

# МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОДНОГТЕВЫХ МЕЛАНОМ

**Д.Е. Мацко**<sup>1, 2</sup>, **М.Ю. Мяснянкин**<sup>3</sup>, **В.В. Анисимов**<sup>3</sup>, **Г.И. Гафтон**<sup>3</sup>, **А.О. Иванцов**<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ГБУЗ «Санкт-Петербургский научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)», Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

<sup>3</sup> ФБГУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Целью настоящей работы явилось исследование морфологических и иммуногистохимических особенностей подногтевых меланом, а также их влияние на прогноз заболевания. Исследовано 40 меланом с морфологически подтвержденным диагнозом «подногтевая меланома». По результатам анализа установлено, что по патоморфологической картине и иммуногистохимическому профилю подногтевые меланомы чрезвычайно гетерогенны. Выявлены основные морфологические факторы, статистически достоверно влияющие на прогноз заболевания: уровень инвазии опухоли по Кларку, изъязвление эпителия, поражение опухолью кости фаланги. В девяти случаях (25,7%) имело место цитоплазматическое окрашивание антителом С-kit (CD117). Экспрессия С-kit в клетках подногтевых меланом позволяет рассматривать их как мишень для ингибиторов С-kit (иматиниб).

*Ключевые слова:* подногтевая меланома, морфологические особенности, С-kit, факторы прогноза

Меланома является одной из наиболее агрессивных злокачественных опухолей кожи. В структуре всех онкологических заболеваний на эту опухоль приходится около 5% [1, 5]. По данным ВОЗ, каждый год в мире от меланомы умирает около 48 000 человек и отмечается рост заболеваемости. Меланома кожи – опухоль визуальной локализации, но более чем у трети пациентов она выявляется уже при наличии метастазов [1, 6]. Акрально-лентигинозная меланома кожи – одна из разновидностей клинико-морфологических типов меланомы. Она возникает на коже пальцев, межпальцевых промежутков, подошв, ладоней, ногтевого ложа и характеризуется определенными клиническими и морфологическими особенностями, отличающимися от меланомы кожи других клинико-морфологических форм [2, 5, 8]. Наиболее частой формой акрально-лентигинозной меланомы у лиц белой расы является подногтевая меланома (ПМ) [2, 5]. Чаще всего фактором риска развития ПМ становится не инсоляция, а различные хронические раздражители, температурные и механические травмы, хирургические вмешательства при заболеваниях ногтей. Диагноз «подногтевая меланома» на поздних стадиях устанавливается без особого труда. Диагностика на ранних стадиях весьма затруднена. Подногтевую меланому в большинстве случаев необходимо дифференцировать с грибковым

поражением ногтевого ложа (онихомикоз), панарицием, подногтевой и подэпидермальной гематомой, бородавкой, кавернозной тромбированной гемангиомой, невусом [2, 4]. По данным литературы, имеют место определенные трудности ранней диагностики ПМ, учитывая многообразие различных патологических процессов в данной области [2, 4].

По данным доступной нам литературы, в России патоморфологические особенности ПМ практически не изучались, а за рубежом представлены ограниченным числом публикаций [4, 5, 8].

Целью настоящей работы было исследование морфологических и иммуногистохимических особенностей подногтевых меланом, а также их влияние на прогноз заболевания.

## Материалы и методы

В настоящем исследовании проанализирована база данных НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, включающая информацию о 2500 пациентов со злокачественной меланомой кожи, проходивших лечение в период с 1991 по 2015 год. Исследован архивный материал лаборатории патологической анатомии НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова. Выявлено 40 радикально прооперированных пациентов с морфологически подтвержденным диагнозом «подногтевая меланома».

Средний возраст пациентов с ПМ на момент установления диагноза составил  $66 \pm 1,6$  года (максимальное и минимальное значения равняются 90 и 40 годам, соответственно), среди женщин этот показатель равнялся  $67 \pm 1$  года, у мужчин –  $64 \pm 3$  года.

В анализируемой группе пациентов было 30 женщин (75%) и 10 мужчин (25%), соотношение 3:1. Наибольшее число пациентов с ПМ отмечалось в интервале старше 70 лет ( $n=19$ ). По этнической принадлежности больные (100%) относились к европеоидной расе.

В структуре поражения пальцев стоп и кистей преобладают большие пальцы, 21 (52,5%) и восемь (20,0%), соответственно (рис. 1).

Стадирование опухолевого процесса проводилось согласно 7-му изданию Руководства по стадированию злокачественных новообразований Объединенного американского комитета по раку (American Joint Committee on Cancer, AJCC, 2009) [3].

Морфологическое изучение материала проводили в соответствии с Международной гистологической классификацией опухолей кожи ВОЗ 2006 года. В каждой опухоли были оценены следующие признаки: гистологический тип меланомы, морфология клеток, изъязвление эпидермиса, наличие пигмента, уровень инвазии по Кларку, толщина опухоли по Бреслоу, митотическая активность с учетом феномена созревания, наличие лимфоидного инфильтрата и степень его выраженности, наличие или отсутствие признаков спонтанной регрессии опухоли.

Морфологическое исследование проведено на срезах толщиной 3–5 мкм с окраской гематоксилином и эозином с целью обзорной гистологической характеристики.

Иммуногистохимическое исследование с использованием панели маркеров (перечень антител приведен в табл. 1) проводили по общепринятой методике на депарафинизированных срезах толщиной 3–4 мкм, расположенных на положительно заряженных стеклах согласно протоколам фирм-производителей, прилагае-



Рис. 1. Число случаев подногтевой меланомы на пальцах рук и ног

Таблица 1  
Характеристика антител, применявшихся в исследовании

| Антитело           | Клон    | Разведение | Производитель    |
|--------------------|---------|------------|------------------|
| BRAF V600E         | VE1     | 1:100      | BOX Spring       |
| C-kit (CD117)      | SP26    | 1:100      | DAKO             |
| S-100 protein      | Poly    | 1:400      | Genemed          |
| PD-1               | NAT 105 | 1:10       | Cell Marque      |
| PD-L1              | Poly    | 1:1000     | Genetex          |
| Melanosome         | HMB45   | 1:100      | Genemed          |
| ALK                | D5F3    | 1:75       | PrimeBioMed      |
| Tyrosinase         | T311    | 1:100      | Leica Biosystems |
| Ki-67              | SP6     | 1:1000     | Cell Marque      |
| MelanA             | A103    | 1:100      | Genemed          |
| Phospho-Histone H3 | Poly    | RTU        | Cell Marque      |

мым к используемым моно- и поликлональным антителам [7, 8]. Интенсивность иммунного окрашивания оценивали визуально и характеризовали как отсутствие реакции, слабая, умеренно выраженная и выраженная экспрессия [7]. Количество опухолевых клеток, экспрессирующих антиген, оценивали полуколичественно: 0 – нет окрашивания, 1+ – окрашивание <5% клеток, 2+ – окрашивание 5–25% опухолевых клеток, 3+ – окрашивание 26–50% клеток, 4+ – окрашивание >50% клеток [7].

Для статистической обработки все данные о пациентах и результатах лечения, клинико-морфологических методов исследования формализованы с помощью кодификатора и внесены в базу, созданную на основе электронных таблиц Excel. Для статистической обработки данных использовался пакет программ IBM SPSS 19.0 (Statistical Package for the Social Sciences software program v. 19.0).

Для определения наиболее значимых независимых факторов, влияющих на отдаленные результаты лечения, использованы методы однофакторного (Log-rank test) и многофакторного анализа регрессионной модели пропорциональных интенсивностей Кокса. При нормальном распределении выборок для определения достоверности различий между ними был применен параметрический t-критерий Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

При гистологическом исследовании всех 40 удаленных операционных препаратов ПМ установлено, что

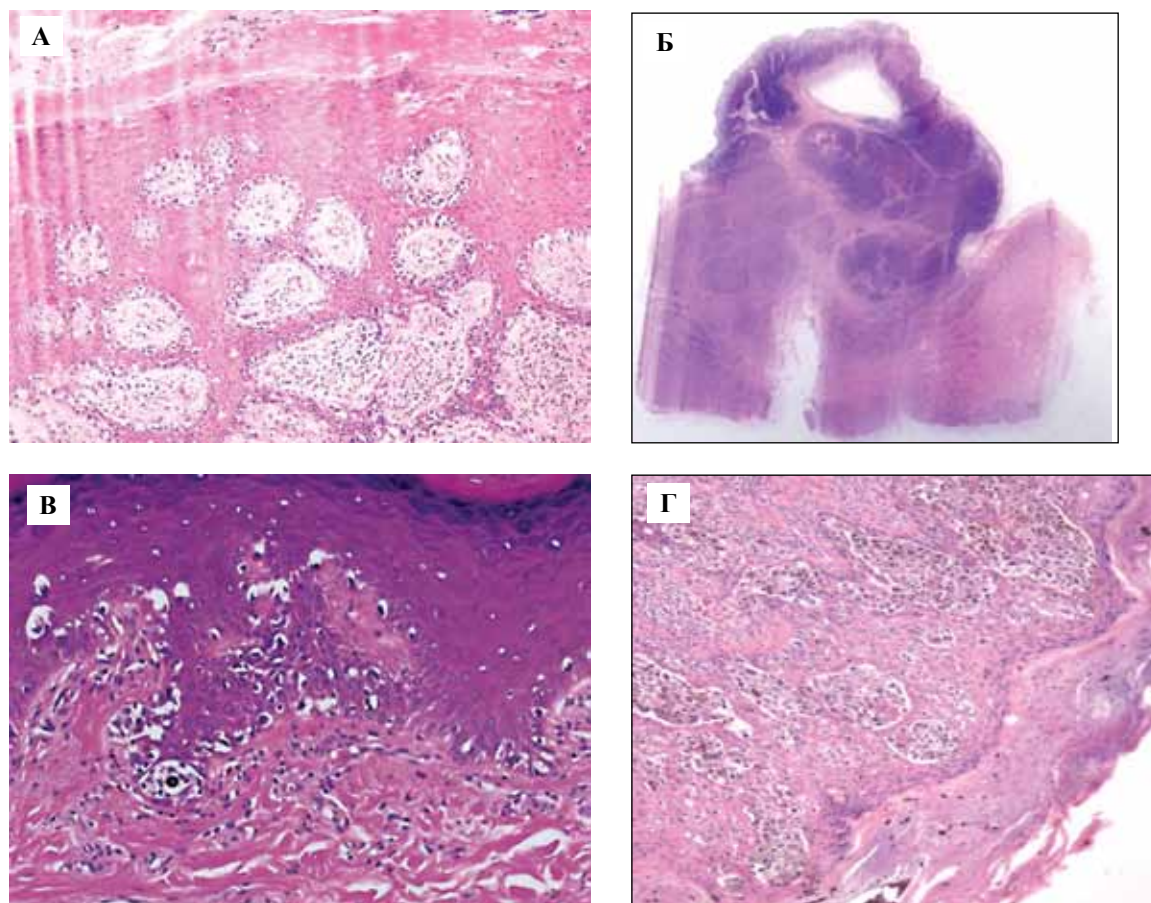


Рис. 2. Гистологические типы подногтевой меланомы. Окраска гематоксилином и эозином.  
 А – акрально-лентигинозная меланнома,  $\times 100$ , Б – узловая меланнома,  $\times 10$ , В – лентигино-меланнома,  $\times 200$ ,  
 Г – поверхностно-распространяющаяся меланнома,  $\times 200$

гистологический тип в 27 наблюдениях (67,5%) оказалась акрально-лентигинозной меланомой, узловой меланомой в семи (17,5%), лентигино-меланомой в четырех (10%), поверхностно-распространяющейся меланомой в двух (5%) случаях (рис. 2).

Основные морфологические особенности ПМ сведены в таблицу 2. В большинстве случаев имелся эпителиоидно-клеточный тип опухоли – 21 (52,5%), в 14 опухолях (35%) – смешанноклеточный. Изъязвление эпидермиса наблюдалось в 27 случаях, что составило 67,5%. Отмечалось отсутствие пигмента или минимальное его количество в ПМ, соответственно, в 17 (42,5%) и в 14 (35%) наблюдениях. Опухоль имела II уровень инвазии по Кларку у одного пациента (2,5%), III – у шести (15%), IV – у 23 (57,5%), V – у 10 (25%). Наиболее часто встречалась толщина опухоли по Бреслоу более 4,1 мм (55%), средняя составила  $5,5 \pm 0,6$  мм (минимальные и максимальные значения равняются 0,2 и 17 мм, соответственно). Средняя митотическая активность составила 30 митозов на  $3 \text{ мм}^2$ . Лимфоидная инфильтрация по степени выраженности в опухоли распределилась в следующем порядке: выраженная – семь (17,5%), умеренно выраженная – 14 (35%) и слабо выраженная –

19 (47,5%). Только в одном случае (2,5%) выявлена частичная спонтанная регрессия ПМ.

В шести случаях (15%) для определения уровня инвазии по Кларку проведена декальцинация пораженной части фаланги. Во всех этих наблюдениях выявлено прорастание опухоли в кость (рис. 3).

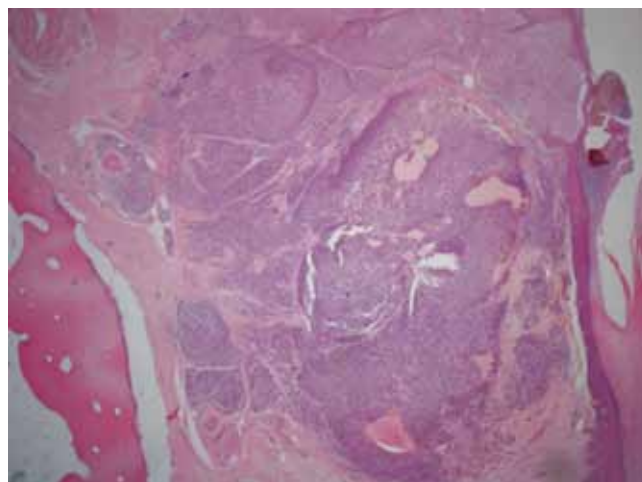


Рис. 3. Прорастание подногтевой меланомы в кость фаланги.  
 Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 25$



Таблица 2

## Морфологические особенности подногтевой меланомы

| № | Признак                                      | Характеристика |
|---|--|----------------|
| 1 | Клеточный тип                                |                |
|   | эпителиоидный                                | 21/40 (52,5%)  |
|   | веретенноклеточный                           | 5/40 (12,5%)   |
|   | невоклеточный                                | 0/40 (0%)      |
|   | смешанный                                    | 14/40 (35%)    |
| 2 | Изъязвление                                  |                |
|   | есть   | 27/40 (67,5%)  |
|   | нет  | 13/40 (32,5%)  |
| 3 | Наличие пигмента                             |                |
|   | нет  | 17/40 (42,5%)  |
|   | фокально <5%                                 | 14/40 (35%)    |
|   | умеренное количество 6–50%                   | 8/40 (20%)     |
|   | выраженная пигментация >50%                  | 1/40 (2,5%)    |
| 4 | Уровень инвазии по Кларку                    |                |
|   | I  | 0/40 (0%)      |
|   | II   | 1/40 (2,5%)    |
|   | III  | 6/40 (15%)     |
|   | IV   | 23/40 (57,5%)  |
|   | V  | 10/40 (25%)    |
| 5 | Толщина по Бреслоу                           |                |
|   | до 1,0 мм                                    | 4/40 (10%)     |
|   | 1,1–2,0 мм                                   | 5/40 (12,5%)   |
|   | 2,1–4,0 мм                                   | 9/40 (22,5%)   |
|   | 4,1 мм и больше                              | 22/40 (55%)    |
| 6 | Митотическая активность на 3 мм <sup>2</sup> |                |
|   | менее 2                                      | 6/40 (15%)     |
|   | 2–5  | 8/40 (20%)     |
|   | 6–10   | 1/40 (2,5%)    |
|   | более 10                                     | 25/40 (62,5%)  |
| 7 | Лимфоидная инфильтрация                      |                |
|   | выраженность                                 |                |
|   | слабо выраженная                             | 19/40 (47,5%)  |
|   | умеренно выраженная                          | 14/40 (35%)    |
|   | выраженная                                   | 7/40 (17,5%)   |
| 8 | Вид регрессии опухоли                        |                |
|   | полная                                       | 0/40 (0%)      |
|   | частичная                                    | 1/40 (2,5%)    |

При иммуногистохимическом исследовании все опухоли экспрессировали S-100 (рис. 4 А). В большинстве случаев выявлялось окрашивание Melan-A (85,7%) (рис. 4 Б). Была выявлена выраженная экспрессия HMB-45, Ki-67, Tyrosinase во всех опухолях (рис. 4 В, Г, рис. 5 А). Результаты нашего анализа продемонстрировали экспрессию C-kit (CD117) в 25,7% всех случаев (рис. 5 Б). Среди ПМ было выявлено по 3,2% BRAF и ALK позитивных случаев (рис. 5 В, Г). В свою очередь, экспрессия PD-1 и PD-L1 во всех опухолях отсутствовала. В описанных случаях уровень Ki-67 варьировал от 1 до 29%. Количество Phospho-Histone H3 положительных клеток в 3 мм<sup>2</sup> было от 1 до 312 при определении митотической активности (рис. 6). Результаты иммуногистохимического исследования ПМ представлены в таблице 3.

Молекулярно-генетический анализ ПМ проводился в трех случаях на наличие мутаций в генах *BRAF*, *C-kit*, *NRAS*. Только в одной опухоли выявлена мутация *C-kit*, коррелировавшая с экспрессией маркера C-kit (CD117), в остальных случаях мутации не выявлены.

Таблица 3

## Результаты иммуногистохимического исследования подногтевой меланомы

| Антиген    | 0  | 1+ | 2+ | 3+ | 4+ | Всего        |
|------------|----|----|----|----|----|--------------|
| S100       | 0  | 0  | 0  | 0  | 35 | 35/35 (100%) |
| C-kit      | 26 | 2  | 0  | 3  | 4  | 9/35 (25,7%) |
| BRAF       | 30 | 0  | 0  | 0  | 1  | 1/31 (3,2%)  |
| ALK        | 30 | 0  | 0  | 0  | 1  | 1/31 (3,2%)  |
| HMB45      | 0  | 1  | 0  | 1  | 5  | 7/7 (100%)   |
| Melan A    | 1  | 1  | 0  | 0  | 5  | 6/7 (85,7%)  |
| PD-1       | 30 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0/30 (0%)    |
| Tyrosinase | 0  | 0  | 0  | 0  | 5  | 5/5 (100%)   |
| PD-L1      | 30 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0/30 (0%)    |

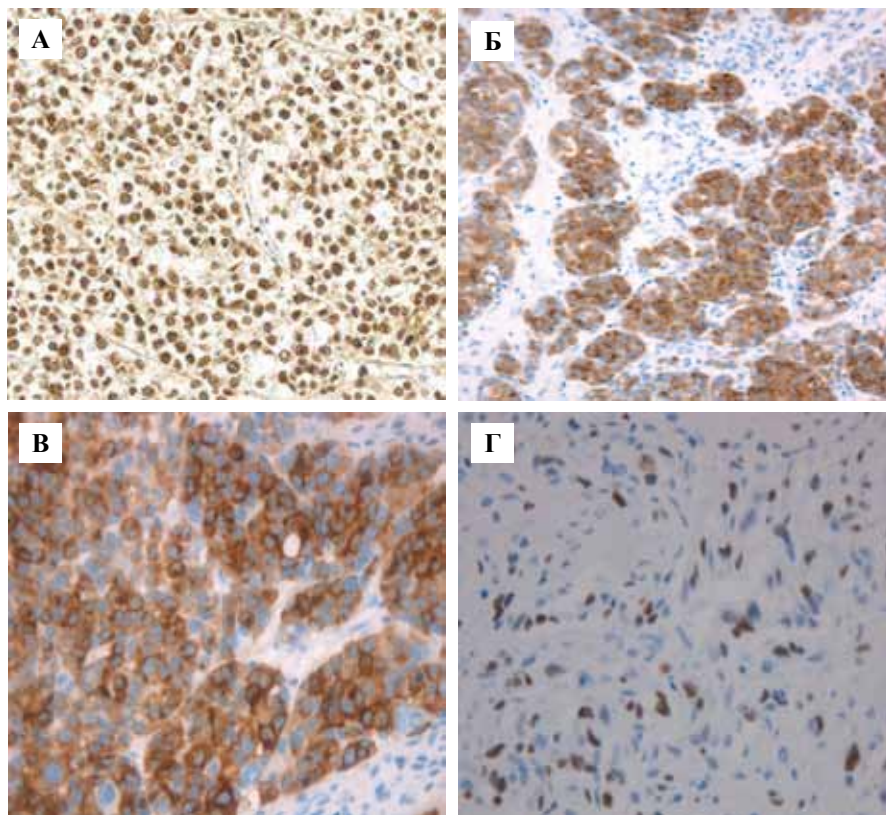


Рис. 4. Иммунопрофиль подногтевой меланомы.

А – цитоплазматическое окрашивание S-100, ×200, Б – цитоплазматическое окрашивание Melan A, ×200, В – цитоплазматическое окрашивание HMB45, ×400, Г – ядерная экспрессия Ki 67, ×400

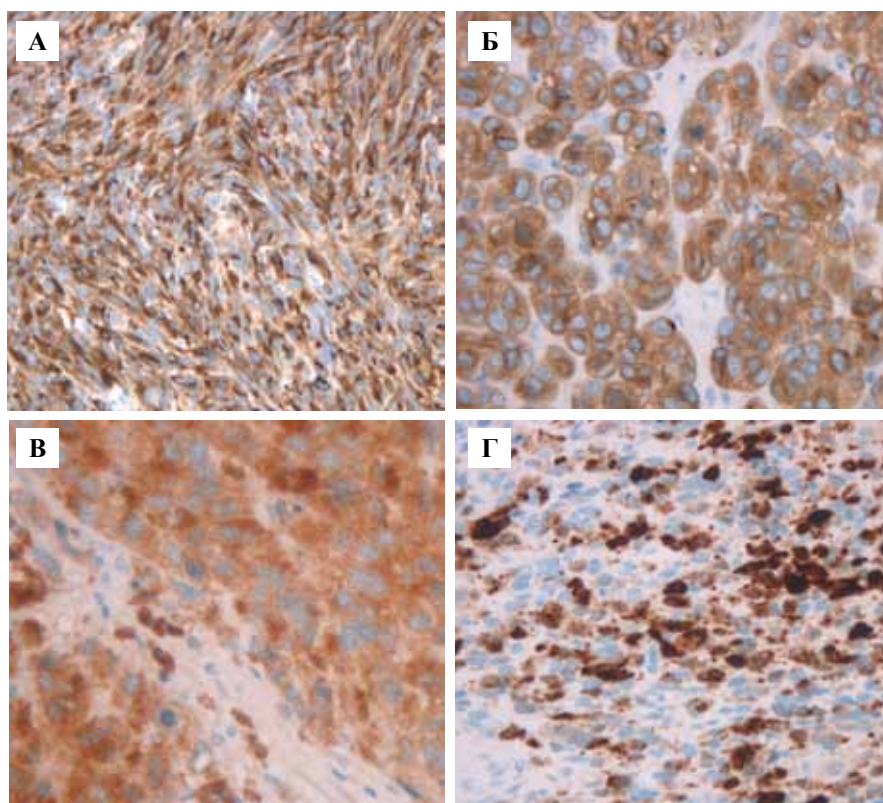


Рис. 5. Иммунопрофиль подногтевой меланомы.

А – цитоплазматическое окрашивание Tyrosinase, ×200, Б – цитоплазматическое окрашивание C-kit, ×400, В – цитоплазматическое окрашивание BRAF, ×400, Г – цитоплазматическое окрашивание ALK, ×400

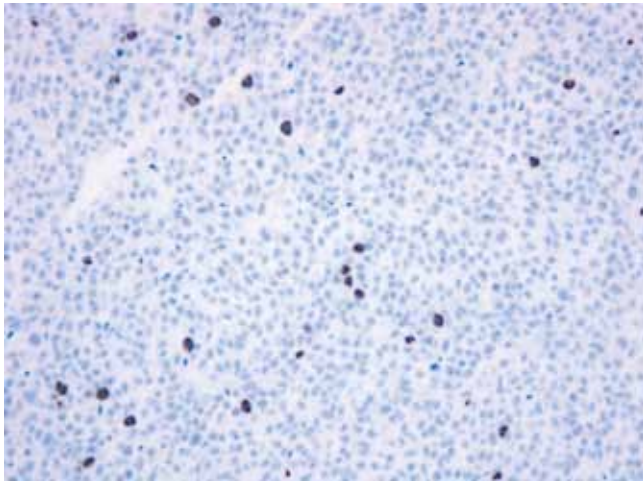


Рис. 6. Определение митотической активности в подногтевой меланоме. Ядерное окрашивание Phospho-Histone H3,  $\times 200$

Для определения наиболее значимых независимых факторов, влияющих на отдаленные результаты лечения, использованы методы однофакторного (Log-rank test) и многофакторного анализа регрессионной модели пропорциональных интенсивностей Кокса (табл. 4).

### Выводы

1. Подногтевая меланомы – морфологически и иммуногистохимически гетерогенная группа меланокитарных новообразований, составляющая 1,6% от всего числа меланом. Среди подногтевых меланом преобладают беспигментные формы (42,5%), акрально-лентигинозный тип строения (67,5%).

2. Высокая частота IV уровня инвазии по Кларку (57,5%) и средняя толщина опухоли по Бреслоу (5,5 мм) свидетельствуют о поздней диагностике подногтевых меланом и вместе с изъязвлением эпителия кожи и поражением костей фаланг пальцев ухудшают прогноз заболевания.

3. Экспрессия C-kit в клетках подногтевых меланом позволяет рассматривать их как мишень для ингибиторов C-kit (иматиниб).

### Литература

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., ред. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. 250 с.

## MORPHOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF SUBUNGUAL MELANOMA

**D.E. Matsko**, M.Y. Myasnyankin, V.V. Anisimov, G.I. Gafton, A.O. Ivantsov

The aim of this work was to study the morphological and immunohistochemical characteristics of subungual melanomas (SM) and their effect on the prognosis of the disease. Forty cases of melanoma with morphologically confirmed diagnosis of subungual melanoma were investigated. According to the results

Таблица 4

### Влияние факторов прогноза на отдаленные результаты лечения подногтевой меланомы

| Фактор прогноза           | Многофакторный анализ (Cox) | Однофакторный анализ (Log-rank Test) |
|---------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| Изъязвление ПМ            | $p=0,03$                    | $p=0,04$                             |
| Уровень инвазии по Кларку | $p=0,07$                    | $p=0,03$                             |
| Поражение кости фаланги   | $p=0,04$                    | $p=0,03$                             |

[Caprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V., eds. Malignant neoplasms in Russia in 2015 (morbidity and mortality): Management. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена is a branch of the Federal Medical and Biological Center NIIRT of the Russian Ministry of Health, 2017. 250 s. (In Russ.)].

2. Кудрявцева Г.Т., Борисова Т.Н., Неборак Ю.Т., Курильчик А.А. Клинико-диагностические особенности акральной меланомы кожи и результаты комплексного лечения // Российский онкологический журнал. 2006. № 1. С. 14–17. [Kudryavtseva G.T., Borisova T.N., Neborak Yu.T., Kurilchik A.A. Clinical and diagnostic features of the acral melanoma of the skin and the results of complex treatment // Russian Cancer Journal. 2006. V. 1. P. 14–17. (In Russ.)].
3. Balch C.M., Gershenwald J.E., Soong S.J. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification // J Clin Oncol. 2009;27:6199–206.
4. Barnhill R.L., Piepkorn M., Busam K.J., eds. Pathology of Melanocytic Nevi and Melanoma. 3 rd ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2014. 647 p.
5. Cohen T., Busam K.J., Patel A. Subungual melanoma: management considerations // Am J Surg. 2008;195:240–48.
6. Garbe C., Peris K., Hauschild A., Saiag P. et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016 // Eur J Cancer. 2016;63:201–17.
7. Gown A.M., Yaziji H. Immunohistochemical markers of melanocytic tumors // International journal of surgical pathology. 2003;11(1):11–5.
8. Massi G., LeBoit P. Histological diagnosis of nevi and melanoma. 2 nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2014. 752 p.



of the analysis, it was revealed that SM were extremely heterogeneous in pathomorphological pattern and immunohistochemical profile. The main morphological factors statistically significantly influencing the disease prognosis were identified as follows: Clark's level of invasion, ulceration of the epithelium, and tumor lesion of the bone of the phalanx. In nine cases (25.7%), cytoplasmic staining with C-kit antibody (CD117) occurred. Expression of C-kit in SM cells allows considering them as a target for C-kit inhibitors (imatinib).

*Key words:* subungual melanoma, morphological features, C-kit, prognostic factors

### **Информация об авторах**

Мяснянкин Михаил Юрьевич – кандидат медицинских наук, НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова.

Адрес: 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68. Телефон 8 921 872 3823. E-mail: oncologmisha@gmail.com

Анисимов Валентин Вадимович – доктор медицинских наук, НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова.

Адрес: 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68. Телефон 8 921 952 4158. E-mail: anisimov.doctor@gmail.com

Гафтон Георгий Иванович – доктор медицинских наук, профессор НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова.

Адрес: 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68. Телефон 8 921 956 4771. E-mail: doc-tor@mail.ru

Иванцов Александр Олегович – кандидат медицинских наук, НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова.

Адрес: 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68. Телефон 8 911 932 7592. E-mail: shurikiv@mail.ru

*Материал поступил в редакцию 21 июня 2017 года*