
Význam intermediárního filamenta nestinu v progresi maligního melanomu

Brychtová S.¹, Fiurášková M.¹, Brychta T.², Hirňák J.³

¹Ústav patologie, Laboratoř molekulární patologie, LF UP a FN, Olomouc

²Interní ambulance, SPEA Olomouc, s.r.o.,

³Oddělení plastické a estetické chirurgie, LF UP a FN, Olomouc

Souhrn

Nestin je jedno z intermediárních filament exprimovaných v proliferujících neuronálních progenitorových buňkách CNS a PNS (centrálního a periferního nervového systému). Jeho postnatální reexprese se objevuje zejména u nádorů CNS a koreluje s vysokým stupněm malignity. Naše studie je zaměřena na sledování exprese nestinu u benigních a maligních kožních melanocytárních lézí, s cílem zjistit prognostický význam tohoto proteinu. Vyšetřili jsme 127 bioptických vzorků, z nichž bylo 42 nodulárních melanomů (NM), 32 superficiálních melanomů (SSM), 10 dysplastických névů (DN) a 43 běžných intradermálních i dermoepidermálních pigmentových névů. Prokázali jsme významné zvýšení exprese nestinu u jednotlivých typů melanomů, zejména u melanomů nodulárních. Protein byl lokalizován zvláště v periferních, invazivních částech tumoru. Závěr: Sledování nestinu by mohlo být důležitým doplňkem ostatních melanomových markerů.

Klíčová slova: pigmentové névy – maligní melanom – nestin – nádorová progresie

Summary

The Role of Intermedial Filament Nestin in Malignant Melanoma Progression

Nestin is one of intermedial filaments exprimed in proliferating progenitor cells of the CNS and PNS (central and peripheral nervous system). Postnatal reexpression of the protein occurs mainly in CNS tumors and correlates with a high grade of malignancy. The aim of our study is assessment of the nestin expression in benign and malignant skin melanocytic lesions with respect to presume a prognostic role of this protein. We examined 127 bioptic specimens, including 42 nodular melanomas (NM), 32 superficial spreading melanomas (SSM), 10 dysplastic nevi and 43 common intradermal or dermoepidermal nevi. We proved significant increase in nestin expression in melanoma groups, especially in nodular melanomas, where nestin was localized mainly in the peripheral, invasive areas of the tumor mass. Conclusion: Detection of nestin expression might be used as an additional melanocytic tumour marker.

Key words: common nevi – malignant melanoma – nestin – tumour progression

Čes.-slov. Patol., 41, 2005, No. 4, p. 143–145

Nestin je protein, který patří k intermediárním filamentům. Bývá označován za marker neuroektodermových kmenových a progenitorových buněk, protože je fyziologicky ve vysokých koncentracích exprimován buňkami CNS během embryogeneze. Během maturace a diferenciaci multipotentních neurálních prekursorů do neuronů a astrocytů je nestin postupně nahrazován vimentinem a u gliálních buněk posléze GFAP (gliální kyselý fibrilární protein). Postnatálně je pak jeho exprese v CNS omezena pouze na subventrikulární zónu a na endotel cév (14, 16). Reexprese nestinu je však popisována u některých patologických stavů CNS, které jsou charakterizovány zvýšením proliferace gliálních elementů, jako jsou záněty a traumata (6). Signifikantní zvyšování hladin nestinu bylo popsáno dále u lidských gliomů a zejména glioblastomů (2, 4, 7), kde jeho exprese koreluje s diferenciací léze (14). Nověji byl nestin u dospělých jedinců prokázán rovněž

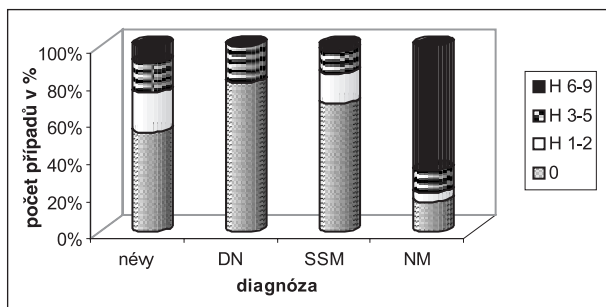
v progenitorových buňkách vlasového folikulu (8) a kožních kmenových buňkách, které jsou schopny neuronální, adipocytární nebo fibroblastové diferenciaci (16). Nestin byl rovněž detekován u populace normálních nebo hyperplastických Leydigových buněk a u testikulárních malignit rovněž v buňkách Sertoliho (9).

Během embryogeneze se skupina migrujících buněk, známých jako buňky neurální lišty, derivuje z neurální trubice. Z této lišty vznikají periferní neurony, Schwannovy buňky, sekreční buňky periferního neuroendokrinního systému, stejně jako melanocyty (13). Některé tyto buňky mohou rovněž nestin v různých koncentracích a za určitých podmínek exprimovat. Ze studií, které se cíleně zabývají problematikou neuroektodermových tumorů, vyplývá, že imunohistochemické sledování exprese nestinu může být důležitým rozlišujícím znakem mezi zralými a nezralými elementy (4, 11).

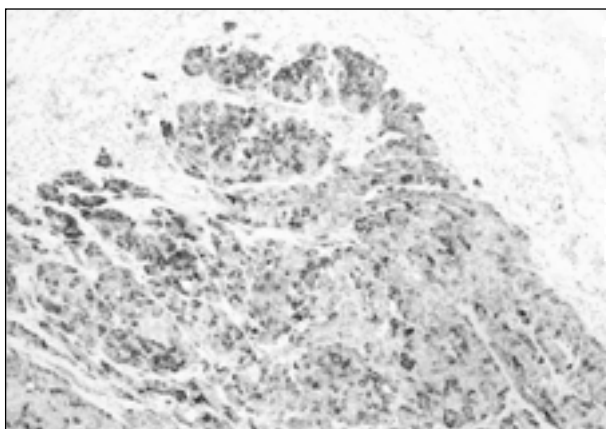
Cílem naší studie bylo zjistit a porovnat expresi nestinu u maligních a benigních melanocytárních kožních lézí.

Materiál a metodika

Do studie bylo zařazeno 127 bioptických vzorků, z nichž bylo 42 nodulárních melanomů (NM), 32 superficiálních melanomů (SSM), 10 dysplastických névů a 43 běžných intradermálních i dermoepidermálních pigmentových névů. Pro detekci byly využity formalínem fixované řezy, zalité do parafinu. Tkáňové řezy o šíři 5 μm byly zpracovány nepřímou imunohistochemickou technikou s použitím primární monoklonální myší anti-*nestin* protilátky fy Chemicon International v ředění 1 : 200. Po odparafinování a zavodnění řezů následovalo demaskování antigenů v mikrovlnném generátoru 1krát 20 minut a zrušení endogenní peroxidázové aktivity. Poté byly řezy inkubovány přes noc s primární protilátkou. Po promytí následovala detekce pomocí EnVision plus kitu (DakoCytomation, Dánsko) po dobu 60 minut při pokojové teplotě a vizualizace s AEC (aminoethylcarbazolem) jako chromogenem. Jako pozitivní kontrolu jsme užili tkáň glioblastomu. Hodnocení bylo provedeno semikvantitativně výpočtem H-skóre (procento pozitivních buněk násobené intenzitou zbarvení). Případy tak byly rozděleny do čtyř skupin: negativní, slabá exprese H1-2, střední exprese H3-5 a silná exprese H6-9. Výsledky byly statisticky analyzovány Chi-kvadrát testem ($p < 0.05$).



Obr. 1. Graf znázorňuje zvyšující se expresi nestinu u skupiny nodulárních melanomů (NM) ve srovnání se skupinou superficiálních melanomů (SSM), dysplastických névů (DN) a benigních pigmentových névů. Pro hodnocení bylo použito H-skóre

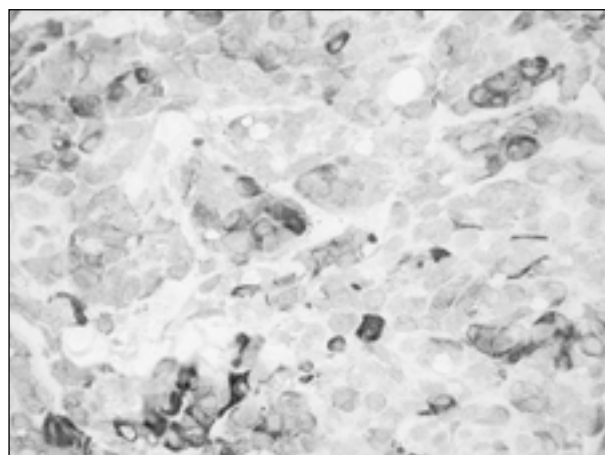


Obr. 2. Výrazná cytoplazmatická exprese nestinu nádorovými buňkami, zejména v periferních oblastech nodulárního maligního melanomu (AEC, 100krát)

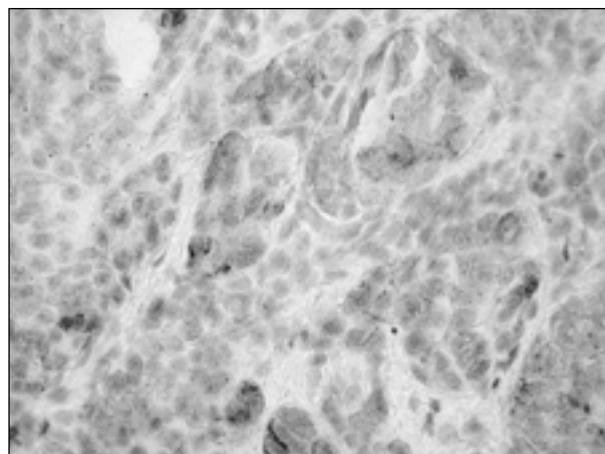
bovány přes noc s primární protilátkou. Po promytí následovala detekce pomocí EnVision plus kitu (DakoCytomation, Dánsko) po dobu 60 minut při pokojové teplotě a vizualizace s AEC (aminoethylcarbazolem) jako chromogenem. Jako pozitivní kontrolu jsme užili tkáň glioblastomu. Hodnocení bylo provedeno semikvantitativně výpočtem H-skóre (procento pozitivních buněk násobené intenzitou zbarvení). Případy tak byly rozděleny do čtyř skupin: negativní, slabá exprese H1-2, střední exprese H3-5 a silná exprese H6-9. Výsledky byly statisticky analyzovány Chi-kvadrát testem ($p < 0.05$).

Výsledky

Výsledky jsou shrnuty v obr. 1. Imunohistochemická analýza prokázala, že 35 ze 42 (84 %) nodulárních melanomů, 10 ze 32 (31 %) superficiálních melanomů, 2 z 10 (20 %) dysplastických



Obr. 3. Difuzní zbarvení nestinu v buňkách maligního melanomu (AEC, 400krát)



Obr. 4. Nestin je exprimován pouze v drobných skupinách buněk pigmentového névu (AEC, 500krát)

névů a 20 ze 43 (47 %) běžných névů vykazovalo detekovatelnou pozitivitu nestinu. Protein byl lokalizován typicky intracytoplazmaticky. U maligních lézí byl nestin exprimován zejména v periferních oblastech vykazujících infiltrativní růst (obr. 2), méně často byl distribuován víceméně rovnoměrně celým nádorem (obr. 3). Převažovala střední až silná exprese. U névových lézí jsme přítomnost nestinu zaznamenali pouze v rozptýlených, drobných skupinách buněk a nebo jen v ojedinelých melanocytech, i intenzita zbarvení byla slabá (obr. 4). Většina pigmentových lézí byla negativních. Statistická analýza potvrdila signifikantní rozdíly v expresi nestinu mezi skupinou nodulárních melanomů a dalšími skupinami zahrnujícími superficiální melanomy ($p = 0,0001$), dysplastické névy ($p = 0,0004$) a běžné pigmentové névy ($p = 0,0001$).

Diskuse

Získané poznatky o reexpresi nestinu u melanocytárních lézí přispívají k porozumění procesům, ke kterým dochází během maligní transformace. Zatímco nestin nebyl detekován ve zralých, diferencovaných neurogenických buňkách jako jsou Schwannovy buňky a nenádorové melanocyty, znovu se objevuje u melanocytárních nádorů. Zdá se, že dochází k opětovné reaktivaci genu pro nestin u buněk, u kterých byl tento gen aktivní během embryonálního vývoje. Objevuje se tedy otázka, zda změny v periferním nervovém systému jsou analogické procesům probíhajícím v CNS. Mohli bychom tedy očekávat korelaci mezi expresí nestinu a stupněm malignity nádorů. Autoři Florenes et al. (5) popisují vyšší hladiny nestinu u nádorových metastáz ve srovnání s primárními lézemi. Není tedy vyloučeno, že exprese nestinu může korelovat rovněž s metastatickým potenciálem tumoru. Tak by se dalo vysvětlit i zjištění, že vyšší koncentrace nestinu se často objevuje v periferních oblastech nádoru s invazivním růstem. Můžeme předpokládat, že na periférii se selektují nezralější klonové populace s vyšším invazivním potenciálem (10).

Nestin může ovlivňovat i intercelulární interakce mezi nádorovými a stromálními buňkami a zvyšovat tak angioinvasivitu nádorových buněk (1, 3). O biologické funkci nestinu se předpokládá, že toto intermediární filamentum se účastní migrace, proliferace a strukturální remodelace buněk (12, 15). Vyšší hladiny nestinu u nezralých a hojně proliferujících buněk mohou těmto buňkám umožňovat vyšší dynamiku a motilitu a teprve později u diferencovaných a stálých linií je nestin nahrazován jinými intermediárními fi-

lamenty (16). V naší studii jsme prokázali zvyšující se expresi nestinu u maligních primárních kožních melanomů, zejména u pokročilejších stadií onemocnění. Zdá se, že sledování nestinu by mohlo být důležitým doplňkem ostatních melanomových markerů, který svědčí pro dediferenciaci, a tím nepřímo i pro vyšší agresivitu léze.

Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR 1A/8245-3/2004 a MSM 6198959216.

Literatura

1. **Blagosklonny, M.V.:** Antiangiogenic therapy and tumor progression. *Cancer Cell*, 5, 2004, s. 3–17.
2. **Dahlstrand, J., Collins, V.P., Lendahl, U.:** Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res.*, 52, 1992, s. 5334–5341.
3. **Dvorak, H.F. Rous-Whipple Award Lecture:** How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am. J. Pathol.*, 162, 2003, s. 1747–1757.
4. **Ehrmann, J., Kolar, Z., Mokry, J.:** Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours. *J. Clin. Pathol.*, 58, 2005, s. 222–223.
5. **Florenes, V.A., Holm, R., Myklebost, O., et al.:** Expression of the neuroectodermal intermediate filament nestin in human melanomas. *Cancer Res.* 54, 1994, s. 354–356.
6. **Jin, J.K., Jeong, B.H., Na, Y.J. et al.:** Increased expression of the embryonic intermediate filament, nestin, in the brains of scrapie-infected mice. *Neurosci. Lett.*, 367, 2004, s. 254–258.
7. **Kurihara, H., Zama, A., Tamura, M., et al.:** Glioma/glioblastoma-specific adenoviral gene expression using the nestin gene regulator. *Gene Ther.*, 7, 2000, s. 686–693.
8. **Li, L., Mignone, J., Yang, M. et al.:** Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 100, 2003, s. 9958–9961.
9. **Lobo, M.V., Arenas, M.I., Alonso, F.J. et al.:** Nestin, a neuroectodermal stem cell marker molecule, is expressed in Leydig cells of the human testis and in some specific cell types from human testicular tumours. *Cell Tissue Res.*, 316, 2004, s. 369–376.
10. **Mokry, J., Cizkova, D., Filip, S. et al.:** Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev.*, 13, 2004, s. 658–664.
11. **Redies, C., Lendahl, U., McKay, R.D.:** Differentiation and heterogeneity in T-antigen immortalized precursor cell lines from mouse cerebellum. *J. Neurosci. Res.*, 30, 1991, s. 601–615.
12. **Sejersen, T., Lendahl, U.:** Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J. Cell Sci.*, 106, 1993, s. 1291–1300.
13. **Stemple, D.L., Anderson, D.J.:** Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell*, 71, 1992, s. 973–985.
14. **Sugawara, K., Kurihara, H., Negishi, M. et al.:** Nestin as a marker for proliferative endothelium in gliomas. *Lab. Invest.*, 82, 2002, s. 345–351.
15. **Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G. et al.:** Nestin expression—a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol. Life Sci.*, 61, : 2004, s. 510–522.
16. **Yang, L.Y., Zheng, J.K., Liu, X.M., et al.:** Culture of skin-derived precursors and their differentiation into neurons. *Chin. J. Traumatol.*, 7, 2004, s. 91–95. MUDr. Svetlana

MUDr. Světlana Brychtová, Ph.D.

Ústav patologie, Laboratoř molekulární patologie

Hněvotínská 3

775 15 Olomouc

tel: 58 563 2455

e-mail: svetlana.brychtova@seznam.cz