



**Резюме на проект по Фонд „Наука“ № 19005 – Конкурсна сесия 2019:
„Сравнителен анализ на имунохистохимичната експресия на Cyclin D1,
BCL2 и p53 в меланоцитни невуси и кожни меланоми, с цел изготвяне на
диагностичен алгоритъм“**

Ръководител: Гл. ас. д-р Ина Георгиева Кобакова, дм

Изследователи, участващи в разработването на проекта:

- ❖ Ръководител на проекта: д-р Ина Георгиева Кобакова, дм, главен асистент, факултет Дентална медицина, катедра „Медико-биологични науки“;
- ❖ Главен изследовател по проекта, административен и финансов отговорник: д-р Лиляна Николова Петкова, асистент-докторант, факултет Медицина, катедра „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“;
- ❖ Изследовател по проекта: д-р Георги Стоянов Стоянов, асистент-докторант (специализант), факултет Медицина, катедра „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“;
- ❖ Изследовател по проекта: Цветомила Димитрова Кючукова, студент четвърти курс, специалност Медицина, МУ-Варна;
- ❖ Изследовател по проекта: Виктор Светошаров Желев, студент четвърти курс, специалност Медицина, МУ-Варна;
- ❖ Изследовател по проекта: Жеко Янков Колев, студент четвърти курс, специалност Медицина, МУ-Варна.

Обосновка на необходимост от провеждане на изследването:

При хора, кожният меланом е един от най-злокачествените тумори, който често рецидивира и метастазира по лимфогенен път и хематогенно в почти всички органи. От страна на организма имунна реакция срещу тумора липсва или е слабо проявена и прогресията на меланом е изключително бърза и агресивна.

Рисковите фактори и причини за възникване на меланом са разнообразни, но най-голямо значение имат облъчването на кожата с ултравиолетови лъчи и слънчевите изгаряния, особено при хора със светла кожа. Други фактори, имащи отношение към появата на неоплазмата са генетичното предразположение, възраст над 50 години, други. Често меланом възниква от предшестващи невуси, като множествените невуси увеличават риска от развитието на меланом.

Появата и прогресията на неоплазмите е асоциирана с нарушение в баланса между клетъчния растеж и клетъчната смърт, процеси, в които участват редица протеини.

Циклин D1 е белтък, който образува комплекс с циклин-зависимите кинази CDK4 и CDK6. Циклин D1/CDK4 или циклин D1/CDK6 активират (фосфорилират) ретинобластомния Rb протеин (туморен супресор) и клетката преминава от G1 в S фаза на клетъчния цикъл. Мутации, амплификация и свръхекспресия на циклин D1 гена ускорява клетъчния цикъл и деленето на клетките, промени които често се наблюдават при туморите и могат да участват в туморната онкогенеза.

Протеин BCL2 е антиапоптоичен протеин, спомагащ за клетъчното оцеляване и инхибира действието на проапоптоичните протеини.

Протеинът p53 е транскрипционен фактор, регулиращ клетъчния цикъл, изпълнява функцията на супресор при злокачествените новообразувания и се явява „пазител“ на генома.

Публикации от проучвания за експресията на Cyclin D1 и BCL2 в меланом и бенигнни пигментни лезии (неви) 2016 г. Jessica Donigan, Jacquelin De Luca and Christopher Lum, установяват сигнификантна разлика в Cyclin D1 експресията при сини неви и подобния на син невус малигнен меланом. В нормална кожа няма Cyclin D1 експресия (Анна Алексеенко и съавтори 2010 г.), бенигнените неви имат зонална експресия, диспластичните неви свръхекспресират, като експресията корелира със степента на цитологичен атипизъм (Carol Ewanowich, Russel K. Brynes, Jeffrey Medeiros, Althea McCourthy, Raymond Lai 2001 г.). Според Zainal Abidin и съавтори 2012 г., акралният меланом експресира сигнификантно Cyclin D1, за разлика от неакралните меланоми. Eduard R. Sauter и съавтори 2002 г., установяват експресия на Cyclin D1, както в акрални, така и в лентиго малигна меланом и суперфициално напредващ меланом. BCL2 имунореактивността е позитивна както при неви, така и при меланоми, но намалява при малигнените лезии (M. Carmen Saenz-Santamaria и съавтори 1994 г.). Според други изследователи, BCL2 експресията е идентична в неви и меланоми (E. Selzer и съавтори 1998 г.), т. е. резултатите не показват ясна и конкретна разлика и значимост. P53 protein експресията, изследвана в Spitz неви, ординерни неви и малигнени меланоми, манифестира детерминираща разлика, според Reuven Bergman и съавтори 1995 г., с висока диференцираща експресия при меланомите.

Цел на настоящото изследване е да се проучи имунохистохимичната експресия на протеините: Cyclin D1, BCL2 и P53 при конвенционални невуси и кожни меланоми, с оглед изясняване на патогенетичната им роля в прогресията на меланоцитните лезии и изготвяне на диагностичен алгоритъм. За доказване меланоцитния характер при бедните на пигмент (ахроматични) кожни лезии ще се използват синхронно S100 protein и Melanosome clone HMB45. Първият маркер за меланоцитна диференциация е високо сензитивен с ниска специфичност. По-голямата част от меланоцитните лезии,

включително амеланотичния меланом и метастазите от тези тумори, са имунореактивни и позитивират нуклеарна и цитоплазмена експресия. Melanosome clone HMB45, високо сензитивен и висока специфичен маркер, за меланин продуциращите клетки, ще се използва за отграничаване на S100 protein позитивните немеланоцитни тумори от истинските пигментни (меланоцитни) неоплазии.

Изследователски задачи:

- ❖ Да се проучи експресията на Cyclin D1 при конвенционални пигментни невуси, атипични невуси, малигнени меланоми и контролно в епидермиса на съседната на неоплазмите кожа;
- ❖ Да се изследва експресията на BCL2 при конвенционални пигментни невуси, атипични невуси, малигнени меланоми и в епидермиса на съседната на неоплазмите кожа;
- ❖ Да се оцени експресията на P53 в при конвенционални пигментни невуси, атипични невуси, малигнени меланоми и в епидермиса на съседната на неоплазмите кожа.

Дизайн и организация на научното изследване:

Изследването е ретроспективно и ще бъде извършено върху архивни биопсични материали, включени в парафин. Срези с дебелина 3-4 μm ще бъдат оцветени с хемалаун-еозин за оценка на хистологичните промени и имунохистохимично изследвани с Dako Autostainer Link48 – автоматична система за приготвяне на имунохистохимични оцветявания. Оценката на хистологичните препарати и на експресията на изследваните антители ще се извърши със светлинен микроскоп Leica. Препаратите ще бъдат съхранени с помощта на скенер Leica Aperio AT2 – автоматизирана система за сканиране на изготвени хистологични срези, съвместима с хистохимични и имунохистохимични оцветявания. В изследването ще бъдат включени 4 групи материали: от конвенционални невуси, от атипични невуси, от меланоми и контролна група от кожа в съседство на неоплазмите. Материалът за изследването е селективен, подбран от архивни парафинови блокчета с пигментни тумори, диагностицирани в ДКЦ 2 ЕООД Добрич и КОКП „Св. Марина“ Варна и включва таргетната група от 80 случая с конвенционални невуси, атипични невуси и малигнени меланоми. Контролната група ще бъде представена от 20 случая с непроменена кожа.

Методология, включително и използвани статистически методи за анализ на данните.

Изследването ползва приложими класически методи – ретроспективно проучване на срези от архивни парафинови блокчета, обработени по стандартни хистологични и имунохистохимични методи, наблюдение и оценка на светлинна микроскопия.

Статистическа оценка и анализ, базирани на следните методи:

- ❖ дескриптивен (изчисляване на средна аритметична величина, стандартно отклонение на количествените признаци);
- ❖ непараметричен анализ (чрез кростабулация и критерий на Pearson);
- ❖ параметричен (корелационен) анализ;
- ❖ мултифакторен регресионен анализ (формиране на регресионен модел, в който всеки фактор има определена тежест за развитието на наблюдавания резултат).

Анализ на резултатите, статистическа оценка, формулиране на изводи от проведеното изследване и публикуване на резултатите.

Преценка на водещия изследовател относно ползите от провежданото изследване:

Изследваният проблем има отношение към диагностиката на меланоцитните лезии, трудно разпознаващи се като малигнени хистологично, т.е. резултатите ще служат на ранната диагностика на малигнените меланоми, подобряваща успеваемостта от лечението – съществува пряка връзка между ранната диагностика и успеха от лечението. В теоретичен план проучването ще предостави информация за развитието на меланома от предшестващи атипични лезии и възможност за по – точно прогнозиране на такова развитие. Резултатите ще обогатят биопсичната преценка и могат да дадат възможност за определяне на високо рискови групи пациенти, които биха имали полза от ранни профилактични и/или лечебни мероприятия.

Книгопис:

1. J S Chana, G D Wison, I A Cree, R A Alexander, N Myatt, M Neale, J L Hungenford “c-мус, p53 and BCL2 expression and clinical outcome in uveal melanoma 1999 Br J Ophthalmol, 83:110-114
2. Jurgen Eberle and Amir M. Hossini “Expression and function of BCL2 protein in melanoma” 2008 Current genomics 9, 409-419
3. Meryem Bektas, Puneet SJolly, Carola Muller, Jurgen Eberle, Sara Spiegel, Cristoph C Geilen “Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of BCL2 expression Oncogene (2005)24, 178-187
4. Jessica M. Donigan, Jacqueline De Luca, Christopher Lum “CyclinD1 and p16 expression in blue nevi and malignant melanoma” Appl immunohistochem Mol Morphology 2016: 00:000-000
5. Carol Ewanowich, Russel K. Brynes, L. Jeffrey Medeiros, Althea Mc Courty, Raymond Lai “CyclinD1 expression in dysplastic nevi” Arch Pathology Lab Med – vol 125, February 2001
6. Anna Alekseenko, Anna Wojas, Grzegorz J. Lis, Alicja Furgal, Grzegorz Suriwka, Jan A. Litwin “CyclinD1 and D3 expression in melanocytic skin lesions Arch Dermatol Res (2010)302:545-550

7. Zainal Abidin Ibrachim, M Zulkarnaen A Narihan, Norlida A OJep, Ashley Edwards Soosay and Kok Long Pan "CyclinD1 expression in acral melanoma: a case control study in Sarawak" *Malaysian J Pathology* 2012;34(2):89-95
8. M. Carmen Saenz Santamaria, Jon Reed, N. Scott McNutt and Christopher R. Shea "Immunohistochemical expression of BCL2 in melanomas and intradermal nevi" *Jurnal of cutaneous pathology* 1994 393-397
9. E. Selzer, H. Schlagbauer Wadl, I. Okamoto, H. Pehamberger, R. Potherr and B. Jansen "expression of BCL2 in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma celllines" *Melanoma research* 1998,8, 197-203
10. Reuven Bergman, Avner SHEMER, Rivka Levy, Rach Friedman-Birnbaum, Henri Trau and Chaim Lichtig "immunohistochemical study of p53 protein expression in Spitz nevi as compared with other melanocytic lesions *The American Journal of dermathology*17(6):547-550,1995
11. Mario Cristofolini, Sebastiana Boi, Salvatore Girlando, Giuseppe Zumiani, Paolo Cristofolini, Paolo Dalla Palma, Claudio Doglini, Matia Barbareschi "p53 protein expression in nevi and melanomas" *Arch Dermatol-vol* 129 june 1993
12. David Weinstein, Jennifer Leninger, Carl Hamby, Bijan Safai Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma 2014 *Clinical aesthetic dermatology volume7* (6):13-24
13. Jakob Pitkovski, Ehud Shahar, Elina Aizenshtein, Raphael Gorodetsky Melanoma ahtigens and relatedimunological markers *Critical Reviews in oncology* 115(2017) 36-49
14. Jochen Utikal, C. Becker, Selma Uguler "Diagnostic and prognostic biomarcers in melanoma: current state of play" *Current clinical pathology*, DOI10.1007/978-1-60761-433-3-2 Springer 2012
15. H. Gogas, A. M. M. Eggermont, A.Hauschild, P. Hersey, P. Moh, D. Schadendorf Biomarcers in melanoma *Annals of Oncology* 20 (Supplement 6): vi8-vi13, 2009
16. Jasim M. Radbi Malignant melanoma arising from nevi, p53, p16, BCL2 expression in benign versus alignant components *Journal of cutaneous medicine and surgery/volume* 3, number 6, 1999
17. Jurgen Eberle and Amir M. Hossini Expression and function of BCL2 proteins in melanoma *Current genomics*, 2008,9,409-419

Постигнати резултати:

В хода на проучването е извършен задълбочен анализ на имунохистохимичната експресия на Cyclin D1, BCL2 и p53 и HMB-45 в бенигнени, атипични и малигнени меланоцитни неоплазии. На база на вида и градиента на експресията е съставена единадесет-моделна скала за оценка от риска от малигнитет с много голяма степен на статистическа достоверност.