

Histologické změny maligního melanomu oka po provedené radioterapii CyberKnifem

Jana Dvořáčková^{1,2}, Jirka Mačák^{1,2}, Petr Mašek³, David Feltl⁴, Jana Žmolíková^{1,5}

¹Ústav patologie Lékařské fakulty Ostravské univerzity

²Ústav patologie Fakultní nemocnice Ostrava

³Oční Oddělení FNO

⁴Onkologická klinika FNO

⁵CGB laboratoř a.s.

V léčbě uveálních melanomů se v některých případech používá radiochirurgie CyberKnifem. Histologickými a imunohistologickými změnami v nádorové tkáni po terapii se zabývá poměrně málo autorů. V tomto sdělení uvádíme výsledky vyšetření dvou takových případů. U obou pacientů byla provedena enukleace bulbu pro bolestivý glaukom. U prvního pacienta šlo o recidivující melanom, který byl ošetřen gama nožem před deseti lety. Pro lehkou progresi ložiska melanomu bylo provedeno ošetření CyberKnifem celkovými dávkami 45Gy ve 3 frakcích. Po necelých pěti měsících po ozáření bulbu došlo k regresi recidivujícího nádoru z původní prominence 1,4 mm v ploše 6 mm × 0,6 mm na prominenci 0,3 mm v ploše 3 mm × 0,3 mm. Histologicky byla zaznamenána rezidua řídce celulárního ložiska regresivně změněných nádorových buněk a přítomnost reaktivních změn optického nervu. Druhý pacient byl měsíc po radioterapii CyberKnifem s následnou komplikovanou operací katarakty a s enukleací bulbu bez regrese – tedy zániku nádorových buněk. Velikost tumoru 11,1 mm × 15 mm s prominencí 9,3 mm přetrvávala i po ozáření dávkou 40Gy/1Fr. V histologickém vyšetření byly nádorové buňky bez patologických změn. V imunohistochemickém vyšetření jsme pozorovali u prvního pacienta vysokou difúzní expresi proteinu bcl-2 až do výše 75 % a méně než 1 % pozitivitu ve vyšetření s proliferčním markerem Ki-67. U druhého případu byla situace odlišná, s výraznou až 75 % pozitivní expresí bcl-2 proteinu v nádorových buňkách v povrchových vrstvách tumoru a s klesajícím počtem pozitivní exprese v hlubokých vrstvách nádoru, kde dosahovala maxima do 25 %. Proliferační aktivita s pozitivní jadernou expresí v Ki-67 vzrůstala od povrchu, kde se pohybovala v rozmezí 1–3 % do hloubky nádoru a k jeho bázi, kde dosahovala až 5 %. Naše pozorování ukazuje na výraznou redistribuci genetické aktivity uvnitř nádoru. Ta se projevuje „overexpresí“ bcl-2 proteinu a u druhého případu je patrná rozdílná pozitivita bcl-2 proteinu v různých vrstvách nádoru. Vztah tohoto fenomenu k radioterapii není dosud jasný.

Klíčová slova: uveální maligní melanom, terapie CyberKnifem, enukleace bulbu, regresivní změny nádoru.

Histological changes in malignant melanoma of the eye following radiotherapy with CyberKnife

Radiosurgery with CyberKnife is used in the treatment of uveal melanomas in some cases. Histological and immunohistological changes in tumour tissue following treatment have been addressed by relatively few authors. This paper presents the results of investigations of two such cases. Enucleation of the eye was performed for painful glaucoma in both patients. Patient 1 had a recurrent melanoma treated with a Gamma Knife ten years ago. Due to slight progression in the melanoma site, treatment with CyberKnife was used with total doses of 45 Gy in 3 fractions. Some five months following eye irradiation, there was regression of the recurrent tumour from the original height of 1.4 mm in an area of 6 mm x 0.6 mm to that of 0.3 mm in an area of 3 mm x 0.3 mm. Histologically, residua of a sparsely cellular locus of regressively altered tumour cells and the presence of reactive changes in the optic nerve were noted. Patient 2 underwent radiotherapy with CyberKnife one month prior, with subsequent complicated cataract surgery and enucleation of the eye without regression, i.e. destruction of tumour cells. The size of the tumour of 11.1 mm x 15 mm with a height of 9.3 mm remained unchanged even after irradiation with a dose of 40 Gy/1 fr. No pathological changes in the tumour cells were seen on histological examination. In patient 1, immunohistochemistry showed high diffusion expression of the bcl-2 protein of up to 75 % and less than 1 % positivity on examination with the proliferation marker Ki-67. In patient 2, the situation was different, with significant, as high as 75 % positive expression of the bcl-2 protein in tumour cells in the superficial tumour layers and a decreasing rate of positive expression in the deep tumour layers where it reached no more than 25 %. The proliferation activity with positive nuclear expression of Ki-67 increased from the surface, where it ranged from 1 % to 3 %, to the depth of the tumour and toward its base, where it reached up to 5 %. Our observation suggests significant redistribution of genetic activity within the tumour. It is manifested by overexpression of the bcl-2 protein and, in patient 2, different bcl-2 protein positivity in the various tumour layers is apparent. The relation of this phenomenon to radiotherapy remains unclear.

Key words: Malignant uveal melanoma, therapy with CyberKnife, enucleation of the eye, regressive tumour changes.

Onkologie 2013; 7(2): 78–82

Úvod

Uveální maligní melanom je nejčastějším a nejzávažnějším zhoubným nitroočním nádorem u dospělých pacientů. Vzniká z mela-

nocytárních buněk duhovky, řasnatého tělesa nebo cévnatky. Melanom cévnatky je nejčastější a představuje až 80 % všech uveálních melanomů. Melanomy řasnatého tělesa a duhovky jsou

méně časté (corpus ciliare 15 %, iris 5 %). Nejčastěji se vyskytují ve věku 50–60 let. Většina melanomů zůstává stacionární bez tendence metastazovat. Výjimky jsou popisovány u melanomu s propa-

Tabulka 1. Počet provedených radiochirurgických ošetření CyberKnifem pro maligní melanom oka ve FNO s upřesněním podle pohlaví a doplněním o medián věku

	Muži	Ženy	Celkem
Počet	8	8	16
Věk – medián	59,5	60,5	60,5

gací do optického nervu. Při prokázaném růstu se provádí brachyterapie – lokální ozáření nebo chirurgická excize nádoru (1). Ve Fakultní nemocnici Ostrava se za tímto účelem používá radiochirurgické ošetření CyberKnifem. Systém umí sledovat pozici nádoru během ozařování, takže reaguje na sebemenší pacientovy pohyby tak, aby nedošlo k poškození zdravé tkáně a záření bylo zacíleno pouze na nádor. Jeho sofistikovaný software sleduje pohyblivý cíl nádoru například v plicích nebo játrech a také v oku a dokáže směr ozařování tomuto pohybu přizpůsobit s přesností na 2 mm. Právě díky této extrémní přesnosti podstatně rozšíří možnosti v oblasti léčby malých nádorů v blízkosti životně důležitých struktur. V průběhu dvou let bylo ve FNO celkem ozářeno 16 melanomů oka, dva pacienti pro bolestivý neovaskulární glaukom byli podrobeni enukleaci v rozsahu jednoho a pěti měsíců po radioterapii CyberKnifem.

Materiál a metodika

Provedli jsme vyšetření enukleovaných bulbů dvou pacientů s maligním melanomem chorioidey. V prvním případě šlo o 62letého pacienta, který se před 10 lety podrobil teleterapii Leksellovým gama nožem pro melanoblastom chorioidey, nyní s recidivou léčenou pět měsíců před enukleací pravého bulbu CyberKnifem dávkami 45Gy ve třech frakcích (45Gy/3Fr). Odstranění bulbu bylo provedeno pro neovaskulární bolestivý glaukom z ischemie. Pro histomorfologické zhodnocení jsme měli k dispozici pravostranný enukleovaný bulbus, který byl po fixaci 10 % pufovaným formalínem zpracován parafinovou technikou a řezy byly standardně barveny hematoxylinem a eozinem. Ve druhém případě šlo o 57letého pacienta s maligním melanomem chorioidey, u něhož jeden měsíc po ošetření CyberKnifem dávkou 405Gy/1Fr byla provedena operace intumescentní katarakty. Následná enukleace levého bulbu byla provedena po pěti dnech od první operace pro zakrvácení do přední komory a zvýšení nitroočního tlaku, vedoucí k sekundárnímu bolestivému glaukomu. Bulbus fixovaný 10 % pufovaným formalínem jsme klasicky zpracovali parafinovou technikou a řezy byly standardně nabarveny hematoxylinem a eosinem.

K potvrzení diagnózy a zhodnocení viability tkáně bylo provedeno imunohistochemické vyšetření (IHC) metodou avidin-biotin komplex (ABC metoda). Přitom byly provedeny pozitivní a negativní kontroly. Pro vyšetření byly použity následující protilátky: Melan A, monoklonální myší protilátka, klon A103, Dako, anti human Melanosoma, monoklonální myší protilátka klon HMB45, Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, S100, polyklonální králičí protilátka, Dako, bcl2, monoklonální myší protilátka, klon 124, Dako, Ki67 monoklonální myší protilátka klon MIB1, Dako, p53 monoklonální myší protilátka klon DO7, Novocastra.

Výsledky

Histologické vyšetření prvního případu enukleovaného pravostranného očního bulbu pro recidivující melanom chorioidey potvrdilo minimální rezidua nádoru pod sítnicí v blízkosti odstupu očního nervu, tvořená plošným ložiskem s nevelkým počtem vřetenobuněčných pigmentovaných elementů (obrázek 1, 2) a pozitivní expresí v imunohistochemickém vyšetření S100, Melan A a HMB45 dokreslujících původ v neuroektodermovém nádoru. Část fokálně prokrvácených nádorových buněk vykazovala regresivní změny, ve smyslu buněčného rozpadu a prosáknutí v okolním stromatu, dále kulatobuněčnou lymfocytární celulizaci s ojediněle přítomnými granulocyty. Regresivní změny dokreslila úklidová reakce melanofágů a hyalinizace stěn drobných cév. Velikost ložiska nepřesahovala plochu 3 mm × 0,3 mm, s prominencí 0,3 mm. Původní velikost před terapií byla 6 mm × 0,6 mm s prominencí 1,4 mm. Invaze do cév a nervu nebyla neprokázána. V 1/3 optického nervu byl zastižen rozpad vláken a nekróza s bohatou reaktivní lymfocytární celulizací.

Histologické vyšetření druhého případu levostranného bulbu prokázalo prokrvácenou chorioideu se strukturami hematomu. V zadní komoře byl zachycen objemný uzel velikosti 11,1 mm × 15 mm, s prominencí 9,3 mm, tvořený nádorovými buňkami převážně vřetenobuněčného až polygonálního tvaru, které obsahovaly hnědočerný pigment (obrázek 3). Pozitivní exprese v S100, HMB45 a v Melanu A opět potvrzuje neuroektodermový původ nádoru (obrázek 4). Tumor propagoval do přední komory bulbu,

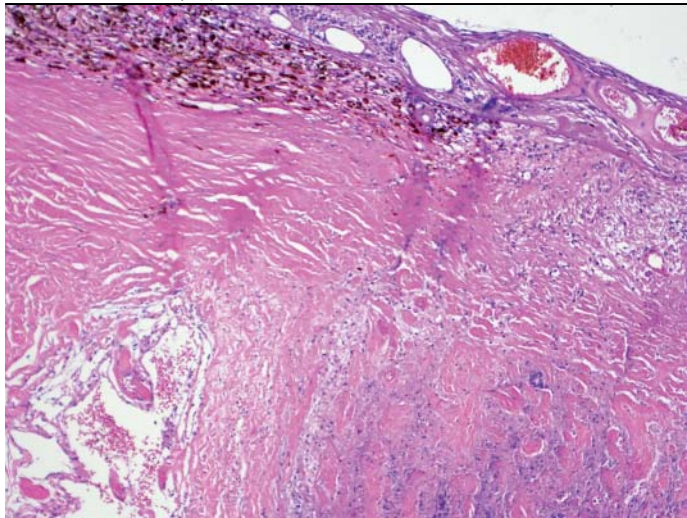
v cévách a v optickém nervu známky invaze nebyly nalezeny. Nádorové struktury nevykazovali regresivní změny ve smyslu nekrózy a prokrvácení, ani reaktivní kulatobuněčnou celulizaci.

V imunohistochemickém vyšetření jsme pozorovali u prvního pacienta vysokou difúzní expresi bcl-2 více než u 75 % buněk (obrázek 5) a minimální proliferativní aktivitu nádorových buněk do 1 % v Ki67 v celém rozsahu malého zbytku regresivně změněných nádorových struktur (obrázek 6). U druhého případu byla situace odlišná, s výraznou až 75% pozitivní expresí nádorových buněk v bcl-2, zvláště na povrchu tumoru (obrázek 7) a s klesající intenzitou a počtem pozitivně exprimujících nádorových buněk směrem ke spodině, kde exprese byla 25 % (obrázek 8). Proliferativní aktivita s pozitivní jadernou expresí v Ki67 vzrůstala od povrchu (obrázek 9), kde se pohybovala v rozmezí 1–3 %, k bázi tumoru, kde dosahovala až 5 % (obrázek 10). Expresi p53 nelze z důvodu nedostatečného množství materiálu v prvním případě hodnotit, ve druhém případě klesá směrem k povrchu nádoru, kde je zastižena již jen cytoplazmatická pozitivita ojedinělých elementů (obrázek 11, 12).

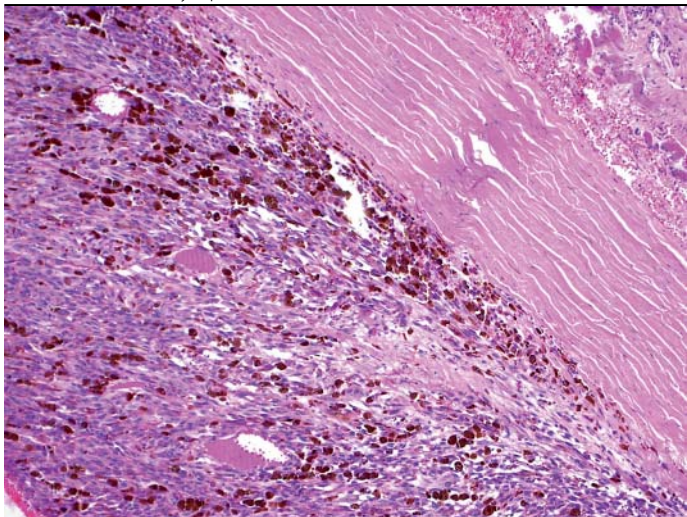
Diskuze

Uveální melanom patří k nádorům s raritním výskytem do 1 % všech orbitálních neoplazií. Jde o radiorezistentní tumor, u kterého však může být alternativně použita mimo jiné i radiochirurgická terapie CyberKnifem, jak tomu bylo u demonstrovaných případů ve Fakultní nemocnici Ostrava. Časově lze průběh záslahu rozdělit na čtyři základní stadia – fyzikální stadium, stadium fyzikálně – chemické, chemické stadium a konečné stadium biologické. Intenzita poškození buněk závisí na celkové masě tkáně, délce záření a jeho intenzitě. Vyššího efektu se dosahuje opakovanými frakcemi. V průběhu frakcionované radioterapie dochází v nádorových i zdravých tkáních k biologickým pochodům, které se označují jako pravidlo 4R: reparace, depopulace/regenerace, redistribuce a reoxygenace. K reparaci dochází na úrovni buněk a jde o opravy poškození způsobené ionizujícím zářením. Probíhá u zdravých i nádorových buněk. Radioterapie vychází z vyšší schopnosti reparace zdravých tkání. Zjednodušeně lze říci, že tkáně obsahují dva typy buněk – kmenové a dceřiné. Z kmenových buněk procesem asymetrického dělení vznikají jednak buňky kmenové a také buňky dceřiné nebo-li efektorové. Při ozařování jsou nejvíce zasaženy kmenové, stále se dělící buňky. Pokles kmenových buněk vede k ztrátě i buněk efektorových

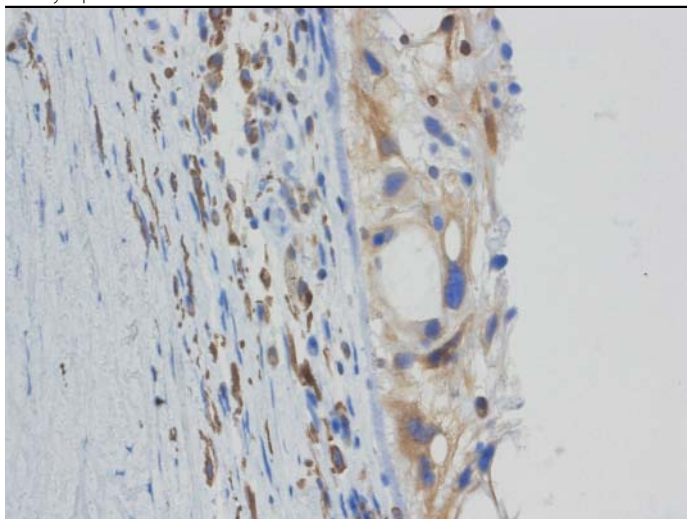
Obrázek 1. Přehledné zvětšení s rezidui melanomu a nekrózou optického nervu 40x, HEM, Olympus DP20



Obrázek 3. Objemné nádorové masy silně pigmentovaného melanomu 40x, HEM, DP 20 Olympus



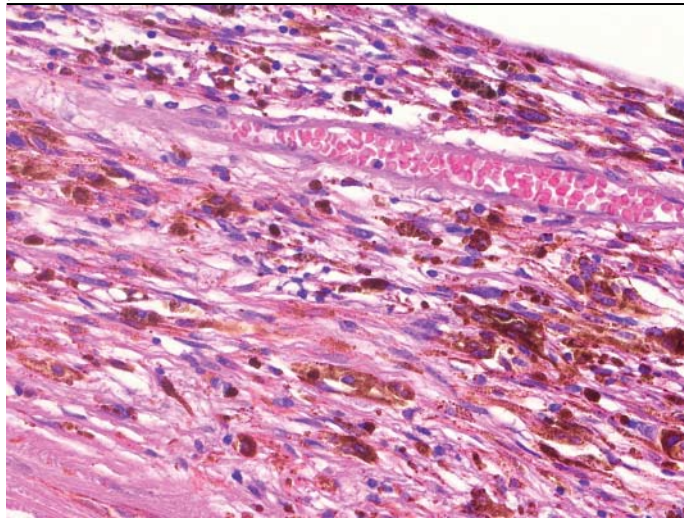
Obrázek 5. Difúzní exprese bcl2 v residuu nádorových buněk, 200x, DP 20 Olympus



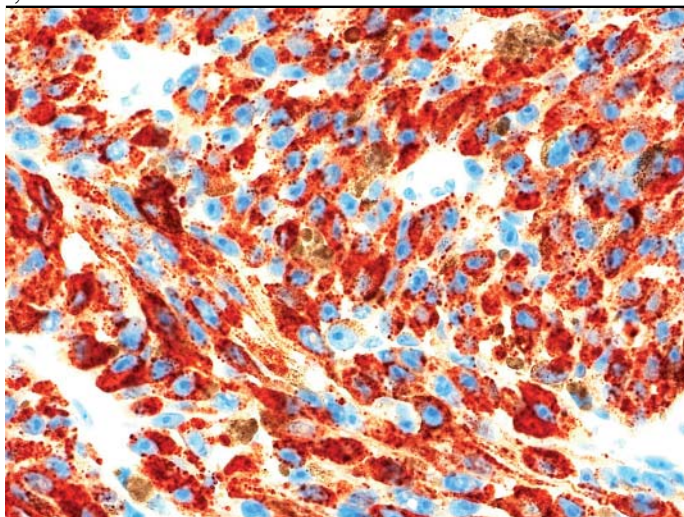
a následně ke ztrátě asymetričnosti buněčného dělení. Další pokles kmenových buněk vyvolá akcelerovanou repopulaci kmenových buněk nutnou pro zachování existence této populace. Zvýšená repopulace kmenových buněk vede

dočasně ke snížení počtu efektorových buněk a tak i k nástupu vedlejších účinků. Tato situace nastává nejčastěji 3. týden po ozařování. Další pokračování v radioterapii vede k postupné obnově i efektorových buněk – regenerace (1).

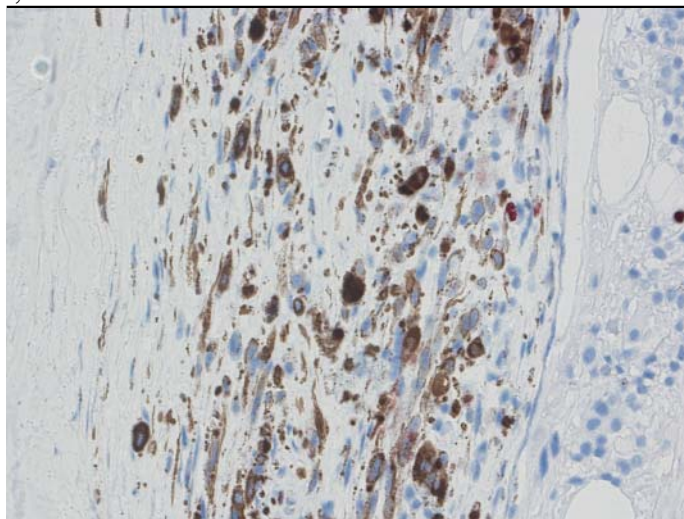
Obrázek 2. Detail na rezidua nádorových buněk 200x, HEM, Olympus DP 20



Obrázek 4. Pozitivní exprese Melan A, 200x, DP 20 Olympus, detekční systém s tzv. červenou koncovkou

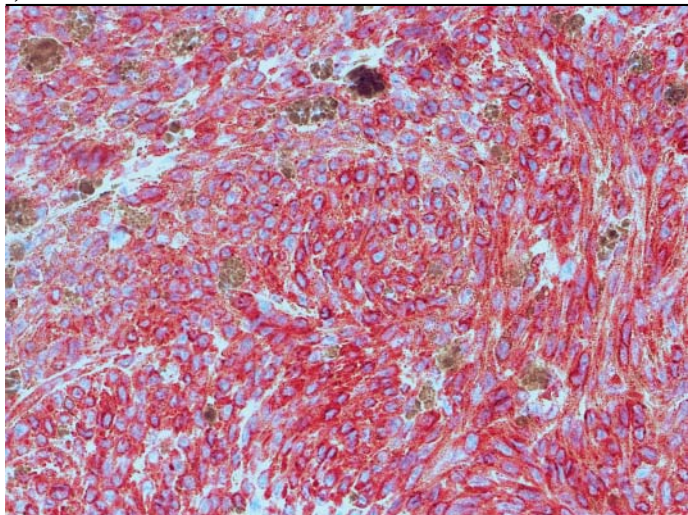


Obrázek 6. Proliferační aktivita v Ki67 1 %, 100x, DP 20 Olympus ,detekční systém s tzv. červenou koncovkou

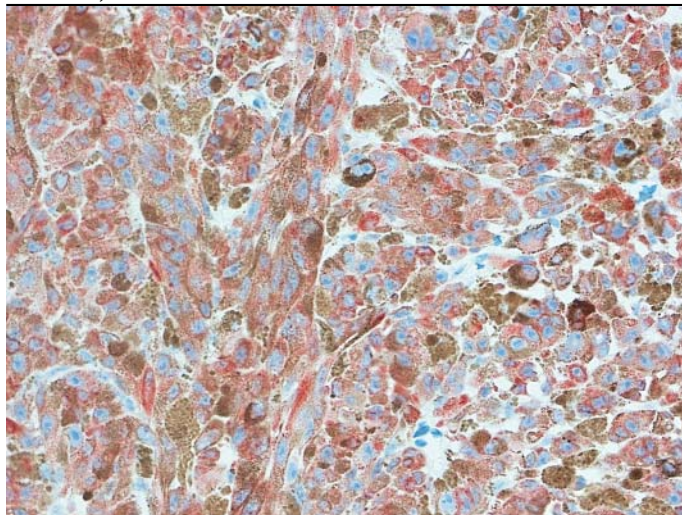


Popsaný proces probíhá nejen ve zdravých tkáních, ale i v tkáních nádorových. Přerušení radioterapie v této době vede k zhoršení léčebných výsledků, protože k regeneraci dochází i v nádorové tkáni. Kolem pátého týd-

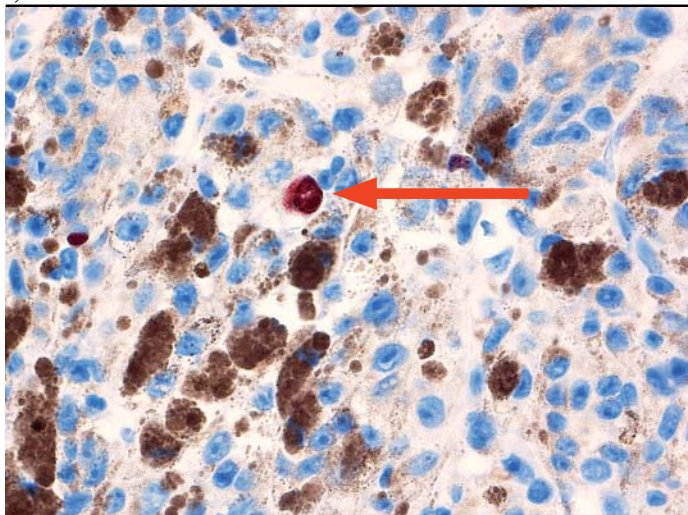
Obrázek 7. Expres bcl2 na povrchu do 75 %, 200 x, DP 20 Olympus, detekční systém s tzv. červenou koncovkou



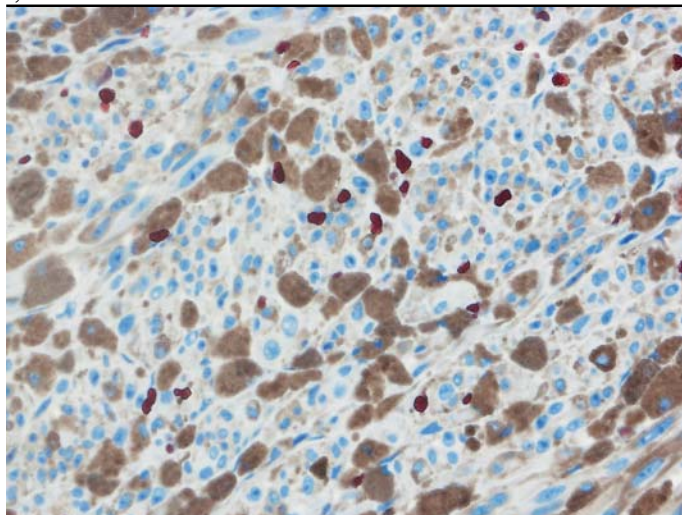
Obrázek 8. Expres bcl2 při bási maximálně 25 %, 200 x, DP 20 Olympus, detekční systém s tzv. červenou koncovkou



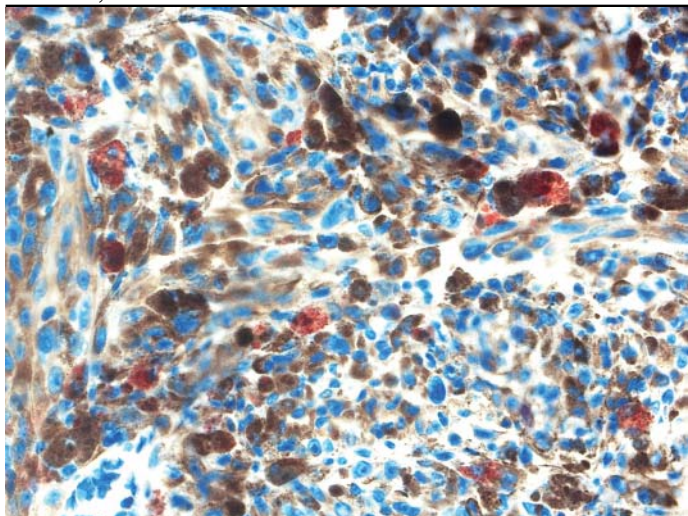
Obrázek 9. Expres Ki67 na povrchu tumoru, 400 x, DP 20 Olympus, detekční systém s tzv. červenou koncovkou



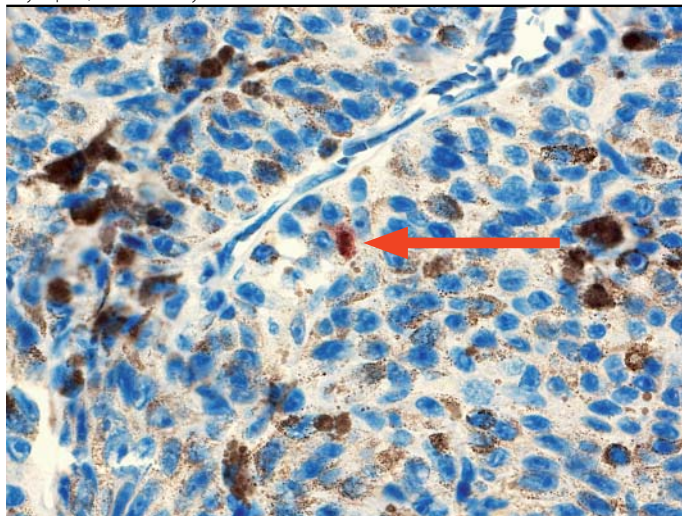
Obrázek 10. Expres Ki67 5 % při bási tumoru, 200 x, DP 20 Olympus, detekční systém s tzv. červenou koncovkou



Obrázek 11. Expres p53 při bási je maximálně 200 x, DP 20 Olympus, detekční systém s tzv. červenou koncovkou



Obrázek 12. Expres p53 na povrchu tumoru je maximálně 200 x, DP 20 Olympus, detekční systém s tzv. červenou koncovkou



ne ozařování se ustanovuje určitá rovnováha a úbytek kmenových buněk není tak drastický a efektorové buňky jsou schopny zajistit svoji funkci. Redistribuce probíhá na úrovni buněk, které se nacházejí v různých fázích cyklu.

Vzhledem k různé citlivosti fází buněčného cyklu k radioterapii, dojde při ozaření k zničení buněk v radiosenzitivních fázích. Tím je zničena jen určitá frakce buněk. Reoxygenace působí na úrovni tkání. Kyslíkový efekt je z hlediska

radioterapie velmi důležitý. Kyslíkové radikály vznikající při aplikaci ionizujícího záření jsou zodpovědné za poškození tkání. Buňky, které mají nedostatek kyslíku, jsou radiorezistentní. Často jsou v G0 fázi.

Gen bcl-2 kóduje protein, který ochraňuje buňky před apoptózou a umožňuje jim přežít v G0 fázi, když není k dispozici růstový faktor. Podle některých autorů (10) exprese bcl-2 proteinu u kožních melanocytických lézí je běžným nálezem a nesouvisí s biologickým chováním nádoru. Některé novější práce (11) naopak ukazují na fakt, že exprese genů bcl-2 a bcl-xL a pravděpodobně i jejich proteinů se zvyšuje s progresí melanomu. Jejich exprese může ukazovat zvýšený maligní potenciál způsobený inhibicí apoptózy a převahou růstu u metastazujících buněk melanomu.

Aplikace radioterapie může vést k reoxygenaci, tedy k opětovnému zlepšení zásobení kyslíkem. Nádorové buňky jsou často hypoxické. Je to z důvodu chaotického uspořádání buněk a nedostatečného krevního zásobení. Zmenšení nádorové masy může dojít k obnovení krevního zásobení a v další aplikaci radioterapie i k zvýšení radiosenzitivity. Tyto složité děje se odrážejí i v expresi proteinů zodpovědných za apoptózu a proliferační aktivitu buněk. Jiné způsoby terapie jako jsou brachyterapie, lokální resekce, transpupilární termoterapie anebo stereotaktická radiochirurgie, vyvolávají morfologické změny slučitelné s regresivními změnami po léčbě CyberKnifem, mnohdy však širšího rozsahu vedoucímu k vytvoření hemorágií, šedého zákalu, retinopatií, papilopatií, neovaskulárnímu glaukomu, sklerální nekrózy a popřípadě i ke vzniku místní recidivy.

Závěr

S ohledem na omezený počet uveálních melanomů ošetřených CyberKnifem s následnou enukleací jsou histomorfologické změny v tumoru popisovány v odborné literatuře minimálně. Histologické a imunohistochemické

vyšetření obou enukleovaných bulbů zhodnotilo vitalitu tkáně a poškození nádorových buněk zářením. Zatímco u prvního enukleovaného bulbu došlo k regresí nádoru až k fokální nekróze současně s reaktivními změnami optického nervu, v případě druhého pacienta se velikost nádoru nezměnila a morfologický obraz nevykazoval žádné charakteristické morfologické známky radičního poškození. Protože u obou pacientů byla použita odlišná dávka ozáření (45Gy/40Gy) v různém režimu (3F/1F), exprese apoptotických markerů a proliferačního markeru se liší. Rozdíly dále mohou být způsobeny s největší pravděpodobností i velikostí nádoru, délkou trvání a předchozí terapií Leksellovým gama nožem u prvního pacienta. V úvahu je nutno také vzít genetické změny, které doprovází vznik maligního melanomu, respektive rozdíly těchto genetických aberací u jednotlivých pacientů, které bohužel nebylo možno vzhledem k nedostatečnému množství materiálu vyšetřit. Nález morfologických změn u obou bulbů koresponduje s délkou po ozáření a nastupujícími změnami na úrovni proteinů. Výše popsaný obraz koreluje s celosvětovými studiemi ukazujícími, že 5 % až 10 % pacientů s uveálním melanomem léčených radioterapií nakonec vyžadují enukleaci postiženého oka, a to pro vzniklé komplikace či později v důsledku vzniklé recidivy.

Literatura

1. Ullmann V. Jaderná fyzika a fyzika ionizujícího záření. Ostrava: elektronická podoba - www.web.cz/astronuklfyzika, 2002.
2. Shields CL, Shields JA. Recent developments in the management of choroidal melanoma. *Curr Opin Ophthalmol*. 2004; 39: 351–317.
3. Pajonk F, Vlasi E, William H. McBride Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited, stem cells volume 28, issue 4, article first published online: 4 feb 2010.
4. Zorlu F, Selek U, Kiratli H. Initial results of fractionated cyberknife radiosurgery for uveal melanoma. *J Neurooncol*. 2009; 94(1): 111–177. doi: 10.1007/s11060-009-9811-x.
5. Shields CL, Shields JA, Karlsson U, Menduke H, Brady LW. Enucleation following plaque radiotherapy: for posterior uveal melanoma. histopathologic findings. *Ophthalmology*. 1990; 97: 1665–1670.
6. Aaberg TM Jr, Bergstrom CS, Hickner ZJ, Lynn MJ. Long-term results of primary transpupillary thermal therapy for the treatment of choroidal malignant melanoma. *BR J Ophthalmol* 2008; 92: 741–746.
7. Sagoo MS, Shields CL, Mashayekhi A, Freire J, Emrich J, Reiff J, Komarnicky L, Shields JA. Plaque radiotherapy for juxtapapillary choroidal melanoma. tumor control in 650 consecutive cases. *Ophthalmology*. 2011; 118: 402–407.
8. Gunduz K, Shields CL, Shields JA, Cater J, Freire J, Brady LW. Radiation complications and tumor control after plaque radiotherapy of choroidal melanoma with macular involvement. *Am J Ophthalmol*. 1999; 127: 579–588.
9. Krema H, Somani S, Sahgal A, Xu W, Heydarian M, Payne D. Stereotactic radiotherapy for treatment of juxtapapillary choroidal melanoma: 3-year follow-up. *Br J Ophthalmol* 2009; 93: 1172–1176.
10. Cerroni L, Sover HP, Kerl H. Bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi. *Am J Dermatopathol* 1995; 17: 7–11.
11. Leiter U, Schmid RM, Kaskel P. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch Dermatol Res*. 2000; 292: 225–232.
12. Henderson MA, Shirazi H, Lo SS, Mendonca MS, Fakiris AJ, Witt TC, Worth RM, Timmerman RD. Stereotactic radiosurgery and fractionated stereotactic radiotherapy in the treatment of uveal melanoma. *Technol Cancer Res Treat*. 2006; 5(4): 411–419.
13. Zehetmayer M. Stereotactic photon beam irradiation of uveal melanoma. *Dev Ophthalmol*. 2012; 49: 58–65. doi: 10.1159/000328259. epub 2011 oct 21.

Článek přijat redakcí: 6. 3. 2013

Článek přijat k publikaci: 9. 4. 2013

Mgr. Jana Žmolíková

Košenského 10, 703 00 Ostrava-Vítkovice
zmolikova@pathology.cz