

Л.М. Хамаде, А.И. Курченко, Г.В. Федорук
Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев

Роль иммуногистохимического исследования лимфоцитарного инфильтрата в диагностике ранней стадии грибовидного микоза

Цель работы — изучить качественный морфологический состав клеточного воспалительного инфильтрата в коже больных грибовидным микозом.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили биоптаты кожи, взятые у 5 больных грибовидным микозом, наблюдаемых на кафедре дерматовенерологии НМУ имени А.А. Богомольца. Иммуногистохимическая панель включала в себя следующие антитела: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8 и CD20 производства Dako Cytomation. Для визуализации использовали проявочную систему визуализации EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH (Link), Code K8012 на автостейнере фирмы DAKO.

Результаты и обсуждение. При гистологическом исследовании клеточного состава сформированных субэпидермальных инфильтратов с использованием моноклональных антител Т-клеточной (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8) и В-клеточной (CD20) направленности выявили доминирующий Т-клеточный характер. Наибольшая количественная плотность была характерна для CD4 и CD3⁺-клеток, несколько меньшая — для клеток с CD2 и CD5-позитивностью. В инфильтратах содержались единицы Т-лимфоцитов с CD8-позитивностью.

Полученные данные свидетельствуют об избирательной миграции в пораженную кожу Т-лимфоцитов хелперной субпопуляции. Появление CD8⁺ Т-клеточной субпопуляции лимфоцитов может свидетельствовать об активизации опухолевого процесса, что в наших случаях подтверждается характерной клинической картиной.

Выводы. Учитывая трудности клинической верификации макроскопических и микроскопических проявлений в раннюю стадию развития грибовидного микоза для дифференциальной диагностики дерматитов различного генеза, выявление с помощью иммуногистохимического метода уменьшения соотношения CD4/CD8 может служить убедительным критерием, подтверждающим опухолевую прогрессию.

Ключевые слова

Грибовидный микоз, ранняя стадия, иммуногистохимия, соотношение CD4⁺/CD8⁺-лимфоцитов.

Кожная Т-клеточная лимфома (СТСЛ) — опухолевое новообразование, которое состоит из CD4⁺ Т-лимфоцитов и клинически проявляется грибовидным микозом (ГМ) или, как лейкоемический вариант, синдромом Сезари [2, 8–10]. У пациентов грибовидный микоз обычно проявляется плоскими кожными «очажками» или инфильтрированными кожными бляшками. При прогрессировании заболевания эти образования трансформируются в кожные опухоли с последующим вовлечением в опухолевый процесс региональных лимфатических узлов и, в конечном итоге, к системному проявлению заболевания. У пациентов с синдромом Сезари наблюдаются эритродермия, лимфаденопатия и лейкемия.

Протекает синдром Сезари более агрессивно, чем у пациентов с грибовидным микозом. В финале болезни у некоторых больных происходит «трансформация» собственных СТСЛ и развивается высокозлокачественная анапластическая крупноклеточная лимфома [1, 2, 6]. Это плохой прогностический признак для пациентов с СТСЛ, т. к. медиана выживаемости составляет 1–2 года.

Опухолевые клетки при грибовидном микозе чаще всего имеют определенные кластеры дифференцировки (CD2, CD3, CD4, CD5) [4]. Антигенный фенотип клеток ГМ и частая их локализация в коже и регионарных лимфатических узлах указывают на то, что грибовидный микоз —

новообразование, происходящее из опухоле-трансформированных (мутировавших) зрелых Т-клеток-хелперов, которые относятся к иммунной системе, ассоциированной с кожей (SALT). По сути, грибовидный микоз — опухолевое новообразование из клеток, обладающих природным свойством миграции между кожей и регионарными лимфатическими узлами [10]. Этим фактом можно объяснить многоочаговость поражений кожи на ранних стадиях болезни и подтвердить, что грибовидный микоз — системное заболевание.

Исследования предыдущих лет, посвященные изучению иммунофенотипических свойств клеточного состава кожного новообразования, показали, что, кроме популяции опухолевых клеток, метастазы ГМ также содержат и неизменные лимфоциты [1, 3]. В связи с этим при анализе лимфоцитарного состава клеточных инфильтратов при ГМ следует разграничивать эти популяции клеток. На основе полученных ранее результатов можно предположить, что грибовидный микоз в ранних стадиях развития проявляется по типу дерматитов, а большинство клеток инфильтрата, вероятнее всего, неспецифически участвует в метастазировании небольшим «авангардом» специальных Т-клеток. При дерматитах, например аллергическом контактном, такие «авангардные» Т-клетки чаще всего представлены антиген-специфическими клонами [7]. В отличие от контактного дерматита, на ранних стадиях ГМ эти авангардные Т-клетки могут быть также представлены клоном доминантной опухолевой клетки. Известно, что практически во всех случаях ГМ — это новообразования CD4⁺ Т-клеток [3, 5]. Тем не менее, характерные кожные инфильтраты содержат также разнообразные неизменные лимфоциты, включая CD8⁺-популяцию. Несмотря на прогресс в изучении этого заболевания, роль исследуемых клеток в патогенезе ГМ все еще нуждается во всестороннем изучении.

Цель работы — изучить качественный морфологический состав клеточного воспалительного инфильтрата в коже больных грибовидным микозом.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили биоптаты кожи, взятые у 5 больных с грибовидным микозом, которые наблюдались на кафедре дерматовенерологии НМУ имени А.А. Богомольца. Полное комплексное иммунологическое обследование больные проходили на кафедре клинической иммунологии и аллергологии с секцией медицинской генетики НМУ имени А.А. Бо-

гомольца. Каждый пациент получал подробную информацию о исследовании и давал информированное согласие на участие в нем. Гистологическое обзорное исследование осуществляли по общепринятой методике окрашивания гематоксилином и эозином в целях выявления общей гистологической картины. Иммуногистохимические реакции проводили по стандартизованной методике с использованием серийных парафиновых срезов толщиной 3–5 мкм, помещенных на адгезивные стекла, покрытые полизином (Menzel-Glaser, Германия), и реактивов компании DAKO.

Иммуногистохимическая панель включала в себя следующие антитела: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8 и CD20 производства Dako Cytomation.

Для визуализации использовали проявочную систему визуализации EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH (Link), Code K8012 на автостейнере фирмы DAKO.

В месте локализации антигена визуализировался продукт реакции коричневого цвета.

Морфометрическое исследование включало подсчет позитивных клеток в 5 полях зрения при увеличении в 200 раз. Данные пересчитывали на 1 мм² среза. Просмотр и цифровые фотографии микропрепаратов осуществляли цифровой камерой OLYMPUS C 5050Z, установленной на микроскопе Olympus CX-41.

Результаты и обсуждение

При гистологическом исследовании биоптатов кожи больных грибовидным микозом определены характерные признаки, достаточно полно описанные в литературе, а именно: воспаление и эпидермальная пролиферация клеточных элементов [1, 9, 10]. По данным литературы, в нормальной здоровой коже всегда содержится небольшое количество Т-лимфоцитов, которые, как правило, располагаются вокруг посткапиллярных венул поверхностного сплетения или придатков кожи [3]. Соотношение CD4⁺/CD8⁺-клеток в неповрежденной дерме, по данным разных авторов, составляет в среднем 0,9 [1, 3]. В нашем исследовании в контрольной группе волонтеров индекс соотношения CD4⁺/CD8⁺ составил $0,93 \pm 0,01$ ($p = 0,29$).

В коже больных с бляшечной формой грибовидного микоза наблюдалось умеренное утолщение эпидермиса за счет пролиферации клеток мальпигиевого слоя. Местами в гистологических препаратах отмечен незначительный спонгиоз. Выявлены акантоз и умеренный гиперкератоз. Изменения отмечались преимущественно в верхней части дермы, где формировались диффузные умеренной плотности лимфоиднокле-

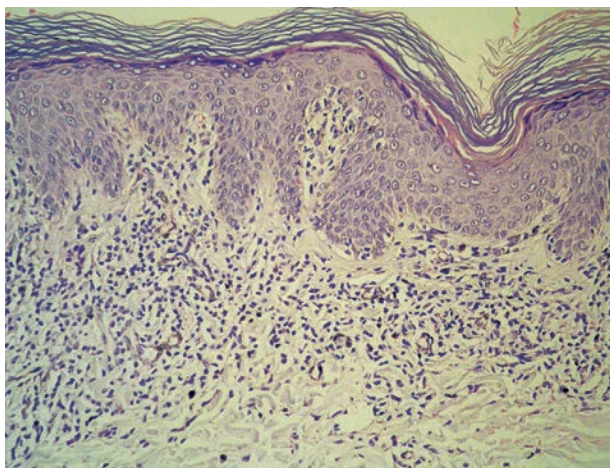


Рис. 1. Биоптат кожи бляшечной формы грибовидного микоза. Гиперкератоз, акантоз, формирование лимфоидноклеточного инфильтрата в верхней части дермы.

Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

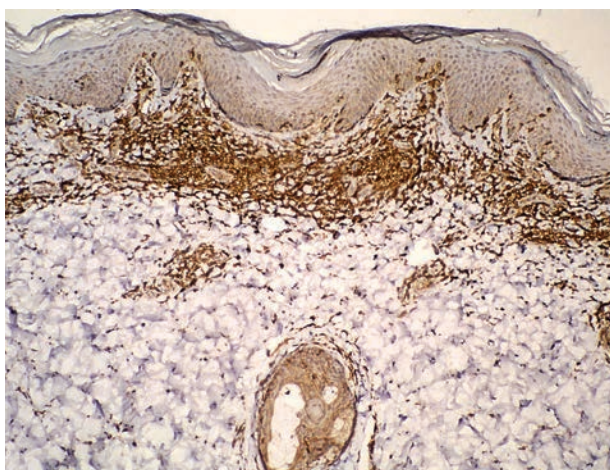


Рис. 2. Грибовидный микоз. Формирование $CD4^+$ Т-лимфоцитарного инфильтрата в верхней части дермы. $\times 100$

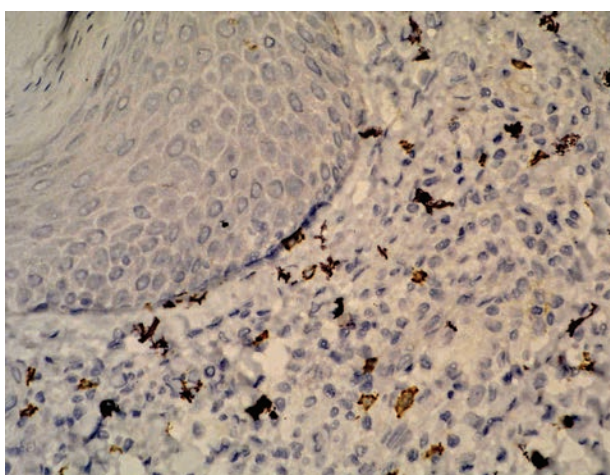


Рис. 3. Грибовидный микоз. Лимфоидноклеточный инфильтрат в верхней части дермы. Проявление $CD8$ -позитивности. $\times 400$

точные инфильтраты, содержащие расширенные кровеносные сосуды. Не отмечено тенденции к миграции лимфоидных клеток в эпидермис и формированию эпидермальных абсцессов типа Потрие. Также не выявлено нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов (рис. 1).

Во время гистологического исследования клеточного состава сформированных субэпидермальных инфильтратов с использованием моноклональных антител Т-клеточной ($CD2$, $CD3$, $CD4$, $CD5$, $CD7$, $CD8$) и В-клеточной ($CD20$) направленности выявили доминирующий Т-клеточный характер. Наибольшая количественная плотность была характерна для $CD4^+$ и $CD3^+$ -клеток (рис. 2).

Несколько меньшую количественную плотность имели клетки с $CD2$ и $CD5$ позитивностью. В инфильтратах содержались единицы Т-лимфоцитов с $CD8$ позитивностью (рис. 3).

Не отмечено в лимфоидноклеточных инфильтратах кожи $CD7^+$ Т-, а также $CD20^+$ В-лимфоцитов.

Результаты иммуногистохимического исследования кожи подтверждают данные исследований, в которых указывают на избирательность состава лимфоидного инфильтрата у больных с бляшечной стадией грибовидного микоза. Дермальный инфильтрат преимущественно состоит из $CD4^+$ Т-лимфоцитов хелперов. Коэффициент соотношения между $CD4$ и $CD8$ субпопуляциями лимфоцитов в инфильтратах кожи составил в среднем 7 : 1.

Полученные данные свидетельствуют об избирательной миграции в пораженную кожу Т-лимфоцитов хелперной субпопуляции. Эти особенности грибовидного микоза контрастируют с особенностями соотношений $CD4/CD8$, характерных для контактного дерматита, для которого соотношения $CD4/CD8$ как в крови, так и в пораженной коже в среднем соответствовали 2 : 1. Появление $CD8^+$ Т-клеточной субпопуляции лимфоцитов может свидетельствовать об активизации опухолевого процесса, что в наших случаях подтверждается характерной клинической картиной.

Выводы

Учитывая трудности клинической верификации макроскопических и микроскопических проявлений ранней стадии развития грибовидного микоза для дифференциальной диагностики дерматитов различного генеза, выявление с помощью иммуногистохимического метода уменьшения соотношения $CD4/CD8$ может служить убедительным критерием, подтверждающим опухолевую прогрессию.

Список литературы

1. Вавилов А.М., Самсонов В.А., Димант Л.Е. и др. Иммунологические исследования Т-лимфоцитов в коже // Вестн. дерматол.— 2000.— № 4.— С. 4—5.
2. Bernengo M.G., Novelli M., Quaglino P. et al. The relevance of the CD4⁺ CD26- subset in the identification of circulating Sezary cells // Br. J. Dermatol.— 2001.— N 144.— P. 125—135.
3. Berger C.L., Tigelaar R., Cohen J. et al. Cutaneous T-cell lymphoma: malignant proliferation of T-regulatory cells // Blood.— 2005.— Vol. 105.— P. 1640—1647.
4. Bernengo M.G., Novelli M., Quaglino P. et al. The relevance of the CD4⁺ CD26- subset in the identification of circulating Sezary cells // Br. J. Dermatol.— 2001.— N 144.— P. 125—135.
5. Kim E.J., Hess S., Richardson S.K. et al. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma// J. Clin. Invest.— 2005.— N 115.— P. 798—812.
6. Kim Y.H., Liu H.L., Mraz-Gernhard S. et al. Long-term outcome of 525 patients with mycosis fungoides and Sezary syndrome: clinical prognostic factors and risk for disease progression// Arch. Dermatol.— 2003.— N 139.— P. 857—866.
7. Massone C., Crisman G., Kerl H. et al. The prognosis of early mycosis fungoides is not influenced by phenotype and T-cell clonality // Br. J. Dermatol.— 2008.— N 159.— P. 881—886.
8. Olsen E., Vonderheid E., Pimpinelli N. et al. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC) // Blood.— 2007.— N 110.— P. 1713—1722.
9. Scarisbrick J.J., Whittaker S., Evans A.V. et al. Prognostic significance of tumor burden in the blood of patients with erythrodermic primary cutaneous T-cell lymphoma // Blood.— 2001.— N 97.— P. 624—630.
10. Willemze R., Jaffe E.S., Burg G. et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas // Blood.— 2005.— N 105.— P. 3768—3785.

Л.М. Хамаде, А.І. Курченко, Г.В. Федорук

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ

Роль імуногістохімічного дослідження лімфоцитарного інфільтрату в діагностиці ранньої стадії грибоподібного мікозу

Мета роботи — вивчити якісний морфологічний склад клітинного інфільтрату в шкірі хворих на грибоподібний мікоз.

Матеріали та методи. Матеріалом для дослідження були біоптати шкіри, взяті у 5 хворих на грибоподібний мікоз, за якими спостерігали на кафедрі дерматовенерології НМУ імені О.О. Богомольця. Імуногістохімічна панель включала в себе такі антитіла: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8 і CD20 виробництва Dako Cytomation. Для візуалізації використовували проявну систему візуалізації EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH (Link), Code K8012 на автостейнері фірми DAKO.

Результати та обговорення. Гістологічне дослідження клітинного складу сформованих субепідермальних інфільтратів із використанням моноклональних антитіл Т-клітинного (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8) і В-клітинного (CD20) спрямування виявило домінуючий Т-клітинний характер. Найбільша кількісна щільність була характерна для CD4 та CD3⁺-клітин, дещо менша — для клітин з CD2 та CD5-позитивністю. У інфільтратах виявляли поодинокі Т-лімфоцити з CD8-позитивністю.

Отримані дані свідчать про вибіркву міграцію в уражену шкіру Т-лімфоцитів хелперної субпопуляції. Поява CD8⁺ Т-клітинної субпопуляції лімфоцитів може свідчити про активізацію пухлинного процесу, що в наших випадках підтверджується характерною клінічною картиною.

Висновки. З огляду на труднощі клінічної верифікації макроскопічних і мікроскопічних ознак грибоподібного мікозу в ранню стадію розвитку для диференціальної діагностики дерматитів різного генезу виявлення за допомогою імуногістохімічного методу зменшення співвідношення CD4/CD8 може слугувати переконливим критерієм для підтвердження пухлинної прогресії.

Ключові слова: грибоподібний мікоз, рання стадія, імуногістохімія, співвідношення CD4⁺/CD8⁺-лімфоцитів.

L.M. Hamadeh, A.I. Kurchenko, G.V. Fedoruk

O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv

Role of immunohistochemical study of lymphocytic infiltrate in diagnosis of early stage of mycosis fungoides

Objective — to study the quality of cellular morphological composition of the inflammatory infiltrate in the skin of patients with mycosis fungoides.

Materials and methods. The material for the study of skin biopsies were taken from 5 patients with mycosis fungoides, which were observed at the department of dermatology and venereology of Bogomolets National Medical University. Immunohistochemical panel included the following antibodies: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8 and CD20 production Dako Cytomation. For visualization of imaging system we used Processor EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH (Link), Code K8012 on Autostainer of DAKO Company.

Results and discussion. Histological examination of cell composition of formed subepidermal infiltrates using monoclonal T cell antibodies (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8) and B-cells (CD20) revealed a dominant T-cell character. The highest quantitative density was characteristic of CD4 and CD3⁺ cells. A smaller density was manifested by cells with CD2 and CD5 positivity. Isolated T cells with CD8 positivity were revealed in the infiltrates. The findings have suggested of selective migration of T helper lymphocyte subpopulation to the affected skin. The emergence of CD8⁺ T-cell subpopulations of lymphocytes in the area of skin infiltrate may indicate the activation of the tumor process, which in our case is confirmed by the characteristic clinical picture.

Conclusions. Detection of a decrease in the ratio of CD4/CD8 by means of immunohistochemistry may serve as a persuasive criterion of confirming tumor progression considering the difficulties of clinical verification of macroscopic and microscopic manifestations of early stage of mycosis fungoides in the differential diagnosis of dermatitis of various origins.

Key words: mycosis fungoides, early stage, immunohistochemistry, the ratio of CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes.

Дані про автора:

Хамаде Луай Мустафа, аспірант кафедри дерматології та венерології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця

01601, м. Київ, бульв. Тараса Шевченка, 13. E-mail: dvk2@ukr.net

Курченко Андрій Ігорович, д. мед. н., проф., зав. кафедри клінічної імунології та алергології з секцією медичної генетики Національного медичного університету імені О.О. Богомольця

Федорук Галина Вікторівна, к. мед. н., доц. кафедри клінічної імунології та алергології з секцією медичної генетики Національного медичного університету імені О.О. Богомольця