

Молекулярно-генетическое определение Т-клеточной клональности лимфоидных клеток

В.А. Молочков^{1, 4}, А.М. Ковригина², Ю.В. Сидорова³, Г.В. Меньщикова¹,
А.А. Грознова⁴, А.В. Федоровская¹

¹Отделение дерматовенерологии и дерматоонкологии (зав. — проф. В.А. Молочков) МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского; ²лаборатория патоморфологии (зав. — д-р мед. наук А.М. Ковригина) ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России; ³лаборатория молекулярной гематологии (зав. — канд. биол. наук А.Б. Судариков); ⁴кафедра кожных и венерических болезней (зав. — проф. В.А. Молочков) ФППОВ ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

Статья посвящена совершенствованию ранней диагностики Т- и В-клеточных лимфом кожи, в том числе дифференциальной диагностики с крупноплащечным параспориозом, Т- и В-клеточными псевдолимфомами кожи, а также уточнению частоты их трансформации в злокачественные лимфомы кожи.

Ключевые слова: злокачественные лимфомы кожи, полимеразная цепная реакция, клональность, Т-клеточный рецептор

MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION OF T-CELL CLONALITY OF LYMPHOID CELLS

V.A.Molochkov, A.M.Kovrigina, Yu.V.Sidorova, G.V.Menshchikova, A.A.Groznova, A.V.Fedorovskaya

¹M.V.Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute; ²Hematology Research Center, Moscow; ³I.M.Sechenov Moscow State Medical University

The authors discuss problems in improvement of early diagnosis of T- and B-cell cutaneous lymphomas and differential diagnose from large-plaque parapsoriasis, T- and B-cell cutaneous pseudolymphomas, and evaluate the incidence of their transformation into malignant skin lymphomas.

Key words: malignant skin lymphomas, polymerase chain reaction, clonality, T-cell receptor

Современная диагностика лимфом кожи осуществляется комплексно с использованием гистологического, иммунофенотипического и молекулярно-генетического методов исследования [1—3]. Последний не только повышает точность диагностики лимфом кожи на 5—10%, может применяться для их раннего выявления [1, 3], но и весьма удобен, так как не требует больших временных затрат и может проводиться с использованием микробиоптатов (пункционная биопсия диаметром не более 3 мм) кожи и ДНК из парафиновых блоков (архивный, а не только свежий биопсийный материал) [2, 3]. С другой стороны, следует учитывать, что выявляемая с его помощью моноклональность лимфоидных клеток еще не указывает на наличие у пациента лимфомы (как, например, это наблюдается при лимфоматоидном папулезе, красной волчанке или системной склеродермии) [2] и для установления такого диагноза обязательно нужна гистологическая верификация.

В более ранних работах мы продемонстрировали высокую информативность в диагностике и диф-

ференциальной диагностике Т-клеточных лимфом кожи (Т-КЛК) одного из методов полимеразной цепной реакции (PCR) — метода конформационного одноцепочечного полиморфизма (SSCP) на основе определения Т-клеточной клональности лимфоидных клеток по генам γ -цепи Т-клеточного рецептора (TCR γ) [2].

Цель исследования — сравнительная оценка результатов молекулярно-генетического определения Т-клеточной клональности лимфоидных клеток по генам TCR γ с помощью методов SSCP и фрагментного анализа (FA) со стандартизированными PCR-праймерами по протоколу BIOMED-2 BMH4-ST98-3936 при дифференциальной диагностике Т-КЛК с В-клеточной лимфомой кожи (В-КЛК), клинически сходными с ними доброкачественными дерматозами (крупно- и мелкоплащечным параспориозом — КБП и МБП), псевдолимфомой кожи (ПЛК) и хроническими доброкачественными дерматозами (ХДД), такими как атопический дерматит, экзема, псориаз.

Сведения об авторах:

Молочков Владимир Алексеевич — д-р мед. наук, проф.; Ковригина Алла Михайловна — д-р мед. наук, проф.; Сидорова Юлия Владимировна — канд. мед. наук, науч. сотр.; Меньщикова Галина Владимировна — канд. мед. наук, ассистент; Грознова Анна Александровна — аспирант (anna_groznova@list.ru); Федоровская Анастасия Владимировна — аспирант.

Таблица 1

Клинические признаки и предполагаемый диагноз у обследуемых больных (n = 131)

Клинические признаки, выявленные у обследуемых больных	Количество пациентов		Диагноз, предполагаемый на основании клинической картины				
	абс.	%	Т-КЛК	В-КЛК	парапсориаз	ПЛК	ХДД
Пятна эритематозно-сквамозные	72	55	53	2	15	0	15
Бляшки	42	35	45	2	15	4	14
Узлы	15	13	3	7	0	6	0
Пойкилодермия	49	3	11	0	1	0	1
Полилимфаденопатия	30	25	23	6	1	0	5
Зуд	81	68	45	8	5	7	11
Сухость кожи	48	39	38	3	3	0	7

Таблица 2

Результаты молекулярно-генетического обследования при гистологически верифицированных Т-КЛК, В-КЛК и сравниваемых с ними заболеваниях

Количество больных (n = 131)	Диагноз по данным гистологического исследования	PCR-SSCP-TCR γ		PCR-FA-TCR γ		PCR-IgH
		моно	поли	моно	поли	моно
99	Т-КЛК (n = 49)	49 (100%)	0	49 (100%)	0	-
	КБП (n = 14)	0	14	1(7%)*	13	-
	МБП (n = 5)	0	5 (100%)	0	5 (100%)	-
	ПЛК (n = 7)	0	7 (100%)	0	7 (100%)	-
	ХДД (n = 24)	0	24 (100%)	0	24 (100%)	-
9	В-КЛК (n = 9)	0	0	0	0	9 (100%)
23	Результат исследования не позволяет достоверно верифицировать диагноз	12 (52%)	0%	7 (31%)	4(17%)	-
10	Группа контроля	0	10 (100%)	0	10 (100%)	-

Примечание. *У 1 больного КБП через 3 мес после выявления моноклональности методом FA-TCR γ также выявлена Т-КЛК с помощью патоморфологического метода исследования.

Таблица 3

Результаты обследования больных 1-й группы

№ наблюдения	Пациент	Возраст, годы	Пол	Клиническая картина	Гистологический диагноз	PCR-SSCP-TCR γ *	PCR-FA-TCR γ **
1	С.	44	М.	Эритродермия	Т-КЛК	0	+
2	М.	56	М.	Пятна	Т-КЛК	0	+
3	П.	52	Ж.	Эритродермия	Т-КЛК	0	+
4	И.	57	М.	Пятна	Т-КЛК	0	+
5	Х.	37	М.	Пятна, бляшки	Т-КЛК	0	+
6	М.	72	М.	Пятна, бляшки	Т-КЛК	0	+
7	З.	55	М.	Эритродермия	Т-КЛК	0	+
8	М.	72	М.	Эритродермия	Т-КЛК	0	+
9	С.	55	Ж.	Эритродермия	Т-КЛК	0	+
10	Т.	36	Ж.	Пятна	Т-КЛК	0	+
11	В.	65	Ж.	Пятна	Дерматит	0	-

Примечание. Здесь и в табл. 4: *праймеры опубликованы в работе T. Greiner [4]; **— праймеры по протоколу BIOMED-2 [5]; плюс — моноклональный результат, минус — поликлональный результат.

Таблица 4

Результаты обследования больных 2-й группы

№ наблюдения	Больной	Возраст, годы	Пол	Клиническая картина	Гистологический диагноз	PCR-SSCP-TCR γ *	PCR-FA-TCR γ **
1	Ц.	56	М.	Эритродермия	Т-КЛК	+	+
2	З.	49	Ж.	Пятна	Т-КЛК	+	+
3	Т.	69	Ж.	Эритродермия	Т-КЛК	+	+
4	И.	55	М.	Пятна	Т-КЛК	+	+
5	И.	37	М.	Пятна, бляшки	Т-КЛК	-	+
6	Т.	48	М.	Пятна, бляшки	Т-КЛК	-	+
7	Л.	55	Ж.	Эритродермия	Дерматит	-	+
8	Т.	58	Ж.	Эритродермия	Дерматит	-	+
9	С.	77	Ж.	Эритродермия	Дерматит	-	-
10	Х.	56	Ж.	Пятна	Дерматит	-	-
11	Ж.	65	М.	Пятна	Дерматит	-	-
12	И.	66	Ж.	Пятна	Дерматит	-	-

Материалы и методы

Обследован 131 пациент (55 мужчин и 76 женщин) в возрасте от 27 до 87 лет (средний возраст $57 \pm 4,9$ года) с патологическим процессом, требующим отличия Т-КЛК от других, сходных по клиническим проявлениям заболеваний. Объектом исследования являлись биоптаты кожи из очагов поражения всех обследуемых пациентов. Контролем служили 10 биоптатов кожи здоровых лиц.

На выраженное клиническое сходство с Т-КЛК сравниваемых заболеваний, таких как В-КЛК, парапсориаз, ПЛК и ХДД, указывают данные **табл. 1**.

Сходство клинических признаков требовало для установления диагноза Т-КЛК проведения гистологического исследования биоптата пораженной кожи (см. **табл. 1**), на основании которого он был подтвержден у 49 больных, у 23 было высказано лишь подозрение на Т-КЛК, у 9 — диагностирована В-КЛК, у 14 — КБП, у 5 — МБП, у 7 — ПЛК, у 24 — ХДД.

Результаты и обсуждение

При исследовании биоптатов кожи методами SSCP и FA по генам TCR γ (FA-TCR γ и SSCP-TCR γ) у пациентов с гистологически верифицированным диагнозом получены статистически одинаковые результаты при Т-КЛК (срок заболевания варьировал от 3 до 25 лет, в среднем составил $6,3 \pm 4,6$ года), В-КЛК, ХДД и в группе контроля (**табл. 2**).

Оставшиеся 23 пациента с клиническим подозрением на Т-КЛК и без гистологической верификации диагноза были разделены на 2 группы (1-я группа — 11 пациентов, средний срок заболевания $8,3 \pm 5,1$ мес, 2-я группа — 12 пациентов, средний срок заболевания $10,7 \pm 5,7$ мес) и обследованы с помощью PCR-методов FA и SSCP по генам TCR γ .

Результаты молекулярно-генетического исследования биоптатов кожи больных 1-й группы с помощью методов FA-TCR γ и SSCP-TCR γ представлены в **табл. 3**.

Как видно из **табл. 3**, при исследовании методом FA-TCR γ моноклональность выявлена в наблюдениях № 1—10 в сроки заболевания от 6 до 18 мес (в среднем $11,1 \pm 4,6$ мес). Гистологическая верификация диагноза Т-КЛК была осуществлена в более поздние сроки болезни — от 7 до 24,5 мес (в среднем $14,6 \pm 5,6$ мес) соответственно.

Результаты молекулярно-генетического исследования биоптатов кожи больных 2-й группы с помо-

щью методов FA-TCR γ и SSCP-TCR γ представлены в **табл. 4**, из которой видно, что моноклональность лимфоидных клеток выявили в наблюдениях № 1—4 в сроки заболевания от 3,5 до 23 мес (в среднем $9,6 \pm 7,9$ мес; $p > 0,05$). Гистологический диагноз Т-КЛК во 2-й группе был установлен позже — в сроки болезни 9, 11, 17, 31 мес соответственно (в среднем $17 \pm 8,6$ мес).

Таким образом, в диагностике и дифференциальной диагностике Т-КЛК оба метода (PCR-SSCP-TCR γ и PCR-ФА-TCR γ) оказались одинаково информативными в поздние (от 3 до 25 лет) сроки болезни; в более ранние сроки Т-КЛК метод FA с праймерами по протоколу BIOMED-2 оказался существенно чувствительнее (64 и 33% соответственно), что позволяет с большой достоверностью рекомендовать метод PCR-ФА-TCR γ для проведения ранней диагностики лимфом кожи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никитин Е.А., Сидорова Ю.В., Рыжикова Н.В., Бидерман Б.В., Меликян А.Л., Виноградова Ю.Э. и др. Определение Т-клеточной клональности по гамма-цепи Т-клеточного рецептора: окончательные данные. *Терапевтический архив*. 2006; 7: 52—7.
2. Овсянникова Г.В. Современные методы комплексной диагностики злокачественных лимфом кожи: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 2009.
3. Delabesse E., Burtin M.-L., Millien C., Madonik A., Arnulf B., Beldjord K., et al. Rapid, multicolor TCR γ V γ and J γ typing: application to T cell acute lymphoblastic leukemia and to the detection of minor clonal populations. *Leukemia*. 2000; 14(6): 1143—52.
4. Greiner T.C., Raffeld M., Lutz C., Dick F., Jaffe E.S. Analysis of T-cell receptor-gamma gene rearrangements by denaturing gradient gel electrophoresis of GC-clamped polymerase chain reaction products: correlation with tumor-specific sequences. *Am. J. Pathol.* 1995; 146(1): 46—55.
5. van Dongen J.J., Langerak A.W., Bruggemann M., Evans P.A., Hummel M., Lavender F.L., et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4 CT98-3936. *Leukemia*. 2003; 17(12): 2257—317.

Поступила 28.11.12