

Уровень пролиферативной активности лимфоцитов при грибковидном микозе и бляшечном парапсориазе

А.С. Жуков, И.Э. Белоусова, В.Р. Хайрутдинов, И.Н. Теличко, А.В. Самцов

ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ
194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

Уровень пролиферативной активности является важным прогностическим фактором ряда онкологических заболеваний, но его диагностическая значимость при грибковидном микозе до настоящего времени изучена недостаточно.

Цель. Изучение пролиферативной активности лимфоцитов в коже больных грибковидным микозом и бляшечным парапсориазом.

Материал и методы. Методом иммуногистохимического исследования в биоптатах кожи больных грибковидным микозом (18 пациентов) и бляшечным парапсориазом (6 пациентов) определяли содержание CD3+ и Ki-67+ клеток. Рассчитывали коэффициент эпидермо-дермального отношения пролиферативной активности клеток (Ki-67+) кожи и индекс пролиферативной активности клеток. Группу контроля составили 16 здоровых лиц.

Результаты. Коэффициент эпидермо-дермального отношения пролиферирующих клеток у здоровых людей составил 10,9, у больных бляшечным парапсориазом — 5,43, у пациентов с грибковидным микозом пятнистой и бляшечно-опухолевой стадий — 3,84 и 2,42 соответственно. Доля пролиферирующих CD3+Ki-67+ клеток от общего количества Т-лимфоцитов составила у больных бляшечным парапсориазом 1%, у пациентов с грибковидным микозом пятнистой стадии — 3%.

Заключение. Коэффициент эпидермо-дермального отношения пролиферативной активности клеток (Ki-67+) кожи у больных грибковидным микозом всех стадий ниже, чем у здоровых людей и пациентов с парапсориазом. Индекс пролиферативной активности клеток у пациентов с грибковидным микозом бляшечно-опухолевой стадии выше, чем у больных бляшечным парапсориазом. Количество CD3+Ki-67+ клеток у больных грибковидным микозом пятнистой и бляшечно-опухолевой стадии выше, чем у здоровых лиц и пациентов с бляшечным парапсориазом.

Ключевые слова: **грибковидный микоз, Ki-67, пролиферативная активность, Т-клеточная лимфома кожи.**

Контактная информация: md.zhukov@gmail.com. Вестник дерматологии и венерологии 2014; (1): 30—36.

Level of the proliferative activity of lymphocytes in case of mycosis fungoides and plaque parapsoriasis

A.S. Zhukov, I.E. Belousova, V.R. Khairutdinov, I.N. Telichko, A.V. Samtsov

Military Medical Academy named after S.M. Kirov Ministry of Defense of the Russian Federation
Akademika Lebedeva str., 2, St. Petersburg, 194044, Russia

The level of the proliferative activity is an important predictor of a number of oncologic diseases; at the same time, its diagnostic value for mycosis fungoides was not adequately investigated.

Goal. To study the proliferative activity of lymphocytes in the skin of patients suffering from mycosis fungoides and plaque parapsoriasis.

Materials and methods. The level of CD3+ and Ki-67+ cells was determined in skin biopsy samples taken from patients suffering from mycosis fungoides (18 subjects) and plaque parapsoriasis (6 subjects) by means of immunohistochemistry. The epidermal to dermal skin cell proliferative activity ratio (Ki-67+) and cell proliferative activity index were calculated. The control group comprised 16 healthy people.

Results. The epidermal to dermal skin cell proliferative activity ratio amounted to 10.9 in healthy people, 5.43 in patients suffering from plaque parapsoriasis, and 3.84 and 2.42 in patients suffering from mycosis fungoides, spotty and plaque and tumor stages, respectively. The percentage of proliferative CD3+Ki-67+ cells relative to the total number of T-lymphocytes amounted to 1% in the patients suffering from plaque parapsoriasis and 3% in the patients with mycosis fungoides, spotty stage.

Conclusion. The epidermal to dermal skin cell proliferative activity ratio (Ki-67+) in patients suffering from mycosis fungoides at any stage is lower than that in healthy subjects and patients suffering from parapsoriasis. The cell proliferative activity index was higher in the patients with mycosis fungoides, plaque and tumor stage, than in the patients with parapsoriasis. The number of CD3+Ki-67+ cells was higher in the patients with mycosis fungoides, spotty and plaque and tumor stages, than in the healthy subjects and patients suffering from parapsoriasis.

Key words: mycosis fungoides, Ki-67, proliferative activity, T-cell skin lymphoma.

Corresponding author: md.zhukov@gmail.com. Vestnik Dermatologii i Venerologii 2014; 1: 30—36.

■ Т-клеточные лимфомы кожи (ТКЛК) — гетерогенная группа лимфопролиферативных заболеваний, характеризующаяся клональной пролиферацией малигнизированных Т-лимфоцитов в коже. Наиболее часто встречающейся формой ТКЛК является грибовидный микоз (ГМ). Данное заболевание имеет широкий спектр клинических проявлений: от незначительных пятен до множественных узлов на коже, в поздних стадиях могут поражаться лимфатические узлы и внутренние органы. Начальные стадии ГМ нередко трудны для диагностики. Так, по данным Е.М. Лезвинской и соавт., при первом обращении к врачу диагноз ГМ был установлен только в 25% случаев, в остальных диагностировали экзему, аллергический дерматит, токсидермию, парapsoriasis [1]. Очевидно, что клиническая диагностика не всегда является достаточным методом для установления диагноза ГМ. Существующие гистологические и иммуногистохимические критерии также не всегда позволяют провести дифференциальный диагноз между ранними стадиями ГМ и воспалительными дерматоза-

ми, поэтому остается актуальной проблема поиска новых иммуногистохимических маркеров и методов оценки их экспрессии.

Сходные с пятнистой стадией ГМ клинические проявления и гистологические признаки имеет бляшечный парapsoriasis (БП), что создает значительные трудности при проведении дифференциальной диагностики. По классификации ВОЗ БП относится к хроническим доброкачественным дерматозам, однако эту точку зрения поддерживают не все авторы [2, 3]. Разработка дифференциальных критериев ГМ и БП является одним из приоритетных направлений современной дерматоонкологии.

Раннее диагностирование ГМ, основанное на выявлении злокачественной пролиферации лимфоцитов, необходимо для выбора оптимальной тактики лечения больного, определяющей долгосрочный прогноз заболевания.

В качестве маркеров клеточной пролиферации в настоящее время используют протеин Ki-67, ци-

клин D1 и белок MCM (Mini Chromosome Maintenance protein). Молекула Ki-67 является универсальным маркером, что обусловлено ее присутствием в клетке только во время процесса деления и разрушением в течение 1,5—2 ч. после окончания митоза. Маркер Ki-67 выявляется в области теломер, центромер и ядрышках. Детекцию Ki-67 используют для установления диагноза и оценки прогноза ряда онкологических заболеваний [4]. Описаны корреляции между уровнем экспрессии маркера Ki-67 и стадией рака молочной железы, выживаемостью пациентов [5]. W. Foltyn и соавт. разработали алгоритм лечения больных с нейроэндокринными опухолями желудочно-кишечного тракта в зависимости от уровня экспрессии Ki-67 [6]. Диагностической значимостью обладает определение экспрессии белка Ki-67 при раке желудка [7].

При лимфопролиферативных заболеваниях кожи высокое значение индекса пролиферативной активности опухолевых клеток коррелирует с плохим прогнозом у больных с первично-кожной диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой [8]. Обнаружено, что уровень экспрессии Ki-67 увеличивается при прогрессировании ГМ [9]. В исследовании T. Gambichler и соавт. показано, что экспрессия маркера Ki-67 в коже достоверно различается у пациентов с ГМ IIB стадии и больных БП, но у пациентов с ГМ I—IIA стадии и БП нет статистически значимых различий этого показателя [10].

Таким образом, уровень пролиферативной активности является важным прогностическим фактором ряда онкологических заболеваний. Диагностическая значимость определения пролиферативной активности лимфоцитов при ГМ до настоящего времени изучена недостаточно.

Цель исследования — изучение пролиферативной активности лимфоцитов в коже больных ГМ и БП.

Материал и методы

Группу больных ГМ составили 18 пациентов в возрасте от 58 до 82 лет (средний возраст $70 \pm 4,5$ года). Среди них I стадия (пятнистая) была диагностирована у 9 пациентов, II стадия (бляшечная) — у 7, III стадия (опухолевая) — у 2. Больные ГМ были разделены на две подгруппы: с пятнистой и бляшечно-опухолевой стадией. Диагноз был установлен клинически и подтвержден гистологическим исследованием. В группу больных БП вошли 6 пациентов в возрасте от 45 до 62 лет (средний возраст $52 \pm 3,4$ года). Группу контроля составили 16 здоровых лиц (средний возраст $56 \pm 2,1$ года). На проведение исследования получено разрешение Комитета по вопросам этики при ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ.

Объектами исследования были пораженные участки кожи больных ГМ, БП и здоровых лиц, взятые методом кожи панч-биопсии (6 мм). Для иммуногистохими-

ческой детекции использовали первичные мышинные моноклональные античеловеческие антитела к CD3 и Ki-67, систему визуализации Envision (Dako, Швеция) (хромоген — диаминобензидин) и двойную систему визуализации Multivision Polymer (Thermo Fisher Scientific, США). Результаты оценивали с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из светового оптического микроскопа Nikon Eclipse E400, цифровой камеры Nikon DXM1200, персонального компьютера на базе Intel Pentium 4 и программного обеспечения «Морфология 5.2» («ВидеоТест», Россия). В каждом случае анализировали 3 поля зрения при увеличении $\times 200$ (размером 720×530 мкм), выбранных с учетом наибольшего количества меченых клеток.

Для количественной оценки препаратов были использованы следующие показатели.

Относительную площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах.

Индекс пролиферативной активности определяли как отношение количества Ki-67-позитивных клеток к общему количеству ядерных клеток в поле зрения, выраженное в процентах.

Эпидермо-дермальное отношение рассчитывали как коэффициент, равный отношению площади экспрессии маркера в эпидермисе к площади экспрессии в дерме.

Детекция двойных позитивных (CD3+Ki-67+) клеток проводилась путем подсчета относительной площади экспрессии клеток, окрашенных двойным цветом, которая выражалась в процентах.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы STATISTICA 10.0 (StatSoft, Inc). Для сравнения данных между группами применяли U-критерий Манна — Уитни. Для всех критериев и тестов различия признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Относительная площадь экспрессии маркера CD3 в коже здоровых лиц составила $0,12 \pm 0,11\%$, пациентов с БП — $2,93 \pm 0,18\%$ ($p < 0,05$). У больных ГМ в пятнистой стадии данный показатель возрастал до $9,24 \pm 0,22\%$ ($p < 0,05$) и наибольшее его значение определено у пациентов с бляшечной и опухолевой стадиями ГМ — $22,96 \pm 0,32\%$ ($p < 0,05$) (см. таблицу).

Анализ распределения Т-лимфоцитов в эпидермисе и дерме показал, что у больных БП коэффициент эпидермо-дермального отношения маркера CD3 составлял $0,2 \pm 0,058$. В пятнистой и бляшечно-опухолевой стадиях ГМ данный показатель статистически значимо не различался, составляя $0,29 \pm 0,11$ и $0,22 \pm 0,08$ соответственно ($p > 0,05$).

Таблица Показатели относительной площади экспрессии CD3+ и Ki-67+ клеток в коже больных ГМ и БП

Группа	CD3+				Ki-67+				CD3+Ki-67+			
	всего	Э	Д	коэф-фициент Э/Д	всего	Э	Д	коэф-фициент Э/Д	всего	Э	Д	коэф-фициент Э/Д
	относительная площадь экспрессии, %				относительная площадь экспрессии, %				относительная площадь экспрессии, %			
Больные БП (n = 6)	2,93 ± 0,18*	0,48 ± 0,26*	2,44 ± 0,15*	0,2 ± 0,05	1,57 ± 0,19*	1,32 ± 0,25*	0,24 ± 0,08*	5,43 ± 0,98*	0,03 ± 0,01	0,00	0,03 ± 0,01	0
Больные ГМ I стадии (n = 9)	9,24 ± 0,27 [#]	2,08 ± 0,22 [#]	7,16 ± 0,31 [#]	0,29 ± 0,11	1,87 ± 0,74	1,48 ± 0,82	0,39 ± 0,21	3,84 ± 0,44 [#]	0,32 ± 0,02 [#]	0,02 ± 0,01	0,29 ± 0,09 [#]	0,08 ± 0,02
Больные ГМ II, III стадии (n = 9)	22,96 ± 0,52 [#]	4,16 ± 0,37 [#]	18,8 ± 0,61 [#]	0,22 ± 0,08	3,04 ± 0,27 [#]	2,15 ± 0,35 [#]	0,89 ± 0,18 [#]	2,42 ± 0,25 [#]	0,48 ± 0,18 [#]	0,04 ± 0,03	0,44 ± 0,21 [#]	0,08 ± 0,03
Контрольная группа (n = 16)	0,12 ± 0,11	0	0,12 ± 0,11	0,001 ± 0,001	0,49 ± 0,15	0,46 ± 0,22	0,04 ± 0,01	10,9 ± 2,13	0	0	0	0

Примечание. Э — эпидермис; Д — дерма; Э/Д — эпидермо-дермальное отношение; коэффициент Э/Д — коэффициент эпидермо-дермального отношения. Статистически значимые различия $p < 0,05$: * между группой больных БП и контролем; [#] между группой больных БП и ГМ.

Индекс пролиферативной активности у пациентов с ГМ бляечно-опухоловой стадии ($3,04 \pm 0,27\%$) был почти в 2 раза выше, чем у больных БП ($1,57 \pm 0,19\%$; $p < 0,05$). В то же время различия между показателями у больных БП ($1,57 \pm 0,52\%$) и с пятнистой стадией ГМ ($1,87 \pm 0,44\%$) не были статистически значимы ($p > 0,05$).

Коэффициент эпидермо-дермального отношения пролиферирующих клеток (все Ki-67+ клетки кожи) у здоровых людей составил $10,9 \pm 2,13$, у больных БП он был ниже — $5,43 \pm 0,98$ ($p < 0,05$), у пациентов с ГМ пятнистой и бляечно-опухоловой стадий его значение было наименьшим — $3,84 \pm 0,44$ и $2,42 \pm 0,25$ соответственно ($p < 0,05$ при каждом сравнении) (рис. 1).

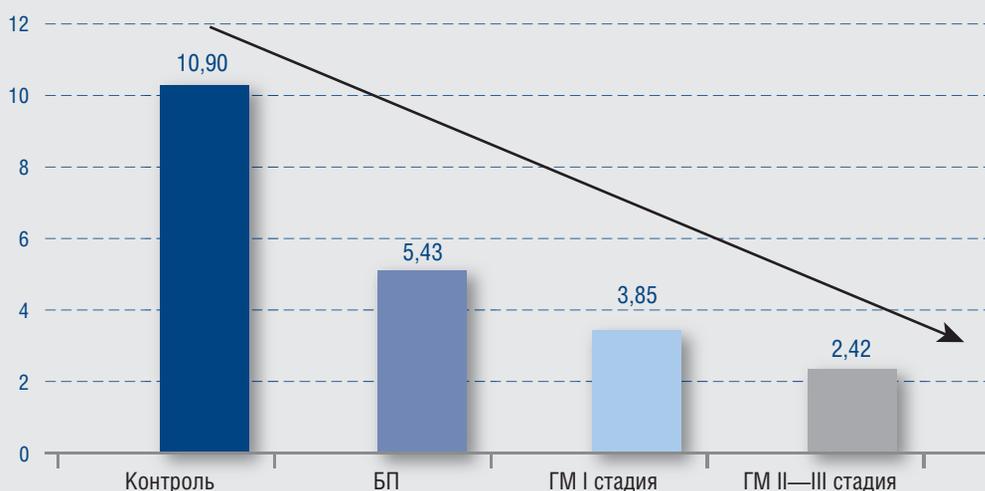


Рис. 1. Значение коэффициента эпидермо-дермального отношения количества Ki-67+ клеток в коже больных ГМ и БП

Двойные позитивные клетки CD3+Ki-67+ практически не встречались в коже здоровых лиц (рис. 2). У пациентов с БП CD3+Ki-67+ клетки локализовались только в дерме (относительная площадь экспрессии $0,03 \pm 0,01\%$), у больных ГМ относительная пло-

щадь экспрессии маркеров CD3+Ki-67+ была выше и составила при пятнистой стадии $0,32 \pm 0,02\%$ ($p < 0,05$), при бляшечно-опухолевой — $0,48 \pm 0,12\%$ ($p < 0,05$) (рис. 3). Различия между пятнистой стадией ГМ ($0,32 \pm 0,12\%$) и бляшечно-опухолевой стадией

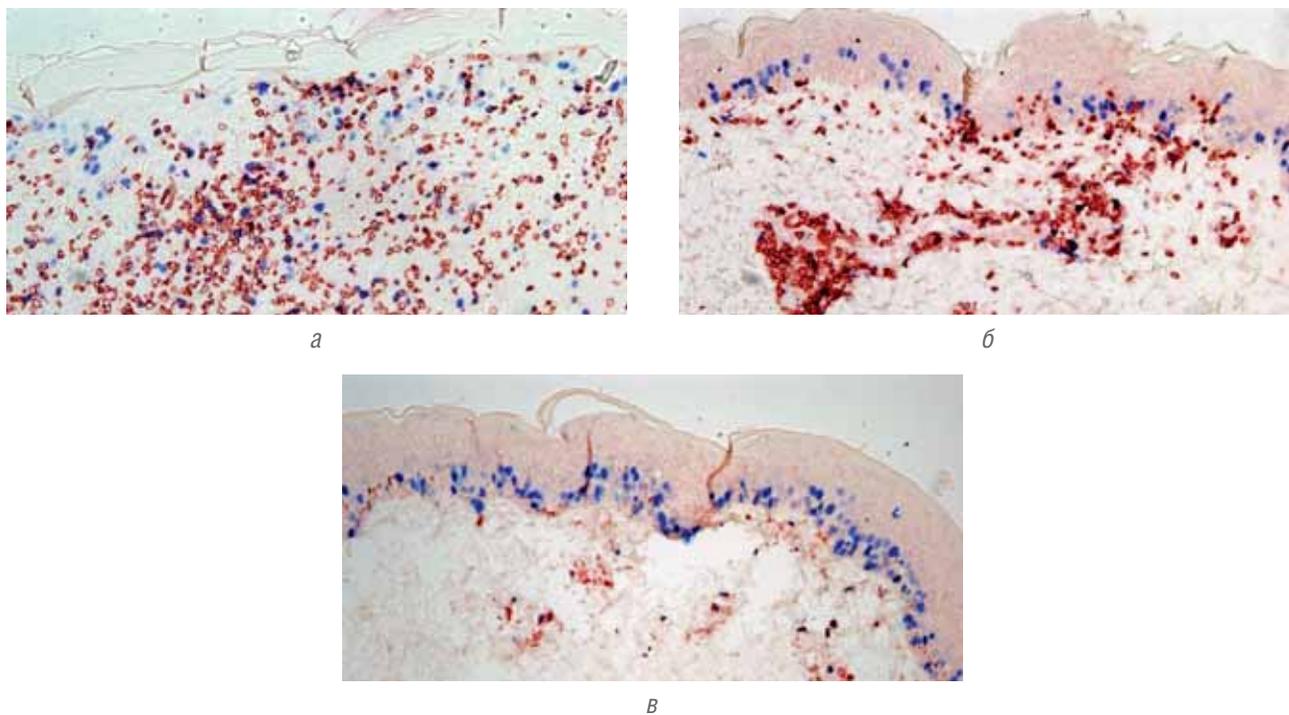


Рис. 2. Иммуногистохимический препарат кожи больных ГМ (а), БП (б) и здорового человека (в). Анти-CD3 — красное окрашивание; анти-Ki-67 — синее окрашивание ($\times 100$)

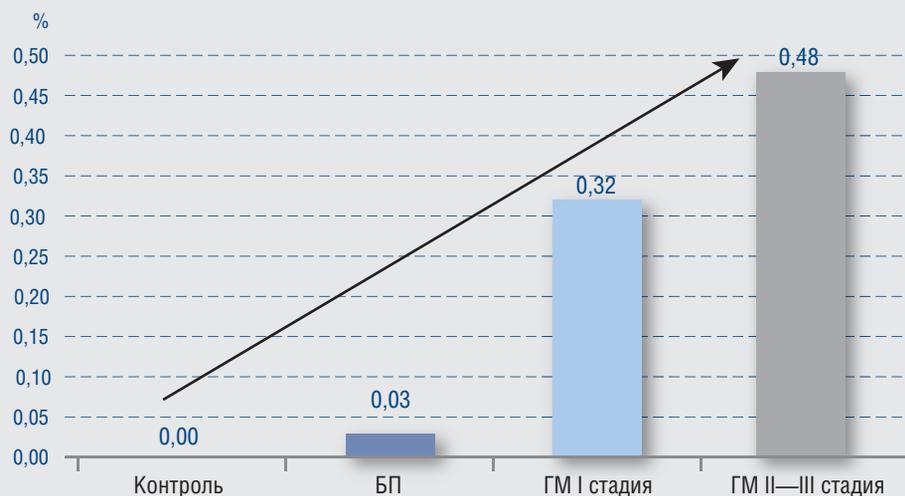


Рис. 3. Относительная площадь экспрессии маркера CD3+Ki-67+ в коже больных ГМ и БП

($0,48 \pm 0,23\%$) не достигли статистической значимости в связи с малочисленностью сравниваемых групп. У больных ГМ CD3+Ki-67+ клетки встречались не только в дерме, но и в эпидермисе.

Доля пролиферирующих CD3+Ki-67+ клеток от общего количества Т-лимфоцитов у больных БП составила $1,00 \pm 0,02\%$, у пациентов с ГМ пятнистой стадии — $3,00 \pm 0,12\%$ ($p > 0,05$), с бляшечно-опухоловой — $2,00 \pm 0,08\%$ ($p > 0,05$) (рис. 4).

Обсуждение

Выполнено исследование пролиферативной активности клеток кожи больных БП и ГМ. Выявленное увеличение содержания лимфоцитов в дермальных инфильтратах и эпидермисе у больных БП по сравнению с больными ГМ пятнистой стадии и дальнейшее нарастание их количества в коже при ГМ бляшечно-опухоловой стадии было ожидаемым. Повышение численности лимфоцитов в эпидермисе и дерме происходило одновременно, в связи с чем коэффициент эпидермо-дермального отношения CD3+ клеток у больных БП и ГМ изменялся незначительно и находился в пределах 0,2—0,3.

Анализ распределения всех Ki-67+ клеток кожи (в первую очередь, пролиферирующих кератиноцитов и Т-лимфоцитов) выявил наиболее высокое значение коэффициента эпидермо-дермального отношения у здоровых людей. У пациентов с БП и ГМ этот показатель многократно уменьшается за счет нарастания пролиферативной активности клеток дермальных инфильтратов и, возможно, снижения пролиферации кератиноцитов. Уменьшение коэффициента эпидермо-дермального отношения Ki-67+ клеток кожи у больных ГМ по сравнению с больными БП свидетельствует о более интенсивной пролиферации дермальных Т-лимфоцитов при их злокачественной трансформации.

Использование иммуногистохимического исследования с двойной маркировкой CD3+Ki-67+, направленное на детекцию пролиферирующих Т-лимфоцитов, более информативно при проведении дифференциальной диагностики лимфопролиферативных заболеваний кожи. Применение данного метода позволяет достоверно оценить уровень пролиферативной активности лимфоцитов и обнаружить более значимые различия между БП и ГМ, чем при использовании только одного маркера Ki-67.

Определение коэффициента эпидермо-дермального отношения Ki-67+ клеток и детекцию двойных позитивных CD3+Ki-67+ клеток целесообразно проводить при дифференциальной диагностике БП и ГМ. Практическая значимость исследования пролиферации Т-лимфоцитов методом двойной маркировки у больных ГМ различных стадий может заключаться в прогнозировании дальнейшей прогрессии заболевания.

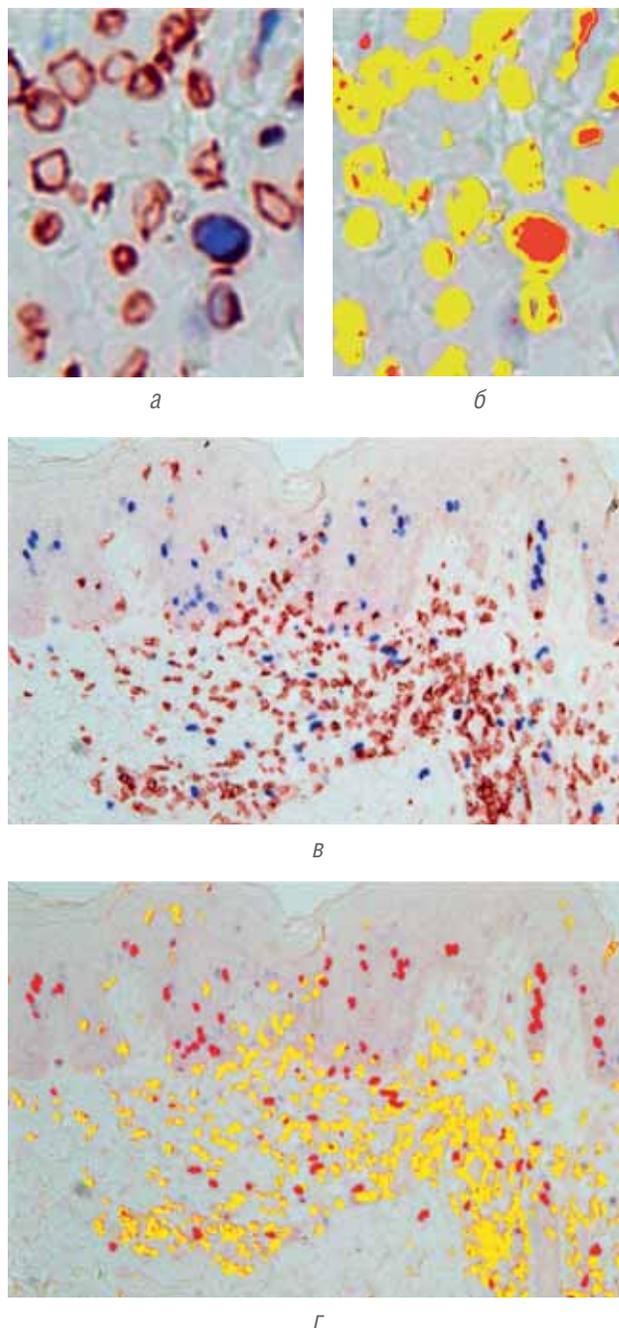


Рис. 4. Иммуногистохимический препарат кожи больного ГМ: а, в — до модификации программой «Морфология»: анти-CD3 — красное окрашивание; анти-Ki-67 — синее окрашивание (а — $\times 400$; в — $\times 100$); б, г — модификация изображения программой «Морфология»: анти-CD3 — желтое окрашивание, анти-Ki-67 — красное окрашивание (б — $\times 400$; г — $\times 100$)

Выводы

Коэффициент эпидермо-дермального отношения пролиферативной активности клеток (Ki-67+) кожи у больных ГМ всех стадий ниже, чем у здоровых людей и пациентов с БП.

Индекс пролиферативной активности клеток у пациентов с ГМ бляшечно-опухолевой стадии выше, чем у больных БП.

Количество CD3+Ki-67+ клеток у больных ГМ пятнистой и бляшечно-опухолевой стадий выше, чем у здоровых лиц и пациентов с БП. ■

Литература

1. Lezvin'skaya E.M., Molochkov V.A., Larina N.K. Sostoyaniye zaboлеваemosti zlokachestvennyimi limfomami kozhi v Moskovskoy oblasti i puti sovershenstvovaniya lechebno-diagnosticheskoy pomoshchi bol'nym. Russian Journal of Skin and Sexually Transmitted Diseases [Лезвинская Е.М., Молочков В.А., Ларина Н.К. Состояние заболеваемости злокачественными лимфомами кожи в Московской области и пути совершенствования лечебно-диагностической помощи больным. Росс журн кож и вен бол 2000; (4): 12—17.]
2. Ackerman A.B. If small plaque (digitate) parapsoriasis is a cutaneous T-cell lymphoma, even an «abortive» one, it must be mycosis fungoides! Arch Dermatol 1996; 132: 562—566.
3. Willemze R., Jaffe E.S., Burg G. et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. Blood 2005; 105: 3768—3785.
4. Babichenko I.I., Kovyazin V.A. Novye metody immunogistokhimicheskoy diagnostiki opukholevogo rosta: Ucheb. posobie. — M: RUDN, 2008. — 109 s. [Бабиченко И.И., Ковязин В.А. Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста: Учеб. пособие. М: РУДН, 2008; 109.]
5. Golmohammadi R., Pejhan A. The prognostic value of the P53 protein and the Ki-67 marker in breast cancer patients. J Pak Med Assoc 2012; 62 (9): 871—875.
6. Foltyn W., Zajęcki W., Marek B. et al. The value of the Ki-67 proliferation marker as a prognostic factor in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. Endokrynol Pol 2012; 63 (5): 362—366.
7. He W.L., Li Y.H., Yang D.J. et al. Combined evaluation of centromere protein H and Ki-67 as prognostic biomarker for patients with gastric carcinoma. Eur J Surg Oncol. 2013; 39 (2): 141—149.
8. Jovanovich M.P., Jakovich L., Bogdanovich A. et al. Poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma is associated with high percentage of bcl-2 and Ki 67-positive tumor cells. Vojnosanit Pregl 2009; 66 (9): 738—743.
9. Dummer R., Michie S.A., Kell D. et al. Expression of bcl-2 protein and Ki-67 nuclear proliferation antigen in benign and malignant cutaneous T-cell infiltrates. J Cutan Pathol 1995; 22 (1): 11—17.
10. Gambichler T., Bischoff S., Bechara F.G. et al. Expression of proliferation markers and cell cycle regulators in T cell lymphoproliferative skin disorders. J Dermatol Sci 2008; 49 (2): 125—132.

об авторах:

А.С. Жуков — адъюнкт кафедры кожных и венерических болезней ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург

И.Э. Белоусова — д.м.н., доцент кафедры кожных и венерических болезней ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург

В.Р. Хайрутдинов — к.м.н., ассистент кафедры кожных и венерических болезней ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург

И.Н. Теличко — д.м.н., профессор кафедры кожных и венерических болезней ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург

А.В. Самцов — д.м.н., профессор, зав. кафедрой кожных и венерических болезней ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье