

# Роль молекулярно-генетических методов определения Т- и В-клеточной клональности в диагностике злокачественных лимфом кожи

В.А. Молочков, Ю.В. Сидорова, А.А. Грознова, Г.В. Овсянникова, А.В. Федоровская, А.В. Молочков, А.Б. Судариков

The role of molecular and genetic methods to determine the T-cell and B-cell clonality in diagnosing malignant cutaneous lymphomas.

A.V. MOLOCHKOV, YU.V. SIDOROVA, A.A. GROZNOVA, G.V. OVSYANNIKOVA, A.V. FEDOROVSKAYA, A.V. MOLOCHKOV, A.B. SUDARIKOV

об авторах:

В.А. Молочков — руководитель отделения дерматовенерологии и дерматоонкологии МОНИКИ им. М.В. Владимирского, д.м.н., профессор

Ю.В. Сидорова — научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии Гематологического научного центра РАМН, к.м.н.

А.А. Грознова — аспирант кафедры кожных и венерических болезней ФППОВ Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Г.В. Овсянникова — ассистент кафедры дерматовенерологии и дерматоонкологии МОНИКИ им. М.В. Владимирского, к.м.н.

А.В. Федоровская — аспирант кафедры дерматовенерологии и дерматоонкологии МОНИКИ им. М.В. Владимирского

А.В. Молочков — профессор кафедры дерматовенерологии и дерматоонкологии МОНИКИ им. М.В. Владимирского, д.м.н.

А.Б. Судариков — руководитель лаборатории молекулярной гематологии Гематологического научного центра РАМН, к.м.н.

Приведены данные об исследованиях, способствующих совершенствованию дифференциальной диагностики Т- и В-клеточных лимфом кожи, в том числе с крупноплащечным параспориозом, Т- и В-клеточными псевдолимфомами кожи, а также о частоте их трансформации в злокачественные лимфомы кожи. У 101 пациента проведено обследование методом полимеразной цепной реакции с целью определения Т- и В-клеточной клональности лимфоцитов по генам  $\gamma$ - и  $\beta$ -цепей Т-клеточного рецептора и генам тяжелой цепи иммуноглобулина. У пациентов с Т-клеточными лимфомами кожи моноклональность определялась в 40 из 46 случаев, с В-клеточными лимфомами кожи — в 3 из 4 случаев. Также моноклональность была выявлена в 1 из 14 случаев крупноплащечного параспориоза и в 1 из 2 случаев Т-клеточной псевдолимфомы кожи. Во всех 24 случаях хронических доброкачественных дерматозов, 5 случаях мелкоплащечного параспориоза и 10 биоптатах кожи от здоровых доноров была выявлена поликлональность лимфоцитов. Таким образом, полученные результаты позволяют считать данный метод важным дополнением в диагностике лимфопролиферативных заболеваний кожи.

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

The article presents the data on the studies contributing to improving the differential diagnostics of T-cell and B-cell cutaneous lymphomas including large-plaque parapsoriasis and T-cell and B-cell cutaneous pseudolymphomas as well as frequency of their transformation into malignant cutaneous lymphomas. There was a study of 101 patients using the polymerase chain reaction method to determine the T-cell and B-cell lymphocyte clonality by genes of  $\gamma$  and  $\beta$  chains in the T-cell receptor and immunoglobulin heavy chain genes. Monoclonality was determined in 40 of 46 cases in patients

with T-cell cutaneous lymphomas and in three of four cases in patients with B-cell cutaneous lymphomas. Monoclonality was revealed in one of 14 cases of large-plaque parapsoriasis and one of two cases of T-cell cutaneous pseudolymphoma. In all of the 24 cases of chronic benign dermatoses, five cases of small-plaque parapsoriasis and ten skin tissue samples obtained from healthy donors, polyclonal lymphocytes were revealed. So, the obtained results make it possible to consider the method to be an important addition in the field of diagnosing lymphoproliferative skin diseases.

**Key words:** malignant cutaneous lymphomas, polymerase chain reaction, clonality, T-cell receptor.

■ Как известно, молекулярно-генетические методы определения клональности лимфоцитов, основанные на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР), повышают точность выявления злокачественных лимфом кожи (ЗЛК) [1]. Однако используемый ранее полиакриламидный гель-электрофорез был менее информативным при ЗЛК [2, 3] по сравнению с разработанным и используемым в настоящее время методом фрагментного анализа (*the automated high-resolution PCR fragment analysis*). Высокая чувствительность данного метода основывается на возможности дифференцировать нуклеотидные последовательности с точностью до одного нуклеотида [2].

Метод фрагментного анализа основан на разделении меченных флюоресцентным красителем ПЦР-продуктов в капиллярах, заполненных гелем. Для исследования используется автоматический анализатор нуклеиновых кислот. Флюоресцентный сигнал, испускаемый ПЦР-продуктом, фиксируется в виде пика определенной высоты и площади в зависимости от интенсивности свечения [4].

При ПЦР-анализе исследуется уникальная для каждого Т- и В-лимфоцита область соединения V-D-J сегментов (CDR3 области) генов гамма- и бета-цепей Т-клеточных рецепторов лимфоцитов (*TCR $\gamma$*  и *TCR $\beta$* ), а также генов тяжелой цепи иммуноглобулинов (IgH). При появлении клона лимфоцитов, если перестройка прошла на одной хромосоме (моноаллельная перестройка), среди амплификатов будет доминировать один ПЦР-продукт, если перестройка прошла на двух гомологичных хромосомах (биаллельная перестройка) — два ПЦР-продукта [5].

Клональность лимфоцитов определяется при наличии 1—10% опухолевых лимфоцитов в образце, что позволяет выявлять ее не только в биоптатах кожи, но и в образцах крови [6, 7].

Основным показанием к определению клональности Т- и В-лимфоцитов является дифференциальная диагностика опухолевой и реактивной пролиферации лимфоцитов [3, 8]. Определение моноклонального типа пролиферации свидетельствует о злокачественном характере болезни. Однако иногда моноклональность лимфоцитов может выявляться при различных хронических воспалительных дерматозах (ХВД), таких как псориаз, экзема, атопический дерматит [9—11], инфекционных воспалительных процессах (инфекци-

онный мононуклеоз) [12] или системных заболеваниях соединительной ткани (системная склеродермия, системная красная волчанка и т. д.). При этих заболеваниях высота доминирующих пиков, обозначающих клоны лимфоцитов (по данным фореграмм фрагментного анализа), достоверно ниже, чем при ЗЛК [13]. Поликлональный тип пролифераций выявляется при доброкачественных реактивных лимфопролиферативных процессах и ХВД. При ЗЛК, даже подтвержденных гистологически, возможно отсутствие моноклональности лимфоцитов инфильтрата, что связано с неравномерным распределением лимфоцитов в коже. Это, в частности, наблюдается при эритродермии у больных грибовидным микозом, при котором воспалительный компонент доминирует над пролиферативным, а также при незначительном количестве опухолевых лимфоцитов в биоптате кожи на начальных стадиях лимфомы кожи [14, 15]. Следует отметить, что моноклональность опухолевых лимфоцитов может иметь место не только в биоптате пораженной кожи, но и в крови этого же пациента в 15% случаев на ранних стадиях и 63% на поздних стадиях грибовидного микоза [16]. При этом эффективность ранней диагностики ЗЛК повышается путем одновременного гистологического и молекулярно-генетического исследования двух биоптатов пораженной кожи в совокупности с образцом крови пациента.

С учетом вышесказанного целью настоящего исследования явилось совершенствование дифференциальной диагностики Т- и В-клеточных лимфом кожи (ТКЛК и ВКЛК) с крупнобляшечным парapsориазом (КБП), Т- и В-клеточными псевдолимфомами (ТПЛК и ВПЛК) кожи, с ХВД, а также уточнение частоты их трансформации в ЗЛК.

## Материал и методы

Метод фрагментного анализа для определения клональности лимфоцитов был применен нами при обследовании 101 пациента (66 мужчин и 35 женщин) с патологическим процессом, требующим дифференциальной диагностики с ТКЛК и ВКЛК. Возраст пациентов варьировал от 27 до 87 лет (средний возраст 57 лет). У 46 из них был гистологически установлен диагноз ТКЛК, у 4 — ВКЛК, у 19 — парapsориаз, у 8 — псевдолимфомы кожи. В группу больных с ХВД, схожими по ряду клинических симптомов с ТКЛК, было

включено 24 пациента с гистологически установленным диагнозом хронического воспалительного процесса (табл. 1).

Все пациенты были обследованы в отделении дерматоонкологии и дерматовенерологии и отделении патоморфологии ГУ МОНКИ им. М.Ф. Владимирского. Молекулярные методы определения клональности лимфоцитов проводились в лаборатории молекулярной гематологии ГНЦ РАМН. Диагноз лимфомы кожи устанавливали в соответствии с международной классификацией лимфом кожи WHO/EORTC (2005 г.) [17]. Объектом исследования являлись биоптаты пораженной кожи, у 3 больных помимо двух биоптатов исследовали на клональность лимфоцитов образцы периферической крови.

В качестве положительного (моноклонального) контроля использовали клеточную линию Jurkat (линия клеток Т-лимфобластного острого лейкоза), имеющую биаллельную перестройку гамма-цепи Т-клеточного рецептора, которая выявляется с V $\gamma$ 1—8 и V $\gamma$ 11 праймерами. В качестве поликлонального контроля использовали мононуклеары периферической крови здоровых доноров и образцы кожи, полученные в ходе пластических операций у здоровых людей.

### Выделение ДНК

Мононуклеары из периферической крови выделяли в градиенте плотности фиколла (плотность 1,077 г/см<sup>3</sup>) стандартным методом. ДНК выделяли из мононуклеаров периферической крови с помощью набора Wizard genomic DNA purification system (Promega, США), из свежей или замороженной ткани (кожи и крови) стандартным методом — обработкой протеиназой К с последующей очисткой в феноле и хлороформе и осаждением в трех объемах 96% этилового спирта с раствором аммония ацетата в конечной концентрации 1М. Концентрацию выделенной ДНК проверяли на спектрофотометре Beckman DU-64.

### Анализ В-клеточной клональности по генам IgH и Т-клеточной клональности по генам TCR $\gamma$ и TCR $\beta$

Определение В-клеточной клональности лимфоцитов проводили на основе анализа перестроек варибельного региона генов тяжелой цепи иммуноглобулина, Т-клеточной клональности лимфоцитов — на основе перестроек генов  $\gamma$ - и  $\beta$ -цепи Т-клеточного рецептора. Определение клональности лимфоцитов проводили методом ПЦР и методом фрагментного анализа. Для определения В-клеточной клональности

ТАБЛИЦА 1

Клиническая характеристика обследованных больных

Нозологическая форма	Число больных	Пределы возраста, лет	Мужчины / женщины
Т-клеточные лимфомы кожи (n = 46)			
Грибовидный микоз	40	60,7	23/17
Синдром Сезари	2	78	2/0
Первичная кожная CD30+ анапластическая крупноклеточная лимфома	3	72,7	1/2
Первичная кожная агрессивная лимфома кожи	1	76	0/1
В-клеточные лимфомы кожи (n = 4)			
Первичная кожная диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома типа нижних конечностей	1	70	0/1
Первичная кожная лимфома из клеток фолликулярного центра	2	71,5	1/1
Первичная кожная лимфома маргинальной зоны	1	76	1/0
Парапсориаз (n = 19)			
Крупнобляшечный	14	42,2	8/6
Мелкобляшечный	5	46,3	4/1
Т-клеточные псевдолимфомы кожи (n = 2)			
Актинический ретикулоид	1	65	1/0
Т-клеточная лимфоидная гиперплазия	1	44	1/0
В-клеточные псевдолимфомы кожи (n = 6)			
Лимфоматоидная реакция на укусы насекомых	2	64,5	0/2
Постскабиозная гиперплазия	3	65,7	1/2
Лимфоцитомы	1	49	0/1
Хронические воспалительные дерматозы (n = 24)			
Атопический дерматит	5	33,8	3/2
Псориаз	8	55,2	7/1
Экзема	6	54,5	2/4
Красный плоский лишай	2	38	1/1
Склеродермия	2	42	0/2
Розовые угри	1	31	0/1

лимфоцитов использовали смесь праймеров к фракциям FR1, FR2, FR3 варибельного региона генов IgH и меченный флуоресцентной краской консенсусный праймер к J-региону IgH [18].

Для мультиплексной ПЦР-генов TCR $\gamma$  применяли два набора праймеров: 1) смесь праймеров T $\gamma$  [18], 2) смесь праймеров T $\gamma\gamma$  [19]. Для мультиплексной ПЦР генов TCR $\beta$  применяли смесь праймеров T $\beta$  [18]. Все праймеры для определения T-клеточной клональности лимфоцитов — смесь прямых праймеров к V генам TCR и меченных флуоресцентной краской обратных праймеров к J генам TCR. ПЦР проводили на автоматическом термоциклере DNAEngine (BioRad). Реакционная смесь в конечном объеме 20 мкл включала: 200 нг ДНК, 10 мкл 2 X смеси для ПЦР (PCR Master Mix Promega), 5 пмоль каждого праймера. Условия ПЦР: предварительная денатурация 95 °C (5 мин), 35 циклов ПЦР для IgH и TCR $\gamma$  и 40 циклов для TCR $\beta$  — 95 °C (35 с.), 60 °C (35 с.), 72 °C (35 с.), окончательная пролонгация 72 °C (10 мин.). Результаты реакции выявляли в 2% агарозном геле, окрашенном бромидом этидия. При успешной ПЦР проводили очистку ПЦР продуктов и фрагментный анализ.

### Очистка ПЦР-продуктов и фрагментный анализ амплификатов

Для очистки ПЦР-продуктов в каждую пробирку добавляли по 100 мкл смеси для осаждения ДНК (0,25 объема 10M раствора ацетата аммония, 2—2,5 объема 96% этилового спирта), инкубировали 20 мин. при комнатной температуре, центрифугировали 20 мин. при 13 000 g. Осадок ДНК дважды отмывался 70% спиртом, высушивался при комнатной температуре, разбавлялся дистиллированной водой 30 мкл. Концентрация очищенных продуктов проверялась в 2% агарозном геле, окрашенном бромидом этидия. В зависимости от интенсивности свечения ПЦР-продукты разбавились в 10—40 раз. Разведенные продукты смешивались с формамидом (2 мкл продукта, 10 мкл

формамида, 0,05 мкл внутреннего стандарта Genescan 500LIZ (Applied Biosystems). Денатурацию ДНК проводили в растворе с низкой ионной силой. 5 мкл ПЦР-продукта разводили в 15 мкл LIS-solution (10% раствор сахарозы + 0,01% бромфеноловый синий), полученную смесь инкубировали в течение 5 мин. при температуре 95 °C, а затем быстро охлаждали во льду до 0 °C в течение 10 мин. Затем 10 мкл денатурированного продукта наносили в плашку автоматического секвенатора. Для фрагментного анализа использовали автоматический анализатор нуклеиновых кислот ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) и программное обеспечение GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems).

### Критерии интерпретации результатов

Результат фрагментного анализа был виден как набор пиков в области амплификации T $\gamma$  — 90 — 240 п.н., T $\gamma\gamma$  — 100 — 260 п.н., T $\beta$  — 200—250 п.н. Отрицательный (поликлональный) результат определяли при наличии множества пиков ПЦР-продукта. Результат считался положительным (моноклональным) при наличии одного или двух четких доминантных пиков ПЦР-продукта (в случае биаллельной реарранжировки). При этом пики ПЦР-продукта должны были преобладать и превышать поликлональный фон более чем в 3 раза. Если имелось более трех четких пиков, то результат оценивался как олигоклональный. При наличии одного или двух четких пиков, которые превышали поликлональный фон в 2—3 раза, результат оценивался как сомнительный моноклональный.

Из 46 больных ТКЛК моноклональность по генам TCR $\gamma$  была обнаружена у 40 (87%). Из 20 этих же больных по генам TCR $\beta$  моноклональность лимфоцитов была обнаружена у 5 (25%). Более подробные данные о выявлении моноклональности лимфоцитов по генам  $\gamma$ - и  $\beta$ -цепей TCR с учетом клинических и иммунофенотипических особенностей лимфом кожи представлены в табл. 2.

**ТАБЛИЦА 2**
**Данные о выявлении моноклональности по  $\gamma$ - и  $\beta$ -цепям T-клеточного рецептора у больных с ТКЛК с учетом клинических и иммунофенотипических особенностей**

Диагноз	Обследовано (n = 46)	Моноклональность по генам TCR $\gamma$ (n = 40)	Моноклональность по генам TCR $\gamma$ , - $\beta$ (n = 5)	Поликлональность (n = 6)
Грибовидный микоз	40	34	5	6
Синдром Сезари	2	2	0	0
Первичная кожная CD30+ анапластическая крупноклеточная лимфома	3	3	0	0
Первичная кожная агрессивная лимфома кожи	1	1	0	0

Из 14 больных КБП моноκлональность по генам TCR $\gamma$  была обнаружена у 1 (7%), при мелкобляшечном параспориозе (МБП) — ни в одном из 5 случаев.

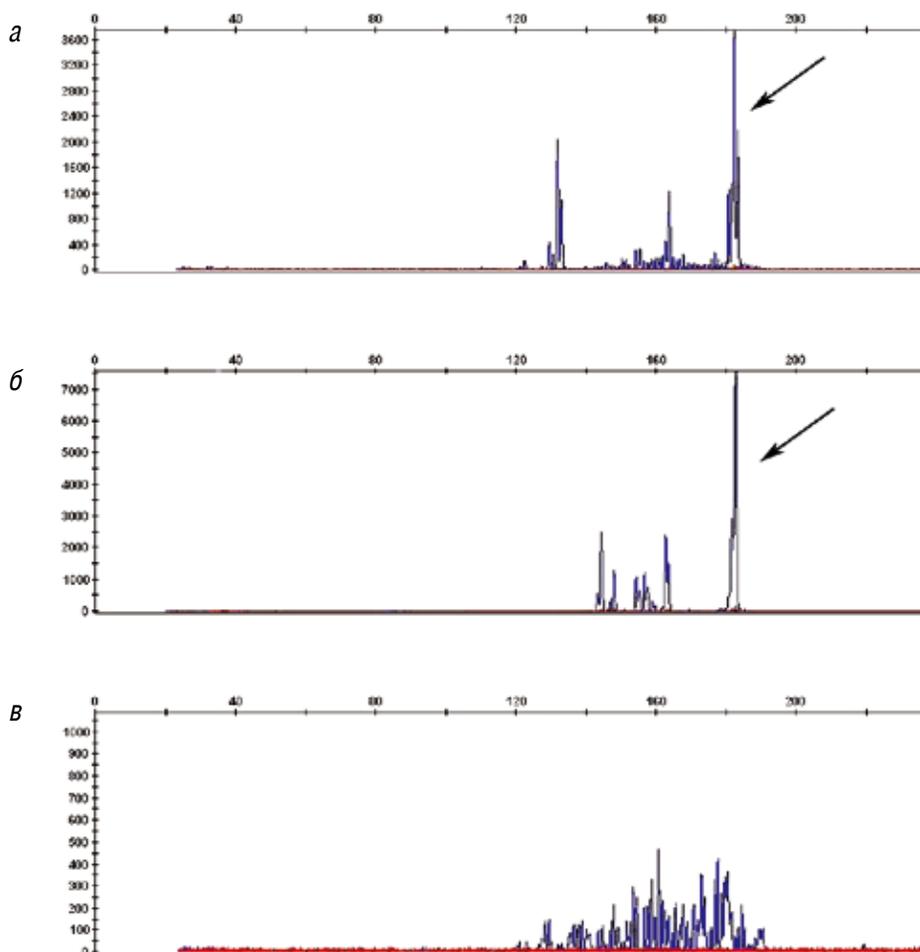
Из 4 больных ВКЛК моноκлональность лимфоцитов по генам тяжелой цепи IgH была выявлена у 3 (75%).

Из 2 пациентов с ТПЛК моноκлональность по генам TCR $\gamma$  была обнаружена только у 1, а также из 6 больных с ВПЛК моноκлональность по генам IgH не была обнаружена ни у одного пациента.

В 24 случаях ХВД в биоптате кожи была выявлена полиκлональность по генам TCR $\gamma$ .

При исследовании 10 биоптатов кожи и образцов периферической крови контрольной группы здоровых доноров была выявлена полиκлональность по генам TCR $\gamma$ .

Нами был проведен анализ частоты выявления κлональности лимфоцитов по генам TCR $\gamma$  крови и двух биоптатов кожи (взятых у одного больного одновременно с разных участков кожи на расстоянии не менее 20 см) у 3 больных с ТКЛК (у 2 — с грибовидным микозом IIА степени и у 1 — с грибовидным микозом в состоянии эритродермии). В 2 случаях при исследовании биоптатов кожи была обнаружена моноκлональность. В третьем случае отмечалась разница в выявлении κлональности (определялась моноκлональность в биоптате кожи, морфологически соответствующем бляшке, и полиκлональность в биоптате, морфологически соответствующем пятну). Кровь в каждом из трех случаев была моноκлональна (см. рис.).



**Рисунок.** Выявление моноκлональности по генам TCR $\gamma$  методом фрагментного анализа у пациента с грибовидным микозом IIА степени. В крови и биоптате кожи, морфологически соответствующей бляшке, выявляются одинаковые моноκлональные пики (указаны стрелками). В биоптате кожи, морфологически соответствующей пятну, — полиκлональная картина: а — образец периферической крови; б — биоптат кожи (бляшка); в — биоптат кожи (пятно)

Полученные данные свидетельствуют о корреляции между гистологически подтвержденными диагнозами ТКЛК и ВКЛК и выявлением моноклональности лимфоцитов по генам  $\gamma$ - и  $\beta$ -цепей TCR, а также по генам тяжелых цепей Ig соответственно, что дает основание использовать данные молекулярно-генетические методы с помощью ПЦР в ранней диагностике ЗЛК.

Кроме того, были подтверждены данные зарубежных исследователей о том, что моноклональность при ТКЛК развивается по мере нарастания инфильтративных изменений в очаге поражения. Обнаружение клона лимфоцитов в образце крови, идентичном биоптату кожи, свидетельствует о рециркуляции его из очага пораженной кожи в периферическую кровь. ■

## Литература

1. Assaf C., Hummel M., Dippel E. et al. High detection rate of T-cell receptor beta chain rearrangements in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with the GeneScan technique and DNAsequencing. *Blood* 2000; 96(2): 640—646.
2. Simon M., Kind P., Kaudewitz P. et al. Automated High-Resolution Polymerase Chain Reaction Fragment Analysis. *Am J Pathol* 1998; 152: 29—33.
3. Holm N., Flaig M. J., Yazdi A.S. et al. The value of molecular analysis by PCR in the diagnosis of cutaneous lymphocytic infiltrates. *J Cutan Pathol* 2002; 29: 447—452.
4. Furmanczyk P.S., Wolgamot G.M., Kussick S.J. et al. Diagnosis of mycosis fungoides with different algorithmic approaches. *J Cutan Pathol* 2010; 37: 8—14.
5. Никитин Е.А., Сидорова Ю.В., Рыжикова Н.В. и др. Определение Т-клеточной клональности по гамма-цепи Т-клеточного рецептора: окончательные данные. *Терапевтический архив* 2006; 7: 52—57.
6. Muche J.M., Lukowsky A., Ahnhudt C. et al. Peripheral blood T cell clonality in mycosis fungoides -an independent prognostic marker? *J Invest Dermatol* 2001; 116 (3): 484—485.
7. Selkovic K.L., Cikota B., Stojadinovic O., et al. TCR $\gamma$  gene rearrangement analysis in skin and blood of mycosis fungoides patients. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica* 2007; 16 (4): 149—155.
8. Cotta A.C., Cintra M.L., Macedo de Souza E., Magna L.A., Vassallo J. Reassessment of diagnostic criteria in cutaneous lymphocytic infiltrates. *Sao Paulo Medical Journal* 2004; 122 (4): 161—165.
9. Delfau-Larue M.H., Laroche L., Wechsler J. et al. Diagnostic value of dominant T-cell clones in peripheral blood in 363 patients presenting consecutively with a clinical suspicion of cutaneous lymphoma. *Blood* 2000; 96 (9): 2987—2992.
10. Dippel E., Assaf C., Hummel M., et al. Clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan analysis in advanced cutaneous T-cell lymphoma: a critical evaluation. *J Pathol* 1999; 188: 146.
11. Klemke C.D., Dippel E., Dembinski A. et al. Clonal T cell receptor gamma-chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan analysis in the skin and blood of patients with parapsoriasis and early-stage mycosis fungoides. *J Pathol* 2002; 197 (3): 348—354.
12. Callan M.F., Steven N., Krausa P. et al. Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *Natural Medicine* 1996; 2(8): 906—911.
13. Lee S.C., Berg K.D., Racke F.K. et al. Pseudo-Spikes Are Common in Histologically Benign Lymphoid Tissues. *J Mol Diagn* 2000; 2 (3): 145—152.
14. Botella-Estrada R., Sanmartin O., Oliver V. et al. Erythroderma. A clinicopathological study of 56 cases. *Archives of Dermatology* 1994; 130: 1503.
15. Cherny S., Mraz S., Su L., Harvell J., Kohler S. Heteroduplex analysis of T-cell receptor g gene rearrangement as an adjuvant diagnostic tool in skin biopsies for erythroderma. *J Cutan Pathol* 2001; 28: 351—355.
16. Beylot-Barry M., Sibaud V., Thiebaut R., et al. Evidence that an identical T cell clone in skin and peripheral blood lymphocytes is an independent prognostic factor in primary cutaneous T cell lymphomas. *J Invest Dermatol* 2001; 117 (4): 920—926.
17. Willemze R., Jaffe E.S., Burg G., Cerroni L., et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005; 105: 3768—3785.
18. Dongen J.J., Langerak A.W., Bruggemann M. 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: 2257—2317.
19. Greiner T.C., Raffeld M., Lutz C. et al. 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: 46—55.