

Иммунофенотипическая характеристика лимфоцитов у пациентов с грибковидным микозом на ранних стадиях заболевания

Хамаде Луай Мустафа

Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца

Резюме

Кожные Т-клеточные лимфомы в основном представлены грибковидным микозом (ГМ) и его лейкемическим вариантом – синдромом Сезари. В последние годы было признано, что наличие изменений в периферической крови у больных с ГМ является отдельным прогностическим фактором, что влияет на выбор тактики лечения и установления стадии заболевания. Однако данных о специфике таких изменений периферической крови на ранних стадиях ГМ практически нет. Нами был проведен ретроспективный анализ результатов исследования образцов крови с помощью метода проточной цитометрии пациентов с ГМ. Были изучены 36 результатов проточной цитометрии образцов крови 12 пациентов с ГМ при сравнении с результатами, полученными от 30 здоровых добровольцев. В ходе исследования была использована панель моноклональных антител для определения уровня различных субпопуляций Т-лимфоцитов. Было обнаружено статистически значимое увеличение соотношения уровня CD3+CD4+ и CD3+CD8+ Т-клеток, которое изменялось в зависимости от стадии заболевания и было существенно большим, чем у здоровых добровольцев. Существует большое количество данных об измененной экспрессии различных кластеров дифференциации в опухолевых клетках при ГМ. Также данное заболевание на поздних стадиях сопровождается более выраженными изменениями в периферической крови. В процессе исследования были выявлены изменения в периферической крови пациентов с ГМ на стадии IA и IB, которые могут помочь в установлении стадии заболевания и выборе оптимальной тактики лечения.

Ключевые слова: грибковидный микоз, ранняя стадия, проточная цитометрия, периферическая кровь, соотношение CD3+CD4+:CD3+CD8+.

Введение

Грибовидный микоз (ГМ) – вялотекущее заболевание с неопластической пролиферацией Т-клеток, которое обычно поражает кожу и почти всегда вовлекает в процесс Т-хелперные клетки. У пациентов с ГМ также наблюдаются выраженные изменения в периферической крови [19]. 65 % всех кожных лимфом представлены ГМ и тесно связанным с ним синдромом Сезари. ГМ подразделяется на стадии по классификации TNM, как и все другие Т-клеточные лимфомы [16]. Однако в последние годы было признано, что появление клеток лимфомы

в периферической крови, особенно в высоких концентрациях, является независимым и неблагоприятным прогностическим фактором у больных с ГМ [9, 14, 17].

Важным моментом является оптимальный метод, который используется для идентификации и подсчета количества клеток лимфомы в периферической крови. Оценка изменений периферической крови при ГМ с помощью только морфологических критериев не является ни чувствительной, ни специфичной, поскольку интерпретация анализа зависит от исследователя, а в ряде случаев

количество циркулирующих опухолевых клеток настолько мало, что их трудно обнаружить [7, 15]. Кроме того, у здоровых людей и людей с доброкачественными кожными заболеваниями иногда может наблюдаться некоторое количество атипичных циркулирующих в крови лимфоцитов [8, 15]. В последние десятилетия проточная цитометрия зарекомендовала себя как более надежный метод, чем морфологические исследования, при определении клеток лимфомы в периферической крови у пациентов с ГМ, так как эти клетки часто имеют аберрантный иммунофенотип [1–4, 10, 20].

Целью исследования был поиск специфических изменений в клеточном составе мононуклеаров периферической крови у пациентов с ГМ на ранних стадиях заболевания.

Для оценки клинического применения проточной цитометрии при изучении изменений в периферической крови у таких пациентов мы провели ретроспективный анализ результатов проточной цитометрии 36 образцов крови, взятых у 12 больных с ГМ, и сравнили их с результатами проточной цитометрии периферической крови 30 добровольцев из контрольной группы.

Материалы и методы исследования

Группа исследования

Проточная цитометрия проводилась на 36 образцах крови, отобранных у 12 пациентов с ГМ с 2013 по 2015 г. Все пациенты имели ГМ в стадии IA или IB, и в течение описанного промежутка времени стадия менялась в этих рамках. Анализ крови контрольной группы проводился 1 раз у каждого добровольца (всего 60 образцов). Методом проточной цитофлуориметрии было изучено наличие в крови следующих субпопуляций Т-лимфоцитов: общие Т-лимфоциты (CD45+CD5+CD19-), общие Т-лимфоциты (CD45+CD3+), Т-хелперы (CD3+CD4+CD8-), наивные Т-хелперы (CD4+CD45RA+CD45RO-), Т-клетки памяти (CD4+CD45RA-CD45RO+), активированные Т-хелперы (на стадии дифференцирования) (CD4+CD45RA+CD45RO+), активированные Т-хелперы (поздняя активация) (CD45+CD4+HLA-DR+), активированные Т-хелперы (ранняя активация) (CD4+CD25+), регуляторные Т-клетки (CD45+CD4+CD25brightCD127neg), Т-цитотоксические лимфоциты (CD45+CD3+CD4-CD8+), Т-цитотоксические активированные лимфоциты (CD45+CD3+CD8+CD38+), Т-цитотоксические активированные лимфоциты (CD45+CD3+CD8+HLA-DR+), соотношение CD4/CD8, DNT-L (CD45+CD3+CD4-CD8-), DPT-L (CD45+CD3+CD4+CD8+), Т-НК-клетки (цитолитические) (CD45+CD3+CD16+CD56+), активированные Т-клетки (CD45+CD3+HLA-DR+), $\alpha\beta$ -Т-клетки (CD3+TcR $\alpha\beta$ +TcR $\gamma\delta$ -), $\gamma\delta$ -Т-клетки (CD3brightTcR $\alpha\beta$ -TcR $\gamma\delta$ +).

Все пациенты проходили лечение в клинике кафедры дерматологии и венерологии НМУ им. А.А. Богомольца. Диагноз ГМ подтверждался на основании клинических симптомов, гистологического исследования и анализа периферической крови. Все пациенты минимум два раза сдавали анализ крови для проточной цитометрии. Образцы крови анализировались за период начиная с 2013 и заканчивая 2017 г. Клиническая информация была получена в ходе анализа историй болезни пациентов.

Трехцветная проточная цитометрия

В этом исследовании были изучены образцы крови, которые анализировались с помощью трехцветной проточной цитометрии по следующей схеме [13]. Свежая венозная кровь пациентов с ГМ или добровольцев из группы контроля собиралась в пробирки, которые содержали 1,5 мл этилендиаминтетрауксусной кислоты на каждый мл крови. 100 мкл хорошо перемешанной цельной крови помещались в тестовые пробирки, которые находились в водно-ледяной бане. Эритроциты лизировались согласно схеме, описанной в руководстве по эксплуатации, с использованием раствора хлорида аммония (Ortho-mune lysing solution; Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ) в течение 10 мин при комнатной температуре. Лимфоциты периферической крови отмывались и ресуспендировались в холодном фосфатно-буферном растворе, который содержал 2 % эмбриональную бычью сыворотку (FBS; GIBCO, Paisley, Scotland, U.K.) и 0,02 % азид натрия (NaN_3) при концентрации 2×10^6 /мл.

Все последующие процедуры проводились в условиях водно-ледяной бани. 100 мкл суспензии смешивались с 10 мкл раствора каждого моноклонального антитела и инкубировались в темноте при температуре 4 °С 30 мин. Через 30 мин клетки отмывались дважды с помощью холодного физиологического раствора и ресуспендировались с 300 мкл физиологического раствора, содержащего эмбриональную бычью сыворотку и NaN_3 , с последующей немедленной проточной цитометрией.

Количественный анализ трехцветной цитометрии проводился с использованием FAC-Scan Instrument (Becton Dickinson). Все данные анализировались с использованием программного обеспечения CellQuest (Becton Dickinson). Живые лимфоциты фиксировались вместе с сигналами переднего и бокового рассеяния света.

Статистический анализ

Статистический анализ был проведен с использованием программного обеспечения SigmaStat версии 1.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA). Пропорции сравнивались с помощью U-критерия Манна–Уитни и коэффициента корреляции Спирмена. Для всех статистических тестов статистическая значимость подтверждалась при значении $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Был проведен проточный цитометрический анализ образцов крови с помощью панели антител для определения соотношения CD3+CD4+:CD3+CD8+ и уровня субпопуляций CD3+CD4+-Т-клеток в соответствии с экспрессией ими различных поверхностных маркеров.

Характеристика пациентов

В основную группу вошли 12 пациентов с ГМ. Всем пациентам несколько раз (минимум 2 анализа) проводился анализ крови с использованием проточной цитометрии. Медиана лимфоцитов была (77,5 ± 8,5) % или (1048 ± 526) кл/мкл. Методом проточной цитометрии было определено, что среднее число CD3+CD4+-лимфоцитов составило (67,1 ± 14,3) % или (730 ± 464) кл/мкл. Величина соотношения CD3+CD4+:CD3+CD8+ составляла в среднем 6,2 (табл. 1). Кроме того, была обследована контрольная группа из 30 здоровых доноров.

Маркеры активации/дифференциации

Проведено сравнение результатов 36 исследований крови пациентов с ГМ и 30 здоровых доноров на наличие маркеров активации/дифференциации.

Процент CD3+CD4+-лимфоцитов был несколько увеличен у пациентов, которые находились на ранней стадии ГМ (IA), и был существенно увеличен у пациентов на более поздней стадии заболевания (IB) (случаи, когда образцы крови брались у пациентов во время наличия у них диффузной эритродермии, поражающей менее 10% поверхности кожи, и 2 случая – когда кожные изменения затронули более 10% поверхности кожи). В сравнении с контрольной группой абсолютное количество CD3+CD4+-лимфоцитов на стадии заболевания IB было существенно большим ($p < 0,05$). Также процентное и абсолютное количество CD3+CD8+-Т-клеток было меньшим на стадии IA и еще меньшим – на стадии IB по сравнению с группой контроля (см. табл. 1).

Соотношение CD4:CD8

Соотношение CD3+CD4+:CD3+CD8+ в среднем равнялось 10,5 среди пациентов с ГМ и 1,2 – в контрольной группе (диапазон, 0,07–12,9). Эти различия были статистически значимыми ($p < 0,041$).

Интересно, что образцы крови, где соотношение CD3+CD4+:CD3+CD8 было больше (> 10), в основном были отобраны у пациентов, которые на момент забора крови имели IB стадию (83 % от общего количества образцов крови с CD3+CD4+:CD3+CD8+ > 10). В это же время образцы крови, где соотношение CD3+CD4+:CD3+CD8+ было меньше (< 10), были получены у пациентов с более ранней стадией ГМ IA (76 % от общего количества образцов крови с CD3+CD4+:CD3+CD8+ < 10). При этом в группе контроля соотношение было существенно ниже.

Оценка других субпопуляций Т-лимфоцитов

Был также оценен уровень субпопуляций других Т-лимфоцитов в образцах крови пациентов с ГМ при сравнении с такими же показателями у здоровых

доноров. В процессе проводимого исследования не было обнаружено никаких существенных различий в относительном количестве CD4+CD25+-Т-клеток и CD4+CD25bright CD127neg-Т-клеток в общей популяции CD4+-Т-клеток в образцах крови пациентов с ГМ и у здоровых доноров: (9,27 ± 0,5) % против (9,7 ± 0,4) % CD4+CD25+-Т-клеток и (1,4 ± 0,3) % против (1,9 ± 0,9) % CD4+CD25bright CD127neg-Т-клеток у здоровых доноров и пациентов с ГМ соответственно (табл. 2).

Также не было обнаружено существенных различий в уровне Т-хелперов активированных/памяти (CD4+CD45R0+) и Т-хелперов наивных (CD4+CD45RA+): (12,3 ± 4,3) % против (11,6 ± 3,2) % или (256 ± 103) кл/мкл против (300 ± 125) кл/мкл CD4+CD45R0+-Т-клеток; (31 ± 7,5) % против (28 ± 8,3) % или (308 ± 56) кл/мкл против (298 ± 49) кл/мкл CD4+CD45RA+-Т-клеток; у здоровых доноров и у пациентов с ГМ соответственно (табл. 3).

Уровни $\alpha\beta$ -Т-клеток и $\gamma\delta$ -Т-клеток среди пациентов и здоровых доноров также существенно не различались: (71 ± 9,3) % против (73 ± 8,7) % или (950 ± 217) кл/мкл против (1032 ± 183) кл/мкл для $\alpha\beta$ -Т-клеток; (4,4 ± 1,7) % против (3,8 ± 1,9) % или (56 ± 12) кл/мкл против (65 ± 23) кл/мкл для $\gamma\delta$ -Т-клеток у здоровых доноров и пациентов с ГМ соответственно (табл. 4).

Прогрессирование ГМ характеризуется переключением иммунной системы на более супрессивный и менее цитотоксический характер [14].

В данном исследовании мы ретроспективно проанализировали возможность использования

Таблица 1
Показатели экспрессии маркеров активации/дифференциации Т-клеток у пациентов с ГМ и здоровых добровольцев

CD3+			
CD4+		CD8+	
%	Абсолютное кол-во (кл/мкл)	%	Абсолютное кол-во (кл/мкл)
Здоровые добровольцы			
59,6 ± 8,8	725 ± 142	32,8 ± 8	401 ± 116
Пациенты с ГМ			
67,1 ± 14,3	730 ± 464	25,6 ± 10,8	245 ± 149

Примечание: $p < 0,05$.

Таблица 2
Уровни CD4+CD25+-Т-клеток и CD4+CD25brightCD127neg-Т-клеток у исследуемых

	CD4+CD25+ (%)	CD4+CD25bright CD127neg (%)
Здоровые доноры	9,27 ± 0,5	1,4 ± 0,3
Пациенты с ГМ	9,7 ± 0,4	1,9 ± 0,9

Примечание: $p < 0,05$.

Таблица 3			
Оценка уровня CD4+CD45R0+-Т-клеток и CD4+CD45RA+-Т-клеток у исследуемых			
CD4+CD45R0+		CD4+CD45RA+	
%	Абсолютное кол-во (кл/мкл)	%	Абсолютное кол-во (кл/мкл)
Здоровые добровольцы			
12,3 ± 4,3	256 ± 103	31 ± 7,5	308 ± 56
Пациенты с ГМ			
11,6 ± 3,2	300 ± 125	28 ± 8,3	298 ± 49
Примечание: $p < 0,05$.			

Таблица 4			
Оценка уровня αβ-Т-клеток и γδ-Т-клеток у исследуемых			
αβ		γδ	
%	Абсолютное кол-во (кл/мкл)	%	Абсолютное кол-во (кл/мкл)
Здоровые добровольцы			
71 ± 9,3	950 ± 217	4,4 ± 1,7	56 ± 12
Пациенты с ГМ			
73 ± 8,7	1032 ± 183	3,8 ± 1,9	65 ± 23
Примечание: $p < 0,05$.			

проточной цитометрии при изучении изменений периферической крови у пациентов с ранними стадиями ГМ.

Известно, что опухолевые клетки ГМ в основном обладают CD4+-фенотипом [5] и только в небольшом количестве случаев имеют CD8+-фенотип [21]. Закономерно предположить, что при росте и прогрессировании неоплазии клетки опухоли с aberrантным фенотипом будут попадать в кровь. Ранее было предложено использовать соотношение CD4:CD8 для определения стадии заболевания. Считается, что соотношение CD4:CD8 > 10 определяет наличие у пациентов синдрома Сезари [23]. В нашем исследовании не изучалась кровь пациентов с синдромом Сезари, однако было отмечено, что в образцах крови пациентов со стадией IA ГМ соотношение CD4:CD8 было в среднем 3,9, тогда как в образцах крови пациентов со стадией IB ГМ оно достигло среднего уровня 6,6. Это указывает на наличие стойких изменений в периферической крови пациентов с ГМ на ранних стадиях заболевания, до того как уровень опухолевых клеток в крови повысится значительно. Проточная цитометрия позволяет с точностью установить уровень этого соотношения и помочь в установлении стадии заболевания.

Существуют данные, что Т-клеточные лимфомы могут изменять уровень и функцию Т-регуляторных клеток (CD4+CD25+ и CD4+CD25brightCD127neg) в периферической крови пациентов с ГМ [6]. Однако в исследовании не было обнаружено никакой статистически значимой разницы в уровнях Т-регуляторных клеток у пациентов с ГМ и здоровых доноров. Существуют также исследования, которые, тем не менее, обнаружили нарушение функции этих клеток [12]. Как стало известно ранее, супрессивные функции Т-регуляторных клеток обратно пропорционально снижались в зависимости от количества опухолевых клеток в периферической крови пациентов с ГМ. Возможно, на более поздних стадиях заболевания уровень Т-регуляторных клеток будет снижаться так же, как и снижаются их функции, что требует дальнейшего изучения.

Другие данные говорят, что большая часть CD4+-лимфоцитов, которые находятся в коже пациентов с ГМ, имеет фенотип CD45RA-/CD45R0+ [24]. Существует концепция, что CD4+-Т-клетки экспрессируют различный фенотип до (Т-клетки наивные) и после (Т-клетки памяти) первой активации [24]. Сначала они экспрессируют CD45RA-антиген, а после активации перманентно увеличивают экспрессию антигенов CD45R0, LFA-3, CD2, LFA-1. Эта концепция объясняет злокачественную дегенерацию Т-клеток при ГМ и других Т-клеточных лимфомах. Более поздние исследования обнаружили, что такие злокачественные клетки могут экспрессировать измененные уровни CD45RA, CD45R0, CD150. В дальнейшем, при прогрессировании заболевания, такие клетки могут попадать в периферическую кровь пациентов. В нашем исследовании мы не нашли никаких различий в уровне CD45RA и CD45R0 Т-клеток в периферической крови между пациентами с ГМ в стадиях IA и IB, а также между ними и группой контроля.

Выводы

Исходя из результатов нашего исследования, мы можем с уверенностью говорить о наличии изменений в периферической крови пациентов с ГМ. Более того, эти изменения становятся более значимыми с прогрессированием заболевания. Основными проявлениями заболевания на стадии IA и IB является нарушение соотношения CD3+CD4+- и CD3+CD8+-клеток, которое является различным даже между этими стадиями. Проточная цитометрия помогает с большой точностью определять наличие таких изменений, что может помочь в выборе тактики лечения и определения стадии заболевания у пациентов с ГМ.

Список літератури

1. Abnormalities of circulating T-cell subpopulations in patients with cutaneous T-cell lymphoma: cutaneous lymphocyte-associated antigen expression on T cells correlates with extent of disease [Text] / M.J. Borowitz, A. Weidner, E.A. Olsen et al. // *Leukemia*. – 1993. – Vol. 7. – P. 859–863.
2. Absence of CD26 expression is a useful marker for diagnosis of T-cell lymphoma in peripheral blood [Text] / D. Jones, N.H. Dang, M. Duvic et al. // *Amer J of Clin Pathol*. – 2001. – Vol. 115. – P. 885–892.
3. Bernengo M.G. The relevance of the CD4+ CD26-subset in the identification of circulating Sezary cells [Text] / M.G. Bernengo, M. Novelli, P. Quaglino et al. // *Br J Dermatology*. – 2001. – Vol. 144. – P. 125–135.
4. CD4(+)CD7(–) T cells compose the dominant T-cell clone in the peripheral blood of patients with Sezary syndrome [Text] / G. Rapp, J.M. Mucche, H. Abken et al. // *J Amer Acad Dermatol*. – 2001. – Vol. 44. – P. 456–461.
5. Cutaneous T-cell lymphoma: neoplasm of T cells with helper activity [Text] / C.L. Berger, D. Warburton, J. Raafat et al. // *Blood*. – 1979. – Vol. 53. – P. 642–651.
6. Cutaneous T-cell lymphoma: malignant proliferation of T-regulatory cells [Text] / C.L. Berger, R. Tigelaar, J. Cohen, K. Mariwalla, J. Trinh, N. Wang, et al. // *Blood*. – 2005. – Vol. 105. – P. 1640–1647.
7. Cytogenetic, cytophotometric, and ultrastructural study of large cerebriform cells of the Sezary syndrome and description of a small-cell variant [Text] / M.A. Lutzner, I. Emerit, R. Durepaire et al. // *J of the National Cancer Institute*. – 1973. – Vol. 50. – P. 1145–1162.
8. Duncan S.C. Circulating Sezary cells in hospitalized dermatology patients [Text] / S.C. Duncan, R.K. Winkelmann // *Br J Dermatol*. – 1978. – Vol. 99. – P. 171–178.
9. Evaluation of circulating malignant cells provides prognostic information in cutaneous T cell lymphoma [Text] / G.P. Schechter, E.A. Sausville, A.B. Fischmann et al. // *Blood*. – 1987. – Vol. 69. – P. 841–849.
10. Flow cytometric DNA ploidy analysis of peripheral blood from patients with sezary syndrome: detection of aneuploid neoplastic T cells in the blood is associated with large cell transformation in tissue [Text] / S. Wang, N. Li, P. Heald et al. // *Amer J Clin Pathol*. – 2004. – Vol. 122. – P. 774–782.
11. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma [Text] / E.J. Kim, S. Hess, S.K. Richardson, S. Newton, L.C. Showe, B.M. Benoit et al. // *J Clin Invest*. – 2005. – Vol. 115. – P. 798–812.
12. Lack of suppressive CD4+ CD25+ FOXP3+ T cells in advanced stages of primary cutaneous T-cell lymphoma [Text] / M.T. Machteld, J.M. Tracey, H. Lisa, J.W. Sean, S.T. Leonie, J. Susan // *J Invest Dermatol*. – 2006. – Vol. 126 (10). – P. 2217–2223.
13. LAG-3 expression and IFN- γ production are variably coregulated in different human T lymphocyte subpopulations [Text] / E. Scala, M. Carbonari, P. Del Porto, M. Cibati, T. Tedesco, A.N. Mazzone, R. Paganelli, M. Fiorilli // *J Immunol*. – 1998. – Vol. 161. – P. 489–493.
14. Long-term outcome of 525 patients with mycosis fungoides and Sezary syndrome: clinical prognostic factors and risk for disease progression [Text] / Y.H. Kim, H.L. Liu, S. Mraz-Gernhard et al. // *Arch Dermatol*. – 2003. – Vol. 139. – P. 857–866.
15. Lutzner M.A. Ultrastructure of abnormal cells: in Sezary syndrome, mycosis fungoides, and parapsoriasis en plaque [Text] / M.A. Lutzner, J.W. Hobbs, P. Horvath // *Arch Dermatol*. – 1971. – Vol. 103. – P. 375–386.
16. Mycosis fungoides cooperative study [Text] / S.I. Lamberg, E.L. Diamond, A.L. Lorincz et al. // *Arch Dermatol*. – 1975. – Vol. 111. – P. 3.
17. Prognostic significance of tumor burden in the blood of patients with erythrodermic primary cutaneous T-cell lymphoma [Text] / J.J. Scarisbrick, S. Whittaker, A.V. Evans et al. // *Blood*. – 2001. – Vol. 97. – P. 624–630.
18. 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) [Text] / E. Olsen, E. Vonderheid, N. Pimpinelli et al. // *Blood*. – 2007. – Vol. 110. – P. 1713–1722.

References

1. Borowitz MJ. Abnormalities of circulating T-cell subpopulations in patients with cutaneous T-cell lymphoma: cutaneous lymphocyte-associated antigen expression on T-cells correlates with extent of disease. *Leukemia*. 1993;7:859-863.
2. Jones D, Dang N, Duvic M, Washington L, Huh Y. Absence of CD26 Expression Is a Useful Marker for Diagnosis of T-Cell Lymphoma in Peripheral Blood. *Amer J Clin Pathol*. 2001;115(6):885-892.
3. Bernengo MG. The relevance of the CD4+ CD26- subset in the identification of circulating Sezary cells. *Br J Dermatol*. 2001;144:125-135.
4. Rapp G, Mucche J, Abken H, Sterry W, Tilgen W, Ugurel S, Reinhold U. CD4+CD7– T cells compose the dominant T-cell clone in the peripheral blood of patients with Sezary syndrome. *J Amer Acad Dermatol*. 2001;44(3):456-461.
5. Berger C. Cutaneous T-cell lymphoma: neoplasm of T cells with helper activity. *Blood*. 1979;53:642–651.
6. Berger C. Cutaneous T-cell lymphoma: malignant proliferation of T-regulatory cells. *Blood*. 2005;105(4):1640-1647.
7. Lutzner M, Emerit I, Durepaire R, Flandrin G, Grupper C, Prunieras M. Cytogenetic, Cytophotometric, and Ultrastructural Study of Large Cerebriform Cells of the Sézary Syndrome and Description of a Small-Cell Variant 2 3. *J of the National Cancer Institute*. 1973;50(5):1145-1162.
8. Duncan S, Winkelmann R. Circulating Sezary cells in hospitalized dermatology patients. *Br J Dermatol*. 1978;99(2):171-178.
9. Schechter GP, Sausville EA, Fischmann AB. Evaluation of circulating malignant cells provides prognostic information in cutaneous T cell lymphoma. *Blood*. 1987;69:841–849.
10. Wang S, Li N, Heald P, Fisk J, Fadare O, Howe J, McNiff J, Smith B. Flow Cytometric DNA Ploidy Analysis of Peripheral Blood From Patients With Sézary Syndrome: Detection of Aneuploid Neoplastic T Cells in the Blood Is Associated With Large Cell Transformation in Tissue. *Amer J Clin Pathol*. 2004;122(5):774-782.
11. Kim E. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest*. 2005;115(4):798-812.
12. Machteld MT, Tracey JM, Lisa H, Sean JW, Leonie ST, Susan J. Lack of Suppressive CD4+CD25+FOXP3+ T Cells in Advanced Stages of Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J Invest Dermatol*. 2006;126(10):2217-2223.
13. Scala E. Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3) Expression and IFN- γ Production Are Variably Coregulated in Different Human T Lymphocyte Subpopulations. *J Immunol*. 1998;161(1):489-493.
14. Kim Y, Liu H, Mraz-Gernhard S, Varghese A, Hoppe R. Long-term Outcome of 525 Patients With Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome. *Arch Dermatol*. 2003;139(7):857-866.
15. Lutzner M. Ultrastructure of abnormal cells in Sezary syndrome, mycosis fungoides, and parapsoriasis en plaque. *Arch Dermatol*. 1971;103(4):375-386.
16. Lamberg SI, Diamond EL, Lorincz AL, et al. Mycosis Fungoides Cooperative Study. *Arch Dermatol*. 1975;111(4):457.
17. Scarisbrick J, Whittaker S, Evans AV, et al. Prognostic significance of tumor burden in the blood of patients with erythrodermic primary cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2001;97(3):624-630.
18. 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;110:1713-1722.
19. Taswell H. Sézary Syndrome – A Malignant Reticulemic Erythroderma. *JAMA*. 1961;177(7):465.
20. Klemke C, Brade J, Weckesser S, Sachse M, Booken N, Neumaier M, Goerdt S, Nebe T. The diagnosis of Sézary syndrome on peripheral blood by flow cytometry requires the use of multiple markers. *Br J Dermatol*. 2008;159(4):871-880.
21. Massone C, Crisman G, Kerl H, Cerroni L. The prognosis of early mycosis fungoides is not influenced by phenotype and T-cell clonality. *Br J Dermatol*. 2008;159(4):881-886.
22. Van der Loo EM, Cnossen J, Meijer CJ. Morphological aspects of T cell subpopulations in human blood: characterization

19. Taswell H.F. Sezary syndrome—a malignant reticulemic erythroderma [Text] / H. F. Taswell, R. K. Winkelmann // JAMA. – 1961. – Vol. 177. – P. 465–472.

20. The diagnosis of Sezary syndrome on peripheral blood by flow cytometry requires the use of multiple markers [Text] / C. D. Klemke, J. Brade, S. Weckesser et al. // Br J Dermatol. – 2008. – Vol. 159. – P. 871–880.

21. The prognosis of early mycosis fungoides is not influenced by phenotype and T-cell clonality [Text] / C. Massone, G. Crisman, H. Kerl et al. // Br J Dermatol. – 2008. – Vol. 159. – P. 881–886.

22. Van der Loo E.M. Morphological aspects of T cell subpopulations in human blood: characterization of the cerebriform mononuclear cells in healthy individuals [Text] / E. M. Van der Loo, J. Cnossen, C. J. Meijer // Clin and Experiment Immunol. – 1981. – Vol. 43. – P. 506–516.

23. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas [Text] / R. Willemze, E. S. Jaffe, G. Burg et al. // Blood. – 2005. – Vol. 105. – P. 3768–3785.

24. Wolfram, S. CD4+ cutaneous T-cell lymphoma show the phenotype of helper/inducer T cells (CD45RA-, CDw29+) [Text] / S. Wolfram, M. Volker // J Invest Dermatol. – 1989. – Vol. 93(3). – P. 413–416.

of the cerebriform mononuclear cells in healthy individuals. Clin and Experiment Immunol. 1981;43(3):506–516.

23. Willemze R. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. Blood. 2005;105(10):3768–3785.

24. Wolfram S, Volker M. CD4+ Cutaneous T-Cell Lymphomas Show the Phenotype of Helper/Inducer T Cells (CD45RA-, CDw29+). J Invest Dermatol. 1989;93(3):413–416.

ІМУНОФЕНОТИПІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІМФОЦИТІВ У ПАЦІЄНТІВ, ХВОРИХ НА ГРИБОПОДІБНИЙ МІКОЗ, НА РАННІХ СТАДІЯХ ЗАХВОРЮВАННЯ

Хамаде Луай Мустафа

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця

Резюме

Шкірні Т-клітинні лімфоми переважно представлені грибоподібним мікозом (ГМ) і його лейкемічним варіантом – синдромом Сезарі. В останні роки було визнано, що наявність змін у периферійній крові у хворих з ГМ є окремим прогностичним фактором, що впливає на вибір тактики лікування і встановлення стадії захворювання. Однак даних про специфіку таких змін периферійної крові при ранніх стадіях ГМ практично немає. Нами був проведений ретроспективний аналіз результатів дослідження зразків крові за допомогою методу проточної цитометрії пацієнтів з ГМ. Вивчали 36 результатів проточної цитометрії зразків крові 12 пацієнтів з ГМ у порівнянні з результатами, що були отримані від 30 здорових добровольців. В ході дослідження була використана панель моноклональних антитіл для визначення рівня різних субпопуляцій Т-лімфоцитів. Було виявлено статистично значуще збільшення співвідношення рівня CD3+CD4+ і CD3+CD8+ Т-клітин, яке змінювалося в залежності від стадії захворювання і було суттєво більшим, ніж у здорових добровольців. Існує велика кількість даних про наявність зміненої експресії кластерів диференціації в клітинах пухлини при ГМ. Також дане захворювання на пізніх стадіях супроводжується більш вираженими змінами в периферійній крові. В дослідженні були виявлені зміни в периферійній крові пацієнтів з ГМ на стадії IA і IB, які можуть допомогти у встановленні стадії захворювання і виборі оптимальної тактики лікування.

Ключові слова: грибоподібний мікоз, рання стадія, проточна цитометрія, периферійна кров, співвідношення CD3+CD4+ / CD3+CD8+.

IMMUNOPHENOTYPING CHARACTERISTIC OF LYMPHOCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS WITH MYCOSIS FUNGOIDES IN THE EARLY STAGES OF THE DISEASE

Hamade Luay Mustafa

National Medical University named after Bogomolets

Abstract

Cutaneous T-cell lymphoma primarily presents in mycosis fungoides (MF) and its leukemic variant, Sezary syndrome. In recent years, it was recognized, that changes in the peripheral blood of MF patients is a separate prognostic factor that affects treatment and staging of the disease. However, there are almost no data about the specifics of such peripheral blood changes in the early stages of MF. We conducted a retrospective study of the results of blood samples flow cytometry from patients with MF. We studied 36 results of flow cytometry blood samples from 12 patients with MF and compared them with the results from 30 healthy volunteers. During the research, we used the flow cytometry results where panel of monoclonal antibodies was used to determine the level of different subpopulations of T-lymphocytes. We found a statistically significant increase in the CD3+CD4+/CD3+CD8+ T cells ratio, which varied depending on the stage of the disease and was significantly greater than in healthy volunteers. There is a large amount of data about different altered cluster of differentiation expression in tumor cells with the MF. In addition, the disease in the later stages accompanied by more pronounced changes in the peripheral blood. We have identified changes in the peripheral blood of patients with MF stage IA and IB, which can assist in the staging of the disease and selecting optimal treatment strategies.

Key words: mycosis fungoides, early-stage, flow cytometry, peripheral blood, CD3+CD4+ / CD3+CD8+ ratio.

Відомості про автора:

Хамаде Луай Мустафа – аспірант кафедри дерматології та венерології, Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця. E-mail: dvk2@ukr.net