

Ocena angiogenezy u chorych na ziarniniaka grzybiastego

Angiogenesis assessment in patients with mycosis fungoides

Alina Jankowska-Konsur¹, Joanna Maj¹, Zdzisław Woźniak², Eugeniusz Baran¹

¹Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Eugeniusz Baran

²Katedra i Zakład Anatomii Patologicznej Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, kierownik Katedry: prof. dr hab. n. med. Jerzy Rabczyński

Post Dermatol Alergol 2009; XXVI, 4: 186–189

Streszczenie

Wprowadzenie: Ziarniniak grzybiasty (*mycosis fungoides* – MF) jest najczęstszym pierwotnie skórny chłoniakiem, wywodzącym się z komórek T, charakteryzującym się występowaniem na skórze we wczesnych stadiach plam rumieniowo-żółtaczających. Podobne wykwity mogą pojawiać się w przebiegu innych chorób skóry, takich jak przyłuszczycza plackowata wielkoogniskowa (*parapsoriasis en grandes plaques* – PP). Podobieństwo obrazu klinicznego, a także, częściowo, obrazu histopatologicznego obu jednostek chorobowych jest przyczyną poszukiwania markera umożliwiającego różnicowanie tych schorzeń. Nowotworzenie naczyń jest cechą charakterystyczną procesów rozrostowych guzów litych i nowotworów hematologicznych.

Cel: Celem pracy była ocena gęstości mikronaczyń (*microvascular density* – MVC) w zmianach skórnych w przebiegu MF i PP.

Materiał i metody: Metodą immunohistochemiczną przy użyciu przeciwciała przeciwko CD34 zbadano gęstość mikronaczyń w wycinkach skórnych pobranych od 56 chorych na MF (29 chorych w stadium wczesnym IA–IIA, 27 chorych w stadium zaawansowanym IIB–IV) oraz 11 pacjentów z PP. Grupę kontrolną stanowili zdrowi pacjenci oddziału chirurgii plastycznej. Wyniki badań poddano analizie statystycznej za pomocą testu *t* Studenta.

Wyniki: Stwierdzono statystycznie istotne różnice gęstości mikronaczyń między grupą z zaawansowanym MF a grupami chorych z wczesnymi postaciami MF i PP ($p < 0,0001$). Nie odnotowano znamiennych statystycznie różnic między grupą MF IA–IIA a PP ($p > 0,005$) oraz między grupami MF IA–IIA i PP a grupą kontrolną.

Wnioski: Badany czynnik nie spełnia kryteriów biomarkera różnicującego PP i wczesne postacie MF. Nasilona angiogeneza mierzona ekspresją CD34 jest złym czynnikiem prognostycznym i cechą charakterystyczną zaawansowanej postaci MF.

Słowa kluczowe: angiogeneza, ziarniniak grzybiasty, przyłuszczycza plackowata wielkoogniskowa.

Abstract

Introduction: Mycosis fungoides (MF) is the most common primary cutaneous T-cell derived lymphoma. In the early stages the disease presents with erythematous, scaly macules and plaques. Similar lesions may appear in different skin conditions, such as parapsoriasis en grandes plaques (PP). Similarity of the clinical and partially the histopathological picture of both skin disorders prompts the search for a differentiating biomarker. Neoangiogenesis is a characteristic feature of malignant tumours such as solid tumours and haematological neoplasms.

Aim: The aim of the study was to evaluate microvascular density (MVC) in the skin specimens obtained from skin lesions in the course of MF and PP.

Material and methods: Immunohistochemistry studies were performed using antibodies to CD34. The MVC was assessed in 56 MF patients (29 patients with early disease (stage IA–IIA), 27 patients with advanced disease (stage IIB–IV) and 11 PP patients. The control group consisted of healthy individuals, patients of the Department of Plastic Surgery.

Results: There was a statistically significant difference in MVC between the advanced MF group and both the early MF group and the PP group ($p < 0.0001$). There was no statistically significant difference between the early MF and PP group ($p < 0.005$), or between the early MF and PP groups and the control group.

Adres do korespondencji: dr n. med. Alina Jankowska-Konsur, Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Akademii Medycznej we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 1, 50-368 Wrocław, e-mail: ajanko@op.pl

Conclusions: The studied factor does not fulfil the criteria for a biomarker distinguishing mycosis fungoides and parapsoriasis en grandes plaques, despite being a characteristic feature of advanced mycosis fungoides, and increased angiogenesis measured by CD34 expression is a poor prognostic marker of the disease.

Key words: angiogenesis, mycosis fungoides, parapsoriasis en grandes plaques.

Wprowadzenie

Ziarniniak grzybiasty jest pierwotnie skórnyim chłoniakiem, wywodzącym się z komórek T. W początkowej fazie, trwającej zwykle od kilku do kilkunastu lat, zmiany skórne są mało charakterystyczne, mogą naśladować ogniska rumieniowo-łuszczające w przebiegu wyprysku lub przyłuszczycy plackowatej, blaszki łuszczycowe, wykwity chorobowe w przebiegu świerzbu lub choroby Devergie [1].

Przyłuszczycy plackowate (*parapsoriasis en plaques* – PP) są grupą skórnych chorób limfoproliferacyjnych. W obrazie klinicznym odmiana wielkoogniskowa przypomina wczesne zmiany w przebiegu ziarniniaka grzybiastego (*mycosis fungoides* – MF), a w części przypadków w obrębie zmian skórnych w jej przebiegu dochodzi do rozwoju chłoniaka T-komórkowego, przede wszystkim MF. Istnieją także doniesienia o transformacji zmian skórnych w przebiegu PP drobnooogniskowej (palczastej), nieuważanej powszechnie za stan poprzedzający MF, w skórnyim chłoniaka T-komórkowego [2]. Podobieństwo obrazu klinicznego, a także histopatologicznego zmian skórnych w przebiegu przyłuszczycy plackowatej i ziarniniaka grzybiastego [3], przy odmiennym rokowaniu, wiąże się z trudnościami w diagnostyce różnicowej i stwarza potrzebę odkrycia czynnika umożliwiającego różnicowanie obu jednostek chorobowych. Neoangiogeneza jest cechą charakterystyczną dla procesów nowotworowych. Autorzy w prezentowanej pracy podjęli próbę porównania procesu nowotworzenia naczyń w zmianach skórnych w przebiegu przyłuszczycy plackowatej wielkoogniskowej i ziarniniaka grzybiastego.

Materiał i metody

Za materiał do badań posłużyły bloczki parafinowe wycinków skórnych pobranych ze zmian chorobowych pobranych w znieczuleniu miejscowym od 56 chorych (24 kobiet i 32 mężczyzn) z MF. Uzyskano 22 preparaty od pacjentów z MF we wczesnym stadium choroby (MF IA–IIA), pozostałe 23 – ze zmian pobranych od chorych z zaawansowanym procesem rozrostowym (MF IIB–IV). Zbadano również preparaty pochodzące od 11 pacjentów (7 mężczyzn i 4 kobiety) z przyłuszczycą plackowatą wielkoogniskową (PP). Za grupę kontrolną posłużyły preparaty skóry zdrowej pobranej od 8 pacjentów operowanych na oddziale chirurgii plastycznej. Diagnozę postawiono na podstawie obrazu klinicznego oraz badań dodatkowych, w tym badania histopatologicznego i badań obrazowych. Stopień zaawansowania MF ustalono zgodnie z wytycznymi ISCL/EORTC [4]. Badanie uzyskało pozytywną opinię Komisji ds. Etyki

Badań Akademii Medycznej we Wrocławiu. Wszyscy pacjenci wyrazili zgodę na udział w nim.

Preparaty zabarwiono eozyną–hematoksyliną i poddano ocenie histopatologicznej. Badania immunohistochemiczne wykonywano na skrawkach parafinowych grubości 5 μm , które umieszczono na szkiełkach silanizowanych (DAKO® nr kat. S 3003), a następnie skrawki odparafinowano w ksylenie i przeprowadzono przez szereg alkoholi o malejących stężeniach aż do wody. Antygeny tkanek utrwalonych w formalinie odkrywano w Target Retrieval Solution, pH 9, DAKO® nr kat. 3308, przez podgrzewanie w łaźni wodnej w temp. 96°C w czasie 20 min. Endogenną peroksydazę blokowano w 3-procentowym roztworze H_2O_2 przez 5 min. Następnie na skrawki наносzono pierwotne przeciwciała monoclonal Mouse anti human CD34clone: class II, QBEnd 10, firma DAKO® nr kat. N 1632, rozcieńczenie producenta, inkubacja 10 min w temperaturze pokojowej. Płukano w TBS i nakładano biotynylowane przeciwciała (LSAB® + Kit, DAKO K 0675) na 15 min. Reakcję immunocytochemiczną wywołano roztworem tetrachloru 3,3'-diaminobenzyny (DAB+, Liquid K 3486 DAKO). Następnie skrawki płukano w wodzie bieżącej i odwadniano w szeregu alkoholowym oraz ksylenie i zamykano w balsamie.

Ocenę ilościową ekspresji CD34 przeprowadzano w strefach na największej gęstości naczyń tzw. *hot spots* i wyrażano ją poprzez liczbę pojedynczych komórek lub grup komórek endotelialnych na 1 mm^2 . W badaniach wykorzystano system analizy obrazu mikroskopowego Multiscan II (obiektyw Zeissa 40 \times , powiększenie końcowe wynosiło 400 \times).

Analizy statystycznej dokonano przy użyciu testu *t* Studenta (za wartość statystycznie istotną uznano $p < 0,05$).

Wyniki

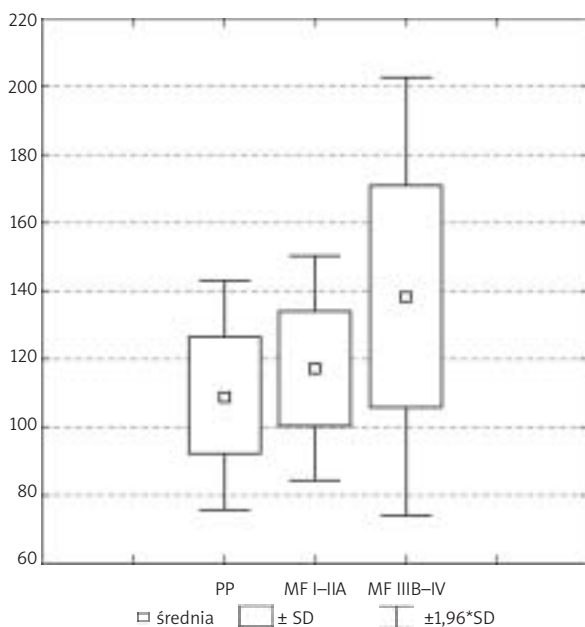
Badano ekspresję CD34 w komórkach śródbłonna naczyń skóry właściwej w obszarach objętych naciekiem limfocytarnym. Stwierdzono statystycznie istotną różnicę w ekspresji CD34 między grupą PP a grupą MF IIB–IV ($p < 0,0001$) (tab. 1.). Podobną różnicę zaobserwowano, porównując grupę MF IA–IIA i MF IIB–IV ($p < 0,0001$). Grupa chłoniaków w stadium zaawansowanym (MF IIB–IV) charakteryzowała się również znacząco większą gęstością mikronaczyń (*microvascular density* – MVC) niż w grupie osób zdrowych ($p < 0,0001$). Nie wykazano natomiast statystycznie istotnych różnic między grupami PP a MF IA–IIA, jak również między PP i MF IA–IIA a grupą kontrolną.

Tab. 1. Średnie wartości (zakres) ekspresji CD34 w przytuszczycy plackowatej wielkoogniskowej i ziarniniaku grzybiastym

Marker Jednostka chorobowa	CD34 (gęstość naczyń/mm ²)	Wartość p*
(A) PP	110 (68–125)	A/B NS A/C $p < 0,0001$
(B) MF stadium IA–IIA	118 (70–128)	A/B NS B/C $p < 0,0001$
(C) MF stadium IIB–IV	141 (76–179)	A/C $p < 0,0001$ B/C $p < 0,0001$

NS – nieistotnie statystycznie; za wartość statystycznie istotną uznano $p < 0,05$

PP – przytuszczycza plackowata wielkoogniskowa, MF – ziarniniak grzybiasty
*test t Studenta



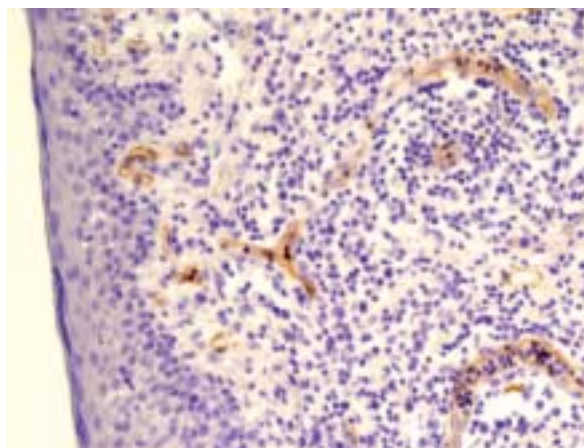
SD – odchylenie standardowe

Ryc. 1. Ekspresja CD34 w grupach *parapsoriasis en grandes plaques* (PP), *mycosis fungoides* I–IIA (MF I–IIA) i *mycosis fungoides* IIB–IV (MF II–IV)

Na ryc. 1., 2. przedstawiono przykładowy obraz ekspresji CD34 w obrębie zmiany skórnej w przebiegu MF.

Omówienie wyników

Nowotworzenie naczyń jest charakterystyczną cechą procesów rozrostowych. Szczególne znaczenie przypisuje się angiogenezie w przebiegu nowotworów bogato unaczynionych, takich jak rak prostaty czy sutka, oraz w rozrostach hematologicznych [5]. W dotychczas opublikowanych pracach wzrost gęstości mikronaczyń, wskazu-

**Ryc. 2.** Ekspresja antygenu CD34 w zmianie skórnej pobranej od chorego z MF, powiększenie 200 ×

jący na nasiloną angiogenezę w obrębie badanej tkanki, jest zwykle złym czynnikiem prognostycznym w guzach litych, m.in. w raku sutka, jajnika, raku płuca [6, 7]. Wykazano, że wzmożona angiogeneza w obrębie ogniska pierwotnego w przebiegu raka przewodowego sutka sprzyja powstawaniu przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych [8]. Znaczenie prognostyczne neoangiogenezy w przebiegu chłoniaków jest zróżnicowane w zależności od typu choroby [9]. Dotychczas opublikowano niewiele prac dotyczących nowotworzenia naczyń w pierwotnie skórnych chłoniakach T-komórkowych (CTCL) [10, 11]. Prace te obejmowały zwykle niewielkie grupy chorych, a ich wyniki wskazywały na istnienie dodatniej korelacji między neoangiogenezą i stopniem zaawansowania choroby.

W ocenie nowotworzenia naczyń wykorzystuje się wiele markerów angiogenezy, wśród których szczególną popularność zdobyły takie antygeny, jak CD31, CD34 czy czynnik VIII [12]. W ostatnich latach podejmowano próby porównania wyników badań nad neoangiogenezą w zmianach nowotworowych za pomocą omawianych znaczników [13, 14] i stwierdzono, że oznaczenie MVC metodą immunohistochemiczną z użyciem przeciwciała przeciwko CD34 charakteryzuje się największą czułością i detekcją większej liczby najdrobniejszych naczyń w obrębie tkanki nowotworowej [15].

Antygen CD34 jest powierzchniową glikoproteiną należącą do rodziny przezbłonowych białek sialomucynowych, biorącą udział w adhezji komórkowej. Białko CD34 ulega ekspresji na powierzchni komórek hematopoetycznych szpiku kostnego, komórek tucznych, komórek dendrytycznych, a także na powierzchni komórek progenitorowych śródbłonna i komórkach śródbłonna. Tę ostatnią cechę wykorzystuje się w ocenie angiogenezy (tzw. gęstości mikronaczyń).

W prezentowanej pracy stwierdzono, że wzmożona neoangiogeneza jest cechą charakterystyczną zaawansowanego stadium MF i złym czynnikiem prognostycznym

tej jednostki chorobowej. We wczesnych stadiach MF oraz w przebiegu PP nie odnotowano nasilonego procesu nowotworzenia naczyń, mierzonego metodą immunohistochemiczną przy użyciu przeciwciała przeciwko CD34, a otrzymane wyniki były porównywalne z wynikami uzyskanymi ze skóry zdrowej. Omawiany czynnik nie spełnia więc kryteriów markera różnicującego obie jednostki chorobowe.

Piśmiennictwo

1. Elmer KB, George RM. Cutaneous T-cell lymphoma presenting as benign dermatoses. *Am Fam Physician* 1999; 59: 2809-13.
2. Belousova IE, Vanecek T, Samtsov AV, et al. A patient with clinicopathological features of small plaque parapsoriasis presenting later as plaque-stage mycosis fungoides: report of a case and comparative study of 27 of "nonprogressive" small plaque parapsoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2008; 59: 474-82.
3. Reddy K, Bhawan J. Histologic mimickers of mycosis fungoides: a review. *J Cutan Pathol* 2007; 34: 519-25.
4. 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: 1713-22.
5. Guinebretiere JM. Angiogenesis and breast neoplasms. The pathologist's point of view. *Gynecol Obstet Fertil* 2005; 33: 140-6.
6. Uzzan B, Nicholas P, Cucherat M, Perret GY. Microvessel density as a prognostic factor In women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res* 2004; 64: 2941-55.
7. Murri AM, Hilmy M, Bell J, et al. The relationship between the systemic inflammatory response, tumour proliferative activity, T-lymphocytic and macrophage infiltration, microvessel density and survival in patients with primary operable breast cancer. *Br J Cancer* 2008; 99: 1013-9.
8. Popiela TJ, Sikora J, Klimek M, et al. The analysis of CD34 immunoreactivity level in invasive ductal breast cancer with respect to the presence of lymph node metastases. *Neuro Endocrinol Lett* 2008; 29: 443-6.
9. Koster A, Raemaekers JM. Angiogenesis in malignant lymphomas. *Curr Opin Oncol* 2005; 17: 611-6.
10. Mazur G, Woźniak Z, Wróbel T, et al. Increased angiogenesis in cutaneous T-cell lymphomas. *Pathol Oncol Res* 2004; 10: 34-6.
11. Vacca A, Moretti S, Ribatti D, et al. Progression of mycosis fungoides is associated with changes in angiogenesis and expression of matrix metalloproteinases 2 and 9. *Eur J Cancer* 1997; 33: 1685-92.
12. Baluk P, McDonald DM. Markers of microscoping imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1131: 1-12.
13. Nico B, Benagiano V, Mangieri D, et al. Evaluation of microvascular density in tumours: pro and contra. *Histol Histopathol* 2008; 23: 601-7.
14. Norrby K, Ridell G. Tumour-type-specific capillary endothelial cell stainability in malignant B-cell lymphomas using antibodies against CD31, CD34 and Factor VIII. *APMIS* 2003; 111: 483-9.
15. Sasano H, Suzuki T. Pathological analysis of angiogenesis in human tumors. *Biomed Pharmacother* 2005; 59 (Suppl 2): 334-6.