

Zastosowanie badań immunohistochemicznych i technik biologii molekularnej w diagnostyce ziarniniaka grzybiastego

The use of immunohistochemistry and molecular biology techniques in the diagnosis of mycosis fungoides

MARIOLA PAWLACZYK¹, ELŻBIETA PORĘBA², VIOLETTA FILAS³, TAMARA BANASIAK³, LUCYNA KRAMER⁴, JAN BRĘBOROWICZ³, ANNA GOŹDZICKA-JÓZEFIAK²

¹ Katedra i Klinika Dermatologii AM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, kierownik Katedry i Kliniki prof. dr hab. med. Wojciech Silny; ² Zakład Wirusologii Molekularnej Instytutu Biotechnologii UAM, kierownik Zakładu prof. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak; ³ Katedra Onkologii AM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, kierownik Katedry prof. dr hab. med. Jan Bręborowicz; ⁴ Katedra i Zakład Informatyki i Statystyki AM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, kierownik Katedry i Zakładu prof. dr hab. Jerzy Moczko

Abstract

Mycosis fungoides (MF) is the most common primary cutaneous T-cell lymphoma which may be difficult to diagnose at the early stage. The aim of the study was to evaluate the usefulness of immunohistochemical examinations and T-cell receptor γ gene (TCR γ) rearrangement analysis in the diagnosis of MF. Immunohistochemical reactions were performed with antibodies to CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8 and CD20 cell markers of skin infiltrates. TCR γ rearrangements were detected using the method of polymerase chain reaction with the subsequent separation of products by temperature gradient gel electrophoresis. The studied group consisted of 49 patients with MF and 25 patients with inflammatory dermatoses. In the majority of MF skin infiltrates cells expressed the immunophenotype: CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, CD7-, CD8- and CD20- did not vary significantly from phenotypes observed in chronic inflammatory dermatoses. Dominant clones with TCR γ rearrangement were detected in 85% of MF skin biopsies and in 63% of MF peripheral blood cells whereas in the control group in 11% and 14% of cases, respectively. Statistically significant differences were found in the occurrence of clonal T-cells in skin infiltrates between patients with MF and the control group. A statistical analysis of TCR γ rearrangement in pe-

Streszczenie

Ziarniniak grzybiasty (MF) jest najczęściej występującym pierwotnym chłoniakiem skóry T-komórkowym, który w początkowym okresie choroby często sprawia trudności diagnostyczne. Celem pracy była ocena przydatności badań immunohistochemicznych oraz rearanżacji genu γ receptora limfocytów T (TCR γ) w diagnostyce ziarniniaka grzybiastego (MF). Reakcje immunohistochemiczne prowadzono z przeciwciałami przeciw markerom CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20 komórek nacieków skórnych. Do analizy rearanżacji TCR γ zastosowano metodę PCR z elektroforetycznym rozdzieleniem heterodupleksów w żelu, w gradiencie temperaturowym. Badaniami objęto 49 chorych na MF w różnych stadiach oraz 25 chorych z dermatozami zapalnymi. W większości nacieków skórnych MF na komórkach stwierdzano immunofenotyp CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, CD7-, CD8-, CD20-, podobny do występującego w przewlekłych zapalnych chorobach skóry. Dominujące klonalności z rearanżacją TCR γ wykryto w wycinkach skórnych u 85%, a w komórkach krwi obwodowej u 63% ogółu chorych z MF, podczas gdy w grupie kontrolnej odpowiednio u 11 i 14% chorych. Stwierdzono statystycznie istotne różnice w porównaniu występowania klonów limfocytów T w naciekach skórnych u chorych z MF w stosunku do chorych z grupy kontrolnej. Analiza statystyczna wyników rearan-

Adres do korespondencji: dr med. Mariola Pawlaczyk, Katedra i Klinika Dermatologii AM, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań, e-mail: m_p@go2.pl

ripheral blood cells did not reveal any differences only in patients with the MF in the early stage (IA) when compared with inflammatory dermatoses. Detection of TCR γ rearrangement is a valid supplement to histopathologic and immunohistochemical examination in cases of suspected MF however the diagnosis should always be based on the analysis of examinations and clinical status of patients.

Key words: mycosis fungoides, immunohistochemical diagnosis, monoclonality.

żacji TCR γ w komórkach krwi obwodowej nie wykazała istotnych różnic tylko w stadium początkowym (IA) MF w porównaniu z dermatozami łagodnymi. W przypadkach podejrzenia MF, wykrycie rearanżacji genu TCR γ stanowi cenne uzupełnienie diagnostyki histopatologicznej i immunohistochemicznej, jednak rozpoznanie powinno być zawsze stawiane na podstawie całościowej oceny badań i stanu klinicznego chorych.

Słowa kluczowe: ziarniniak grzybiasty, diagnostyka immunohistochemiczna, monoklonalność.

(PDiA 2003; XX, 2: 73–79)

Wstęp

W przebiegu klinicznym ziarniniaka grzybiastego (*mycosis fungoides*, MF), najczęściej występującego nowotworu z grupy pierwotnych chłoniaków skórnych T-komórkowych, wyróżnia się 3 następujące kolejno po sobie stadia rozwojowe: rumieniowe, naciekowe i guzowate [1, 2]. W każdym okresie MF dojść może do erythrodermii, co pogarsza rokowanie [2, 3]. Prawidłowe rozpoznanie wczesnego stadium choroby sprawia trudności diagnostyczne klinicyście i histopatologom ze względu na podobieństwo obrazu klinicznego oraz histopatologicznego zmian skórnych do dermatoz zapalnych o przewlekłym przebiegu, takich jak wyprysk, łuszczyca, przyłuszczyca plackowata [2, 4, 5]. Erythrodermię w przebiegu MF trudno jest różnicować z erythrodermią innego pochodzenia [3, 6, 7], dlatego chorym podejrzanym o MF często wielokrotnie pobiera się wycinki skórne do badań [2, 7].

W diagnostyce pierwotnych chłoniaków skóry obok badań histopatologicznych zmian skórnych, wykorzystuje się badania immunohistochemiczne, wykrywające markery powierzchniowe komórek nacieków [8, 9], a w ostatnich latach coraz szerzej stosuje się techniki biologii molekularnej [10–12].

W procesie dojrzewania prawidłowe limfocyty T przechodzą rearanżacje regionów zmiennych, łączących i stałych w obrębie genów receptora limfocytów T (*T cell receptor*, TCR), w wyniku czego każdą komórkę charakteryzują określone cząstki powierzchniowe, a wszystkie komórki siostrzane wywodzące się z dojrzałych limfocytów T wykazują ekspresję tych samych TCR. W procesach nowotworzenia związanych z monoklonalną proliferacją limfocytów T, do których zalicza się MF, liczba jednakowych komórek będzie więc wzrastać do poziomu dającego się wykryć technikami molekularnymi [11–15].

Celem pracy była ocena przydatności badań immunohistochemicznych markerów powierzchniowych komórek nacieków skórnych oraz analizy rearanżacji genu γ TCR w diagnostyce ziarniniaka grzybiastego.

Materiał i metody

Badaniami objęto materiał pochodzący od 49 chorych na MF, w wieku od 34 do 82 lat, leczonych w Klinice Dermatologii AM w Poznaniu, bądź diagnozowanych w Katedrze Onko-

Tab. 1. Stadium zaawansowania ziarniniaka grzybiastego wg klasyfikacji TNM*

Stadium	T (<i>tumor</i>)	N (<i>lymph node</i>)	M (<i>metastasis</i>)
IA	rumienie i nacieki <10% powierzchni skóry (T1)	brak lymphadenopatii lub zmiany odczynowe w węzłach	brak
IB	rumienie i nacieki >10% powierzchni skóry (T2)	brak lymphadenopatii lub zmiany odczynowe w węzłach	brak
IIA	rumienie i nacieki	lymphadenopatia ze zmianami odczynowymi w węzłach chłonnych	brak
IIB	guzy >1 (T3)	brak lymphadenopatii lub zmiany odczynowe w węzłach	brak
III	erythrodermia (T4)	lymphadenopatia ze zmianami odczynowymi w węzłach chłonnych	brak
IVA	T1, T2, T3 lub T4	nacieki nowotworowe w węzłach chłonnych	brak
IVB	T1, T2, T3 lub T4	zmiany odczynowe lub nowotworowe w węzłach chłonnych	zajęcie narządów wewnętrznych

*Podział przyjęty przez Międzynarodową Konferencję określającą zasady leczenia chłoniaków skóry [16]

Tab. 2. Startery stosowane do amplifikacji fragmentów receptora γ limfocytów T

Runda PCR	Starter V γ (5'-3')	Starter J γ (5'-3')
I	V γ 1-8 zewnętrzny GGAGCTTCTAGCTTTCCTGTCTC lub V γ 9 zewnętrzny GGAATTCCAAATCTTGGTTTA	J γ zewnętrzny CGTCGACAACAAGTGTGTTCAC
II	V γ 1-8 wewnętrzny CTCGAGTGCCTGCCTACAGAGAGG lub V γ 9 wewnętrzny CTCGAGTGCCTGCCTACAGAGAG	J γ wewnętrzny GGATCCACTGCCAAAGAGTTTCTT

logii AM w Poznaniu, w latach 1994–2002. Stadium MF oceniano wg klasyfikacji TNM, przedstawionej w tab. 1. [16]. Do grup kontrolnych włączono 15 chorych na przewlekły, rozsiały wysypk kontaktowy niealergiczy, 10 chorych na łuszczycę oraz 10 chorych na przyłuszczycę plackowatą droбноogniskową. Materiał pobierany był przed wdrożeniem leczenia i obejmował wycinki skórne oraz u części chorych krew obwodową. We wszystkich przypadkach rozpoznania potwierdzone były rutynowymi badaniami laboratoryjnymi z uwzględnieniem szczegółowej oceny rozmazu krwi obwodowej, badaniem radiologicznym klatki piersiowej oraz ultrasonograficznym jamy brzusznej, oceną histopatologiczną i immunohistochemiczną wycinków skórnych oraz węzłów chłonnych w przypadku ich powiększenia. Badania immunohistochemiczne markerów powierzchniowych CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20 na komórkach nacieków skórnych wykonywano w skrawkach parafinowych i kriostatowych, z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych firmy Dako i Novocastra oraz metody immunohistochemicznej z kompleksem EnVision + HRP. Reakcje immunohistochemiczne uznawano za dodatnie, jeżeli barwiło się co najmniej 50% komórek jednojądrzastych nacieku. Oceny histopatologicznej i immunohistochemicznej dokonywały niezależnie, dwie różne osoby.

Analizę rearanżacji genu γ TCR przeprowadzono w wycinkach skórnych i krwi obwodowej, stosując metodę PCR (*polymerase chain reaction*, PCR), z elektroforetycznym rozdziałem heterodupleksów w żelu, w gradiencie temperaturowym (HD-TGGE, *heteroduplex temperature gradient gel electrophoresis*). Do izolacji genomowego DNA z wycinków skórnych skrawano 10 skrawków po 10 μ m każdy. W celu odparafinowania materiał poddawano działaniu ksylenu, a po odwirowaniu i przepłukaniu etanolem trawiono proteinazą K [17]. Do izolacji genomowego DNA z komórek nacieków skórnych i krwi obwodowej wykorzystano zestawy firmy QIAGEN; odpowiednio QIAamp DNA Mini Kit oraz QIAamp DNA Blood Kit. Jakość DNA w próbkach sprawdzano techniką PCR z użyciem starterów specyficznych dla fragmentu genu ludzkiej β -globiny. Reakcje amplifikacji fragmentów TCR γ prowadzono ze starterami komplementarnymi do regionów V1-8 lub V9 oraz J1-2 TCR γ zestawionymi w tab. 2. [18]. Mieszanki reakcyjne o objętości końcowej 20 μ l zawierały: 50 ng DNA genomowego, 1 x stężony bufor PCR, 200 μ M każdego dNTP, 1 μ M każdego z dwóch oligonukleotydów, 1U/25 μ l Taq DNA polimerazy. Reakcję prowadzono, stosując następujące profile termiczne: denaturacja

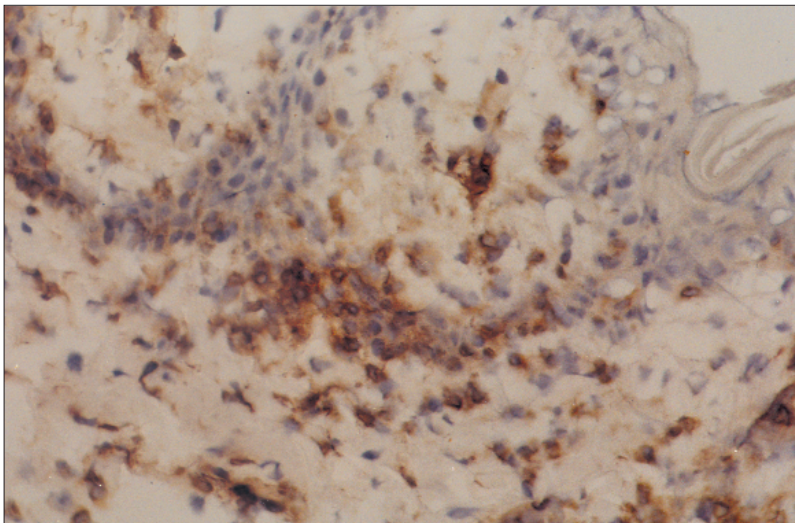
w 94°C przez min, przyłączanie starterów w 55°C przez 1,5 min, polimeryzację w 70°C przez 1,5 min. W pierwszej rundzie amplifikacji stosowano pary starterów zewnętrznych V1-8 γ i J γ 1/2 albo V γ 9 i J γ 1/2. Następnie otrzymane produkty używano jako matrycę w kolejnej rundzie amplifikacji, w której wykorzystywano odpowiednio startery komplementarne do wewnętrznych sekwencji genów V γ 1-8 i J γ 1/2 albo V γ 9 i J γ 1/2. Po pierwszej rundzie amplifikacji rejonu V γ 1-8 i J γ 1/2 otrzymywano produkty o wielkości ok. 480 par zasad, a po drugiej 420 par zasad. Amplifikowane fragmenty rejonu V γ 9 i J γ 1/2 wynosiły odpowiednio 400 i 380 par zasad. Do oceny rearanżacji jako kontrolę negatywną stosowano DNA wyizolowany z krwi osób zdrowych, a jako kontrole pozytywne DNA wyizolowany z komórek Jurkat (rearanżacje w rejonie V1-8 γ) oraz DNA wyizolowany z krwi obwodowej chorego na ostrą białaczkę limfatyczną T-komórkową $\gamma\delta$ + (rearanżacje w rejonie V γ 9). Wszystkie reakcje PCR przeprowadzono w aparacie UNO II firmy Biometra. Otrzymane produkty rozdzielano w 2% żelu agarozowym, zawierającym bromek etydyny, w celu sprawdzenia efektu amplifikacji. Produkty otrzymane w reakcji amplifikacji denaturowano w 95°C przez 5 min, a następnie renaturowano w 55°C przez 20 min w celu uzyskania heterodupleksów. Rozdział elektroforetyczny prób prowadzono w 8% żelu poliakrylamidowym zawierającym 7M mocznik, w gradiencie temperatury (35–55°C) przez 3 godz. przy napięciu 450 V, z użyciem aparatu TGGE Maxi firmy Biometra. Po zakończeniu elektroforezy żele barwiono srebrem, stosując zestaw Silver Stain, firmy Kucharczyk i fotografowano.

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy pomocy testu dokładnego Fishera ($p=0,05$). Dla porównania wyników monoklonalności w poszczególnych grupach zastosowano test Manna-Whitthney'a, przyjmując dla wycinków skórnych $p=0,0027$, a dla krwi obwodowej $p=0,0216$.

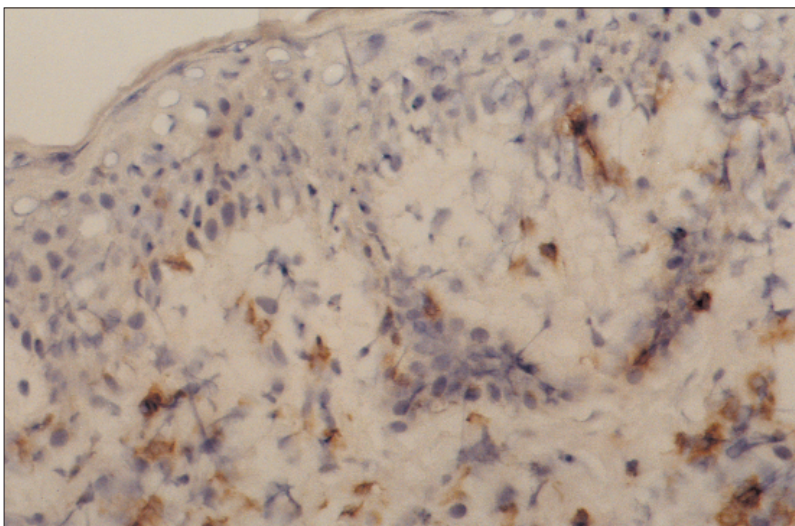
Wyniki

W badaniach przeanalizowano 53 wycinki skórne pochodzące od chorych na MF w różnych stadiach choroby i wycinki od wszystkich chorych z grupy kontrolnej oraz krew obwodową od 40 chorych na MF i wszystkich z grupy kontrolnej.

Większość limfocytów w naciekach skórnych MF wykazywała fenotyp CD2+ CD3+ CD4+ CD8- (fot. 1. i 2.), za wyjątkiem 4 przypadków w stadium IIB i 2 w stadium IVA MF,



Fot. 1. Dodatnia reakcja z przeciwciałem anti-CD4 w nacieku skórnym u chorego w stadium IIA ziarniniaka grzybiastego (pow. 400 razy)



Fot. 2. Ujemna reakcja z przeciwciałem anti-CD8 w nacieku skórnym u chorego w stadium IIA ziarniniaka grzybiastego (pow. 400 razy)

z ekspresją CD8+ CD4-. Osłabioną ekspresję CD5 obserwowano u 7 chorych (stadia IIA, IIB, III, IVA), a CD3 u 4 chorych w stadium IIB, III, IVA. W nielicznych przypadkach (dwóch w stadium IA, dwóch w stadium IB i jednym w stadium IIA) w naciekach MF stwierdzono ekspresję CD7+. Tylko pojedyncze komórki nacieków nowotworowych MF wykazywały reakcję z przeciwciałem CD 20. W grupie kontrolnej w większości stwierdzano immunofenotyp komórek nacieków skórnych: CD2+ CD3+ CD4+ CD5+ CD7- CD8-, z wyjątkiem 3 przypadków przewlekłego wyprysku i 3 przypadków przyłuszczyicy plackowatej, w których występowała ekspresja CD7+. Analiza statystyczna ekspresji CD7+ nie wykazała istot-

nych różnic między grupą MF a grupą kontrolną.

Wyniki analizy rearanżacji genu γ TCR zestawiono w tab. 3. Próby uznawano za monoklonalne, jeśli w smudze DNA na żelu widoczny był pojedynczy prążek (fot. 3.). Dominujące klony z rearanżacją TCR γ stwierdzono w naciekach skórnych u 79%, a w komórkach krwi obwodowej u 63% ogółu chorych z MF. Monoklonalność występowała we wszystkich próbkach chorych w stadium IVA. W stadium IIB rearanżacje występowały u 90% chorych w limfocytach nacieków skórnych oraz u 78% we krwi obwodowej. Porównywalny odsetek rearanżacji stwierdzono w stadiach IIA i III, zarówno w wycinkach, jak i komórkach krwi obwodowej. W początkowym stadium IA MF rearanżacje stwierdzono u 75% chorych w wycinkach skórnych, ale tylko u 37,5% w komórkach krwi obwodowej. W trzech przypadkach przewlekłego wyprysku i u jednego chorego z przyłuszczycą plackowatą wykryto dominujące klony w wycinkach skórnych. Analiza rearanżacji TCR γ we krwi obwodowej u chorych z grupy kontrolnej dała dodatnie wyniki u 2 chorych na wyprysk oraz u 3 z 10 chorych na przyłuszczycę plackowatą.

Stwierdzono statystycznie istotne różnice w porównaniu występowania klonów limfocytów T w naciekach skórnych u chorych z MF w stosunku do chorych z grup kontrolnych. Analiza statystyczna wyników rearanżacji TCR γ w komórkach krwi obwodowej nie wykazała istotnych różnic tylko w stadium IA.

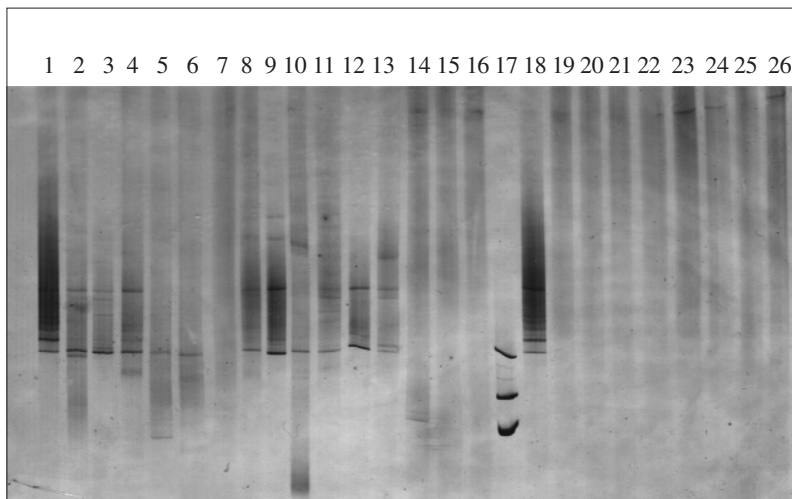
Omówienie

Poszukiwania nowych metod diagnostycznych gwarantujących prawidłowe rozpoznanie pierwotnych chłoniaków skóry w początkowym okresie choroby, koncentrowały się przez wiele lat na badaniach immunohistochemicznych i genetycznych. Oznaczanie immunofenotypów komórek nowotworowych nacieków skórnych stanowi podstawy obowiązujących aktualnie klasyfikacji pierwotnych chłoniaków skóry [7]. Przedstawione przez nas badania immunohistochemiczne wykazały utratę niektórych markerów powierzchniowych na limfocytach T w naciekach skórnych w stadiach zaawansowanych MF, co przemawia za procesem złośliwym, jednak w początkowym okresie choroby antygeny powierzchniowe wykazywały podobną ekspresję w MF i przewlekłych, zapalnych chorobach skóry, co potwierdzają także liczne doniesienia innych autorów [5, 7–9, 20–22]. W większości przypadków na komórkach nacieków MF nie stwierdza-

no dodatnich reakcji z przeciwciałem anti-CD7, ale podobny immunofenotyp charakteryzował grupę kontrolną. Zwiększenie liczby pacjentów grupy kontrolnej mogłoby wpłynąć na wykazanie istotnych różnic dyskryminujących nacieki MF od dermatoz zapalnych, jak przedstawił to Bergman i wsp. [23]. W swojej pracy obejmującej większą liczbę chorych autorzy wykazali istotne różnice w ekspresji CD7, pozwalające na różnicowanie przypadków MF od zapalnych chorób skóry [23]. Obserwacji Bergmana i wsp. nie potwierdzają jednak inne badania. Wydaje się, że ujemna reakcja z przeciwciałem anti-CD7 w sytuacjach wątpliwych nie przesądza o nowotworowym charakterze nacieku skórnoego [5, 9, 12, 19, 20].

Od momentu wprowadzenia do diagnostyki pierwotnych chłoniaków skóry technik biologii molekularnej, monoklonalność wykrywano początkowo opierając się na technice Southern blot, jednak liczba komórek T w naciekach we wczesnych okresach MF może okazać się niewystarczająca do wykazania dominującego klonu tą metodą [18]. Czułość badań wzrosła po wprowadzeniu do analizy monoklonalności techniki PCR. Limfocyty T mogą prezentować 2 rodzaje łańcuchów $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$, co sprawia, że w badaniach diagnostycznych wykorzystywać można rearan-

żacje w obrębie czterech genów. Większość skórnych limfocytów T wykazuje ekspresję $\alpha\beta$ TCR. Amplifikacja tych łańcuchów jest jednak dość trudna z uwagi na dużą liczbę segmentów zmiennych, stąd w celu wykrycia klonalności wykorzystu-



Fot 3. Produkty amplifikacji TCR γ 1-8 rozdzielone metodą elektroforezy w żelu w gradiencie temperatury. Linie 7, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 – produkty poliklonalne; linie – 5, 6, 8, 10, 11 produkty monoklonalne; linie – 1, 9, 12, 13 produkty biklonalne; linia – 2, 3, 4 produkty oligoklonalne. 17 marker masy pUC19/MspI. Linia 18 – kontrola dodatnia (DNA izolowany z komórek Jurkat)

Tab. 3. Wyniki analizy rearanżacji genu γ receptora limfocytów T w wycinkach skórnych i krwi obwodowej u chorych na ziarniniaka grzybiastego i w grupach kontrolnych

Rozpoznanie	Wycinki skórne N/nPCR+ (%)	Krew obwodowa N/nPCR+ (%)
stadium MF		
IA	8/6 75%	8/3 37,5%
IB	12/8 67%	9/5 55,5%
IIA	10/8 89%	10/7 70%
IIB	10/9 90%	9/7 78%
III	10/8 80%	5/3 60%
IVA	3/3 100%	2/2 100%
razem	53/42 79%	43/27 63%
grupa kontrolna		
wyprysk	15/3 20%	5/2 13%
łuszczyca	10/0 0%	11/0 0%
przyłuszczyca	10/1 10%	10/3 30%
razem	35/4 11%	35/5 14%

N: liczba chorych

N PCR+: liczba chorych ze stwierdzoną monoklonalnością

je się częściej amplifikację łańcucha γ TCR. W prezentowanej pracy zastosowano technikę PCR opracowaną przez Wooda i wsp. [18], skojarzoną z czułą metodą elektroforetycznego rozdziału uzyskanych produktów amplifikacji w żelu w gradencie temperatury [24–26]. Uzyskane przez nas wyniki wykrywania monoklonalności w naciekach skórnych są podobne do przedstawionych przez innych autorów [18, 27–29]. Bergman i wsp. wykazali rearanżacje klonalne TCR γ w naciekach skórnych u 69% chorych z klasycznym MF [23], a Dadej w 88% [30]. Nieznacznie niższy odsetek rearanżacji stwierdzono w stadium IA MF (37,5%) w komórkach krwi obwodowej w porównaniu z doniesieniami Muche i wsp. [24], którzy w tym stadium MF wykryli rearanżacje u 46,2% chorych. Z punktu widzenia klinicznego i patologicznego MF, zgodnie z definicją pierwotnych chłoniaków skórnych T-komórkowych, rozwija się w skórze i przez 6 mies. od początku choroby nie powinien dawać przerzutów do węzłów chłonnych czy narządów wewnętrznych [6, 7]. Badania z wykorzystaniem technik biologii molekularnej wskazują na możliwość pozaskórnego rozsiewu nowotworowych limfocytów T już we wczesnym okresie choroby, o czym świadczy występowanie klonów komórek T we krwi obwodowej w stadiach IA i IB MF.

Ciekawe wydaje się wykrycie rearanżacji w komórkach krwi obwodowej chorych z przyłuszczycą plackowatą droбноogniskową. Dermatoza ta od kilku lat stanowi przedmiot kontrowersji wśród dermatologów; przez jednych uważana jest za prekursora MF, inni zaś traktują przyłuszczycę plackowatą w odmianie wieloogniskowej jako stadium rumieniowe MF [31]. Muche i wsp. wykazali wysoki odsetek klonów limfocytów T we krwi obwodowej chorych na przyłuszczycę plackowatą droбноogniskową, przy braku tych klonów w naciekach skórnych. Autorzy tłumaczą ten fakt możliwością występowania miejscowej odpowiedzi immunologicznej skutecznie redukującej nacieki klonalne w skórze [25].

Częstość wykrywania klonów komórkowych w badanym materiale zależy od kilku czynników: warunków technicznych, w tym sposobu ekstrakcji DNA, rodzaju zastosowanych starterów i techniki rozdziału produktów amplifikacji, badanego materiału oraz interpretacja wyników [11, 15, 18, 24, 26, 27, 30]. Rearanżacje wykrywa się częściej w świeżych mrożonych wycinkach niż w skrawkach parafinowych [18, 22, 30]. Z drugiej strony stosowanie materiału zatopionego w parafinie upraszcza procedury diagnostyczne i pozwala na retrospektywną ocenę materiału. Zwiększanie czułości stosowanych technik może jednak doprowadzić do wykrywania pojedynczych klonów reaktywnych limfocytów w zmianach skórnych w przebiegu zmian zapalnych skóry [11, 30, 32]. Potwierdzają to wykryte przez nas rearanżacje w komórkach nacieków u chorych na wyprysk.

Monoklonalność nie zawsze musi być jednoznaczna z rozrostem złośliwym. Z drugiej strony, badania prowadzone przez Athony-Key'a i wsp. [22] i Bergmana i wsp. [23] udowodniły, że dermatozy z pogranicza MF, w których występowały klonalne rearanżacje komórek T mimo braku w momencie ustalania rozpoznania kryteriów klinicznych i histopatologicznych odpowiadających MF, po pewnym czasie uległy transformacji w MF. Chorzy z tzw. klonalnym zapaleniem skóry (*clonal dermatitis*) powinni więc być objęci obserwacjami klinicznymi

i histopatologicznym z uwagi na możliwość rozwoju CTCL [22, 23, 30, 33].

W świetle prezentowanych wyników własnych oraz licznych doniesień innych autorów okazuje się, iż analiza klonalności dostarcza cennych dodatkowych informacji potwierdzających rozrost nowotworowy [10, 12, 18, 23, 24, 27, 30]. Nie można jednak wyników tego badania traktować jako odrębnego kryterium diagnostycznego, a jedynie jako badanie uzupełniające diagnostykę histopatologiczną, immunohistochemiczną i całościową analizę stanu klinicznego pacjenta [6, 7, 30, 32–34].

Wnioski

1. Badania immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał przeciw antygenom powierzchniowym: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20 komórek nacieków skórnych nie pozwalają na różnicowanie początkowego okresu ziarniniaka grzybiastego z przewlekłymi, zapalnymi chorobami skóry.
2. Analiza monoklonalności na podstawie badania rearanżacji genu γ TCR dostarcza istotnych danych potwierdzających nowotworowy charakter dermatoz.
3. Rozpoznanie ziarniniaka grzybiastego powinno być zawsze stawiane na podstawie całościowej oceny badań histopatologicznych, immunohistochemicznych, analizy monoklonalności oraz stanu klinicznego chorych.

Piśmiennictwo

1. Diamandidou E, Cohen PR, Kurzrock M: Mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Blood*, 1996, 88, 2385-409.
2. Fung MA, Murphy MJ, Hoss DM, et al.: Practical evaluation and management of cutaneous lymphoma. *J Am Acad Dermatol*, 2002, 46, 325-57.
3. Bernengo MG, Burg G, Duvic M, et al.: Update on erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: report of the international society for cutaneous lymphomas. *J Am Acad Dermatol*, 2002, 46, 95-106.
4. Yeh A, Hudson A, Prieto V, et al.: Reassessment of lymphocytic atypia in the diagnosis of mycosis fungoides. *Mod Pathol*, 2001, 14, 285-88.
5. Kempf W, Dummer R, Burg G: Approach to lymphoproliferative infiltrates of the skin. The difficult lesions. *Am J Clin Pathol*, 1999, 111 (suppl. 1), S84-S93.
6. Willemze R: Primary cutaneous lymphomas. *Curr Opin Oncol*, 2000, 12, 419-25.
7. Willemze R, Kerl H, Sterry W, et al.: EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. A proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood*, 1997, 90, 354-71.
8. Ralfkiaer E, Wollf-Sneedorff A, Thomsen K, et al.: Immunophenotypic studies in cutaneous T-cell lymphomas: clinical implications. *Br J Dermatol*, 1993, 129, 655-59.
9. Preesman AH, Toonstra J, van der Putte SCJ, et al.: Immunophenotyping on simultaneously occurring plaques and tumours in mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Br J Dermatol*, 1993, 129, 660-66.
10. Kohler S, Zehnder JL: Use of the polymerase chain reaction in the evaluation of the cutaneous T-cell infiltrates. *Dermatol Clin*, 1999, 17: 657-66.

11. Wood GS: T-cell receptor and immunoglobulin gene rearrangements in diagnosing skin disease. *Arch Dermatol*, 2001, 137: 1503-506.
12. Bakels V, Oostveen J, Preesman A, et al.: Differentiation between actinic reticuloid and cutaneous T cell lymphoma by T cell receptor γ gene rearrangements analysis and immunophenotyping. *J Clin Pathol* 1998, 51, 154-158.
13. Terhune MH, Cooper KD: Gene rearrangements and T-cell lymphomas. *Arch Dermatol*, 1993, 129, 1484-490.
14. Li N, Bhawan J: New insight into the applicability of T-cell receptor γ gene rearrangement analysis in cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Pathol*, 2001, 28, 412-8.
15. Mieleke V, Staib G, Boehncke WH, et al.: Clonal disease in early cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Clin*, 1994, 12, 351-60.
16. Proceeding of the International Concensus Conference on CTCL Treatment and Recommendations Boston. *J Am Acad Dermatol*, 1997, 36, 949-54.
17. Wright DK, Manos MM: Sample preparation from paraffin embedded tissues. W: PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York, 1990, 153-58.
18. Wood G, Tung R, Haeffner A, et al.: Detection of clonal T-cell receptor γ gene rearrangements in early mycosis fungoides/Sezary syndrome by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE). *J Invest Dermatol*, 1994, 103, 34-41.
19. Ralfkiaer E.: Controversies and discussion on early diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma. Phenotyping. *Dermatol Clin*, 1994, 12, 329-34.
20. Smoller BR, Bishop K, Glusac EJ, et al.: Lymphocyte antigen abnormalities in inflammatory dermatoses. *Appl Immunohistochem*, 1995, 3, 127-31.
21. Pawlaczyk M, Filas V, Bręborowicz J, Silny W: Badania immunohistochemiczne nacieków skórnych u chorych z ziarniniakiem grzybiastym. Doniesienie wstępne. *Przegl Dermatol*, 1997, 84, 19-26.
22. Asthon-Key M, Diss TC, Du MQ, et al.: The value of polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous T-cell infiltrates. *Am J Surg Pathol*, 1997, 21, 743-47.
23. Bergman R, Faclieru D, Sahar D, et al.: Immunophenotyping and T-cell receptor γ gene rearrangement analysis as an adjunct to the histopathologic diagnosis of mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol*, 1998, 39, 554-59.
24. Muche M, Lukowsky A, Asadullah K, et al.: Demonstration of frequent occurrence of clonal T cells in peripheral blood of patients with primary cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*, 1997, 4, 1636-42.
25. Muche M, Lukowsky A, Heim J, et al.: Demonstration of frequent occurrence of clonal T cells in peripheral blood but not in the skin of patients with small plaque parapsoriasis. *Blood*, 1999, 94, 1409-1417.
26. Scheller U, Muche M, Sterry W, et al.: Detection of clonal T cells in cutaneous T cell lymphoma by polymerase chain reaction: comparison of mutation detection enhancement-polyacrylamide gel electrophoresis, temperature gradient gel electrophoresis and fragment analysis of sequencing gels. *Electrophoresis*, 1998, 19, 653-58.
27. Bachelez H, Bioul L, Flageul B, et al.: Detection of clonal T-cell receptor γ gene rearrangements with the use of polymerase chain reaction in cutaneous lesions of mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Arch Dermatol*, 1995, 131, 1027-31.
28. Bottaro M, Berti E, Biondi A, et al.: Heteroduplex analysis of T-cell receptor γ gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*, 1994, 83, 3271-78.
29. Theodorou I, Bigorgane C, Delfau MH, et al.: VJ rearrangements of the TCR γ locus in peripheral T-cell lymphomas: analysis by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J Pathol*, 1996, 178, 303-10.
30. Dadej K, Gaboury L, Lamare L, et al.: The value of clonality in the diagnosis and follow-up of patients with cutaneous T-cell infiltrates. *Diagn Mol Pathol*, 2001, 10, 78-88.
31. Burg G, Dummer R: Small plaque (digitate) parapsoriasis is an abortive cutaneous T-cell lymphoma and is not mycosis fungoides. *Arch Dermatol*, 1995, 131, 336-8.
32. Wood G: Analysis of clonality in cutaneous T cell lymphoma and associated diseases. *Ann New York Acad Sciences*, 2001, 941, 26-30.
33. Delfau-Larue MH, 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, 2987-92.
34. Dippel E, Assaf C, Hummel M, et al.: Clonal T-cell receptor g-chain gene rearrangement by PCR-based genescan analysis in advanced cutaneous T-cell lymphoma: a critical evaluation. *J Pathol*, 1999, 188, 146-54.

Praca wykonana została dzięki programowi badań własnych nr 501-2-12-03 AM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Podziękowania: Autorzy pragną podziękować Panu doc. Ansgarowi Lukowsky z Kliniki Dermatologii Uniwersyteckiego Szpitala Charite, Uniwersytetu Humboldta w Berlinie, za nieocenioną pomoc w opracowaniu metody analizy rearanżacji genu γ receptora TCR i interpretacji uzyskanych wyników.