

Оценка клональности эпителиотропной Т-клеточной лимфомы собак разной анатомической локализации

М.К. Китинг¹ (ID), В.С. Розенкранц¹, С.М. Келлер², П.Ф. Моор²

¹ Группа ветеринарной дерматологии (Тастин, Калифорния, США).

² Кафедра патологии, микробиологии, иммунологии, Ветеринарная школа, Университет Калифорнии-Дэвис (Дэвис, Калифорния, США).

Для переписки

М. Kelly Keating, Animal Dermatology Group, Inc. 8405 S Eastern Ave, Las Vegas, NV 89123, USA. Email: m.kelly.keating@gmail.com

Предпосылки. Полагают, что эпителиотропная кожная Т-клеточная лимфома собак (эКТКЛ) представляет собой заболевание, гомологичное фунгоидной гранулеме (ФГ) у человека. При ФГ у людей опухолевые клетки фенотипически соответствуют резидентным эффекторным Т-клеткам памяти, популяции, сохраняющейся в тканях длительное время без циркуляции. У собак с эКТКЛ часто появляются очаги в разных местах, что вызывает вопрос, происходит ли новообразование из одной субпопуляции Т-клеток или нет.

Цели. Описать перестройки гена антигенного рецептора лимфоцитов из кожи и крови собак с эКТКЛ, чтобы установить, идентичны ли клоны опухоли.

Животные. 14 собак с эКТКЛ.

Материалы и методы. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование, ПЦР для обнаружения перестройки антигенного рецептора (PARR) Т-клеточного рецептора гамма (TRG) различных биоптатов кожи и крови.

Результаты. Все биоптаты кожи содержали неопластические лимфоциты, содержащие кластер дифференциации (CD)3. У отдельных собак все биоптаты кожи показали идентичные профили клональности TRG, что дает основания предполагать присутствие одного опухолевого клона во всех очагах. В крови соответствующий клон обнаружен у 6 из 14 собак, уникальный клон выявлен у 9 из 14 собак, и у 2 из 14 не было обнаружено клона.

Выводы. Эти данные показывают, что очаги эКТКЛ собак в нескольких локализациях содержат один клон опухоли, неопластические лимфоциты не остаются неподвижно в коже, а могут циркулировать в крови, в коже и крови можно обнаружить различающиеся клоны, и циркулирующие неопластические клетки не обязательно сопровождаются лимфоцитозом.

Ключевые слова: эпителиотропная кожная Т-клеточная лимфома, собаки, клональность опухоли, перестройка гена антигенного рецептора лимфоцитов

Evaluation of clonality from multiple anatomic sites in canine epitheliotropic T cell lymphoma

М. Kelly Keating¹ Wayne S. Rosenkrantz¹, Stefan M. Keller², Peter F. Moore²

¹ Animal Dermatology Group, Inc, Tustin CA, USA.

² Department of Pathology, Microbiology, Immunology, School of Veterinary Medicine, University of California-Davis, Davis, CA, USA.

Background. Canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma (eCTCL) is thought to represent a disease homologue to human mycosis fungoides (MF). In human MF, neoplastic cells are phenotypically consistent with resident effector memory T cells, a population that remains for an extended period within tissue without circulating. Dogs with eCTCL often present with lesions in multiple locations, raising the question of whether the neoplasm is of the same T-cell subpopulation or not.

Objectives: To characterize the antigen receptor gene rearrangements of lymphocytes from skin and blood of dogs with eCTCL to determine if neoplastic clones are identical.

Animals. Fourteen dogs with eCTCL.

Materials and methods. Histological and immunohistochemical examination, and PCR for antigen receptor rearrangement (PARR) for T-cell receptor gamma (TRG) performed on multiple cutaneous biopsy samples and blood.

Results. All skin biopsies contained cluster of differentiation (CD)3-positive neoplastic lymphocytes. Within individual dogs, all skin biopsies revealed identical TRG clonality profiles, suggesting that the same neoplastic clone was present in all sites. In the blood, a matching clone was found in six of 14 dogs, a unique clone was observed in nine of 14 dogs, and no clone was detected in two of 14 dogs.

Conclusions. These findings show that canine eCTCL lesions in multiple locations harbour the same neoplastic clone, neoplastic lymphocytes do not remain fixed to the skin and instead can circulate via blood, differing clones can be identified in skin versus blood, and circulating neoplastic cells can be detected without lymphocytosis.

Keywords: epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma, dogs, tumor clonality, antigen receptor gene rearrangements of lymphocytes.

Информация о финансировании

Американская коллегия ветеринарной дерматологии.

Сокращения: АД — атопический дерматит, ГЭ — гематоксилин и эозин, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ИГХ — иммуногистохимия/чекский, МКПК — моноклеарные клетки периферической крови, МОЗ — молекулярное/минимальное остаточное заболевание, ОКА — общий клинический анализ, ПР — педжетоидный ретикулез, ПЦР — полимеразная цепная реакция, СС — синдром Сезари, ФГ — фунгоидная гранулема, ЩФ — щелочная фосфатаза, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, ЭТКЛ — эпителиотропная кожная Т-клеточная лимфома.

Введение

Эпителиотропная кожная Т-клеточная лимфома — неоднородная группа опухолевых заболеваний кожи у людей и собак.

Фунгоидная гранулема — самый распространенный подтип ЭТКЛ у людей. ФГ проявляется эритематозными пятнами, которые могут прогрессировать до бляшек и опухолей, и гистологически характеризуется эпителиотропными инфильтратами атипичных лимфоцитов с разной степенью инфильтрации дермы [1].

Педжетоидный ретикулез — вариант ФГ с атипичными лимфоцитами, ограниченными эпителием.

Синдром Сезари — редкая форма кожной Т-клеточной лимфомы, характеризующаяся поражением кожи и лимфатических узлов и лейкоэмическим компонентом.

В целом, ФГ и ПР у людей считаются доброкачественными лимфомами, ограниченными кожей, которые обычно благоприятно отвечают на лечение, воздействующее на кожу, и часто характеризуются длительным и незаметным клиническим течением. Клиническое течение СС обычно агрессивное, он устойчив к различным способам лечения [1...4].

У собак описаны подтипы ЭТКЛ, сходные с человеческим ФГ, ПР и СС, с различиями в клиническом течении и иммунофенотипе [5...7]. ЭТКЛ собак обычно проявляется как многоочаговое заболевание с быстрым клиническим прогрессированием. Неопластические клетки при ЭТКЛ собак представляют собой клетки (CD)8⁺ или CD4⁺ CD8⁻, и значительный процент экспрессирует Т-клеточный рецептор (TCR) $\gamma\delta$ [5, 8]. Это коррелирует с ФГ человека, при котором неопластические Т-клетки экспрессируют CD4 и TCR $\gamma\delta$ [4]. Исторически у людей ФГ и СС считали вариантами одного заболевания; однако фенотипические характеристики, молекулярные профили и ответы на терапию дают основания полагать, что это отдельные заболевания, происходящие из разных субпопуляций эффекторных Т-клеток памяти [1, 2, 9].

Среди Т-клеток кожи выделяют циркулирующие и резидентные закрепляющиеся в тканях популяции [9]. Постоянные Т-клетки памяти (T_{RM}) длительно сохраняются в коже, не рециркулируют и экспрессируют кожные адресины CCR4 и кожный лимфоцитарный антиген (CLA), и лишены других рецепторов хоминга [9, 10]. В противоположность этому, центральные Т-клетки памяти циркулируют между кровью и лимфатическими узлами, а также экспрессируют адресины, обуславливающие хоминг в кожу, могут входить и рециркулировать через кожу. Неопластические клетки из ФГ человека обладают фенотипом тканевых клеток памяти, тогда как неопластические клетки пациентов с СС (в крови или коже) обладают фенотипом центральных клеток памяти [2, 10]. В целом клиническое течение у пациентов с указанными характеристиками отражает биологию данных субпопуляций Т-клеток памяти. Однако имеются некоторые несоответствия, например возникает вопрос, почему ЭТКЛ обычно проявляется в нескольких анатомических локализациях, хотя полагают, что клетки T_{RM} остаются закрепленными в коже.

Многие из доступных маркеров для описания характеристик Т-клеток у людей и мышей недоступны для использования в тканях собак. Это ограничивает возможности описания характеристик ЭТКЛ собак. Однако данные о биологии ЭТКЛ возможно получить с помощью ИГХ-методов с использованием маркеров и молекулярных инструментов, доступных для собак, прежде всего ПЦР для определения перестроек рецепторов (PARR), что позволяет определить клональные взаимоотношения клеток в разных анатомических участках.

Цель исследования

Это исследование проведено, чтобы определить, содержат ли неопластические Т-клетки из разных несмежных кожных очагов те же клоны Т-клеток на основании молекулярной клональности, и можно ли определить клон в крови.

Материалы и методы

Животные. Это было проспективное сравнительное исследование. От всех владельцев было получено письменное информированное согласие в соответствии с государственными и федеральными требованиями, и исследование одобрено Комиссией по уходу и использованию животных Западного Университета медицинских наук (IACUC № 1785494-1).

В исследование включили 14 собак, принадлежащих частным лицам, с результатами клинического осмотра и данными анамнеза, указывающими на ЭТКЛ. Всех собак обследовали, после установления диагноза лечили в специализированной клинике, обслуживающей несколько штатов (Калифорния,

Джорджия и Орегон, США) в соответствии с наилучшей клинической практикой применительно к ветеринарии. Собакам сделали биопсию кожи в соответствии со стандартами диагностики ЭКТКЛ. Во время биопсии записывали местоположение клинических очагов и описывали их, а также делали фотографии. Брали 3 или 4 кожных биоптата из несмежных очагов, которые помещали в отдельные маркированные контейнеры с формалином и отправляли для стандартной обработки, изготовления срезов 5 мкм и окрашивания ГЭ. Одновременно с биопсией или примерно в то же время брали 1 мл цельной крови в пробирки с ЭДТА.

Клинические данные оценивали ретроспективно из историй болезни. Данные включали в себя породу, пол, возраст, предыдущий анамнез/сопутствующие заболевания [например, АД], время от возникновения симптомов до биопсии, результаты цитологии (например, инфекция или атипичные лимфоциты или круглые клетки), клинические изменения (покраснение, шелушение, зуд, депигментация, алопеция, лейкотрихия, образование бляшек, изъязвление и корки, образование узелка/объемного образования), распределение очагов [губы, мочка носа, веки, ротовая полость (десна, нёбо, слизистая оболочка щек, язык), граница кожи и слизистой оболочки в анальной области, граница кожи и слизистой оболочки в области гениталий, подушечки лап, лапы/межпальцевые складки, пах, туловище и/или другие участки кожи], анамнез применения лекарств (ко времени биопсии и за последние 6 месяцев), ответ на предыдущую терапию и время выживания при наличии данных. Недавние лабораторные результаты, такие как ОКА крови, биохимический анализ сыворотки и анализ мочи, были сделаны в день биопсии или в пределах 7 дней после нее у всех собак, кроме одной (собака 8), у которой лабораторные анализы были сделаны через 5 недель после биопсии и до лечения.

Иммунохемиллюминесцентный анализ и клональность. Из диагностических лабораторий получали исходные блоки, фиксированные формалином и залитые в парафин, и препараты, окрашенные ГЭ. Все стекла исследовались двумя дипломантами Американской Коллегии ветеринарных патологов и дипломантом Американской коллегии ветеринарной дерматологии. Препараты оценивали на число митозов и стадию (пятна-бляшки, ПР и/или стадия опухоли), как описано ранее [5, 8]. Число митотических фигур подсчитывали вручную в 10 полях зрения при высоком увеличении ($\times 40$), избегая зон рядом с изъязвлениями/эрозиями. Из единичных характерных блоков ткани, фиксированной формалином и залитой в парафин, готовили серию срезов. Применяли специфические антитела к лейкоцитарным антигенам собак, как описано ранее, включая CD3, CD20 и CD79a [5, 11, 12].

Образцы из трех кожных очагов и крови исследовали с помощью ПЦР для обнаружения перестроек гена антигенного рецептора. Из 3...4 срезов (толщиной 25 мкм) ткани, фиксированной формалином и

залитой в парафин, или 20 мкл крови выделяли ДНК с помощью набора DNeasy для тканей (Qiagen; Валенсия, Калифорния, США) по протоколу, рекомендованному производителем. Количественный анализ ДНК проводили на спектрофотометре Ultraspec 2100 Pro (Amersham Pharmacia Biotech, Упсала, Швеция). Для оценки клональной направленности Т-клеток ген Т-клеточного рецептора гамма (TRG) каждого образца подвергали мультиплексному анализу TRG, как описано ранее [13]. Праймерные последовательности TRG перечислены в табл. S1 в подтверждающей информации. Все образцы исследовали в двух повторностях. В качестве клонального, поликлонального и отрицательного контролей, соответственно, использовали Т-клеточную лимфому с ранее установленными характеристиками, нормальный лимфатический узел и образец без ДНК-мишени, соответственно. Для ПЦР использовали термоциклер Veriti (Applied Biosystems; Фостер-сити, Калифорния, США). Продукты ПЦР разделяли по размеру с помощью анализатора eGene HAD-GT12 для капиллярного электрофореза (Qiagen) и представляли результаты в форме гистограммы (электрофореграммы) (зависимость интенсивности флуоресценции от времени/размера ампликона).

Картину электрофореза классифицировали как клональную, поликлональную, клональную на поликлональном фоне, псевдоклональную или отсутствие амплификации. Клональный результат требовал наличия одного или более воспроизводимых резких пиков в обеих повторностях. Клональный на поликлональном фоне определяли как резкий пик (пики) одного размера в обеих повторностях, когда пик был как минимум вдвое выше поликлонального фона. На основании геномной структуры локуса TRG собак установлено, что клональные образцы имели одну или несколько перестроек [13, 14]. Случаи резких пиков, не воспроизводившихся при повторном анализе, интерпретировали как псевдоклональные. Продукты с нормальным распределением (Гауссова кривая) интерпретировали как поликлональные. Образцы без пика или Гауссовой кривой определяли как «отсутствие амплификации». Псевдоклональные, поликлональные или без/со слабой амплификацией образцы расценивались как неклональные, а клональные или клональные на поликлональном фоне — как клональные.

Результаты

Клиническое резюме. Эпителиотропная кожная Т-клеточная лимфома развивалась у собак от среднего до пожилого возраста (медиана 10 лет, диапазон 5–15 лет) различных пород, как чистопородных, так и метисов (табл. 1). Время от появления клинических симптомов до постановки диагноза на основании биопсии составило от 2 месяцев до года. Все собаки имели очаги в разных анатомических локализациях, в частности, на коже, покрытой шерстью (14 из 14)

и часто на границе кожи и слизистой оболочки в одном или нескольких местах (13 из 14) (см. табл. 1). Подушечки лап и кожа межпальцевых промежутков поражались реже, а поражение ротовой полости не описано. Клинические изменения включали в себя: эритродермию, шелушение, депигментацию, алопецию/гипотрихоз, эрозии/язвы и, реже, бляшки, узелки и/или лейкотрихию (рис. 1). Системные симптомы при поступлении были нечастыми (3 из 14). О периферической лимфаденопатии не сообщалось. Часто встречался зуд (11 из 14), который варьировался от легкого до сильного.

Самым распространенным ранее существовавшим заболеванием был АД (4 из 14). Для лечения большинства собак (13 из 14) перед направлением использовали один или более системных препаратов с различным успехом, от отсутствия ответа до легкого или частичного улучшения (см. табл. 1). Ко времени написания 8 собак умерли, одна проходила активное лечение у сертифицированного ветеринарного онколога, а 5 были недоступны для наблюдения.

Лабораторные данные. Недавние результаты ОКА крови были доступны в 14 из 14 случаев, результаты биохимического анализа — в 12 из 14 и результаты анализа мочи — в 3 из 14. У четырех собак лабораторные результаты были в пределах нормы. У двух собак обнаружена лимфопения от легкой до умеренной степени (890 и 480 кл/мкл; норма 1050...5100 кл./мкл) и у одной — легкий лимфоцитоз (5184 кл/мкл) (см. табл. 1); сопутствующие отклонения у этих собак включали в себя: сниженный гематокрит и повышенный азот мочевины; лейкопению; и лейкоцитоз с нейтрофилией и моноцитозом, повышением щелочной фосфатазы (ЩФ) и глобулинов, соответственно. Прочие отклонения присутствовали единично или у малого числа собак и включали снижение или повышение эритроцитарной массы (эритроциты, гематокрит), лейкоцитоз или лейкопению, увеличение содержания азота мочевины и/или креатинина, повышение активности ЩФ и аланинаминотрансферазы, увеличение содержания глобулинов и бактериурию.

Цитологическое, гистологическое и иммуногистологическое исследование. Цитологическое исследование поверхностных мазков-отпечатков кожи показало атипичные крупные лимфоциты или круглые клетки у 5 из 14 собак и бактерии или дрожжи с сопутствующим смешанным воспалением или без у 10 из 14 собак.

При гистологическом исследовании большинство собак были на стадии пятен-бляшек (12 из 14), а у двух собак присутствовали как пятна и бляшки, так и очаги на стадии опухоли (собаки 2 и 14) на основании биопсии очага (табл. 2). Лимфоциты показали исключительную эпителиотропность к эпидермису и придаткам кожи с минимальной или отсутствующей инфильтрацией дермы в одном или более биоптатов у 6 из 14 собак (изменения, подобные пещетоидному ретикулезу) (рис. 2 а, d). В очагах, имевших вид

пятен и бляшек, лимфоциты образовывали пласты различной плотности в поверхностных и средних слоях дермы и присутствовали в форме диффузных инфильтратов, одиночно или мелкими скоплениями (микроагрегаты Потрие) в эпидермисе и придаточных структурах (рис. 2b). Число митозов варьировалось от 0 до 93 митотических фигур (медиана 4) на 10 полей зрения $\times 40$ и было высочайшим в биоптатах на стадии опухоли (см. табл. 2). Вторичные изменения, связанные с изъязвлением/эрозией или инфекцией, такие как гиперкератоз, спонгиоз, гиперплазия эпидермиса, смешанный околосоудистый дерматит, гипергранулез, образование клеточных струев и нейтрофильное воспаление, присутствовали с разной частотой. У собаки 12 наблюдали обильный апоптоз одиночных клеток или сливающиеся участки апоптоза в эпидермисе и придатках с вторичным разрушением фолликулов.

У всех собак (14 из 14) неопластические лимфоциты обладали сильной иммунореактивностью к CD3 (рис. 2c), а у 8 из 14 собак неопластические клетки дополнительно экспрессировали CD20. У двух собак присутствовала аномальная совместная экспрессия CD79a в небольшой субпопуляции внутриэпителиальных лимфоцитов.

Клональность: Т-клеточный рецептор гамма. У одного и того же индивидуума все биоптаты из несмежных участков кожи содержали одинаковые клональные перестройки на основании размеров ампликонов (см. табл. 2). В крови соответствующий клон обнаружен у 6 из 14 собак, уникальный клон обнаружен у 9 из 14, и у 2 из 14 результат был поликлональным (рис. 3). У 3 из 14 собак в крови было обнаружено 2 отдельных клон, один соответствовал найденному в коже и один уникальный. В дополнение к обнаружению клональных перестроек, в 7 образцах крови был обнаружен фоновый поликлональный результат, при этом всего 2 кожных очага показали обнаружимый поликлональный результат (данные не показаны).

Обсуждение

В этом исследовании молекулярное изучение несмежных кожных очагов эТКЛ собак подтвердило, что во всех очагах присутствует тот же клон опухолевых клеток. Кроме того, в крови 43 % собак были обнаружены циркулирующие клетки с клональными перестройками, соответствующими клеткам в коже, несмотря на отсутствие лимфоцитоза у 13 из 14 собак. Уникальные клональные перестройки, не соответствующие таковым в коже, обнаружены у 64 % собак. На основании описанных критериев для людей и собак все собаки, включенные в это исследование, были классифицированы как имеющие ФГ, так как ни у одной из собак не было атипичных лимфоцитов в крови или увеличения лимфатических узлов, характерного для синдрома Сезари [8, 15, 16]. Обнаружение соответствующей

1. Некоторые клинические и патологические особенности эпителиотропной КТКЛ собак Selected Clinical and Pathological Features in Canine epitheliotropic CTCL

№ собаки	Порода	Возраст, лет	Пол	Топография очагов	Тип клинических изменений	Число лимфоцитов, кл/мкл	Системные симптомы	Сопутствующие заболевания	Иммуно-модулирующие препараты†
1	Метис бордер-колли	10	КК	Кожа, веки, губы	Эритродермия, шелушение, депигментация, alopecia/ гипотрихоз	480 (н)	-	АД, сердечный шум, конъюнктивит, гипотрихоз	Локиветмаб 3,1 мг/кг п/к
2	Метис гаванской	12	КК	Кожа, веки, губы	Эритродермия, шелушение, депигментация, узелки	2070	Вялость	Истечения из глаз	-
3	Мальтийская болонка	15	КС	Кожа, веки, мочка носа, подушечки лап, околоанальная и окологенитальная область	Эритродермия, шелушение, эрозии/ язвы, депигментация, alopecia/ гипотрихоз	1958	-	АД, заболевание сердца, коллапс трахеи	Преднизон 1 мг/кг в сутки, локиветмаб 4,1 мг/кг п/к
4	Йоркширский терьер	6	КС	Кожа, веки, губы	Эритродермия, шелушение, alopecia/ гипотрихоз, депигментация	5184 (в)	Вялость	-	-
5	Метис пуделя	13	КК	Кожа, веки, губы, мочка носа, окологенитальная область	Шелушение, эрозии/ язвы, депигментация, бляшки	890 (н)	-	Недержание мочи	-
6	Метис мальтийской болонки	11	КК	Кожа, веки, губы, межпальцевые пространства	Эритродермия, шелушение, депигментация, alopecia/ гипотрихоз	1260	-	Демодекс (разрешился)	Локиветмаб 3,4 мг/кг п/к
7	Метис питбуля	10	КК	Кожа, околоанальная область	Эритродермия, шелушение, alopecia/ гипотрихоз, депигментация	1224	-	Чувствительность желудочно-кишечного тракта, контактная реакция на шампунь	Преднизон 0,4 мг/кг в сутки, дифенгидрамин 1...2 мг/кг в сутки
8	Английский бульдог	10	КС	Кожа, подушечки лап, околоанальная область	Эритродермия, шелушение, эрозии/ язвы, депигментация, alopecia/ гипотрихоз, бляшки, узелки	2277	-	-	-
9	Золотистый ретривер	6	КК	Кожа, губы	Эритродермия, шелушение, бляшки	1494	-	АД и гиперчувствительность к укусам насекомых	Локиветмаб 2,6 мг/кг п/к
10	Метис золотистого ретривера и пуделя	15	КС	Кожа, веки	Эритродермия, шелушение, эрозии/ язвы, депигментация	2570	Лихорадка, рвота, гипорексия	Сердечный шум	-
11	Метис уиппета	13	КС	Кожа	Эритродермия, шелушение, депигментация, лейкотрихоз, alopecia/ гипотрихоз	912	-	-	-
12	Золотистый ретривер	7	КК	Кожа, губы, подушечки лап, околоанальная область	Эритродермия, шелушение, эрозии/ язвы, депигментация, лейкотрихоз, alopecia/ гипотрихоз	1344	-	Рецидивирующий наружный отит	Суспензия триамцинолона ацетонида 0,18 мг/кг п/к
13	Английский бульдог	5	КК	Кожа, околоанальная область	Бляшки, эрозии/ язвы	1296	-	АД	-
14	Метис чихуахуа	6	КК	Кожа, веки, губы, мочка носа	Шелушение, эрозии/ язвы, депигментация, alopecia/ гипотрихоз, бляшки, узелки	1260	-	-	-

Примечания: КС, кастрированная самка; КК, кастрированный кобель; н, лимфопения; в, лимфоцитоз; п/к, подкожно.
†на момент биопсии.



Рис. 1. Некоторые клинические изменения у собак с эпителиотропной кожной Т-клеточной лимфомой. Сильная обширная региональная алопеция и покраснение на морде (а) и множественная пятнистая лейкотрихия на туловище собаки 12 (b). Четко отграниченные области депигментации и покраснения мочки носа у век у собаки 3 (с). Собака 14 поступила с более генерализованной и поздней стадией болезни, которая проявлялась покраснением, шелушением, депигментацией, алопецией, лейкотрихией, изъязвлением и образованием корок (d)

Select clinical lesions in dogs with epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma. Severe, regionally extensive alopecia and erythema of the muzzle (a) and multifocal patchy leukotrichia throughout the trunk in Dog 12 (b). Well-demarcated regions of depigmentation and erythema of the nasal planum and eyelids in Dog 3 (c). Dog 14 presented with more generalized and advanced disease exhibiting erythema, scaling, depigmentation, alopecia, leukotrichia, ulceration and crusting (d)

2. Иммуногистохимия и клональность Immunohistochemistry and Clonality

№ соб.	Стадия	Число митозов	Иммуногистохимия			Кожа 3 участка	Клональность TRG		
			CD3	CD79a	CD20		Кровь	Тот же клон	Уникальный клон
1	ПБ, ПР	0	+	+	-	Клональность	X	-	-
2	ОС, ПБ	93	+	-	+	Клональность	X	X	-
3	ПБ	4	+	+	+	Клональность	X	-	-
4	ПБ, ПР	5	+	-	-	Клональность	X	X	-
5	ПБ	3	+	-	+	Клональность	X	-	-
6	ПБ	2	+	-	+	Клональность	X	X	-
7	ПБ, ПР	2	+	-	+	Клональность	-	X	-
8	ПБ	1	+	-	+	Клональность	-	X	-
9	ПБ	4	+	-	-	Клональность	-	X	-
10	ПБ	6	+	-	-	Клональность	-	X	-
11	ПБ, ПР	1	+	-	-	Клональность	-	X	--
12	ПБ	2	+	-	+	Клональность	-	X	-
13	ПБ, ПР	13	+	-	+	Клональность	-	-	X
14	ПБ, ПР, ОС	14	+	-	-	Клональность	-	-	X

Примечания: ПБ – пятна и бляшки; ПР – изменения, подобные пелетоидному ретикулезу; ОС – опухолевая стадия; НА – нет амплификации¹ Исследован один участок кожи.

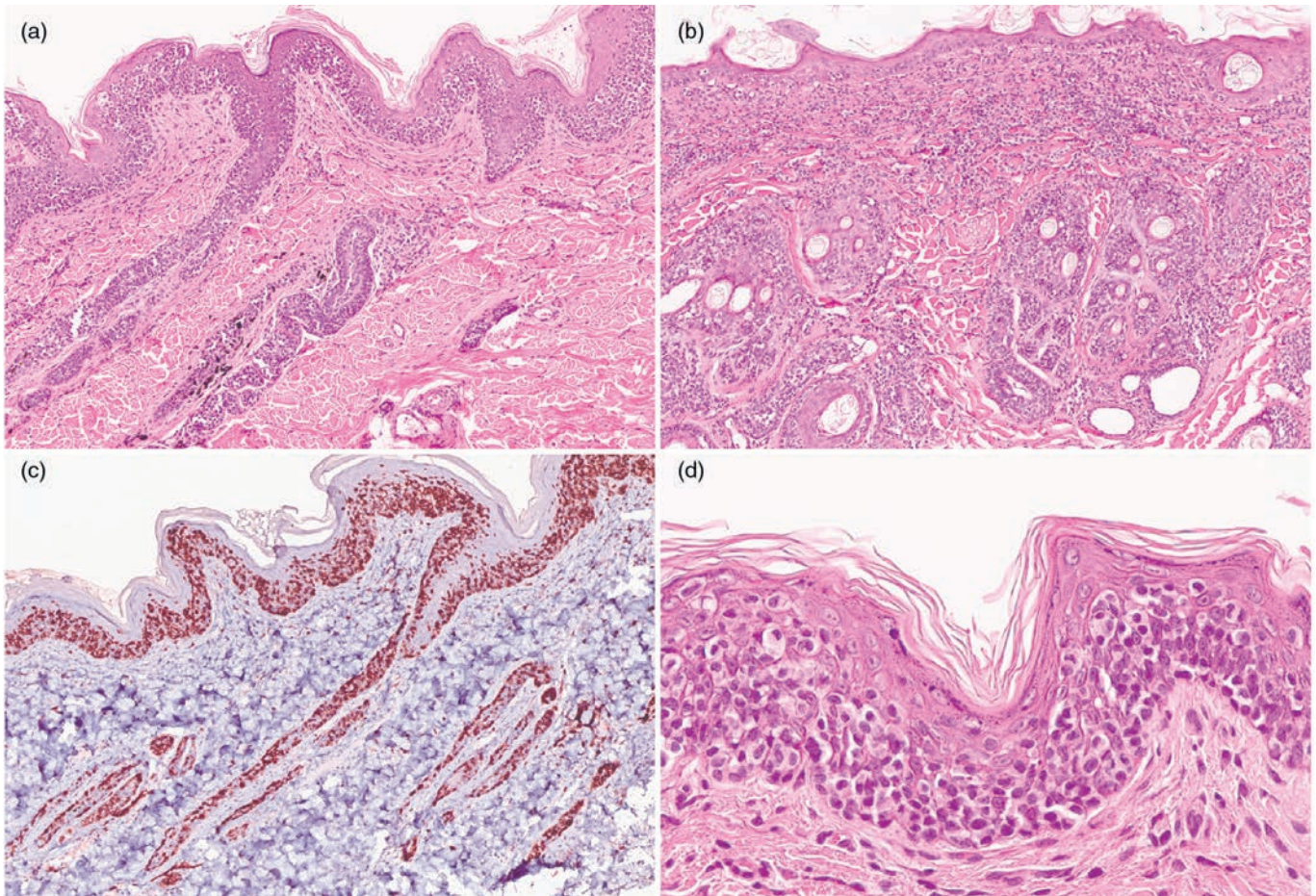


Рис. 2. Микрофотографии и результаты иммуногистохимического исследования у собак с эпителиотропной кожной Т-клеточной лимфомой. Гистологическое сравнение формы, подобной пажетоидному ретикулезу (а), и формы с пятнами и бляшками (б). При пажетоидном ретикулезу неопластические Т-клетки почти полностью ограничены эпидермисом и придаточными структурами, что видно при окрашивании ГЭ (а) и иммуногистохимическом окрашивании на CD3 (с). При форме с пятнами и бляшками инфильтрат присутствует как в эпидермисе, так и в дерме (б). Неопластические клетки обладают сильной эпителиотропностью (д). (а, б, d) окрашивание ГЭ и (с) иммуногистохимическое окрашивание на CD3. (а)–(с) × 10, (d) × 40

Photomicrographs and immunohistochemistry from dogs with epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma. Histologic comparison of Pagetoid reticulosis-like (a) and patch-plaque (b) forms. In Pagetoid reticulosis the neoplastic T cells are almost entirely confined to the epidermis and adnexa as seen with HE stain (a) and immunohistochemistry for CD3 (c). In the patch-plaque forms the infiltrate is present both within the epidermis and dermis (b). Neoplastic cells show strong epitheliotropism (d). (a, b, d) HE and (c) CD3 immunohistochemistry. (a)–(c) × 10, (d) × 40

клональной популяции Т-клеток в крови собак с ФГ, у которых отсутствовали атипичные циркулирующие лимфоциты при стандартном общем анализе крови или значительный лимфоцитоз, дает информацию о направлении перемещений лимфоцитов, хоминге Т-лимфоцитов при ЭКТКЛ собак в коже, и подчеркивает чувствительность молекулярного анализа.

У людей кожные T_{RM} являются лимфоцитами, играющими роль в ФГ и, как полагают, состоят из нерезициркулирующих клеток памяти, длительно сохраняющихся в тканях эпителиального барьера и лишенных адрессинов, обеспечивающих направленную миграцию в лимфатические узлы, кровь или другие ткани [2, 9, 10, 17]. Недавняя работа показала, что сильная компартиментализация CD4 Т-лимфоцитов в тканях человека может быть более изменчивой, чем полагалось ранее, и были обнаружены постоянно присутствующие в ткани клетки, способные дезактивировать экспрессируемые рецепторы при нахождении в коже и выходить в ткани

[18]. Наше обнаружение соответствующих клонов в разных местах и в крови дает основания полагать, что неопластические лимфоциты в ЭКТКЛ собак могут покидать кожу, мигрировать через кровь и снова проникать в кожу в другом месте. Необходима дальнейшая работа, чтобы определить, действительно ли эти клетки являются T_{RM} способными регулировать экспрессию поверхностных маркеров, модулирующих миграцию в коже.

Молекулярная идентификация циркулирующих опухолевых клеток в количестве ниже предела обнаружения стандартных диагностических методов, таких как ОКА крови и проточная цитометрия, описана ранее при лимфоме собак [19...23]. У людей с ФГ присутствие клона неопластических Т-клеток указывает на неблагоприятный прогноз независимо от клинической стадии и возраста [24, 25]. У собак обнаружение клона периферических неопластических лимфоцитов наиболее обширно изучалось в контексте МОЗ после химиотерапии многоцентро-

вой лимфомы [19...23, 26]. Молекулярное остаточное заболевание означает сохранение опухолевых клеток, которые можно обнаружить молекулярными методами, такими как PARR, путем выявления клеточной или свободной циркулирующей опухолевой ДНК («жидкая биопсия»), но которые не обнаруживаются традиционными диагностическими методами, такими как визуальная диагностика, общий анализ крови и гистологическое исследование [20, 27, 28]. Эти исследования дали сведения о прогнозе, прогрессировании и ответе на лечение. МОЗ у собак к концу химиотерапии отрицательно коррелирует с длительностью ремиссии от конца лечения до рецидива, и повышение МОЗ в периферической крови предшествует клиническому рецидиву [23, 27]. Эти исследования сосредоточены главным образом на многоцентричной В-клеточной лимфоме высокой степени злокачественности, и все же идентификация циркулирующих опухолевых клеток в субпопуляции

собак с ЭТКЛ открывает дверь будущим исследованиям применимости МОЗ для прогнозирования течения болезни и ответа на лечение.

В этом исследовании у 9 из 14 собак обнаружено размножение уникального клона в крови, отличающегося от клонов в коже, что может отражать направленный иммунный ответ на рак. Хотя клональное размножение обычно характерно для опухолевого процесса, имеются обстоятельства, при которых описано доброкачественное клональное размножение. После антигенной стимуляции множество лимфоцитов претерпевает клональное размножение, что приводит к поликлональной популяции лимфоцитов в целом [29, 30]. Редко некоторые клоны пролиферируют непропорционально и выглядят как отчетливое клональное размножение. Это описано у людей в ответ на инфекцию, при лекарственно-индуцированных кожных реакциях, новообразованиях или аутоиммунных нарушениях

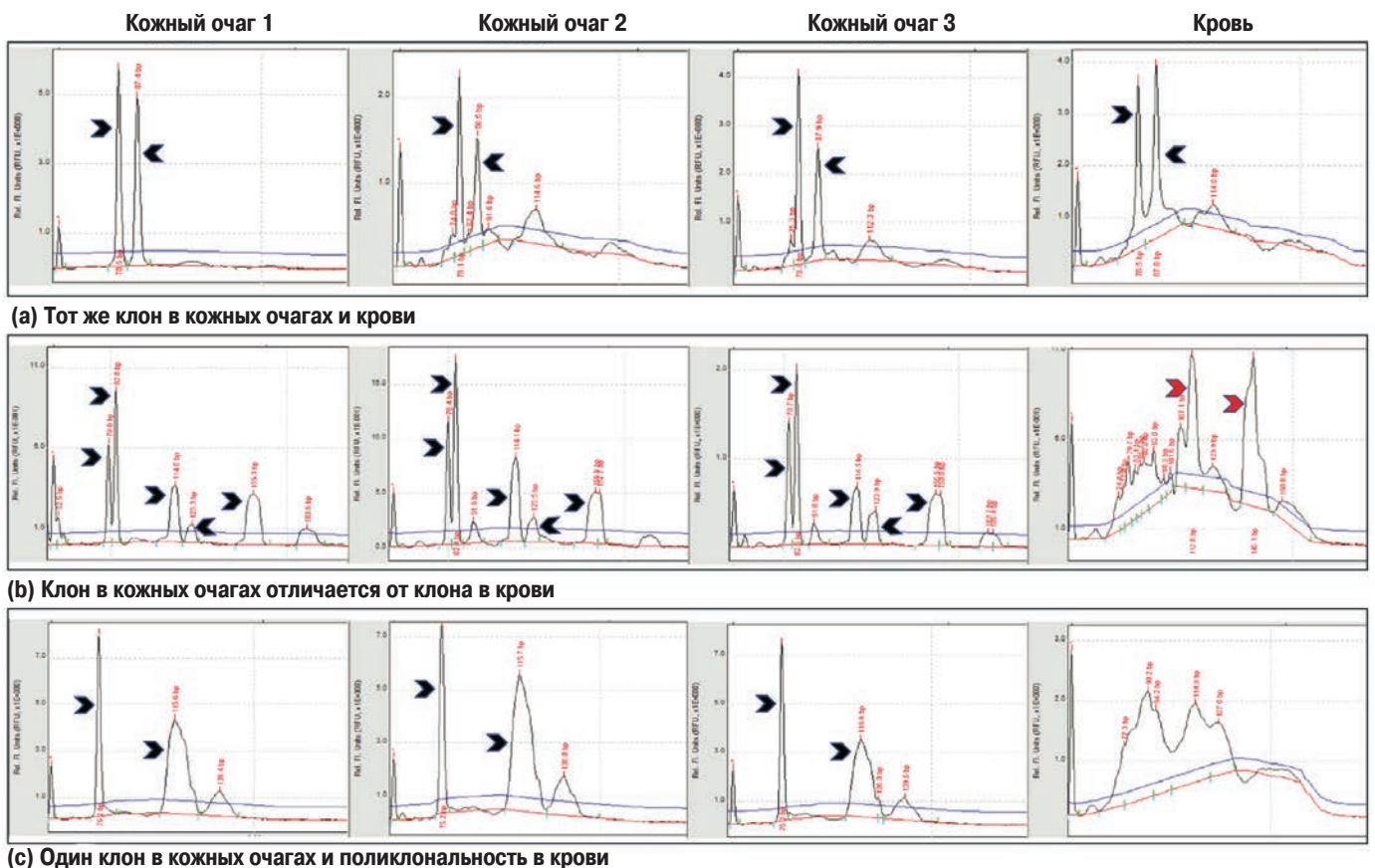


Рис. 3. Характерные электрофореграммы клональности Т-клеточного рецептора гамма (TRG) из трех кожных очагов и крови (все образцы исследовали в двух повторностях). (а) Собака 1: резкий пик, соответствующий молекулам одного размера в парах оснований и указывающий на клональное размножение, обнаружен во всех кожных очагах и крови (черные короткие стрелки). В коже и крови также наблюдался поликлональный фон. (б) Собака 10: клональное размножение с резким пиком продукта одного размера в парах оснований во всех кожных очагах (черные короткие стрелки) и другая картина клонального размножения с поликлональным фоном в крови (красные короткие стрелки), а в крови присутствует поликлональный фон. Примечание: несколько коротких стрелок в одном образце означает несколько перестроек в одном клоне лимфоцитов [14]

Representative T-cell receptor gamma (TRG) clonality electropherographs from three skin sites and blood (all samples run in duplicate). (a) Dog 1: Sharp-peaked clonal expansions of the same base pair sizes observed within all skin sites and blood (black arrowheads). Polyclonal background also observed within the skin and blood. (b) Dog 10: Sharp-peaked clonal expansions of the same base pair sizes within all skin sites (black arrowheads), and a different clonal expansion present emerging from a polyclonal background in the blood (red arrowheads). (c) Dog 13: The same clonal peak noted within all skin sites (black arrowheads), and a polyclonal background present within the blood. Note: multiple arrow heads within a single sample represent multiple rearrangements within the same lymphocyte clone [14]

[30...34]. У собак доброкачественное клональное размножение обнаруживается реже и описано в связи с инфекционными заболеваниями, например вызванными *Ehrlichia* spp. и *Leishmania* spp. [35, 36]. Механизмы, способствующие доброкачественному клональному размножению, пока недостаточно изучены и включают в себя стойкую иммуногенную реакцию на конкретный антиген, нарушение регуляции Т-лимфоцитов, нарушение функции или анергия Т-супрессоров, лекарственно-индуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов и генетическую предрасположенность [30, 33, 36]. Исследований, посвященных определению, значимости и патогенезу доброкачественных клонов в периферической крови собак, особенно в контексте рака, мало. Исследование по сравнению последовательностей гена рецептора лимфоцитарного антигена из первичных очагов и МКПК собак с лимфомой показало сходные результаты, особенно у собак с лимфомой желудочно-кишечного тракта, у которых были обнаружены разные клоны в первичных очагах и МКПК [21]. У людей описаны циркулирующие Т-лимфоциты, специфичные для опухолевых антигенов, в связи с определенными видами рака, такими как метастатическая меланома, что поддерживает предположение, что иммунная система может распознавать и создавать специфический ответ на антигены раковых клеток [34, 37]. Необходима дополнительная работа для описания явления неопухолевых клональных популяций лимфоцитов у собак, в частности, потенциального влияния на противоопухолевый ответ, прогноз и прогрессирование болезни.

Ограничения этого исследования включают в себя малый размер выборки, отсутствие данных длительного последующего наблюдения, ограниченную иммунофенотипическую оценку (например, проточная цитометрия и ИГХ-оценка на альфа-бета в сравнении с гамма-дельта TCR), а также ограничения, присущие технике PARR, такие как ложноотрицательные результаты. Ложноотрицательные результаты возможны при высоком поликлональном фоне в результате амплификации неопухолевой лимфоцитарной ДНК. В целом, поликлональный фон не был частым явлением в этом исследовании, и при наличии чаще наблюдался в крови. Это ожидаемо, так как кровь является основным путем миграции лимфоцитов и, следовательно, всегда содержит неопухолевые лимфоциты с разным репертуаром TCR. Тот факт, что поликлональный фон не был обнаружен во всех образцах крови, может быть обусловлен присущей ПЦР систематической погрешности в сторону обнаружения матриц, которые наиболее обильны на ранних циклах ПЦР.

В заключение, это исследование показало, что неопластические Т-лимфоциты при эКТКЛ собак со сходными перестройками TCR присутствуют в крови и несмежных кожных очагах, давая основания полагать, что данные клетки перемещаются с кровью и не остаются прикрепленными в коже. В периферической крови можно обнаружить тот же

клон неопластических Т-лимфоцитов и/или уникальный, возможно, реактивный клон Т-лимфоцитов, что подчеркивает важность коллективной интерпретации результатов гистологического и ИГХ анализа и/или клональности как в первичных очагах, так и в периферической крови. Необходима дальнейшая работа, чтобы установить прогностическую значимость циркулирующих опухолевых или реактивных клонов Т-лимфоцитов при эКТКЛ.

Вклад авторов

M. Kelly Keating: создание концепции; обработка данных; формальный анализ; получение финансирования; исследование; методология; руководство проектом; визуализация; написание оригинальной черновой рукописи. **Wayne Rosenkrantz:** создание концепции; формальный анализ; получение финансирования; исследование; методология; ресурсы; надзор; написание — обзор и редактирование. **Stefan M Keller:** создание концепции; формальный анализ; исследование; методология; проверка; визуализация; написание — обзор и редактирование. **Peter Francis Moore:** создание концепции; обработка данных; формальный анализ; получение финансирования; исследование; методология; управление проектом; ресурсы; надзор; проверка; визуализация; написание — обзор и редактирование.

Благодарности

Мы бы хотели поблагодарить: Willie A. Bidot за опыт и вклад в планирование исследования и подготовку рукописи; Kristy Harmon и Derek Fang за технический опыт и помощь; и Ross Parnell-за помощь с визуализацией.

Данные о финансировании

Резидентский грант Американской коллегии ветеринарной дерматологии и самофинансирование.

Конфликт интересов

Ни один из авторов или лиц, внесших вклад в исследование, не заявляет о конфликте интересов.

References

1. Kempf W., Zimmermann A.K., Mitteldorf C., Cutaneous lymphomas – An update 2019., *Hematol Oncol.*, 2019, No. 37(S1), pp. 43-47.
2. Campbell J.J., Clark R.A., Watanabe R., Kupper T.S., Sézary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: A biologic rationale for their distinct clinical behaviors, *Blood*, 2010, No. 116(5), pp. 767-771.
3. Willemze R., Meijer C.J., Classification of Cutaneous T-Cell Lymphoma: From Alibert to WHO-EORTC. *J Cutan Pathol.*, 2006, No. 33(S1), pp. 18-26.

4. Willemze R., Cerroni L., Kempf W., Berti E., Facchetti F., Swerdlow S.H. et al., The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas, *Blood* 2019, No. 133(16), pp. 1703-1714.
5. Moore P.F., Affolter V.K., Graham P.S., Hirt B., Canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma: An investigation of T-cell receptor immunophenotype, lesion topography and molecular clonality, *Vet Dermatol.*, 2009, No. 20(5-6), pp. 569-76.
6. Chan C.M., Frimberger A.E., Moore A.S., Clinical outcome and prognosis of dogs with histopathological features consistent with epitheliotropic lymphoma: a retrospective study of 148 cases (2003-2015), *Vet Dermatol.*, 2018, No. 29(2), pp. 154-e59.
7. Ewing T.S., Pieper J.B., Stern A.W., Prevalence of CD20 + cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma in dogs: a retrospective analysis of 24 cases (2011-2018) in the USA, *Vet Dermatol.*, 2019, No. 30(1), pp. 51-e14.
8. Moore P.F., Olivry T., Naydan D., Animal model canine cutaneous epitheliotropic lymphoma (mycosis fungoides) is a proliferative disorder of CD8+ T Cells, *Am J Pathol.*, 1994, No. 144(2), pp. 421-429.
9. Watanabe R., Gehad A., Yang C., Scott L.S., Teague J.E., Schlapbach C. et al., Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells, *Sci. Transl Med.*, 2015, No. 7(279), pp. 279ra39.
10. Clark R.A., Resident memory T cells in human health and disease, *Sci Transl Med.*, 2015, No. 7(269), pp. 269rv1.
11. Jubala C.M., Wojcieszyn J.W., Valli V.E.O., Getzy D.M., Fosmire S.P., Coffey D. et al. CD20 expression in normal canine B cells and in canine non-Hodgkin lymphoma, *Vet Pathol.*, 2005, No. 42(4), pp. 468-76.
12. Valli V.E., Vernau W., de Lorimier L.P., Graham P.S., Moore P.F., Canine indolent nodular lymphoma, *Vet Pathol.*, 2006, No. 43, pp. 241-56.
13. Keller S.M., Moore P.F., A novel clonality assay for the assessment of canine T cell proliferations, *Vet Immunol Immunopathol.*, 2012, No. 145(1-2), pp. 410-9.
14. Keller S.M., Moore P.F., Rearrangement patterns of the canine TCR γ locus in a distinct group of T cell lymphomas, *Vet Immunol Immunopathol.*, 2012, No. 145(1-2), pp. 350-61.
15. Rütgen BC, Flickinger I, Wolfesberger B, Litschauer B, Fuchs-Baumgartinger A, Hammer SE et al. Cutaneous T-cell lymphoma – Sézary syndrome in a Boxer. *Vet Clin Pathol* 2016;45(1):172-8.
16. Fontaine J., Heimann M., Day M.J., Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review of 30 cases, *Vet Dermatol*, 2010, No. 21(3), pp. 267-75.
17. Clark R.A., Human skin in the game, *Sci Transl Med.*, 2013, No. 5(204), pp. 204ps13.
18. Klicznik M.M., Morawski P.A., Höllbacher B., Varkhande S.R., Motley S.J., Kuri-Cervantes L., Goodwin E. et al., Human CD4 + CD103 + cutaneous resident memory T cells are found in the circulation of healthy individuals, *Sci Immunol.*, 2019, No. 4(37), eaav8995.
19. Keller R.L., Avery A.C., Burnett R.C., Walton J.A., Olver C.S., Detection of neoplastic lymphocytes in peripheral blood of dogs with lymphoma by polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement, *Vet Clin Pathol.*, 2004, No. 33(3), pp. 145-9.
20. Yamazaki J., Baba K., Goto-Koshino Y., Setoguchi-Mukai A., Fujino Y., Ohno K. et al., Quantitative assessment of minimal residual disease (MRD) in canine lymphoma by using realtime polymerase chain reaction, *Vet Immunol Immunopathol.*, 2008, No. 126(3-4), pp. 321-31.
21. Hiyoshi-Kanemoto S., Goto-Koshino Y., Fukushima K., Takahashi M., Kanemoto H., Uchida K. et al., Detection of circulating tumor cells using GeneScan analysis for antigen receptor gene rearrangements in canine lymphoma patients, *J Vet Med Sci.*, 2016, No. 78(5), pp. 877-81.
22. Lana S.E., Jackson T.L., Burnett R.C., Morley P.S., Avery A.C., Utility of polymerase chain reaction for analysis of antigen receptor rearrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma, *J Vet Intern Med*, 2006, No. 20(2), pp. 329-34.
23. Sato M., Yamazaki J., Goto-Koshino Y., Takahashi M., Fujino Y., Ohno K. et al., Increase in minimal residual disease in peripheral blood before clinical relapse in dogs with lymphoma that achieved complete remission after chemotherapy, *J Vet Intern Med*, 2011, No. 25(2), pp. 292-6.
24. Scarisbrick J.J., Whittaker S., Evans A.V., Fraser-Andrews E.A., Child F.J., Dean A. et al., Prognostic significance of tumor burden in the blood of patients with erythrodermic primary cutaneous T-cell lymphoma, *Blood*, 2001, No. 97(3), pp. 624-30.
25. Fraser-Andrews E.A., Woolford A.J., Russell-Jones R., Seed P.T., Whittaker S.J., Detection of a peripheral blood T cell clone is an independent prognostic marker in mycosis fungoides, *J Invest Dermatol.*, 2000, No. 114(1), pp. 117-21.
26. Sato M., Yamazaki J., Goto-Koshino Y., Takahashi M., Fujino Y., Ohno K. et al., The prognostic significance of minimal residual disease in the early phases of chemotherapy in dogs with highgrade B-cell lymphoma, *Vet J.*, 2013, No. 195(3), pp. 319-24.
27. Yamazaki J., Takahashi M., Setoguchi A., Fujino Y., Ohno K., Tsujimoto H., Monitoring of minimal residual disease (MRD) after multidrug chemotherapy and its correlation to outcome in dogs with lymphoma: a proof-of-concept pilot study, *J Vet Intern Med.*, 2010, No. 24(4), pp. 897-903.
28. Cescon D.W., Bratman S.V., Chan S.M., Siu L.L., Circulating tumor DNA and liquid biopsy in oncology, *Nat Cancer*, 2020, No. 1(3), pp. 276-90.
29. Thilakarathne D.N., Mayer M.N., Macdonald V.S., Jackson M.L., Trask B.R., Kidney B.A., Article clonality and phenotyping of canine lymphomas before chemotherapy and during remission using polymerase chain reaction (PCR) on lymph node cytologic smears and peripheral blood, *Can Vet J.*, 2010, No. 51(1), pp. 79-84.
30. Keller S.M., Vernau W., Moore P.F., Clonality testing in veterinary medicine: a review with diagnostic guidelines, *Vet Pathol.*, 2016, No. 53(4), pp. 711-25.
31. Brady S.P., Magro C.M., Diaz-Cano S.J., Wolfe H.J., Analysis of clonality of atypical cutaneous lymphoid infiltrates associated with drug therapy by PCR/DGGE, *Hum Pathol.*, 1999, No. 30(2), pp. 130-36.
32. Magro C.M., Crowson A.N., Kovatich A.J., Burns F., Druginduced reversible lymphoid dyscrasia: a clonal lymphomatoid dermatitis of memory and activated T cells, *Hum Pathol.*, 2003, No. 34(2), pp. 119-29.
33. Magro C.M., Daniels B.H., Crowson A.N., Drug induced pseudolymphoma. *Semin Diagn Pathol.*, 2018, No. 35(4), pp. 247-59.
34. Lee P.L., Yee C., Savage P.A., Fong L., Brockstedt D., Weber J.S. et al., Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients, *Nat Med.*, 1999, No. 5(6), pp. 677-85.
35. Qurollo B.A., Davenport A.C., Sherbert B.M., Grindem C.B., Birkenheuer A.J., Breitschwerdt E.B., Infection with *Panola Mountain Ehrlichia sp.* in a dog with atypical lymphocytes and clonal T-cell expansion, *J Vet Intern Med.*, 2013, No. 27(5), pp. 1251-5.
36. Melendez-Lazo A., Jasensky A.K., Jolly-Frahija I.T., Kehl A., Müller E., Mesa-Sánchez I., Clonality testing in the lymph nodes from dogs with lymphadenomegaly due to *Leishmania infantum* infection, *PLoS One*, 2019, No. 14(12), pp. e0226336.
37. Boon T., Coulie P.G., Van den Eynde B.J., van der Bruggen P., Human T cell responses against melanoma, *Ann Rev Immunol.*, 2006, No. 24, pp. 175-208.

Подтверждающая информация

Дополнительную подтверждающую информацию можно найти в конце онлайн-версии этой статьи.

Как цитировать эту статью: Keating MK, Rosenkrantz WS, Keller SM, Moore PF. Evaluation of clonality from multiple anatomic sites in canine epitheliotropic T cell lymphoma. *Vet Dermatol.* 2022;33:559-567. <https://doi.org/10.1111/vde.13106>