

Роль лангеринпозитивных и CD83+ клеток в патогенезе грибовидного микоза

А.С. Жуков, И.Э. Белоусова, В.Р. Хайрутдинов, А.В. Самцов

ФГКВООУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ
194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

Дендритные клетки выполняют функцию регулирования баланса между иммунным ответом и иммунной толерантностью, их роль в патогенезе лимфом кожи до конца не изучена.

Цель. Изучение численности популяций CD83+ и лангерин+ клеток в коже больных грибовидным микозом и мелкобляшечным параспориозом.

Материал и методы. Определяли содержание лангерин+ и CD83+ клеток методом иммуногистохимического исследования биоптатов кожи у больных грибовидным микозом (17 пациентов) и мелкобляшечным параспориозом (6 пациентов). Группу контроля составили 16 здоровых лиц.

Результаты. Выявлено преобладание лангерин+ и CD83+ дендритных клеток у больных грибовидным микозом по сравнению с больными мелкобляшечным параспориозом и здоровыми лицами. Определено увеличение доли незрелых дендритных клеток у больных параспориозом и грибовидным микозом.

Заключение. Статистически значимое различие количества лангерин+ и CD83+ дендритных клеток, а также величина отношения незрелых к зрелым дендритным клеткам при грибовидном микозе по сравнению с мелкобляшечным параспориозом может послужить дополнительным диагностическим критерием в дифференциальной диагностике этих заболеваний.

Ключевые слова: **грибовидный микоз, дендритные клетки, лангерин, CD83, Т-клеточная лимфома кожи.**

Контактная информация: md.zhukov@gmail.com. Вестник дерматологии и венерологии 2013; (4): 38—43.

Role of langerin-positive and CD83+ cells in the pathogenesis of mycosis fungoides

A.S. Zhukov, I.E. Belousova, V.R. Khairutdinov, A.V. Samtsov

Military Medical Academy named after S.M. Kirov Ministry of Defense of the Russian Federation
Akademika Lebedeva str 6 St. Petersburg, 194044, Russia

Dendritic cells regulate the balance between the immune response and immunotolerance; their role in the pathogenesis of skin lymphomas is underexplored.

Goal. To study the number of populations of CD83+ and langerin positive cells in the skin of patients suffering from mycosis fungoides and small plaque parapsoriasis.

Materials and methods. The authors determined the content of langerin-positive and CD83+ cells by means of immunohistochemistry of skin biopsy samples taken from patients suffering from mycosis fungoides (17 subjects) and small plaque parapsoriasis (6 subjects). The control group comprised 16 healthy people.

Results. The study revealed that langerin positive and CD83+ dendritic cells prevailed in patients suffering from mycosis fungoides as compared to patients with small plaque parapsoriasis and healthy subjects. The share of immature dendritic cells grows in patients with parapsoriasis and mycosis fungoides.

Conclusion. The statistically reliable difference between the amount of langerin positive and CD83+ dendritic cells as well as immature to mature dendritic cells ratio in case of mycosis fungoides vs. small plaque parapsoriasis can serve as an additional diagnostics criterion for these diseases.

Key words: **mycosis fungoides, dendritic cells, langerin, CD83, T-cell lymphoma.**

Corresponding author: md.zhukov@gmail.com. Vestnik Dermatologii i Venerologii 2013; 4: 38—43.

■ Иммунная система человека является основным защитным механизмом, направленным на поддержание целостности организма. Устойчивость этой защиты достигается посредством двух противоположных процессов. С одной стороны, при попадании чужеродных организмов или малигнизации своих клеток развивается иммунный ответ, с другой — постоянно поддерживается иммунная толерантность, при помощи которой не происходит разрушения собственных тканей.

Считается, что дендритные клетки (ДК) выполняют функцию регулирования баланса между иммунным ответом и иммунной толерантностью. Находясь в коже, ДК поглощают чужеродные антигены (АГ), созревают и мигрируют через афферентные лимфатические пути в дренирующие лимфатические узлы. В лимфатических узлах происходит презентация АГ-лимфоцитам при участии классических (I и II классов комплекса гистосовместимости) и неклассических (CD1-семейство) антигенпрезентирующих молекул, следствием чего является пролиферация и дифференцировка антигенспецифических Т- и В-лимфоцитов.

ДК происходят из единой стволовой клетки крови, которая развивается по двум путям: миелоидному и лимфоидному. После циркуляции в крови ДК оседают в периферических органах, в том числе в коже. Миелоидный росток дает начало клеткам Лангерганса и дермальным ДК, а лимфоидный — плазмоцитойдным ДК. У каждого вида клеток есть характерный набор поверхностных маркеров, определяющий их фенотип. Так, клетки Лангерганса характеризуются экспрессией CD207 (лангерин, который относится к лектинам С-типа) и CD205 антигенов, дермальные ДК имеют CD207–CD205+CD209+ фенотип, плазмоцитойдные ДК — CD207–CD303+ (табл. 1).

Все подтипы ДК в коже находятся на разных стадиях созревания. Для определения степени зрелости используют такие маркеры, как CD83 и CD208 (DC-LAMP). Молекула CD208 является лизосомассоциированным мембранным гликопротеином, экспрессирующимся при дифференцировке ДК в процессе ее созревания [2]. CD83 маркирует полностью зре-

лые ДК. Существуют две изоформы молекулы CD83: одна — мембранно-связанная, обладающая иммуностимулирующими свойствами, другая — растворимая, оказывает противоположное действие, вызывая ингибирование иммунного ответа. Обнаружены изменения экспрессии этих изоформ при различных заболеваниях. Повышение содержания растворимой изоформы находят при хроническом лимфолейкозе, лимфоме из мантийных клеток, ревматоидном артрите. Некоторые вирусы, например цитомегаловирус или вирус простого герпеса, могут блокировать рецепторы CD83 на поверхности ДК, что приводит к нарушению созревания этих клеток и, как следствие, подавлению иммунного ответа организма [3].

Обнаружены ассоциации между степенью зрелости, количеством субпопуляций ДК и прогнозом ряда онкологических заболеваний. Так, установлено, что увеличение плотности зрелых клеток в очаге поражения с маркером DC-LAMP+ у больных меланомой коррелирует с отсутствием метастазов в лимфатических узлах [4]. Повышенное содержание незрелых дермальных ДК, экспрессирующих DC-SIGN/209, ассоциировано с неблагоприятным прогнозом при остром лимфобластном лейкозе. В ткани карциномы из клеток почечного эпителия возрастает количество ДК [5]. При аденокарциноме молочной железы наблюдается инфильтрация незрелыми ДК самой опухоли и скопление зрелых ДК по ее периферии [6]. Перечисленные факты свидетельствуют о том, что изучение подтипов ДК и степени их зрелости значимо для ряда онкологических заболеваний.

Описано влияние ДК на микроокружение при лимфопролиферативных заболеваниях кожи. А. Chu и соавт. установили повышенное содержание CD1a+ клеток в дерме больных грибовидным микозом (ГМ), что позже подтвердилось данными других исследователей [7–9]. А. Meissner и соавт. обнаружили корреляционную связь между количеством клеток Лангерганса и выживаемостью пациентов с ГМ, выявив более благоприятный прогноз при увеличении количества CD1a+ клеток в эпидермисе [10]. Исследуя содержание клеток Лангерганса в Т- и В-клеточных лимфомах

Таблица 1 Маркеры ДК кожи [1]

	Локализация	С-тип лектина	Маркер
Клетки Лангерганса	Эпидермис/дерма	Лангерин/CD207	CD11c CD1a E-кадгерин
Дермальные интерстициальные ДК	Дерма	CD206 CD209/DC-SIGN	CD1c, CD1a/CD14c, CD11b, CD36, фактор XIIIa
Плазмоцитойдные ДК	Пораженная кожа	CD303/BDCA2	CD123 ILT7

кожи, M. Der-Petrossian и соавт. пришли к выводу, что эпидермотропизм опухолевых лимфоцитов при ГМ коррелирует с количеством клеток Лангерганса в инфильтрате [11]. Большинство исследователей не нашли ассоциаций между количеством лангерин+ или CD1a+ клеток и возрастом, полом больного и ответом на терапию [8, 12, 13], но в то же время обнаружена зависимость между количеством дермальных ДК и стадией заболевания [8].

Было исследовано не только количество, но и степень зрелости ДК. Проведя эксперимент *in vitro*, С. Berger и соавт. выявили, что опухолевые лимфоциты, извлеченные из очагов Т-клеточной лимфомы кожи, могут расти в культуре до 3 мес. только в присутствии незрелых ДК [14]. С. Schlapbach и соавт. была обнаружена значительная инфильтрация пораженной кожи больных ГМ незрелыми CD209+ ДК [12].

Тесную связь с ГМ могут иметь некоторые заболевания из группы параспориозов, в частности крупнобляшечный параспориоз (КП) и мелкобляшечный параспориоз (МП), различающиеся клиническим течением и прогнозом [15, 16]. В настоящее время КП, по мнению подавляющего большинства авторов, является проявлением ранней стадии ГМ. Классификация опухолей кожи ВОЗ определяет МП как хронический доброкачественный дерматоз, однако эту точку зрения поддерживают не все авторы [17].

Целью настоящего исследования явилось изучение численности популяций CD83+ и лангерин+ клеток в коже больных ГМ и МП.

Материал и методы

Группу больных ГМ составили 17 пациентов в возрасте от 58 лет до 81 года (средний возраст $70 \pm 4,5$ года). Среди них пятнистая стадия ГМ была диагностирована у 9 пациентов, бляшечная — у 6, опухолевая — у 2. Диагноз был установлен клинически и подтвержден гистологическим исследованием. В группу больных МП вошли 6 пациентов в возрасте от 45 до 62 лет (средний возраст $52 \pm 3,4$ года). Группу контроля составили 16 здоровых лиц (средний возраст $56 \pm 2,1$ года). Получено разрешение Комитета по вопросам этики при ФГКВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» на проведение исследования.

Объектом исследования были биоптаты пораженной кожи больных ГМ, МП и биоптаты кожи здоровых лиц, полученные методом панч-биопсии (диаметром 6 мм). Для иммуногистохимической детекции использовали первичные мышинные моноклональные антитела к лангерину и CD83 человека. Применяли систему визуализации EnVision (Дако, Швеция), в качестве хромогена — диаминобензидин (ДАБ) (Дако, Швеция).

Для оценки результатов иммуногистохимического исследования использовали систему компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящую

из светового оптического микроскопа Nikon Eclipse E400, цифровой камеры Nikon DXM1200, персонального компьютера на базе Intel Pentium 4 и программного обеспечения «Морфология 5.2» (ВидеоТест, Россия). В каждом случае анализировали 3 поля зрения при увеличении 200 (размером 720×530 мкм), выбранных с учетом наибольшего количества меченных ДАБ+ клеток.

Относительную площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft, Inc). В случае отклонения от нормального распределения для сравнения данных применяли *U*-критерий Манна — Уитни, при нормальном распределении использовали *t*-критерий Стьюдента. Для всех критериев и тестов различия признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ распределения в коже ДК, экспрессирующих лангерин, показал, что у здоровых лиц 93% лангерин+ клеток локализуется в эпидермисе, 7% — в дерме. В биоптатах больных МП распределение лангерин+ клеток отличалось более высоким содержанием клеток Лангерганса в дерме — 25%, в эпидермисе они составляли 75%. В коже больных ГМ в верхней трети дермы содержалось 34% лангерин+ клеток, а 66% клеток — в эпидермисе. Анализ тканевого распределения экспрессии маркера CD83 показал локализацию позитивных клеток у здоровых лиц: в эпидермисе — 51%, в дерме — 49%; у больных МП — 40 и 60%, у больных ГМ — 26 и 74% соответственно (рис. 1).

При анализе уровня экспрессии маркера CD83 в коже установлено, что его содержание у больных ГМ (0,79%) в 3,1 раза превышает показатели пациентов с МП (0,25%) и в 3,9 раза больше, чем в коже здоровых людей (0,2%; $p < 0,05$) (рис. 2, а). Относительная площадь экспрессии лангерин+ ДК в коже больных ГМ (1,38%) была в 1,6 раза больше, чем у больных МП (0,85%; $p < 0,05$), и в 6,3 раза больше, чем в коже здоровых лиц (0,22%; $p < 0,05$) (рис. 2, б).

Отношение уровня экспрессии лангерина к уровню экспрессии CD83 у здоровых лиц составило 1,1, у больных МП — 3,37, ГМ — 1,74 (табл. 2).

Отмечено значительное увеличение количества зрелых CD83+ клеток у больных ГМ по сравнению со здоровыми лицами и пациентами с МП. Вместе с тем, анализируя соотношение клеток Лангерганса и зрелых ДК, мы обнаружили, что у здоровых людей этот показатель практически равен 1.

При МП отмечается увеличение в коже преимущественно незрелых лангерин+ клеток при численности CD83+ клеток, сравнимой со здоровыми людьми (ко-

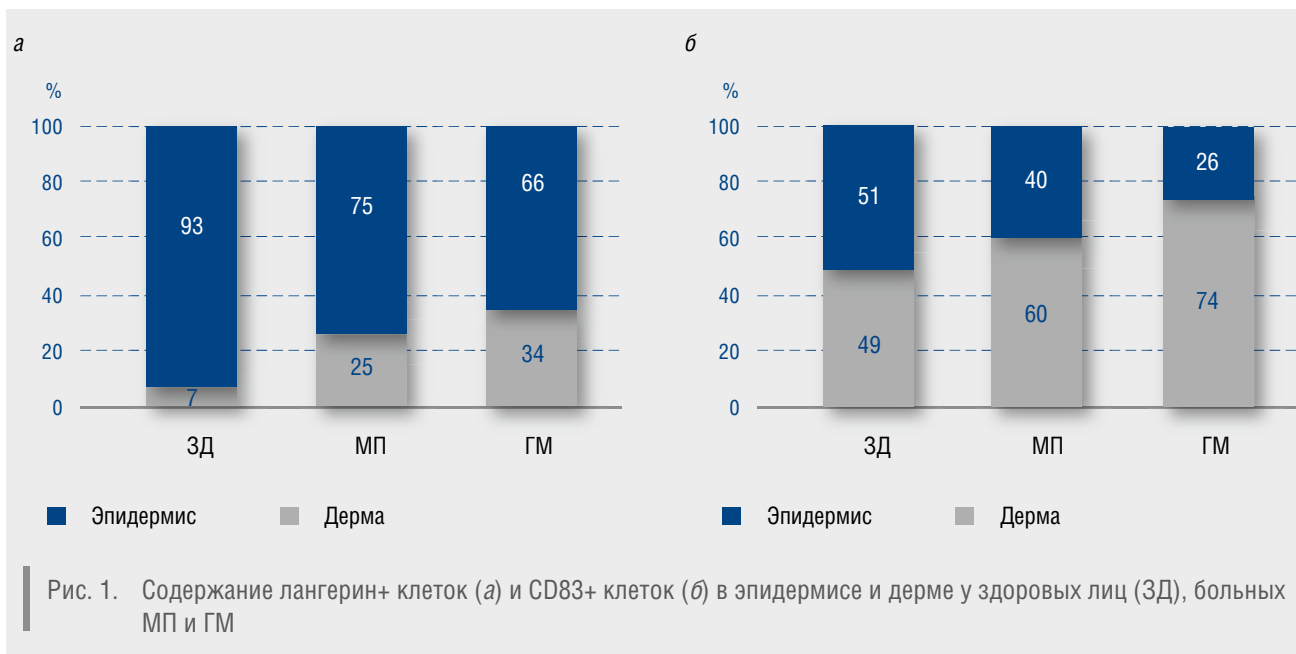


Таблица 2 Показатели численности клеток Лангерганса в коже больных ГМ, параспориозом и здоровых людей

Группа	Лангерин+				CD83+				Отношение лангерин+/CD83+ клеток
	общее, %	эпидермис (Э), %	дерма (Д), %	Э/Д	общее, %	эпидермис (Э), %	дерма (Д), %	Э/Д	
Здоровые лица	0,22	0,21	0,01	14,1	0,20	0,10	0,10	0,7	1,10
Больные МП	0,85*	0,64*	0,21*	3,08	0,25	0,10	0,15	0,66	3,37
Больные ГМ	1,38*#	0,91*	0,47*#	1,95	0,79*#	0,21*#	0,58*#	0,36	1,74

Примечание. Статистически значимые различия ($p < 0,05$): * — между группами здоровых лиц и больными ГМ и МП; # — между группами МП и ГМ.

эффицент 3,37). У больных ГМ наблюдается повышение количества в коже как незрелых (лангерин+), так и зрелых (CD83+) ДК (коэффициент 1,74). Наиболее значимое увеличение количества ДК в коже пациентов с ГМ отмечается в дерме, где происходит деление злокачественных Т-клеток. Можно предположить, что дермальные клетки Лангерганса, секретирующие цитокины и фактор роста, и зрелые CD83+ клетки, несущие на своей поверхности наибольшее количество костимуляторных молекул, являются необходимым микроокружением для осуществления пролиферации лимфоцитов в коже.

В исследовании G. Rowden и соавт. показано, что в эпидермисе в микроабсцессах Потрие клетки Лангерганса окружены опухолевыми Т-лимфоцитами [18]. Позже *in vitro* была продемонстрирована выживаемость злокачественных Т-лимфоцитов только в присутствии клеток Лангерганса [19]. На основании этих данных можно предположить, что незрелые ДК активируются в эпидермисе и перемещаются в сосочковую дерму, где созревают и образуют кластеры, что подтверждается как нашими, так и другими исследованиями [13, 20].

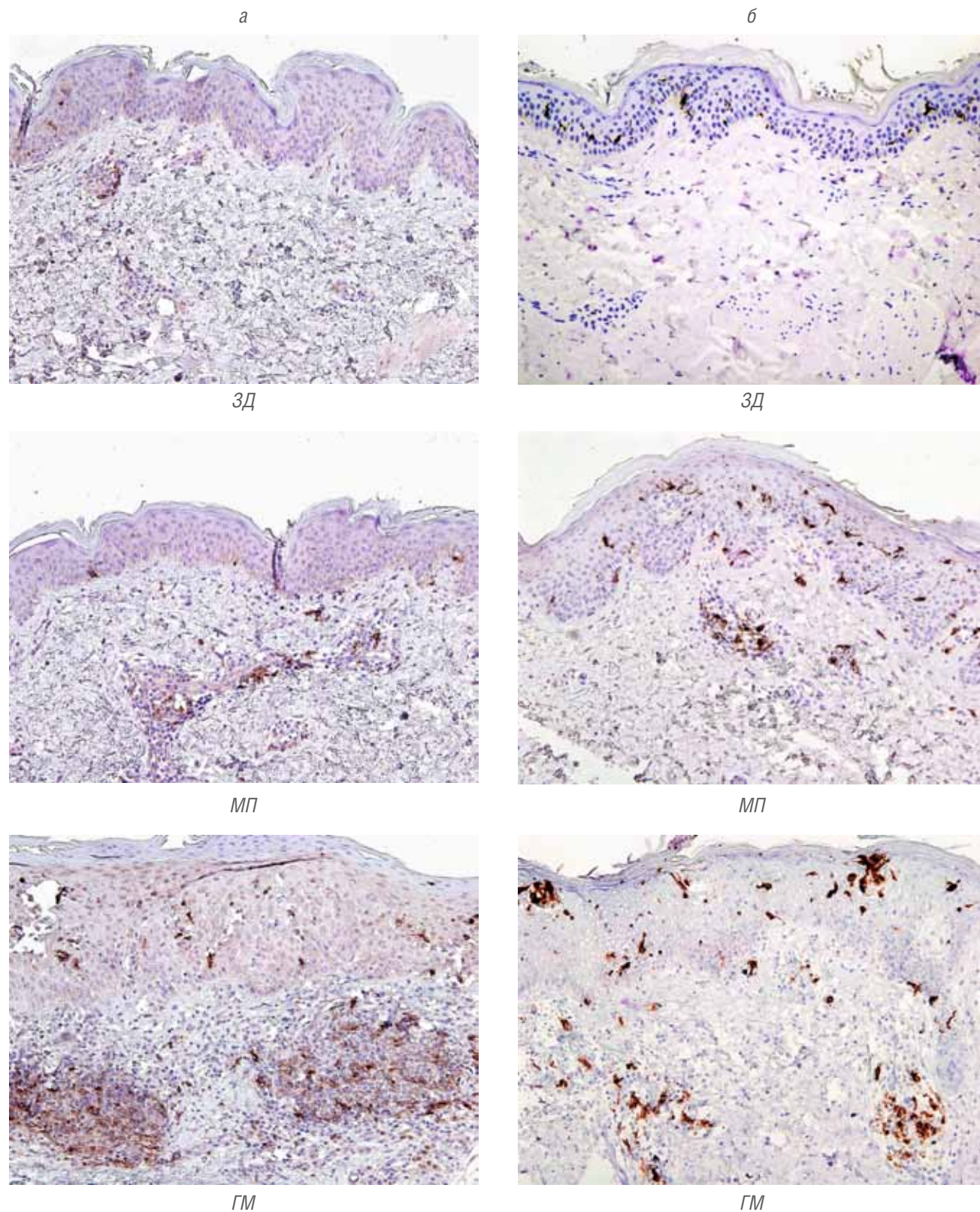


Рис. 2. Иммуногистохимические препараты. CD83+ клетки (а) и лангерин+ клетки (б) в коже здоровых лиц (ЗД), больных МП и ГМ

Заключение

Исследование численности субпопуляций ДК при ГМ, МП и у здоровых лиц показало значительное преобладание клеток Лангерганса у больных ГМ по сравнению со здоровыми лицами и больными МП.

Статистически значимое различие количества лангеринположительных клеток при ГМ по сравнению

с МП может послужить дополнительным критерием в дифференциальной диагностике этих заболеваний. Выявленные нами различия количества зрелых ДК у пациентов с ГМ, МП и здоровых лиц помогут глубже изучить патогенез лимфом кожи. Большое значение имеет не только клеточный состав околоопухолевого инфильтрата, но и степень зрелости составляющих его клеток. ■

Литература

- Ueno H., Schmitt N., Klechevsky E. et al. Harnessing human dendritic cell subsets for medicine. *Immunol Rev* 2010; 234 (1): 199—212.
- Saint-Vis B., Vincent J., Vandenabeele S. et al. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* 1998; 9 (3): 325—336.
- Prechtel A.T., Steinkasserer A. CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Arch Dermatol Res* 2007; 299 (2): 59—69.
- Elliott B., Scolyer R.A., Suci S. et al. Longterm protective effect of mature DC-LAMP+ dendritic cell accumulation in sentinel lymph nodes containing micrometastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 3825—3830.
- Thurnher M., Radmayr C., Ramoner R. et al. Human renal-cell carcinoma tissue contains dendritic cells. *Int J Cancer* 1996; 68: 1—7.
- Bell D., Chomarat P., Broyles D. et al. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 1999; 190: 1417—1426.
- McMillan E.M., Beeman K., Wasik R., Everett M.A. Demonstration of OKT 6-reactive cells in mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 1982; 6: 880—887.
- Goteri G., Filosa A., Mannello B. et al. Density of neoplastic lymphoid infiltrate, CD8+ T-cells, and CD1a+ dendritic cells in mycosis fungoides. *J Clin Pathol* 2003; 56 (6): 453—458.
- Pigozzi B., Bordinon M., BelloniFortina A. et al. Expression of the CD1a molecule in B- and T-lymphoproliferative skin conditions. *Oncol Rep* 2006; 15: 347—351.
- Meissner K., Loning T., Rehpenning W. Epidermal Langerhans cells and prognosis of patients with mycosis fungoides and Sezary syndrome. *In Vivo* 1993; 7: 277—280.
- Der-Petrosian M., Valencak J., Jonak C. et al. Dermal infiltrates of cutaneous T-cell lymphomas with epidermotropism but not other cutaneous lymphomas are abundant with langerin+ dendritic cells. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25(8): 922—927.
- Schlapbach C., Ochsenbein A., Kaelin U. et al. High numbers of DC-SIGN+ dendritic cells in lesional skin of cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* 2010; 62 (6): 995—1004.
- Schwingshackl P., Obermoser G., Nguyen V.A. et al. Distribution and maturation of skin dendritic cell subsets in two forms of cutaneous T-cell lymphoma: mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Acta Derm Venereol* 2012; 92 (3): 269—275.
- Berger C.L., Hanlon D., Kanada D. et al. The growth of cutaneous T-cell lymphoma is stimulated by immature dendritic cells. *Blood* 2002; 99 (8): 2929—2939.
- Ackerman A.B. If small plaque (digitate) parapsoriasis is a cutaneous T-cell lymphoma, even an «abortive» one, it must be mycosis fungoides! *Arch Dermatol* 1996; 132: 562—566.
- Sarveswari K.N., Yesudian P. The conundrum of parapsoriasis versus patch stage of mycosis fungoides. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2009; 75: 229—235.
- Willemze R., Jaffe E.S., Burg G. et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005; 105: 3768—3785.
- Rowden G., Phillips T.M., Lewis M.G., Wilkinson R.D. Target role of Langerhans cells in mycosis fungoides: transmission and immuno-electron microscopic studies. *J Cutan Pathol* 1979; 6: 364—382.
- Edelson R.L. Cutaneous T cell lymphoma: the helping hand of dendritic cells. *Ann NY Acad Sci* 2001; 941: 1—11.
- Lüftl M., Feng A., Licha E., Schuler G. Dendritic cells and apoptosis in mycosis fungoides. *Br J Dermatol*. 2002; 147 (6): 1171—1179.

об авторах: 

А.С. Жуков — адъюнкт кафедры кожных и венерических болезней ФГКОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург

В.Р. Хайрутдинов — к.м.н., ассистент кафедры кожных и венерических болезней ФГКОУ ВПОВ «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург

И.Э. Белоусова — д.м.н., доцент кафедры кожных и венерических болезней ФГКОУ ВПОВ «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург

А.В. Самцов — д.м.н., профессор, зав. кафедрой кожных и венерических болезней ФГКОУ ВПОВ «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург