

Foxp3+ Т-лимфоциты в патогенезе грибовидного микоза

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

ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ
194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 2

Патогенез грибовидного микоза (ГМ) до настоящего времени полностью не изучен. Тем не менее считается, что микроокружение опухолевых клеток может оказывать влияние на развитие малигнизированных лимфоцитов. Т-регуляторные клетки являются специализированной субпопуляцией Т-лимфоцитов, которая способна оказывать иммуносупрессивное воздействие и тем самым влиять на иммунный ответ организма.

Цель. Изучение численности популяции Т-регуляторных клеток в коже больных ГМ и бляшечным параспориозом.

Материал и методы. Определяли содержание Foxp3+ и CD3+ клеток методом иммуногистохимического исследования биоптатов кожи у больных пятнистой стадией ГМ (10 пациентов) и бляшечным параспориозом (10 пациентов). Группу контроля составили 16 здоровых лиц.

Результаты. Относительная площадь экспрессии Foxp3+ клеток у больных пятнистой стадией ГМ (0,44%) в 2,6 раза больше, чем у пациентов с бляшечным параспориозом (0,14%; $p < 0,05$). Доля Foxp3+ клеток от общего количества Т-лимфоцитов у больных ГМ (5,9%) и пациентов с бляшечным параспориозом (4,7%) статистически значимо не различается ($p > 0,05$).

Заключение. В начальной стадии у больных ГМ определено статистически значимое преобладание абсолютного количества Т-регуляторных клеток как в эпидермисе, так и в дерме. Доля Т-регуляторных клеток от всех Т-лимфоцитов кожи у больных пятнистой стадией ГМ и бляшечным параспориозом статистически значимо не различается.

Ключевые слова: **грибовидный микоз, Т-регуляторные клетки, бляшечный параспориоз, Т-клеточная лимфома кожи.**

Контактная информация: md.zhukov@gmail.com. Вестник дерматологии и венерологии 2014; (5): 68—72.

Foxp3+ T-lymphocytes in the pathogenesis of mycosis fungoides

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

Military Medical Academy named after S.M. Kirov Ministry of Defense of the Russian Federation
Akademika Lebedeva str., 2, St.-Petersburg, 194044, Russia

The pathogenesis of mycosis fungoides (MF) is not fully understood, nevertheless it is believed that the microenvironment of the tumor cells could influence the development of malignant lymphocytes. T-regulatory cells are a specialized subpopulation of T-lymphocytes, which can have an immunosuppressive effect and thus affect the immune response.

Goal. The study population of regulatory T-cells in the skin of patients with mycosis fungoides and plaque parapsoriasis.

Materials and methods. The content of Foxp3+ and CD3+ cells by immunohistochemical studies of skin biopsy specimens from patients with patch stage mycosis fungoides (10 patients) and plaque parapsoriasis (10 patients). The control group consisted of 16 healthy individuals.

Results. Relative expression area Foxp3+ cells in patients with mycosis fungoides patch stage (0.44%) 2.6 times greater than in patients with plaque parapsoriasis (0.14%; $p < 0,05$). Part the Foxp3+ cells of the total number of T lymphocytes in patients with patch stage mycosis fungoides (5.9%) and plaque parapsoriasis (4.7%) were not significantly different ($p > 0,05$).

Conclusion. In the initial stage of patients with mycosis fungoides determined a statistically significant predominance of the absolute number of T-regulatory cells in the epidermis and in the dermis. Part T-regulatory cells from all of T-lymphocytes in patients with skin patch stage mycosis fungoides and plaque parapsoriasis not statistically significantly different.

Key words: **Mycosis fungoides, regulatory T-cells, plaque parapsoriasis, cutaneous T-cell lymphoma.**

Corresponding author: md.zhukov@gmail.com. Vestnik Dermatologii i Venerologii 2014; 5: 68—72.

■ Т-клеточные лимфомы кожи (ТКЛК) — группа заболеваний, характеризующаяся первичным накоплением и малигнизацией Т-лимфоцитов в коже. Наиболее распространенной и вариабельной формой ТКЛК является грибовидный микоз (ГМ) [11, 14].

Описаны десятки различных вариантов клинического течения этого заболевания. Кроме классического ГМ выделяют буллезную, дисгидротическую, эритродермическую, гипер- и гипопигментную, гранулематозную, фолликулярную, «невидимую», пустулезную, пойкилодермическую и другие формы заболевания [6, 15].

В настоящее время диагностика ГМ представляет трудности, которые определяются как вариабельностью клинических проявлений заболевания, так и большим количеством хронических дерматозов со сходной клинической картиной [8].

Наименее информативной в диагностическом плане является пятнистая стадия ГМ, дифференциальная диагностика которой проводится в первую очередь с бляшечным параспориозом (БП) [1, 10]. Инструментальные и лабораторные методы диагностики не всегда позволяют дифференцировать эти заболевания, что необходимо для определения прогноза и тактики ведения таких пациентов [13].

Этиология и патогенез ГМ полностью не изучены. Все большее значение придается микроокружению малигнизированных лимфоцитов. Считается, что клетки, окружающие опухоль, могут оказывать влияние на инициацию или течение канцерогенного процесса [3]. К микроокружению малигнизированных лимфоцитов относятся Т-регуляторные клетки, роль которых в патогенезе лимфопролиферативных заболеваний до настоящего времени не определена.

Т-регуляторные клетки являются специализированной субпопуляцией Т-лимфоцитов, которая обладает иммуносупрессивными свойствами. Они поддерживают гомеостаз иммунной системы, подавляя избыточную активность эффекторных Т-клеток в реакциях с чужеродными антигенами. Снижение функции Т-регуляторных клеток сопровождается развитием аутоиммунных заболеваний, а избыточная активность часто наблюдается при злокачественных новообразованиях [7].

Для определения Т-регуляторных клеток в тканях при проведении иммуногистохимического исследования используют сочетание маркеров CD4, Foxp3 (forkhead box protein 3) и CD25. Маркеры Foxp3 и CD25 могут синтезироваться и на других активированных Т-лимфоцитах, хотя их экспрессия будет ниже [2]. Исследователи отмечают, что в настоящее время нельзя точно дифференцировать исходные (натуральные) Т-регуляторные клетки и индуцибельные (активированные) с приобретенным фенотипом [7].

Подтверждением роли Т-регуляторных клеток в патогенезе ГМ являются исследования J. Gjerdum и со-

авт., которые выявили, что повышенное количество Foxp3+ клеток соотносится с увеличением выживаемости у больных ГМ [5]. Кроме того, в работе I. Fried и L. Cerroni представлено наблюдение пациента, у которого установлена положительная корреляционная связь между повышенным содержанием Foxp3+ клеток и длительным благоприятным течением заболевания [4].

Прогрессирующий иммунодефицит является характерным состоянием для ТКЛК. Пациенты в поздних стадиях ГМ чаще умирают от инфекционных заболеваний, чем от распространения опухолевых клеток [9].

Иммуносупрессивное влияние Т-регуляторных клеток в коже на микроокружение подтверждается данными T. Krejsgaard и соавт. Исследователи обнаружили, что в ранних стадиях ГМ клеточный инфильтрат преимущественно состоит из немалигнизированных Т-лимфоцитов. По их мнению, доброкачественные лимфоциты, окружающие малигнизированные клетки, могут сдерживать развитие неопластических клеток, а под воздействием механизма, который делает малигнизированные клетки резистентными к этому влиянию, происходит прогрессия заболевания. Авторы считают, что, воздействуя на опухолевосвязанную иммуносупрессию, можно положительно влиять на продолжительность жизни больных ГМ [7].

Таким образом, исследование Т-регуляторных клеток является актуальной научной задачей для понимания патогенеза и оценки течения ТКЛК.

Цель исследования: изучение численности популяции Т-регуляторных клеток в коже больных ГМ и БП.

Материал и методы

Группу больных ГМ составили 10 пациентов с пятнистой стадией ГМ, возраст больных колебался от 58 до 82 лет (средний возраст $63 \pm 4,5$ года). В группу больных БП вошли 10 пациентов в возрасте от 45 до 62 лет (средний возраст $52 \pm 3,4$ года). Диагноз был установлен клинически и подтвержден гистологическим исследованием. Группа контроля представлена 16 здоровыми лицами (средний возраст $56 \pm 2,1$ года).

На проведение исследования получено разрешение Комитета по вопросам этики при ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова».

Объектами исследования были пораженные участки кожи больных ГМ, БП и здоровых лиц, взятые методом панч-биопсии (6 мм). Для иммуногистохимической детекции использовали первичные мышиные моноклональные антитела к Foxp3 и CD3. Применяли систему визуализации Envision (Dako, Швеция), хромоген — диаминобензидин (ДАБ) (Dako, 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 (размером 720 × 530 мкм) при увеличении 200, 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 (рис. 1).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы STATISTICA 10.0 (StatSoft, Inc). Для сравнения данных между группами применяли U-критерий Манна — Уитни. Для всех критериев и тестов различия признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В ходе исследования выявлено, что относительная площадь экспрессии CD3+ клеток у пациентов с пятнистой стадией ГМ (9,24%) в 3,15 раза превышала показатели у больных БП (2,93%; $p < 0,05$) и в 77 раз значение у здоровых лиц (0,12%; $p < 0,05$).

При оценке тканевого распределения обнаружено, что 99% Т-лимфоцитов у здоровых лиц расположено в дерме, а менее 1% — в эпидермисе. У больных БП количество эпидермальных Т-лимфоцитов гораздо выше и составляет до 17%, а в пятнистую стадию ГМ — до 23% от общего количества Т-лимфоцитов в коже (таблица).

Установлено, что у больных пятнистой стадией ГМ относительная площадь экспрессии Foxp3+ клеток составляет 0,44%, что в 3,1 раза превышает данные у пациентов с БП (0,14%; $p < 0,05$). У здоровых лиц этот показатель находится на уровне 0,02% (таблица).

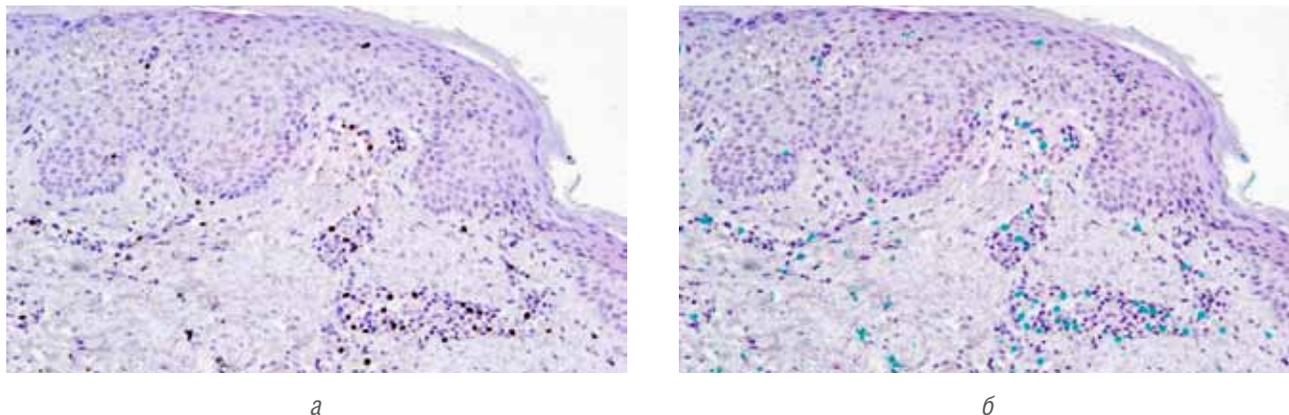


Рис. 1. Интерфейс программного обеспечения «Морфология 5.2». Детекция Foxp3+ клеток: а — исходное изображение; б — после выделения масок программным обеспечением «Морфология 5.2»

Таблица

Относительная площадь экспрессии CD3+ и Foxp3+ клеток в коже больных ГМ, БП и здоровых людей, Ме (25—75%)

Группа	CD3+ клетки				Foxp3+ клетки				% Foxp3+ клеток от CD3+
	общая	Э	Д	Э/Д	общая	Э	Д	Э/Д	
Здоровые лица	0,12% [0,09—0,18]	0,00%	0,12% [0,09—0,18]	0,00	0,02% [0,01—0,04]	0,00%	0,02% [0,01—0,04]	0,00	16,7% [15,5—19,2]
Больные БП	2,93% [2,65—3,23]	0,48% [0,38—0,57]	2,44% [2,22—2,79]	0,20 [0,13—0,28]	0,17% [0,11—0,30]	0,02% [0,01—0,03]	0,15% [0,10—0,28]	0,15 [0,09—0,27]	5,9% [4,1—7,3]
Больные ГМ	9,24%* [8,54—10,22]	2,08%* [1,75—2,26]	7,16%* [6,82—7,44]	0,29 [0,14—0,40]	0,44%* [0,32—0,69]	0,09%* [0,06—0,15]	0,35%* [0,22—0,44]	0,26 [0,15—0,39]	4,7% [3,9—6,8]

Примечание. Э — эпидермис; Д — дерма; Э/Д — эпидермо-дермальное отношение. * — статистически значимые различия ($p < 0,05$) между группами БП и ГМ.

Анализ распределения Foxp3+ клеток в коже установил, что в эпидермисе здоровых лиц доля Foxp3+ клеток составляет 1%, у больных БП — 13% и у пациентов с ГМ — 21%.

При оценке процентного содержания Foxp3+ клеток от общего количества Т-лимфоцитов в коже выявлено, что данный показатель у больных пятнистой стадией ГМ (5,9%) статистически значимо не отличается от такового у пациентов с БП (4,7%; $p > 0,05$) и гораздо ниже, чем у здоровых лиц (20,7%; $p < 0,05$).

Обсуждение

Нами был проведен иммуногистохимический анализ распределения в коже Т-лимфоцитов и их подтипа — Т-регуляторных клеток. Обнаружено закономерное увеличение количества Т-лимфоцитов при БП, еще более выраженное при пятнистой стадии ГМ по сравнению со здоровыми донорами.

В ходе определения Foxp3+ клеток установлено статистически значимое преобладание данного показателя у пациентов с пятнистой стадией ГМ в срав-

нении с больными БП. При исследовании отношения Foxp3+ клеток к общему количеству Т-лимфоцитов в коже не обнаружены статистически значимо различающиеся данные у этих групп больных.

I. Fried и L. Cerroni в своих исследованиях определяли долю Т-регуляторных клеток в коже по отношению к Т-лимфоцитам, однако в отличие от нашей работы только у пациентов с разными стадиями ГМ авторы обнаружили, что у большинства больных ГМ доля Т-лимфоцитов в коже не превышает 10%. При этом авторы не выявили статистически значимого различия доли Т-регуляторных клеток у больных с разными стадиями ГМ [4].

Среднее содержание Т-регуляторных клеток в коже больных ГМ в нашей работе соответствует данным ряда авторов: D. Wada и соавт. (12,9%), Solomon и Margo (14%), но значительно отличаются от данных других авторов: Fujimura и соавт. (44,6%), Klemke и соавт. (26,3%) (цит. по: [12]) (рис. 2). Расхождение результатов можно объяснить как различной техникой подсчета, так и применением неспецифических антител, которые могли

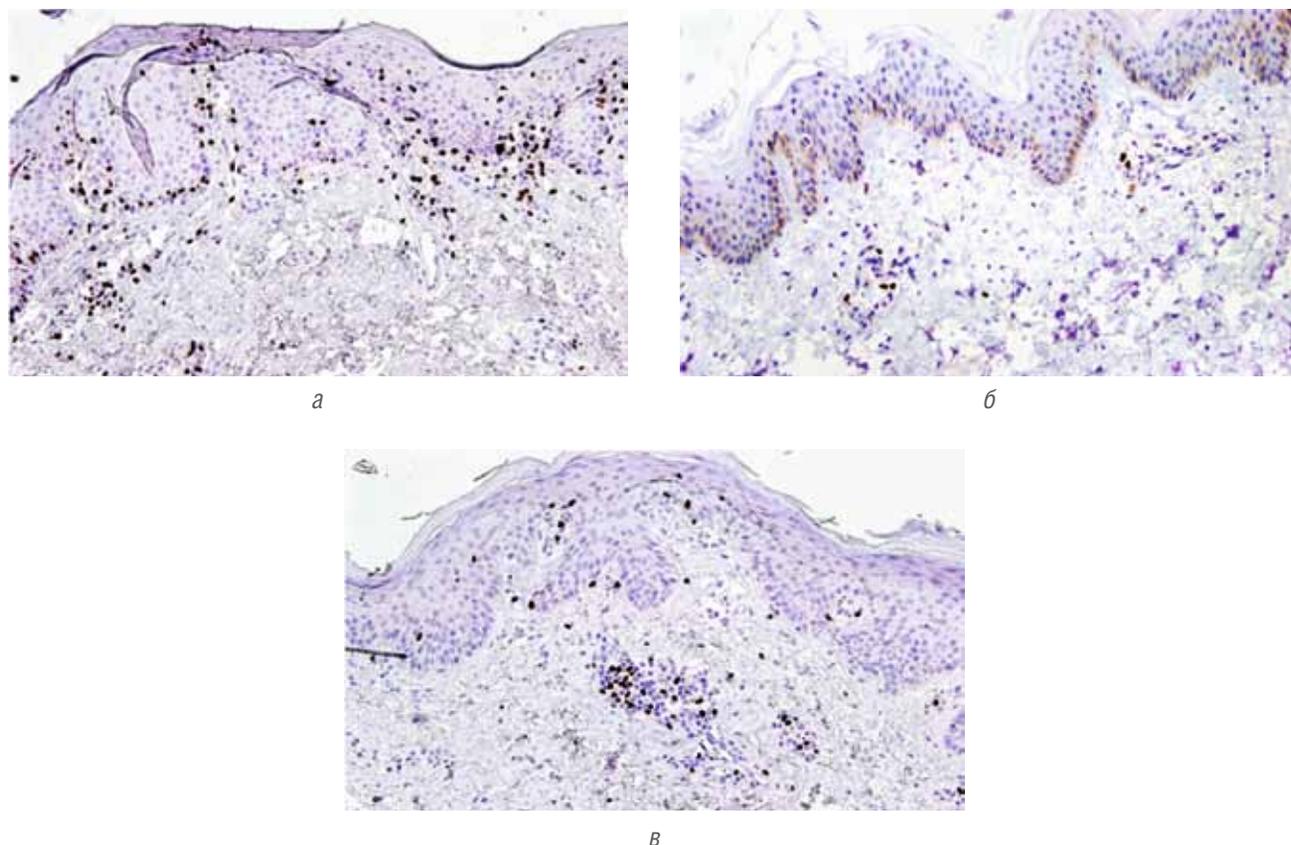


Рис. 2. Иммуногистохимические препараты. Foxp3+ клетки (Т-регуляторные клетки) — коричневый цвет, в коже больных ГМ (а), БП (б) и здоровых лиц (в)

дать дополнительные окрашенные клетки. Например, в исследовании С. Berger и соавт. было определено, что большинство малигнизированных Т-лимфоцитов являются Т-регуляторными клетками, а позже выяснилось, что применялись неспецифические антитела [3].

При анализе полученных нами результатов и данных других исследователей остается открытым вопрос о роли Foxp3+ клеток в патогенезе ГМ и значимости определения данного показателя при дифференциальной диагностике с БП. С одной стороны, мы видим увеличение уровня экспрессии данного маркера при развитии лимфопролиферативного заболевания, с другой — идет увеличение общего пула Т-лимфоцитов, и отдельная роль Т-регуляторных клеток полностью не определена.

Тем не менее можно предположить, что многократное увеличение количества Т-регуляторных клеток в коже больных ГМ по сравнению со здоровыми донорами позволяет рассматривать избыточное иммуно-

супрессивное действие этих клеток с позиции важного патогенетического фактора развития злокачественной пролиферации Т-лимфоцитов. Дальнейшее изучение различных субпопуляций Т-лимфоцитов, а также других иммунокомпетентных клеток позволит глубже разобраться в механизмах развития ГМ.

Выводы

1. В начальной стадии у большинства пациентов с ГМ определено статистически значимое преобладание абсолютного количества Т-регуляторных клеток как в эпидермисе, так и в дерме по сравнению с больными БП.

2. Выявлено преобладание количества Т-лимфоцитов в коже у пациентов с пятнистой стадией ГМ по сравнению с больными БП.

3. Доля Т-регуляторных клеток от всех Т-лимфоцитов кожи у больных пятнистой стадией ГМ и БП статистически значимо не различается. ■

Литература

- 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.
- Babichenko I.I., Kovyazin V.A. New methods of immunohistochemical diagnosis of tumor growth: Tutorial. — Moscow.: RUDN 2008; 109. (Бабиченко И.И., Ковязин В.А. Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста: Учеб. пособие. М.: РУДН 2008; 109).
- 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: 2929—2939.
- Fried I., Cerroni L. FOXP3 in sequential biopsies of progressive mycosis fungoides. *Am J Dermatopathol* 2012 May; 34 (3): 263—5.
- Gjerdrum L.M., Woetmann A., Odum N., Burton C.M., Rossen K., Skovgaard G.L., Ryder L.P., Ralfkiaer E. FOXP3+ regulatory T cells in cutaneous T-cell lymphomas: association with disease stage and survival. *Leukemia* 2007 Dec; 21 (12): 2512—8.
- Kazakov D.V., Burg G., Kempf W. Clinicopathological spectrum of mycosis fungoides. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004 Jul; 18 (4): 397—415.
- Krejsgaard T., Odum N., Geisler C., Wasik M.A., Woetmann A. Regulatory T cells and immunodeficiency in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Leukemia* 2012 Mar; 26 (3): 424—32.
- Pimpinelli N., Olsen E.A., Santucci M. et al (2005) Defining early mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 53: 1053—1063.
- Reinhold U., Pawelec G., Fratila A., Leipold S., Bauer R., Kreysel H.W. Phenotypic and functional characterization of tumor infiltrating lymphocytes in mycosis fungoides: continuous growth of CD4+ CD45R+ T-cell clones with suppressor-inducer activity. *J Invest Dermatol* 1990 Mar; 94 (3): 304—9.
- Sanchez J.L., Ackerman A.B. The patch stage of mycosis fungoides. *Am J Dermatopathol* 1979; 1: 5—26.
- Thomas B.R., Whittaker S. A practical approach to accurate classification and staging of mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Skin Therapy Lett* 2012 Dec; 17 (10): 5—9.
- Wada D.A., Wilcox R.A., Weenig R.H., Gibson L.E. Paucity of intraepidermal FoxP3-positive T cells in cutaneous T-cell lymphoma in contrast with spongiotic and lichenoid dermatitis. *J Cutan Pathol* 2010 May; 37 (5): 535—41. (2): 348—58.
- Willemze R., Jaffe E.S., Burg G. et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005; 105: 3768—85.
- Wilson L.D., Hinds G.A., Yu J.B. Age, race, sex, stage, and incidence of cutaneous lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2012 Oct; 12 (5): 291—6.
- Zackheim H.S., McCalmont T.H. Mycosis fungoides: the great imitator. *J Am Acad Dermatol* 2002 Dec; 47 (6): 914—8.

об авторах:

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

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

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье