

Limfocyty T-regulatorowe CD4+CD25^{high} we krwi obwodowej chorych na łuszczycę

T regulatory CD4+CD25^{high} lymphocytes in peripheral blood of patients suffering from psoriasis

Mariola Pawlaczyk, Jacek Karczewski, Krzysztof Wiktorowicz

Zakład Profilaktyki Chorób Skóry Katedry Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, kierownik Katedry: prof. dr hab. Krzysztof Wiktorowicz

Post Dermatol Alergol 2010; XXVII, 1: 25–28

Streszczenie

Wprowadzenie: Łuszczycą jest autoimmunologiczną chorobą skóry mediowaną przez limfocyty T. Ostatnio zwrócono uwagę na rolę limfocytów T-regulatorowych (Treg) CD4+CD25+ w patogenezie łuszczycy.

Cel: Ocena odsetka limfocytów Treg CD4+CD25^{high} we krwi obwodowej chorych na łuszczycę w różnych stadiach nasilenia choroby.

Materiał i metody: Badaniem objęto 50 chorych na łuszczycę zwyczajną, których podzielono na dwie grupy – z małym i umiarkowanym natężeniem (PASI ≤ 12) oraz dużym natężeniem choroby (PASI > 12). Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych osób. Pomiaru stężenia obwodowych limfocytów Treg dokonano z zastosowaniem metody cytometrii przepływowej przy użyciu przeciwciał anti-CD3, anti-CD4 i anti-CD25. U chorych z nasilonymi zmianami łuszczycowymi średni odsetek komórek Treg wynosił 4,44, u chorych na łuszczycę o przebiegu klinicznym łagodnym i umiarkowanym 7,01, podczas gdy w grupie kontrolnej 8,39.

Wyniki: Zaobserwowano statystycznie mniejszy odsetek limfocytów Treg o fenotypie CD3+CD4+CD25^{high} we krwi obwodowej pacjentów z nasilonymi zmianami łuszczycowymi (PASI > 12) w stosunku do grupy kontrolnej (4,44 ± 2,2 vs 8,39 ± 2,7, $p < 0,05$). W przypadku pacjentów z małym i umiarkowanym nasileniem choroby (PASI ≤ 12) odsetek limfocytów Treg był porównywalny z odsetkiem w grupie kontrolnej (7,01 ± 2,6 vs 8,39 ± 2,7, $p > 0,05$). Badane grupy chorych na łuszczycę ze wskaźnikiem PASI ≤ 12 oraz PASI > 12 różniły się odsetkiem obwodowych limfocytów Treg w sposób istotny statystycznie.

Wnioski: Łuszczycę charakteryzuje proces zapalny, za który odpowiada aktywacja patogennych efektorowych limfocytów T. Wydaje się, że zmiany w odsetkach limfocytów Treg w krwi obwodowej i skórze mogą świadczyć o upośledzeniu aktywności tych komórek.

Słowa kluczowe: łuszczycą, komórki T-regulatorowe, krew.

Abstract

Introduction: Psoriasis is a chronic T-cell mediated autoimmune skin disease. Recently, the role of T regulatory lymphocytes (Treg) CD4+CD25+ in the pathogenesis of psoriasis has been pointed out.

Aim: To estimate the percentage of Treg lymphocytes CD4+CD25^{high} in peripheral blood of patients with psoriasis in various stages of disease severity.

Material and methods: The study was conducted on 50 patients divided into two groups: with mild and moderate (PASI ≤ 12) and severe (PASI > 12) psoriasis. The control group consisted of 15 healthy subjects. Treg cells were measured using flow cytometry with CD3, CD4, CD25 antibody. The mean percentage of Treg was 4.4 in the group of patients with severe clinical course of psoriasis, 7.01 in patients with mild and moderate stage of the disease, and 8.39 in the control group.

Results: A statistically lower percentage of CD3+CD4+CD25 Treg lymphocytes was found in peripheral blood of patients with severe psoriasis in comparison with control healthy subjects (4.44 ± 2.2 vs. 8.39 ± 2.7, $p < 0.05$). The

Adres do korespondencji: dr hab. n. med. Mariola Pawlaczyk, Zakład Profilaktyki Chorób Skóry Katedry Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Dojazd 34, 60-631 Poznań, e-mail: mariola.pawlaczyk@zozmswia.poznan.pl

percentage of Treg cells in cases with mild and moderate disease (PASI \leq 12) was comparable with the control group (7.01 \pm 2.6 vs. 8.39 \pm 2.7, $p >$ 0.05). Examined patients suffering from psoriasis with PASI \leq 12 differed statistically from patients with PASI $>$ 12 in the percentage of Treg in peripheral blood.

Conclusions: Psoriasis is characterized by an inflammatory process for which the activation of effector T lymphocytes is responsible. It seems that changes in percentages of Treg lymphocytes in peripheral blood may prove that the activation of the cells is defective.

Key words: psoriasis, T regulatory cells, blood.

Wprowadzenie

Łuszczyca (*psoriasis vulgaris*) jest przewlekłą, zapalną chorobą skóry uwarunkowaną genetycznie, występującą w populacji z różną częstością 0,2–4,8% [1]. Od kilku lat łuszczycę plackowatą uważa się za chorobę skóry o podłożu immunologicznym, mediowaną przez limfocyty T, przebiegającą z nadmierną proliferacją i nieprawidłowym różnicowaniem komórek naskórka [2, 3]. Charakterystyczna dla tej jednostki jest przewaga odpowiedzi komórkowej, związanej z limfocytami T CD4+ (Th1), z towarzyszącą produkcją cytokin prozapalnych, głównie interleukiny 2 (IL-2), czynnika martwicy nowotworów (*tumour necrosis factor α* – TNF- α), interferonu γ (IFN- γ), interleukiny 12 (IL-12) i 23 (IL-23). W badaniach immunohistochemicznych wykazano, że w wykwitach łuszczycowych znajdują się głównie limfocyty T-pomocnicze CD4+ (Th), cytotosyczne CD8+ (Tc), NK, NK-T oraz regulatorowe CD4+, CD25+. Interleukina 1, 6 i 23 odpowiadają za różnicowanie się limfocytów T-pomocniczych (Th), produkujących IL-17 (Th17). Pobudzone limfocyty Th17 wydzielają IL-17A, IL-17F, IL-6, TNF- α oraz IL-22. Profil tych cytokin różni się od wydzielanych przez limfocyty Th1 i Th2. Limfocyty Th17 i IL-17 wywołują hiperproliferyzację keratynocytów, promują stan zapalny poprzez stymulację migracji neutrofilów do naskórka i indukcję cytokin prozapalnych. Uważa się, że komórki te są wyspecjalizowane w zwalczaniu bakterii zewnątrzkomórkowych i niektórych grzybów. Aktywacja limfocytów T i sekrecja czynników prozapalnych powodują wzmożoną angiogenezę, infiltrację leukocytów i powstawanie mikroropni Munro w warstwie rogowej skóry. Do cech charakterystycznych dla łuszczycy należą: niska ekspresja markerów różnicowania keratynocytów (keratyny K1 i K10), zanik warstwy ziarnistej, parakeratoza oraz wydłużenie soplei naskórkowych. Keratynocyty wytwarzają czynniki stymulujące angiogenezę, powodując nadmierną proliferację naczyń skóry. Zarówno w blaszkach łuszczycowych, jak i w surowicy chorych stwierdzono podwyższony poziom czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (*vascular endothelial growth factor* – VEGF). Leukocyty obecne w wykwitach łuszczycowych to przede wszystkim limfocyty o fenotypie Th1 CD4+ znajdujące się w skórze właściwej i CD8+ w naskórku. Komórki te mają na powierzchni cząsteczki LFA-1 (*lymphocyte-1 function-associated antigen* – CD11/CD18), receptor zasiedlania skóry CLA (*cutaneous lymphocyte antigen*), bardzo późny antygen VLA-4 (*very late antigen* – CD49c), cząsteczki ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1* – CD54),

VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1* – CD106) i integralinę α E(CD103) β 7, które promują przyleganie i migrację limfocytów. Na keratynocytach znajdują się ICAM-1, E-kadheryny, natomiast na śródbłonku naczyń skórnych występuje E-selektyna. Cząsteczki te umożliwiają przyleganie leukocytów. Obie subpopulacje limfocytów T CD4+ i CD8+ wykazują ponadto ekspresję HLA-DR i receptora dla IL-2 (CD25), będących markerami stanu pobudzenia. Większość limfocytów T stanowią efektorowe komórki pamięci, mające antygeny CD45RO+. W wykwitach łuszczycowych znajdują się głównie limfocyty Tc1, a ich znaczenie nie jest do końca znane. Stopień zaawansowania klinicznego koreluje z liczbą krążących limfocytów CD8+. Limfocyty te rozpoznają antygen HLA-Cw6*602 związany z łuszczycą typu I, prezentujący sekwencje aminokwasowe obecne w białkach M paciorkowców i keratynach typu I [4]. Ostatnio zwrócono uwagę na limfocyty T-regulatorowe (Treg) CD4+CD25+, które u chorych na łuszczycę wykazują defekt funkcjonalny polegający na obniżonej zdolności do supresji limfocytów efektorowych Th1 [1] oraz ich rolę w patogenezie łuszczycy [5, 6].

Cel

Celem pracy była cytometryczna ocena odsetka limfocytów Treg CD4+CD25^{high} we krwi obwodowej chorych na łuszczycę w różnych stadiach nasilenia choroby.

Materiał i metody

Badaniem objęto populację 50 chorych na łuszczycę zwyczajną, bez współistniejących schorzeń ogólnoustrojowych i dolegliwości bólowych stawów, leczonych na Oddziale Dermatologii ZOZ MSWiA w Poznaniu im. prof. Ludwika Bierkowskiego z powodu nawrotu zmian skórnych w latach 2004–2008. Analizowani pacjenci przez 2 mies. nie stosowali terapii miejscowych bądź układowych modyfikujących przebieg łuszczycy. Stan dermatologiczny oceniano za pomocą skali *Psoriasis Area and Severity Index* (PASI). Przyjęto kryteria zaawansowania klinicznego choroby wg zaleceń Schmitt i Wozel, uznając wynik PASI o wartości poniżej 7 za łagodny stopień zaawansowania łuszczycy, 7–12 za umiarkowany i powyżej 12 za łuszczycę o ciężkim przebiegu [7]. W badanej grupie było 21 kobiet i 29 mężczyzn w wieku 21–56 lat.

Projekt badawczy uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Biorąc pod uwagę stopień nasilenia łuszczycy mierzony wskaźnikiem PASI, chorych podzielono na dwie grupy – z małym i umiarkowanym natężeniem choroby (PASI ≤ 12), w której znalazło się 22 pacjentów, oraz z dużym natężeniem choroby (PASI > 12), obejmującą dalszych 28 osób. W wyodrębnionych grupach przeprowadzono analizę charakterystyki epidemiologicznej z uwzględnieniem wieku i płci. W ramach rutynowych badań od pacjentów pobrano próbki krwi obwodowej na heparynę litową. Pomiaru poziomu obwodowych limfocytów Treg dokonano z zastosowaniem metody cytometrii przepływowej (FACScan, BD Biosciences, USA) przy użyciu przeciwciał anti-CD3, anti-CD4 i anti-CD25 (BD Biosciences Pharmingen, USA). Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych osób, wolontariuszy z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu, dobranych pod względem płci i wieku.

Analizę statystyczną danych przeprowadzono przy użyciu programu Spss v. 15 (SPSS, USA) z zastosowaniem testu U Manna-Whitneya oraz testu χ^2 . Za statystycznie istotną przyjęto wartość $p < 0,05$.

Wyniki

Średni wiek badanych chorych na łuszczycę wynosił 43,6 roku. Nasilenie objawów klinicznych mierzone wskaźnikiem PASI osiągnęło wartości 7,1–23,4. Nie stwierdzono istotnie statystycznych różnic w charakterystyce epidemiologicznej grupy chorych z wartościami PASI ≤ 12 w porównaniu z pacjentami ze wskaźnikiem PASI > 12 ($p > 0,05$).

Odsetek limfocytów Treg o fenotypie CD3+CD4+CD25^{high} w badanej populacji przedstawiono w tab. 1. U chorych z nasilonymi zmianami łuszczycowymi średni odsetek tych komórek wynosił 4,44, u chorych na łuszczycę o przebiegu klinicznym łagodnym i umiarkowanym 7,01, podczas gdy w grupie kontrolnej 8,39. Zaobserwowano statystycznie mniejszy odsetek limfocytów Treg o fenotypie CD3+CD4+CD25^{high} we krwi obwodowej pacjentów z nasilonymi zmianami łuszczycowymi (PASI > 12) w stosunku do grupy kontrolnej (4,44 ± 2,2 vs 8,39 ± 2,7, $p < 0,05$). W przypadku grupy pacjentów z małym i umiarkowanym nasileniem choroby (PASI ≤ 12) odsetek limfocytów Treg był porównywalny z odpowiednim odsetkiem w grupie kontrolnej (7,01 ± 2,6 vs 8,39 ± 2,7, $p > 0,05$). Badane grupy chorych na łuszczycę ze wskaźnikiem PASI ≤ 12 oraz PASI > 12 różniły się odsetkiem obwodowych limfocytów Treg w sposób istotny statystycznie (7,01 ± 2,6 vs 4,44 ± 2,2, $p < 0,05$), co przedstawiono na ryc. 1.

Omówienie wyników

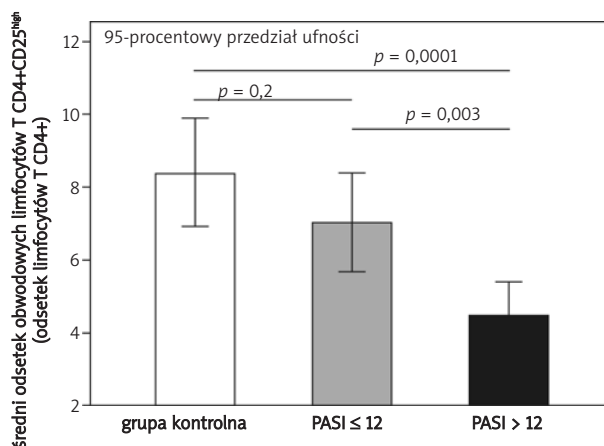
Duże zainteresowanie komórkami regulatorowymi doprowadziło w ostatnich latach do ustalenia ich kluczowej roli w kontrolowaniu odpowiedzi immunologicznej poprzez oddziaływanie na efektorowe komórki T. Limfocyty Treg stanowią ok. 5–10% wszystkich komórek T CD4+

pełniąc ważną funkcję w homeostazie obwodowej limfocytów T oraz immunoregulacji [8, 9]. Najlepiej poznany z tej heterogennej grupy są naturalnie występujące komórki Treg CD4+CD25+, które wykazują ekspresję receptora dla łańcucha α IL-2 (CD25), antygeny 4 związane z limfocytami T-cytotoksycznymi (CTLA-4) oraz receptorów z rodziny TNF indukowanych przez glikokortykosteroidy (GITR) [10, 11]. Limfocyty Treg wykazują także ekspresję czynnika Foxp3 (*forkhead transcription factor*), uznawanego za ich specyficzny marker [8, 12, 13]. Mutacja genu *Foxp3*, kodującego czynnik transkrypcyjny – skurfinę, prowadzi do niedoborów lub całkowitego braku komórek CD4+CD25+ oraz do rozwoju chorób autoimmunologicznych [8–14].

Zwiększa się liczba danych sugerujących istotną rolę limfocytów Treg o fenotypie CD3+CD4+CD25^{high} w patogenezie łuszczycy [1–3, 5, 6]. Wydaje się, że u pacjentów z łuszczycą zaburzenia proporcji ilościowych między subpopulacją limfocytów Treg a całkowitą subpopulacją limfocytów T CD4+ mogą prowadzić do hiperprolifracji komórek efektorowych. W efekcie dochodzi m.in. do zwiększonej produkcji cytokin prozapalnych przez aktywowane limfocyty, co stymuluje proliferację keratynocytów i komórek endotelialnych [15].

Tab. 1. Średni odsetek limfocytów Treg o fenotypie CD3+CD4+CD25^{high} obliczonych jako odsetek limfocytów CD3+CD4+ w badanej populacji

Badana grupa	Średni odsetek Treg	Liczba badanych <i>n</i>	Odchylenie standardowe
kontrolna	8,39	15	2,68
PASI ≤ 12	7,01	22	2,64
PASI > 12	4,44	28	2,16



Ryc. 1. Średni odsetek limfocytów Treg o fenotypie CD3+CD4+CD25^{high} we krwi pacjentów z małym/umiarkowanym natężeniem łuszczycy PASI ≤ 12, pacjentów z dużym natężeniem łuszczycy PASI > 12 oraz w grupie kontrolnej. Wyniki przedstawione jako odsetek limfocytów T CD4+

Wyniki przeprowadzonych badań własnych wykazały, że u chorych na łuszczycę odsetek limfocytów Treg CD4+CD25^{high} we krwi obwodowej jest obniżony w porównaniu z populacją osób zdrowych i zależy od ciężkości przebiegu procesu chorobowego skóry, co potwierdza powyższą sugestię. Zaburzenia funkcji i liczby limfocytów Treg stwierdzono w wielu chorobach o podłożu autoimmunologicznym, w tym w łuszczycy, i nadal analizuje się ich rolę w patogenezie tych schorzeń. Po raz pierwszy zmiany dotyczące komórek T CD4+CD25+ w skórze i krwi obwodowej u chorych na łuszczycę opisał Sugiyama i wsp. [1], uważając, że różnią się one od komórek Treg osób zdrowych mniejszą aktywnością cytotoksyczną. Występowanie w naskórku i skórze właściwej limfocytów CD4+CD25+Foxp3+ potwierdzono także metodami immunohistochemicznymi [16, 17]. Patogeneza łuszczycy nadal pozostaje niewyjaśniona, jednak w wielu badaniach sugeruje się, że pobudzone limfocyty T w zmianach skórnych mogą produkować cytokiny, które odpowiadają następnie za proliferację komórek podstawnych naskórka i za zaburzenia rogowacenia występujące w łuszczycy [18]. Chorobę tę charakteryzuje proces zapalny, za który odpowiada aktywacja patogennych efektorowych limfocytów T. Wydaje się, że zmiany w odsetkach limfocytów Treg we krwi obwodowej i skórze właściwej świadczą o upośledzeniu aktywności tych komórek, co może prowadzić do niekontrolowanego rozwoju procesu zapalnego.

Praca została wykonana w ramach badań własnych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu Nr programu 501-1-4402503-6035.

Piśmiennictwo

1. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25 high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* 2005; 174: 164-73.
2. Kruger JG. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46: 1-23.
3. Valdimarsson H, Baker BS, Jonsdottir I, Fry L. Psoriasis: a disease of abnormal proliferation induced by T lymphocytes. *Immunol Today* 1986; 7: 256-9.
4. Nedoszytko B. Znaczenie subpopulacji limfocytów T w patogenezie łuszczycy. *Post Dermatol Alergol* 2008; 1: 20-33.
5. Griffiths CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 2007; 370: 263-71.
6. Chen L, Shen Z, Wang G, Fan P, Liu Y. Dynamic frequency of CD4+CD25+Foxp3+ Treg cells in psoriasis vulgaris. *J Derm Sci* 2008; 51: 200-3.
7. Schmitt J, Wozel G. The Psoriasis Area and Severity Index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis. *Dermatology* 2005; 210: 194-9.
8. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-52.
9. Piccirillo CA, Shevach EM. Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin Immunol* 2004; 16: 81-8.
10. Berzofsky JA, Terese M. A novel immunoregulatory axis of NKT cell subsets regulating tumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 1679-83.
11. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune disease. *J Immunol* 1995; 155: 1151-64.
12. Shevach EM. Certified professionals: CD4 (+)CD25 (+) suppressor T cells. *J Exp Med* 2001; 193: F41-6.
13. Schwarz RH. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* 2005; 6: 327-30.
14. Bach JF. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 189-98.
15. Ghoreschi K, Weigert C, Röcken M. Immunopathogenesis and role of T cells in psoriasis. *Clin Dermatol* 2007; 25: 574-80.
16. Bovenschen HJ, van Vlijmen-Willems IM, van de Kerkhof PC, van Erp PE. Identification of lesional CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory cells in psoriasis. *Dermatology* 2006; 213: 111-7.
17. Fujimura T, Okuyama R, Ito Y, Aiba S. Profiles of Foxp3+ regulatory T cells in eczematous dermatitis, psoriasis vulgaris and mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 2008; 158: 1256-63.
18. Nickoloff BJ, Nestle FO. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 2004; 113: 1664-75.