

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Małgorzata Sokołowska-Wojdyło

**ROLA CHEMOKIN, ICH RECEPTORÓW
I ANTYGENU CD26 W DIAGNOSTYCE
ZIARNINIAKA GRZYBIASTEGO
I ZESPOŁU SÉZARY'EGO - PRZYCZYNEK
DO PATOGENEZY CHŁONIAKÓW
PIERWOTNYCH SKÓRY**

Rozprawa habilitacyjna

**Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. med. Jadwiga Roszkiewicz**

GDAŃSK 2010

**Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

Wydawca: Gdański Uniwersytet Medyczny
Druk: Dział Wydawnictw GUMed
Gdańsk, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a
Zlecenie KW 215/10



SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	7
WYKAZ PRAC BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY	9
1. WSTĘP	11
2. CELE PRACY	17
3. MATERIAŁ I METODY	18
3.1. Analiza receptorów chemokin w krwi obwodowej pacjentów z pierwotnie skórnymi chłoniakami wywodzącymi się z komórek T.....	18
3.2. Analiza receptorów chemokin u pacjentów z chorobami zapalnymi (toczeń rumieniowaty)	19
3.3. Analiza ekspresji antygenu CD26.....	21
3.4. Hodowla komórek Sézary'ego.....	22
4. WYNIKI	24
4.1. Receptory chemokin w zespole Sézary'ego, ziarniniaku grzybiastym oraz toczniu układowym	24
4.1.1 Podwójny potencjał migracyjny (tzw. skin homing oraz lymph node homing) nowotworowych limfocytów T w zespole Sézary'ego	24
4.1.2 Rola CCR4 w migracji komórek T w toczniu układowym.....	26
4.2. Rola antygenu CD26 w diagnostyce zespołu Sézary'ego i ziarniniaka grzybiastego	26
4.3. Hodowla komórek Sézary'ego.....	29
5. WNIOSKI.....	31
6. DYSKUSJA.....	32
7. STRESZCZENIE.....	37
8. SUMMARY.....	38
9. PIŚMIENNICTWO	39
10. PRACE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM ROZPRAWY	47

WYKAZ SKRÓTÓW

- allo-HCT – allogeneic hematopoietic cell transplantation – allogeniczna transplantacja komórek układu krwiotwórczego
- APC – antigen presenting cells – komórki dendrytyczne prezentujące antygen
- CCL – Chemokine (C-C motif) Ligand– chemokina (ligand) np. CCL10, CCL27
- CCR – Chemokine (C-C motif) Receptor - receptor dla chemokin np. CCR4, CCR10
- CD – Cluster of Differentiation – antygen różnicowania komórkowego np. CD4, CD5, CD26
- CLA – Cutaneous Lymphocyte Antigen – antygen limfocytów skórnych
- CTACK – Cutaneous T cell-Attracting Chemokine – chemokina dla skórnych limfocytów T (przyciągająca limfocyty T skóry)
- CTCL – Cutaneous T Cell Lymphoma – chłoniak pierwotnie skórny T-komórkowy
- Cy5 – Cyanin5 – cyjanina 5
- CXCR – Chemokine (CXC motif) Receptor – receptor chemokin z grupy CXC np. CXCR3
- DC – dendritic cells – komórki dendrytyczne
- EORTC – European Organization for Research and Treatment of Cancer – Europejska Organizacja ds Badań i Leczenia Nowotworów
- FCS – Fetal Calf Serum – płodowa surowica cielęca
- FITC – Fluorescein Isothiocyanate – izotiocyjanian fluoresceiny
- GM-CSF – Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
- ICAM-1 – intercellular adhesion molecule 1 – cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1
- IL – Interleukina np. IL-4, IL-7
- ISCL – International Society for Cutaneous Lymphomas – Międzynarodowe Stowarzyszenie ds. Chłoniaków Skóry
- LN– Lymph Node – węzeł chłonny
- MF – Mycosis fungoides – ziarniniak grzybiasty
- NCI – National Cancer Institute – Instytut National Cancer
- NK – Natural Killer– naturalni zabójcy
- PCR – Polymerase Chain Reaction – łańcuchowa reakcja polimerazy
- PE – Phycoerythrin – fikoerytryna
- PE-Cy5 – Phycoerythrin Cyanin 5 – tandem fluorochromów: fikoerytryny i cyjaniny
- PerCP – Peridinin-Chlorophyll-Protein – fluorochrom
- PNAd – Peripheral Node Adressin – adresyna obwodowych węzłów chłonnych
- RANTES – Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted (CCL5) – chemokina wykazująca działanie poprzez aktywację, chemotaksję, adhezję limfocytów T

RT-PCR – Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction – zmodyfikowana łańcuchowa reakcja polimerazy wykorzystująca jako matrycę mRNA (dzięki odwrotnej transkrypcji)

SAv-PerCP – Streptavidin-Peridinin-Chlorophyll-a Protein – tandem streptawidynu z PerCP

SBA – Southern Blotting Analysis – analiza Southern Blotting

SPSS – Statistical Product and Service Solutions – metoda statystyczna

SS – Sézary syndrome – zespół Sézary’ego

TARC – Thymus and Activation Regulated Chemokine – chemokina regulowana przez aktywację i grasycę

TCR – T Cell Receptor – receptor limfocytów T

TNMB – Tumor, Nodules, Metastasis, Blood – guz, węzeł chłonny, przerzut, krew

TOPO® vector – nazwa własna powiązana z kluczowym dla procesu enzymem topoizomerazą I DNA

WHO – World Health Organization – Światowa Organizacja Zdrowia

WYKAZ PRAC BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY

Podstawę niniejszej rozprawy habilitacyjnej stanowi sześć niżej wymienionych publikacji, prezentujących wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań dotyczących receptorów chemokin i antygenu CD26, odgrywających ważną rolę w trudnej diagnostyce chłoniaków pierwotnych skóry z komórek T: ziarniniaka grzybiastego i zespołu Sézary'ego oraz hodowli komórek Sézary'ego. Badania te mogą, w moim odczuciu, stanowić wartość przyczynkową do patogenezy pierwotnych chłoniaków skóry.

1. **Sokolowska-Wojdyło M**, Wenzel J, Gaffal E, Lenz J, Speuser P, Erdmann S, Abuzahra F, Bowman E, Roszkiewicz J, Bieber T, Tüting “**Circulating clonal CLA(+) and CD4(+) T cells in Sézary syndrome express the skin-homing chemokine receptors CCR4 and CCR10 as well as the lymph node-homing chemokine receptor CCR7.**” Br J Dermatol. 2005;152(2):258-64 [66] IF 2,978, MNiSW 24
2. J. Wenzel, S. Henze, E. Wörenkämper, E. Basner-Tschakarjan, **M. Sokolowska-Wojdyło**, J. Steitz, T. Bieber and T. Tüting “**Role of the Chemokine Receptor CCR4 and its Ligand Thy-mus and Activation-Regulated Chemokine/CCL17 for Lymphocyte Recruitment in Cutaneous Lupus Erythematosus**” J Invest Dermatol 2005; 124, 1241–1248 [78] IF 4,406, MNiSW 24
3. **M. Sokolowska-Wojdyło**, J. Roszkiewicz “Rola chemokin i ich receptorów w chłoniakach T-komórkowych pierwotnie skórnych.” Przegł. Dermatol 2004;91:509-515 [64] MNiSW 4
4. **M. Sokolowska-Wojdyło**, J. Roszkiewicz, W. Barańska-Rybak, E. Gaffal, A. Szczerkowska-Dobosz, J. Wenzel, T. Tüting „Ocena ekspresji antygenu CD26 na limfocytach T DC4+CLA+ krwi obwodowej pomocną metodą w diagnostyce pierwotnie skórnych chłoniaków z komórek T Przegł Dermatol 2006;93:663-666 [65] MNiSW 4
5. **M. Sokolowska-Wojdyło**, A. Maciejewska-Radomska, A. Lewandowski, W. Barańska-Rybak, H. Ługowska-Umer, J. Roszkiewicz „**Dipeptydylowa aminopeptydaza IV (CD26) w codziennej diagnostyce chłoniaków pierwotnie skórnych z komórek T (Cutaneous T Cell Lymphomas –CTCL)**” Przegł Dermatol. 2010; 97:74-78 [63] MNiSW 6
6. **M. Sokolowska-Wojdyło**, P. Speuser, T. Tüting „Hodowla nowotworowych komórek T w chłoniakach pierwotnie skórnych z komórek T – nieustające wyzwanie” Przegł Dermatol 2007;4:495-498 [67] MNiSW 4

ŹRÓDŁA FINANSOWANIA

- Stypendium Naukowe Otto Braun Falco 2002-2003, Laboratorium Dermatologii Eksperymentalnej Kliniki Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Bonn, Niemcy (Labor für Experimentelle Dermatologie der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Bonn), Niemcy, kierownik projektu: Małgorzata Sokołowska-Wojdyło
- Grant Uniwersytetu medycznego w Bonn, Niemcy, 2002-2003, Immunobiology of Cutaneous T Cell Lymphoma, kierownik projektu Małgorzata Sokołowska-Wojdyło
- Praca W-152 2003-2006 Gdański Uniwersytet Medyczny, kierownik projektu: Małgorzata Sokołowska-Wojdyło Ekspresja antygenów różnicowania (CD, cluster differentiation), ze szczególnym uwzględnieniem CD26 oraz receptorów chemokin na limfocytach T krwi obwodowej w pierwotnie skórnych chłoniakach z komórek T oraz chorobach zapalnych skóry przebiegających pod postacią erytrodermii.
- Praca Statutowa Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego ST-66 2006-2008 Nowe możliwości w diagnostyce różnicowej najczęściej występujących zapalnych dermatoz oraz nowotworów skóry

1. WSTĘP

W XVIII wieku naukowcy podjęli temat skóry jako narządu. Wcześniej rozumiano zmiany skórne jako objawy chorób wewnętrznych lub braku równowagi w dystrybucji fluidów ciała i uważano, że te zaburzenia o wiele prościej jest diagnozować poprzez analizę moczu. Giovanni Batista Morgani (1682-1771) poruszył problem wagi poszczególnych tkanek i organów. Pierwsza książka, autorstwa Anne Charles Lorry'ego, wzmiankująca o szybko rosnących, licznych guzach w obrębie skóry (niem. Fleischgewächse (sarcome)), niestety niemożliwych do zdiagnozowania współcześnie na podstawie opisu, powstała w 1776 roku. W 1806 roku, dr Albert w „Monographie des Dermatosen” zaprezentował po raz pierwszy pacjenta ze zmianami skórnymi, które opisał szczegółowo jako „pian fongoides” w 1814 roku, a w 1832 przemianował na „Mycosis fungoides” [2,3]. Opisał pacjenta, którego choroba rozpoczęła się od zmian rumieniowo-złuszczających skóry i doprowadziła go do śmierci, w stadium licznych guzów skóry, przypominających leśne grzyby, po 5 latach trwania choroby. Chociaż dr Albert zakwalifikował Mycosis fungoides do chorób wenerycznych, uznając za europejską odmianę tropikalnej choroby zwanej „ospą z Amboyna” spotykaną w Indonezji lub frambezji, to współcześnie, na podstawie jego opisu, uznaje się, że było to pierwsze doniesienie dotyczące chłoniaka pierwotnie skórno wywodzącego się z komórek T - nadal zwanego ziarniniakiem grzybiastym [21].

Kolejne kroki w diagnostyce chłoniaków poczyniono w wieku XIX. W 1845 w Rudolf Virchow stworzył termin chłoniak dla grupy guzów, które w utkaniu histopatologicznym przypominały guzy tkanek limfatycznych, np. wywodzących się z grudek chłonnych jelit. Badacz ten nie odróżniał wtedy jeszcze zmian nowotworowych od zapalnych, a ziarniniak grzybiasty uznawał za odmianę frambezji. W 1864 roku Heinrich Köbner opisał obraz histopatologiczny chłoniaka jako guza brodawek skóry, przypominającego utkaniem gąbkę. Ostatecznie powiązano MF z układem chłonnym w 1869 roku. Badania histopatologiczne prowadzone przez Xaviera Gillot oraz Louis Antonie Ranvier wykazały rozwój („regenerację”) tkanki limfatycznej w skórze i postulowali uznanie MF za skórną manifestację chłoniaka. Gillot opisał także jako pierwszy stadia tej choroby: rumieniowe (swędzące, czerwone zmiany zwane ang. patches), lichenoidalne (swędzące grudki i blaszki skórne), guzowate (guzy przypominające grzyby leśne) oraz wrzodziejące i bliznowaciejące (z rozpadem guzów) [22]. Jednak to Ernest Bazin, a nie Gillot jest uznany za twórcę stadiów klinicznych MF pomimo, że informacje na temat trzech stadiów MF opublikował rok później [6]. W 1885 roku Emile Vidal i Jean-Louis Brocq opisali trzy przypadki MF o zaskakującym przebiegu, w których od początku choroby w skórze występowały guzy, a przebieg choroby był bardzo gwałtowny. Ten typ nazywano wówczas Mycosis fungoides d'emblée. Dziś uważa się, że te przypadki są zakwalifikowane do grupy chłoniaków skóry o agresywnym przebiegu [21].

W 1892 roku opisano trzeci podtyp (jak wówczas uważano) MF erythrodermiczny. Dokonali tego Francois Hens Hallopeau i Ernest Besnier [9]. Jednak dopiero Albert Franz Sézary powiązał erythrodermię w przebiegu MF z białaczką. Swoje spostrzeżenia przedstawił w 1938 roku na spotkaniu Francuskiego Towarzystwa Dermatologii i Symilografii pod nazwą białaczkowej odmiany retikulozy skóry [61]. Dziś ta odmiana MF zwana jest zespołem Sézary'ego. Natomiast komórki Sézary'ego, wraz z charakterystycznym mózgowkształtnym jądrem, zostały opisane szczegółowo przez Lütznera w 1968 roku [46,47].

W 1975 roku po raz pierwszy uznano odrębność ziarniniaka grzybiastego i zespołu Sézary'ego. Powstające kolejno klasyfikacje chłoniaków skóry doprowadziły ostatecznie do klasyfikacji WHO (the World Health Organization) z 2008 roku powstałej na bazie klasyfikacji WHO-

EORTC (the European Organization for Research and Treatment) z roku 2005 [70,79]. Klasyfikację WHO-EORTC, którą najchętniej posługują się dermatolodzy przedstawia Tabela 1 [79].

Poszczególne typy pierwotnych chłoniaków skóry cechuje odmienny przebieg kliniczny i rokowanie w porównaniu z chłoniakami układowymi. Chłoniaki skóry mają najczęściej przebieg przewlekły, ale całkowite wyleczenie chorego rzadko jest możliwe.

Tabela 1. Klasyfikacja chłoniaków pierwotnych skóry wg WHO-EORTC [79]

<p>Pierwotne chłoniaki skóry z komórek T i NK</p> <p>Ziarniniak grzybiasty</p> <p>Odmiany ziarniniaka grzybiastego:</p> <ul style="list-style-type: none">Odmiana folikulotropowaSiatkowica pagetoidalnaSkóra obwisła i ziarniniakowa <p>Zespół Sézary'ego</p> <p>Pierwotne skórne choroby limfoproliferacyjne z komórek T CD30+</p> <ul style="list-style-type: none"><i>Lymphomatoid papulosis</i>Pierwotny skórny chłoniak anaplastyczny z dużych komórek T CD30+ <p>Białaczka / chłoniak z komórek T dorosłych</p> <p>Chłoniak z komórek T typu zapalenia tkanki podskórnej</p> <p>Chłoniak pozawęzłowy z komórek NK/T, typ nosowy</p> <p>Pierwotne chłoniaki skóry z obwodowych komórek T, odmiany rzadkie</p> <ul style="list-style-type: none">Pierwotny chłoniak skóry agresywny epidermotropowy z cytotoksycznych komórek CD8+Pierwotny chłoniak skóry z komórek T $\gamma\delta$Pierwotny chłoniak skóry z małych /średnich komórek T CD4+
<p>Pierwotne chłoniaki skóry z komórek B</p> <p>Pierwotny skórny chłoniak strefy brzeżnej</p> <p>Pierwotny skórny chłoniak z ośrodków rozmnażania</p> <p>Pierwotny skórny chłoniak rozlany z dużych komórek, typu kończynowego</p> <p>Pierwotny skórny chłoniak rozlany z dużych komórek, inne</p> <ul style="list-style-type: none">Śródnacyniowy chłoniak z dużych komórek B
<p>Nowotwór z komórek prekursorowych</p> <p>Nowotwór z blastycznych plazmocytoidalnych komórek dendrytycznych (Nowotwór hematodermiczny CD4+/CD56+ (Chłoniak blastyczny z komórek NK)</p>

Diagnostyka i leczenie pierwotnych chłoniaków skóry jest zagadnieniem interdyscyplinarnym, w które są zaangażowani lekarze dermatolodzy, onkolodzy, hematolodzy i patomorfologodzy. Rozpoznanie histopatologiczne stanowi klucz do rozpoznania.

Nacieki z atypowych limfocytów T stwierdza się zarówno w naskórku, jak i skórze właściwej, wokół mieszków włosowych, gruczołów potowych, a także w tkance podskórnej - w zależności od odmiany chłoniaka pierwotnie wywodzącego się ze skóry z komórek T. Natomiast w odmianach wywodzących się z limfocytów B naciek nowotworowy najczęściej lokalizuje się w głębszych warstwach skóry właściwej. Wiadomo, że w sąsiedztwie nowotworowych limfocytów T stwierdza się znaczną ilość komórek dendrytycznych. Obecność komórek dendrytycznych ma kluczowe znaczenie dla przetrwania komórek T i jest wykorzystywane w hodowlach linii komórkowych [70,79].

Odróżnienie rzadko występujących postaci chłoniaków skóry od ziarniniaka grzybiastego oraz prawidłowe różnicowanie zespołu Sézary'ego z erytrodemią o innej etiologii, zarówno nowotworową (erythrodermiczne postaci ziarniniaka grzybiastego – o korzystniejszym rokowaniu w porównaniu z SS), jak i zapalną (wyprysk, łuszczyca, atopowe zapalenie skóry, osutki polekowe i in.) jest kluczem do właściwego leczenia CTCL [31,38]. Podejście terapeutyczne w chłoniakach skóry uwarunkowane jest bowiem rozpoznaniem histopatologicznym i stopniem zaawansowania nowotworu, ocenianym zgodnie z klasyfikacją TNMB (Tabela 2 i 3).

Tabela 2. Klasyfikacja TNMB ziarniniaka grzybiastego oraz zespołu Sézary'ego wg ISCL/EORTC [70,79]

Skóra	
T1	Zmiany rumieniowe, grudki lub/i zmiany naciekowe zajmujące poniżej 10% powierzchni skóry
T1a	- tylko zmiany rumieniowe
T1b	- zmiany rumieniowe i naciekowe
T2	Zmiany rumieniowe, grudki lub/i zmiany naciekowe zajmujące ponad 10% powierzchni skóry
T3	Guz (pojedynczy lub liczne, o średnicy powyżej 1 cm)
T4	Erythrodermia (ponad 80% powierzchni skóry)
Węzły chłonne	
N0	Bez klinicznie badalnych nieprawidłowych węzłów chłonnych (szyjnych, nad obojczykowych, okolicy nadkłykcia przyśrodkowego kości ramiennej, pachowych, pachwinowych; centralne węzły chłonne nie są ujęte w klasyfikacji); biopsja nie jest wymagana
N1	Klinicznie nieprawidłowe (spoisłe, nieregularne, w pakietach lub o średnicy przekraczającej 1,5cm) węzły chłonne, histopatologicznie: wg NCI LN0-2 lub klasyfikacji holenderskiej: stopień 1

- N1a	- w badaniu molekularnym: poliklonalne
- N1b	- w badaniu molekularnym: monoklonalne
N2	Klinicznie nieprawidłowe węzły chłonne, histopatologicznie: wg NCI LN3 lub klasyfikacji holenderskiej: stopień 2
- N2a	- w badaniu molekularnym: poliklonalne
- N2b	- w badaniu molekularnym: monoklonalne
N3	Klinicznie nieprawidłowe węzły chłonne, histopatologicznie: wg NCI LN4 lub klasyfikacji holenderskiej: stopień 3-4, poliklonalne lub monoklonalne
Nx	Klinicznie nieprawidłowe węzły chłonne bez oceny histopatologicznej
Zajęcie narządów wewnętrznych	
M0	Bez zajęcia narządów wewnętrznych
M1	Z zajęciem narządów wewnętrznych
Stopień zajęcia krwi obwodowej	
B0	5% limfocytów krwi obwodowej o morfologii atypowych komórek Sézary'ego
- B0a	- poliklonalnych
- B0b	- monoklonalnych
B1	5% limfocytów krwi obwodowej o morfologii komórek Sézary'ego, w ilości nie spełniającej kryterium B2
- B1a	- poliklonalnych
- B1b	- monoklonalnych
B2	1000 monoklonalnych komórek Sézary'ego we krwi obwodowej lub Rozrost komórek CD3+ lub CD4+ z stosunkiem CD4/CD8 > 10 lub Rozrost komórek CD4+ o nieprawidłowym fenotypie (z utratą CD7 i CD26)

Klonalność – rearanzacja receptora TCR oceniana metodą PCR lub metodą Southern blot

Tabela 3. Klasyfikacja stopnia zaawansowania choroby wg ISCL/EORTC (stadia zaawansowane: IIB-IVB) [70,79]

	T	N	M	B
IA	1	0	0	0- 1
IB	2	0	0	0-1
IIA	1-2	1-2	0	0-1
IIB	3	0-2	0	0-1
III	4	0-2	0	0-1
IIIA	4	0-2	0	0
IIIB	4	0-2	0	1
IVA 1	1-4	0-2	0	2
IVA 2	1-4	3	0	0-2
IVB	1-4	0-3	1	0-2

Waga właściwego rozpoznania CTCL wynika z faktu, że spektrum leczenia chłoniaków różnych od ziarniniaka grzybiastego rozciąga się od postępowania zachowawczego, takiego jak w pierwotnych skórnych chorobach limfoproliferacyjnych z komórek T CD30+ np. w *lymphomatoid papulosis*, do bardzo agresywnego leczenia, jak np. w pierwotnym chłoniaku skóry z komórek T gamma/delta, czy też w pierwotnym chłoniaku skóry agresywnym epidermotropowym z cytotoksycznych komórek CD8+. Możliwości współczesnych metod leczenia najczęstszych postaci CTCL, takich jak ziarniniak grzybiasty i zespół Sézary’ego nadal niestety ograniczają się jedynie do zmniejszenia nasilenia objawów, nie wpływając na całkowity czas przeżycia chorych. Stąd najważniejszymi parametrami oferowanego leczenia powinny być bezpieczeństwo i poprawa jakości życia chorego. Dotyczy to również chemioterapii systemowej, co tłumaczy dlaczego preferuje się monoterapię lekami doustnymi, a w przypadku braku odpowiedzi - dożylnymi, o jak najmniejszym profilu toksyczności. Polichemioterapia przynosi krótkotrwały efekt i obciążona jest dużą toksycznością, stąd jej stosowanie wydaje się niecelowe. Wyjątkiem jest zastosowanie polichemioterapii u młodych chorych poniżej 40-50 roku życia jako przygotowania do allogenicznego przeszczepienia komórek układu krwiotwórczego (allo-HCT, allogeneic hematopoietic cell transplantation), która daje szansę na wyleczenie. Brak możliwości wyleczenia chłoniaków wywodzących się ze skóry zmusza do poszukiwania nowych metod terapeutycznych. Coraz częściej nowe leki powstają na bazie wiedzy na temat patogenezы choroby np. przeciwciała anty-CD25 (denilukin difitoks), anty CD20 (rituksimab), czy też przeciwciała anty-CCR4 czy anty-CCR3 [82]. Stąd zasadność badań i poszerzania wiedzy na temat biologii choroby. Badania nad chłoniakami wywodzącymi się ze skóry są także przydatne z innego względu: chłoniaki te można uznać za prototyp rozwoju nowotworu w sensie ogólnym. Bardzo trudno jest badać wczesne fazy np. chłoniaków węzłowych, gdyż są one najczęściej rozpoznawane w fazie pełnoobjawowej, zaawansowanej.

Natomiast w skórze już od okresu najdyskretniejszych zmian skórnych, często jeszcze nie nowotworowych, można prowadzić obserwację kliniczną, a także powtarzać biopsje i prowadzić szczegółowe badania nad procesami rozwoju nowotworów. Szczególnie chłoniaki skóry T-komórkowe mogą być poprzedzone zmianami zapalnymi skóry (np. przyłuszczyca wielkoogniskowa mogąca wyprzedzać MF). Także interesujące są różnice pomiędzy odmianami chłoniaków, szczególnie pomiędzy ziarniniakiem grzybiastym i zespołem Sézary'ego. W obu tych chorobach, w badaniu histopatologicznym skóry można stwierdzić takie same zmiany, a jednak przebieg tych chorób jest bardzo różny: przewlekły w MF, bardziej agresywny, z zajęciem węzłów chłonnych i odczynem białaczkowym od początku choroby w SS. Badania nad różnicami w obu ww. jednostkach chorobowych mogą przyczynić się zarówno do poszerzenia wiedzy na temat rozprzestrzeniania się procesu nowotworowego, a także nad migracją limfocytów T w ustroju [62,68,79].

Zaburzenia immunologiczne w CTCL były już wielokrotnie szczegółowo opisywane [31,41]. W większości przypadków MF i SS podkreśla się monoklonalną ekspansję limfocytów T CD4⁺ oraz ich aktywację, z której wynika produkcja licznych cytokin i czynników wzrostu oddziałujących na keratynocyty, co prowadzi do stanu zapalnego skóry właściwej i naskórka, a klinicznie wyraża się rumieniem i złuszczeniem [41]. To, w jaki sposób i dzięki jakim procesom nowotworowe komórki T namnażają się w skórze, prowadząc do rozwoju zmian nowotworowych, a z czasem dłaczego dochodzi do ich rozsiewu (przerzutowania) do węzłów chłonnych, krwi obwodowej i narządów wewnętrznych, pozostaje wciąż nurtującym problemem. Coraz częściej podnosi się rolę chemokin i ich receptorów, uznając je odpowiedzialnym za proces wybiórczej migracji limfocytów T (zwanej po angielsku *T cell homing*) zarówno w stanie zapalnym jak i wstanie rozwoju nowotworu [30,48,59].

Chemokiny to grupa białek wielkości 8-11kDa, która można podzielić w zależności od rozmieszczenia cysteiny na cztery podgrupy: C, CC, CXC, CX3C [14]. Nazewnictwo chemokin i ich receptorów opiera się na numeracji (numery nadawano w kolejności odkrywania / opisywania cząstek). Do każdego numeru dodana jest litera L – gdy mamy do czynienia z ligandem lub R – gdy z receptorem. Większość poznanych chemokin (ponad 50) należy do rodzin CC i CXC. Chemokiny oddziałują z komórkami przez błonowe domeny receptorów białkowych. Opisano dotychczas 18 receptorów chemokin. Niektóre z nich łączą się z kilkoma chemokinami, jak i poszczególne chemokiny mogą oddziaływać na kilka receptorów [14,59,64].

2. CELE PRACY

1. Ocena ekspresji receptorów chemokin CCR4, CCR7, CCR10 na komórkach CD4+CLA+ migrujących do skóry (ang. skin homing) we krwi pacjentów z chłoniakami skóry: zespołem Sézary'ego i ziarniniakiem grzybiastym, z chorobą zapalną (tocznikiem układowym) oraz u osób zdrowych.
2. Analiza przydatności utraty antygenu CD26 na limfocytach T w diagnostyce oraz ocenie progresji / regresji chłoniaków pierwotnie wywodzących się ze skóry z komórek T oraz chorobach zapalnych.
3. Hodowla nowotworowych limfocytów T pacjenta z zespołem Sézary'ego jako próba wprowadzenia linii komórek Sézary'ego.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Analiza receptorów chemokin w krwi obwodowej pacjentów z pierwotnie skórnymi chłoniakami wywodzącymi się z komórek T.

- Diagnoza chłoniaków pierwotnych skóry (CTCL – Cutaneous T Cell Lymphoma) została ustalona na podstawie obrazu klinicznego, badania histopatologicznego, metod immunohistochemicznych oraz molekularnych zgodnych z przyjętymi kryteriami EORTC (European Organisation of Research and Treatment of Cancer). Wiek pacjentów i zdrowych ochotników wynosił odpowiednio 50-81 lat i 30-50 lat. Wszystkie osoby poddane badaniu stanowiły populację rasy kaukaskiej.
- Izolacja komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej (PMBC) osób badanych (pacjentów z Klinik Dermatologii Uniwersytetów Medycznych w Bonn (Niemcy), Aachen (Niemcy) i Gdańsku (Polska)) została wykonana w gradiencie gęstości, stosując do tego celu Ficoll jako mieszaninę rozdzielającą (Lymphoprep™ (Axis-Shield PoC AS, Norway)). Wśród osób poddanych badaniom wyodrębniono 3 grupy: pacjentów z zespołem Sézary'ego (5 chorych), pacjentów z ziarniniakiem grzybiastym (6 chorych) i zdrowych ochotników (4 osoby).
- U wszystkich osób przeprowadzono Immunofenotypowanie komórek krwi obwodowej oraz klonowanie i sekwencjonowanie TCRβV.

Do analiz wykorzystano następujące przeciwciała:

- IO Test Beta Mark TCRVβ Repertoire Kit® - TCRVβ2/FITC (MPB2D5), TCRVβ17/FITC (E17.5F3.15.13), CD4 PC5 (I3B8.2), IgG1/FITC (679.1Mc7), IgG1 PE (679.1Mc7), IgG1 PC5 (679.1Mc7) firmy Beckman Coulter, Fullerton;
- anty- CCR7 PE (3D12), CCR4 PE (1G1), CLA biotin/FITC (HECA 452), CD3 FITC/PE (SK7), CD4/ FITC (RPA-T4), CD4 PE (SK3), CD4 PerCP (Leu-3a), CD8 PerCP (Leu-2a), IgG1 PerCP (X40), IgM biotin (R4-22), IgG1 (MOPC 21) firmy BD Pharmingen, San Diego, CA, USA;
- przeciwciała kozie F(ab)₂ anty-mysie IgG PE i kozie F(ab)₂ anty-mysie IgG (H+L) Cy-5 firmy Jackson Immuno Research Lab. Inc, West Grove, PA, USA oraz Streptavidin PerCP firmy BD Pharmingen, San Dirgo, CA, USA.
- oczyszczone monoklonalne mysie przeciwciało CCR10 IgG (klon 1908) zostało przygotowane przez DNAX Research Institute (Palo Alto, USA). W celu wykrycia aktywności CCR10 reakcję przeprowadzono stopniowo, wykorzystując kolejno następujące przeciwciała: monoklonalne przeciwciało anty-CCR10, kozie anty-mysie przeciwciało IgG PE, następnie biotynylowane monoklonalne przeciwciało anty-CLA oraz polimer peroksydazy chrzanowej ze streptawidyną (Streptavidin PerCP) i przeciwciało anty-CD4 znakowane FITC.
- IO Test Beta Mark TCRVβ Repertoire Kit® został wykorzystany zgodnie z załączonym protokołem.

Wyniki analizy IO Test Beta Mark TCRVβ Repertoire Kit® zweryfikowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej z przeciwciałem przeciw dominującemu fragmentowi łańcucha TCRβV (TCRβV2 lub TCRβV17) i następowym barwieniem przeciwciałami anty-mysimi Cy-5 IgG oraz CD3/ FITC i CCR4 PE. Ponadto wykorzystano metodę hot start PCR

oraz RT-PCR stosując w tym celu PAX gene Blood RNA Kit (Quiagen, Valencia, CA, USA). cDNA komplementarne wygenerowano z 1µg RNA z wykorzystaniem oligonukleotydów pełniących rolę starterów (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) i odczynników cMaster RT plus PCR System and cMaster RT Kit (Eppendorf, Hamburg, Niemcy) w następujących warunkach: 42 °C przez 70 min, następnie 85 °C przez 5 min. Reakcję PCR przeprowadzono w próbkach o objętości 50 µl z odczynnikami cMaster RT plus PCR System i cMaster RT Kit (Eppendorf jw.) i starterami opisanymi ww. teście.

TCRVβ: 5'-GCTTCTACATCTGCAGTGC-3' i 5'TTCTGATGGCTCAAACACAG-3'
dla pacjenta allele 1
oraz 5'CCAAAAGAACCCGACAGCTTTC-3' i 5'TTCTGATGGCTCAAACACAG-3'
dla allele 2.

Warunki reakcji: wstępna denaturacja 94 °C – 5 minut, 35 cykli replikacyjnych, które obejmowały: denaturację właściwą 94°C – 30 sekund, hybrydyzację (dołączanie starterów) 58 °C – 30 sekund, elongację (wydłużanie starterów) 68 °C – 1 minuta, oraz 5 minutową inkubację w temp. 68 °C w celu dokończenia niekompletnych syntez i pełnej hybrydyzacji pojedynczoniowych komplementarnych produktów. Produkty reakcji PCR zanalizowano w aparacie do elektroforezy na 2% żelu agarozowym. Zamplifikowane fragmenty DNA o 130 i 150 par zasad (Qiaex II, Quiagen) wklonowano do wektora TOPO (TOPO-TA Cloning System®, Invitrogen, San Diego, CA, USA). Produkty klonowania poddano sekwencjonowaniu w MWG-Biotech AG (Ebersberg, Niemcy).

- Trójbarwna cytometria przepływową została przeprowadzona z 5×10^5 stężonych leukocytów wyizolowanych z krwi obwodowej pacjentów (LymphoprepTM, Axis-SHield PoC, AS, Oslo, Norwegia) lub 10 µl krwi pełnej pobranej na EDTA. Próbkę inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami w 4 °C i przechowywano w -80 °C w RPMI medium zawierającym 10% płodową surowicę bydlęcą i 10% DMSO. Po utrwaleniu komórek Cytofix Buffer® (BD Pharmingen) badanie cytometryczne przeprowadzono z zastosowaniem aparatu FACScan i oprogramowania CellQuest® (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

3.2. Analiza receptorów chemokin u pacjentów z chorobami zapalnymi (toczeń rumieniowaty)

- Materiał do badań stanowiły wycinki skórne i krew pobrane od 25 pacjentów (17 kobiet i 8 mężczyzn) z toczniem rumieniowatym w fazie zaostrzenia choroby (5 pacjentów z odmianą ograniczoną do jednej lokalizacji skórno tocznia bliznowaciejącego, 4 z odmianą rozsianą skórno tocznia bliznowaciejącego, 11 z podostrą skórną postacią tocznia, 5 z podtypem choroby układowej). Grupę kontrolną stanowiło 15 osób, w tym: 5 osób zdrowych, 5 pacjentów z łuszczycą i 5 pacjentów z półpaścem, w przedziale wiekowym od 18 do 72 roku życia. Wszystkie osoby były rasy kaukaskiej. Przed pobraniem wycinków skóry pacjenci nie byli leczeni z powodu zaostrzenia choroby podstawowej
- Barwienie immunohistochemiczne bioptatów skóry utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie przeprowadzono z wykorzystaniem następujących przeciwciał monoklonalnych: anty-CCR4 (1G1, biotin), CLA (HECA452) (firmy BD-Pharmingen, San Diego, California), TARC/CCL17 (ETR01) (firmy R&D Systems, Minneapolis, Minnesota), CD4 (1F6 firmy Novocastra, Newcastle, UK), CD3 (F7238), CD8 (C8/144B), CD20 (L26), i granzym B (GrB7) (firmy DAKO, Hamburg, Germany). Inkubacje z pierwszym przeciwciałem prowadzono przez 2 godziny. Do kolejnego barwienia stosowano

wano zestaw LSAB2 staining kit® (DAKO) oraz przeciwciała anty-mysie znakowane TRITC i królicze znakowane FITC. Badania były przeprowadzone przez dwóch niezależnych dermatologów metodą zaślepioną. Komórki liczone w powiększeniu $\times 200$. Ekspresja TARC/CCL17 była oceniana metodą półilościową (0, +, ++, +++).

- Analiza metodą cytometrii przepływowej:
 - leukocyty izolowano z krwi pobranej na heparynę z wykorzystaniem gradientu gęstości (Lymphoprep™, Axis –Shield PoC AS, Norwegia). Do analizy zastosowano przeciwciała CCR4 PE (1G1), CLA/ FITC (HECA452), CD3 PE/PerCP (SK7), CD4 PerCP (SK3), CD8/ FITC (SK1) oraz przeciwciała izotopowe (BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey)
 - analizy dokonano na wycinkach skórnych świeżych i mrożonych (-80 °C, w RPMI medium z 10% płodową surowicą bydlęcą oraz 10% DMSO) – nie stwierdzono różnic w wynikach uzyskanych z materiału mrożonego oraz świeżego;
 - analizę metodą trójkolorowej cytometrii przepływowej przeprowadzono po inkubacji 5×10^5 stężonych leukocytów z odpowiednimi przeciwciałami monoklonalnymi. Komórki utrwalano w Cytifix Buffer® (BD Pharmingen) i analizowano z wykorzystaniem aparatu FACScan oraz oprogramowania Cell Quest® (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) i WinMDI 2.8®.
- Stężenie TARC/CCL17 badano metodą ELISA (Quantikine, R&D Systems) zgodnie z protokołem.
- Test migracji chemokin przeprowadzono na płytkach z 24-studzienkami (5 μm) (Costar, Cambridge, Massachusetts). 5×10^5 komórek inkubowano na membranach w 37 °C z RPMI-1640 z 0,4% płodową surowicą bydlęcą. Określono optymalne stężenie migracyjne rekombinowanego TARC/CCL17 (R&D System) metodą seryjnych rozcieńczeń. W celu oceny indeksu chemotaktycznego zebrano do TruCOUNT tubes® 20 μl komórek migrujących w ciągu 2 godzin w 37 °C do dolnej studzienki oraz 20 μl komórek z górnej studzienki (BD Pharmingen). Następnie komórki analizowano metodą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem aparatu FACScan oraz oprogramowania Cell Quest® (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) i WinMDI 2.8®. Migracja podstawowa (basal migration) i migracja do TARC/CCL17 były oceniane indeksem chemotaktycznym (migracja specyficzna komórek / migracja niespecyficzna komórek).
- Wszystkie eksperymenty powtórzono trzykrotnie.
- Analiza statystyczna:
 - Ekspresję CCR4, CD4, CD8 i granzymu B w cytometrii przepływowej oraz immunohistochemii oceniono testem nieparametrycznym U Manna-Whitney’a. Wartości p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych) dla danych nieparametrycznych obliczono przy zastosowaniu testu Kruskala-Wallisa. Ekspresja CCR4, CD4, CD8 i granzymu B w cytometrii przepływowej oraz immunohistochemii oceniono testami nieparametrycznymi. Testy Kruskal-Wallis oraz Mann-Whitney wykorzystano do analizy różnic pomiędzy grupami. Za statystycznie znaczącą różnicę uznano $p < 0,05$, a $p < 0,01$ za wysoce znaczącą statystycznie.

3.3. Analiza ekspresji antygeny CD26

Do analizy wstępnej pobrano 49 próbek krwi od 16 pacjentów z ziarniniakiem grzybiastym, 7 pacjentów z zespołem Sézary'ego w ciągu 16 miesięcy terapii oraz od 11 osób zdrowych, które stanowiły grupę kontrolną. Przeanalizowano także próbki krwi 41 pacjentów z dermatozami zapalnymi (w tym 14 pacjentów z erythrodermią: w przebiegu łuszczycy (5 pacjentów), atopowego zapalenia skóry (6 pacjentów), pityriasis rubra pilaris (2 pacjentów) i actinic reticuloid (1 pacjent).

W przypadku 2 pacjentów z zespołem Sézary'ego analizę powtórzono wielokrotnie w ciągu 12 miesięcy w celu oceny poziomu ekspresji badanego antygeny po zastosowanym leczeniu. W ten sposób monitorowano kliniczną odpowiedź pacjentów na wdrożone leczenie w oparciu o ekspresję antygeny CD26.

Trójbarwna cytometria przepływowa została przeprowadzona z 5×10^5 stężonych leukocytów wyizolowanych z krwi obwodowej inkubowanych z odpowiednimi przeciwciałami w 4 °C lub 10 µl świeżej krwi pobranej na EDTA z przeciwciałami:

- do oceny fenotypu limfocytów T we krwi obwodowej: CD3 FITC/PE (SK7), CD4 PC5 (I3B8.2), CD4 FITC (RPA-T4), CD4 PE (SK3), CD4 PerCP (Leu-3a), CD8 PerCP (Leu-2a) (BD Pharmingen)
- przeciw antygenom CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen) występującym na limfocytach migrujących do skóry, także w CTCL: CLA biotin/FITC (HECA 452) firmy BD Pharmingen
- przeciw chemokinie stwierdzonej na limfocytach migrujących do skóry: CCR4 PE (1G1) firmy BD Pharmingen
- przeciw antygenom: CD7 FITC (4H9), CD26 PE (L272)
- kontrolnymi: IgG1/FITC (679.1Mc7), IgG1 PE (679.1Mc7), IgG1 PC5 (679.1Mc7) firmy Beckman Coulter; IgG1 PerCP (X40) firmy BD Pharmingen

Analiza statystyczna została przeprowadzona z wykorzystaniem programu SPSS (wersja 11, SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Istotność różnic wartości średnich pomiędzy grupami sprawdzano testem nieparametrycznym U Manna-Whitney'a. Określono czułość i specyficzność metody.

Następnie metodą cytometrii przepływowej określono immunofenotyp komórek krwi obwodowej 71 pacjentów z podejrzeniem lub rozpoznaniem chłoniaków pierwotnie skórnych z komórek T (6 pacjentów z zespołem Sézary'ego, 33 z pozostałymi T-komórkowymi chłoniakami skóry i 32 osoby z dermatozami zapalnymi o ciężkim przebiegu, sugerującymi rozwój chłoniaka, którego ostatecznie nie potwierdzono) leczonych w Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Szpitala Klinicznego Akademii Medycznej w Gdańsku (aktualnie Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) w okresie od 1.01.2006 (od dnia wprowadzenia CD26 do rutynowej diagnostyki) do 31.03.2008. Typowanie przeprowadzono także z wykorzystaniem przeciwciał przeciw antygenom linii T: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$ oraz CD 25 (komórki regulatorowe) oraz antygenom linii B: CD19 i NK: CD16&56/CD3. Określono procentowy skład limfocytów T, B i NK, stosunek limfocytów T4 do T8. Przeprowadzono także badanie immunocytochemiczne krwi obwodowej w celu znalezienia komórek limfoidalnych Lütznera/Sézary'ego.

3.4. Hodowla komórek Sézary'ego

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej wyizolowano z krwi pobranej na heparynę od 62-letniej kobiety z zespołem Sézary'ego (SS) i od kobiety zdrowej z wykorzystaniem gradientu gęstości (Lymphoprep™ Axis-Shield PoC AS, Norway). Diagnoza SS u pacjentki została ustalona w oparciu o objawy kliniczne, obraz histopatologiczny i immunohistochemiczny oraz badania molekularne (zgodnie z przyjętymi kryteriami EORTC)[80]. Pacjentka chorowała od 2 lat. Obraz kliniczny stanowiły erythrodermia, świąd, limfadenopatia, rozlane łysienie i leukocytoza (WBC 12 100/ml). Wśród białych krwinek stwierdzono 77% limfocytów CD4+, 4% limfocytów CD8+. Stosunek CD4/CD8 wynosił 19,25. 66% limfocytów CD4+ wykazywał fenotyp CLA+. Dominujący fenotyp TCRβV20-1 (wg Lefranc'a) wykazywało 74-93% limfocytów CD4+. Fenotyp ten potwierdzono poprzez ocenę monoklonalności rearanżacji genu TCR i sekwencjonowanie. Pacjentka była leczona PUVA, fotoferezą pozaustrojową, IFNα, metotreksatem, doksorubicyną oraz glikokortykosteroidami ogólnie i miejscowo.

Wyizolowane leukocyty hodowano z cytokinami IL-7 (10 ng/ml) i IL-2 (10 U/ml) w celu stymulacji wzrostu nowotworowych komórek T oraz GM-CSF (800 U/ml) i IL-4 (1000 U/ml) (R&D System, Minneapolis) w celu wyróżnicowania komórek dendrytycznych wywodzących się z linii monocytów z monocytów, w RPMI 1640 z dodatkiem 20% autologicznego serum, 1% AB/AM (antibiotica / antimycotica), wyjściowo 1-24 mln komórek na studzienkę. Przewadzono też porównawczą hodowlę z wszystkimi wymienionymi cytokinami i z FCS (Fetal Calf Serum) zamiast autologicznego serum oraz z serum autologicznym i tylko z IL-7 lub tylko z IL-2 i IL-7.

- Cytometria przepływową:

- Do analizy komórek wykorzystano następujące przeciwciała: IO Test Beta Mark TCRVβ Repertoire Kit, TCRVβ2/FITC (MPB2D5), TCRβV2FITC (TCRβ20-1) (E17.5F3.15.13), CD4 PC5 (I3B8.2), IgG1/ FITC (679.1Mc7), IgG1 PE (679.1Mc7), IgG1 PC5 (679.1Mc7) wszystkie firmy Beckman Coulter; CCR4 PE (1G1), CLA biotin/FITC (HECA 452), CD3 FITC/PE (SK7), CD4/ FITC (RPA-T4), CD4 PE (SK3), CD4 PerCP (Leu-3a), CD8 PerCP (Leu-2a), IgG1 PerCP (X40), IgM biotin (R4-22), IgG1 (MOPC 21) wszystkie firmy BD Pharmingen.
- Trójkolorowa cytometria przepływową została przeprowadzona z 5×10^5 stężonych komórek hodowlanych z hodowli z wymienionymi przeciwciałami. IO Test Beta Mark TCR Vβ Repertoire Kit był wykorzystany zgodnie z załączonym protokołem w celu oceny obecności dominującego klonu w komórkach przygotowanych do hodowli (wyjściowych). Rezultat testu zweryfikowano wykorzystując trójkolorową cytometrię przepływową z monoklonalnym przeciwciałem przeciwko dominującemu łańcuchowi TCRβV20-1 i następnym barwieniem: anti-mouse-Cy5 IgG, CD4 FITC oraz CCR4 P lub TCRβV20-1 FITC i CD3PE. Typ TCRVβ20-1 potwierdzono także sekwencjonowaniem cDNA – wg Lefranc'a: fragm. TCRβV20-1*01.D1*01.J1-2*01..-βCpar = fragm. TCRβV2 (dawna nomenklatura):

```
GCTTCTACATCTGCAGTGCTAGAGAGGCAG
GGGGCGAAGGTGGCTACACCTTCGGTTCGG
GGACCAGGTTAACCGTTGTAGAGGACCTGA
ACAAGGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTT
TGAGCCATCAGAA
```

Po barwieniu próbki utrwalano przez dodanie Cytifix TM Buffer (BD Biosciences Pharmingen) i analizowano z wykorzystaniem cytometru FACSscan flow cytometer (Becton Dickinson).

4. WYNIKI

4.1. Receptory chemokin w zespole Sézary'ego, ziarniniaku grzybiastym oraz toczeniu układowym

4.1.1 Podwójny potencjał migracyjny (tzw. skin homing oraz lymph node homing) nowotworowych limfocytów T w zespole Sézary'ego

Publikacja M. Sokolowska-Wojdyło, Wenzel J, Gaffal E, Lenz J, Speuser P, Erdmann S, Abuzahra F, Bowman E, Roszkiewicz J, Bieber T, Tüting "Circulating clonal CLA(+) and CD4(+) T cells in Sézary syndrome express the skin-homing chemokine receptors CCR4 and CCR10 as well as the lymph node-homing chemokine receptor CCR7" *Br J Dermatol.* 2005;152:258-64 [66] była jedną z pierwszych poruszających problem roli chemokin i ich receptorów, zarówno w aspekcie procesu migracji limfocytów T do skóry (tzw. sn homing), jak i do węzłów chłonnych (lymph-node homing), w ziarniniaku grzybiastym i zespole Sézary'ego. Szczególnie interesujący wydał się fakt, że zespół Sézary'ego, od początku choroby przebiega z limfadenopatią i odczynem białaczkowym, w przeciwieństwie do pozostałych CTCL, ograniczających się w pierwszych okresach choroby wyłącznie do skóry [27,53,71,79]. Grupa CTCL stanowi tym samym znakomity model badawczy nad naturą wywodzących się ze skóry nowotworowych limfocytów T o różnym potencjale migracyjnym.

Zainteresowani różnicą w potencjale migracyjnym nowotworowych limfocytów T w zespole Sézary'ego i pozostałych chłoniakach z grupy CTCL, postanowiliśmy ocenić receptory chemokin na powierzchni komórek T we krwi obwodowej, ze szczególnym uwzględnieniem CCR4 i CCR10 związanych z wędrówką limfocytów T do skóry oraz CCR7, który jest odpowiedzialny za migrację do węzłów chłonnych [30,48,54,59].

Zgodnie z naszym domniemaniem, że komórki T CLA+CD4+ wykazują ekspresję receptorów chemokin CCR4 i CCR10, udowodniliśmy to w przeprowadzonych badaniach. Wysoką ekspresję CCR4 stwierdziliśmy jednak zarówno we krwi chorych z MF, jak i SS, co nie pozwala, na tej podstawie, na różnicowanie tych dwóch odmian CTCL. Natomiast odmienności ekspresji CCR10 we krwi obwodowej w MF i SS okazały się wystarczające dla różnicowania tych dwóch odmian chłoniaka. Interesującym był także wynik eksperymentu z receptorem CCR7: potwierdzono wysoką ekspresję tego receptora na komórkach nowotworowych w zespole Sézary'ego. Receptor ten jest współodpowiedzialnym za wędrówkę komórek T do węzłów chłonnych. W przeciwieństwie do CCR4: obecności CCR7 na powierzchni limfocytów T w przypadku MF oraz osób zdrowych stwierdzono tylko na niewielkim odsetku komórek.

Koncepcja istnienia w organizmie dwóch podtypów komórek T pamięci (centralnych i obwodowych) została zaproponowana w oparciu o różnicę w ekspresji na ich powierzchni cząsteczek CD62L i CCR7. Na większości komórek pamięci T nie stwierdza się obecności tych molekuł i te komórki najczęściej spotykane są w tkankach obwodowych. Na limfocytach T należących do tak zwanej subpopulacji "centralnych" komórek pamięci T stwierdza się obecność obydwu cząstek CD62L i CCR7, co pozwala tym limfocytom na swobodny dostęp do węzłów chłonnych oraz krążenie we krwi. Wykazano, że u ludzi limfocyty T CLA+, CCR4+, CCR10+ mogą być zarówno CCR7+ jak i CCR7-, co może tłumaczyć możliwość kontaktu z antygenem zarówno w tkankach obwodowych jak i w węzłach chłonnych. Stwierdzono także, że większość krążących komórek T CD4+ CLA+ w chłoniakach CTCL wykazuje na swej powierzchni ekspresję receptora CCR4, należącego do grupy skin homing recep-

tors, czym tłumaczy się zjawisko epidermotropizmu charakterystyczne dla tego typu nowotworów. Wykazano też, że zaktywowane keratynocyty produkują chemokinę CTACK/CCL27, która oddziałując z receptorem CCR10 obecnym na powierzchni skórnych efektorowych komórek T oraz limfocytach T pamięci wspomaga proces rekrutacji tych komórek do skóry. Zablockowanie chemokiny CCL27 utrudnia wędrówkę do skóry komórek T CCR4+.

Analizując ekspresję receptorów chemokin na limfocytach T pacjentów z zespołem Sézary'ego i ziarniniakiem grzybiastym w przedstawionej pracy stwierdzono istotne różnice. Wiadomo, że komórki CLA+ biorą udział nie tylko w procesie migracji komórek nowotworowych do skóry (skin homing), ale także uczestniczą w wielu zapalnych dermatozach. Wiadomo, że ekspresja antygenu CLA+ na limfocytach CD4+ koreluje z nasileniem procesu rozrostowego w MF – potwierdziły to także nasze badania. Wykorzystując specyficzne przeciwciała monoklonalne TCR β V potwierdziliśmy, że znaczna liczba komórek T CLA+CD4+ wykazuje ekspresję pojedynczego rodzaju TCR β V. Jednak jako pierwszym badaczom udało się nam udowodnić, że większość komórek T CLA+CCR4+CD4+ w CTCL wykazuje także ekspresję CCR10. Także większość komórek T z jednorodną rearanżacją monoklonalną TCR β V wykazuje ekspresję CCR10. Dane te wspierają hipotezę, że CLA, CCR4 i CCR10 współdziałają w migracji komórek nowotworowych do skóry.

W zależności od obecności na powierzchni komórek T receptora odpowiedzialnego za migrację do węzłów chłonnych (CCR7) podzielono limfocyty T pamięci na obwodowe (CCR7-) i centralne (CCR7+). Nasze badania wykazały, że znaczący procent klonalnych limfocytów pamięci CLA+CD4+ u pacjentów z zespołem Sézary'ego wykazuje ekspresję zarówno CCR4 i CCR10 związanych z procesem wędrówki do skóry (ang. skin-homing) jak i CCR7, odpowiedzialnego za migrację do węzłów chłonnych (ang. lymph node homing). Istnieje możliwość, że nowotworowe limfocyty T poddane są rekrutacji do skóry przez CCR4, a następnie wracają do krwi obwodowej dzięki CCR7. Jednak współistnienie ww chemokin nie jest wystarczające do wytłumaczenia przyczyny obecności komórek T w zespole Sézary'ego we krwi od początku choroby. Badaliśmy bowiem także ekspresję innej cząstki odpowiedzialnej za migrację komórek T do węzłów chłonnych - CD62L i zaobserwowaliśmy współistnienie CD62L+ zarówno z CCR7+ jak i CCR7-. Możliwe jest, iż klon nowotworowych komórek T przechodzi funkcjonalne przemiany w trakcie procesu migracji w organizmie. Niemniej rola receptorów chemokin w tym procesie jest niepodważalna. Nowatorskim wynikiem pracy było potwierdzenie istnienia złośliwego rozrostu komórek T o potencjale wędrówki zarówno do skóry jak i do węzłów chłonnych (ang. skin homing central memory T cells).

Przedstawiona praca była cytowana 35 razy przez badaczy podejmujących temat chemokin i ich receptorów (zgodnie z Google Scholar).

Wiedzę przeglądową tamtego okresu na temat chemokin i ich receptorów w chłoniakach pierwotnych skóry wywodzących się z komórek T podsumowano w pracy **M. Sokołowska-Wojdyło, J. Roszkiewicz** "Rola chemokin i ich receptorów w chłoniakach T-komórkowych pierwotnie skórnych." *Przegl Dermatol.* 2004;91:509-515 [64].

4.1.2 Rola CCR4 w migracji komórek T w toczeniu układowym

W pracy **J. Wenzel, S. Henze, E. Wörenkämper, E. Basner-Tschakarjan, M. Sokołowska-Wojdyło, J. Steitz, T. Bieber and T. Tüting** “**Role of the Chemokine Receptor CCR4 and its Ligand Thymus- and Activation-Regulated Chemokine/CCL17 for Lymphocyte Recruitment in Cutaneous Lupus Erythematosus**”. *J Invest Dermatol* 2005; 124, 1241–1248 [78] także stwierdzono, że znaczna liczba komórek pamięci T CLA⁺ wykazuje na swej powierzchni ekspresję receptora chemokiny 4 (CCR4). Oddziaływanie pomiędzy CCR4 a ligandem TARC/CCL17 (ang. thymus and activation related chemokine) na zaktywowanych komórkach śródbłonna naczyń umożliwia limfocytom T ekstrawazację dzięki zależnej od integryn adhezji komórek T CLA⁺ do cząstek ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), obecnych na powierzchni komórek śródbłonna. Oddziaływanie to jest znane także w patogenezie chorób zapalnych. W pracy poruszono temat ekspresji chemokiny TARC (CCL17) oraz jej receptora CCR4 w zapalnej chorobie skóry: toczeniu rumieniowatym skórny. Stwierdzono wysoki odsetek limfocytów T CCR4⁺ w skórze pacjentów. W toczeniu bliźnowaciejącym z licznymi zmianami skórnymi potwierdzono także obecność licznych krążących limfocytów T CD8⁺ CCR4⁺. Zaobserwowano nacieki z cytotoksycznych komórek T CCR4⁺ w strukturach warstwy podstawnej naskórka oraz przydatków towarzyszące keratynocytom o cechach apoptotycznych.

Rola CCR4/CCL17 w patogenezie toczenia nie wyklucza udziału tej cząstki w ewolucji pierwotnych chłoniaków skóry. Potwierdza tylko złożoność procesów, w których chemokiny i ich receptory odgrywają istotną rolę.

Przedstawiona praca była cytowana 26 razy przez badaczy podejmujących temat chemokin i ich receptorów (zgodnie z Google Scholar).

4.2. Rola antygeny CD26 w diagnostyce zespołu Sézary’ego i ziarniniaka grzybiastego

Antygen CD26 (dipeptydylowa peptydaza IV) był tematem prac badawczych:

- **M. Sokołowska-Wojdyło, J. Roszkiewicz, W. Barańska-Rybak, E. Gaffal, A. Szczerkowska-Dobosz, J. Wenzel, T. Tüting** Ocena ekspresji antygeny CD26 na limfocytach T DC4⁺CLA⁺ krwi obwodowej pomocną metodą w diagnostyce pierwotnie skórnych chłoniaków z komórek T *Przeł Dermatol* 2006;93:663-666 [65]
- **M. Sokołowska-Wojdyło, A. Maciejewska-Radomska, A. Lewandowski, W. Barańska-Rybak, H. Ługowska-Umer, J. Roszkiewicz** „Dipeptydylowa aminopeptydaza IV (CD26) w codziennej diagnostyce chłoniaków pierwotnie skórnych z komórek T (Cutaneous T Cell Lymphomas – CTCL)” *Przeł Dermatol* 2010; 97: 74-78 [63]

Pomimo, iż zgodnie z przeprowadzonymi wcześniej badaniami można różnicować zespół Sézary’ego, postaci erythrodermiczne CTCL oraz choroby zapalne wykorzystując receptory chemokin CCR4, CCR7 i CCR10, to ich przydatność w codziennej diagnostyce jest ograniczona koniecznością stosowania wszystkich trzech metod w tej samej analizie, co podnosiło znacznie koszty badania. Ponadto analiza ekspresji CCR10 była czasochłonna, ze względu na konieczność wielostopniowego barwienia przeciwciała.

W piśmiennictwie znajdujemy liczne doniesienia na temat zastosowania analizy ekspresji antygeny CD7 w diagnostyce CTCL [35,52,76]. Utrata antygeny CD7 jest obserwowana zarówno w SS jak w i w zaawansowanych stadiach innych odmian CTCL. Antygen CD7 jest jednak niedoskonały w różnicowaniu SS i innych postaci chłoniaków skóry. Interesujące wydały się nam doniesienia na temat utraty ekspresji antygeny CD26 na limfocytach T krwi obwodowej w zespole Sézary'ego. Ponieważ komórki nowotworowe T krążące we krwi obwodowej pacjentów z zespołem Sézary'ego oraz w zaawansowanych stadiach pozostałych CTCL wykazują fenotyp CD4+CLA+CCR4+ postanowiliśmy zbadać obecność antygeny CD26 w powiązaniu z wymienionym fenotypem [34,35].

Celem wspomnianej pracy była ocena przydatności analizy fenotypu CLA+CD4+CD26-, CLA+CD4+CD7- oraz CCR4+CLA+CD4+ we krwi obwodowej u pacjentów z zespołem Sézary'ego i ziarniniakiem grzybiastym w diagnostyce chłoniaków pierwotnie skórnych z komórek T [65].

W przeprowadzonych badaniach ekspresja CLA i CCR4 na powierzchni limfocytów T była wysoka zarówno we krwi pacjentów z zespołem Sézary'ego jak i ziarniniakiem grzybiastym. Z doniesień literaturowych wiadomo, że wysoką ekspresję CLA+CCR4+ obserwowano nie tylko w CTCL, ale także na limfocytach T we krwi obwodowej w chorobach zapalnych skóry (atopowe zapalenie skóry, łuszczyca, skórny toczeń rumieniowaty) [18,33,75,78]. W naszym badaniu obserwowano wzrost ekspresji CR4+CLA+CD4+ u wszystkich pacjentów z zespołem Sézary'ego, ale także u części pacjentów z MF, z czego wynikała specyficzność tylko około 44%. Utratę CD7 i CD26 opisywano już wcześniej na krążących komórkach Sézary'ego [8,35,77,40]. Czulość badania utraty antygeny CD7 na komórkach T CLA+CD4+ we krwi obwodowej naszych pacjentów odpowiadała 71%, natomiast specyficzność 94%. Bardziej znaczącą różnicę zaobserwowano w przypadku utraty antygeny CD26 na komórkach CLA+CD4+ krwi obwodowej. Stwierdzenie fenotypu CD26-CLA+CD4+ u wszystkich pacjentów z SS odpowiada czulości 100% w tej grupie pacjentów. Ponieważ jednak fenotyp ten stwierdzono także u 2 pacjentów w zaawansowanym stadium MF specyficzność badania ograniczona była do 88%. Taki wynik sugeruje jednak utratę antygeny CD26 w zaawansowanych stadiach MF, co stanowi klinicznie bardzo przydatną informację.

Wielokrotna analiza z wykorzystaniem antygenów CD7, CD26 i CCR4 przeprowadzona metodą immunofenotypowania krwi obwodowej u pacjentów z zespołem Sézary'ego w ciągu roku potwierdziła ścisłą korelację pomiędzy wdrażanymi pulsami chemioterapii a fenotypem komórek nowotworowych. Wyraźny spadek ekspresji fenotypu CLA+CD26+CD4+ obserwowano około 2 tygodnie po wdrożonej chemioterapii [65].

W przeprowadzonych badaniach wykazaliśmy, że fenotyp CD26-CLA+CD4+ jest wysoce specyficznym i czułym markerem pacjentów z zespołem Sézary'ego, czulszym niż utrata antygeny CD7 i bardziej specyficznym niż obecność komórek CCR4+CLA+CD4+. Stwierdziliśmy także dobrą korelację między wdrażaną terapią u pacjentów z SS, a utratą wspomnianego fenotypu w przypadkach odpowiadających na leczenie. Uważamy, że w przypadkach ziarniniaka grzybiastego, w których we krwi obwodowej także zaobserwowano utratę antygeny CD26 na limfocytach T CLA+CD4+, we krwi obwodowej był już obecny klon nowotworowy wywodzący się ze skóry z komórek T. Nie stwierdzono obserwowanego w przypadku SS zjawiska utraty antygeny CD26 na komórkach CD4+CLA+ we krwi pacjentów z dermatozami zapalnymi, co np. w przypadku actinic reticuloid zdecydowało o rozpoznaniu. Pacjent ten pozostaje pod naszą opieką od po3 lat i nie obserwujemy progresji choroby w kierunku CTCL [65].

Chcąc uprościć jeszcze bardziej diagnostykę CTCL z wykorzystaniem antygenu CD26 zdecydowano o wprowadzeniu go do rutynowych badań pacjentów bez oceny antygenu CLA i CCR4. Badania takie (immunofenotypowanie krwi obwodowej) są wykonywane w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (wcześniej Uniwersyteckim Centrum Klinicznym Akademii Medycznej w Gdańsku) od 2006 roku u pacjentów z podejrzeniem CTCL – w celu ustalenia diagnozy oraz w przypadkach, w których należy zwerfikować stopień zaawansowania choroby. Ze względu na brak odczynników (spowodowany dramatyczną sytuacją finansową szpitala) – zawieszono przeprowadzanie badań na kilka ostatnich miesięcy roku 2009. Aby ocenić zasadność ich prowadzenia przeanalizowano dane przebadanych pacjentów.

Grupę pacjentów z rozpoznaniem zespołem Sézary'ego charakteryzował wysoki odsetek komórek z utratą antygenu powierzchniowego CD26 we krwi obwodowej. Średnia wartość stosunku komórek T4 : T8 wynosiła 3,5 , a więc nie zawsze była wysoka (a wysoki stosunek T4 do T8 jest uznanym kryterium diagnostycznym w SS). Warty podkreślenia jest fakt, iż także dla wyższych stopni zaawansowania innych chłoniaków pierwotnie skórnych T-komórkowych (np. ziarniniak grzybiastego) typowy był spadek liczby komórek o fenotypie CD4+/ CD26+ na korzyść wzrostu liczby komórek klonu CD4+/ CD7-/ CD26- , jak również procentowego udziału komórek limfoidalnych Lütznera.

Wysoki odsetek limfocytów o fenotypie CD4+/CD7-/CD26- obserwowano także w grupie chorych z innymi niż SS pierwotnymi chłoniakami skóry przy współistniejącym niskim stosunku T4 do T8.

Analiza krwi chorych z innymi zapalnymi chorobami skóry, u których stan kliniczny różnicowano z chłoniakami pierwotnie skórnymi T komórkowymi, wykazała, iż utrata antygenu CD26 z powierzchni limfocytów T4 może występować także w przebiegu innych niż CTCL dermatoz. Wymusza to wnikliwą obserwację, gdyż u 2 pacjentów pierwotnie leczonych z powodu actinic reticuloid oraz atopowego zapalenia skóry, u których potwierdzono obecność komórek o fenotypie CD4+/CD7-/ CD26- a także wysoki odsetek komórek Lütznera, w trakcie wielomiesięcznej obserwacji doszło do rozwoju ziarniniaka grzybiastego (Mycosis fungoides, MF).

Aktualnie prezentowane wyniki badań pochodzą z reprezentatywnej grupy chorych (71 pacjentów). Potwierdzają one wykazaną wstępnie w poprzednim doniesieniu przydatność identyfikacji komórek o fenotypie CD4+CD7-CD26- we krwi pacjentów z SS lub zaawansowanym stadium innych typów CTCL w codziennej praktyce klinicznej, jednocześnie ułatwiając proces diagnostyczny i obniżając koszt badania (metoda nie wymaga zastosowania analizy CCR4 i CLA). Okazuje się bowiem, iż stwierdzenie klonu nowotworowego CD4+CD7-CD26- jest możliwe już przy niskim (< 10) stosunku T4 do T8. Stanowi to o dużej wartości diagnostycznej metody. Szczególnie przydatna może się ona okazać w ocenie choroby resztkowej. Wyniki ww badania wykazują, że należy zawsze pamiętać o możliwości występowania klonu komórek o fenotypie CD4+CD7-CD26- we krwi obwodowej także u części chorych z dermatozami zapalnymi. Jednocześnie należy rozważyć prawdopodobieństwo rozwoju u nich w przyszłości chłoniaków pierwotnie skórnych. Dotyczy to głównie chorych z grupy podwyższonego ryzyka (duży odsetek komórek Lütznera i/lub limfocytów o fenotypie CD4+CD7-CD26-.

4.3. Hodowla komórek Sézary'ego

M. Sokołowska-Wojdyło, P. Speuser, T. Tüting Hodowla nowotworowych komórek T w chłoniakach pierwotnie skórnych z komórek T – nieustające wyzwanie Przegl Dermatol 2007;4:495-498 [67].

W związku ze stosunkowo rzadkim występowaniem chłoniaków pierwotnie skórnych, a jednocześnie ich interesującą biologią (chłoniaki ograniczone swym występowaniem do skóry contra rozrosty o agresywnym przebiegu, gwałtownie rozprzestrzeniające się i zajmujące narządy wewnętrzne) postanowiliśmy podjąć próbę hodowli komórek Sézary'ego, licząc na uzyskanie linii komórkowej do dalszych badań. Wykorzystano wiedzę na temat powiązań komórek dendrytycznych i limfocytów T [16]. Wiadomo, że komórki dendrytyczne, produkujące ligandy receptora CCR4, obecnego na komórkach nowotworowych MF i SS, sąsiadujące z nowotworowymi limfocytami T od pacjentów z CTCL, odpowiadają za chemotaksję tych limfocytów do skóry i formowanie mikroropni Pautriera w naskórku. - Zgodnie z doniesieniem Berger i wsp. komórki dendrytyczne mogą przyczyniać się do utrzymania tych ostatnich w hodowli [7]. Podjęto próby wyprowadzenia linii komórkowej z krwi pacjentki z zespołem Sézary'ego. Jednak w naszych doświadczeniach, w hodowlach prowadzonych z GM-CSF i IL-4, komórki dendrytyczne (DC) nie proliferowały intensywnie i nie przeżywały dłużej niż 1 miesiąc. W przypadku hodowli nowotworowych komórek T z niedojrzałymi komórkami dendrytycznymi, zgodnie z danymi Berger i wsp., po 1-2 miesiącach około 2/3 komórek dendrytycznych było wciąż niedojrzałych, zdolnych do fagocytozy, natomiast po 3 miesiącach DC dojrzewały i umierały razem z nowotworowymi komórkami T. Obecność niedojrzałych komórek dendrytycznych przedłużała żywot limfocytów T CTCL (poprzez interakcję CD40 komórek dendrytycznych z ligandem na limfocytach T).

W przypadku hodowli w badaniach własnych nie udało się ustalić linii komórkowej nowotworowych limfocytów T, ale w prowadzonych 13 eksperymentach stwierdzono następujące prawidłowości:

- w 2 hodowlach z FCS oraz z wszystkimi z zastosowanych cytokin (GM-CSF, IL-7, IL-2, IL-4) komórki T pacjentki z SS przeżyły 51 i 115 dni, przy czym już po 2 tygodniach hodowli nie stwierdzano fenotypu CD4+TCRβV20-1+; w hodowli tej komórki przesiewano praktycznie codziennie ze względu na intensywny wzrost; komórki ostatecznie zamrożono w -70°C
- w 7 hodowlach z autologicznym serum pacjentki z SS oraz wszystkimi cytokinami komórki T przeżyły średnio 61 dni (39-90 dni); tylko w jednym przypadku po 7 tygodniach hodowli stwierdzano jeszcze 20% limfocytów CD4+TCRβV20-1+ (wyjściowo fenotyp CD4+TCRβV20-1+ wykazywało 74% komórek T w hodowli, CD4+CLA+ wyjściowo: 65%, po 7 tygodniach 12%, CD4+CCR10+CLA+ wyjściowo 40%, po 7 tygodniach hodowli 8%, CD4+CCR10+CLA wyjściowo 25%, w hodowli po 7 tygodniach wyjściowo: 25%)
- w hodowli limfocytów T pacjentki z autologicznym serum oraz tylko IL-7 i IL-2 limfocyty T przeżyły tylko 47 dni, nie wykazują pod koniec fenotypu nowotworowego
- w hodowli limfocytów T pacjentki z autologicznym serum i IL-7 komórki T przeżyły 58 dni również tracąc fenotyp nowotworowy
- w 2 hodowlach limfocytów T osoby zdrowej z autologicznym serum i wszystkimi cytokinami komórki T żyły (w pierwszym przypadku 41 dni i zginęły, w drugim – zamro-

żono je po 47 dniach, gdyż wykazywały bardzo dobry wzrost, konieczne było częste przesiewanie hodowanych komórek)

5. WNIOSKI

1. Komórki nowotworowe pamięci CD4+CLA+ u pacjentów z zespołem Sézary'ego wykazują podwójny potencjał migracyjny poprzez ekspresję zarówno receptorów chemokin CCR4 i CCR10 związanych z wędrówką limfocytów do skóry (skin homing), jak i CCR7 odpowiedzialnego za migrację komórek T do węzłów chłonnych (lymph node homing). Istnieje możliwość, że nowotworowe limfocyty T podlegają rekrutacji do skóry dzięki receptorowi CCR4, a następnie wracają do krwi obwodowej dzięki CCR7. Receptor chemokin CCR4, wraz z ligandem TARC/CCL17, wpływa także na rekrutację i wędrówkę limfocytów T do skóry w skórnej odmianie tocznia rumieniowatego, a więc w chorobie nienowotworowej. Należy jednak pamiętać, że ryzyko rozwoju nowotworów u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi jest wyższe niż w populacji ogólnej, co może mieć związek z chemokinami i ich receptorami rekrutującymi komórki T do skóry. Badania nad ekspresją receptorów chemokin w zespole Sézary'ego, ziarniniaku grzybiastym, toczniu rumieniowatym i u osób zdrowych stanowią przyczynek do poznania patogenezы chłoniaków skóry.
2. Utrata antygeny CD26 na komórkach CD4+ CLA+ lub CD4+ krwi obwodowej pozwala na różnicowanie późnych i mniej zaawansowanych postaci ziarniniaka grzybiastego, zespołu Sézary'ego oraz dermatoz zapalnych (łuszczycy, atopowego zapalenia skóry, actinic reticuloid, łupieżu czerwonego mieszkowego), co jest szczególnie przydatne w przypadkach erythrodermii. Ocena utraty antygeny CD26 na ww komórkach jest metodą bardziej czułą i specyficzną, niż utrata antygeny CD7 na komórkach CD4+ oraz CD4+CLA+. Metoda ta pozwala na ocenę zarówno progresji choroby limfoproliferacyjnej (obecność klonu nowotworowego we krwi), jak i regresji będącej efektem zastosowanej terapii. Wysoka przydatność badań ekspresji antygeny CD26 doprowadziła do uznania tej metody za obowiązującą w diagnostyce różnicowej oraz ocenie stopnia zaawansowania chłoniaków pierwotnie skórnych wywodzących się z komórek T [70]
3. Hodowla nowotworowych limfocytów T pacjentów z pierwotnie skórnymi chłoniakami T-komórkowymi wymaga wnikliwych, czasochłonnych i kosztownych procedur, a uzyskanie wzrostu (hodowli) limfocytów T z krwi pacjenta z rozrostem limfoproliferacyjnym nie jest jednoznaczne z utrzymaniem wzrostu linii nowotworowej.

6. DYSKUSJA

Dwie dekady temu przeprowadzono pierwsze badania nad immunobiologią komórek T oceniając ich migrację (trafficking) pomiędzy poszczególnymi narządami organizmu człowieka oraz nad molekularną analizą regulacji ich wędrówki do skóry (skin homing) [43,57,58]. Przedstawiono tezę, że tak zwane naiwne komórki T (naive T cells) wykazują na swej powierzchni ekspresję takich molekuł adhezyjnych jak L-selektyna, która pozwala im na wniknięcie do węzłów chłonnych poprzez wysoki nabłonek żylny, na którego powierzchni znajduje się odpowiedni ligand: adresyna węzłów chłonnych (PNAd, peripheral node addressin). W węzłach chłonnych komórka T zostaje zaktywowana przez pochodzące ze skóry komórki dendrytyczne prezentujące antygen (APC, antigen presenting cells), a następnie podlega podziałom i proliferacji. Jednocześnie na powierzchni tych komórek T dochodzi do ekspresji molekuł aktywacyjnych i efektorowych, przez co stają się one komórkami pamięci. Podczas tej przemiany podgrupa komórek pamięci T nabywa antygen CLA (cutaneous lymphocyte antigen), który pozwala tej komórce migrować do skóry, szczególnie zmienionej zapalnie, dzięki ekspresji na powierzchni śródbłonna naczyń skórnych odpowiednich dla niego ligandów [17,74]. Wykazano, że w skórnych zmianach chorobowych typu CTCL większość komórek pamięci T wykazuje ekspresję CLA [27,52]. Wyniki badań sugerują, że najczęstsze postaci CTCL: ziarniniak grzybiasty i zespół Sézary'ego reprezentują nowotworowy rozrost komórek T pamięci CLA+, czyli komórek o powinowactwie do skóry (skin homing T cells, CCR4+CCR10+). Chemotaktyczne cytokiny (chemokiny) oraz cząstki adhezyjne znacząco przyczyniają się do procesu wędrówki do skóry (skin homing) zaktywowanych komórek T i komórek T pamięci. Naiwne komórki T wykazują ekspresję receptora chemokiny 7 (chemokine receptor 7 – CCR7) oraz cząstki adhezyjnej CD62L. Oddziaływanie pomiędzy CCR7 i jego ligandami: SLC/CCL21 (secondary lymphoid tissue chemokine) i MIP3β/CCL19 (macrophage inflammatory protein 3β) obecnymi na komórkach śródbłonna naczyń węzłów chłonnych stymuluje aktywację integryn, a następnie adhezję i migrację przezbłonową komórek T [11,23].

Znaczna liczba komórek pamięci T CLA+ wykazuje na swej powierzchni ekspresję receptora chemokiny 4 (CCR4) [12]. Oddziaływanie pomiędzy CCR4 a ligandem TARC/CCL17 (thymus and activation regulated chemokine) na zaktywowanych komórkach śródbłonna naczyń umożliwia limfocytom T ekstrawazację dzięki zależnej od integryn adhezji komórek T CLA+ do cząstek ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) obecnych na powierzchni komórek śródbłonna [12].

Wiadomo, że chemokiny wykazują zdolność stymulacji wszystkich leukocytów. Poszczególne klasy limfocytów T (Th1, Th2, Th17, T reg, naiwne, pamięci itd.) charakteryzują się zestawem określonych receptorów na swej powierzchni, pozwalającym na zróżnicowaną odpowiedź na poszczególne chemokiny. Keratynocyty wydzielają liczne chemokiny będące chemoatraktantami dla leukocytów. Podsumowując dane można stwierdzić, że:

- Powinowactwo do receptora CCR4, obecnego na komórkach T, wykazują ligandy CCL17 oraz CCL22 (wydzielane przez keratynocyty, komórki dendrytyczne i komórki śródbłonna naczyń) [12]
 - o Ekspresję CCR4+ obserwowano u pacjentów z transformowanym (CD30+) ziarniniakiem grzybiastym, o agresywniejszym niż klasyczna postać MF przebiegu [36]
 - o Ekspresja CCR4+ w CTCL jest większa na komórkach T CLA+ [18]

- o A u pacjentów z zespołem Sézary’ego także na komórkach CCR10+ i CCR7+ (a więc o powinowactwie zarówno do skóry jak i węzłów chłonnych); monoklonalną naturę komórek potwierdzono metodą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem IO Test Beta Mark TCR V β Repertoire Kit, a następnie metodami cytometrii przepływowej z przeciwciałem przeciw dominującemu fragmentowi TCR β V oraz sekwencjonowaniem produktów klonowania dominującego fragmentu TCR β V [66].
- o Receptor CCR4 bierze udział w migracji limfocytów T do skóry [13]
- Receptor CCR10 występuje na limfocytach T migrujących do skóry oraz na melanocytach. Jego ligandem jest CCL27 wydzielana przez komórki endotelium oraz keratynocyty.
 - o CCR10 jest odpowiedzialny za wędrówkę limfocytów T do skóry, gdy w niej rozwija się stan zapalny [29,30,48,54]
 - o Komórki nowotworowe w ziarniniaku grzybiastym oraz zespole Sézary’ego wykazują ekspresję receptora CCR10 na swojej powierzchni [50,66]
 - o Zaktywowane keratynocyty produkują chemokinę CTACK/CCL27, która oddziałując z receptorem CCR10 obecnym na powierzchni skórnym efektorowym komórek T oraz limfocytach T pamięci, wspomaga proces rekrutacji tych komórek do skóry. Zablokowanie chemokiny CCL27 utrudnia wędrówkę do skóry komórek T CCR4+ [66]
- Do receptora CCR7 obecnego na komórkach dendrytycznych i limfocytach T powinowactwo wykazuje ligand CCL21 wydzielany przez komórki śródbłonka naczyń węzłów chłonnych)
 - o CCR7 i CCL21 są fundamentalną parą odpowiedzialną za fizjologicznie występującą w zdrowym organizmie migrację limfocytów T do węzłów chłonnych [19,20,24]
 - o Wysoką ekspresję CCR7 stwierdzano w naciekach węzłów chłonnych w białacze/chłoniaki dorosłych z komórek T [26]
 - o Obecność nowotworowych komórek T w MF i SS o wysokiej ekspresji CCR7 stwierdzono w pracy Kallinich i wsp. [37]; ekspresja tego receptora sprzyjała wystąpieniu przerzutów do węzłów chłonnych; potwierdzono wysoką ekspresję CCR7 na komórkach nowotworowych w zespole Sézary’ego, jednak nie w MF – co mogłoby tłumaczyć różnicę w przebiegu klinicznym obu chorób (komórki SS wykazują podwójny potencjał migracyjny – do skóry – dzięki CCR10+ i do węzłów chłonnych dzięki CCR7+) [66]
- Receptor CCR3 (nie brany pod uwagę w badaniach ze względu na powszechność występowania – na komórkach T, komórkach kwasochłonnych i innych leukocytach) oddziałuje z CCL5, CCL7, CCL8, CCL11 i wieloma innymi receptorami produkowanymi przez makrofagi i inne komórki
 - o Wykazano jego rolę w pierwotnych chłoniakach skóry CD30+ [42]
- Receptor CXCR4 występujący na komórkach endotelium, leukocytach i wielu innych komórkach wykazuje powinowactwo do ligandu CXCL12, produkowanego przez fibroblasty oraz inne komórki zębca

- o Tzw. skin homing receptor CXCR4+ jest ściśle powiązany z utratą na powierzchni komórek T antygeny CD26 (dipeptydylaza) tnie i inaktywuje CXCL12, natomiast unieczynnienie CD26 wzmacnia chemotaksję prowokowaną przez CXCL12, co sprzyja migracji komórek nowotworowych w zespole Sézary'ego [49]

Badania nad receptorami chemokin, szczególnie CCR4 i CCR10, zachęcają do rozważań nad ich przydatnością w leczeniu CTCL, szczególnie, że stosunkowo niewielka populacja prawidłowych limfocytów T wykazuje ekspresję obu receptorów, a więc być może eradykacja komórek T CCR4+CCR10+ nie będzie prowadzić do ciężkich limfopenii, typowych np. dla niektórych chemioterapii stosowanych w CTCL. Doniesienia na temat zastosowania przeciwciał anti-CCR4 w białaczkach/chłoniakach z komórek T dorosłych oraz w ziarniniaku grzybiastym i zespole Sézary'ego stanowią początek obiecującej drogi (pomimo doniesień na temat cytotoxyczności zależnej od przeciwciał) [33,82].

Na ekspresję i funkcję CCR4 wpływa znany już w terapii CTCL beksaroten. [56] Inny lek zarejestrowany w USA: denileukin diftitoks (białko fuzyjne IL2-z toksyną błonicy oddziałuje na CCL27 (ligand CCR10) oraz CCL17 (ligand CCR4), choć jego skuteczność w leczeniu CTCL jest wciąż ograniczona [4].

Zgodnie z przeprowadzonymi badaniami można różnicować zespół Sézary'ego, postaci erythrodermiczne CTCL oraz choroby zapalne wykorzystując receptory chemokin CCR4, CCR7 i CCR10, ale, jak wspomniano wcześniej, ich przydatność w codziennej diagnostyce jest wciąż ograniczona pracochłonnością oraz wysokimi kosztami badania. Stąd podjęto badania nad antygenem CD26, biorącym aktywny udział w procesach proliferacji limfocytów T, także w powiązaniu z aktywnością chemokin.

Antygen CD26 (dipeptydylowa peptydaza IV) jest proteolitycznym enzymem podlegającym ekspresji na powierzchni większości krążących komórek T u osób zdrowych [40,64]. Dipeptydylowa aminopeptydaza IV (DPP IV, EC 3.4.14.5) należy do grupy proteaz serynowych. Enzym ten, o masie cząsteczkowej 110-120 kDa, jest przezbłonową glikoproteiną odcinającą dipeptydy Xaa-Pro, a rzadziej także Xaa-Ala z N-końca polipeptydów. Pomimo, iż jest szeroko rozpowszechniony w nabłonkach i śródbłonkach wszystkich tkanek – jego rola wciąż pozostaje nie do końca wyjaśniona. Wiadomo, że enzym ten bierze udział między innymi w procesie proliferacji limfocytów T. Obecność antygeny CD26 zidentyfikowano na powierzchni około 50 % limfocytów krwi obwodowej [10,32,40]. Ekspresję CD26 potwierdzono również w obrębie subpopulacji komórek T pamięci. Przyczyna utraty CD26 w przypadkach zespołu Sézary'ego oraz zaawansowanych stadiów MF nie jest ostatecznie znana. Wiadomo, że CD26 wpływa na aktywność wielu cząsteczek, w tym chemokin odpowiadających za chemotaksję wielu komórek do skóry, np. I-TAC/CXCL11, która rekrutuje komórki T poprzez receptor CXCR3 [44,45]. Jeśli oddziaływanie CXCL11-CXCR3 jest ważne dla procesu migracji limfocytów T do skóry, to utrata CD26 może odpowiadać za utratę tej zdolności migracyjnej, co powoduje nagromadzenie limfocytów T we krwi obwodowej. Podobnie jest ze wspomnianą zależnością ekspresji CD26 i CXCL12, w której to utrata CD26 sprzyja zwiększonej aktywności CXCL12, a tym samym – przetrwaniu komórek nowotworowych oraz ich aktywnej migracji, a więc i rozprzestrzenianiu się choroby. CD26 także tnie i inaktywuje chemokinę SDF-będącą ligandem CXCR4, którego rola w procesach migracji komórek Sézary'ego do skóry jest bezsporna. Stąd utrata antygeny CD26, wiąże się z rozprzestrzenianiem się komórek Sézary'ego poza skórę i progresją choroby [44,45,63,65].

Utrata antygeny CD26 na ponad 30% komórek CD4+ została przyjęta za marker obecności klonu nowotworowego we krwi obwodowej w zespole Sézary'ego oraz w zaawansowanych postaciach ziarniniaka grzybiastego [70].

Nawiązując ponownie do receptorów chemokin: zgodnie z danymi z piśmiennictwa – ligandy receptora CCR4 są produkowane przez komórki dendrytyczne, stymulują w ziarniniaku grzybiastym gwałtowną chemotaksję limfocytów T, które m.in. formują mikroropnie Pautriera w naskórku, będące markerem MF. O związku komórek dendrytycznych z komórkami Sézary'ego donosili w 2001 Edelson i wsp. prowadząc hodowle komórek chłoniaków w obecności niedojrzałych form komórek dendrytycznych. W związku ze stosunkowo rzadkim występowaniem chłoniaków pierwotnie skórnych, a jednocześnie ich interesującą biologią (chłoniaki ograniczone swym występowaniem do skóry contra rozrosty o agresywnym przebiegu, gwałtownie rozprzestrzeniające się i zajmujące narządy wewnętrzne) postanowiliśmy podjąć próbę hodowli komórek Sézary'ego – licząc na uzyskanie linii komórkowej do dalszych badań [16].

Znane są powszechnie dwojakiego rodzaju problemy związane z hodowlą komórek Sézary'ego. Pierwszy z nich stanowią trudności w utrzymaniu komórek przy życiu przez długi czas. Drugim jest udowodnienie, że hodowane komórki są rzeczywiście komórkami nowotworowymi CTCL. Nacieki nowotworowe z komórek CD3+CD4+ w CTCL nie są jednorodne. Pomimo mózgowkształtnego jądra nowotworowe limfocyty T trudno odróżnić w rutynowych badaniach cytologicznych i immunohistochemicznych od licznych towarzyszących nienowotworowych komórek T, a domieszka komórek zapalnych, szczególnie we wczesnych stadiach choroby, jest znaczna

Jedną z metod potwierdzenia nowotworowego charakteru nacieku, a tym samym wywodzącej się z niego linii komórkowej, jest ocena klonalności rearanżacji łańcuchów receptora TCR oraz ocena obecności aberracji chromosomowych w grupie hodowanych limfocytów T. Metody te były i są stosowane powszechnie, a ich wyniki potwierdzają trudności w hodowli właściwych komórek [5,39,60,73,85].

Abrams i wsp. ustalili linię komórkową komórek T pacjenta z zespołem Sézary'ego i wykazali w niej tę samą rearanżację TCR co w wyjściowych komórkach klonu nowotworowego potwierdzając nowotworowy charakter linii limfocytów T [1]. Natomiast Ho i wsp. nie byli w stanie potwierdzić monoklonalności linii komórkowej wywodzącej się ze zmian skórnych pacjenta z ziarniniakiem grzybiastym stosując tą samą metodę [28]. Harvix i wsp. prowadzili 150 hodowli komórkowych od 4 pacjentów z CTCL (3 z ziarniniakiem grzybiastym i 1 z CTCL CD30+) [25]. Wykorzystując metodę sekwencjonowania (po amplifikacji PCR DNA z komórek CD4+ i wklonowaniu produktu PCR do E. Coli) porównali N-specyficzny region TCR β klonu nowotworowego wyjściowego oraz linii hodowanych komórek i nie stwierdzili w ani jednym przypadku identyczności. Oznacza to, że hodowane komórki nie były złośliwymi limfocytami T. Bagot i wsp. potwierdzili obecność 2 klonów nowotworowych w hodowanych linii komórkowych cytogenetycznie identycznych (trisomia chromosomu 7) jak w komórkach wyjściowych klonu [5]. Klonalność w hodowanych ponad 2 lata liniach została potwierdzona przez analizę transkryptu TCR β i regionu CDR3. Hodowla ta nie wymagała dodawania IL (tylko początkowo dodawano IL-2 i IL-7), obserwowano bowiem niezależny samodzielny wzrost, co mogło potwierdzać nowotworowy charakter komórek T w hodowli. Niemniej nie przeprowadzono sekwencjonowania komórek linii w celu ostatecznego potwierdzenia, że komórki te wywodzą się z wyjściowego klonu nowotworowego. Jednocześnie w jednej z hodowli wyprowadzono linię komórek T CD4+, które wykazywały aktywność antynowotworową. Były to komórki reaktywne nienowotworowe. Możliwość prowadzenia hodowli także linii komórkowych tego typu potwierdza konieczność ostrożnej interpretacji uzyskanych wyników.

Z doniesień literaturowych wynika, że w wielu hodowlach nie potwierdzano klonalności komórek nowotworowych metodą PCR, natomiast wykorzystywano technikę Southern blot-

tingu (SBA, Southern Blotting Analysis). Abram i wsp. przeprowadzili analizę metodą SBA z sondą przeciwko odcinkowi stałemu łańcucha TCR β , czym potwierdzili, że rearanżacja w linii komórek Sézary'ego była identyczna z tą znaną we krwi pacjenta [1]. Także Starkebaum i wsp. wykorzystali tą samą metodę w ocenie linii komórek T wyhodowanej z wykorzystaniem IL-2 od pacjenta z białaczką/chłoniakiem skórnym [69]. Metoda SBA opiera się na różnorodności wynikającej z rearanżacji fragmentów C i V receptora TCR. Niemniej należy pamiętać, że różnice jedno lub kilku nukleotydowe w obrębie połączeń C-V, wynikające z dodania lub ujęcia kilku nukleotydów mogą pozostać niezauważone przez sondę i rozpoznane jako identyczne. Dlatego aktualnie uznaje się, że analiza TCR- β metodą SBA nie jest wystarczająca do potwierdzenia jednorodności hodowanej linii limfocytów T. Ma to związek z faktem, że niemonoklonalne komórki T mogą mieć ten sam łańcuch β TCR [15].

Z badań własnych wynika konieczność dokładnej analizy fenotypu hodowanych komórek. Morfologia komórek oraz podstawowe metody z wykorzystaniem CD typowych dla limfocytów T są niewystarczające. Intensywny wzrost hodowanych komórek nie musi potwierdzać ich nowotworowej natury. W jednym z eksperymentów stwierdzono intensywny wzrost limfocytów T nie będących komórkami Sézary'ego. Jest możliwe, iż były to limfocyty odczynowo reagujące np. na składniki serum (FCS). Można więc doprowadzić do wzrostu limfocytów T nie będących komórkami nowotworowymi – co potwierdzają dane literaturowe [5].

W ciągu ostatnich 20 lat przedstawiono wiele metod hodowli nowotworowych komórek T. Żadna z nich nie została dotychczas uznana za optymalną dla komórek T z krwi i skóry pacjentów z zespołem Sézary'ego i innymi odmianami CTCL [7,16,25,55].

Prowadzenie dalszych hodowli komórek nowotworowych i dendrytycznych pacjentów z CTCL może zapewnić materiał do badań natury nowotworowych komórek T w CTCL jak i pozwolić na wnikliwą analizę interakcji pomiędzy obydwoma rodzajami komórek. Interesujące wydają się doniesienia na temat niezależnych antygenowo interakcji pomiędzy niedojrzalymi DC, a limfocytami T mogące sprzyjać rozwojowi immunoterapii w CTCL [55]. Zawsze jednak należy pamiętać, że badania *in vitro* nie muszą odzwierciedlać rzeczywistości *in vivo*, co potwierdzała widoczna zmiana ekspresji wybranych receptorów chemokin i CLA na powierzchni komórek T w hodowli. Ograniczona liczba pacjentów z CTCL, a szczególnie z zespołem Sézary'ego, przy jednoczesnym śmiertelnym przebiegu choroby zmusza do poszukiwania nowych dróg badawczych, takich jak hodowle komórkowe, pozwalających w przyszłości stać się użytecznymi w badaniach nie tylko nad biologią nowotworu, ale także możliwościami terapeutycznymi. Być może rozwiązaniem będą modele zwierzęce CTCL, z których jeden udało się ustalić badaczom niemieckim, dając początek badaniom nad biologią chłoniaków pierwotnie skórnych z komórek T *in vivo* [13].

7. STRESZCZENIE

Receptory chemokin wraz z aktywującymi je chemokinami odgrywają kluczową rolę w migracji leukocytów, m.in. limfocytów T, zarówno w stanie zdrowia jak i procesach zapalnych. We wczesnym okresie rozrostu nowotworowego, chemokiny wraz z receptorami, wpływają m.in. na procesy odpowiedzialne za rozwój nowotworu, oporność jego komórek na reakcje immunologiczne hamujące toczący się proces, w tym rozsiew komórek nowotworu. W rozwoju pierwotnych chłoniaków skóry z komórek T (CTCL, Cutaneous T Cell Lymphoma) w tym najczęściej występującego ziarniniaka grzybiastego (MF, Mycosis fungoides) oraz jednego z najbardziej agresywnych w przebiegu: zespołu Sézary'ego (SS, Sézary syndrome), kluczową rolę odgrywają receptory CCR4, CXCR4 i CCR10, odpowiedzialne m.in. za migrację limfocytów T do skóry, a także receptor CCR7, biorący udział w procesie wędrówki limfocytów T do węzłów chłonnych, co potwierdziły badania własne autora. Wyniki badań sugerują, że komórki nowotworowe krwi w zespole Sézary'ego wędrują do skóry dzięki ekspresji CCR4 i CCR10, a następnie wracają do krwi, najprawdopodobniej dzięki CCR7. Wykazują więc podwójny potencjał migracyjny wynikający ze złożonego fenotypu "centralnych" komórek T pamięci o potencjale wędrówki do skóry (skin homing „central” memory T cells). W pracy poruszono także temat ekspresji chemokiny TARC (CCL17) oraz jej receptora CCR4 w zapalnej chorobie skóry: toczniu rumieniowatym skórny. Stwierdzono wysoki odsetek limfocytów T CCR4+ w skórze pacjentów z tą chorobą zapalną, szczególnie z jej postacią bliznowaciejącą. Potwierdza tylko złożoność procesów, w których chemokiny i ich receptory odgrywają istotną rolę.

Pomimo przekonywujących wyników badań własnych, sugerujących znaczenie ww. cząstek (receptorów chemokin) w diagnostyce różnicowej ziarniniaka grzybiastego oraz zespołu Sézary'ego, wysoki koszt procedur oraz ich pracochłonność spowodowały, iż podjęto badania nad antygenem CD26, odgrywającym ważną rolę w patogenezie chłoniaków skóry m.in. poprzez powiązania z chemokinami oraz ich receptorami. Rozważając praktyczne zastosowanie wyników badań nad antygenem CD26 stwierdzono, że ocena ekspresji tej cząsteczki na limfocytach CD4+CLA+ jest prostsza w przeprowadzeniu i tańsza, niż badania receptorów chemokin. Metody oceny fenotypu CCR4 CLA CD4 CD26 oraz CD4 CD7 CD26 okazały się na tyle pomocne w diagnostyce zespołu Sézary'ego i ziarniniaka grzybiastego, że, uwzględniając zachęcające doniesienia literaturowe, wdrożono je do rutynowej diagnostyki chłoniaków skóry w Uniwersyteckim Centrum Medycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Utrata antygeny CD26 na minimum 30% komórek CD4+ stała się równocześnie uznana przez EORTC (European Organization of Research and Treatment of Cancer) oraz WHO (World Health Organization) metodą oceny zajęcia krwi obwodowej przez nowotworowe komórki w ziarniniaku grzybiastym oraz zespole Sézary'ego.

W celu uzyskania do badań dużej puli komórek Sézary'ego, ze względu na rzadkie występowanie choroby, podjęto także próby hodowli tych komórek. Pomimo stosunkowo krótkiego czasu utrzymywania się komórek Sézary'ego w hodowli, poddano dyskusji interakcje pomiędzy komórkami dendrytycznymi, a limfocytami T w SS oraz zwrócono uwagę na konieczność dokładnego określenia fenotypu hodowanych komórek. Jak wynika z wcześniejszych badań innych autorów, rutynowo wykonywane badania komórek nowotworowych w przypadku zespołu Sézary'ego, z wykorzystaniem markerów CD typowych dla limfocytów T, okazują się często niewystarczające dla potwierdzenia nowotworowej natury utrzymywanych w hodowli komórek, co zmusza do bardzo wnikliwej oceny badań prowadzonych na liniach komórkowych CTCL.

8. SUMMARY

Chemokine receptors and activating them chemokines play a key role in the migration of leukocytes, including T cells, both in health and inflammatory processes. Chemokines and their receptors influence on the early stage of tumor growth. They are responsible for the tumor growth, the resistance of neoplastic cells to the immune cells trying to inhibit an ongoing process and the spreading of cancer cells in the organs. Receptors CCR4, CXCR4 and CCR10, which is responsible inter alia for migration of T lymphocytes to the skin, as well as receptor CCR7, which is involved in the process of T cell migration to lymph nodes play a pivotal role in the development of primary cutaneous lymphomas of T-cell (CTCL, Cutaneous T Cell Lymphoma) both the most common mycosis fungoides (MF, mycosis fungoides) and one of the most aggressive in the course: Sézary syndrome (SS, Sézary syndrome), what was confirmed by the author. The results of experiments suggests that the SS cells are admitted to the skin by CCR4 and/or CCR10 and then return to the blood thanks to CCR7. The malignant clone may represent double migrating potential thanks to complex phenotype expression of skin homing cutaneous “central” memory T cells in the peripheral blood of patients with Sézary syndrome. The expression of chemokine TARC (CCL17) and its receptor CCR4 was checked also in the inflammatory disease of the skin: cutaneous lupus erythematosus (CLE). A high percentage of CCR4 + T cells in the skin of patients with CLE, particularly in the cicatricial subtype was found. That confirms the complexity of the processes, in which chemokines and their receptors play a role.

Despite the convincing results, suggesting the importance of the aforementioned particles (chemokine receptor) in the differential diagnosis of mycosis fungoides and Sézary syndrome, the high cost and labor-intensive procedures, led the research undertaken over the CD26 antigen, which plays an important role in the pathogenesis of cutaneous lymphomas in between through linkages with chemokines and their receptors. Considering the practical application of research results on the CD26 antigen, there was found that the assessment of expression of this molecule on CD4 + CLA + is simpler and cheaper to conduct, than studies of chemokine receptors. Methods of assessing the phenotype of CLA CCR4 CD4 CD26 and CD4 CD7 CD26 proved to be so helpful in the diagnosis of Sézary syndrome and mycosis fungoides that, given the encouraging literature reports, it has been implemented into routine diagnosis of lymphomas of the skin at the University Medical Center, Medical University of Gdansk. The loss of CD26 antigen on a minimum of 30% CD4 + cells became also recognized by the EORTC (European Organization of Research and Treatment of Cancer) and WHO (World Health Organization) by assessing the activities of peripheral blood tumor cells in the mycosis fungoides and Sézary syndrome.

In order to test a large pool of Sézary cells, due to the rarity of the disease, it has been also attempts to culture these cells. Despite a relatively short time of Sézary cells persistence, this survival was discussed considering the interaction between dendritic cells and T cells in the SS, and highlighted the need to clarify deeply the phenotype of cultured cells. As shown also in previous studies, the routine tests for neoplastic cells in Sézary syndrome, using CD markers typical for T cells, often prove insufficient to confirm the nature of tumor maintained in cell culture, what means a very careful evaluation of research on CTCL cell lines.

9. PIŚMIENICTWO

1. Abrams FT, Lessin S, Gosh SK, Ju W, Vonderheid EC, Nowell P A clonal CD4-positive T-cell line established from the blood of patients with Sezary syndrome *J Invest Dermatol* 1991, 96, 31-37.
2. Alibert JL. Description des Maladies de la peau Pservees a l'Hopital St. Louis, Paris, Barrois, 1806
3. Alibert JL. Description des maladies de la peau tome second Paris, 1814
4. Baatar D, Olkhanud P, Newton D, Sumitomo K, Biragyn A. CCR4-expressing T cell tumors can be specifically controlled via delivery of toxins to chemokine receptors. *J Immunol.* 2007, 179, 3, 1996-2004.
5. Bagot M, Echchakir H, mamiCHouaib F, Delfau-larue MH, Charue D, Bernheim A Isolation of tumor-specific cytotoxic CD4+ and CD4+CD8dim+ T-cell clones infiltrating cutaneous T-cell lymphoma *Blood* 1998, 91, 4331-4341
6. Bazin E. Lecons sur le traitement des maladies chroniques in general affections de la peau, Paris 1870
7. Berger CL, Halon D, Kanada D, Girardi M, Edelson RI The growth of cutaneous T-cell lymphoma is stimulated by immature dendritic cells. *Blood* 2002, 2, 2929-2939
8. Bernengo MG, Novelli M, Quaglino P, Lisa F, De Matteis A, Savoia P, Cappello N, Fierro MT. The relevance of the CD4+ CD26- subset in the identification of circulating Sézary cells. *Br J Dermatol.* 2001, 144, 1, 125-135.
9. Besnier E., Hallopeau F., Sur les erythrodermies du mycosis fungoide. *Ann Dermatol Syphiligr (Paris)* 1892; III, 987
10. Bühling F, Kunz D, Reinhold D, Ulmer AJ, Ernst M, Flad HD, Ansorge S. Expression and functional role of dipeptidyl peptidase IV (CD26) on human natural killer cells. *Nat Immun.* 1994, 13, 5, 270-9.
11. Campbell JJ, Bowman EP, Murphy K, Youngman KR, Siani MA, Thompson DA, Wu L, Zlotnik A, Butcher EC. 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. *J Cell Biol.* 1998, 141, 4, 1053-9.
12. Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Rottman J, Qin S, Ponath P, Andrew DP, Warnke R, Ruffing N, Kassam N, Wu L, Butcher EC. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature.* 1999 , 400, 6746, 776-780.

13. Campbell JJ, O'Connell DJ, Wurbel MA. Cutting Edge: Chemokine receptor CCR4 is necessary for antigen-driven cutaneous accumulation of CD4 T cells under physiological conditions. *J Immunol.* 2007, ;178, 3358-3362.
14. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006, 354, 6, 610-621.
15. Dummer R, Helad PW, Nestel FO, Ludwig O, Laine E Sezary syndrome T-cell clones display T-helper 2-cytokines and express the accessory factor-1 (interferon – gamma receptor beta chain) *Blood* 1996, 88, 383-389
16. Edelson RL. Cutaneous T cell lymphoma: the helping hand of dendritic cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2001, 941, 1-11.
17. Erdmann I, Scheidegger EP, Koch FK, Heinzerling L, Odermatt B, Burg G, Lowe JB, Kündig TM. Fucosyltransferase VII-deficient mice with defective E-, P-, and L-selectin ligands show impaired CD4⁺ and CD8⁺ T cell migration into the skin, but normal extravasation into visceral organs. *J Immunol.* 2002, 168, 5, 2139-2146.
18. Ferenczi K, Fuhlbrigge RC, Pinkus J, Pinkus GS, Kupper TS. Increased CCR4 expression in cutaneous T cell lymphoma. *J Invest Dermatol.* 2002, ;119, 6, 1405-1410.
19. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, Lipp M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999, 99, 1, 23-33.
20. Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature.* 1997, 389, 6654, 978-1981.
21. Geiges M., Burg G., Kempf W, Specker R.. Cutaneous lymphomas – historical aspects w Cutaneous lymphomas red. Burg G., Kempf W., Wyd. Taylor and Francis Group, LCC, USA, 2005: 1-9
22. Gillot X. These Pour le doctorat en médecine: etude sur une affection de la peau decrite sous le nom de Mycosis fongoide Paris, 1869
23. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, Nakano H. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med.* 1999, 189, 3, 451-460.
24. Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 95, 1, :258-263.
25. Harvix S, Gunzl HJ, Blaschke V, Zachmann K, Neumann C Inability to culture the dominant T-cell clone from the skin of primary cutaneous T-cell lymphoma as proven by TCR-gamma-chain gene sequencing. *Arch Dermatol Res* 2001, 293, 139-146

26. Hasegawa H, Nomura T, Kohno M, Tateishi N, Suzuki Y, Maeda N, Fujisawa R, Yoshie O, Fujita S. Increased chemokine receptor CCR7/EBI1 expression enhances the infiltration of lymphoid organs by adult T-cell leukemia cells. *Blood*. 2000, 95, 1, 30-38.
27. Heald PW, Yan SL, Edelson RL, Tigelaar R, Picker LJ. Skin-selective lymphocyte homing mechanisms in the pathogenesis of leukemic cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*. 1993, 101, 2, 222-226.
28. Ho VC, Baadsgaard O, Elder JT, Hsen ER, Hanson CA, Vejsgaard GL. Genotypic analysis of T-cell clones derived from cutaneous T cell lymphoma lesion demonstrates selective growth of tumour infiltrating lymphocytes. *J Invest Dermatol* 1990, 95, 4-8
29. Homey B, Alenius H, Müller A, Soto H, Bowman EP, Yuan W, McEvoy L, Lauerma AI, Assmann T, Bünemann E, Lehto M, Wolff H, Yen D, Marxhausen H, To W, Sedgwick J, Ruzicka T, Lehmann P, Zlotnik A. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med*. 2002, 8, 2, 157-165.
30. Hudak S, Hagen M, Liu Y, Catron D, Oldham E, McEvoy LM, Bowman EP. Immune surveillance and effector functions of CCR10(+) skin homing T cells. *J Immunol*. 2002, 169, 3, 1189-1196.
31. Hwang ST, Janik JE, Jaffe ES, Wilson WH. Mycosis fungoides and Sézary syndrome *Lancet*. 2008, 371, 9616, 945-957.
32. Ikushima H, Munakata Y, Ishii T, Iwata S, Terashima M, Tanaka H, Schlossman SF, Morimoto C. Internalization of CD26 by mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor contributes to T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, 97, 15, 8439-8444.
33. Ishida T, Iida S, Akatsuka Y, Ishii T, Miyazaki M, Komatsu H, Inagaki H, Okada N, Fujita T, Shitara K, Akinaga S, Takahashi T, Utsunomiya A, Ueda R. The CC chemokine receptor 4 as a novel specific molecular target for immunotherapy in adult T-Cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2004, 10, 22, 7529-7539.
34. Ishida T, Utsunomiya A, Iida S, Inagaki H, Takatsuka Y, Kusumoto S, Takeuchi G, Shimizu S, Ito M, Komatsu H, Wakita A, Eimoto T, Matsushima K, Ueda R. Clinical significance of CCR4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma: its close association with skin involvement and unfavorable outcome. *Clin Cancer Res*. 2003, 9, 3625-3634.
35. Jones D, Dang NH, Duvic M, Washington LT, Huh YO. Absence of CD26 expression is a useful marker for diagnosis of T-cell lymphoma in peripheral blood. *Am J Clin Pathol*. 2001, 115, 6, 885-892.
36. Jones D, O'Hara C, Kraus MD, Perez-Atayde AR, Shahsafaei A, Wu L, Dorfman DM. Expression pattern of T-cell-associated chemokine receptors and their chemokines correlates with specific subtypes of T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2000, 15, 96(2), 685-690.

37. Kallinich T, Muche JM, Qin S, Sterry W, Audring H, Kroczeck RA. Chemokine receptor expression on neoplastic and reactive T cells in the skin at different stages of mycosis fungoides. *J Invest Dermatol.* 2003, 121, 5, 1045-1052.
38. Kamarashev J, Burg G, Kempf W, Hess Schmid M, Dummer R. Comparative analysis of histological and immunohistological features in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *J Cutan Pathol.* 1998, 25, 8, 407-412.
39. Karenko L, Hyytinen E, Sarna S, Ranki A Chromosomal Abnormalities in cutaneous T-cell lymphoma and its premalignant conditions as detected by G-banding and interphase cytogenetic methods *J Invest Dermatol* 1997, 108, 22-29
40. Kari L, Loboda A, Nebozhyn M, Rook AH, Vonderheid EC, Nichols C, Virok D, Chang C, Horng WH, Johnston J, Wysocka M, Showe MK, Showe LC. Classification and prediction of survival in patients with the leukemic phase of cutaneous T cell lymphoma. *J Exp Med.* 2003, 197, 11, 1477-1488.
41. Kim EJ, Hess S, Richardson SK, Newton S, Showe LC, Benoit BM, Ubriani R, Vittorio CC, Junkins-Hopkins JM, Wysocka M, Rook AH. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest.* 2005, 115, 4, 798-812. Review. Erratum in: *J Clin Invest.* 200, ;117, 3, 836.
42. Kleinhans M, Tun-Kyi A, Gilliet M, Kadin ME, Dummer R, Burg G, Nestle FO. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in CD30+ cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.* 200, ;101, 4, 1487-1493.
43. Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity.* 2002, 1,1-4.
44. Lambeir AM, Proost P, Durinx C, Bal G, Senten K, Augustyns K, Scharpé S, Van Damme J, De Meester I. Kinetic investigation of chemokine truncation by CD26/dipeptidyl peptidase IV reveals a striking selectivity within the chemokine family. *J Biol Chem.* 2001, 276, 32, 29839-29845.
45. Ludwig A, Schiemann F, Mentlein R, Lindner B, Brandt E. Dipeptidyl peptidase IV (CD26) on T cells cleaves the CXC chemokine CXCL11 (I-TAC) and abolishes the stimulating but not the desensitizing potential of the chemokine. *J Leukoc Biol.* 2002, 72, 1, 183-191.
46. Lutzner MA. NIH Conference: cutaneous T-cell lymphomas: the Sezary syndrome, mycosis fungoides and related disorders. *Ann Intern Med* 1975; 83, 534-552
47. Lutzner MA., Jordan HW. Ultrastructure of an abnormal cell in Sezary syndrome. *Blood* 1968; 31, 719-726.
48. Morales J, Homey B, Vicari AP, Hudak S, Oldham E, Hedrick J, Orozco R, Copeland NG, Jenkins NA, McEvoy LM, Zlotnik A. CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, 96, 25, 14470-14475.

49. Narducci MG, Scala E, Bresin A, Caprini E, Picchio MC, Remotti D, Ragone G, Nasorri F, Frontani M, Arcelli D, Volinia S, Lombardo GA, Baliva G, Napolitano M, Russo G. Skin homing of Sézary cells involves SDF-1-CXCR4 signaling and down-regulation of CD26/dipeptidylpeptidase IV. *Blood*. 2006, 107, 3, 1108-1115.
50. Notohampirado Notohamiprodo M, Segerer S, Huss R, Hildebrandt B, Soler D, Djarfzadeh R, Buck W, Nelson PJ, von Luetichau I. CCR10 is expressed in cutaneous T-cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2005, 115, 4, 641-647.
51. Picker LJ, Kishimoto TK, Smith CW, Warnock RA, Butcher EC. ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature*. 1991, 349, 6312, 796-799.
52. Picker LJ, Michie SA, Rott LS, Butcher EC. A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. *Am J Pathol*. 199, 136, 5, 1053-1068.
53. Reinhold U, Abken H, Kukel S, Moll M, Müller R, Oltermann I, Kreysel HW. CD7- T cells represent a subset of normal human blood lymphocytes. *J Immunol*. 1993, 150, 5, 2081-2089.
54. Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med*. 2001, 194, 10, 1541-1547.
55. Revy P, Sospedra M, Barbour B, Trautmann A Functional antigen-independent synapses formed between T-cells and dendritic cells *Nat Immunol* 2001, 2, 925-931
56. Richardson SK, Newton SB, Bach TL, Budgin JB, Benoit BM, Lin JH, Yoon JS, Wysocka M, Abrams CS, Rook AH. Bexarotene blunts malignant T-cell chemotaxis in Sézary syndrome: reduction of chemokine receptor 4-positive lymphocytes and decreased chemotaxis to thymus and activation-regulated chemokine. *Am J Hematol*. 2007, 82, 9, 792-797.
57. Robert C, Kupper TS. Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med*. 1999, 341, 24, 1817-1828.
58. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999, 401, 6754, 708-712.
59. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2000, 18, 593-620.
60. Schlegelberger B, Himmler A, Godde E, Grote W, Feller Acm Lennert K Cytogenetic findings in peripheral T-cell lymphoma as a basis for distinguishing low-grade and high-grade lymphomas *Blood* 1994, 83, 505-511
61. Sezary A., Bouvrain Y. Erythrodermie avec presence de cellules monstreuses dans derme et dans sang circulant *Bull soc Fr Dermatol Syphiligr* 1938, 45, 254-260

62. Sokołowska-Wojdyło M, Lech-Marańda E, Placek W, Meder J, Walewski J Leczenie pierwotnych chłoniaków skóry. Rekomendacje Sekcji Chłoniaków Skóry Polskiej Grupy Badawczej Chłoniaków (PLRG). *Przegl Dermatol* 2010, 4, 225-242
63. Sokołowska-Wojdyło M, Maciejewska-Radomska A, Lewandowski K, Barańska-Rybak W., Ługowska-Umer H, Roszkiewicz J Dipeptydylowa aminopeptydaza IV (CD26) w codziennej diagnostyce chłoniaków pierwotnie skórnych z komórek T (Cutaneous T Cell Lymphomas – CTCL) *Przegl Dermatol.* 2010, 97, 74-78
64. Sokołowska-Wojdyło M, Roszkiewicz J Rola chemokin i ich receptorów w chłoniakach T-komórkowych pierwotnie skórnych. *Przegl. Dermatol* 2004, 91, 509-515
65. Sokołowska-Wojdyło M, Roszkiewicz J, Barańska-Rybak W, Gaffal E, Szczerkowska-Dobosz, Wenzel J, Tüting Ocejna ekspresji antygenu CD26 na limfocytach T DC4+CLA+ krwi obwodowej pomocną metodą w diagnostyce pierwotnie skórnych chłoniaków z komórek T *Przegl Dermatol* 2006, 93, 663-666
66. Sokolowska-Wojdyło M, Wenzel J, Gaffal E, Lenz J, Speuser P, Erdmann S, Abuza-hra F, Bowman E, Roszkiewicz J, Bieber T, Tüting Circulating clonal CLA(+) and CD4(+) T cells in Sézary syndrome express the skin-homing chemokine receptors CCR4 and CCR10 as well as the lymph node-homing chemokine receptor CCR7. *Br J Dermatol.* 2005, 152, 2, 258-264
67. Sokołowska-Wojdyło M, Speuser P, Tüting T Hodowla nowotworowych komórek T w chłoniakach pierwotnie skórnych z komórek T – nieustające wyzwanie *Przegl Dermatol* 2007, 4, 495-498.
68. Stanford MM, Issekutz TB. The relative activity of CXCR3 and CCR5 ligands in T lymphocyte migration: concordant and disparate activities in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol.* 2003, 74, 5, 791-799.
69. Starkbaum G, Loughran TP, Waters CA, Ruscetti FK Establishemnt of an IL-2 independent humanT-cell line possessing only the p70 IL-2 receptor *Int J Cancer* 1991, 49, 246-253
70. Swerdlow SH., Campo E, Harris NL i wsp. WHO classification of tumors of hemato-poietic lymphoid issues. International Agency for Research on Cancer (IARC) Lyon 2008, 179-317
71. Teraki Y, Miyake A, Takebayashi R, Shiohara T. Homing receptor and chemokine receptor on intraepidermal T cells in psoriasis vulgaris. *Clin Exp Dermatol.* 2004, 29, 6, 658-663.
72. Thaler S, Burger AM, Schult T, Brill B, Bittnes A, Oberholzer PA Establishment of a mouse xenograft model for mycosis fungoides *Exp Dermatol* 2004, 13, 406-412
73. Thor Straten P, Ralfkiaer E, Hendrix J, Seremet T, Vejlsgaard GL, Zeuthen JT Cell receptor variable region genes in cutaneous T cell lymphomas *Br J Dermatol* 1998, 138, 3-12

74. Tietz W, Allemand Y, Borges E, von Laer D, Hallmann R, Vestweber D, Hamann A. CD4⁺ T cells migrate into inflamed skin only if they express ligands for E- and P-selectin *J Immunol.* 1998, 161, 2, 963-970.
75. Vestergaard C, Bang K, Gesser B, Yoneyama H, Matsushima K, Larsen CG. A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA⁺CCR4⁺ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J Invest Dermatol.* 2000, 115, 4, 640-646.
76. von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med.* 2000, 343, 14, 1020-1034.
77. Washington LT, Huh YO, Powers LC, Duvic M, Jones D. A stable aberrant immunophenotype characterizes nearly all cases of cutaneous T-cell lymphoma in blood and can be used to monitor response to therapy. *BMC Clin Pathol.* 2002, 2, 1, 5.
78. Wenzel J, Henze S, Wörenkämper E, Basner-Tschakarjan E, Sokolowska-Wojdylo M, Steitz J, Bieber T and Tüting T Role of the Chemokine Receptor CCR4 and its Ligand Thymus and Activation-Regulated Chemokine/CCL17 for Lymphocyte Recruitment in Cutaneous Lupus Erythematosus *J Invest Dermatol* 2005; 124, 1241–1248.
79. Willemze R, Jaffe ES, Burg G WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas *Blood* 2005, 105, 3768-3785
80. Willemze R, Kerl H, Sterry W, Berti E, Cerroni L, Chimenti S, Diaz-Peréz JL, Geerts ML, Goos M, Knobler R, Ralfkiaer E, Santucci M, Smith N, Wechsler J, van Vloten WA, Meijer CJ. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood.* 1997, 90, 1, 354-371.
81. Wood GS, Tung R, Haeffner A, Crooks C, Liao S, Orozco R Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangement in early mycosis fungoides/Sezary syndrome by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis *J Invest Dermatol* 1994, 103, 34-41
82. Yano H, Ishida T, Inagaki A, Ishii T, Ding J, Kusumoto S, Komatsu H, Iida S, Inagaki H, Ueda R. Defucosylated anti CC chemokine receptor 4 monoclonal antibody combined with immunomodulatory cytokines: a novel immunotherapy for aggressive/refractory Mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Clin Cancer Res.* 2007, 13, 21, 6494-6500.