



## Επίδραση των Β ρυθμιστικών κυττάρων στην ομοιοστασία των Tregs και Th17 κυττάρων σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση

Αθανάσιος Μαυρόπουλος, Γεώργιος Ευθυμίου, Δημήτριος Π. Μπόγδανος, Λάζαρος Ι. Σακκάς

Πανεπιστημιακή Κλινική Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας και Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, Λάρισα 41 110, Θεσσαλία, Ελλάδα

### ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

Η συστηματική σκλήρυνση (ΣΣκλ) είναι χρόνια πάθηση που χαρακτηρίζεται από ίνωση, διέγερση του ανοσιακού συστήματος, και μικροαγγειοπάθεια.<sup>1-8</sup> Τα τελευταία έτη, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα ρυθμιστικά Β λεμφοκύτταρα (Bregs) παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αυτοανοσίας και ότι στην επικράτηση της βλαπτικής δράσης των αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων στα αυτοάνοσα νοσήματα σημαντικό ρόλο παίζει η ανεπάρκεια λειτουργικών ρυθμιστικών Β λεμφοκυττάρων (Bregs).<sup>9-10</sup> Τα Bregs χωρίζονται σε ρυθμιστικά CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) (transitional Bregs) και τα memory Bregs. Τα κύτταρα αυτά καταστέλλουν άλλα κύτταρα κυρίως μέσω παραγωγής ιντερλευκίνης-10 (IL-10).<sup>11</sup> Ο ρόλος των Bregs έχει μελετηθεί σε πειραματικά μοντέλα νόσων και σε ανθρώπους με διάφορες νόσους. Στη ΣΣκλ υπάρχει διαταραχή της ομοιοστασίας των Β λεμφοκυττάρων, με υπερδιεγερμένα Β λεμφοκύτταρα να παράγουν αυτοαντισώματα που ευοδώνουν την ίνωση.<sup>12</sup> Πρόσφατα δείξαμε ότι στη ΣΣκλ υπάρχει ανεπάρκεια των Bregs.<sup>13</sup> Συγκεκριμένα, στην ΣΣκλ υπολείπονται τόσο τα transitional Bregs όσο και τα memory Bregs, και η παραγόμενη - από τα λιγοστά Bregs - IL-10 είναι πολύ λιγότερη από εκείνη που παράγεται από Bregs υγιών μαρτύρων.<sup>13</sup>

**Κύριος ερευνητής και  
Υπεύθυνος αλληλογραφίας:**  
Καθηγητής Λάζαρος Ι. Σακκάς  
Πανεπιστημιακή Κλινική Ρευματολογίας  
και Κλινικής Ανοσολογίας,  
Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών  
Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας και  
Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο  
Λάρισας, Λάρισα 41 110,  
Θεσσαλία, Ελλάδα  
Τηλ.: 2413502813, Fax: 2413501016  
E-mail: lsakkas@med.uth.gr

Υπάρχει διαφορά στα Bregs μεταξύ περιορισμένης και διάχυτης δερματικής ΣΣκλ, μεταξύ της πρώιμης και προχωρημένης νόσου και της συνύπαρξης ή όχι πνευμονικής ίνωσης.<sup>13</sup> Μάλιστα, ασθενείς με ΣΣκλ-σχετιζό-

μενη πνευμονική ίνωση έχουν σχεδόν παντελή έλλειψη των Bregs.<sup>13</sup>

Η αντιφλεγμονώδη δράση της IL-10 και η ανοσορυθμιστική της δράση σε λεμφοκυτταρικούς Β και Τ αυτοδραστικούς πληθυσμούς είναι τεκμηριωμένη.<sup>14</sup> Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει τον καθοριστικό ρόλο που παίζουν τα Bregs στην ισορροπία μεταξύ των ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων (Tregs) και Th17 λεμφοκυττάρων.<sup>15-17</sup> Φαίνεται ότι τα Bregs επάγουν Tregs (CD25+, FoxP3+ κύτταρα),<sup>18-19</sup> και αντίστροφα τα Tregs επάγουν την παραγωγή των Bregs *in vitro*.<sup>20</sup> Σε μερικούς από τους ασθενείς μας παρατηρήσαμε υποπληθυσμούς Β κυττάρων που μπορούσαν να παράξουν μικρή, αλλά όχι αμελητέα, παραγωγή IL-10. Αυτό μας οδηγεί στην υπόθεση ότι οι πληθυσμοί αυτοί μπορεί να αποτελέσουν πιθανές δεξαμενές εν δυνάμει ανοσορυθμιστικών Β λεμφοκυττάρων. Αυτά τα κύτταρα ήταν ανιχνεύσιμα ακόμη και σε ασθενείς με προχωρημένο διάχυτο δερματικό ΣΣκλ. Θα απομονώσουμε τους υποπληθυσμούς αυτών των Β λεμφοκυττάρων και θα τα διαφοροποιήσουμε *in vitro* σε επαγόμενα (inducible) Bregs κατά ανάλογο τρόπο με τα inducible Tregs.

### Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός της προτεινόμενης μελέτης είναι να μελετήσουμε τους κυτταρικούς υποπληθυσμούς των Bregs, Tregs και Th17 σε ασθενείς με ΣΣκλ, και την ικανότητα των Bregs να επάγουν αυτόλογα Tregs. Συγκεκριμένα, ο σκοπός της μελέτης είναι να μελετήσουμε: α) τα Bregs, τα Tregs, και τα Th17 κύτταρα σε ασθενείς με ΣΣκλ· β) την *in vitro* επαγωγή αυτόλογων Bregs από Β λεμφοκύτταρα που στη μελέτη μας φάνηκε ότι μπορούν να αποκτήσουν φαινοτυπικούς χαρακτηριστές Bregs και που εν δυνάμει θα μπορούσαν να

παράγουν IL-10, και γ) την *in vitro* επίδραση των Bregs στα Tregs σε ασθενείς με ΣΣκλ.

## ΥΛΙΚΟ - ΜΕΘΟΔΟΙ

### Βιολογικό Υλικό – Ασθενείς

Η ερευνητική πρόταση περιλαμβάνει την μελέτη, απομόνωση και καλλιέργεια Β και Τ λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος από ασθενείς με ΣΣκλ (με πρώιμη νόσο, με περιορισμένη δερματική ΣΣκλ, και με διάχυτη δερματική ΣΣκλ). Επίσης θα περιλαμβάνει ασθενείς από ρευματοειδή αρθρίτιδα με πνευμονική ίνωση ως παθολογικούς μάρτυρες, καθώς και υγιείς μάρτυρες. Όλοι οι ασθενείς θα μετάσχουν ύστερα από έγγραφη και ενημερωμένη συγκατάθεση της συγκεκριμένης μελέτης από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας Νοσοκομείου και σύμφωνα με την Διακήρυξη του Ελσίνκι. Οι ασθενείς υποβάλλονται για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς λόγους σε τακτικές αιμοληψίες. Για τη μελέτη θα ληφθούν κατά τη διάρκεια μιας τέτοιας αιμοληψίας επιπρόσθετη ποσότητα αίματος (15-20 mL) από τις οποίες απομονώνονται και καταψύχονται τα μονοπύρνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMC, ορός, RNA & DNA). PBMCs από αρρώστους με ΣΣκλ, παθολογικούς και υγιείς μάρτυρες έχουν επίσης συλλεχτεί και αποθηκευτεί σε υγρό άζωτο στην τράπεζα βιολογικού υλικού της Πανεπιστημιακής Κλινικής Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας και είναι διαθέσιμα για το σύνολο των πειραμάτων.

### Μεθοδολογία

Μετά την απόψυξή τους, τα βιώσιμα λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣΣκλ θα επωάζονται σε καλλιεργητικό μέσο RPMI 1640 με χαμηλή περιεκτικότητα ορού (5-10%) στους 37° C. Τα Β λεμφοκύτταρα θα χαρακτηρίζονται με επιφανειακή χρώση με συζευγμένα αντισώματα έναντι των CD19, CD24, CD38, και CD27 και θα μετρούνται τα ποσοστά naïve, memory B cells and transitional, και memory Bregs.<sup>13</sup> Από άλλο φιαλίδιο κρυσταλλοποίησης, ο συνολικός πληθυσμός των Β κυττάρων θα διαχωρίζεται με την χρήση μαγνητικών σφαιριδίων (Miltenyi-B cell negative selection) από τα συνολικά PBMC. Ανάλογα θα διαχωρίζεται διαδοχικά και ο συνολικός πληθυσμός αυτόλογων CD4+ Τ λεμφοκυττάρων από κάθε ασθενή.

Τα Β λεμφοκύτταρα ή και τα ολικά PBMC θα καλλιεργούνται χωρίς ή με την παρουσία ειδικών ή μη διεγερτών, όπως polyclonal IgM (BCR activation) bacterial CpG (ODN2006 – TLR-9 activation), bacterial LPS (TLR-4 activation, PMA, ιονομυκίνης, κ.ά. με στόχο την ενεργοποίηση και διαμορφοποίηση των Β κυττάρων στην παραγωγή IL-10. Οι χρόνοι επώασης διαφέρουν μεταξύ διαφόρων διεγερτών και λόγω τοξικότητας θα κυμαίνονται από 24-72 ώρες έως 5-7 ημέρες. Θα

γίνεται επώαση πολλαπλών κυτταροκαλλιιεργειών, κάποιων με χρήση gamma-irradiation και άλλων ανοσοκατασταλτικών που μπορεί να συμμετέχουν στην επαγωγή Β και Τ ρυθμιστικών κυττάρων και άλλων με την χορήγηση ανασυνδυασμένων κυτταροκινών όπως IL-2 και IL-15 σημαντικών για την ομαλή ανάπτυξη και κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στη περίπτωση χρώσης κυτταροκινών, σε ορισμένο χρόνο μετά την έναρξη της καλλιέργειας, θα προστίθεται ως αναστολέας της εξωκυττάρωσης πρωτεΐνης brefeldin A, και μετά το πέρας της καλλιέργειας θα γίνεται χρώση των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών με τα ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι επιφανειακών αντιγόνων ή με τα αντίστοιχα ισοτυπικά αντισώματα-μάρτυρες. Μετά από τη διαπερατοποίηση της μεμβράνης των λεμφοκυττάρων με ειδικό διάλυμα σαπονίνης θα γίνεται χρώση με ειδικά αντισώματα, όπως εκείνα των ενδοκυττάρων κυτταροκινών της IL-10, IL-6.

Επίσης, θα γίνεται χρώση των Β αλλά και των Τ λεμφοκυττάρων με συζευγμένα αντισώματα έναντι του CD25 και του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 για τον χαρακτηρισμό Tregs. Τα Β λεμφοκύτταρα που παράγουν IL-10 θα μετρούνται και θα απομονώνονται με την χρήση μαγνητικών σφαιριδίων Miltenyi, αν πρόκειται για συνολικά PBMC. Στην συνέχεια τα Β κύτταρα θα καλλιεργούνται με αυτόλογα CD4 Τ λεμφοκύτταρα σε συγκεκριμένες αναλογίες και θα μελετάται η ανοσοκαταστολή με proliferation assays ή και την μέτρηση φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως IFN-γ και IL-6 από τα Τ λεμφοκύτταρα.

### Σημασία της Μελέτης - Αναμενόμενα Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα της μελέτης έχουν τεράστια σημασία για την κατανόηση της παθογένεσης της ΣΣκλ αλλά και την εξεύρεση ικανοποιητικών θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Απώτερος σκοπός της μελέτης είναι να αναδείξουμε την πιθανότητα αποτελεσματικής θεραπευτικής αγωγής που θα στηρίζεται στην αυτόλογη μετάγγιση inducible Bregs (σε συνδυασμό ή όχι με inducible Tregs) σε ασθενείς με ΣΣκλ.

Για να γίνει αυτό, πρέπει πρώτα να δούμε αν Β λεμφοκύτταρα που υπάρχουν σε ασθενείς με ΣΣκλ και έχουν δυνητικούς χαρακτήρες Bregs μπορούν πραγματικά να μετατραπούν σε Bregs και να παράξουν IL-10. Η ερευνητική μας ομάδα είναι σε πλεονεκτική θέση όσον αφορά στη μελέτη των Bregs και την αλληλεπίδρασή τους με τα Tregs/Th17, μια και έχει μελετήσει σε βάθος τα κύτταρα αυτά και ήταν η πρώτη ομάδα που ανάδειξε το σημαντικό τους ρόλο στην ΣΣκλ.

### ΣΥΓΚΡΟΥΣΗ ΣΥΜΦΕΡΟΝΤΩΝ:

Οι συγγραφείς δεν αναφέρουν σύγκρουση συμφερόντων για τη συγκεκριμένη δημοσίευση.

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sakkas L I, Bogdanos D P. Systemic sclerosis: New evidence re-enforces the role of B cells. *Autoimmun Rev* 2016;15:155-61.
2. Sakkas L I, Simopoulou T, Katsiari C, Bogdanos D, Chikanza I C. Early systemic sclerosis-opportunities for treatment. *Clin Rheumatol* 2015;34:1327-31.
3. Cantarini L, Rigante D, Vitale A, Napodano S, Sakkas L I, et al. Intravenous immunoglobulins (IVIg) in systemic sclerosis: a challenging yet promising future. *Immunol Res* 2015;61:326-37.
4. Sakkas L I, Chikanza I C, Platsoucas . Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2:679-85.
5. Sakkas L I. New developments in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmunity* 38:113-6.
6. Kalogerou A, Gelou E, Mountantonakis S, Settas L, Zafiriou E, et al. Early T cell activation in the skin from patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1233-5.
7. Sakkas L I, Platsoucas C D. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheum* 2004;50: 1721-33.
8. Sakkas L I, Xu B, Artlett C M, Lu S, Jimenez S A, et al. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Immunol* 2002;168:3649-59.
9. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo D J, Matsushita T, Horikawa M, et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* 2012;491:264-8.
10. Xing C, Ma N, Xiao H, Wang X, Zheng M, et al. Critical role for thymic CD19+CD5+CD1dhiIL-10+ regulatory B cells in immune homeostasis. *J Leukoc Biol* 2015;97:547-56.
11. Khoder A, Sarvaria A, Alsuliman A, Chew C, Sekine T, et al. Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD. *Blood* 2014;124:2034-45.
12. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum* 2004;50:1918-27.
13. Mavropoulos A, Simopoulou T, Varna A, Liaskos C, Katsiari C, et al. B regulatory cells are decreased and functionally impaired in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol*.2016;68:494-504.
14. Lampropoulou V, Hoehlig K, Roch T, Neves P, Calderon Gomez E, et al. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J Immunol* 2008;180:4763-73.
15. Carter N A, Rosser E C, Mauri C. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R32.
16. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein M R, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med* 2013;5:173ra123.
17. Kim H Y, Cho M L, Jhun J Y, Byun J K, Kim E K, et al. The imbalance of T helper 17/regulatory T cells and memory B cells during the early post-transplantation period in peripheral blood of living donor liver transplantation recipients under calcineurin inhibitor-based immunosuppression. *Immunology* 2013;138:124-33.
18. Shah S, Qiao L. Resting B cells expand a CD4+CD25+Foxp3+ Treg population via TGF-beta3. *Eur J Immunol* 2008;38:2488-98.
19. Kessel A, Haj T, Peri R, Snir A, Melamed D, et al. Human CD19(+)/CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory

- cells. *Autoimmun Rev* 2012;11:670-7.
20. Zheng M, Xing C, Xiao H, Ma N, Wang X, et al. Interaction of CD5 and CD72 is involved in regulatory T and B cell homeostasis. *Immunol Invest* 2014;43:705-16.