

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО

„Акад. Кирил Братанов“

Шина Иванова Пашова

**АНТИГЕН-ПРЕДСТАВЯЩИ И РЕГУЛАТОРНИ ФУНКЦИИ НА
В-ЛИМФОЦИТНИ СУБПОПУЛАЦИИ**

АВТОРЕФЕРАТ

Към дисертация за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

по научна специалност „Имунология“ – шифър: 01.06.23

Научни ръководители:

Доц. д-р Анастас Пашов

Доц. Милена Мурджева

Официални рецензенти:

Проф. Магдалена Чорбаджиева

Доц. Петя Димитрова

София, 2015

Дисертационният труд е написан на 102 страници, илюстриран е с 24 фигури и с 2 таблици. В библиографския списък са цитирани 233 литературни източника от журнали и 2 книги.

Изследванията включени в дисертацията са проведени в ИМБ – БАН, департамент „Имунология“ –, София и INSERM UMRS 872 Equipe 16 - Immunopathology and Therapeutic Intervention, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris.

Дисертационният труд е преминал успешно процедура за предварително обсъждане и е насочен за защита на заседание на научния съвет на ИБИР-БАН, състоял се на 27.10.2015 г., София.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на 18.12.2015 от 11.00 часа в заседателната зала на ИБИР, бул. Цариградско шосе 73, гр. София пред научно жури в състав:

1. Проф. Магдалена Чорбаджиева
2. Проф. д-р Мария Николова
3. Доц. Петя Димитрова
4. Проф. д-р Стефан Лолов
5. Доц. Милена Мурджева

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на ИБИР-БАН.

Отпечатването на автореферата е финансирано по проект BG051PO001-3.3.06-0059 по ОПЧР на ЕСФ.

Забележка: Номерата на фигурите в автореферата не съответстват на номерата в дисертационния труд.

СЪДЪРЖАНИЕ

УВОД	5
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	7
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	8
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	9
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	35
ИЗВОДИ.....	37
ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ УЧАСТИЯ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА.....	38
ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА.....	40

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

В-1 клетки	В клетки с фетален чернодробен произход
В10 клетки	В клетки, продуциращи IL-10
В-2 клетки	В клетки с костно-мозъчен произход
Врег клетки	В регулаторни клетки
ИВИг	Интравенозен имуноглобулин
КМ	Костен мозък
МИВИг	Модифициран интравенозен имуноглобулин
Трег клетки	Т регулаторни клетки
ФДК	Фоликулярни дендритни клетки
ANOVA	Analysis of variance
ВР филтър	Лентов (bandpass) филтър
ConA	Concanavalin A
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FIX	Фактор IX
FO В клетки	Фоликулярни В клетки
FVIII	Фактор VIII
IRA В клетки	Innate Response Activator В cells/В клетки активатори на вродения имунитет
LPS	Lipopolysaccharide
MBP	Myelin basic protein
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
MZ В клетки	В клетки от маргиналната зона
T1 В клетки	Транзитивни В клетки тип 1
T2 В клетки	Транзитивни В клетки тип 2

УВОД

В лимфоцитите са обект на иновативни имунологични изследвания, чиято цел е намиране на начини за превантивна терапия и лечение на туморни, автоимунни и инфекциозни заболявания. Основният подход е модулиране на регулаторните механизми, които обуславят посоката на имунния отговор. Тук е разгледан потенциалът на В лимфоцитите чрез антигенно-представяне и чрез секретиранияте от тях цитокини и имуноглобулини да влияят на посоката на имунния отговор и изхода от него.

В клетките проявяват пластичност във възможностите си да стимулират или потискат Т клетките (1). Тази пластичност е отражение на свойствата на отделните популации В клетки да активират Т клетки и на участието на различни разтворими и мембранно свързани фактори. Например, В клетките от маргиналната зона на слезката (MZ В клетки) по-силно, в сравнение с тези от фоликулите (FO В клетки), стимулират CD4+ Т клетки и индуцират Th1 реакции (2), докато FO В клетките са типичните стимулатори на Th2 отговори (3, 4). Съществуват и условия, при които В клетките стимулират Т регулаторни клетки или пък самите В клетки, след като бъдат активирани, секретират IL-10 и други цитокини, с което оказват контрол и предизвикват потискане на имунните отговори (5).

Регулаторна В клетъчна функция се открива основно сред етапи от диференциацията на В клетките както и от цикличните промени при имунен отговор каквито са етапите на незрелите В лимфоцити в периферията както и преплазмабластите. Специфични популации с висок процент IL-10 продуциращи В клетки са също MZ и B-1 при мишките. Отчасти тези етапи съответстват на контролните точки на механизмите на толерантност според Goodnow (6), в които се срещат автореактивни В клетки. От друга страна, регулаторните функции на В клетките обхващат не само конкретно имунокомпетентността/толерантността, но и по-общо контрола на възпалителните процеси произтичащи от имунната функция. Това, по-конкретно, е вярно за отрицателната обратна връзка от преплазмабластите. Изобщо, имунорегулация чрез IL-10 има характер на отрицателна обратна връзка потискаща индуктивната фаза на имунния отговор (активиране на Th1 клетки) и стимулираща ефекторната фаза (активация и диференциация на В клетките и на цитотоксични ефектори)(7-10). Регулаторната функция на В

клетките е интимно свързана със сигналите през BCR (11, 12). По този начин стимулацията на полиспецифични и автореактивни В-клетъчни компартименти (транзитивни, MZ, B-1) с автоантигени или анти-идиотипни антитела се явява условие за отключване на регулаторната им функция.

Така се очертава една сложна картина, в която различни В клетъчни популации свързват на системно ниво регулаторните мрежи от сигнали и осигуряват премерена и адекватна имунна функция. В тази картина се очертават няколко бели петна. Развитието на В-клетъчно базираните имунотерапевтични подходи без съмнение изисква познанията ни относно тези регулаторни връзки на В лимфоцитите да бъдат своевременно попълнени. Незследвани проблеми в тази връзка са потенциалната регулаторна роля на T1 транзитивни В клетки както и ефекта от стимулиране с и представяне на (авто)антигени и ИВИг от полиспецифични В клетки (най-често от MZ и B-1 компартиментите).

Въз основа на изложените данни ние си позволихме да формулираме хипотезата, че T1 клетките както и T2 В клетите притежават регулаторна функция, както и че стимулирането на полиспецифични клетки както със сурогатни хаптени (ФИТЦ, флуоресцеин изо-тио-цианат, FITC) така и с високо полиспецифичен репертоар от ИГГ антитела отключва регулаторни функции и може да осигури контрол на автоимунни и възпалителни процеси. За да тестваме тази хипотеза и да попълним липсващата информация ние си поставихме следните цел и задачи.

ЦЕЛ

Изясняване на регулаторната функция на транзитивни В клетки тип I и на В-1 преплазмабласти в модел на контрол на сепсис чрез ИВИг.

ЗАДАЧИ

1. Изолиране на основните В лимфоцитни популации от миши спленоцити с помощта на магнитни наночастици и флоуцитометър с клетъчен сортер;
2. Разработване на модел на първичен имунен отговор в смесена лимфоцитна култура (MLR) за оценяване на пролиферацията на Т лимфоцитите и на продуцираните от тях цитокини чрез проточна цитометрия;
3. Сравнение на антиген-представящата/регулаторна функция на основните субпопулации В лимфоцити в миша слезка – T1, T2, от маргиналната зона и фоликуларни В лимфоцити с помощта на смесена лимфоцитна култура;
4. Изследване на антиген-представящата/регулаторна функция на полиспецифични миши В лимфоцити, използвайки като модел антигенно разпознаване и представяне на OVA-FITC към трансгенни OVA-специфични CD4⁺ Т лимфоцити;
5. Изследване участието на перитонеални В1 лимфоцити в лечението на експериментален сепсис с модифициран имуноглобулинов препарат за венозно приложение.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали

Биотинилирани или флуорохром-конюгирани анти-миши антитела, магнитни наночастици, китове за изолиране на В/Т лимфоцити, кит за измерване пролиферацията на лимфоцитите, поликлонални стимулатори (LPS, ConA), ИВИг препарати, багрила за изключване на мъртви клетки, пълна среда за култивиране DMEM, буфери и помощни реагенти (FCS, BSA)

Лабораторни животни

BALB/c, C57BL/6, трансгенни OVA₃₂₃₋₃₃₉-специфични OTII (C57BL/6) и ICR мишки

Методи

Изолиране на лимфоцитни популации

Проточна цитометрия

In vitro стимулиране на Т лимфоцити

Третиране на ИВИг с железни йони

In vitro стимулиране на В лимфоцити

Индуциране на експериментален сепсис

Статистически анализ

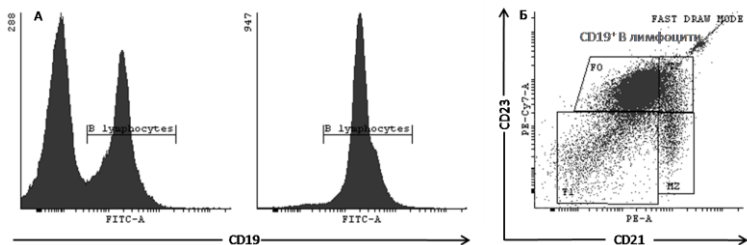
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Изолиране на основните В лимфоцитни популации от миши спленоцити с помощта на магнитни наночастици и флоуцитометър с клетъчен сортер.

Задачата да се характеризират антиген-представящите свойства на четири основни субпопулации В клетки в слезката при мишки - фоликуларни (FO), маргинални (MZ), ранни транзитивни (T1) и късни транзитивни (T2) В лимфоцити, наложи първоначалните експерименти да бъдат насочени към оптимизиране на условията за тяхното сортиране. Това включи подбор на подходящи повърхностни маркери, на които да се базира селекцията на популациите, както и пробване на различни стратегии за негативна и позитивна селекция с помощта на магнитни наночастици. Основните повърхностни антигени, които бяха използвани за разделяне на описаните популации са CD21 (комplement рецептор 2, CR2), CD23 (ниско-афинитетен рецептор за IgE, FcεRII) и CD93 (C1q рецептор). Двойката маркери CD21/CD23 се експресира количествено различно от FO и MZ В лимфоцитите, като FO В клетките са предимно CD23^{hi}CD21^{low}, а MZ В клетките са CD21^{hi}CD23^{low/-}. CD21/CD23 двойката дава възможност и за добро разграничаване на T1 от T2 В клетките по силната им експресия при T2 и липсата на експресия и на двата маркера при T1 В клетките. CD93 се експресира от ранните В лимфоцити и дава възможност за разграничаването им от зрелите В клетки в покой, които не го експресират. В проведените експерименти се стремихме да се придържаме към използването на негативна стратегия за селекция с магнитни наночастици. Често дори много прецизните комбинации от повърхностни маркери не позволяват дадена клетъчна популация да бъде изолирана чрез негативна селекция или популацията е толкова малка, че негативното сортиране е неефективен подход. Поради тези ограничения, някои от изследваните от нас популации бяха частично позитивно селектирани. В резултат, ние установихме процедура за разделяне на В-клетъчните субпопулации, която включва две стъпки на негативна селекция и една стъпка на позитивна селекция. Първо, чрез премахване на не-В лимфоцитите (CD3⁺, CD8⁺, CD11b⁺ и CD49⁺ клетки) от спленоцити беше изолирана фракцията на В лимфоцитите, които идентифицирахме по експресията на CD19 (фигура 1A). В следваща стъпка на негативна селекция, от получените В лимфоцити бяха сортирани субпопулациите на FO, MZ и T1 В лимфоцитите чрез отстраняване съответно на CD21+CD93+, CD23+CD93+ и

CD21⁺CD23⁺ В клетките (фигура 1Б). При негативна селекция на малки популации често получената клетъчна фракция е с понижена чистота в сравнение със селекция на големи популации. Затова, в третата стъпка, негативно селектираните FO, MZ и T1 В лимфоцити бяха обогатени чрез позитивна селекция по общия за всички В клетки маркер CD19.

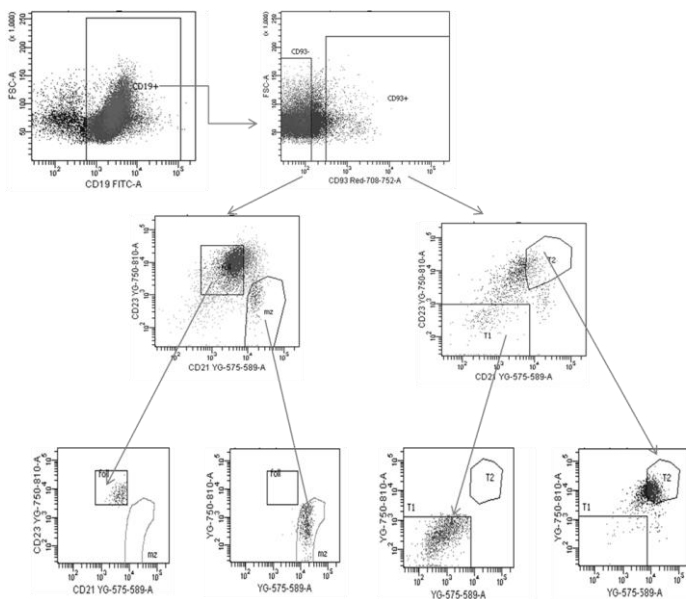
Популацията на T2 В клетките не може да бъде изолирана самостоятелно нито чрез позитивно нито чрез негативно магнитно сортиране по CD21, CD23 и CD93, тъй като T2 клетките са позитивни и по трите маркера (фигура 1Б). Поради това, тяхното влияние върху активацията на Т клетките беше проследено индиректно чрез отчитане на ефекта от присъствието или отсъствието им в стимулаторната популация В лимфоцити. За целта, позитивно бяха сортирани FO и MZ В клетки, съответно по маркерите CD23 и CD21. CD23⁺ В лимфоцитите представляват основно FO В клетки и малка част T2 клетки, докато CD21⁺ В лимфоцитите включват приблизително равни части MZ и T2 В клетки. T2 В лимфоцитите бяха премахнати от популациите на CD23⁺ и CD21⁺ В лимфоцитите чрез негативна селекция по маркера CD93.



Фигура 1: (А) Идентифициране на CD19⁺ спленоцити (В лимфоцити) преди и след негативна селекция (не-В лимфоцитите са маркирани като CD3⁺, CD8⁺, CD11b⁺ и CD49⁺ клетки); (Б) схематично разделение на основните субпопулации В лимфоцити според експресията на CD21 и CD23. T1 В клетките са идентифицирани като CD21⁻CD23⁻CD93⁺, а T2 В клетките – като CD21⁺CD23⁺CD93⁺. Фигурата дава представа за предпоставките, поради които бяха избрани конкретните стратегии за магнитно и FACS сортиране на основните популации В лимфоцити.

При експериментите използващи овалбумин като моделен антиген тези популации бяха изолирани и посредством FACS-сортиране базирано на

същите повърхностни маркери както и при магнитното сортиране: CD19, CD21, CD23 и CD93 (фигура 1Б и фигура 2).



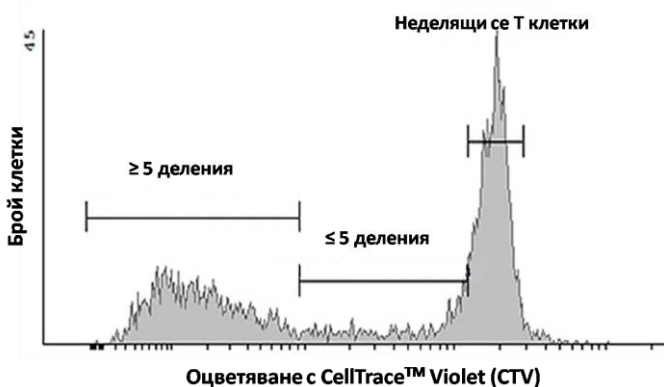
Фигура 2: Стратегия за FACS сортиране на T1, T2, MZ и FO В клетките.

Сортирани бяха негативно изолирани CD19⁺ В лимфоцити, от които предварително бяха премахнати мъртви, апоптотични и дублетни клетки. От CD93⁺ клетките бяха изолирани транзитивните CD21⁻CD23⁻ T1 В лимфоцити и CD21⁺CD23⁺ T2 В лимфоцити. От CD93⁻ клетките бяха изолирани зрите CD23⁺CD21⁻ FO В лимфоцити и CD21⁺CD23⁻ MZ В лимфоцити.

Така получените В лимфоцитни популации бяха ко-култивирани с позитивно селектирани по маркерите CD3 или CD5 Т клетки, неселектирани спленоцити или негативно сортирани Т клетки. Използването като респондери на чиста популация негативно сортирани Т клетки беше предпочитано пред Т клетки изолирани позитивно, а несортирани спленоцити бяха използвани само за сравнение.

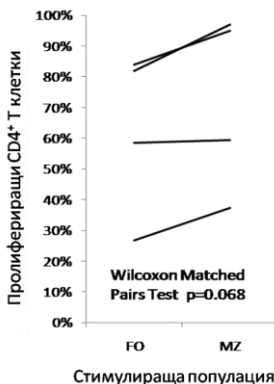
2.Разработване на модел на първичен имунен отговор в смесена лимфоцитна култура (MLR).

В първата си част нашите експерименти бяха насочени към характеризиране на иницирираните от В клетките първични имунни отговори, които са от основно значение за развитието на имунотерапевтичните подходи. Като модел на първичен имунен отговор беше използвана еднопосочна смесена лимфоцитна култура, тъй като алогенният отговор по дефиниция е следствие от първа експозиция на Т клетъчния репертоар на чуждите антигени. При това, смесената лимфоцитна култура води до поликлонален отговор, който много лесно се проследява. Способността на наивните В-лимфоцити да стимулират Т клетки беше оценявана по процента на пролифериралите Т клетки, които предварително бяха оцветени с вътреклетъчното багрило CellTrace™ Violet (Фигура 3), както и по продукцията на цитокини от пролифериралите Т клетки.



Фигура 3: Пролифериращи CD4⁺Т клетки стимулирани с алогенни В лимфоцити. Пролиферацията беше проследявана с помощта на багрилото CellTrace™ Violet. Подобно на други вътреклетъчни багрила, този флуорохром се свързва трайно с белтъците на клетката и остава там, като флуоресцентният му сигнал намалява наполовина след всеки цикъл на клетъчно делене. Освен процентът на пролифериращите клетки, по сигнала на вътреклетъчното багрило може да бъде приблизително определен броят на деленията на пролифериращите клетки.

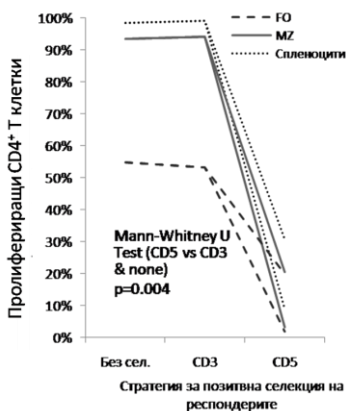
За сравнение с известното от литературата, най-напред беше проследена стимулаторната активност на FO и MZ В лимфоцитите. Негативно селектирани CD21⁻CD93⁻ FO и CD23⁻CD93⁻MZ CD19⁺ В лимфоцити от аутбредни ICR мишки (смес от спленоцити на 2 животни за по-висока алогенна стимулация) бяха ко-култивирани със CD3⁺ или CD5⁺ позитивно селектирани Т клетки или несортирани спленоцити от инбредни BALB/c мишки (обикновено от едно животно). В съгласие с литераурни данни получени с други методи (2), MZ В лимфоцитите показаха тенденция да индуцират по-силна пролиферация на алогенни CD4⁺ Т лимфоцити в сравнение с FO В лимфоцитите (фигура 4). По-силният им стимулаторен потенциал се обяснява с експресираните от тях високи нива на MHC клас II и ко-стимулаторни молекули (13, 14).



Фигура 4: MZ В клетките стимулират по-силен пролиферативен отговор в смесена лимфоцитна култура отколкото FO В клетките. Разликите в процентите на дялящите се клетки в двете групи са в резултат на използването на различни стратегии за сортиране на респондерите в отделните експерименти.

Вътрегруповите разлики в процентите на стимулираните Т клетки (фигура 4) са отражение на различията в използваната стратегия за сортиране на респондерите. При сравняване на процента пролифериращи Т клетки, изолирани по маркерите CD3 и CD5 и неселектирани Т клетки, се вижда ефекта, който позитивното сортиране оказва върху клетките. Културите, в които респондерите бяха изолирани по CD5 (който придава инхибиращ сигнал) показаха по-ниски нива на пролиферация в сравнение с културите, в

които респондерите бяха изолирани по CD3 или неселектирани (фигура 5). Интерес представлява фактът, че изолирането по CD3 (който придава активиращ сигнал) не води до увеличение на процента дялящи се Т клетки в сравнение с несортираните спленоцити, а Т клетките изолирани чрез CD5 също показват по-висока пролиферация в отговор на MZ В клетки, макар и разликата от FO В клетките да е по-малка (фигура 5). Така позитивната селекция се оказва, че повлиява нивото на пролиферация, но не променя съотношенията между различните стимулатори.



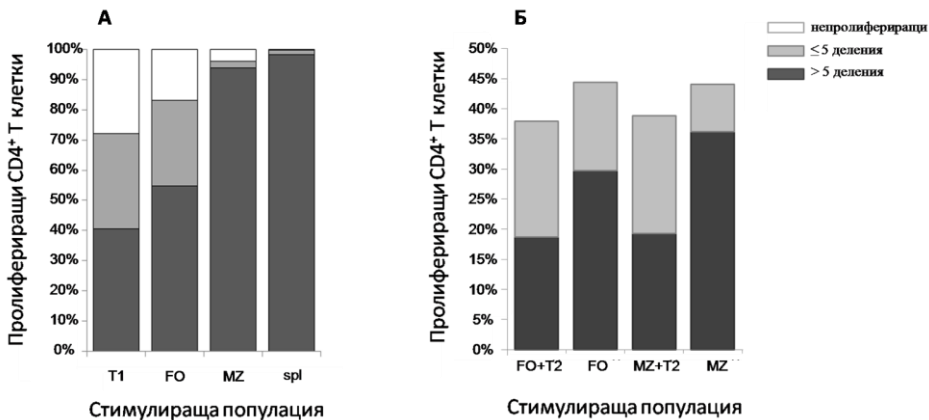
Фигура 5: Ефект на позитивното сортиране върху пролиферативния отговор на Т лимфоцитите. След позитивната селекция по CD5 Т клетките пролиферират слабо, докато селекцията по CD3 не възпрепятства активирането на Т клетките.

3. Сравнение на антиген-представящата/регулаторна функция на основните субпопулации В лимфоцити в миша слезка – T1, T2, от маргиналната зона и фоликуларни В лимфоцити с помощта на смесена лимфоцитна култура.

След като беше показано, че моделът на специфично стимулиране с различни В клетъчни субпопулации основан на смесена лимфоцитна култура възпроизвежда съотношението на нивата на пролиферация, известни от литературата, потенциалът на транзитивните В лимфоцити да активират Т клетки също беше оценен и сравнен с този на зрелите В клетки директно и индиректно. Поради невъзможността T2 В лимфоцитите да бъдат изолирани чрез магнитно сортиране, само популацията на T1 В лимфоцитите беше

негативно сортирана и способността им да стимулират алогенни Т клетки беше директно сравнена с тази на FO и MZ В клетките. Ко-култивирането на CD23⁻CD21⁻ T1, CD21⁻CD93⁻ FO и CD23⁻CD93⁻ MZ В лимфоцити с алогенни Т клетки показва по-ниска способност на T1 В клетките да индуцират Т-клетъчна пролиферация в сравнение с FO и MZ В клетките (фигура 6A). Слабият им стимулаторен потенциал се обяснява с експресиранияте от тях по-ниски нива на МНС клас II и ко-стимулаторни молекули в сравнение със зрелите популации MZ и FO В лимфоцити (15). (13, 14). MZ В клетките, освен по-висок процент пролиферация, индуцираха и повече на брой деления сред пролифериращите CD4⁺ Т клетки (фигура 6A).

Чрез отстраняване на CD93⁺ T2 В клетките от популациите на позитивно селектираните CD23⁺ FO и CD21⁺ MZ В клетки индиректно оценихме техният ефект върху стимулираната от съответните В-лимфоцитни субпопулации Т-клетъчна пролиферация (фигура 6). Ко-култивирането на CD23⁺ FO+T2, CD23⁺CD93⁻ FO, CD21⁺CD93⁺ MZ+T2, CD21⁺CD93⁻ MZ В лимфоцити от ICR мишки с Т клетки от BALB/с мишки показва, че премахването на T2 В лимфоцитите от стимулаторната популация води до повишаване на процента пролифериращи CD4⁺ Т клетки, както по отношение на стимулиращата популация от CD23⁺ FO В лимфоцити, така и по отношение на стимулиращата популация от CD21⁺ MZ В лимфоцити (фигура 6B).

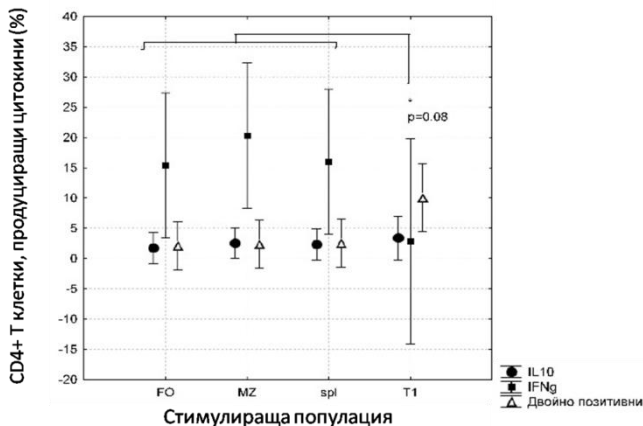


Фигура 6: Потенциал на транзитивните и зрелите В лимфоцити да стимулират алогенни CD4⁺ Т клетки, представително от два експеримента. (А) Негативно сортирани T1 В клетки активират значително по-слабо CD4⁺ Т клетки в сравнение със зрелите FO и MZ В клетки. (Б) Присъствието на T2 В клетките в стимулаторната популация потиска пролиферацията на Т клетките.

Цитокинов профил на стимулираните CD4⁺ Т лимфоцити.

Както рецепторните сигнали между В и Т лимфоцитите при антигенното представяне, така и цитокиновият профил на микросредата определят диференциацията на стимулираните Т лимфоцити в една от няколко алтернативни субпопулации CD4⁺ Т клетки. Основното разделяне е на Th1 и Th2 клетки както и на индуцирани регулаторни Т клетки и Th17. Във връзка с широко обсъжданата регулаторна функция на някои В клетки както и по-рано обсъжданата способност на зрелите В клетки да насочват Т клетъчната диференциация към Th2, ние се спряхме на 2 от многото цитокини, които активират Т клетки секретират - IFN γ и IL-10. Първият е характерен за Th1 отговора докато вторият е обсъждан както като Th2 цитокин, така и като регулаторен/супресивен цитокин. За тази цел пролифериращите CD4⁺ Т клетки бяха оцветени вътреклетъчно с антитела специфични за двата цитокина. Получените резултати от 7 дневно стимулиране на CD4⁺ Т клетки с алогенни T1 В лимфоцити и FO и MZ В лимфоцити показват противоположно насочване на диференциацията на Т клетките от транзитивните и зрелите В клетки. Стимулираните с FO и MZ В клетки CD4⁺ Т лимфоцити продуцираха основно IFN γ и почти напълно липсваше продукцията на IL-10 (фигура 7).

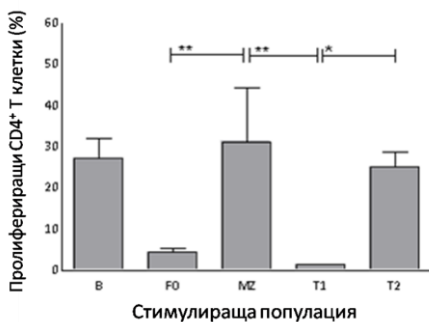
Обратно, алогенните T1 В клетки индуцираха значимо по-малък процент IFN γ и показаха потенциал да индуцират продукцията на IL-10 от активираните T клетки (фигура 7).



Фигура 7: Продукция на IFN γ и IL-10 от CD4⁺ T клетки (BALB/c мишки) стимулирани с алогенни (ICR мишки) T1, MZ, FO В лимфоцити и несепарирани спленоцити в продължение на 7 дни, представително от три експеримента (ANOVA, средноаритметична стойност \pm 95% доверителни интервали) . Цитокиновият профил на T клетките стимулирани с T1 В лимфоцити достоверно се отличава от профила на останалите групи T клетки.

В първоначално използвания модел на смесена лимфоцитна култура респондерите бяха T лимфоцити от BALB/c мишки докато стимулаторните В лимфоцитни популации бяха изолирани от 2 аутбредни мишки ICR. При тази постановка се постига стимулация на по-голям брой CD4⁺ T клетки поради по-голямото разнообразие от алогенни молекули от главния комплекс на тъканната съвместимост. Същевременно, респондерите и стимулаторите по отделно имат някои особености, които могат да обусловят реакция специфична за използваните линии. Например, при BALB/c мишките репресорът на гена за IL-4 MINA е експресиран много по-слабо отколкото в други инбредни линии (напр.: C57BL/6), което води до склонност да отговарят с Th2 отговор (16). По тази причина експериментите бяха

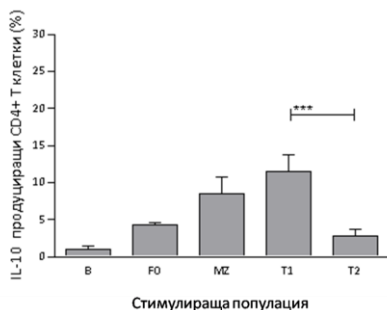
повторени, като за стимулатори бяха използвани разглежданите В клетъчни популации, сортирани с помощта на клетъчен сортер от спленоцити на C57BL/6 мишки. Категорично се потвърди практически липсваща стимулаторна способност на T1 В клетките, силния стимулаторен потенциал на MZ В клетките и по-слабата активност на FO В клетките (фигура 8). В този случай, обаче, самостоятелно сортираната популация на T2 В клетките, предизвика значително Т-клетъчно активиране (фигура 8).



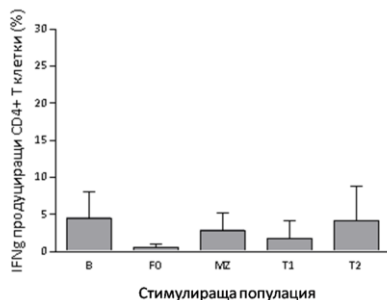
Фигура 8: Пролиферация на Т клетки, стимулирани с алогенни FO, MZ, T1 или T2 В клетки, представително от три експеримента (ANOVA, средноаритметична стойност \pm SD). T1 В лимфоцитите индуцират най-слабо Т клетъчна пролиферация докато T2 и MZ В лимфоцитите показват силен потенциал да активират алогенни Т лимфоцити ($p < 0.001$).

Отново проследихме как способността на изследваните от нас основни В клетъчни субпопулации да стимулират Т-клетъчна активация е свързана с продукцията на IFN γ и IL-10 от активираните Т клетки. Индуцираната от MZ В клетките по-силна продукция на IFN γ , в сравнение с FO В клетките (фигура 10) потвърждава и по-рано установеното им свойство да стимулират диференциацията предимно към Th1 фенотип. Същевременно, MZ В клетките стимулираха и силна продукция на IL-10 (фигура 9), с което показват, че могат ефективно да стимулират и диференциацията към Th2/Tr1.

Подобни функционални различия се наблюдават и между T1 и T2 В клетките. T1 В клетките показват потенциал да стимулират продукция на IL-10 от Т клетките (фигура 9, фигура 7), което е характеристика на регулаторните



Фигура 9: Продукция на IL-10 от Т лимфоцити стимулирани с алогенни FO, MZ, T1 или T2 В лимфоцити, представително от три експеримента (ANOVA, средноаритметична стойност \pm SD). Стимулацията с T1 и MZ В лимфоцити води до активиране на значително повече Т клетки продуциращи IL-10 в сравнение със стимулацията с FO и T2 В лимфоцити ($p < 0.0001$).



Фигура 10: Продукция на IFN γ от Т лимфоцити стимулирани с алогенни FO, MZ, T1 или T2 В лимфоцити, представително от три последователни експеримента (ANOVA, средноаритметична стойност \pm SD). Въпреки липсата на значима разлика между отделните групи и като цяло занижения процент на IFN γ продуциращите Т клетки, T2 В клетките показват тенденция да стимулират повече IFN γ + Т клетки в сравнение с другите изследвани популации ($p = 0.34$)

Т клетки. Обаче, функцията на T2 В клетките в активирането на Т лимфоцити не може да бъде дефинирана толкова еднозначно поне по две причини. Първо, те не индуцираха продукция на IL-10, докато други автори ги идентифицират като толерогенни В клетки (17). Второ, те силно стимулираха Т-клетъчна пролиферация (фигура 8), която беше съпроводена с известна

продукция на IFN γ (фигура 10), но оказаха потискащ ефект върху капацитета на зрелите В лимфоцити да активират Т клетки (фигура 6Б). Наблюдаваната разлика в потенциала на Т1 и Т2 В клетките да стимулират Т клетки е в съгласие с останалите функционални различия между тези два В-клетъчни стадия. Определящо значение, от които има тяхната реакция на свързването на антиген от В-клетъчния рецептор. Т1 В клетките преимуществено претърпяват апоптоза, докато Т2 В клетките се активират силно (18). В стадий Т2, В клетките са вече компетентни антиген-представящи клетки – в сравнение с Т1 стадия имат повишена експресия на МНС II и костимулаторни молекули (19), но все още не са преминали през последните етапи на селекция в слезката (20). В този късен транзитивен стадий Т2 В клетките се намират на „границата на зрелостта“ по пътя към диференцирането им в някоя от основните популации В клетки в слезката, като някои автори различават допълнителни стадии в него (21, 22). Поради това е възможно *in vivo*, всред определените от нас като Т2 В клетки, да има такива с интензивно взаимодействие с помощните Т клетки и подчертаната им способност да ги активират да е под контрола на множество фактори, които допускат или пък ограничават имунно активиране в зависимост от контекста. Затова не е изненада, че има данни за супресивен ефект от Т2 В клетки *in vivo* в модел на ревматоиден артрит, при което те са предизвикали потискане на Th1 отговора посредством секретирани цитокини (17), които са в съгласие с нашите първоначални резултати относно Т2 В клетките (фигура 6Б). Отстраняването на CD93⁺ клетките, както от CD23⁺, така и от CD21⁺ В клетките, водеше до повишена стимулаторна активност (фигура 6Б). Общото между този модел и резултатите получени *in vivo*, в които Т2 клетките имат супресивна функция, са по-сложните клетъчни взаимодействия (*in vivo* или *in vitro* в присъствие на други клетъчни видове). Същевременно, Evans et al. използват IgM, а не CD93 като маркер за този стадий. Възможно е тези две популации да не съвпадат напълно. Според друга хипотеза, Т2 В клетките стимулират самостоятелно пролиферацията на Т клетки с регулаторна функция, което не ни се отдаде да проверим в модела с аутбредните стимулатори, но беше възможно при модела с В клетки от C57BL/6 мишки. Т2 В клетките от C57BL/6 мишки индуцираха силна пролиферация на алогенни CD4⁺ Т клетки, която не беше съпроводена с продукция на IL-10 (фигура 9), а само с незначително повишена продукция на IFN γ (фигура 10). Склонността на имунната система на тези мишки да отговаря със силен Th1\IFN γ отговор е

възможно обяснение за наблюдаваното противоречие с първоначалните ни резултати а също и с резултатите на Evans et al. В работата им е използван модел на ревматоиден артрит в DBA/1 мишки (17), а в онези наши резултати, които потвърждават техните изводи – В клетки от аутбредни ICR мишки. Възможно е взаимодействието на T2 В клетките с Th клетките да води до противоположни резултати в зависимост от баланса на регулаторни фактори, докато типичните (15) имunosупресивни свойства на незрелите В клетки всъщност са характерни по-скоро за T1 В клетките.

Според тези резултати T1 В клетките са популация с толерогенни функции, а T2 В клетките имат потенциал да индуцират както про-толерогенни, така и про-възпалителни Т-клетки. Така, определянето на относителния принос на различните субпопулации В лимфоцити в стимулирането на алогенни CD4⁺ Т клетки помогна да се демонстрира регулаторния ефект на транзитивните T1 В лимфоцити върху антиген представящата функция на зрелите В клетки *in vitro*, което е от значение за проектирането на В-клетъчно базираните терапии.

За да бъде проверена общовалидността на наблюдаваните феномени беше необходимо те да бъдат изследвани поне в един алтернативен модел на първичен имунен отговор. Като такъв, във втората част от характеризирането на антиген-представящите свойства на В-клетъчните субпопулации беше използван *in vitro* модел на антиген-специфичен първичен имунен отговор.

4.Изследване на антиген-представящата/регулаторна функция на полиспецифични миши В лимфоцити, използвайки като модел антигенно разпознаване и представяне на OVA-FITC към трансгенни OVA-специфични CD4⁺ Т лимфоцити.

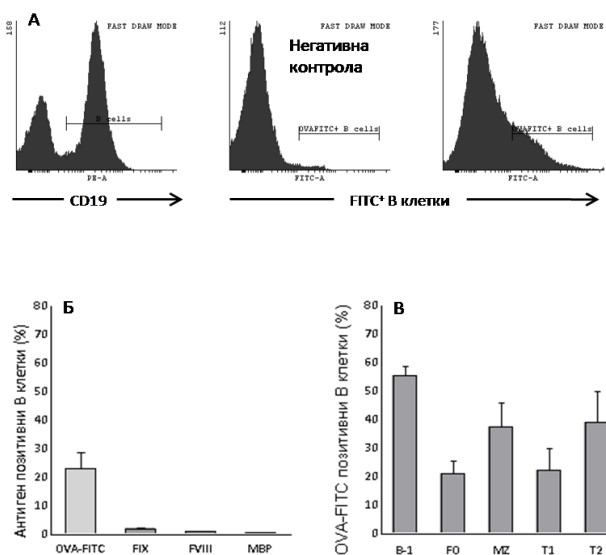
Като всеки модел, използването на алогенна стимулация не възпроизвежда точно първичния имунен отговор. Основната разлика е именно по отношение на В клетките, които представят сурогатни Т клетъчни антигени (всъщност алотипни МНС молекули) без това да е предшествано от антигенно разпознаване, свързване от В клетъчния рецептор и активация на В клетката, което е съществен етап от антигенното разпознаване *in vivo* (23). Това променя контекста като липсват някои от сигналите необходими на В клетките. Поликлоналната активация на голяма част от Т клетките чрез MLR се използва като модел на първичен отговор най-вече защото ниската

честота на антиген-специфичните В клетки ограничава използването на модели основани на специфичен антиген. Експерименталната постановка за сравнение на стимулаторния потенциал на В-лимфоцитните популации налага конкретен антиген да бъде представен от значителна част от всяка от субпопулациите. Една възможност за това е този антиген да бъде свързан от В клетъчните рецептори в резултат на неспецифично, полиспецифично или суперантигенно взаимодействие. Например, това е възможно за В клетките с полиреактивен BCR, съдържащи се в по-голяма или по-малка степен в познатите популации В лимфоцити. Съществуват хаптени, които се разпознават кръстосано от голям процент от В клетките като особено широк спектър от В клетъчни рецептори (респ.: антители) разпознават като хаптен FITC. FITC-конюгирани антигени в комбинация с трансгенни CD4⁺ Т лимфоцити, специфични за конюгирания антиген се оказват интересен модел за Т-В взаимодействия. В такъв антиген-специфичен модел на първичен имунен отговор ние изследвахме способността на различни В-клетъчни субпопулации да свързват с антигенните си рецептори антигена OVA-FITC, да го представят на CD4⁺ Т клетки и да повлияват понататъшната диференциация на тези Т клетки.

Полиспецифично свързване на антигени към повърхността на В лимфоцитите.

Още от началото на изследванията на В-клетъчната специфичност като модели са използвани няколко ароматни и хетероциклени хаптена като анилин, динитрофенол, биотин, флуоресцеин и др. Оказва се, че честотата на В клетките, които свързват такива хаптени е по-висока от типичната честота на антиген специфичните клетки (1*)(24, 25). За да се потвърдят тези по-ранни наблюдения в условията на нашия модел, беше сравнено свързването на няколко моделни антигена под различна форма (FITC-конюгирани или биотинилирани)(фигура 11). Негативно изолирани В клетки бяха инкубирани 1 час на лед в присъствие на 0.2 мг/мл антиген (OVA-FITC или биотинилирани FIX, FVIII и MBP). Процента на В клетките, свързали антиген беше определян директно по процента на FITC позитивните В клетки (фигура 11A) или индиректно по процента на В клетките с позитивен сигнал след белязане със стрептавидин конюгиран с флуорохроми различни от FITC. Интензитета на FITC, над който В клетките бяха определяни като FITC⁺ беше определян спрямо негативната контрола от клетки, инкубирани само в PBS (фигура 11A).

Свързване на антиген се наблюдаваше само при В клетките инкубирани с OVA-FITC (фигура 11B), но не и от В клетките инкубирани с биотинилиран антиген или други биотинилирани антигени. Приблизително 20% от общите В лимфоцити от слезка свързаха OVA-FITC като относително с по-висок процент антигенът беше свързан от популациите на MZ и T2 В лимфоцитите и относително с по-нисък процент от популациите на FO и T1 В лимфоцитите (фигура 11B). Приблизително 60%, от полиспецифичните перитонеални В-1 лимфоцити показаха афинитет към антигена и го свързаха (фигура 11B).



Фигура 11: Свързване на OVA-FITC от наивни В клетки, представително от три последователни експеримента. **(А)** Определяне на процента OVA-FITC+ В лимфоцити спрямо негативна контрола от клетки инкубирани само в PBS. **(Б)** В лимфоцитите от слезка на наивни BALB/c мишки свързват неспецифично само FITC-конюгирания антиген (OVA-FITC), но не свързват биотинилираните антигени, FIX-биотин, FVIII-биотин, MBP-биотин (средноаритметична стойност \pm SD). **(В)** В лимфоцитите от основните популации свързват в различна степен OVA-FITC. Популациите на B-1, MZ и T2 В лимфоцитите свързват процентно повече OVA-FITC, в сравнение с популациите на FO и T1 В клетките (ANOVA, $p < 0.0001$).

Сравняване на свързването на FITC от В клетки от див тип мишки BALB/с с тези от трансгенните TgELMP2A, които се различават само по експресията на BCR показва, че въпреки големия си брой, всички В клетки, които свързват FITC го правят посредством В клетъчния си рецептор без FITC да има формално свойството на суперантиген (С. Planchais, ръкописът се рецензира).

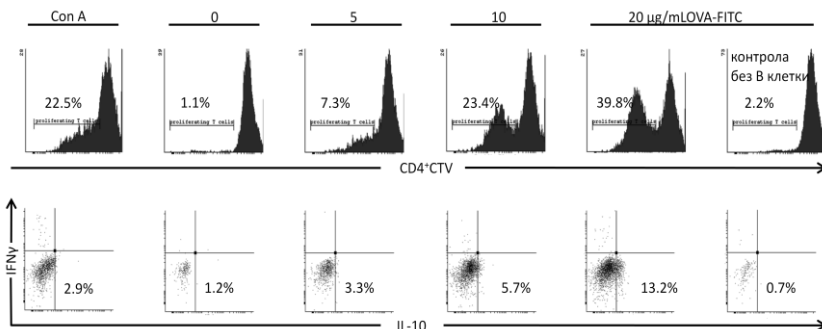
Използваният антиген OVA-FITC селектира определен клас В клетки с полиспецифични рецептори - MZ, транзитивни и В-1 В клетки (фигура 11В). Свързването от страна на антигена е чрез FITC хаптана, тъй като биотинилиран OVA (не е показано) или други биотинилирани антигени не се свързват от същите В клетки нито от толкова голяма част от репертоара (фигура 11Б). Квази-специфичното разпознаване на FITC от полиспецифичните В клетъчни рецептори вероятно се дължи на прости взаимодействия с ароматни странични вериги в паратопа в следствие най-вече на π -stacking връзки. Вероятно те са улеснени от конформационната пластичност характерна за тези предимно слабо мутиралаи клонове. От друга страна, това взаимодействие е с относително нисък афинитет.

За да проверим дали В клетките, които свързват антигена OVA-FITC го и интернализират и представят ефективно ние проследихме как общи В лимфоцити стимулират OVA-специфични Т клетки в модел на антиген-специфичен първичен имунен отговор.

Стимулиране на OVA-специфични Т лимфоцити.

Моноклонална Т-клетъчна популация респондери, необходима за модела на антиген-специфично взаимодействие *in vitro* беше изолирана от трансгенни ОТII мишки (произхождащи от C57BL/6), при които практически всички CD4⁺ Т клетки експресират един Т клетъчен рецептор, в случая – специфичен за овалбумин (епитоп OVA₃₂₃₋₃₃₉). Според по-ранни изследвания, само една малка част от полиреактивните, хаптен-свързващи В клетки могат да стимулират Т клетки специфични за носещия хаптана протеин, което се свързва със субоптимални костимули (26). Въпреки това, в изследвания модел, 7 дневно ко-култивиране на цяла популация C57BL/6 В лимфоцити със CD4⁺ Т лимфоцити, специфични за OVA₃₂₃₋₃₃₉ в присъствие на 5, 10, или 20 мкг/мл OVA-FITC предизвика силно стимулиране на Т клетките - процента на пролифериращите клетки се повишаваше с увеличаване на концентрацията на антигена в средата (фигура 12). В контролните условия,

при които в културалната среда не бяха добавени антигенът или антиген представящите клетки (В лимфоцити), пролиферация не се наблюдаваше. Паралелно с увеличаването на процента пролиферирали Т клетки се повишаваше и процента на IL-10⁺ Т клетки сред тях, докато IFN γ ⁺ Т клетки почти не се откриваха (фигура 12).



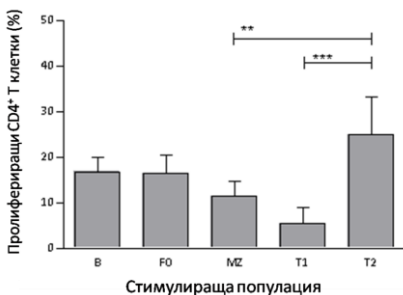
Фигура 12: Представителни хистограми от *In vitro* стимулиране на OVA₃₂₃₋₃₃₉ - специфични CD4⁺ Т лимфоцити в присъствие на повишаващи се концентрации OVA-FITC и В лимфоцити от C57BL/6 мишки. (горе) С увеличаване на концентрацията на OVA-FITC в средата нивото на пролиферация на OVA – специфичните Т клетки се повишава. (долу) Повишаването на нивото на пролиферация на OVA – специфичните Т клетки беше придружено с увеличаване на процента IL-10 – продуциращи Т клетки.

Сравняване на потенциала на субпопулациите T1, T2, MZ и FO В лимфоцити да стимулират OVA₃₂₃₋₃₃₉ - специфични CD4⁺ Т лимфоцити в присъствие на OVA-FITC.

Нашите изследвания както и тези на други автори показват недвусмислено, че различните субпопулации В клетки имат много различен потенциал да стимулират Th клетки и да насочват тяхната диференциация. Неочаквано, В клетките разпознаващи в контекста на полиспецифичност FITC като хаптен се оказаха много ефективни стимулатори за трансгенните OTII CD4⁺ Т клетки. Същевременно, FITC свързващите клетки не бяха разпределени равномерно сред различните субпопулации (фигура 11В). Издигна се хипотезата, че отделна субпопулация В клетки е отговорна за това изключително ефективно антигенно представяне. За да проверим тази хипотеза сортирахме

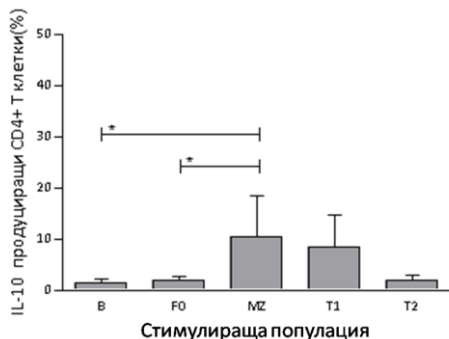
съответните В-клетъчни субпопулации и повторихме експеримента с тях. FACS-сортирани T1, T2, MZ и FO В лимфоцити от C57BL/6 мишки бяха ко-култивирани с OVA₃₂₃₋₃₃₉ - специфични CD4⁺ Т лимфоцити от трансгенни OTII мишки в присъствие на 10 мкг/мл OVA-FITC и показаха различна способност да активират антиген специфичните Т клетки (фигура 13).

T1 и MZ В клетките са популациите, които относително по-слабо стимулираха пролиферация (фигура 13), съпроводена с висока честотата на IL-10⁺ Т клетките сред пролифериращите клетки (фигура 14). За разлика от тях, популациите на FO и T2 В клетките индуцираха по-силна пролиферация (фигура 13), но по-ниска честота на IL-10⁺ Т клетки (фигура 14).

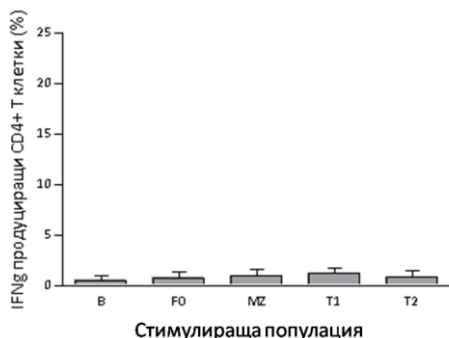


Фигура 13: Пролиферация на OVA-специфичните Т клетки (OTII), стимулирани с FO, MZ, T1 или T2 В клетки в присъствие на 10 мкг/мл OVA-FITC, представително от три експеримента (ANOVA, средноаритметична стойност \pm SD). T1 В лимфоцитите индуцират най слабо Т клетъчна пролиферация докато T2 В лимфоцитите показват силен потенциал да активират OVA-специфичните CD4⁺ Т лимфоцити. ($p < 0.0001$).

По отношение на IFN γ , при стимулацията със сортираните В-клетъчни популации, както и при стимулацията с общи В лимфоцити от слезка (фигура 12), значима продукция на този цитокин от активираните Т клетки липсваше (фигура 15).



Фигура 14: Продукция на IL-10 от OVA-специфичните Т лимфоцити, представително от три експеримента (ANOVA, средноаритметична стойност \pm SD). Стимулацията с MZ и T1 В лимфоцити води до активиране на значителен процент Т клетки продуциращи IL-10 за разлика от стимулацията с FO и T2 В лимфоцитите ($p < 0.01$).



Фигура 15: Продукция на IFN γ от OVA-специфичните Т лимфоцити, представително от три експеримента (ANOVA, средноаритметична стойност \pm SD). Без значима разлика, основните популации В лимфоцити стимулират пренебрежимо ниски проценти IFN γ + OVA-специфични Т клетки ($p = 0.41$).

MZ В клетките са известни със способността си да продуцират IL-10 след като бъдат активирани (27). Те се отличават с бърза реакция дори и при нискоафинитетни взаимодействия между В-клетъчния рецептор и антигена, при което се диференцират в плазмабласти (28). За целта, обаче, този сигнал трябва да е придружен или с костимули (TLR, комплемент рецептори, и т.н.)

или силно омрежване на BCR. Вероятно е слабото взаимодействие между OVA-FITC и MZ В клетките да стимулира тяхната продукция на IL-10, но дали FITC осигурява и конкретен костимул е въпрос, който още не е адресиран. Предвид това, както и че наличието на IL-10 в средата е фактор, който стимулира диференциацията на т. нар. индуцируеми Трег клетки (Tr1), които също продуцират IL-10, може да се предположи, че натоварването на В клетките, или поне на MZ В клетките, с OVA-FITC им придава регулаторни свойства, благодарение на които могат да оказват влияние върху диференциацията на Т клетките към Tr1 фенотип. Възможно е и при T1 В клетките, подобният, макар и по-слаб, ефект който оказват върху диференциацията на Т лимфоцитите да се дължи освен на способността им да ограничават Т-клетъчната пролиферация, също и на такова слабо активиране при свързването на антигена. Ако предложеното обяснение за насочването на диференциацията на Т клетките към Tr1 фенотип е вярно, то този ефект се дължи основно на антигенното представяне от MZ и T1 В клетките. Приносът на FO и T2 В клетките за този ефект не може да бъде определен въз основа на тези резултати, но изглежда относително по-малък. Предвид липсата на продукция на IL-10 от активираните Т клетки, които те индуцираха и силната Т-клетъчна пролиферация, която T2 В клетките стимулираха. От друга страна и въпреки нетипично интензивната пролиферация, липсата на индуциране на IFN γ подсказва хипотезата, че Т клетките, пролифериращи след представяне от T2 В клетки, са потенциално регулаторни или с фенотип потискащ Th1 отговора особено в светлината на супресивната функция на FITC хаптена в модели на автоимунитет (C. Planchais, ръкописът се рецензира).

В предишните експерименти беше намерен паралел между полиспецифичността на някои В клетъчни популации, ниско афинетното свързване на хетероциклени/ароматни хаптени и регулаторната функция след като съответните В клетки индуцират предимно IL-10 секретиращи CD4⁺ Т клетки. Докато при подбора на В клетки подходящи за създаване на терапевтични стратегии за индивидуализирана имунотерапия тази ситуация би била нежелана, при автоимунни и системни възпалителни състояния тя предлага неочаквано нови инструменти. Във втората част от нашата експериментална работа беше изследван регулаторния потенциал на полиспецифичните В-1 клетки при експериментален миши сепсис.

5.Изследване участието на перитонеални В-1 лимфоцити в лечението на експериментален сепсис с модифициран имуноглобулинов препарат за венозно приложение.

Изследванията на регулаторните свойства на незрелите T1 и T2 миши В лимфоцити показаха за първи път, че свойствата на най-ранните периферни T1 В лимфоцити най-точно отговарят на по-общо дефинираната неспособност (или понижена способност) на наивните В клетки да стимулират ефективно CD4⁺ Т лимфоцити в различни модели на антигенно представяне. За разлика от тях и в противоречие с единични предишни публикации, T2 В клетките показаха изненадваща ефективност при модела на полиспецифично свързване към хаптена FITC.

Друг стаии от диференциацията на В клетките, който е описан като притежаващ потенциално имунорегулаторни свойства и чийто фенотип включва също CD93, са преплазмабластите. Наскоро, една от проявите на регулаторната им функция беше най-неочаквано свързана с патофизиологията на сепсиса (29). В миши модел на LPS-индуциран сепсис, В-1а лимфоцитите от перитонеума след свързване на LPS мигрират към слезката и секретират цитокина GM-CSF, който активира клетките на вродения имунитет (В лимфоцити Активатори на Вродения Имуитет, Innate Response Activator В cells, IRA В cells). Ефектът от активирането на IRA В клетките е контрол на цитокиновата „буря“ по време на сепсис и по-висока степен на преживяемост (29). Механизмът, по който осъществяват своята функция IRA В клетките е неясен и изследването му несъмнено поражда асоциация между функцията на IRA В клетките и ИВИг препаратите, които също са успешен модел за контрол на възпалението при сепсис.

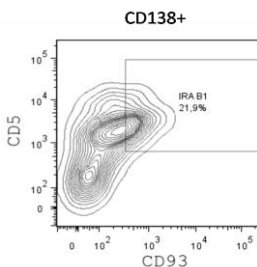
В предишни изследвания е показано, че след третиране с протеин дестабилизиращи агенти като ниско рН, железни йони, третиране с хем, с кислородни радикали и т.н. на препарати от ИГ за венозно приложение, последните придобиват силна полиспецифичност за много собствени антигени. Нещо повече, тези модифицирани ИВИг препарати показват изненадващ терапевтичен ефект в модел на ендотоксинов сепсис. След като наблюдавахме предимно IL-10 секреция от Т клетки стимулирани с В клетки с характерна полиспецифичност, и в контекста на хипотетичната противо-сепсисна функция на (полиспецифичните) В-1а преплазмабласти, беше

предложена хипотезата, че механизмът на контрол на сепсиса под въздействие на полиспецифичен ИВИг включва активиране на IRA В клетките.

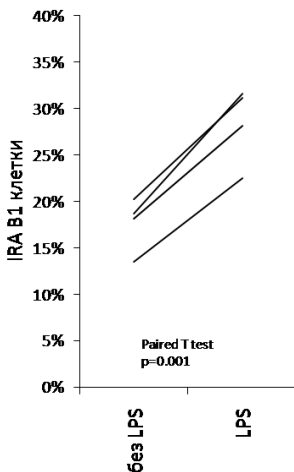
За проверка на тази хипотеза, в следващата група експерименти, потърсихме връзка между способността на имуноглобулиновите препарати с повишена полиреактивност (МИВИг) да контролират LPS-индициран сепсис при мишки и участието на В-1 лимфоцитите в този процес.

Модифицираните ИВИг препарати стимулират диференциацията на перитонеалните В-1 лимфоцити към IRA В клетки.

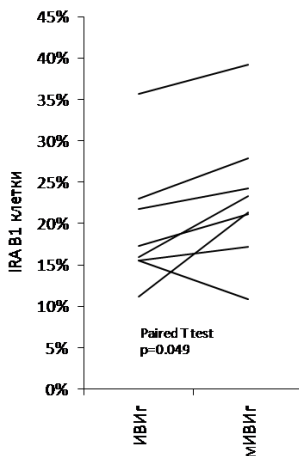
Перитонеални В-1 лимфоцити от BALB/с мишки бяха стимулирани *in vitro* с LPS в продължение на 5 дни. Диференциацията на В-1а клетките към IRA В клетки в присъствие на LPS е свързана с поява на експресия на маркерите CD93, CD138 и секреция на GM-CSF. Процентът на стимулираните IRA В клетки беше директно определян по процента на CD19⁺ CD5^{low}, CD93⁺ CD138⁺ В клетките (фигура 16). Присъствието на LPS в средата предизвика диференциация на В клетките до IRA В клетки (фигура 17А). Допълнително повишаване в процента на стимулираните IRA В клетки се наблюдаваше, когато в средата присъстваше МИВИг препаратът (фигура 17Б). Това ни позволява да предположим, че модифицираните имуноглобулини взаимодействат с перитонеалните В-1а клетки и ги стимулират синергично с ендотоксина.



Фигура 16: IRA В клетките бяха идентифицирани като CD5⁺, CD93⁺, CD19⁺ В лимфоцити.



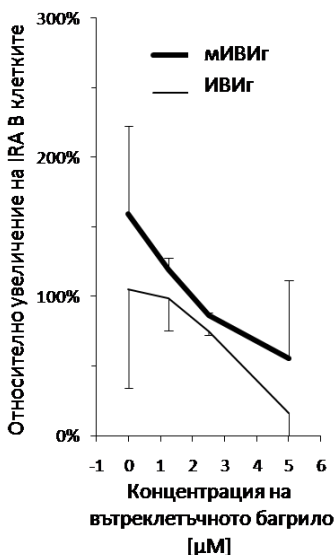
Фигура 17А: Процент на стимулираните IRA B клетки от общия брой на CD5⁺ B клетките. В LPS-стимулираните култури бяха индуцирани повече IRA B клетки спрямо културите без LPS.



Фигура 17Б: Процент на стимулираните IRA B клетки от общия брой на CD5⁺ B клетките. В културите стимулирани с LPS + МИВИГ бяха индуцирани повече IRA B клетки спрямо културите стимулирани с LPS + нативен ИВИГ препарат.

Потискането на диференциацията на IRA В клетките понижава силно терапевтичния ефект на модифицирания ИВИг препарат.

In vivo, този допълнителен стимулиращ ефект на мИВИг препаратата върху диференциацията на IRA В клетките беше тестван в контекста на ефекта върху преживяемостта. За проследяването на пролиферацията на перитонеалните В клетки и миграцията им към слезката in vivo при мишки с LPS – индуциран сепсис, перитонеалните В клетки бяха оцветени с вътреклетъчно флуоресцентно багрило CellTrace™ Violet. Резултатите от третирането на сепсисните мишки с модифицирания и нативния ИВИг препарат не показаха разлика в преживяемостта каквато, винаги до този момент, се наблюдаваше в групите без вътреклетъчно оцветяване на В лимфоцитите. Известно е, че вътреклетъчните багрила потискат пролиферацията, което вероятно би възпрепятствало диференциацията на IRA В клетките и/или на В-1а преплазмаблаастите. In vitro, ефектът на ИВИг препаратите върху диференциацията на оцветени перитонеални В-1 лимфоцити до IRA В клетки беше показан като функция на концентрацията на вътреклетъчното багрило (фигура 18). Перитонеални В лимфоцити оцветени с 5, 2.5, 1.25 или 0 мкМ багрило и стимулирани с LPS бяха третирани с мИВИг препарат, нативния ИВИг препарат или не бяха третирани в продължение на 5 дни. Получените резултати потвърдиха и по-рано наблюдаваното стимулиране на диференциацията на IRA В клетките в резултат на третиране с LPS и показаха, че модифицираният, но не и нативният ИВИг препарат допълнително засилва този процес. Но свойството на мИВИг препаратата да стимулира вътреклетъчно оцветени IRA В-1 клетки се понижи с повишаване на използваната концентрация на багрилото. Дори най-ниската използвана концентрация потисна напълно ефекта на мИВИг препаратата (фигура 18).

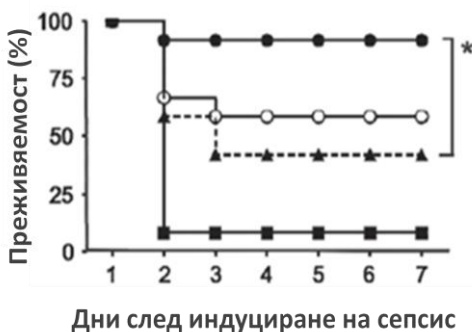


Фигура 18: При LPS-стимулираните перитонелани B-1 клетки се наблюдава относителното увеличение на IRA в клетките след третиране с модифициран, но не и с нативен ИВИг препарат спрямо B-1 клетки стимулирани само с LPS. Вътреклетъчното багрило, приложено локално (интраперитонеално), потиска диференциацията на IRA в клетките по дозо-зависим начин като блокира ефекта на МИВИг. (*Генерализиран линеен модел*, $p=0.015$)

Чрез прицелно потискане на пролиферацията и диференциацията на B-1 клетките с помощта на вътреклетъчното багрило инжектирано интраперитонеално, изследвахме значението на IRA в клетките при третирането на миши LPS-индуциран сепсис с МИВИг препарат (фигура 19). Четири групи ($n=12$) ICR мишки бяха интраперитонеално инжектирани с LPS и непосредствено след това интравенозно инжектирани с модифициран, нативен ИВИг препарат или PBS. Два часа предварително една от групите, която беше третирана с МИВИг препарат, беше интраперитонеално инжектирана с 2.5 мкМ багрило. МИВИг препаратът предотврати смъртта на мишки с LPS-индуциран сепсис (фигура 19), но този ефект беше напълно потиснат след инхибирането на перитонеалните B-1 клетки (фигура 19), което е индикация за тяхното участие в контрола на възпалението при сепсис и подчертава, че взаимодействието на модифицираните полиспецифични

имуноглобулини с B-1 В клетките има значение за протективния ефект на МИВИг препаратът.

Остава неясно кое свойство на ИВИг, придобито след третиране с протеин дестабилизиращи агенти, обуславя това взаимодействие. Работната хипотеза е, че това е индуцираната полиспецифичност и вероятно взаимодействието на голяма част от полиспецифичните антитела със също така полиспецифични В клетъчни рецептори върху B-1 клетките.



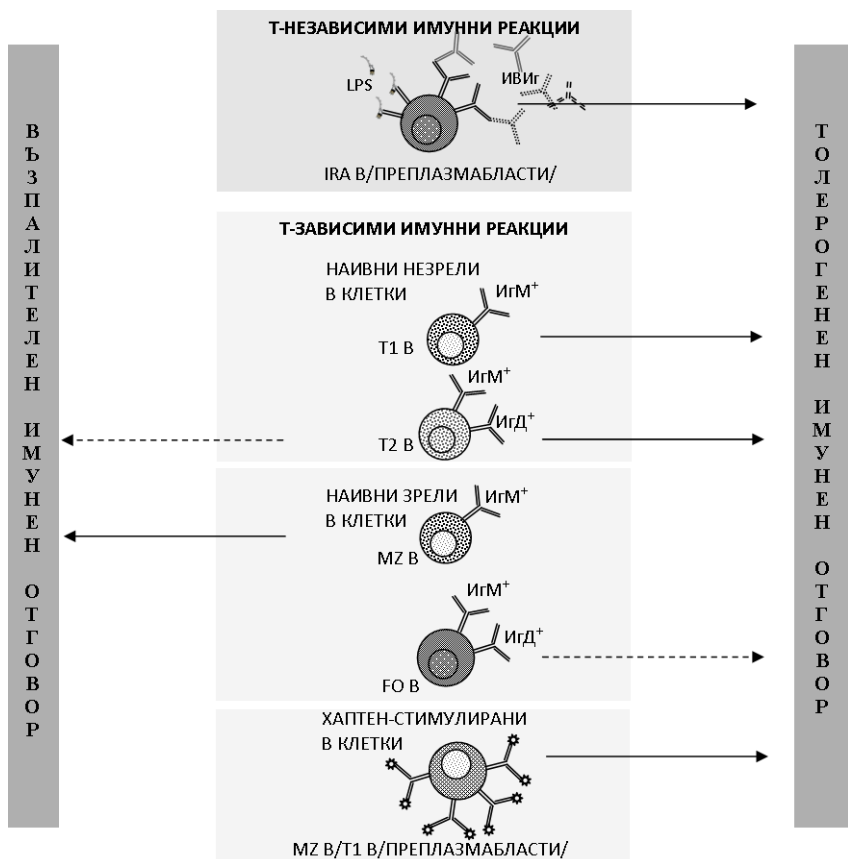
Фигура 19: Анализ на преживяемостта на 4 групи мишки с LPS-индуциран сепсис. Всички групи мишки бяха интраперитонеално инжектирани с LPS. Непосредствено след това, групите бяха третирани чрез интравенозно инжектиране на PBS (черни квадрати), нативен ИВИГ препарат (бели кръгове), МИВИГ препарат (черни кръгове) и ИВИГ препарат и интраперитонеално инжектиране на CellTrace™ Violet два часа преди индуцирането на сепсис (черни триъгълници). Терапевтичният ефект на МИВИГ препаратата напълно е потиснат като преживяемостта е дори по-ниска отколкото при третиране с нативно ИВИГ. (* $p < 0.05$, Mantel-Haenszel logrank test)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описаните тук свойства на мишите В лимфоцити от слезка и перитонеална кухина показват хетерогенност на тяхната регулаторна функция. От една страна тази хетерогенност се изразява в това, че В лимфоцити, способни да представят антигени в толерогенен контекст, има както сред незрелите (транзитивни), така и сред зрелите В клетки (фигура 20). От друга страна, зрелите В клетки, оказват регулаторен ефект върху имунните реакции и по други начини – например продукцията на IL-10 от MZ В клетките или продукцията на GM-CSF от полиспецифичните IRA В клетки.

Същевременно, сами по себе си, в други модели MZ В клетките са много добри антиген представящи клетки. Това вероятно зависи от условията за диференциация на CD4⁺ Т клетките в индуцирани Трег, напр.: - присъствието на дендритни клетки толеризирани от секретирания IL-10 (30), хетерогенност на активираната Т клетъчна популация, и т.н. Картината се усложнява допълнително и от степента на диференциация на В клетките, които осъществяват регулация. Т клетъчната активация в моделите с MLR се ограничава от наивни и нестимулирани с антиген Т1 В клетки. В другия модел на първичен имунен отговор, стимулираните с антиген В клетки, които предизвикват по-слаба пролиферация съпроводена с повече продукция на IL-10 (MZ В и Т1 В клетките) може да се дължи на примес от плазмабласти с регулаторна функция, каквито са установени и от други автори (31, 32) и каквито представляват и IRA В клетките (фигура 20). Това може да се провери като се потърси експресия върху CD19⁺ В клетките на CD93, CD38 и CD138 в тези култури.

Физиологичното значение на потиснатия стимулаторен потенциал на наивните Т1 В клетки вероятно е избягване на неподходящо имунно активиране, поради все още относително по-високата честота на автореактивни специфичности. Докато, физиологичният смисъл на плазмабластите с регулаторна функция е контролиране на протичащите към дадения момент имунни реакции чрез отрицателна обратна връзка.



Фигура 20: Значение на различни субпопулации В лимфоцити за посоката на имунния отговор. В клетки с потенциал да контролират възпалението може да бъдат открити сред различни етапи от диференциацията им в периферията.

ИЗВОДИ

1. T1 В клетките са слаби стимулатори на CD4⁺ Т лимфоцити. Това в известна степен се отнася и за фоликуларните В клетки;
2. T2 В клетките потискат пролиферацията на CD4⁺ Т лимфоцити, но в зависимост от условията на средата биха могли да стимулират силна Т-клетъчна пролиферация;
3. MZ В клетките стимулират силно Th1 клетки, но в зависимост от антигенната стимулация осъществената от тях стимулация може да е в толерогенен контекст;
4. В клетки, натоварени с FITC-конюгирани антигени могат да представят антигена в толерогенен контекст;
5. Перитонеалните В клетки имат критично значение за овладяване на възпалението при сепсис и тази тяхна функция може да бъде усилена в резултат от взаимодействието с МИВИг препарати;
6. Изборът на популация В лимфоцити, която да е прицелна при разработване на В-клетъчно базираните терапии може да промени коренно ефекта от терапията;

В перспектива, можем да очертаем условно разделение на приложението на изследваните субпопулации В лимфоцити в имунотерапевтичните подходи. T1 В клетките, а вероятно и T2 В клетките, биха били подходящи антиген-представящи клетки при разработването на терапевтични стратегии, целящи стимулиране на регулаторен Т клетъчен отговор. Това се отнася и за MZ В клетките в случаите, в които представят FITC-конюгирани антигени. Предвид характерната им способност да стимулират силно Th1 клетки след взаимодействие на BCR с висок афинитет, маргиналните В клетки са подходящи и при индивидуализирани подходи във ваксинологията и туморната имунотерапия.

СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ УЧАСТИЯ

1. Статии в списания с импакт фактор

- Djoumerska-Alexieva I, **Pashova S**, Vassilev T, Pashov A. 2013. The protective effect of modified intravenous immunoglobulin in LPS sepsis model is associated with an increased IRA B cells response. *Autoimmun Rev* 12: 653-6
- Pashova S, Dobrev K, Pashov A. 2014. Regulatory properties of mouse transitional 1 B lymphocytes. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences* 67 (3), 361-6

2. Кратки презентации

- **Pashova S**, Planchais C, Pashov A, Lacroix-Desmazes S: Antigen presenting capacity of different B cell subsets. ***Workshop "Immune cell interactions: a tool to modulate immune response", 8 June 2012, Sofia, Bulgaria***

3. Постерни участия

- Djoumerska I, **Pashova S**, Vassilev T, Pashov A: Polyreactive antibodies and B1 cells in LPS induced sepsis. ***SEEIS, EFI-EJIS, Sofia, 20-23 September, 2013***
- **Pashova S**, Planchais C, Dobrev K, Lacroix-Desmazes S, Pashov A: Comparison of the antigen presenting properties of B cells in mouse spleen. ***SEEIS, EFIS-EJ, Sarajevo, 19-22 September, 2012***

- ***Pashova S, Dobrev K, Pashov A: Mouse CD93+ Transitional 1 B Cells Suppress Allogenic Th Lymphocyte Activation in Mixed Leukocyte Reaction. 13th International Symposium for Immunology of Reproduction, 22-24 June 2012 Varna, Bulgaria***
- ***Pashova S, Planchais C, Lacrois-Desmazes S, Pashov A: Presentation of FITC-coupled antigens by B cells shapes T cell polarization towards Th2/Treg phenotype. 4th National Congress of Immunology, 2-5 Oct 2014 Varna, Bulgaria***

ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Ashour HM, Seif TM. 2007. The role of B cells in the induction of peripheral T cell tolerance. *J Leukoc Biol* 82: 1033-9
2. Attanavanich K, Kearney JF. 2004. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *J Immunol* 172: 803-11
3. Lindell DM, Berlin AA, Schaller MA, Lukacs NW. 2008. B cell antigen presentation promotes Th2 responses and immunopathology during chronic allergic lung disease. *PLoS One* 3: e3129
4. Siebenlist U, Brown K, Claudio E. 2005. Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. *Nat Rev Immunol* 5: 435-45
5. Mauri C, Ehrenstein MR. 2008. The 'short' history of regulatory B cells. *Trends Immunol* 29: 34-40
6. Miosge LA, Goodnow CC. 2005. Genes, pathways and checkpoints in lymphocyte development and homeostasis. *Immunol Cell Biol* 83: 318-35
7. Mocellin S, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM. 2003. The dual role of IL-10. *Trends Immunol* 24: 36-43
8. Brooks DG, Walsh KB, Elsaesser H, Oldstone MB. 2010. IL-10 directly suppresses CD4 but not CD8 T cell effector and memory responses following acute viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3018-23
9. Mumm JB, Emmerich J, Zhang X, Chan I, Wu L, Mauze S, Blaisdell S, Basham B, Dai J, Grein J, Sheppard C, Hong K, Cutler C, Turner S, LaFace D, Kleinschek M, Judo M, Ayanoglu G, Langowski J, Gu D, Paporello B, Murphy E, Sriram V, Naravula S, Desai B, Medicherla S, Seghezzi W, McClanahan T, Cannon-Carlson S, Beebe AM, Oft M. 2011. IL-10 elicits IFNgamma-dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell* 20: 781-96
10. Callard RE, Smith SH, Herbert J, Morgan G, Padayachee M, Lederman S, Chess L, Kroczeck RA, Fanslow WC, Armitage RJ. 1994. CD40 ligand (CD40L) expression and B cell function in agammaglobulinemia with normal or elevated levels of IgM (HIM).

- Comparison of X-linked, autosomal recessive, and non-X-linked forms of the disease, and obligate carriers. *J Immunol* 153: 3295-306
11. Tedder TF. 2015. Introduction: Regulatory B Cell Special Issue-making all the pieces fit. *Int Immunol* 27: 467-70
 12. Gray D, Gray M. 2010. What are regulatory B cells? *Eur J Immunol* 40: 2677-9
 13. Martin F, Kearney JF. 2002. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2: 323-35
 14. Song H, Cerny J. 2003. Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *J Exp Med* 198: 1923-35
 15. Chung JB, Wells AD, Adler S, Jacob A, Turka LA, Monroe JG. 2003. Incomplete activation of CD4 T cells by antigen-presenting transitional immature B cells: implications for peripheral B and T cell responsiveness. *J Immunol* 171: 1758-67
 16. Paul WE, Zhu J. 2010. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* 10: 225-35
 17. Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, Mauri C. 2007. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol* 178: 7868-78
 18. Su TT, Guo B, Wei B, Braun J, Rawlings DJ. 2004. Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development. *Immunol Rev* 197: 161-78
 19. Kleiman E, Salyakina D, De Heusch M, Hoek KL, Llanes JM, Castro I, Wright JA, Clark ES, Dykxhoorn DM, Capobianco E, Takeda A, Renaud JC, Khan WN. 2015. Distinct Transcriptomic Features are Associated with Transitional and Mature B-Cell Populations in the Mouse Spleen. *Front Immunol* 6: 30
 20. Khan WN. 2009. B cell receptor and BAFF receptor signaling regulation of B cell homeostasis. *J Immunol* 183: 3561-7
 21. Allman D, Lindsley RC, DeMuth W, Rudd K, Shinton SA, Hardy RR. 2001. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol* 167: 6834-40

22. Teague BN, Pan Y, Mudd PA, Nakken B, Zhang Q, Szodoray P, Kim-Howard X, Wilson PC, Farris AD. 2007. Cutting edge: Transitional T3 B cells do not give rise to mature B cells, have undergone selection, and are reduced in murine lupus. *J Immunol* 178: 7511-5
23. Liano D, Abbas AK. 1987. Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. V. Requirements for activation of antigen-presenting B cells. *J Immunol* 139: 2562-6
24. Hebbard GS, Pike BL, Nossal GJ. 1984. Single-cell studies on hapten-specific B cells: response to T-cell-dependent antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 2479-83
25. Turtinen LW, Lathey JL, Rouse BT. 1986. Estimation of the B lymphocyte precursor frequencies to herpes simplex type 1 glycoproteins by a limiting dilution assay. *J Med Virol* 20: 357-62
26. Wang Z, Chen ZJ, Wheeler J, Shen S, Notkins AL. 2001. Characterization of murine polyreactive antigen-binding B cells: presentation of antigens to T cells. *Eur J Immunol* 31: 1106-14
27. Barr TA, Brown S, Ryan G, Zhao J, Gray D. 2007. TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *Eur J Immunol* 37: 3040-53
28. Cerutti A, Cols M, Puga I. 2013. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 13: 118-32
29. Rauch PJ, Chudnovskiy A, Robbins CS, Weber GF, Etzrodt M, Hilgendorf I, Tiglaio E, Figueiredo JL, Iwamoto Y, Theurl I, Gorbатов R, Waring MT, Chicoine AT, Mouded M, Pittet MJ, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. 2012. Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science* 335: 597-601
30. Ye Z, Huang H, Hao S, Xu S, Yu H, Van Den Hurk S, Xiang J. 2007. IL-10 has a distinct immunoregulatory effect on naive and active T cell subsets. *J Interferon Cytokine Res* 27: 1031-8
31. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, Kallies A, Nutt SL, Sakaguchi S, Takeda K, Kurosaki T, Baba Y. 2014. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* 41: 1040-51
32. de Masson A, Bouaziz JD, Le Buanec H, Robin M, O'Meara A, Parquet N, Rybojad M, Hau E, Monfort JB, Branchtein M, Michonneau D, Dessirier V, Sicre de Fontbrune F, Bergeron A,

Itzykson R, Dhedin N, Bengoufa D, Peffault de Latour R, Xhaard A, Bagot M, Bensussan A, Socie G. 2015. CD24(hi)CD27(+) and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. *Blood* 125: 1830-9

1* Sercarz EE, Williamson AR, Fox CF. The Immune System: Genes, Receptors, Signals. *Elsevier Science*; 2013, 364 ctp.

