



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: Η δράση των στατινών στην ισορροπία ανάμεσα σε ρυθμιστικούς και προφλεγμονώδεις κυτταρικούς πληθυσμούς σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας

Βασιλειάδης Γεώργιος

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Δαρδιώτης Ευθύμιος (Επιβλέπων Καθηγητής) Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας και αισθητηρίων Οργάνων
- Μπόγδανος Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων
- Αναστάσιος Γερμενής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη μοριακή ιατρική

Λάρισα, Σεπτέμβριος, 2017



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

Title: The effect of statins in the equilibrium between regulatory and proinflammatory cell populations in multiple sclerosis patients

By
Vasileiadis Georgios

Master Thesis committee

- Dardiotis Efthimios (Supervisor) Assistant Professor of Neurology
- Bogdanos Dimitrios Associate Professor of Medicine and Autoimmune diseases
- Germenis Anastasios Professor of Laboratory Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in molecular medicine

Larisa, September, 2017

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ | 5 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 6 |
| ABSTRACT | 7 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 8 |
| 1.1 Σκλήρυνση κατά πλάκας | 8 |
| 1.1.1 Συμπτωματολογία | 9 |
| 1.1.2 Επιδημιολογία | 10 |
| 1.1.3 Παθογένεση | 16 |
| 1.1.4 Παθοφυσιολογία | 18 |
| 1.2 Προφλεγμονώδεις Κυτταρικοί πληθυσμοί | 21 |
| 1.2.1 T _H 1 | 21 |
| 1.2.2 T _H 17 | 23 |
| 1.2.3 B λεμφοκύτταρα | 24 |
| 1.2.4 NK κύτταρα | 24 |
| 1.3 Ρυθμιστικοί κυτταρικοί πληθυσμοί | 26 |
| 1.3.1 Tregs | 26 |
| 1.3.2 Bregs | 28 |
| 1.4 Ανοσορυθμιστικές ιδιότητες θεραπευτικών αγωγών για την ΚΠΣ..... | 33 |
| 1.4.1 Μονοκλωνικά αντισώματα | 33 |
| 1.4.2 Άλλες ανοσορυθμιστικές αγωγές..... | 36 |
| 1.5 Στατίνες | 38 |
| 1.5.1 Οι στατίνες σε πειράματα κυτταροκαλλιιεργειών | 40 |
| 2. ΣΚΟΠΟΣ..... | 42 |
| 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 43 |
| 3.1 Απομόνωση και κρυοσυντήρηση μονοπύρηνων λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs)..... | 43 |
| 3.2 Μέτρηση κυττάρων με χρήση Trypan Blue | 45 |

| | |
|---|----|
| 3.3 Καλλιέργεια PBMCs | 46 |
| 3.4 Κυτταρικά διεγερτικά | 47 |
| 3.5 Επώαση κυττάρων με αντισώματα και προετοιμασία κυτταρομετρίας ροής..... | 49 |
| 3.6 Κυτταρομετρία ροής..... | 51 |
| 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 53 |
| 4.1 Σχέση δόσης-απόκρισης PMA + Ιονομυκίνης | 53 |
| 4.2 Σύγκριση των διαφορετικών διεγερτικών μορίων για παραγωγή IL-10 από τα B κύτταρα..... | 57 |
| 4.3 Επίδραση των στατινών στην παραγωγή IFN-γ από T κύτταρα μετά από επώαση 24h..... | 60 |
| 4.4 Επίδραση των στατινών στην παραγωγή της IL-10 από B κύτταρα μετά από επώαση 24h | 61 |
| 4.5 Επίδραση των στατινών στην παραγωγή IFN-γ από T κύτταρα μετά από επώαση 48h..... | 66 |
| 4.6 Επίδραση των στατινών στην παραγωγή IFN-γ από T κύτταρα μετά από επώαση 96h..... | 68 |
| 4.7 Επίδραση των στατινών στην παραγωγή της IL-10 από B κύτταρα μετά από επώαση 96h | 70 |
| 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 72 |
| 5.1 Οι στατίνες προκαλούν μείωση της IL-10 από τα B κύτταρα..... | 73 |
| 5.2 Ένδειξη πως οι στατίνες αυξάνουν την IFN-γ από τα T κύτταρα..... | 75 |
| 5.3 Επίδραση των στατινών στην ισορροπία ανάμεσα σε ρυθμιστικούς και προφλεγμονώδεις κυτταρικούς πληθυσμούς σε ασθενείς με ΚΠΣ..... | 76 |
| 5.4 Επίλογος | 77 |
| 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 78 |

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κο Δαρδιώτη, τον κο Μπόγδανο και τον κο Γερμενή για τη συμβολή τους στην επίτευξη της διπλωματικής εργασίας. Θα ήθελα κατ' αρχάς να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, τον κο Δαρδιώτη, για την ευκαιρία που μου έδωσε. Επίσης τον κο Γερμενή που με προέτρεψε να βρω το αντικείμενο που με ενδιαφέρει. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον κο Μπόγδανο για τη συμβολή του στην πραγματοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας. Αποτελεί ένα εξαιρετικό παράδειγμα επιστήμονα του οποίου οι υποδείξεις και οι καίριες παρατηρήσεις βοήθησαν ώστε η εργασία να πάρει τη μορφή που έχει.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, τον Θάνο Μαυρόπουλο με τον οποίο είχα την τύχη να δουλέψω μαζί του. Ήταν πραγματικά μεγάλη η τιμή να συνεργαστώ μαζί του, καθώς αυτός με εισήγαγε στην έννοια της κυτταρομετρίας ροής, μία έννοια που είμαι σίγουρος ότι θα αξιοποιήσω στο έπακρο. Αποτέλεσε για μένα έναν εξαιρετικό δάσκαλο και φίλο με τον οποίο τα κοινά ενδιαφέροντα δε σταματούν στα στενά όρια της επιστήμης.

Τον Θάνο (τον Γκουτζουρέλα) για τις συζητήσεις και την παρέα εκείνες τις μέρες που οι ώρες δεν περνούσαν στο εργαστήριο.

Τον Γιώργο που πάντα ήταν πρόθυμος να μου δείξει σε ποιο συρτάρι είναι τα tips, παρά το γεγονός ότι ήταν η τρίτη φορά που ρωτούσα.

Την Ελένη για τις ατέλειωτες ώρες που περάσαμε μαζί δίπλα στο hood.

Την Εμμανουέλλα που με έμαθε πώς να απομονώνω κύτταρα.

Τον κο Χρήστο γιατί πάντα είχε μια ενδιαφέρουσα ιστορία να μας μεταφέρει.

Τους γονείς μου για την πνευματική και υλική υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια (και συνεχίζουν), καθώς και για το ενδιαφέρον και τη φιλότιμη προσπάθειά τους να καταλάβουν με τι ασχολούμαι.

Τη Δώρα που με άντεξε σε όλες τις δύσκολες στιγμές, καθώς και για την αγάπη και την υποστήριξή της ακόμα και όσο με περίμενε στη Σουηδία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η σκλήρυνση κατά πλάκας είναι μία αυτοάνοση απομυελινωτική νόσος του κεντρικού νευρικού συστήματος. Χαρακτηρίζεται από σταδιακή συσσώρευση αναπηρίας η οποία είναι αποτέλεσμα διαδεδομένου νευροεκφυλισμού. Οι παρατηρούμενες ανοσορυθμιστικές ελλείψεις στην πλειοψηφία των νοσούντων έχουν κατηγορηθεί για την εμφάνιση και τη σοβαρότητα της νόσου. Καθώς δεν έχει βρεθεί ακόμα ίαση για την ασθένεια, πολλές έρευνες γίνονται γύρω από τις ελλείψεις αυτές με σκοπό την αποκατάσταση των T και B ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων. Ουσίες όπως οι στατίνες βρίσκονται συχνά στο επίκεντρο των ερευνών λόγω των ανοσορυθμιστικών επιδράσεων που επιδεικνύουν. Στην παρούσα εργασία γίνεται διερεύνηση της δράσης της σιμβαστατίνης και της ατορβαστατίνης στην ισορροπία ανάμεσα σε ρυθμιστικούς και προφλεγμονώδεις κυτταρικούς πληθυσμούς σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας.

Έγινε απομόνωση κυττάρων περιφερικού αίματος ασθενών που πάσχουν από σκλήρυνση κατά πλάκας καθώς και υγιών δοτών. Τα κύτταρα επωάστηκαν με συνδυασμό διεγερτικών μορίων και για διαφορετικές ώρες καλλιέργειας, παρουσία ή όχι στατινών. Στόχος ήταν η εκτίμηση της παραγωγής IL-10 από τα B λεμφοκύτταρα και IFN- γ από τα T λεμφοκύτταρα. Τα πειράματα έδειξαν ότι οι στατίνες προκάλεσαν μείωση της IL-10 και μικρή αύξηση της IFN- γ . Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως οι στατίνες προκαλούν στροφή προς μία φλεγμονώδη TH1 λεμφοκυτταρική απόκριση, τουλάχιστον σε κάποια άτομα. Είναι παρά ταύτα σημαντικό να γίνει ένας μεγάλος αριθμός πειραμάτων κάτω από τις ίδιες συνθήκες ώστε να μπορέσουμε να καταλήξουμε σε ένα ασφαλές συμπέρασμα.

ABSTRACT

Multiple sclerosis is an autoimmune demyelinating disease of the central nervous system. It is characterized by gradual accumulation of disability resulting from widespread neurodegeneration. Observed immunoregulatory deficits in the majority of patients have been blamed for the appearance and severity of the disease. As there is still no cure for the disease, many studies are being carried out around these deficiencies with a view to restoring the regulatory T and B lymphocytes. Substances like statins are often at the heart of research due to the immunomodulatory effects they exhibit. This study investigates the effect of simvastatin and atorvastatin on the balance between regulatory and proinflammatory cell populations in patients with multiple sclerosis.

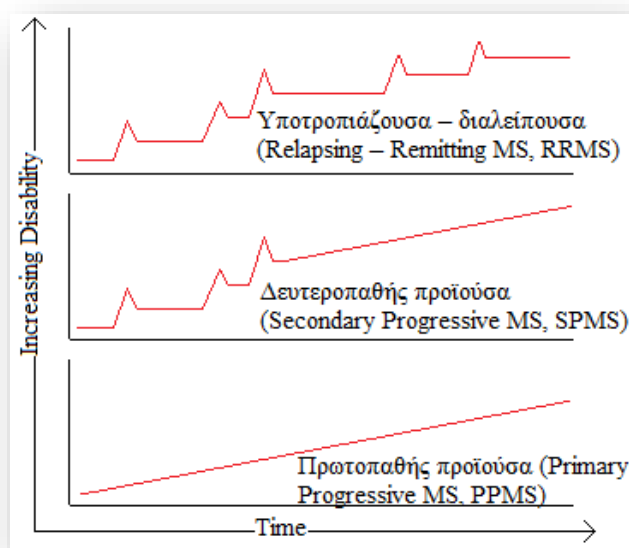
Isolated peripheral blood cells of patients suffering from multiple sclerosis as well as healthy donors were isolated. The cells were incubated with a combination of stimulatory molecules and for different culture times in the presence or absence of statins. The aim was to estimate IL-10 production from B lymphocytes and IFN- γ by T lymphocytes. The experiments showed that statins caused a decrease in IL-10 and a small increase in IFN- γ . These results indicate that statins cause a switch to an inflammatory T_H1 response, at least in some individuals. It is nevertheless important to make a large number of experiments under the same conditions so that we can come to a safe conclusion.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σκλήρυνση κατά πλάκας

Η σκλήρυνση κατά πλάκας (Multiple Sclerosis, MS) ή πολλαπλή σκλήρυνση (ΚΠΣ) ή διάχυτη εγκεφαλομυελίτιδα είναι μία φλεγμονώδης νόσος του εγκεφάλου και της σπονδυλικής στήλης. Χαρακτηρίζεται από εστιακή λεμφοκυτταρική διήθηση η οποία οδηγεί σε καταστροφή της μυελίνης και των νευρικών ινών. Κατά τη διάρκεια της ασθένειας εμφανίζεται εκτενής μικρογλοιακή ενεργοποίηση, η οποία προκαλεί διαδεδομένο νευροεκφυλισμό με αποτέλεσμα τη σταδιακή συσσώρευση αναπηρίας (2-6)]. Η πορεία της ΚΠΣ ποικίλει ιδιαίτερα και ως εξ αυτού είναι απρόβλεπτη. Η ασθένεια ανάλογα με την πορεία της μπορεί να χωριστεί σε 3 βασικές κατηγορίες (Εικόνα 1):

1. Υποτροπιάζουσα – διαλείπουσα (Relapsing – Remitting MS, RRMS): Αποτελεί την πιο συνήθη μορφή με περίπου το 80-85% των ασθενών να κατατάσσονται σε αυτήν την κατηγορία. Χαρακτηρίζεται από υποτροπές στη συμπτωματολογία, ακολουθούμενη από περιόδους ύφεσης, κατά τις οποίες τα συμπτώματα υποχωρούν ή και εξαφανίζονται. Αυτή η μορφή της ασθένειας παρουσιάζεται με ένα πρώτο οξύ επεισόδιο που επηρεάζει μία ή περισσότερες περιοχές, το οποίο ονομάζεται κλινικά απομονωμένο σύνδρομο. Μία μεταγενέστερη, δεύτερη επίθεση απομυελίνωσης είναι απαραίτητη για να ικανοποιηθούν τα διαγνωστικά κριτήρια για τη συγκεκριμένη μορφή της ασθένειας.



Εικόνα 1: Οι 3 κατηγοριοποιήσεις της ΚΠΣ

2. Δευτεροπαθής προϊούσα (Secondary Progressive MS, SPMS): Αυτή η μορφή εμφανίζεται σε κάποιους ασθενείς με υποτροπιάζουσα – διαλείπουσα ΚΠΣ. Για αρκετούς ασθενείς έχει δείχθει ότι θεραπεία με τροποποιητικούς για τη νόσο παράγοντες (disease-modifying agents) βοηθάει την καθυστέρηση μιας τέτοιας εξέλιξης. Η πορεία της νόσου συνεχίζει να επιδεινώνεται είτε μαζί με ενδιάμεσες περιόδους ύφεσης ή σταθεροποίησης των συμπτωμάτων (πλατό) είτε χωρίς.

3. Πρωτοπαθής προϊούσα (Primary Progressive MS, PPMS): Περίπου το 10-20% των ασθενών κατατάσσονται σε αυτήν την κατηγορία. Αυτή η μορφή της ασθένειας είναι η πιο δύσκολα αντιμετωπίσιμη με τις υπάρχουσες θεραπευτικές μεθόδους, καθώς η πορεία της νόσου είναι συνεχώς επιδεινώμενη. Περίοδοι υποτροπών και διαλείψεων απουσιάζουν πλήρως αν και μπορεί να εμφανίζονται περιοδικά πλατό.

Δεν υπάρχει μία συγκεκριμένη διαγνωστική δοκιμασία για τη ΚΠΣ. Η διάγνωση βασίζεται σε αποδείξεις:

1. Τουλάχιστον 2 διαφορετικών αλλοιώσεων στη λευκή ουσία του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ)
2. Τουλάχιστον 2 διαφορετικών επεισοδίων στην πορεία της νόσου
3. Χρόνιας φλεγμονής στο ΚΝΣ

Η μαγνητική τομογραφία (magnetic resonance imaging, MRI) έχει εξελιχθεί στο σημαντικότερο εργαλείο για τη διάγνωση και την παρακολούθηση της ΚΠΣ. Η υψηλή ευαισθησία της στην αξιολόγηση φλεγμονωδών και νευροεκφυλιστικών διεργασιών στον εγκέφαλο και τη σπονδυλική στήλη την κατέστησε τη συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη τεχνική για την εκτίμηση των ασθενών με ΚΠΣ. Επιπλέον, η μαγνητική τομογραφία έχει γίνει ένα ισχυρό εργαλείο για την παρακολούθηση, την αξιολόγηση της ασφάλειας, καθώς και για την πρόγνωση της εξέλιξης της νόσου. Κλινικά, η χρήση της μαγνητικής τομογραφίας έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες ως αποτέλεσμα της βελτιωμένης τεχνολογίας και της αυξημένης διαθεσιμότητας, η οποία εδώ και χρόνια εκτείνεται πέρα από τα ακαδημαϊκά κέντρα. Σημειώνεται ότι υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες που υποστηρίζουν το ρόλο της μαγνητικής τομογραφίας στη διαχείριση ασθενών με ΚΠΣ (7).

1.1.1 Συμπτωματολογία

Οι αρχικές εστιακές εκδηλώσεις της νόσου μπορεί να είναι είτε οξείες είτε λανθάνουσες και συχνά ποικίλλουν σε δριμύτητα. Τα αρχικά συμπτώματα συνήθως περιλαμβάνουν διαταραχές της αισθητικότητας, αδυναμία, απώλεια όρασης, διαταραχές της βάδισης, μειωμένη επιδεξιότητα, διπλωπία, αταξία, ίλιγγο ή διαταραχές του σφιγκτήρα. Οι ασθενείς ίσως αναφέρουν μη ειδικά συμπτώματα όπως δυσφορία, κούραση ή κεφαλαλγία τα οποία συχνά προαναγγέλλουν τις πρώτες εστιακές νευρολογικές διαταραχές. Ο παρακάτω πίνακας συνοψίζει τα πιο συνήθη συμπτώματα τα οποία εμφανίζονται κατά την πορεία της νόσου (2, 3, 6).

| Περιοχή | Συμπτώματα |
|--|--|
| Εγκέφαλος | Γνωστική Δυσλειτουργία, κινητικά προβλήματα, συναισθηματικά προβλήματα (κυρίως κατάθλιψη), επιληψία (σπάνια) |
| Οπτικό νεύρο | Μονομερής, οδυνηρή απώλεια της όρασης |
| Παρεγκεφαλίτιδα και παρεγκεφαλικά μονοπάτια | Τρόμος, αδεξιότητα και διαταραχή της ισορροπίας |
| Εγκεφαλικό στέλεχος | Διπλωπία, ταλαντοψία, ίλιγγος, δυσκαταποσία, προβλήματα στην ομιλία, συναισθηματική αστάθεια, παροξυσμικά συμπτώματα |
| Σπονδυλική στήλη | Αδυναμία, ακαμψία, οδυνηροί σπασμοί, δυσλειτουργία της ουροδόχου κύστης, στυτική ανικανότητα, δυσκοιλιότητα |
| Άλλες | Πόνος, κούραση, ευαισθησία στη θερμοκρασία, δυσανεξία στην άσκηση |

Η Expanded Disability Status Scale (EDSS) είναι μια μέθοδος ποσοτικοποίησης της αναπηρίας στη ΚΠΣ. Η κλίμακα, η οποία αναπτύχθηκε από τον John F. Kurtzke (8), ποσοτικοποιεί την αναπηρία σε οκτώ λειτουργικά συστήματα (functional systems, FS) και επιτρέπει στους νευρολόγους να εκχωρήσουν ένα βαθμό λειτουργικού συστήματος (functional system score FSS) σε καθένα από αυτά. Τα συστήματα είναι τα εξής:

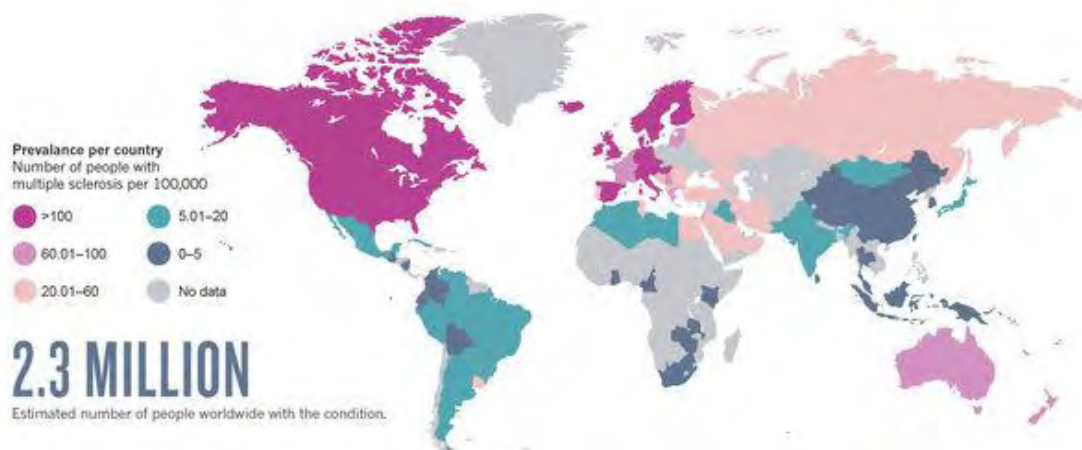
1. Πυραμιδικό
2. Παρεγκεφαλικό
3. Εγκεφαλικού στελέχους
4. Αισθητήριο
5. Του εντέρου και της ουροδόχου κύστης
6. Οπτικό
7. Εγκεφαλικό
8. Άλλα

Η κλίμακα EDSS βαθμολογείται από το 0 (φυσιολογική νευρολογική εξέταση) έως το 10 (θάνατος από ΚΠΣ).

1.1.2 Επιδημιολογία

Η ΚΠΣ είναι η συχνότερη χρόνια νευρολογική διαταραχή σε νέους ενήλικες με περίπου 2,5 εκατομμύρια νοσούντες παγκοσμίως. Παρόλο που η αιτιολογία της ασθένειας παραμένει άγνωστη, οι επιστήμονες συμφωνούν ότι υπάρχει μία πληθώρα περιβαλλοντικών, γενετικών και

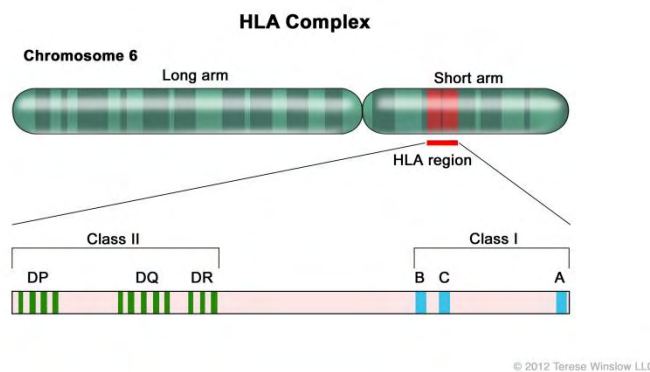
ακόμα και επιγενετικών παραγόντων που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της νόσου. Είναι γνωστό ότι η ΚΠΣ είναι πιο συχνή στις γυναίκες σε σύγκριση με τους άντρες με αναλογία περίπου 2:1. Συνήθως εμφανίζεται σε νέους ενήλικες και σπάνια σε παιδιατρικούς πληθυσμούς ή άτομα άνω των 65 ετών (2, 4, 6).



Εικόνα 2: Επιπολασμός της ασθένειας ανά χώρα. Αριθμός νοσούντων ανά 100.000 άτομα (9)

Ο περιβαλλοντικός παράγοντας: Η ΚΠΣ αυξάνεται σε συχνότητα με την απομάκρυνση από τον ισημερινό και είναι γενικά σπάνια σε τροπικά κλίματα. Αυξημένη ευαισθησία στην ασθένεια εμφανίζεται σε χώρες τις βόρειας Ευρώπης, στις Η.Π.Α, στον Καναδά, στην Ιαπωνία, στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία (10) (Εικόνα 2). Έχει, επίσης, αποδειχθεί ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας βιταμίνης D στο αίμα και στην πιθανότητα εμφάνισης της νόσου. Η βιταμίνη D σχετίζεται με υποτροπές της ασθένειας (11), κατά τις οποίες έχει δειχθεί ότι τα επίπεδά της στο αίμα είναι μειωμένα (12). Σε μία από τις εργασίες που έχουν δημοσιευθεί, συμπληρώματα βιταμίνης D προκάλεσαν μία σημαντική μείωση στον αριθμό νέων εγκεφαλικών αλλοιώσεων σε 12 ασθενείς με ΚΠΣ (13). Αυτό έρχεται σε συμφωνία και με την παρατήρηση ότι μακριά από τον ισημερινό, όπου η υπεριώδης ακτινοβολία και άρα η απορρόφηση της βιταμίνης D είναι περιορισμένη, παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά εμφάνισης της νόσου. Επιπρόσθετα, η μόλυνση από τον ιό Epstein-Barr (EBV) έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη της νόσου. Παρόλο που μέχρι και το 95% του ενήλικου γενικού πληθυσμού είναι θετικό για τον ιό, ο κίνδυνος για την ασθένεια αυξάνεται στο δεκαπενταπλάσιο σε σύγκριση με τα αρνητικά για τον ιό άτομα. Συγκεκριμένες αλληλουχίες αντιγόνων του EBV είναι ομόλογες με αντιγόνα του ΚΝΣ, υποδηλώνοντας ότι η αυτοανοσία της ΚΠΣ πιθανά να ξεκινάει από μοριακό μιμητισμό (14, 15). Τέλος, υπάρχει ένας αριθμός ερευνών που υποστηρίζουν ότι το κάπνισμα παίζει ρόλο στην πρόοδο της ασθένειας, οδηγώντας σε ταχύτερη εμφάνιση αναπηρίας (6, 16).

Γενετική: Το ρίσκο της ΚΠΣ είναι υψηλότερο στα μέλη οικογενειών των ατόμων που πάσχουν σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό. Μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες αποπειρώνται να υπολογίσουν τον κίνδυνο εκδήλωσης της ασθένειας σε διαφορετικού βαθμού συγγενείς ασθενών συμπεριλαμβανομένων μονοζυγωτικών διδύμων, καθώς και πρώτου και δευτέρου βαθμού συγγενείς. Ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου στον Καναδά είναι 0,002 για τον γενικό πληθυσμό, 0,25 για μονοζυγωτικούς διδύμους, 0,04 για συγγενείς πρώτου βαθμού και 0,011 για συγγενείς δευτέρου βαθμού (17, 18). Παρόμοια ποσοστά έχουν αναφερθεί και στην Αγγλία (19, 20). Αξίζει σε αυτό το σημείο να σημειωθεί ότι έρευνες σε ετεροθαλή αδέρφια τα οποία είχαν ανατραφεί σε ίδιες ή διαφορετικές οικογένειες δείχνουν ότι η αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου σχετίζεται κυρίως με το κοινό γενετικό ιστορικό παρά με το κοινό περιβάλλον (17, 21-23).



Εικόνα 3: Σύμπλεγμα HLA. Ανθρώπινο χρωμόσωμα 6 με ενίσχυση της περιοχής HLA. [US National Library of Medicine; Genetics Home Reference; 2012. <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/multiple-sclerosis>]

μονοζυγωτικών διδύμων, καθώς και πρώτου και δευτέρου βαθμού συγγενείς. Ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου στον Καναδά είναι 0,002 για τον γενικό πληθυσμό, 0,25 για μονοζυγωτικούς διδύμους, 0,04 για συγγενείς πρώτου βαθμού και 0,011 για συγγενείς δευτέρου βαθμού (17, 18). Παρόμοια ποσοστά έχουν αναφερθεί και στην Αγγλία (19, 20). Αξίζει σε αυτό το σημείο να σημειωθεί ότι έρευνες σε ετεροθαλή αδέρφια τα οποία είχαν ανατραφεί σε ίδιες ή διαφορετικές οικογένειες δείχνουν ότι η αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου σχετίζεται κυρίως με το κοινό γενετικό ιστορικό παρά με το κοινό περιβάλλον (17, 21-23).

Η σύνδεση ανάμεσα στην ΚΠΣ και το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex – MHC) έχει αναφερθεί ήδη από τη δεκαετία του 1970. Η σύνδεση αυτή είναι ισχυρότερη στους κατοίκους της βόρειας Ευρώπης, αλλά εμφανίζεται σχεδόν σε όλους τους πληθυσμούς. Ο γενετικός αυτός τύπος κωδικοποιεί τα γονίδια που παρουσιάζουν πεπτιδικά αντιγόνα στα Τ λεμφοκύτταρα. Έρευνες χαρτογράφησης υποδεικνύουν ότι η συνεισφορά του συγκεκριμένου γονιδιακού τύπου στο αυξημένο ρίσκο εμφάνισης ΚΠΣ, πιθανότατα οφείλεται σε έναν ή περισσότερους πολυμορφισμούς στα γονίδια HLA-DR (3, 6) (Εικόνα 3).

Έλεγχοι σε επίπεδο γονιδιώματος έχουν αποκαλύψει πάνω από 20 άλλα γονίδια τα οποία συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΚΠΣ. Τα γονίδια αυτά, των οποίων η σύνδεση με την ασθένεια έχει αποδειχθεί, φαίνεται να εμπλέκονται με την ανοσολογική ρύθμιση. Οι μεμονωμένες συνεισφορές του κάθε γονιδίου στην αύξηση της επικινδυνότητας της ασθένειας είναι μικρές και σίγουρα πολύ μικρότερες από το HLA. Μία λίστα με τα γονίδια αυτά φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

| Γονίδιο ενδιαφέροντος | Λειτουργία | Συσχέτιση με άλλες ασθένειες |
|--|---|---------------------------------------|
| HLA-DRB1*15:01 | Αντιγονοπαρουσίαση στα Τ λεμφοκύτταρα. | SLE |
| IL2RA⁽²⁴⁾ | Υπομονάδα α του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2 (IL-2). Ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων. | Grave's disease, RA, SLE, DM1 |
| IL7R⁽²⁴⁾ | Ο υποδοχέας της IL-7 προωθεί την επιβίωση των CD4+ και CD8+ κυττάρων μετά από θετική επιλογή και ρυθμίζει την ομοιόσταση των περιφερικών κυττάρων μνήμης. | DM1 |
| IL12A⁽²⁵⁾ | Η υπομονάδα α της IL-12 παράγεται από μονοκύτταρα και δένδριτικά κύτταρα και είναι σημαντικό στην T _H 1 λεμφοκυτταρική διαφοροποίηση. | Κοιλιοκάκη, πρωτοπαθής χολική κίρρωση |
| CD6⁽²⁵⁾ | Συνδιεγερτικό μόριο το οποίο ενισχύει το λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό | |
| IRF8⁽²⁵⁾ | Μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος επάγεται από ιντερφερόνες τύπου Ι. | |
| TNFRSF1A⁽²⁵⁾ | Υποδοχέας του παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor – TNF) ο οποίος εμπλέκεται στην απόπτωση, τη φλεγμονή και την ανοσοκαταστολή. | TRAPS |
| MPHOSPH9/CDK2AP1⁽²⁵⁾ | Η λειτουργία του MPHOSPH9 είναι άγνωστη. Ο CDK2AP1 κωδικοποιεί το p12DOC-1, έναν αναστολέα της αντιγραφής του DNA. | |
| RGS1⁽²⁵⁾ | Κωδικοποιεί έναν ρυθμιστή μίας σηματοδοτικής G πρωτεΐνης, η οποία εμπλέκεται στη μετανάστευση και διακίνηση των λεμφοκυττάρων. | Κοιλιοκάκη, DM1 |
| CD58⁽²⁵⁾ | Ένας προσδέτης του CD2 σηματοδοτεί αυτό το συνδιεγερτικό μόριο, το οποίο ενισχύει τη σηματοδότηση του υποδοχέα του Τ κυττάρου (Τ | |

| | | |
|-------------------------------|--|---|
| | cell receptor – TCR). | |
| CLEC16A⁽²⁵⁾ | C-τύπος, μέλος της οικογένειας των λεκτινών, ο οποίος εκφράζεται σε B λεμφοκύτταρα, δένδριτικά και φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killer cells – NK). Ίσως σηματοδοτεί την επιλογή ανάμεσα σε ανοχή και ανοσία. | DM1 |
| CD40⁽²⁶⁾ | Μέλος της υπεροικογένειας υποδοχέων TNF, ένα συνδιεγερτικό μόριο των B κυττάρων, των δένδριτικών κυττάρων, των μακροφάγων και της μικρογλοίας. | Graves disease, RA |
| CYP27B1⁽²⁶⁾ | Κωδικοποιεί το ένζυμο υδροξυλάση της 25-υδροξυ-βιταμίνης D-1. Υδροξυλιώνει την 25-OH βιταμίνη D σε 1,25 (OH) ₂ βιταμίνη D. | DM1 |
| EVI5⁽²⁶⁾ | Μία κοινή περιοχή ρετροϊκής ενσωμάτωσης με άγνωστη λειτουργία. | |
| STAT3⁽²⁷⁾ | Μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος εμπλέκεται σε πολλαπλές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένου του μονοπατιού μεταγωγής σήματος Jak-STAT, της απόπτωσης, της νευρικής καθοδήγησης καθώς και της T _H 17 διαφοροποίησης. | Crohn disease |
| TYK2⁽²⁸⁾ | Μία κινάση τυροσίνης του σηματοδοτικού μονοπατιού STAT, το οποίο είναι σημαντικό για τη σηματοδότηση των ιντερφερονών τύπου I και την επαγωγή της T _H 1 διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων. | SLE |
| KIF21B⁽²⁹⁾ | Μέλος την υπεροικογένειας κινητικών πρωτεϊνών των κινεσινών, το οποίο εμπλέκεται στην αξονική μεταφορά | |
| TMEM39A⁽²⁹⁾ | Άγνωστη λειτουργία | |
| MMEL1⁽³⁰⁾ | Μία μεμβρανική μεταλλοενδοπεπτιδάση η οποία εμπλέκεται στην αποδόμηση των νευροπεπτιδίων και του β-αμυλοειδούς. | RA, Κοιλιοκάκη, πρωτοπαθής χολική κίρρωση |

| | | |
|----------------------------|---|--|
| CBLB⁽³¹⁾ | E3 λιγάση της ουβικουιτίνης εμπλεκόμενη στη ρύθμιση της αυτοανοσίας | |
|----------------------------|---|--|

Πίνακας 1: DM1 = Διαβήτης τύπου I; RA = Ρευματοειδής αρθρίτιδα; SLE = Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος; TCR = T-cell receptor; TNFR = tumor necrosis factor receptor; TRAPS Περιοδικό σύνδρομο σχετιζόμενο με τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (traps) ή οικογενής ιρλανδικός πυρετός

Επιγενετική: Οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι κληρονομήσιμες, αναστρέψιμες μετατροπές στη γονιδιακή έκφραση, οι οποίες δεν επηρεάζουν την αλληλουχία του DNA. Εξαρτώνται τόσο από περιβαλλοντικές όσο και από βιολογικές συνθήκες και έχουν ως αποτέλεσμα διαφορετικές κυτταρικές αποκρίσεις (32). Η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και τα micro-RNAs συνιστούν τους κύριους μηχανισμούς της επιγενετικής. Συγκεκριμένα η μεθυλίωση του DNA έχει ως στόχο την παρεμπόδιση μεταγραφικών παραγόντων να συνδεθούν στον εκκινητή του γονιδίου με αποτέλεσμα τη σίγησή του. Τα αποτελέσματα της μεθυλίωσης του DNA έχουν μελετηθεί σε μοντέλα ποντικών με πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE), το ζωικό μοντέλο της ΚΠΣ, το οποίο έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα ευόιωνο ως προς την προέκταση αυτών των αποτελεσμάτων σε ασθενείς.

Οι απαμινάσες της πεπτιδυλο αργινίνης (Peptidylargininedeiminase) 2 (PAD2) και 4 (PAD4) είναι ένζυμα τα οποία εκφράζονται στον εγκέφαλο και στα κύτταρα του περιφερικού αίματος. Αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA του εκκινητή του PAD2, οδηγούν σε αύξηση της παραγωγής της PAD2 πρωτεΐνης που ρυθμίζει την παραγωγή κιτρουλλινοποιημένης βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης (MBP). Αυτή η πιο ασταθής μορφή της MBP οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της μυελίνης και σε ενεργοποίηση της ανοσολογικής απάντησης κατά την ανάπτυξη της ΚΠΣ (33).

Η σύνδεση ανάμεσα στο MHC τάξης II και την ΚΠΣ υποστηρίζεται από ένα αξιοσημείωτο όγκο δεδομένων (34). Η σύνδεση αυτή φαίνεται πως στηρίζεται σε ένα βαθμό και στην επιγενετική. Η έκφραση των μορίων MHC ρυθμίζεται από τον trans-ενεργοποιητή MHC2TA ο οποίος, στη συνέχεια, επηρεάζεται από τη μεθυλίωση του γονιδιακού του εκκινητή IV (35).

Η έκφραση των γονιδίων DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, TET1, TET2, και TET3 επηρεάζουν τη λειτουργία των αντίστοιχων ενζύμων, τα οποία εμπλέκονται στην μετατροπή της 5-μεθυλοκυτοσίνης σε 5-υδροξυ-μεθυλο-κυτοσίνη (36, 37). Έχουν διεξαχθεί έρευνες πάνω στην κατάσταση μεθυλίωσης των ανωτέρω γονιδίων στην ΚΠΣ, μέσω απομόνωσης κυττάρων περιφερικού αίματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν αλλαγές στη μεθυλίωση των εκκινητών των DNMT1 και TET2. Οι αλλαγές αυτές συνοδεύονταν από μειωμένα επίπεδα των αντίστοιχων πρωτεϊνών στο αίμα των ασθενών. Επιπλέον, βρέθηκε μια αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του TET2 και τη διάρκεια της ασθένειας (36). Μία σημαντική ελάττωση της μεταγραφής του γονιδίου TET3 σε ασθενείς με SPMS έχει, επίσης, παρατηρηθεί (38).

Μία ανάλυση της συνολικής μεθυλίωσης του DNA σε ολόκληρο το γονιδίωμα ανάμεσα σε CD4+, CD8+ και κύτταρα ολικού αίματος έχει ολοκληρωθεί, αλλά παρόλες τις διαφορές που παρατηρήθηκαν ανάμεσα σε πάσχοντες από ΚΠΣ και υγιείς, αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (39). Στην ίδια έρευνα παρατηρήθηκαν ισχυρές ενδείξεις για την υπερμεθυλίωση σε μερικά CpG-sites σε CD8+ κύτταρα νοσούντων. Επιπροσθέτως, στα κύτταρα αυτά βρέθηκε υψηλότερη υπερμεθυλίωση σε ασθενείς με διάρκεια νόσου 7 χρόνια ή λιγότερο σε σύγκριση με αυτούς των οποίων η διάρκεια της νόσου ξεπερνούσε τα 8 χρόνια (39, 40).

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις και συγκεκριμένα η μεθυλίωση του DNA, ίσως να αποτελεί τη γέφυρα ανάμεσα στους γενοτύπους, τις περιβαλλοντικές εκθέσεις και στην ΚΠΣ. Δυστυχώς, οι έρευνες για τη μεθυλίωση του DNA στην ΚΠΣ είναι σχετικά λίγες και με μικρό αριθμό δειγμάτων, οπότε ίσως είναι πολύ νωρίς για να βγουν συμπεράσματα. Παρόλα αυτά, είναι εμφανές από τις υπάρχουσες μελέτες ότι η μεθυλίωση του DNA επηρεάζεται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα και επιδρά στη γονιδιακή έκφραση, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε προδιάθεση για τη νόσο (41).

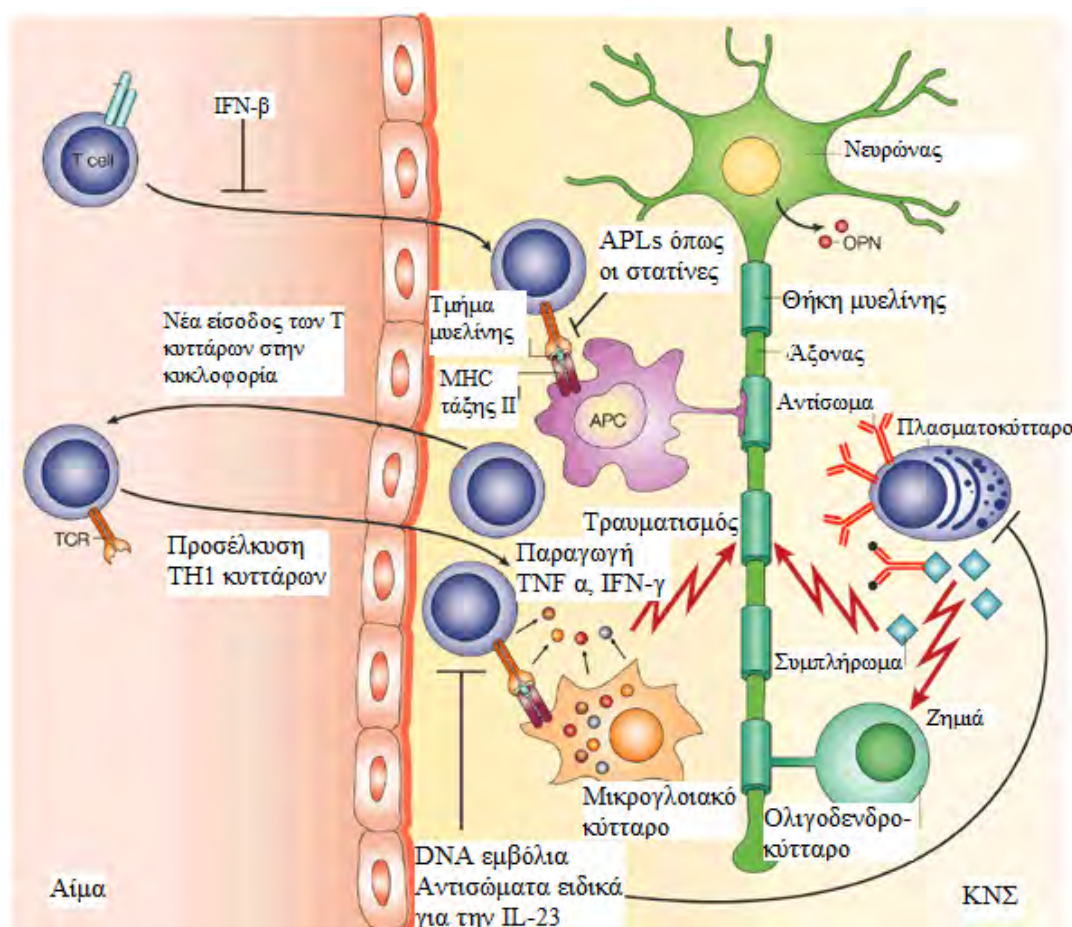
1.1.3 Παθογένεση

Η τρέχουσα επιστημονική αντίληψη υποστηρίζει την ΚΠΣ ως μια αυτοάνοση ασθένεια που προκαλείται από αυτοδραστικά, ειδικά για τη μυελίνη T λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά έχουν αποδειχθεί ότι αναγνωρίζουν πρωτεΐνες της θήκης μυελίνης, συμπεριλαμβανομένης της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης (MBP), της γλυκοπρωτεΐνης που σχετίζεται με μυελίνη (MAG) και της γλυκοπρωτεΐνης ολιγοδενδροκυττάρων μυελίνης (MOG) τόσο σε ασθενείς με ΚΠΣ όσο και σε υγιείς δότες. Ωστόσο, τα CD4+ T λεμφοκύτταρα ασθενών εμφανίζουν έναν ενεργοποιημένο φαινότυπο ή μνήμη με αυξημένη ειδικότητα στις πρωτεΐνες μυελίνης, συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα κύτταρα υγείων ατόμων (42). Μέχρι πρότινος, ειδικά για τη μυελίνη T λεμφοκύτταρα θεωρούνταν ότι συμβάλουν στην TH1-διαμεσολαβούμενη φλεγμονή, σε αντίθεση με την TH2 απόκριση T κυττάρων που απομονώθηκαν από υγιείς δότες (43). Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν καταδείξει τη σημασία της IL-23 στην ΚΠΣ. Η IL-23 είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της προ-φλεγμονώδους κυτταρικής σειράς TH17 που εκκρίνει IL-17, η οποία έχει περιγραφεί ως ο παθογόνος μεσολαβητής αρκετών αυτοάνοσων ασθενειών (15, 44).

Η ανισοροπία από την φυσιολογική ανοσιακή ομοιόσταση στην παθολογική αλληλουχία γεγονότων εγείρεται από ανοσορυθμιστικές ελλείψεις, οι οποίες επιτρέπουν στα αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα να εγκαθιδρύσουν μία ανοσιακή απόκριση μέσα στον εγκέφαλο. Τα ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα νοσούντων από ΚΠΣ αποτυγχάνουν να καταστείλουν τα προφλεγμονώδη κύτταρα (45). Αυτά τα αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα αποφεύγουν τον αποπτωτικό θάνατο μετά

από διέγερση, λόγω υπερέκφρασης β-αρρεστίνης 1, η οποία είναι βασικός υποστηρικτής της κυτταρικής επιβίωσης των CD4⁺ T κυττάρων (46). Πιθανότατα, η αποτυχία των τοπικών ρυθμιστικών μηχανισμών μέσα στον εγκέφαλο ευθύνεται για τη φλεγμονή – στην οποία κυριαρχούν περιαγγειακά CD8⁺ κύτταρα – η οποία οδηγεί στη συσσώρευση των επανομαζόμενων πλακών στις πλευρικές κοιλίες του εγκεφάλου, στο μεσολόβιο, στον φλοιό, στην υποφλοιώδη λευκή ουσία, στα οπτικά νεύρα, στο εγκεφαλικό στέλεχος και κατά μήκος της σπονδυλικής στήλης (6).

T και B κύτταρα καθώς και αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα (APCs), συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, εισέρχονται στο ΚΝΣ, όπου παράγουν κυτταροκίνες οι οποίες καταστρέφουν τα ολιγοδενδροκύτταρα. Αυτά τα κύτταρα είναι υπεύθυνα για την κατασκευή της μυελίνης η οποία μονώνει τους άξονες του νευρικού συστήματος. Η κατεστραμμένη μυελίνη δεν μπορεί να άγει ηλεκτρικά σήματα φυσιολογικά, κατ' αντιστοιχία με ένα σχίσμο σε ένα καλώδιο το οποίο οδηγεί σε βραχυκύκλωμα. Τα λεμφοκύτταρα διαπηδούν μέσα στο ΚΝΣ μέσω ενός μεμβρανικού υποδοχέα, γνωστού ως άλφα4-ιντεγκρίνη. Αυτό το βήμα εμποδίζεται από αντισώματα ειδικά για την άλφα4-ιντεγκρίνη ή και από την ιντερφερόνη-βήτα (IFN-β). Μόλις επέλθει το ρήγμα στον

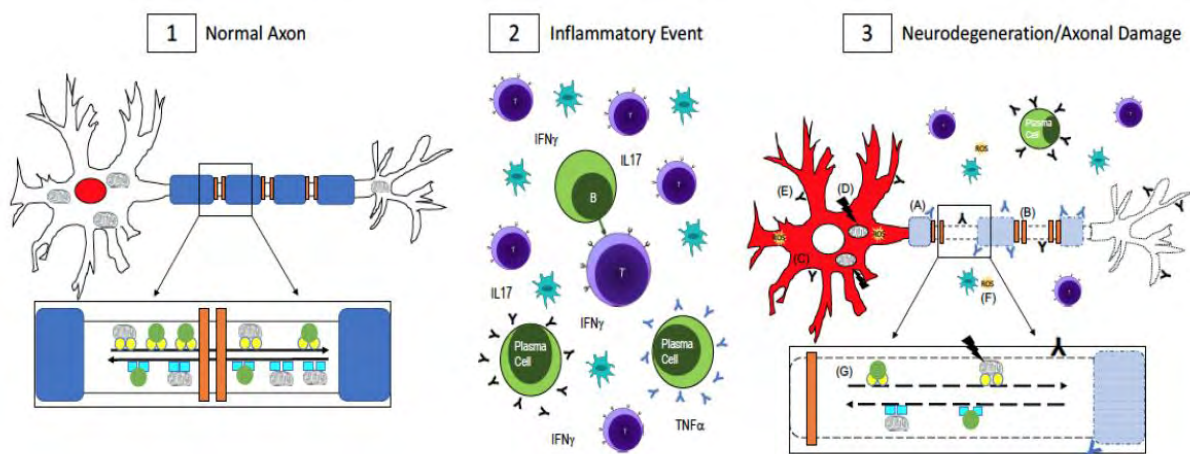


Εικόνα 4: Παθογένεση της ΚΠΣ. Μεταφρασμένη εικόνα από (46)

αιματοεγκεφαλικό φραγμό, παρατηρείται μία συσσώρευση και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων στη λευκή ουσία. Μέσα στον εγκέφαλο, τα Τ λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα που τα συνοδεύουν, καθώς και τα μικρογλοιακά κύτταρα παράγουν οστεοποντίνη (OPN), ιντερλευκίνη 23 (IL-23), IFN- γ και τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF). Όλες αυτές οι κυτταροκίνες καταστρέφουν τη μυελίνη. Επιπλέον, η παρουσία της οστεοποντίνης πιθανότατα προσελκύει προφλεγμονώδη T_H1 κύτταρα. Η ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων μπορεί να παρεμποδιστεί από τροποποιημένους πεπτιδικούς προσδέτες (altered peptide ligands, APLs), όπως είναι η θεραπευτική ουσία της ΚΠΣ copaxone ή οι στατίνες. Συγχρόνως με τα παραπάνω, τα Β λεμφοκύτταρα, και συγκεκριμένα τα πλασματοκύτταρα, παράγουν αντισώματα ειδικά έναντι της μυελίνης. Τα αντισώματα αυτά αλληλεπιδρούν με το τελικό σύμπλεγμα στον μοριακό καταρράκτη του συμπληρώματος και παράγουν συμπλέγματα μεμβρανικής επίθεσης, τα οποία επίσης καταστρέφουν τα ολιγοδενδροκύτταρα. Τα εμβόλια DNA είναι γνωστό ότι μπορούν να προκαλέσουν ανοχή τόσο στα Τ όσο και στα Β λεμφοκύτταρα απέναντι στη μυελίνη (47) (Εικόνα 4). Οι οξείες απομυελινωτικές κακώσεις μετά από διατομή (48), δείχνουν εκτενή αξονικό τραυματισμό, ο οποίος συσχετίζεται με Τ λεμφοκυτταρική και μικρογλοιακή διήθηση (49). Με την έναρξη της δευτερογενούς προϊούσας φάσης, οι περιοχές απομυελίνωσης συνυπάρχουν με άξονες και νευρώνες οι οποίοι παρουσιάζουν διαδεδομένο εκφυλισμό, ο οποίος συνδέεται με τη συσσώρευση υπερ-φωσφορυλιωμένων και αδιάλυτων τ πρωτεϊνών (50). Οι κακώσεις αυξάνονται αργά μέσω ακτινικής αύξησης καθώς η εστιακή εγκεφαλική φλεγμονή σιγά σιγά μετατρέπεται σε διάχυτη παρεγχυματική μικρογλοιακή ενεργοποίηση με αποτέλεσμα διαδεδομένες ανωμαλίες στη λευκή ουσία (5, 6, 51, 52).

1.1.4 Παθοφυσιολογία

Ένα από τα πιο αναγνωρίσιμα παθολογικά χαρακτηριστικά της ΚΠΣ είναι η πλάκα ή η βλάβη που είναι εμφανής *in vivo* σε μαγνητικές τομογραφίες εγκεφάλου. Σε αυτές τις πλάκες, ανάλογα με το στάδιο στο οποίο βρίσκονται, μπορεί να εμφανίζονται ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, μικρογλοιακά κύτταρα καθώς και αποικοδομημένα από μακροφάγα, τμήματα μυελίνης (53). Τα ολιγοδενδροκύτταρα συχνά κάνουν προσπάθειες επαναμυελίνωσης τραυματισμένων αξόνων, κάτι που οδηγεί σε σκιώδεις πλάκες οι οποίες εμπεριέχουν μερικώς απομυελινωμένους άξονες (54). Η φλεγμονή, οι πλάκες και η πρόοδος της νόσου διαφέρει από ασθενή σε ασθενή και μπορεί να μην συσχετίζεται απαραίτητα με τη σοβαρότητα της νόσου. Υποδηλώνεται ότι η φλεγμονή και ο νευροεκφυλισμός, συμπεριλαμβανομένου του τραυματισμού των αξόνων, μπορεί να εμφανιστούν ταυτόχρονα αλλά ανεξάρτητα κατά τη διάρκεια της νόσου (51).



Εικόνα 5: Αξονική βλάβη στη ΚΠΣ. Απεικονίζεται ένας φυσιολογικός άξονας [1], ένα φλεγμονώδες γεγονός [2] καθώς και ο νευροεκφυλισμός και ο αξονικός τραυματισμός [3] (4)

Στην εικόνα 5 περιγράφεται η αξονική βλάβη που προκαλείται από την ΚΠΣ. [1] Σε έναν κανονικό, υγιή άξονα, η μυελίνη (μπλε) περιτυλίγεται γύρω από τον άξονα και οι διάλυτοι ιόντων (πορτοκαλί) συγκεντρώνονται στους μη μυελινωμένους κόμβους του Ranvier. Αυτό επιτρέπει την ταχύτατη μεταγωγή σήματος κατά μήκος του άξονα. Πρωτεΐνες δέσμησης RNA, οι οποίες διατηρούν την ομοιοστασία του μορίου, εντοπίζονται στον πυρήνα (κόκκινο). Μιτοχόνδρια καθώς και άλλα φορτία (πράσινοι κύκλοι), μεταφέρονται παλινδρομικά κατά μήκος του νευράξονα από δυνεΐνη (τυρκουάζ τετράγωνα, ένθετο) ενώ η πρόσθια μεταφορά γίνεται με κινητήρια πρωτεΐνη κινεσίνης (κίτρινο κύκλοι, ένθετο). Η μεταφορά είναι γρήγορη και απρόσκοπτη καθώς ο άξονας δεν είναι τραυματισμένος, δεν υπάρχει έλλειψη ενέργειας και οι κινητήριες πρωτεΐνες είναι ανέπαφες. [2] Στην ΚΠΣ παρατηρείται διείσδυση T και B λεμφοκυττάρων, κυττάρων πλάσματος και μακροφάγων στο ΚΝΣ. Το συμβάν αυτό οδηγεί σε έναν καταρράκτη γεγονότων που περιλαμβάνουν την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και αυτό-αντισωμάτων, τα οποία πιστεύεται ότι είναι επιβλαβή για αμφοτέρους τους νευρώνες, τους άξονες και τη μυελίνη (55, 56). [3] Η βλάβη του άξονα και ο νευροεκφυλισμός συμβαίνουν ταυτόχρονα με τη φλεγμονή. Υπάρχει συνεχής απομυελίνωση λόγω αντισωμάτων κατά των αντιγόνων μυελίνης (μπλε Y, A). Η απομυελίνωση οδηγεί στην ανακατανομή των διαύλων ιόντων (B), η οποία παρεμποδίζει την αγωγιμότητα κατά μήκος του άξονα (57). Η ανακατανομή των πρωτεϊνών δέσμησης RNA από την κανονική πυρηνική τους θέση (1, κόκκινο) στο κυτταρόπλασμα (3, C, κόκκινο) είναι ένα παθολογικό χαρακτηριστικό του νευρωνικού εκφυλισμού σε νευρολογικές παθήσεις (58, 59). Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA (D) μπορούν να βλάψουν την ικανότητα του κυττάρου να παράγει αρκετή ATP ενώ, παράλληλα, αντισώματα για μη-μυελικά αντιγόνα (μαύρα Y, E) βλάπτουν τους νευράξονες (55, 56). Ενεργές ρίζες οξυγόνου (κίτρινο, F) θα μπορούσαν να απελευθερωθούν από την ενεργοποιημένη μικρογλοία ή ως αποτέλεσμα δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων (60). Η

διαταραγμένη αξονική μεταφορά (G) είναι, επίσης, εμφανής στην ΚΠΣ (61). Περισσότερο ο συνδυασμός των γεγονότων, παρά ένα συγκεκριμένο γεγονός, συμβάλλει στον νευροεκφυλισμό και την αξονική βλάβη στην ΚΠΣ (5).

Χαρακτηριστικό της ασθένειας αποτελεί η σταδιακή δυσλειτουργία τμημάτων του νευρικού συστήματος. Μερικώς απομυελινωμένοι άξονες δεν μπορούν να μεταδώσουν ταχείς ηλεκτρικούς παλμούς, εξηγώντας συμπτώματα που προκύπτουν και από φυσιολογική κόπωση. Το ηλεκτρικό σήμα μπορεί να διασχίσει τις κακώσεις αλλά με μειωμένη ταχύτητα, κάτι το οποίο επεξηγεί τη χαρακτηριστική καθυστέρηση των προκλητών δυναμικών. Μερικώς απομυελινωμένοι άξονες μπορούν να εκπολώνονται αυθόρμητα, παράγοντας δυσάρεστες παραμορφώσεις της αισθητικότητας. Αυξημένη μηχανική ευαισθησία οδηγεί σε συμπτώματα τα οποία προκαλούνται από την κίνηση, συμπεριλαμβανομένων λάμπσεων φωτός οι οποίες προκαλούνται από την κίνηση του ματιού και την ηλεκτρική αίσθηση που προκαλείται στη σπονδυλική στήλη, τα άκρα ή την κάμψη του αυχένα. Αυθόρμητες εκπολώσεις των νευρώνων του προσωπικού νεύρου στο στέλεχος του εγκεφάλου είναι υπεύθυνες για τη μυοκυμία, δηλαδή τον ακούσιο σπασμό του βλεφάρου του ματιού, η οποία αποτελεί σύμπτωμα της ασθένειας. Η αποτυχία της ηλεκτρικής ώσης να διαπεράσει μερικώς απομυελινομένες οδούς που σχετίζονται με την αύξηση της θερμοκρασίας, είναι ένας δείκτης μειωμένης χωρητικότητας, δηλαδή της ικανότητας ενός συστήματος να «συγκρατεί» φορτίο και να αποθηκεύει ηλεκτρική ενέργεια, που αντιπροσωπεύει την προσωρινή αύξηση της σοβαρότητας των προϋπαρχόντων συμπτωμάτων με την άσκηση ή ένα ζεστό μπάνιο. Η επαπτική μετάδοση μεταξύ γειτονικών και μερικώς απομυελωμένων αξόνων προκαλεί σύντομες, και συνήθως δυσάρεστες, παροξυσμικές κρίσεις που συχνά προκαλούνται από την αφή ή την κίνηση (3-5).

1.2 Προφλεγμονώδεις Κυτταρικοί πληθυσμοί

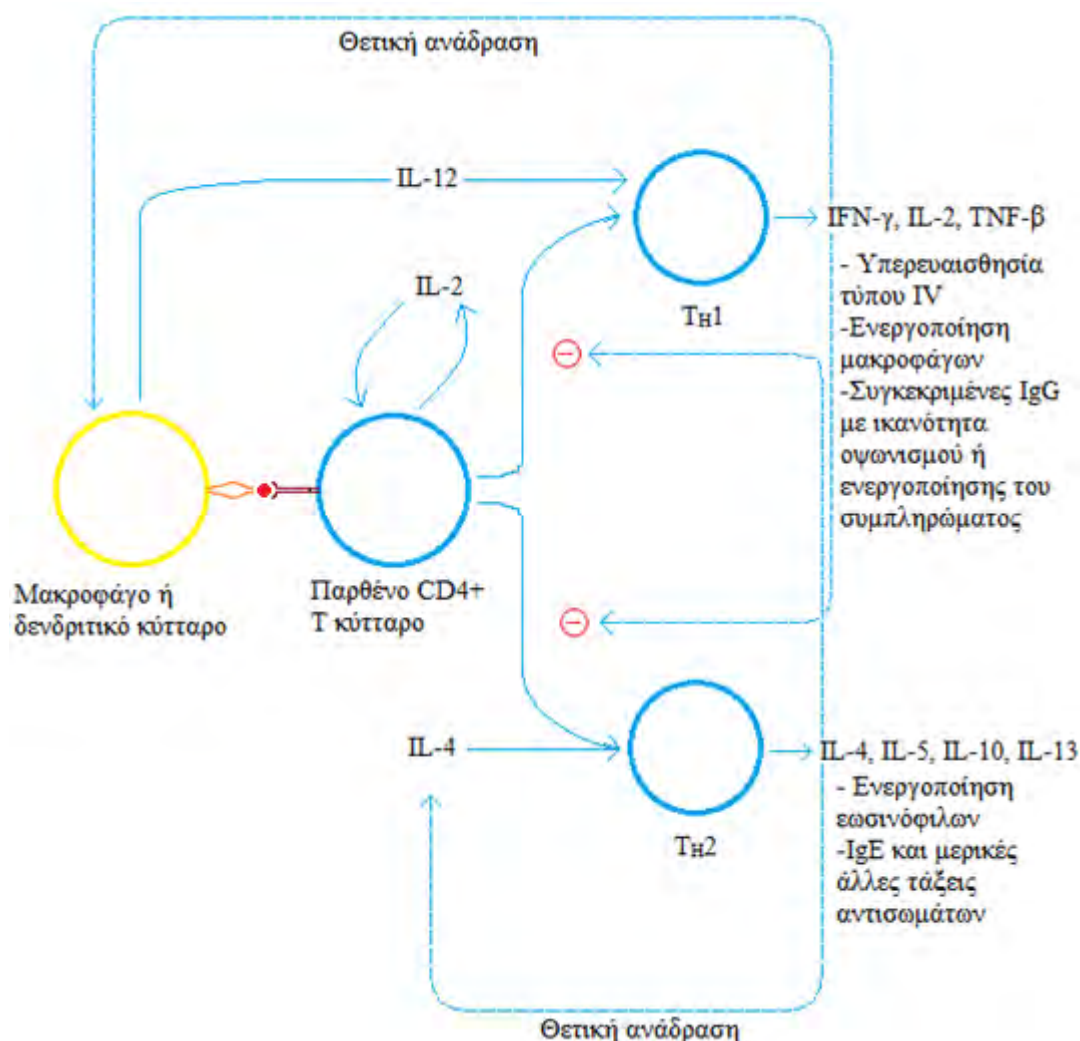
Ένα σημαντικό εύρημα στη βλάβη της ΚΠΣ είναι η διαταραχή του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού (BBB) και ως εκ τούτου μια βασική κατανόηση αυτού του φραγμού είναι απαραίτητη για την κατανόηση της παθογένειας της νόσου. Ο BBB είναι ένα λειτουργικό και ανατομικό φράγμα που διαχωρίζει το αίμα από τους νευρώνες στο ΚΝΣ. Αποτελείται από το αγγειακό τοίχωμα και την περιαγγειακή χώρα. Ο BBB έχει αρκετές σημαντικές λειτουργίες ζωτικής σημασίας για την καλή λειτουργία του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένης της διατήρησης των κατάλληλων ιοντικών συγκεντρώσεων μέσω δυναμικής ρύθμισης. Οι βλάβες εμφανίζονται όταν τα λευκοκύτταρα μεταναστεύουν στον εγκέφαλο και η φλεγμονή ακολουθεί (62).

Ο ρόλος των T κυττάρων θεωρήθηκε πάντοτε κεντρικός στην παθογένεση της ΚΠΣ, κυρίως λόγω του πειραματικού ζωικού μοντέλου πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας, ΕΑΕ, αλλά και λόγω της ισχυρής γενετικής συσχέτισης με γονίδια HLA τάξης II (63). Η ΕΑΕ είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο ζωικό μοντέλο για την ΚΠΣ και επάγεται με ανοσοποίηση ποντικών ή άλλων τρωκτικών με πεπτίδια μυελίνης ή με μεταφορά αυτοδραστικών για τη μυελίνη T λεμφοκυττάρων. Ως εκ τούτου, εγκαθιδρύεται μία ανοσιακή απόκριση στο ΚΝΣ των ζώων με αντιγονοειδική βλάβη μυελίνης και συμπτώματα παρόμοια με της ΚΠΣ. Η κυτταρική παθογένεση της ΚΠΣ είναι ωστόσο πιο περίπλοκη από αυτό. Για μεγάλο χρονικό διάστημα τα αυτοδραστικά CD4⁺ T κύτταρα που εκκρίνουν ιντερφερόνη-γάμμα (IFN-γ), θεωρήθηκαν ότι είναι οι κύριοι μεσολαβητές της φλεγμονής που προκαλούν τις βλάβες στην ΚΠΣ. Περαιτέρω έρευνα υποδεικνύει ότι πολλοί άλλοι τύποι κυττάρων καθώς και υποπληθυσμοί κυττάρων εμπλέκονται επίσης, με ρόλο κλειδί να θεωρείται ότι παίζουν τα T_H17 λεμφοκύτταρα. Τέλος, τα τελευταία χρόνια μεγάλος όγκος δεδομένων εστιάζει, επίσης, στη σημασία των B λεμφοκυττάρων στην πρόοδο της νόσου, μέσω της αντιγονοπαρουσίασης σε αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα, της δημιουργίας αυτοαντισωμάτων και της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών (3, 64-66).

1.2.1 T_H1

Η IFN-γ ανακαλύφθηκε αρχικά, με βάση την ικανότητά της να επάγει σε διάφορα κύτταρα την αναστολή της αναπαραγωγής μεγάλης ποικιλίας ιών. Πέραν της δράσης της αυτής, όμως, παίζει σημαντικό ρόλο στην υποστήριξη ή την αναστολή της ανάπτυξης υποπληθυσμών T_H κυττάρων, την ενεργοποίηση των μακροφάγων, τη διέγερση της ανάπτυξης των αντιμικροβιακών ικανοτήτων τους και την αύξηση των επιπέδων έκφρασης των μορίων MHC τάξης II. Βασική δράση της IFN-γ είναι η προαγωγή της διαφοροποίησης των T_H κυττάρων προς T_H1 και η αναστολή της επέκτασης του T_H2 πληθυσμού. Η δράση αυτή επιτελείται μέσω αλλαγών,

συμπεριλαμβανομένης της αύξησης της παραγωγής IL-12 από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα και της ενεργοποίησης του υποδοχέα της IL-12 στα T κύτταρα.



Εικόνα 6: Ανάπτυξη και διασταυρωτή ρύθμιση των υποπληθυσμών TH, υπό την επίδραση διαφορετικών κυτταροκινών. Τα παρθένα CD4+ T κύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί από αντιγόνο, παράγουν IL-2 και πολλαπλασιάζονται. Αν ο πολλαπλασιασμός συμβεί σε μικροπεριβάλλον όπου επικρατεί η IL-12, τότε παράγεται ένας υποπληθυσμός TH1, που διαθέτει ένα χαρακτηριστικό πρότυπο έκκρισης κυτταροκινών, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται η IFN-γ. Η IFN-γ που παράγεται από έναν αναπτυσσόμενο TH1 πληθυσμό, διεγείρει τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα να παράγουν περισσότερη IL-12 δημιουργώντας ένα βρόχο θετικής ανάδρασης. Αν στο μικροπεριβάλλον επικρατεί η IL-4, τότε παράγεται ένας υποπληθυσμός TH2. Οι κομβικές κυτταροκίνες, που παράγονται από κάθε υποπληθυσμό, ρυθμίζουν θετικά τον υποπληθυσμό που τις παράγει και αρνητικά τον αντίθετο υποπληθυσμό. Προσαρμοσμένο από (67)

Κατά την έναρξη μιας ανοσολογικής απόκρισης, παράγεται IFN-γ από διεγερμένα T κύτταρα, καθώς επίσης και από ενεργοποιημένα φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killer, NK cells). Η πηγή της IL-12, η οποία αποτελεί ένα μεσολαβητή της TH1 διαφοροποίησης, είναι τυπικά τα μακροφάγα ή τα δενδριτικά κύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί από εισβολή ενδοκυτταρικών βακτηρίων ή άλλων ενδοκυτταρικών παρασίτων ή βακτηριακών προϊόντων, όπως ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS). Η έκκριση IFN-γ από τα TH1 κύτταρα, επάγει επίσης τη μετάπτωση τάξης των αντισωμάτων IgG, γεγονός που επηρεάζει θετικά τις διαδικασίες της φαγοκυττάρωσης και της ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Οι TNF-β και IFN-γ είναι

κυτταροκίνες που μεσολαβούν στη δημιουργία φλεγμονής και η έκκρισή τους ευθύνεται για τη σύνδεση των T_H1 κυττάρων με φλεγμονώδεις αντιδράσεις, όπως η υπερευαισθησία τύπου IV. Τα T_H1 κύτταρα παράγουν IL-2 και IFN- γ , οι οποίες προάγουν τη διαφοροποίηση των CD8+ προγονικών κυττάρων σε πλήρως κυτταροτοξικά T_C κύτταρα. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω δεν αποτελεί μυστήριο ο λόγος για τον οποίο ο συγκεκριμένος υποπληθυσμός βοηθητικών T λεμφοκυττάρων σχετίζεται με την προαγωγή εκτεταμένης φλεγμονής και ιστικών βλαβών (68, 69).

1.2.2 T_H17

Τα κύτταρα T_H17 ταυτοποιήθηκαν το 2005 (44, 70, 71) και, όπως και για άλλες υποκατηγορίες CD4+ T κυττάρων, η ανάπτυξή τους ελέγχεται από ένα συνδυασμό κυτταροκινών, οι οποίες εκκινούν ένα πρόγραμμα έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων και επιγενετικό μετασχηματισμό (72). Στους ανθρώπους, οι κυτταροκίνες που καθοδηγούν την εξέλιξη των T_H17 περιλαμβάνουν τις IL-6, IL-21, IL-23 και IL-1 β με πιθανό συνεργιστικό ρόλο του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού βήτα (TGF- β), μέσω της ικανότητάς του να καταστέλλει την ανάπτυξη T_H1 πληθυσμών. Η ενεργοποίηση μέσω της δράσης κυτταροκινών του μονοπατιού signal transducer and activator of transcription (STAT) 3, είναι ένα απαραίτητο βήμα για τη διαφοροποίηση προς T_H17 (73) οδηγώντας τελικά στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα που καθορίζει τη γενεαλογία τους: τους συνδεδεμένους με τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος «ορφανούς» υποδοχείς C (RAR-related orphan receptor C), RORC (74). Αν και η οικογένεια κυτταροκινών IL-17 περιλαμβάνει έξι μέλη, τα T_H17 κύτταρα πιστεύεται ότι παράγουν μόνο IL-17A και IL-17F (75, 76).

Στα πλαίσια της αυτοανοσίας, και συγκεκριμένα της ΚΠΣ, τα T_H17 κύτταρα φαίνεται να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο συνεισφέροντας στην παθογένεση της ασθένειας. Για παράδειγμα, στον ορό και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών που πάσχουν από ΚΠΣ τα T_H17 κύτταρα εμφανίζονται σε αυξημένη συγκέντρωση σε σύγκριση με υγιή δείγματα (77). Μία πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι τα ανθρώπινα CD4+ T λεμφοκύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται προς έναν T_H17 φαινότυπο, διακρίνονται από μία μεγαλύτερη ικανότητα διείσδυσης του BBB και του παρεγχύματος του ΚΝΣ σε σύγκριση με διαφοροποιημένα T_H1 (78). Έχει δειχθεί ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα του BBB εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα πρωτεϊνών σφικτών συνδέσμων (tight junction proteins) μετά από επώαση με ανασυνδυασμένη IL-17, επιτρέποντας τη μετανάστευση CD4+ λεμφοκυττάρων καθώς και άλλων κυττάρων της φλεγμονής μέσα στο ΚΝΣ (76).

1.2.3 B λεμφοκύτταρα

Το πιο προφανές επιχείρημα για τη συσχέτιση των B λεμφοκυττάρων με την παθογένεση της ΚΠΣ είναι η ύπαρξη ανοσοσφαιρινών G1 στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό περίπου στο 95% των ασθενών. Παρόλο που ειδικά για τη μυελίνη αντισώματα έχουν ανιχνευθεί, η σχέση τους με την ασθένεια δεν είναι εξακριβωμένη, κατά παρόμοιο τρόπο με το ρόλο των αντιγόνων. Στις βλάβες του ΚΝΣ υπήρξαν ευρήματα τόσο ανοσοσφαιρινών όσο και συμπληρώματος που μπορεί να υποδηλώνουν παθογόνο ρόλο. Επιπρόσθετα, B λεμφικά θυλάκια, T λεμφοκύτταρα και APCs έχουν ανιχνευθεί στις μήνιγγες ασθενών σε μεταγενέστερα στάδια της νόσου (SPMS αλλά όχι σε PPMS) (79). Τα B κύτταρα μπορούν να συνεισφέρουν στην παθολογία της ασθένειας μέσω της αντιγονο-παρουσίασης των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων ή της παραγωγής ανοσοσφαιρινών από πλασματοκύτταρα, αν και η δραστηριότητα αυτή των B λεμφοκυττάρων μπορεί να αντιπροσωπεύει μια απόκριση στην αυτοάνοση αντίδραση, παρά έναν πρωτογενή επαγωγή της (66, 80).

1.2.4 NK κύτταρα

Τα κύτταρα φυσικοί φονιάδες (NK) είναι μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα που έχουν την ικανότητα να λύουν αυθόρμητα κύτταρα στόχους χωρίς προηγούμενη ευαισθητοποίηση. Έχουν, επίσης, ανοσορυθμιστικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της έκκρισης κυτταροκινών, χημειοκινών και επαφής κυττάρου με κύτταρο (cell to cell contact). Λειτουργικά, αυτά τα κύτταρα είναι σημαντικά σε ανοσοαποκρίσεις σε ιογενείς λοιμώξεις, καθώς επίσης και στον έλεγχο των όγκων (81). Οι δραστηριότητες αυτών των κυττάρων ρυθμίζονται από ενεργοποιητικούς και ανασταλτικούς υποδοχείς, οι οποίοι με ενδοκυτταρική ενσωμάτωση προκλήσεων και αναστολών καθορίζουν την πορεία δράσης των κυττάρων αυτών. Τα κύτταρα NK αναγνωρίζουν και ενεργοποιούνται από κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση κινδύνου, ανιχνεύοντας σε αυτά συνδέτες επαγόμενους από στρες μέσω φυσικών υποδοχέων κυτταροτοξικότητας, καθώς και ο τύπου C υποδοχέας της λεκτίνης NKG2D, μεταξύ άλλων (82). Σε υγιή κύτταρα εν τούτοις, οι ενεργοποιητικοί παράγοντες διατηρούνται σε ισορροπία από ανασταλτικά σήματα. Τα κύτταρα NK εκφράζουν πολυάριθμους υποδοχείς που αναστέλλουν την ενεργοποίηση, συμπεριλαμβανομένης της οικογένειας υποδοχέων KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptor), οι οποίοι αλληλεπιδρούν με μόρια HLA. Ελλείψει αυτών των προσδετών, τα κύτταρα NK ενεργοποιούνται και κατά συνέπεια σκοτώνουν τα κύτταρα στόχους (83). Στο ανθρώπινο αίμα, τα κύτταρα NK αποτελούν περίπου το 2% έως 18% των συνολικών κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων και μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τις κυτταροκίνες που εκφράζουν. Κατά έναν αντίστοιχο τρόπο με τους υπότυπους TH1/TH2 των T λεμφοκυττάρων, τα

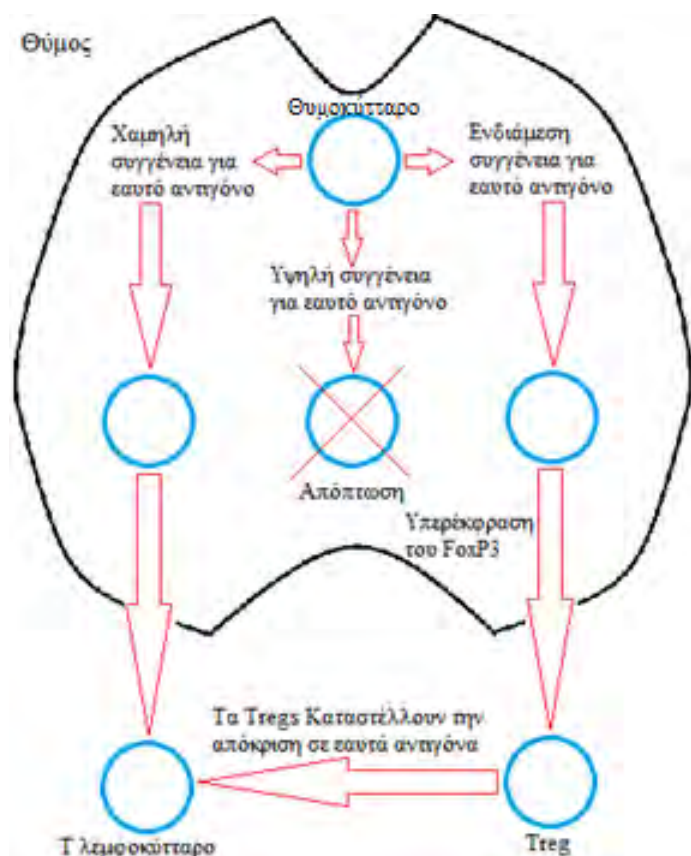
κύτταρα NK χωρίζονται σε NK1, τα οποία εκφράζουν IFN- γ , και σε NK2, τα οποία εκφράζουν IL-5 και IL-13 (66, 84).

Ο ρόλος των NK κυττάρων στις αυτοάνοσες νόσους διερευνάται και συζητείται έντονα καθώς έχουν παρατηρηθεί τόσο θετικές όσο και αρνητικές συσχετίσεις (84). Στο μοντέλο EAE, η εξάντληση των NK κυττάρων οδήγησε σε σοβαρή υποτροπιάζουσα EAE και πιο έντονη παθολογία του ΚΝΣ (84). Αυτό υποδηλώνει προστατευτικές ιδιότητες για τα κύτταρα NK, δεδομένου ότι η εξάντληση συσχετίστηκε με αυξημένη αυτοδραστικότητα των CD4 + T κυττάρων και ως εκ τούτου, μπορεί να σχετίζεται με τον άμεσο θάνατο των κυττάρων αυτών (82). Επίσης στην EAE, τα ποντίκια που είχαν έλλειψη στον υποδοχέα χημειοκίνης CX3CR1 είχαν πιο σοβαρές εκδηλώσεις της νόσου. Αυτός ο υποδοχέας είναι απαραίτητος για την πρόσληψη των κυττάρων NK στο ΚΝΣ, παρέχοντας στοιχεία που δείχνουν ότι η διείσδυση των κυττάρων αυτών στο ΚΝΣ αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό γεγονός στη βελτίωση των συμπτωμάτων και τον έλεγχο της νόσου (85). Στους ίδιους ποντικούς παρατηρήθηκαν αυξημένες αποκρίσεις από TH17 κύτταρα τοπικά στο ΚΝΣ, υποδηλώνοντας έναν πιθανό ρόλο για τα κύτταρα NK στην ανακοπή αυτών των κυττάρων (86). Σε αντίθεση με αυτά τα αποτελέσματα, διαπιστώθηκε ότι η εξάντληση των NK κυττάρων στην επαγόμενη από MOG EAE στην πραγματικότητα βελτίωσε την ασθένεια (87). Επιπροσθέτως, μετά από διέγερση κυττάρων NK και παραγωγή IFN- γ , αυτά τα κύτταρα μπορεί επίσης να προκαλέσουν φλεγμονή εν μέρει με διέγερση απόκρισης κυττάρων TH1 (88). Αυτά τα ευρήματα αντιπροσωπεύουν επιζήμιες επιδράσεις των κυττάρων NK που προκαλούν φλεγμονώδεις βλάβες και επιδεινώνουν την φλεγμονώδη απόκριση. Μεγάλο μέρος της σύγχυσης σχετικά με τα αντικρουόμενα συμπεράσματα μπορεί να αποδοθεί στην αδυναμία αναγνώρισης διαφορετικών επιδράσεων από διαφορετικά υποσύνολα, γεγονός που θα πρέπει να ενθαρρύνει την περαιτέρω διερεύνηση αυτού του πεδίου (66, 84).

1.3 Ρυθμιστικοί κυτταρικοί πληθυσμοί

Από τα προηγούμενα συμπεραίνουμε ότι η φλεγμονώδης αντίδραση των T, B και άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, είναι αυτή που οδηγεί σε απομυελινωμένες αλλοιώσεις σε ολόκληρο το ΚΝΣ (89). Είναι ενδιαφέρον, όμως, ότι υγιή άτομα διαθέτουν επίσης αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα σε χαμηλότερα ποσοστά, ένα εύρημα που σημαίνει ότι η παρουσία τους δεν είναι αναγκαία και ικανή συνθήκη για την επαγωγή της νόσου (90). Είναι γνωστό ότι τα υγιή άτομα βασίζονται σε ρυθμιστικούς μηχανισμούς που διατηρούν αυτά τα αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα υπό έλεγχο. Πιστεύεται ότι η ασθένεια εμφανίζεται όταν αυτά τα φλεγμονώδη κύτταρα και άλλοι τύποι κυττάρων απορυθμίζονται και λαμβάνει χώρα μια μετάβαση από τη φυσιολογική επιτήρηση σε μια παθολογική ανοσοαπόκριση. Νέα δεδομένα δείχνουν ότι τόσο τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Tregs) όσο και τα B ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Bregs) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία.

1.3.1 Tregs



Εικόνα 7: Δημιουργία των nTregs στο θύμο [Προσαρμοσμένο από: (96)]

Τα Tregs ταυτοποιήθηκαν αρχικά από τους Sakaguchi et al το 1995 ως ένα υποσύνολο των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων που εξέφραζε το σύμπλεγμα διαφοροποίησης CD25 και το οποίο είχε ανοσοκατασταλτική δραστηριότητα (91). Αργότερα, αποδείχθηκε ότι αυτά τα κύτταρα εκφράζουν κυτταροτοξικό T-λεμφοκυτταρικό αντιγόνο-4 (CTLA-4) (92) καθώς και υψηλά επίπεδα CD5 (93). Εν συνεχεία, η ανακάλυψη του FoxP3 (forkhead box P3), ως ενός θεμελιώδη μεταγραφικού παράγοντα για την ανάπτυξη των ρυθμιστικών CD4⁺CD25⁺ T λεμφοκυττάρων στο θύμο, έχει βοηθήσει τους ερευνητές στην ακριβή ταυτοποίηση του φαινοτύπου των περισσότερων Tregs (94). Επί του

παρόντος, τα Tregs μπορούν να αναγνωριστούν με ακρίβεια ως κύτταρα CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ή (εφόσον ο FoxP3 έχει μία αρνητική συσχέτιση με την έκφραση του επιφανειακού CD127)

CD4+CD25+CD127^{lo/-} T λεμφοκύτταρα (95). Ειδικοί πληθυσμοί Tregs μπορούν επίσης να εκφράζουν άλλους επιφανειακούς δείκτες όπως CD39, LAG-3 και GITR (96, 97).

Φυσικά και επαγόμενα Tregs

Τα Tregs μπορούν να υποδιαιρεθούν σε θύμο-αναπτυσσόμενα «φυσικά» Tregs και στα «επαγόμενα» Tregs. Τα φυσικά Tregs (nTregs) δημιουργούνται από θυμοκύτταρα κατά τη διάρκεια της αρνητικής επιλογής στο θύμο. Θυμοκύτταρα με υψηλή συγγένεια για αυτοαντιγόνα εξαλείφονται σε αυτό το στάδιο. Θυμοκύτταρα με χαμηλή συγγένεια, επιλέγονται θετικά και ελευθερώνονται στην κυκλοφορία. Τα θυμοκύτταρα με ενδιάμεση συγγένεια για τα αντιγόνα του θύμου εκφράζουν το FoxP3 και μετατρέπονται σε Tregs (Εικόνα 7). Τα nTregs μπορούν επίσης να ταξινομηθούν σε CD45RA⁺ «άωρα» Tregs και CD45RO⁺ Tregs «μνήμης». Τα επαγώγιμα Tregs «iTregs» παράγονται από άωρα T λεμφοκύτταρα ποντικού παρουσία TGF-β ή ρετινοϊκού οξέος (98). Παρά τις φαινοτυπικές και λειτουργικές αλληλεπικαλύψεις με τα φυσικά Tregs, τα iTregs επιδεικνύουν εμφανείς διαφορές στη σταθερότητα και την έκφραση γονιδίων (99). Τέλος, υπάρχει ένας υπότυπος iTreg, CD4+Foxp3⁻, ο οποίος ορίζεται ως ρυθμιστικό T κυττάρου τύπου 1 (Tr1) το οποίο επάγεται από τη χρόνια αντιγονική ενεργοποίηση CD4⁺ T κυττάρων παρουσία της IL-10.

Λειτουργία

Η κυριότερη λειτουργία των Tregs είναι η ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και ο έλεγχος του αριθμού και της λειτουργίας των κυττάρων τελεστών. Έτσι, παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταστολή των ανεπιθύμητων αυτο-αντιδραστικών ανοσοαποκρίσεων, όπως στην περίπτωση της αυτοανοσίας. Είναι ενδιαφέρον ότι έχει αναφερθεί ότι τα Tregs μπορούν να ρυθμίζουν τόσο το προσαρμοστικό όσο και το έμφυτο τμήμα του ανοσοποιητικού συστήματος και, μόλις ενεργοποιηθούν, ρυθμίζουν ειδικά τις ανοσολογικές αποκρίσεις σε πολλαπλά επίπεδα και με διάφορους μηχανισμούς. Αυτοί οι κατασταλτικοί μηχανισμοί μπορούν να οργανωθούν σε μεγάλες ομάδες, συμπεριλαμβανομένης της καταστολής που εξαρτάται από την επαφή κυττάρου-κυττάρου, της παραγωγής κατασταλτικών κυτταροκινών (όπως η IL-10 και το TGF-β), της διαμόρφωσης της λειτουργίας των APCs, της κυτταρόλυσης, της μεταβολικής διαταραχής και της επαγωγής κατασταλτικών κυττάρων (99). Η ανασταλτική κυτταροκίνη IL-35 επίσης συμβάλλει στη λειτουργία των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων (100).

Tregs και ΚΠΣ

Ο ρόλος των Tregs στην ΚΠΣ, αρχικά ερευνήθηκε στην ΕΑΕ, όπου διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ Tregs ειδικών προς κάποιο αντιγόνο και της ανθεκτικότητας έναντι της ασθένειας (101).

Παρομοίως, η μεταφορά Tregs σε ποντίκια στα οποία είχε επαχθεί ΕΑΕ, ελάττωσε τη βαρύτητα της ασθένειας (102). Επίσης, η εξάντληση των CD25⁺ T λεμφοκυττάρων μείωσε το φορτίο αντιγόνου που απαιτείται για την επαγωγή της ΕΑΕ και παρεμπόδισε την αποκατάσταση από την ασθένεια (103). Επιπλέον, τα Tregs εμπλέκονται στη ρύθμιση της μετανάστευσης των κυττάρων διά μέσου του BBB (104).

Ομοίως, τα Tregs εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της ΚΠΣ στον άνθρωπο. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο αριθμός των Tregs είναι αναλλοίωτος σε ασθενείς με ΚΠΣ (105) αλλά η λειτουργία τους είναι ανεπαρκής σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (106). Είναι ενδιαφέρον ότι αυτή η λειτουργική βλάβη είναι πιο σημαντική στην RRMS από ότι στην SPMS (107). Η ανάλυση της εξαγωγικής δραστηριότητας στον θύμο αποκάλυψε την εξασθενημένη απελευθέρωση νεοσυσταθέντων T κυττάρων στην περιφέρεια των ασθενών με ΚΠΣ προκαλώντας έτσι μία ανισορροπία των κυκλοφορούντων Tregs (108). Αυτή η λειτουργική εξασθένηση του θύμου αντισταθμίζεται από μία περιφερική μεταθυμική επέκταση, δημιουργώντας μια μετατόπιση από άωρα Tregs σε Tregs μνήμης στην περιφέρεια των νοσούντων. Οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι είναι αυτή η μετατόπιση που συνιστά στη μειωμένη κατασταλτική λειτουργία των κυττάρων στην ΚΠΣ.

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός για τη λειτουργική ανεπάρκεια των Tregs φαίνεται να είναι οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η IL-12, οι οποίες φαίνεται να υπερεκφράζονται σε ασθενείς με ΚΠΣ (109). Η IL-12 έχει την ικανότητα να αλλάζει τον φαινότυπο και τη λειτουργία των Tregs προκαλώντας την παραγωγή IFN-γ. Τα Tregs που παράγουν IFN-γ παρουσιάζουν μείωση στην κατασταλτική δραστηριότητά τους *in vitro*. Αυτό αποδείχθηκε μέσω του αποκλεισμού της IFN-γ, το οποίο ενίσχυσε σημαντικά την ικανότητά τους χωρίς να επηρεάζει τα υγιά, Tregs ελέγχου (110).

Εκτός από τα FoxP3⁺ Tregs, ο ρόλος των κυττάρων Tr1 στην ΚΠΣ φαίνεται να είναι εξίσου σημαντικός. Στην ΚΠΣ, τα κύτταρα Tr1 μειώθηκαν σε ενεργοποιημένα με CD46 T κύτταρα (111), τα οποία είναι γνωστό ότι αποκτούν έναν φαινότυπο Tr1 (112). Περαιτέρω, η παραγωγή της IL-10 από ενεργοποιημένα με CD46 T κύτταρα ήταν σχεδόν μηδαμινή ενώ η παραγωγή της IFN-γ δεν επηρεάστηκε. Ως εκ τούτου, μπορεί να συναχθεί από τα παραπάνω ευρήματα ότι η ΚΠΣ συσχετίζεται με πολλαπλά ελλείμματα σε ρυθμιστικούς πληθυσμούς T κυττάρων (111).

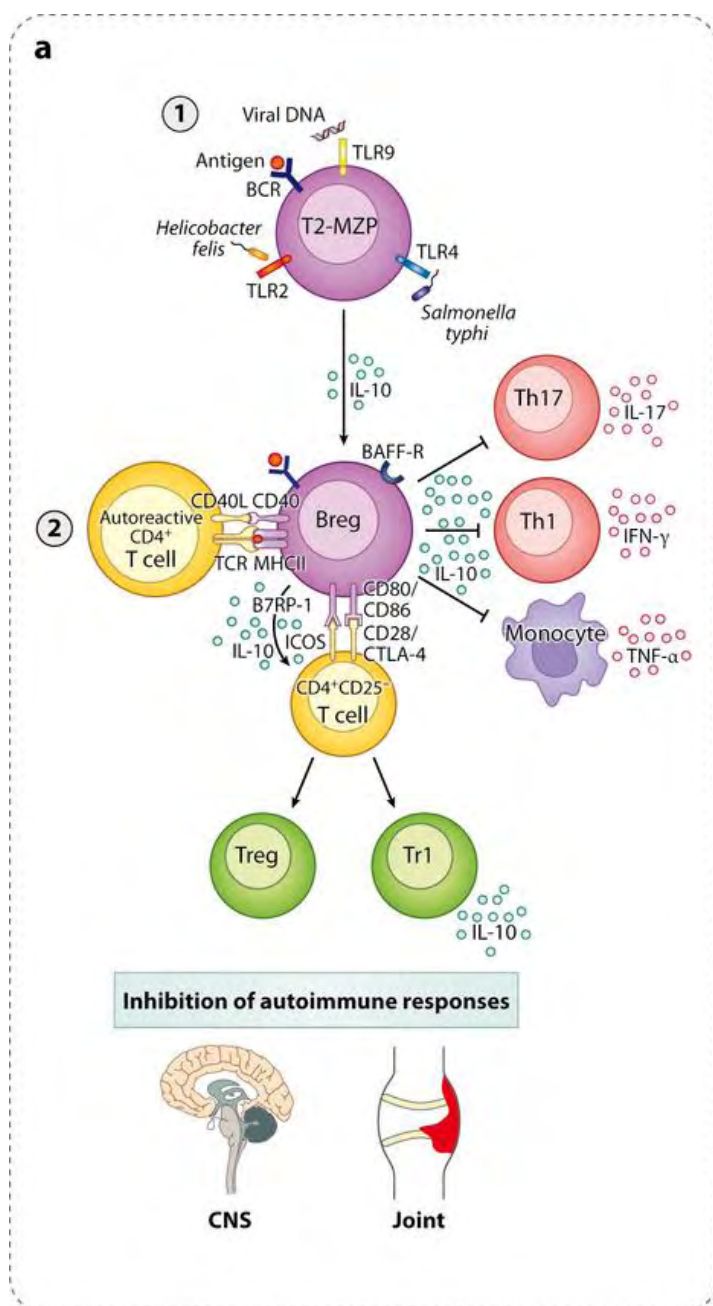
1.3.2 Bregs

Τα Bregs είναι ένα υποσύνολο των B-λεμφοκυττάρων που εμφανίζουν κατασταλτικές λειτουργίες έναντι προ-φλεγμονωδών και αυτοαντιδραστικών ανοσοαποκρίσεων. Εκφράζουν κυρίως την IL-10, μια ρυθμιστική κυτταροκίνη που περιορίζει τη φλεγμονή. Από την άλλη

πλευρά, ένα υπερβολικά κατασταλμένο ανοσοποιητικό σύστημα είναι ευάλωτο σε λοίμωξη ή καρκινογένεση, έτσι μία ισορροπία τόσο στον αριθμό όσο και στη λειτουργία των Bregs είναι απαραίτητη (113-115).

Φαινότυπος

Παρά τις εκτεταμένες έρευνες πάνω στα Bregs οι οποίες διενεργούνται τα τελευταία χρόνια, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει ομοφωνία πάνω σε έναν συγκεκριμένο φαινότυπο που να χαρακτηρίζει τα κύτταρα αυτά. Παρόλο που υπάρχουν ορισμένα προσδιορισίμα υποσύνολα



Εικόνα 8: Διαφοροποίηση και λειτουργία των B ρυθμιστικών κυττάρων στην καταστολή αυτοάνοσων αντιδράσεων. Τροποποίηση από (1).

Bregs, δεν είναι ακόμη γνωστό αν αναπτύσσονται από μια ξεχωριστή κυτταρική σειρά, κατά ένα παρόμοιο τρόπο με τα Tregs τα οποία προέρχονται από το θύμο, ή προκαλούνται από ανοσολογικές διεγέρσεις. Επιπλέον, δεν έχει προσδιοριστεί κάποιος ειδικός μεταγραφικός παράγοντας για τα Breg, όπως ο FoxP3 για τα Tregs. Παρόλο που έχει τεκμηριωθεί η έκφραση του Foxp3 από ορισμένα Bregs, εξακολουθεί να εγείρεται το ερώτημα εάν η ειδική έκφραση του FoxP3 από τα κύτταρα αυτά διευκολύνει την απόκτηση κατασταλτικής ικανότητας. Λόγω της έλλειψης μοριακών δεικτών, τα Bregs συνήθως αναγνωρίζονται από την ικανότητά τους να εκφράζουν IL-10 και αυτά ονομάζονται κύτταρα B10. Στους ανθρώπους, φαίνεται ότι τόσο τα «transitional» CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} (116), όσο και τα Bregs «μνήμης» CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ (117) παράγουν IL-10 (118). Έχουν επίσης περιγραφεί IL-10 ανεξάρτητοι πληθυσμοί Bregs

που παράγουν την IL-35 και τον TGFβ.

Λειτουργία

Τα Bregs διαφοροποιούνται όταν ένα κοινό προγονικό κύτταρο παράγει IL-10 μετά από διέγερση μέσω Toll-like Receptor (TLR). Τα Bregs ενεργοποιούνται περαιτέρω και απελευθερώνουν μία βέλτιστη ποσότητα IL-10 σε απόκριση σε T κύτταρα. Αυτό το βήμα απαιτεί, επίσης, αντιγονική αναγνώριση. Τα Bregs είναι γνωστό ότι καταστέλλουν την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών από δενδριτικά κύτταρα, κάτι που οδηγεί στην καταστολή των T_H1 και T_H17 αποκρίσεων (119). Επιπρόσθετα, η IL-10 που απελευθερώνεται από τα Bregs είναι ζωτικής σημασίας για τη διαφοροποίηση των Foxp3⁺ Tregs και των Tr1, με αποτέλεσμα την ανοσολογική ρύθμιση στο σημείο της φλεγμονής, το οποίο μπορεί να είναι, για παράδειγμα, σε μια άρθρωση ή στο ΚΝΣ (Εικόνα 8). Εκτός από την παραγωγή της IL-10, τα Bregs παράγουν και άλλους αντιφλεγμονώδεις μεσολαβητές και κυτταροκίνες, όπως ο TGF-β ο οποίος, όπως αναφέρθηκε πρωτότερα, μπορεί επίσης να επάγει ένα Treg φαινότυπο. Πράγματι, έρευνες έχουν δείξει ότι τα Bregs υποστηρίζουν τα Tregs τόσο στα ποντίκια (120) όσο και στους ανθρώπους (116). Επίσης, μέσω της έκφρασης του TGF-β, B κύτταρα ενεργοποιημένα από λιποπολυσακχαρίτη (LPS) μπορούν να επάγουν την απόπτωση CD4⁺ κυττάρων (121), καθώς και την ανέργεια σε CD8⁺ κύτταρα τελεστές (122).

B10

Τα B10 αποτελούν ένα υποσύνολο των Bregs του οποίου η ρυθμιστική λειτουργία αποδίδεται εξ ολοκλήρου στην παραγωγή IL-10. Επιπλέον, αυτή η κατασταλτική λειτουργία φαίνεται να είναι αντιγόνο-ειδική, πιθανότατα λόγω της αντιγόνο-ειδικής σηματοδότησης του υποδοχέα του B κυττάρου (BCR) (123, 124). Αυτή η ειδικότητα του BCR εξηγεί και την ταχεία απόκριση των B10 στα αντιγόνα, εαυτά ή ξένα, καθιστώντας τα ικανά να καταστέλλουν ανεπιθύμητες υπερβολικές ανοσοαποκρίσεις (115).

Bregs ανεξάρτητα της IL-10

Ένας νέος πληθυσμός CD138⁺IL-35⁺ Breg (i35 Breg) έχει χαρακτηριστεί πρόσφατα, ο οποίος παράγει IL-35, εκτός από την IL-10. Μέσω της έκφρασης της IL-35, αυτά τα κύτταρα ρυθμίζουν τη φλεγμονή στο ΚΝΣ. Η IL-35 έχει τη δυνατότητα να μετασχηματίζει συμβατικά B-λεμφοκύτταρα ή κύτταρα B10 σε i35-Bregs (125). Επιπλέον, πιστεύεται ότι τα Bregs που εκφράζουν τον TGF-β παίζουν ρόλο στην καταστολή των αλλεργικών αντιδράσεων. Έρευνες δείχνουν ότι έχουν τη δυνατότητα να προάγουν τη διαφοροποίηση σε Treg αυξάνοντας την παραγωγή του FoxP3 στα T λεμφοκύτταρα καθώς και να ρυθμίζουν την επαγόμενη από

τροφικές αλλεργίες φλεγμονή σε ποντίκια. Επιπρόσθετα, CD35+ B λεμφοκύτταρα που εκκρίνουν θρομβοσπονδίνη 1 προκάλεσαν έναν Treg φαινότυπο μέσω του TGF-β, αλλά όχι της IL-10 και κατέστειλαν συνδιεγερτική μοριακή έκφραση στα δένδριτικά κύτταρα. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι το μόριο προγραμματισμένου θανάτου-1 (programmed death, PD-L1) παίζει ρόλο στη λειτουργία των Bregs, καθώς τα PD-L1Hi B λεμφοκύτταρα ρυθμίζουν αρνητικά την T λεμφοκυτταρική διαφοροποίηση (126, 127).

Bregs που παράγουν BTLA

Ο B και T λεμφοκυτταρικός εξασθενητής (B and T lymphocyte attenuator, BTLA ή CD272), είναι μια ανοσοσφαιρίνη η οποία, όπως και ο PD-1, εμπλέκεται στην καταστολή των ανοσοαποκρίσεων. Το BTLA εκφράζεται σε ένα ευρύ φάσμα κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος συμπεριλαμβανομένων T και B λεμφοκυττάρων, NKT κυττάρων, NK κυττάρων, μακροφάγων, δένδριτικών κυττάρων (128) και θυλακιωδών βοηθητικών T λεμφοκυττάρων (129).

Bregs και ΚΠΣ

Τα B κύτταρα μπορούν να παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ΕΑΕ, καθώς τα ποντίκια με γενετικά ελλειμματικά B κύτταρα δεν μπορούν να αναρρώσουν από τη νόσο, ενώ η μεταφορά B λεμφοκυττάρων που παράγουν IL-10 καταστέλλει τα συμπτώματα της ΕΑΕ (123, 124). Επιπλέον, PD-L1Hi Bregs που μεταφέρθηκαν σε προσβεβλημένα ζώα κατέστειλαν την ασθένεια. Συνολικά, τα Bregs, σε αντίθεση με τα B κύτταρα τελεστές, προστατεύουν από την ανάπτυξη της ΕΑΕ, καταστέλλοντας προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και τη μετανάστευση των ενεργοποιημένων κυττάρων στο ΚΝΣ (113, 130, 131).

Δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με τον αριθμό των Breg σε αυτοάνοσα νοσήματα. Σε ορισμένες ασθένειες ή σε συγκεκριμένες νοσηρές καταστάσεις, τα Bregs μειώνονται (132), ενώ σε άλλες αυξάνονται (117). Στην ΚΠΣ ειδικότερα, τα Bregs έχουν αναφερθεί να μειώνονται αριθμητικά (133), να παραμένουν αναλλοίωτα (134) ή να αυξάνονται. Ανεξαρτήτως αυτού, η λειτουργία των Bregs επηρεάζεται στους ασθενείς με ΚΠΣ, καθώς η παραγωγή της IL-10 από τα B κύτταρα μειώνεται (135). Επιπλέον, μειώνεται η αναλογία των άωρων Bregs κατά τη διάρκεια υποτροπών, με αποτέλεσμα αυξημένη αναλογία μνημικών / άωρων B ρυθμιστικών κυττάρων (133). Εάν αυτή η παρατηρούμενη μείωση είναι το αίτιο ή το αποτέλεσμα της υποτροπής της νόσου παραμένει ακόμα προς συζήτηση.

Ένας νέος τύπος κυττάρων Bregs, CD19+CD25+, περιγράφηκε πρόσφατα τόσο σε υγιή άτομα όσο και σε ασθενείς με ΚΠΣ. Αυτός ο νέος υπότυπος φαίνεται να είναι αριθμητικά αυξημένος

στους ασθενείς σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, αλλά και σε υποτροπές σε σύγκριση με τις υφέσεις της νόσου (130). Είναι προφανές ότι απαιτείται περισσότερη έρευνα για να διαφωτιστεί πλήρως ο ρόλος των διαφορετικών υποπληθυσμών των Bregs στην ΚΠΣ.

1.4 Ανοσορυθμιστικές ιδιότητες θεραπευτικών αγωγών για την ΚΠΣ

Οι πρώτες θεραπευτικές αγωγές που ήταν χρονολογικά διαθέσιμες για την ΚΠΣ ήταν η ιντερφερόνη-β (IFN-β) και η οξική γλατιραμέρη (136). Η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA) έχει σήμερα δώσει άδεια σε αρκετές ανοσοτροποποιητικές θεραπείες (disease-modifying therapies, DMTs) για την αντιμετώπιση της νόσου, οι περισσότερες από τις οποίες χρησιμοποιούνται και για την θεραπεία άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων. Ορισμένα από τα φάρμακα είναι βιολογικές θεραπείες δηλαδή εγχύσιμα μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία καταστρέφουν τα Τ ή τα Β λεμφοκύτταρα ή άλλα που έχουν και ανοσορυθμιστικές λειτουργίες (137). Οι σχετικά πρόσφατες κλινικές δοκιμές που εξετάζουν την απομάκρυνση των περιφερικών Β κυττάρων με τη μεσολάβηση αντι-CD20 μονοκλωνικού αντισώματος, έδειξαν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα έναντι της ανάπτυξης νέων αλλοιώσεων του ΚΝΣ και της εμφάνισης υποτροπών. Παρά τα θετικά αυτά αποτελέσματα, δεν υπάρχει ακόμα ίαση για την ΚΠΣ και το θεραπευτικό όφελος περιορίζεται στη διαχείριση της εξέλιξης και των συμπτωμάτων της νόσου. Εκτός από ανεπαρκείς, οι τρέχουσες θεραπείες είναι επίσης δαπανηρές, με συνολικό ετήσιο κόστος 14,6 δις ευρώ για την ΚΠΣ μόνο στην Ευρώπη για το 2010 (138).

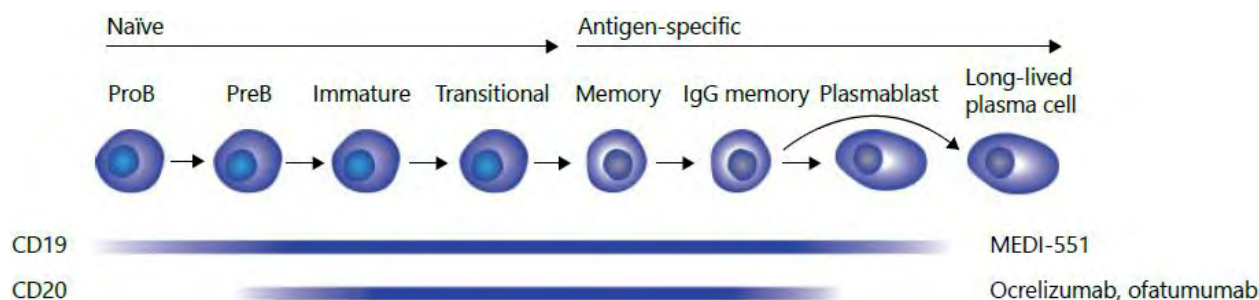
1.4.1 Μονοκλωνικά αντισώματα

Τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικά μέσα σε διάφορους κλάδους της ιατρικής, όπως η ογκολογία, η ρευματολογία, η γαστρεντερολογία, η δερματολογία και η πρόληψη της απόρριψης μοσχεύματος. Από την εισαγωγή του αντι-άλφα4-ιντεγκρίνης mAb natalizumab το 2004, τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν αποκτήσει ενδιαφέρον στη θεραπεία της ΚΠΣ. Προς το παρόν, πολυάριθμα mAbs έχουν δοκιμαστεί σε κλινικές δοκιμές σε υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα ΚΠΣ καθώς και σε προοδευτικές μορφές της νόσου.

Αντι-CD20

Οι θεραπείες που καταστρέφουν τα Β κύτταρα στην ΚΠΣ επικεντρώνονται σε δύο κύριους στόχους, τα CD20 και CD19. Τα μονοκλωνικά αντι-CD20 περιλαμβάνουν τα rituximab, ocrelizumab και ofatumumab, τα οποία διαφέρουν στην αναγνώριση του επιτόπου CD20 και στην ένταση της δράσης τους. Το CD20 εκφράζεται επί των περισσότερων Β λεμφοκυττάρων, από PreB έως IgG B κύτταρα μνήμης, ενώ συνήθως δεν εκφράζονται στους πλασμαβλάστες και τα κύτταρα ProB (εικόνα 9). Όλες οι θεραπείες αντι-CD20 προκαλούν σχεδόν πλήρη εξάλειψη όλων των υποτύπων Β λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα (139). Η ανασύσταση του

πληθυσμού των B κυττάρων ξεκινά αρκετούς μήνες μετά τη θεραπεία και φαίνεται να τείνει προς έναν πιο άωρο και ρυθμιστικό φαινότυπο (140). Η εξάντληση των B κυττάρων καταστέλλει επίσης τις αποκρίσεις TH1 και TH17 και αυξάνει τα κυκλοφορούντα Tregs. Γενικά, αυτή η θεραπεία έδειξε ότι βελτιώνει τα συμπτώματα καθώς και τη δραστηριότητα της ασθένειας ενώ ταυτόχρονα μειώνει το ρυθμό υποτροπής, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης των βλαβών σε μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου (141-143).



Εικόνα 9: Ανάπτυξη B-κυττάρων και έκφραση επιφανειακών δεικτών που στοχεύουν οι αναδυόμενες θεραπείες για την ΚΠΣ. Τροποποίηση από (143).

Αντι-CD19

Η μονοκλωνική θεραπεία με αντι-CD19 mAb φαίνεται επίσης ελπιδοφόρα. Το αντίσωμα IgG1 αντι-CD19 (MEDI-551) (144) εισήλθε πριν μερικά χρόνια στη φάσης II των κλινικών δοκιμών της ΚΠΣ. Το CD19 εκφράζεται σε όλα τα B κύτταρα και χάνεται προοδευτικά σε τελικά διαφοροποιημένα πλασματοκύτταρα (145)(εικόνα 9). Ως αποτέλεσμα, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι το MEDI-551 προκάλεσε μια πιο μακροσκελή εξάλειψη των B λεμφοκυττάρων σε σύγκριση με το rituximab, ενώ επίσης μείωσε τα επίπεδα της ανοσοσφαιρίνης στον ορό, συμπεριλαμβανομένων και των αυτο-αντισωμάτων (143). Η θεραπεία με αντι-CD 19 σε ποντίκια στα οποία έχει επαχθεί EAE καταστέλλει τη σοβαρότητα και τη διάρκεια της νόσου και αυξάνει τα κυκλοφορούντα Bregs και Tregs (146). Ως εκ τούτου, το MEDI-551 αναμένεται να έχει παρόμοια αποτελέσματα με τη θεραπεία με αντι-CD20 σε ασθενείς με ΚΠΣ και θα μπορούσε να εγκριθεί για τη θεραπεία της ασθένειας στο μέλλον.

Alemtuzumab

Το Alemtuzumab είναι ένα εξανθρωπισμένο IgG1 αντι-CD52 μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο καταστρέφει τα περισσότερα T και B λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, δένδριτικά κύτταρα και κοκκιοκύτταρα. Έχει εγκριθεί ως θεραπευτικό μέσο για RRMS ασθενείς σε περισσότερες από 30 χώρες. Μεγάλο μέρος της έρευνας σχετικά με το alemtuzumab εστιάζει στον εμπλουτισμό των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών και έχει δείξει ότι υπήρχε μία μετατόπιση προς ένα φαινότυπο T κυττάρων μνήμης (147). Μια πρόσφατη μελέτη κατέδειξε ότι το alemtuzumab

αύξησε τις αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (όπως η IL-10 και ο TGF-β) ενώ μειώνει τις προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (όπως η IFN-γ, η IL-17, η IL-6 και ο TNF-α) εντός 6 μηνών θεραπείας ενώ ταυτόχρονα αύξησε το ποσοστό των Tregs καθώς και τη λειτουργία τους μετά από 24 μήνες θεραπείας (148). Επιπλέον, το alemtuzumab φαίνεται επίσης να επηρεάζει τα B κύτταρα, καθώς αύξησε το ποσοστό των άωρων B λεμφοκυττάρων μετά την ανασύσταση του πληθυσμού τους (149). Το Alemtuzumab μπορεί κατά συνέπεια να είναι μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία για την ΚΠΣ (150).

Natalizumab

Το natalizumab, εγκεκριμένο για τη θεραπεία της ΚΠΣ, είναι ένα ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα IgG4. Συνδέεται κυρίως με την α4-αλυσίδα του ετεροδιμερούς της α4β1 ιντεγκρίνης – επίσης γνωστό ως πολύ όψιμο ενεργοποιούμενο αντιγόνο-4 (very late activating antigen-4, VLA-4), το οποίο εκφράζεται στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων και αναστέλλει τη δέσμευση του VLA-4 στο μόριο προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της προσκόλλησης των λευκοκυττάρων στην εσωτερική επένδυση των εγκεφαλικών αγγειακών τοιχωμάτων και κατ' επέκταση στην αποτροπή της διέλευσής τους από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Αυτή η διέλευση μειώνει άμεσα τα επίπεδα των αντισωμάτων IgM και μερικώς των IgG στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (151) καθώς και στον ορό των ασθενών (152). Ως εκ τούτου, το natalizumab ρυθμίζει τις λειτουργίες των B λεμφοκυττάρων, αλλά φαίνεται ότι δεν είναι σε θέση να αποκαταστήσει την κατασταλτική λειτουργία των Tregs ενώ μειώνει οριακά τα ποσοστά τους σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία (153, 154).

Tocilizumab

Το tocilizumab είναι εξανθρωπισμένο IgG1 μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο συνδέεται με τον υποδοχέα της IL-6 και είναι εγκεκριμένο από τον FDA για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της ενεργού συστηματικής νεανικής ιδιοπαθούς αρθρίτιδας και της πολυαρθρικής νεανικής ιδιοπαθούς αρθρίτιδας. Η IL-6 είναι γνωστό ότι επάγει την παραγωγή anti-aquaporin 4 (Aqp-4) αντισωμάτων από πλασμαβλάστες *in vitro* και μπορεί να ευθύνεται για τη δραστηριότητα της οπτικής νευρομυελίτιδας (NMO) (155). Εκτός αυτού, η συγκέντρωση της IL-6 είναι αυξημένη στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με NMO (156) και η αυξημένη IL-6 επάγει προ-φλεγμονώδη TH17 κύτταρα τόσο σε ασθενείς με NMO όσο και σε ασθενείς με ΚΠΣ (157). Έτσι, το tocilizumab ρυθμίζει τόσο τα TH17 κύτταρα και τους πλασμαβλάστες. Κατά συνέπεια, το tocilizumab φαίνεται επίσης ένας ελκυστικός υποψήφιος θεραπευτικός παράγοντας για την ΚΠΣ.

1.4.2 Άλλες ανοσορυθμιστικές αγωγές

Φινγκολιμόδη

Η φινγκολιμόδη είναι εγκεκριμένος θεραπευτικός παράγοντας για ασθενείς με RRMS. Προλαμβάνει την έξοδο των λεμφοκυττάρων από τους δευτερογενείς λεμφοειδείς ιστούς, προάγοντας την απώλεια των κυττάρων που εκφράζουν CCR7 και αυξάνοντας τον αριθμό των Tregs καθώς και την κατασταλτική τους λειτουργία στον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων (158). Μπορεί να επηρεάσει τα B-λεμφοκύτταρα, καθώς οδηγεί σε αυξημένο ποσοστό των πλασματοκυττάρων και σε μια μετατόπιση προς έναν πιο άωρο και μεταβατικό φαινότυπο. Επιπλέον, η θεραπεία με φινγκολιμόδη αυξάνει τόσο τον αριθμό όσο και τη λειτουργία των Bregs, που υποδεικνύεται από την ενίσχυση της παραγωγής της IL-10 (159). Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, η φινγκολιμόδη ενισχύει σημαντικά τα CD19+BTLA+IL-10+ B λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με RRMS, το οποίο μπορεί να σχετίζονται με την βελτίωση των συμπτωμάτων (160).

Φουμαρικό διμεθύλιο

Το φουμαρικό διμεθύλιο είναι ένας εγκεκριμένος θεραπευτικός παράγοντας για την ΚΠΣ. Προκαλεί εξάντληση των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα (161, 162). Τόσο τα άωρα όσο και τα B κύτταρα μνήμης μειώθηκαν σε ορισμένους ασθενείς, ενώ τα Bregs αυξήθηκαν μετά από 4-6 μήνες θεραπείας και παρέμειναν σε υψηλότερα επίπεδα 12 μήνες μετά τη θεραπεία. Επίσης, η παραγωγή IL-10 ήταν αυξημένη σε μερικούς ασθενείς (163). Μια άλλη μελέτη έδειξε μια απόκλιση από CD8+ και CD4+ T κύτταρα μνήμης προς τα άωρα ομόλογά τους μαζί με ταυτόχρονο περιορισμό των κυττάρων TH1 σε ασθενείς με RRMS που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με φουμαρικό διμεθύλιο (164). Αυτά τα περιορισμένα δεδομένα φαίνονται ιδιαίτερα ελπιδοφόρα.

Τεριφλουνομίδη

Η τεριφλουνομίδη είναι ένας εγκεκριμένος από του στόματος θεραπευτικός παράγοντας για υποτροπές της ΚΠΣ. Ο κύριος μηχανισμός δράσης της περιλαμβάνει την καταστολή της *de novo* σύνθεσης των πυριμιδινών σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενα T και B λεμφοκύτταρα. Η αναστολή σύνθεσης των πυριμιδινών οδηγεί σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και έτσι έχει αντιπολλαπλασιαστικά αποτελέσματα, μειώνοντας τις αυτοαντιγόνο-ειδικές ανοσοαποκρίσεις. Σε μια πρόσφατη μελέτη της τεριφλουνομίδης σε ποντίκια στα οποία είχε προκληθεί ΕΑΕ, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην σχετική συγκέντρωση των CD39+ Tregs και μια μείωση στα APCs των πλακών του Peyer (165, 166).

Οξική γλατιραμέρη

Η οξική γλατιραμέρη είναι ένα τυχαίο πολυμερές που αποτελείται από τέσσερα αμινοξέα της βασικής πρωτεΐνης μυελίνης και θεωρείται θεραπεία πρώτης επιλογής για την ΚΠΣ. Αποτρέπει την υποτροπή της νόσου και την αναπηρία του ασθενούς. Αυτός ο παράγοντας μετατοπίζει τις Τ λεμφοκυτταρικές αποκρίσεις από T_H1 σε T_H2 (167, 168). Η οξική γλατιραμέρη επάγει ένα φαινότυπο Treg και αυξάνει την έκφραση του FoxP3 ενώ ταυτόχρονα αποκαθιστά τη λειτουργία των Tregs στους ασθενείς (169). Πρόσφατη μελέτη κατέδειξε ότι η έκφραση της IL-10 από τα Β λεμφοκύτταρα αποκαταστάθηκε ενώ η παραγωγή της IL-6 μειώθηκε μετά τη θεραπεία με οξική γλατιραμέρη. Υπήρξε επίσης τροποποιημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός σε απόκριση στο CD40L και αυξημένη παραγωγή ανοσοσφαιρίνης από Β κύτταρα (170).

IFN-β

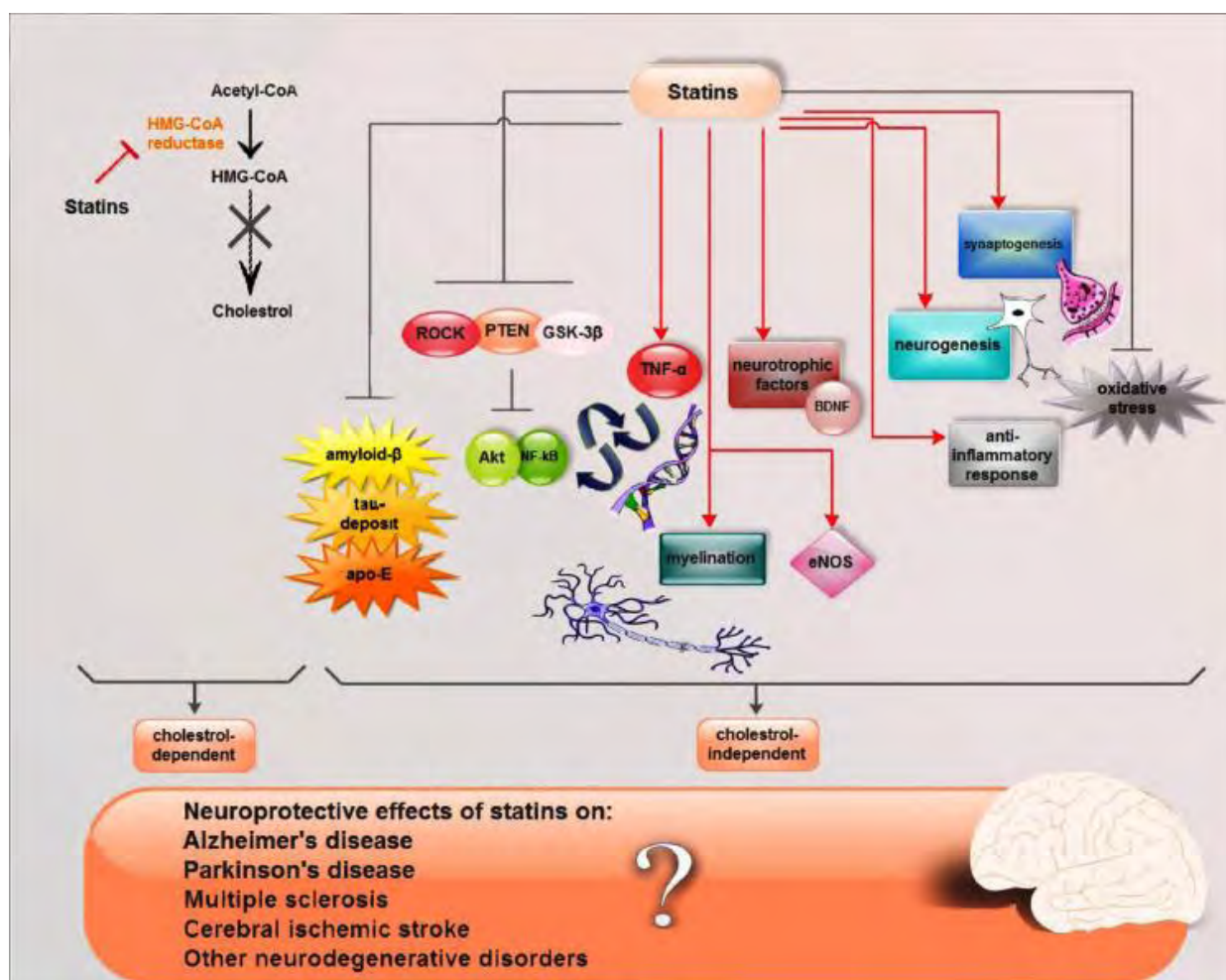
Η IFNβ-1b και η IFNβ-1a είναι ανοσοτροποποιητικές θεραπείες για την RRMS, οι οποίες επηρεάζουν ταυτόχρονα πολλαπλές ανοσολογικές διεργασίες. Η IFN-β καταστέλλει την ικανότητα των APCs να παρουσιάζουν αντιγόνα και να διεγείρουν τα Τ κύτταρα (171) και εμποδίζει τα Τ κύτταρα να διασχίσουν τον BBB, ενώ διοχετεύει αυτο-δραστικά Τ κύτταρα στους λεμφοειδείς ιστούς (172). Επιπλέον, η IFN-β έχει την ικανότητα να επάγει Tregs, πιθανώς λόγω μιας μετατόπισης προς κυτταροκίνες οι οποίες προάγουν τα Tregs, όπως είναι η IL-4, η IL-5 και η IL-13 (172). Τα άωρα Bregs πιστεύεται ότι αυξάνονται, επίσης, ως αποτέλεσμα της θεραπείας με IFN-β (106, 173). Επιπλέον, η θεραπεία προκαλεί θάνατο των T_H17 κυττάρων, μειώνει τον TNF και αυξάνει την παραγωγή της IL-27, η οποία είναι γνωστό ότι επιβραδύνει την εξέλιξη της ΕΑΕ. Έτσι, η θεραπεία με IFN-β παρεμποδίζει προ-φλεγμονώδη κύτταρα και κυτταροκίνες ενώ, επιπλέον, προάγει τα αντίστοιχα αντιφλεγμονώδη (174).

1.5 Στατίνες

Οι στατίνες είναι γνωστές ως ευρέως χρησιμοποιούμενες οικογένειες φαρμάκων που μειώνουν τη χοληστερόλη για τη θεραπεία των δυσλιπιδαιμιών. Αυτά τα φάρμακα αναστέλλουν τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης μέσω της ανταγωνιστικής αναστολής της αναγωγής του 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικού συνενζύμου Α (HMG CoA) και μετέπειτα τον αποκλεισμό της μετατροπής του HMGCoA σε μεβαλονικό (175). Οι στατίνες μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης στο πλάσμα μέσω της αύξησης της έκφρασης των υποδοχέων λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) και της μείωσης της σύνθεσης της χοληστερόλης στα ηπατοκύτταρα, καθώς και των τριγλυκεριδίων (176). Οι στατίνες προκαλούν ένα καταρράκτη από θετικές συνέπειες μέσω της μείωσης της χοληστερόλης. Για παράδειγμα, προστατεύουν από ισχαιμική εγκεφαλοαγγειακή νόσο, παθήσεις της στεφανιαίας αρτηρίας καθώς και περιφερικές αγγειακές παθήσεις (175, 177).

Οι στατίνες έχουν προταθεί ως νευροπροστατευτικά φάρμακα με αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντι-διεγερτοτοξικές (anti-excitotoxicity) ιδιότητες. Οι κύριοι τρόποι της νευροπροστασίας περιλαμβάνουν:

1. τη ρύθμιση των φλεγμονωδών αποκρίσεων
2. μείωση της βλάβης που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες
3. βελτίωση της κεντρικής ροής του αίματος μέσω της ρύθμισης της σύνθεσης του μονοξειδίου του αζώτου (NO), της αναστολής της πήξης, και της προώθησης της αγγειογένεσης (εικόνα 10)



Εικόνα 10: Ένα σχηματικό μοντέλο για τους μηχανισμούς με τους οποίους οι στατίνες εμποδίζουν την ανάπτυξη νευροεκφυλιστικών ασθενειών (177).

Ορισμένες από τις επιδράσεις των στατίνων συνδέονται με έναν τρόπο που εξαρτάται από τη χοληστερόλη, και μπορούν να αντιστραφούν με θεραπεία με μεβαλονικό ή με χοληστερόλη (178). Από την άλλη πλευρά, η ανεξάρτητη από τη χοληστερόλη δραστηριότητα των στατινών διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στις νευροπροστατευτικές επιδράσεις τους. Ένας από αυτούς τους μηχανισμούς είναι η μείωση της επαγόμενης από ιντερφερόνη έκφρασης των MHC-II σε APCs. Δεδομένου ότι τα μόρια MHC-II διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ενεργοποίηση των T-κυττάρων και τον έλεγχο της ανοσοαπόκρισης, οι στατίνες μπορούν να μειώσουν την ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Μεγάλος όγκος ερευνών δείχνει, εξάλλου, ότι οι στατίνες έχουν θετική επίδραση στα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (179). Σε μια πρόσφατη μελέτη, για παράδειγμα, η ατορβαστατίνη και η λοβαστατίνη αύξησαν τους αριθμούς των Tregs, αλλά και τα επίπεδα του mRNA του FoxP3 τριάντα ημέρες μετά τη θεραπεία. Ωστόσο, ο αριθμός των Tregs επέστρεψε σε τυπικά επίπεδα μετά από σαράντα πέντε ημέρες θεραπείας. Παρ' όλα αυτά, παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή TGF-β, FoxP3, CTLA-4 και GITR από τα Tregs (180). Γενικά, οι στατίνες πιστεύεται ότι είναι αντιφλεγμονώδεις ουσίες οι οποίες αυξάνουν την

παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-10 και ο TGF-β ενώ ταυτόχρονα μειώνουν τη σύνθεση προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-1β και ο TNF-α (177, 181).

1.5.1 Οι στατίνες σε πειράματα κυτταροκαλλιιεργειών

Την τελευταία δεκαετία έχει πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός πειραμάτων κυτταροκαλλιιεργειών για τη δράση των στατινών στους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς. Τα πειράματα περιλαμβάνουν τόσο κύτταρα ασθενών – οι οποίοι πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα, ΚΠΣ κ.α – όσο και υγιών δοτών. Τα αποτελέσματα δεν είναι ιδιαίτερα ξεκάθαρα προς τη μία ή την άλλη κατεύθυνση, όπως φαίνεται και από τα παραδείγματα του πίνακα 2. Παρόλ' αυτά, ο μεγαλύτερος όγκος της βιβλιογραφίας υποστηρίζει πώς οι στατίνες έχουν αντιφλεγμονώδεις και ανοσορυθμιστικές επιδράσεις σε κυτταρικό επίπεδο.

| Ερευνητική Ομάδα | Αποτελέσματα |
|-----------------------|--|
| Blaschke et al. (182) | Σημαντική μείωση στα CD4+IFN-γ+ T κύτταρα μετά από επώαση με ατορβαστατίνη σε ασθενείς με RA. |
| Coward et al. (183) | Τόσο η ατορβαστατίνη όσο και η σιμβαστατίνη προκάλεσαν προφλεγμονώδεις αντιδράσεις σε ενεργοποιημένα PBMCs υγιών δοτών, οδηγώντας σε αύξηση της παραγωγής IFN-γ από T κύτταρα. Οι αντιδράσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν μέσω ενεργοποίησης κασπάσης-1, IL-18 και IL-12 από μονοκύτταρα. |
| Desai et al. (184) | 10μM και 20μM σιμβαστατίνη οδήγησαν σε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού έως 60% σε ασθενείς με ΚΠΣ. 10μM σιμβαστατίνης , επίσης, μείωσαν την παραγωγή TNF-α κατά 94%, ενώ παράλληλα μείωσαν και την παραγωγή IL-10 κατά 62%. Σε κύτταρα υγιών δοτών η IL-10 μειώθηκε κατά 30% από επώαση με 10μM σιμβαστατίνης . |
| Ferrari et al. (185) | Ταυτόχρονη επώαση με LPS και σιμβαστατίνη οδήγησε τα κύτταρα ασθενών με οξεία νεφρική βλάβη να παράγουν λιγότερη IL-10 και περισσότερο TNF-α σε σύγκριση με υγιή δείγματα. |
| Kim et al. (186) | Μπλοκάρισμα του μονοπατιού του μεβαλονικού από τη σιμβαστατίνη οδήγησε σε αύξηση των FoxP3+ Tregs. Επιπλέον,δείχθηκε ότι η σιμβαστατίνη παρουσιάζει συνέργεια με χαμηλά επίπεδα TGF-β στην επαγωγή FoxP3+ Tregs. |

| | |
|-------------------------|--|
| Leung et al. (187) | Καταστολή της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών από ενεργοποιημένα μακροφάγα από τη συμβαστατίνη . |
| Peng et al. (188) | Η συμβαστατίνη κατέστειλε την παραγωγή των IFN-γ, TNF-α και IL-2, καθώς και του T-bet, μεταγραφικού παράγοντα που ρυθμίζει την TH1 διαφοροποίηση. |
| Pereira et al. (189) | Σημαντική μείωση των IL-17A, IL-6, IL-22 και IFN-γ σε PBMCs ασθενών με RA μετά από επώαση με συμβαστατίνη . Αξίζει να σημειωθεί ότι ασθενείς με σοβαρότερα συμπτώματα παρουσίασαν μικρή απάντηση στη στατίνη. |
| Zhang et al. (190) | Καταστολή της TH17 διαφοροποίησης από τη συμβαστατίνη μέσω αναστολής της έκφρασης του ρυθμιστικού παράγοντα 4 της IFN (IRF4). |

Πίνακας 2: Η δράση των στατινών σε πειράματα κυτταροκαλλιιεργειών.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της δράσης των στατινών στην ισορροπία ανάμεσα σε ρυθμιστικούς και προφλεγμονώδεις κυτταρικούς πληθυσμούς σε ασθενείς με ΚΠΣ, ορμώμενοι από τα βιβλιογραφικά δεδομένα που συσχετίζουν τη δράση των στατινών με αύξηση του αριθμού και της δραστηρότητας των Tregs.

Προς την κατεύθυνση αυτή, απομονώθηκαν κύτταρα περιφερικού αίματος από διαγνωσμένους ασθενείς καθώς και από υγιείς δότες τα οποία επώαστηκαν είτε με σιμβαστατίνη είτε με ατορβαστατίνη και συνδυασμό διεγερτικών ουσιών. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής αξιολογήθηκε η παραγωγή IFN- γ από T λεμφοκύτταρα (T_H1 απόκριση) καθώς και η παραγωγή IL-10 από B λεμφοκύτταρα (B10 κύτταρα). Απώτερος στόχος ήταν η ανάδειξη των *in vitro* συνεπειών που παρουσιάζονται από τη δράση των στατινών στα κύτταρα ασθενών με ΚΠΣ.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Απομόνωση και κρυοσυντήρηση μονοπύρηνων λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs)

Υλικά και αντιδραστήρια

- Ηπαρινισμένη σύριγγα συλλογής αίματος (20 ml ή μεγαλύτερη)
- Μέσο RPMI-1640
- Στείρες πιπέτες Pasteur
- Διάλυμα Lymphoprep TM
- Ορός εμβρύου μόσχου (FCS)
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- Υγρό άζωτο

Μέθοδος

1. Συλλογή 20ml περιφερικού αίματος με μια ηπαρινισμένη σύριγγα
2. Καλή ανάμιξη με αναστροφή 3-5 φορές και διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου κατά τη μεταφορά στο εργαστήριο (μέχρι 6 ώρες).
3. Κατά την άφιξη σημειώνονται οι πληροφορίες του ασθενούς και κρατούνται σε φάκελο.
4. Απομόνωση λεμφοκυττάρων χρησιμοποιώντας διάλυμα διαβάθμισης Lymphoprep.
5. Τοποθέτηση αργά 20ml αίματος σε 10ml Lymphoprep.
6. Φυγοκέντριση σε 2000 rpm για 20 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο χωρίς φρένο.
7. Συλλογή προσεκτικά του πλάσματος σε κατάλληλα επισημασμένο σωληνάριο falcon των 15 ml.
8. Προσεκτική συλλογή των λεμφοκυττάρων σε ξεχωριστό σωληνάριο falcon των 15 ml.
9. Προσθήκη μέσου RPMI-1640, πλύση και φυγοκέντριση στις 1800 rpm για 5 λεπτά.
10. Με μεγάλη προσοχή ώστε να μην πειραχθεί το κυτταρικό ίζημα, γίνεται απόρριψη και πλύση και πάλι με νέο RPMI-1640.
11. Επαναιώρηση σε 1 ml διαλύματος κρυοσυντήρησης που αποτελείται από 60-90% FCS / 10% DMSO.
12. Κατάψυξη των δειγμάτων στους -20°C, σε ειδικό CryoBox για τουλάχιστον 24 ώρες.
13. Μεταφορά σε υγρό άζωτο για μακροχρόνια αποθήκευση.
14. Απόψυξη του εναιωρήματος κατεψυγμένων λεμφοκυττάρων στους 37°C.

15. Πλύση με RPMI-1640 και προσεκτική απόρριψη του υπερκειμένου διαλύματος κρυοσυντήρησης.
16. Τα κύτταρα είναι τώρα έτοιμα για μεταγενέστερη χρήση.

3.2 Μέτρηση κυττάρων με χρήση Trypan Blue

Υλικά

- Αιμοκυτταρόμετρο
- 0.4% Trypan Blue
- Οπτικό μικροσκόπιο

Μέθοδος

- Γίνεται λήψη 100μl κυττάρων σε Eppendorf tube και προσθήκη 400μL 0.4% Trypan Blue (τελική συγκέντρωση 0.32%). Είναι απαραίτητο να γίνει καλό ανακάτεμα.
- Γίνεται λήψη 100μl κυτταρικού εναιωρήματος που έχει υποστεί κατεργασία με Trypan Blue και γίνεται εφαρμογή σε αιμοκυτταρόμετρο. Γίνεται γέμισμα των δύο θαλάμων κάτω από την καλύπτρα, επιτρέποντας την αφαίρεση του κυττάρου από τριχοειδή δράση
- Χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο, γίνεται εστίαση στις γραμμές πλέγματος του αιμοκυτταρομέτρου με μεγέθυνση 10X.
- Ακολουθεί μέτρηση των ζωντανών, μη χρωματισμένων κυττάρων (τα ζωντανά κύτταρα δεν βάφονται από Trypan Blue)
- Πολλαπλασιασμός του αποτελέσματος $\times 10^4$
- Πολλαπλασιασμός με 5 για να διορθωθεί η αραίωση 1:5 από την προσθήκη Trypan Blue.
- Η τελική τιμή είναι ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων/ml στο αρχικό κυτταρικό εναιώρημα.

Η μέτρηση των κυττάρων πριν την εκκίνηση του κάθε πειράματος είναι σημαντική για να γίνει σωστός υπολογισμός των ποσοτήτων των αντιδραστηρίων που θα χρησιμοποιηθούν.

3.3 Καλλιέργεια PBMCs

Υλικά και αντιδραστήρια

- Μέσο RPMI-1640
- Διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης
- Ορός εμβρύου μόσχου (FCS)
- Πλάκα κυτταρικής καλλιέργειας 24 φρεατίων
- Complete medium (10% FCS σε RPMI-1640 παρουσία 100 units/ml πενικιλίνης και 100μg/ml στρεπτομυκίνης)

Μέθοδος

- Τα κύτταρα τοποθετούνται σε πλάκα κυτταρικής καλλιέργειας 24 φρεατίων.
- Προστίθενται τα αντιδραστήρια (πχ. στατίνες* στην προσχεδιασμένη συγκέντρωση) για το εκάστοτε πρωτόκολλο
- Τα φρεάτια συμπληρώνονται μέχρι το 1ml με complete medium και ακολουθεί ελαφρό ανακάτεμα
- Οι πλάκες κυτταρικής καλλιέργειας τοποθετούνται σε επωαστήρα με συνθήκες 37°C και 5% CO₂
- Τα κύτταρα επωάζονται ανάλογα με το εκάστοτε πρωτόκολλο

*Οι συγκεντρώσεις των στατινών που επιλέχθηκαν για την επώαση των κυττάρων βασίστηκαν σε αντίστοιχα πειράματα στη βιβλιογραφία. Για τα περισσότερα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν 10μM σιμβαστατίνης και 10μM ατορβαστατίνης, όπως λεπτομερώς αναφέρεται.

3.4 Κυτταρικά διεγερτικά

Διέγερση της παραγωγής IFN-γ από T λεμφοκύτταρα

Το phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) είναι χημική ουσία που ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), ένζυμο που συμμετέχει στη μετάδοση του μηνύματος ενεργοποίησης των T κυττάρων. Η Ιονομυκίνη είναι ιονοφόρο του ασβεστίου που χρησιμοποιείται για την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου, που επίσης συμμετέχει στη μετάδοση του μηνύματος ενεργοποίησης των T κυττάρων. Ο συνδυασμός των δύο αυτών ουσιών σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή κυτταροκινών από T λεμφοκύτταρα (191).

Διέγερση της παραγωγής IL-10 από B λεμφοκύτταρα

Τα ολιγονουκλεοτίδια (ODNs) CpG είναι συνθετικά ODNs που περιέχουν μη μεθυλιωμένα δινουκλεοτίδια CpG σε συγκεκριμένα πλαίσια αλληλουχίας (μοτίβα CpG). Αυτά τα μοτίβα CpG είναι παρόντα σε 20 φορές μεγαλύτερη συχνότητα σε βακτηριακό DNA από ότι στο DNA των θηλαστικών. Τα CpG ODNs ενεργοποιούν κυρίως τον Toll-like receptor 9 (TLR9), οδηγώντας σε ισχυρά ανοσοδιεγερτικά αποτελέσματα. Έχουν αναγνωριστεί τρεις τύποι διεγερτικών CpG ODNs, τύποι A, B και C, οι οποίοι διαφέρουν στις ανοσοδιεγερτικές τους δραστηριότητες. Οι τύπου A CpG ODNs χαρακτηρίζονται από ένα φωσφοδιεστερικό κεντρικό CpG που περιέχει παλίνδρομο μοτίβο και ένα φωσφοροθειϊκό 3 'poly-G string. Αυτά επάγουν υψηλή παραγωγή IFN-α από πλακιδιοκυττοειδή δένδριτικά κύτταρα (pDC), αλλά είναι ασθενείς διεγέρτες της σηματοδότησης NF-κΒ εξαρτώμενης από TLR9. Τύποι B CpG ODNs περιέχουν ένα πλήρες σκελετό φωσφοροθειϊκού με ένα ή περισσότερα δινουκλεοτίδια CpG. Ενεργοποιούν έντονα τα B κύτταρα αλλά διεγείρουν ασθενώς την έκκριση IFN-α. Τύποι C CpG ODNs συνδυάζουν χαρακτηριστικά και των δύο τύπων A και B. Περιέχουν ένα πλήρες σκελετό φωσφοροθειϊκού και ένα παλίνδρομο μοτίβο που περιέχει CpG. Ο CpG ODN τύπου C επάγει ισχυρή παραγωγή IFN-α από διέγερση pDC και B κυττάρων. Το ODN 2006 είναι CpG ODN τύπου B ειδικό για την ενεργοποίηση του ανθρώπινου TLR9 (192).

Ο συνδέτης CD40 (CD40L), μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, είναι μέλος της οικογένειας TNF. Εκφράζεται κυρίως σε ενεργοποιημένα CD4⁺ T κύτταρα, καθώς και σε άλλους τύπους κυττάρων. Ο CD40L προσδένεται με το CD40. Η δέσμευση του CD40 και του CD40L μεσολαβεί στην ενεργοποίηση των B κυττάρων, των μονοκυττάρων και των δένδριτικών κυττάρων (193).

Οι λιποπολυσακχαρίτες (LPSs) είναι χαρακτηριστικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος Gram-αρνητικών βακτηρίων. Ο LPS διεγείρει κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος μέσω του TLR4, μέλους της οικογένειας πρωτεϊνικών υποδοχέων τύπου Toll, που αναγνωρίζει κοινά μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνα (pathogen-associated molecular-patterns PAMPs) (194).

Το Brefeldin A είναι μια αντι-ική λακτόνη που παράγεται από το *Eupenicillium brefeldianum*. Αποτελεί αναστρέψιμο αναστολέα της πρωτεϊνικής μεταφοράς από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύστημα Golgi. Αναστέλλει τη δέσμευση της κυτοσολικής πρωτεΐνης περιβλήματος, του β-COP και του παράγοντα ριβοζυλίσωσης ADP (ARF) στις μεμβράνες Golgi ενώ παράλληλα αναστέλλει την ανταλλαγή μεταξύ GDP και GTP. Η χρήση του Brefeldin A είναι απαραίτητη για την ανίχνευση των επιπέδων των παραγόμενων κυτταροκινών μετά από διέγερση, καθώς απουσία του οι κυτταροκίνες θα διέφευγαν από το κύτταρο και δε θα μπορούσαν κατ' επέκταση να ανιχνευθούν με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής (195).

3.5 Επώαση κυττάρων με αντισώματα και προετοιμασία κυτταρομετρίας ροής

Υλικά

- Staining buffer
- 2% PFA (παραφορμαλδεΰδη)
- Permeabilization buffer

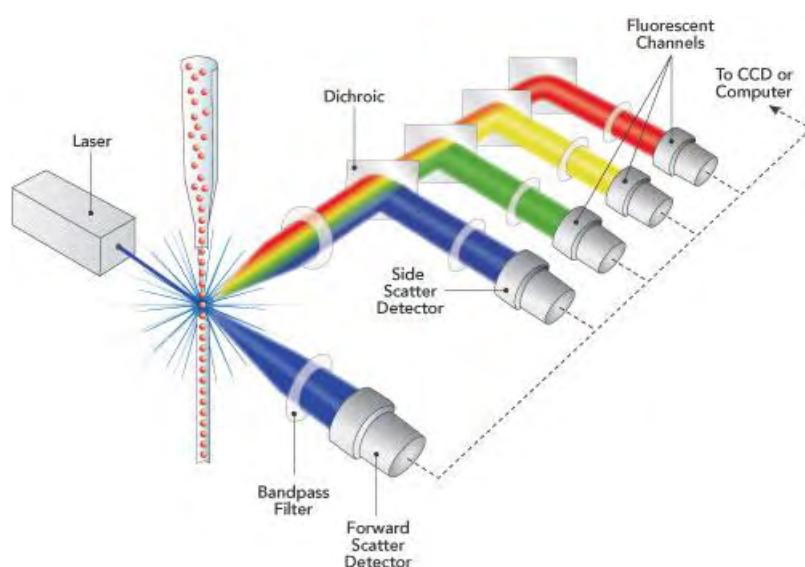
Μέθοδος

- Τα κύτταρα μεταφέρονται σε Eppendorf tubes και υποβάλλονται σε φυγοκέντριση στις 4000rpm για 2 λεπτά.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο και γίνεται πλύση με 800μl staining buffer (επαναιώρηση του δείγματος, φυγοκέντριση στις 4000rpm για 2 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου).
- Γίνεται προσθήκη των επιφανειακών αντισωμάτων σε κατάλληλες ποσότητες μαζί με 100μl staining buffer και καλό ανακάτεμα
- Επώαση για 30 λεπτά στους 4°C
- Πλύση με 800μl staining buffer (επαναιώρηση του δείγματος, φυγοκέντριση στις 4000rpm για 2 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου).
- Προσθήκη 200μl 2% PFA και καλό ανακάτεμα
- Επώαση για 10 λεπτά στους 4°C
- Πλύση με 800μl staining buffer (επαναιώρηση του δείγματος, φυγοκέντριση στις 4000rpm για 2 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου).
- Επαναιώρηση σε 200μl staining buffer
- Σε αυτό το σημείο τα κύτταρα μπορούν να παραμείνουν στο ψυγείο για κάποιες ώρες (overnight), καθώς το πείραμα συχνά συνεχίζεται την επόμενη ημέρα.
- Πλύση με 800μl staining buffer (επαναιώρηση του δείγματος, φυγοκέντριση στις 4000rpm για 2 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου).
- Προσθήκη 200μl permeabilization buffer και καλό ανακάτεμα με χρήση vortex.
- Επώαση για 15 λεπτά στους 4°C
- Πλύση με 300μl permeabilization buffer (επαναιώρηση του δείγματος, φυγοκέντριση στις 4000rpm για 2 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου).
- Γίνεται προσθήκη των επιφανειακών αντισωμάτων σε κατάλληλες ποσότητες μαζί με 100μl permeabilization buffer και καλό ανακάτεμα

- Επώαση για 30 λεπτά στους 4°C
- Πλύση με 400μl permeabilization buffer (επαναιώρηση του δείγματος, φυγοκέντρωση στις 4000rpm για 2 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου).
- Προσθήκη staining buffer ώστε ο τελικός όγκος να είναι περίπου 200-250μl και προσεκτικό ανακάτεμα
- Το δείγμα μεταφέρεται σε φιαλίδιο και η κυτταρομετρία ροής μπορεί να ξεκινήσει.

3.6 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική που βασίζεται σε λέιζερ ή ηλεκτρικές αντιστάσεις και χρησιμοποιείται στην καταμέτρηση και στην ταξινόμηση των κυττάρων καθώς και στην ανίχνευση βιοδεικτών μέσω της αιώρησης των κυττάρων σε ένα ρεύμα υγρού και τη διέλευσή τους μέσω μιας ηλεκτρονικής συσκευής ανίχνευσης. Ένας κυτταρομετρητής ροής επιτρέπει ταυτόχρονη πολυπαραμετρική ανάλυση των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών έως και χιλιάδων σωματιδίων ανά δευτερόλεπτο. Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται συνήθως στη διάγνωση των διαταραχών της κυτταρικής ομοιοστασίας σε παθήσεις, ιδιαίτερα των καρκίνων του αίματος, αλλά έχει πολλές άλλες εφαρμογές στη βασική έρευνα, την κλινική πρακτική και τις κλινικές δοκιμές.



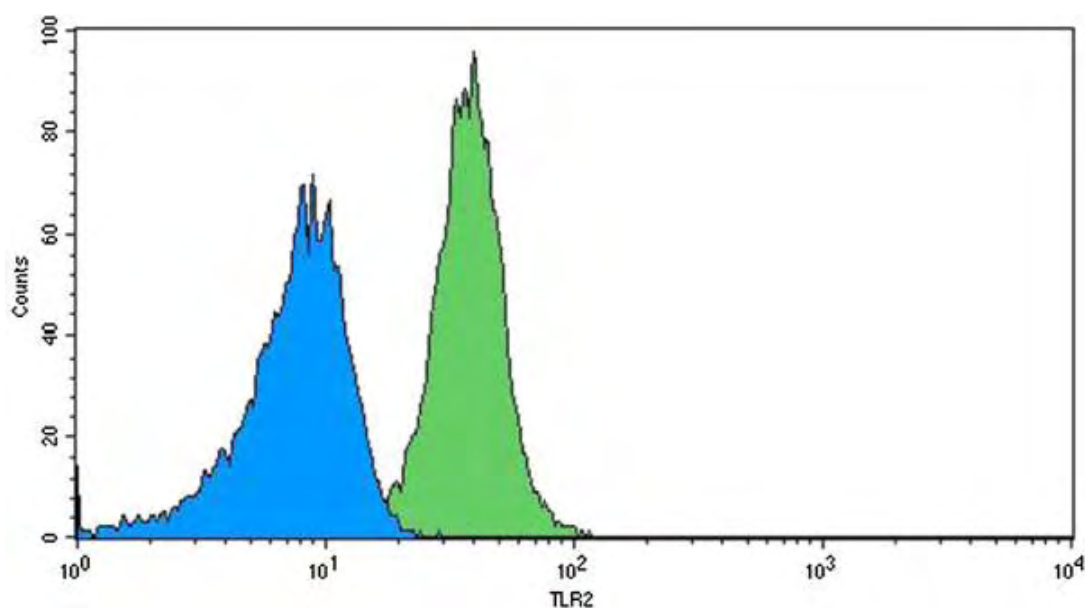
Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της κυτταρομετρίας ροής.

χρωστικές. Ένα πολύπλοκο σύστημα οπτικών καθοδηγεί το φως στον κατάλληλο ανιχνευτή όπου μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα και μεταφράζεται σε παράμετρο μέσω κατάλληλου λογισμικού. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ. κοκκίωση του κυττάρου).

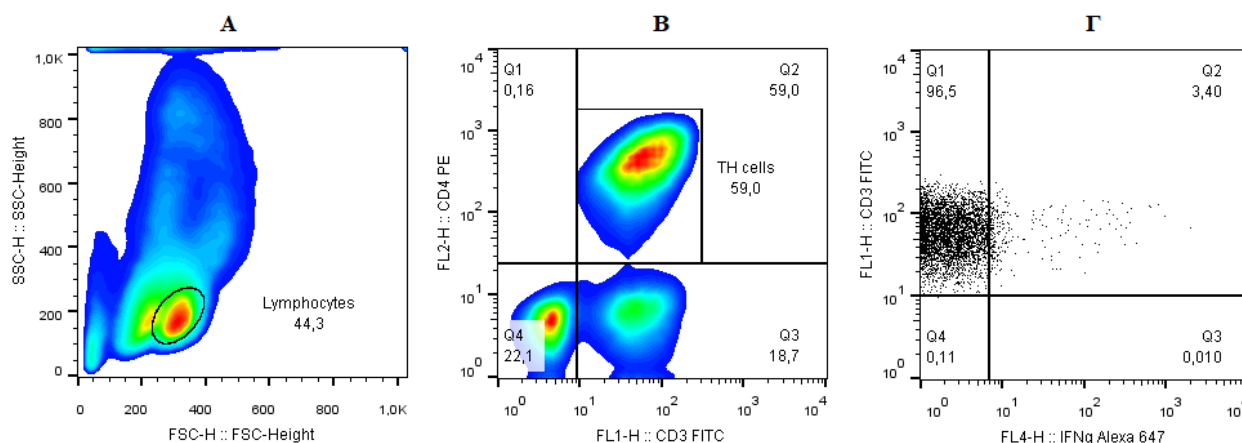
Οι σύγχρονες συσκευές κυτταρομετρίας ροής έχουν τη δυνατότητα ανάλυσης μερικών χιλιάδων σωματιδίων το δευτερόλεπτο, σε "πραγματικό χρόνο", και ορισμένες έχουν επιπλέον τη δυνατότητα ενεργού διαχωρισμού και απομόνωσης σωματιδίων με συγκεκριμένες ιδιότητες. Μια συσκευή κυτταρομετρίας ροής μοιάζει με ένα μικροσκόπιο με τη διαφορά ότι αντί να παράγει την εικόνα ενός κυττάρου, η κυτταρομετρία ροής παρέχει δεδομένα για τα χαρακτηριστικά ενός μεγάλου αριθμού κυττάρων σε λίγο χρόνο. Τα σύγχρονα όργανα

κυτταρομετρίας ροής διαθέτουν πολλαπλά λείζερ και ανιχνευτές φθορισμού. Η αύξηση του αριθμού των λείζερ και των ανιχνευτών φθορισμού επιτρέπει την πολλαπλή σήμανση με χρήση αντισωμάτων και συνεπώς δίνει τη δυνατότητα για πιο ακριβή ταυτοποίηση των πληθυσμών που αποτελούν το στόχο βάσει του φαινοτύπου των τελευταίων. Ορισμένα όργανα μπορούν ακόμα και να φωτογραφίσουν μεμονωμένα κύτταρα επιτρέποντας τον προσδιορισμό της πηγής του σήματος φθορισμού εντός ή επί της επιφανείας των κυττάρων. Στα πειράματα που έγιναν χρησιμοποιήθηκε ο κυτταρομετρητής ροής BD FACSCalibur™.

Τα αποτελέσματα μπορούν να παρουσιαστούν σε ιστογράμματα μίας ή δύο παραμέτρων.



Εικόνα 12: Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται ένα ιστογράμμο κυτταρομετρίας ροής μίας παραμέτρου. Θετικά για τη συγκεκριμένη παράμετρο (TLR2) είναι τα πράσινα κύτταρα, ενώ αρνητικά τα μπλε (τροποποιημένο από (196)).



Εικόνα 13: A: Density plot σήματος πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης στα οποία είναι επιλεγμένος ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων μέσω πύλης (gate). B: Density plot όπου αναγνωρίζονται τα αντιγόνα επιφάνειας CD3 και CD4 και έχει δημιουργηθεί πύλη στα CD3+CD4+ T_H κύτταρα. Γ: Dot plot κυτταρομετρίας ροής στην οποία παρουσιάζεται η παραγωγή της IFN- γ από τα T λεμφοκύτταρα. Στη συγκεκριμένη ανάλυση έχουν περιληφθεί μόνο τα κύτταρα της πύλης T_H της εικόνας B. Στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο εμφανίζονται τα CD3+IFN γ + κύτταρα, στο πάνω αριστερά τα CD3+IFN γ - κύτταρα, στο κάτω αριστερά θα εμφανίζονταν τα CD3-IFN γ - κύτταρα και στο κάτω δεξιά τα CD3-IFN γ +.

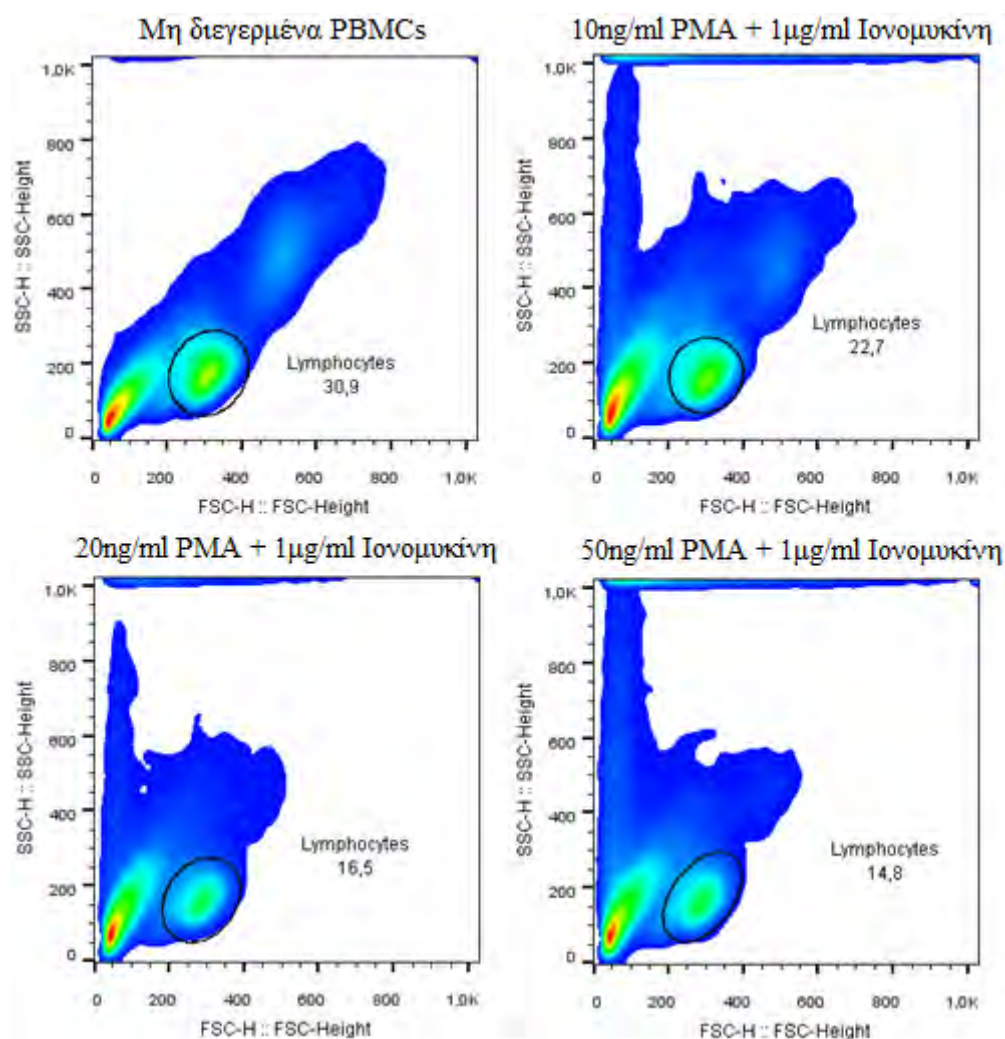
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Σχέση δόσης-απόκρισης PMA + Ιονομυκίνης

Χρησιμοποιώντας δεδομένα από τη σχετική βιβλιογραφία, σχεδιάστηκαν πειράματα στα οποία PBMCs επωάστηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις PMA και Ιονομυκίνης με σκοπό την ανεύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης. Δοκιμάστηκαν 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις τόσο σε ασθενείς όσο και σε δείγματα υγρών απόμων:

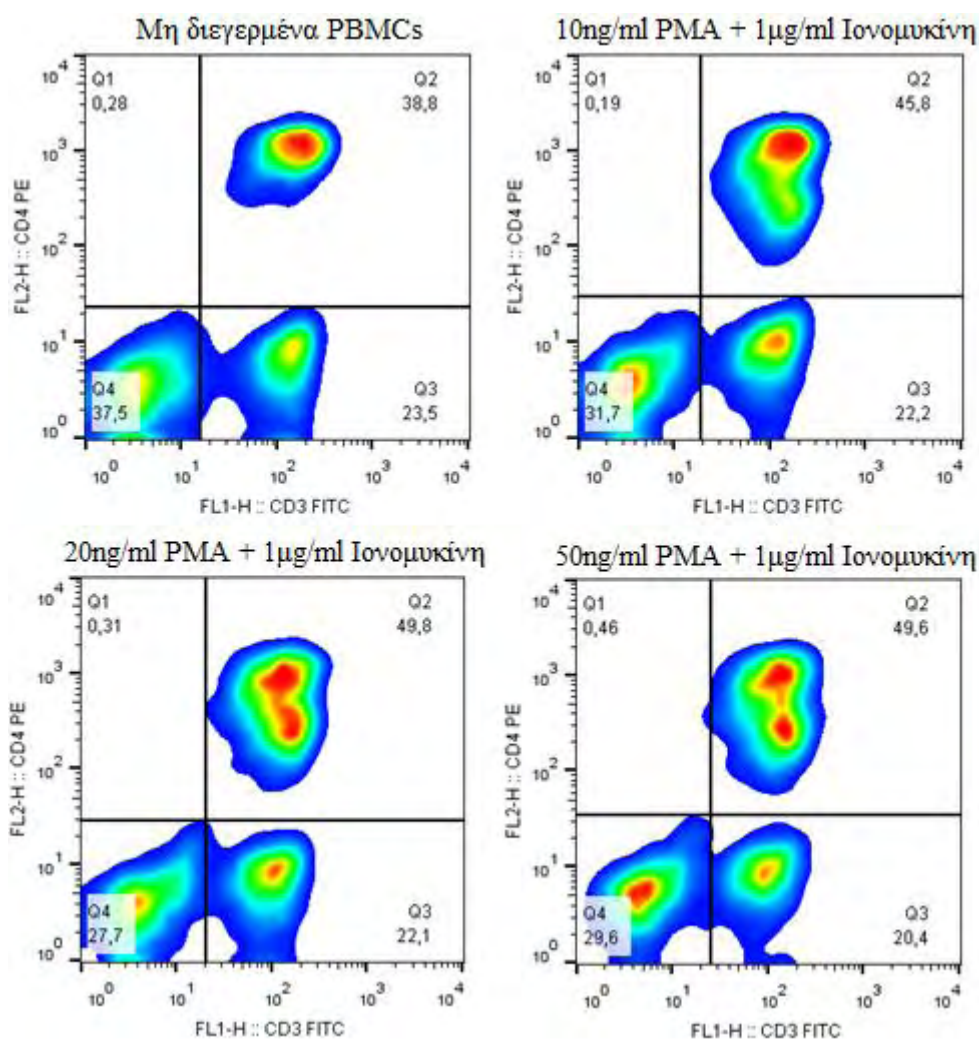
- 10ng/ml PMA + 1μg/ml Ιονομυκίνη για 5 ώρες
- 20ng/ml PMA + 1μg/ml Ιονομυκίνη για 5 ώρες
- 50ng/ml PMA + 1μg/ml Ιονομυκίνη για 5 ώρες

Ενδεικτικά αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής φαίνονται στις παρακάτω εικόνες:



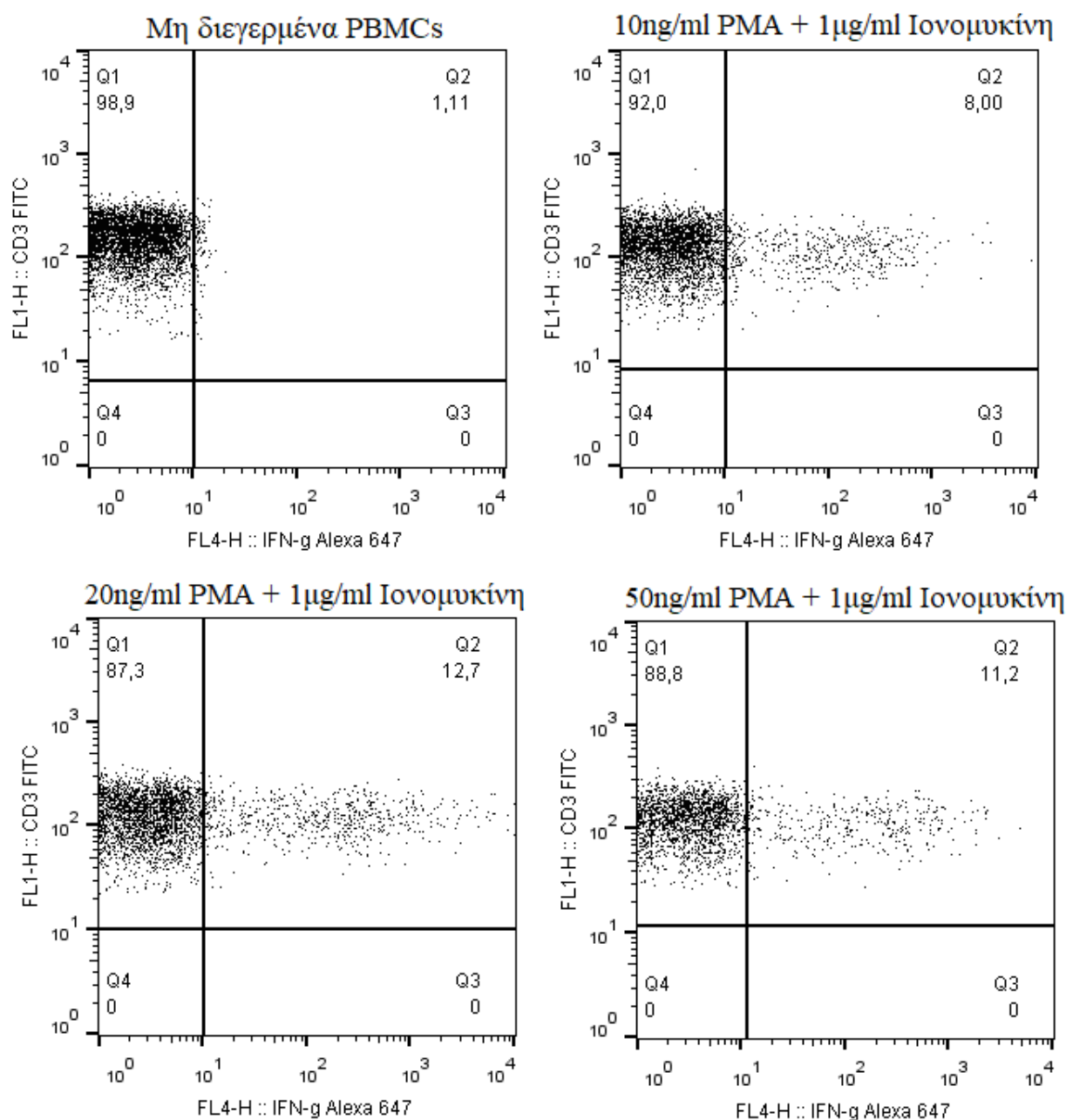
Εικόνα 14: Σήματα πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης στα οποία είναι επιλεγμένος ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων. Φαίνονται σε σειρά τα αποτελέσματα από PBMCs τα οποία δεν είχαν υποστεί καμία διέγερση και από PBMCs τα οποία είχαν επωαστεί με αυξανόμενες συγκεντρώσεις PMA αλλά σταθερή δόση ιονομυκίνης.

Είναι εμφανές από την παραπάνω εικόνα ότι η επώαση με PMA και Ιονομυκίνη οδηγεί σε θάνατο των κυττάρων, κάτι το οποίο είναι μία φυσιολογική συνέπεια της υπέρμετρης διέγερσης τους. Παρατηρείται, επιπλέον, ότι η συγκέντρωση των διεγερτικών ουσιών παίζει σημαντικό ρόλο στον προαναφερθέντα κυτταρικό θάνατο, με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να προκαλούν μεγαλύτερο στρες στα κύτταρα, οδηγώντας τα στην απόπτωση/κυτταρικό θάνατο.



Εικόνα 15: Κυτταρομετρία ροής στην οποία αναγνωρίζονται τα αντιγόνα επιφάνειας CD3 και CD4. Είναι εμφανής η δημιουργία ομάδων κυττάρων, οι οποίες αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς υποπληθυσμούς, όπως τα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα (CD3+CD4+).

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζονται τα αντιγόνα επιφάνειας CD3 και CD4 μετά από επώαση των κυττάρων με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις PMA και Ιονομυκίνης σε σύγκριση με μη διεγερμένα PBMCs. Μία παρατήρηση που μπορεί να γίνει για την εικόνα αυτή είναι ότι η ένταση φθορισμού του CD4 μειώνεται στα διεγερμένα κύτταρα, κάτι το οποίο είναι μάλιστα εντονότερο σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των διεγερτικών ουσιών. Στη συνέχεια, έγινε ανάλυση της παραγωγής IFN- γ από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα, η οποία παρουσιάζεται στην ακόλουθη εικόνα:



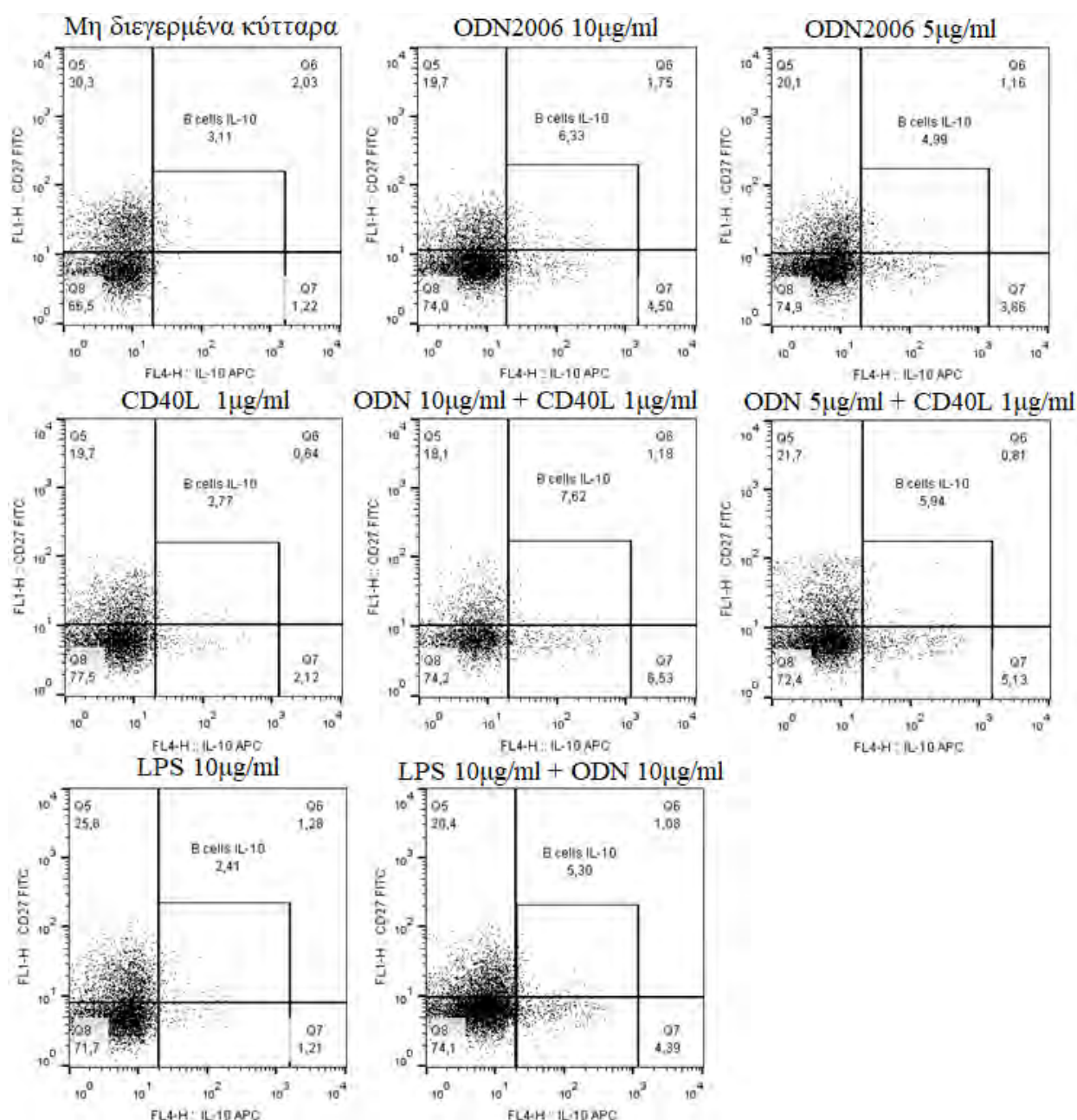
Εικόνα 16: Κυτταρομετρία ροής στην οποία παρουσιάζεται η παραγωγή της IFN-γ από τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα.

Από την εικόνα αυτή είναι εύκολο να εξαχθεί ότι η επώαση με 20ng/ml PMA + 1μg/ml Ιονομυκίνη έχει τα βέλτιστα αποτελέσματα. Στην περίπτωση αυτής της συγκέντρωσης, εμφανίζεται το μεγαλύτερο ποσοστό T_H κυττάρων τα οποία παράγουν την προφλεγμονώδη IFN-γ, χωρίς να παρατηρείται υπέρμετρος κυτταρικός θάνατος, και άρα η συγκέντρωση αυτή είναι η καλύτερη για να πραγματοποιηθούν τα συγκεκριμένα πειράματα.

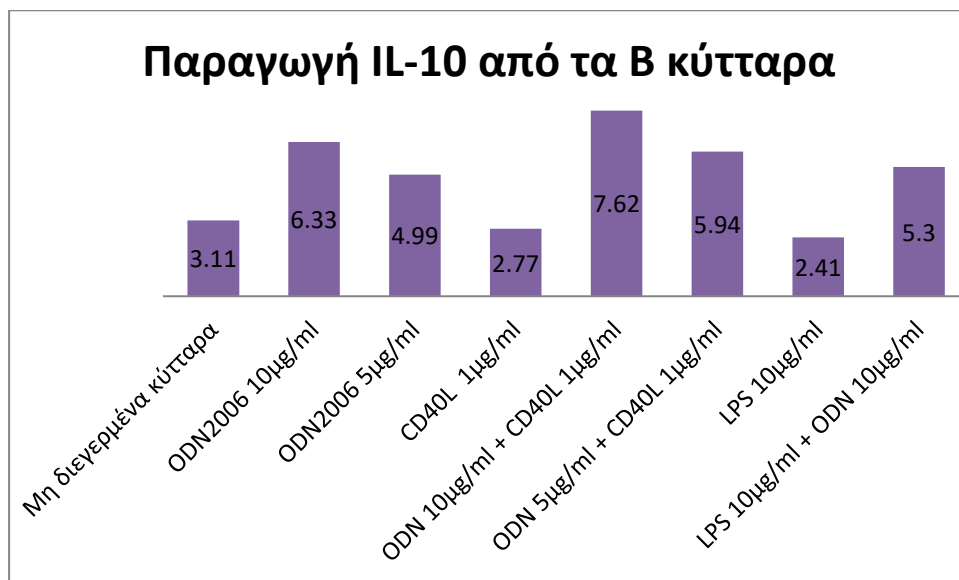
4.2 Σύγκριση των διαφορετικών διεγερτικών μορίων για παραγωγή IL-10 από τα B κύτταρα

Με τη χρήση δεδομένων από τη βιβλιογραφία, θεωρήθηκε σκόπιμο να γίνει μία σύγκριση των διαφορετικών διεγερτικών μορίων που οδηγούν τα B λεμφοκύτταρα, και δη τα Bregs, να παράγουν IL-10 (B10). Προς την κατεύθυνση αυτή έγινε επώαση για 24 ώρες με τα εξής:

- ODN2006 10μg/ml
- ODN2006 5μg/ml
- CD40L 1μg/ml
- ODN 10μg/ml + CD40L 1μg/ml
- ODN 5μg/ml + CD40L 1μg/ml
- LPS 10μg/ml
- LPS 10μg/ml + ODN 10μg/ml



Εικόνα 17: Κυτταρομετρία ροής στην οποία παρουσιάζεται η παραγωγή της IL-10 αποκλειστικά από τα Β λεμφοκύτταρα (B10).

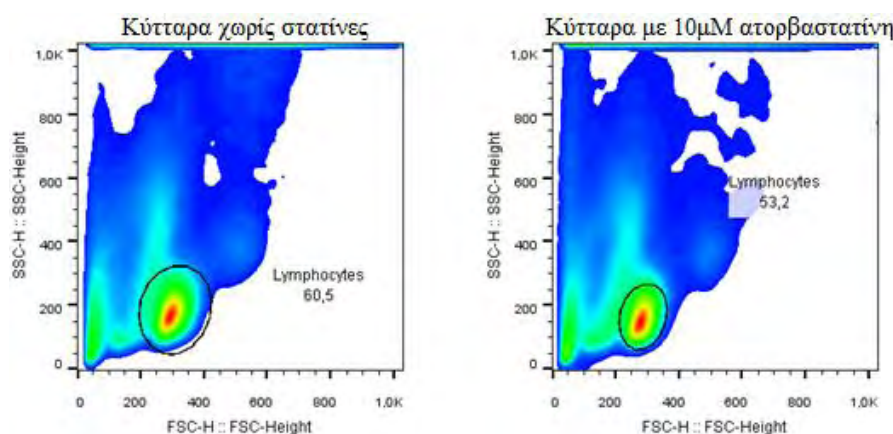


Πίνακας 3: Γραφική απεικόνιση των διαφορών στην παραγωγή της IL-10 από τα Β κύτταρα.

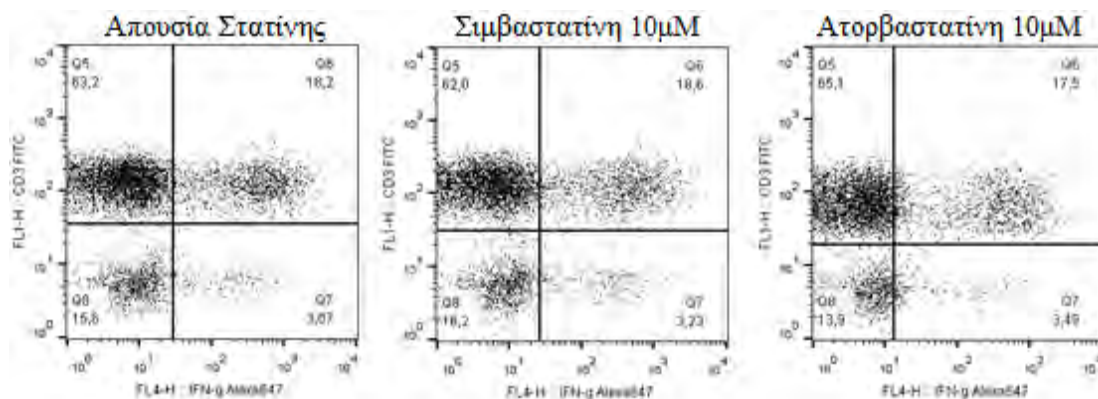
Από τα αποτελέσματα του πειράματος παρατηρήθηκε ότι το ODN 10µg/ml σε συνδυασμό με το CD40L 1µg/ml, επιφέρει τη μεγαλύτερη δυνατή παραγωγή IL-10 από τα Β λεμφοκύτταρα. Αυτό διευκολύνει αργότερα στην εύρεση διαφορών στην παραγόμενη IL-10 μετά από επώαση ή όχι με στατίνες και άρα στην ευκολότερη εξαγωγή συμπερασμάτων από τη δράση τους.

4.3 Επίδραση των στατινών στην παραγωγή IFN- γ από T κύτταρα μετά από επώαση 24h

Αρχικά έλαβαν χώρα επωάσεις των κυττάρων ασθενών με ΚΠΣ και υγιών δειγμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις στατινών για 24 ώρες, ακολουθούμενες από διέγερση με 20ng/ml PMA και 1 μ g/ml Ιονομυκίνη για 5 ώρες. Ακολούθησε κυτταρομετρία ροής με αντισώματα τα αντι-CD3 και αντι-IFN γ . Σκοπός ήταν η διερεύνηση της επίδρασης που έχουν οι στατίνες στην παραγωγή της IFN- γ από τα T λεμφοκύτταρα. Οι συγκεντρώσεις στατινών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 10 μ M, 20 μ M και 50 μ M.



Εικόνα 18: Density plot από σήματα πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης στα οποία είναι επιλεγμένος ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων. Τα κύτταρα ανήκουν σε ασθενή που πάσχει από ΚΠΣ.

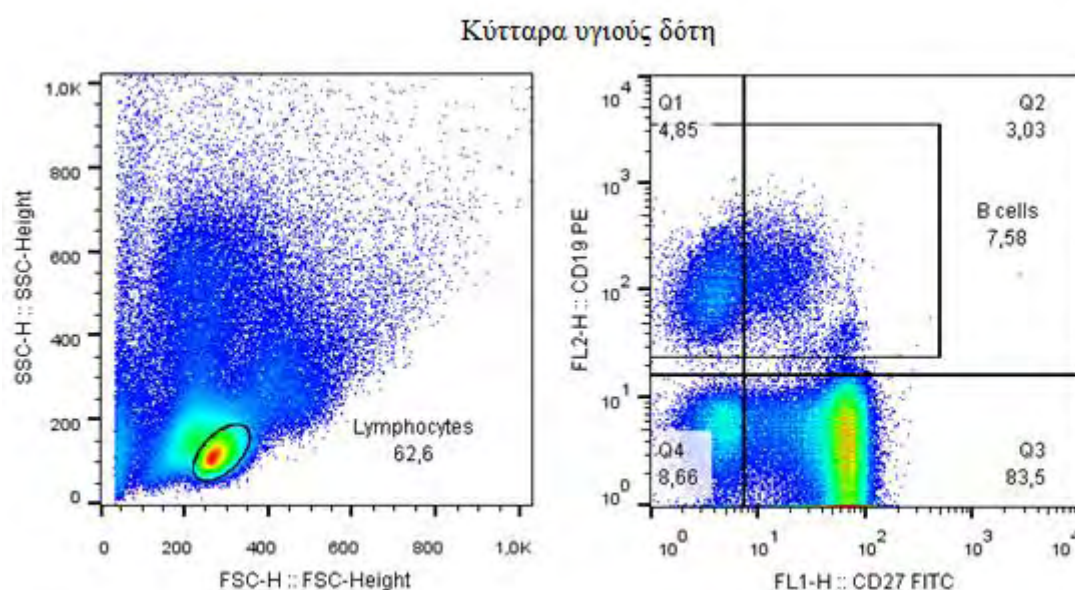


Εικόνα 19: Dot plot κυτταρομετρίας ροής στην οποία παρουσιάζεται η παραγωγή της IFN- γ από τα T λεμφοκύτταρα (πάνω δεξιά τεταρτημόριο) καθώς και από άλλα λεμφοκύτταρα, πιθανότατα από τα NK κύτταρα (κάτω δεξιά τεταρτημόριο). Τα κύτταρα ανήκουν σε ασθενή που πάσχει από ΚΠΣ.

Οι παραπάνω εικόνες είναι χαρακτηριστικές όλων των πειραμάτων που έγιναν μετά από επώαση 24 ωρών με στατίνες για ανίχνευση της IFN- γ . Τα αποτελέσματα έδειξαν μία ελάχιστη επίδραση των στατινών στην παραγωγή της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης, ασχέτως της συγκέντρωσής τους. Κατ' αναλογία, έγινε εν συνεχεία έλεγχος της παραγωγής IL-10 μετά από επώαση με στατίνες.

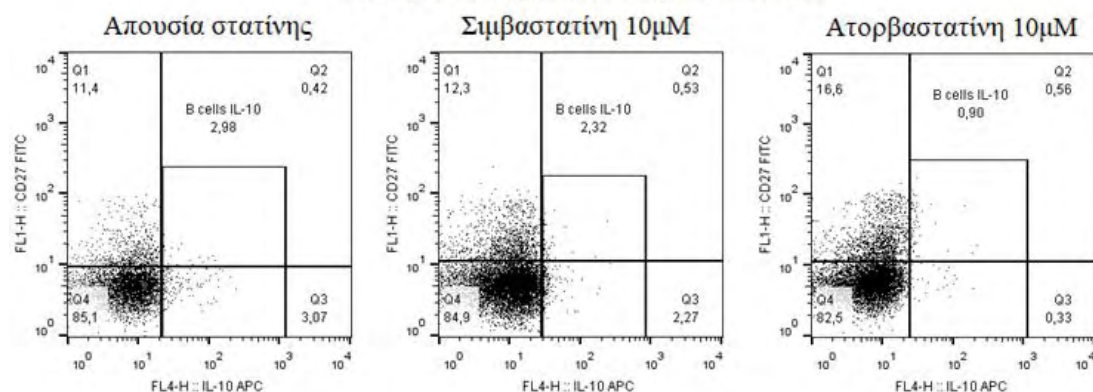
4.4 Επίδραση των στατινών στην παραγωγή της IL-10 από B κύτταρα μετά από επώαση 24h

Στα πειράματα αυτά έγινε επώαση για 24 ώρες με 10μg/ml ODN2006 σε συνδυασμό ή όχι με 1μg/ml CD40L παρουσία είτε σιμβαστατίνης 10μM, είτε ατορβαστατίνης 10μM σε σύγκριση με απουσία στατίνης. Επίσης, για λόγους σύγκρισης έγινε διενέργεια των ίδιων πειραμάτων απουσία διεγερτικών ουσιών. Ακολούθησε κυτταρομετρία ροής με αντισώματα τα αντι-CD19, αντι-CD27 και αντι-IL-10. Έγινε πλήθος επαναλήψεων σε υγιείς δότες για την κανονικοποίηση του πειράματος και μία σε ασθενή με ΚΠΣ.

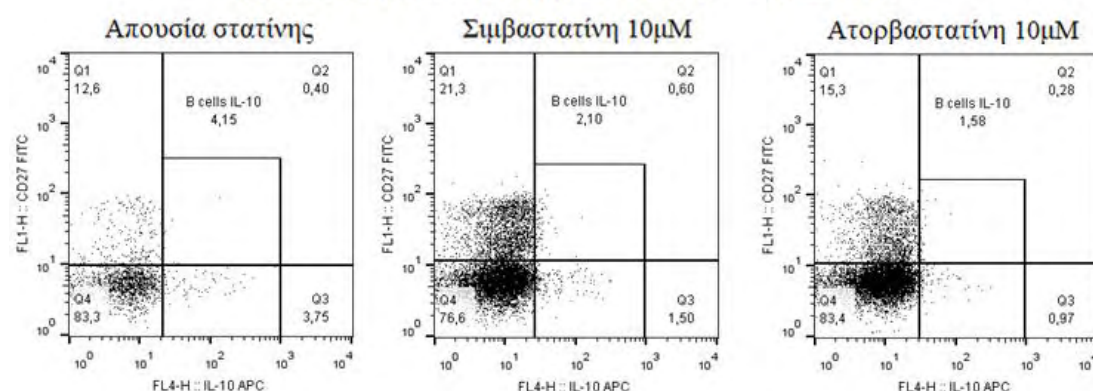


Εικόνα 20: Αριστερά: Dot plot σημάτων πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης στα οποία είναι επιλεγμένος ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων. Δεξιά: Παρουσίαση των προηγούμενως επιλεγμένων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών στην οποία αναγνωρίζονται τα αντιγόνα επιφάνειας CD19 και CD27. Σημειώνονται τα B λεμφοκύτταρα (CD19+), τα οποία μπορούν να χωριστούν σε άωρα (CD19+CD27-) και μνήμης (CD19+CD27+).

Κύτταρα διεγερμένα με 10μg/ml ODN2006

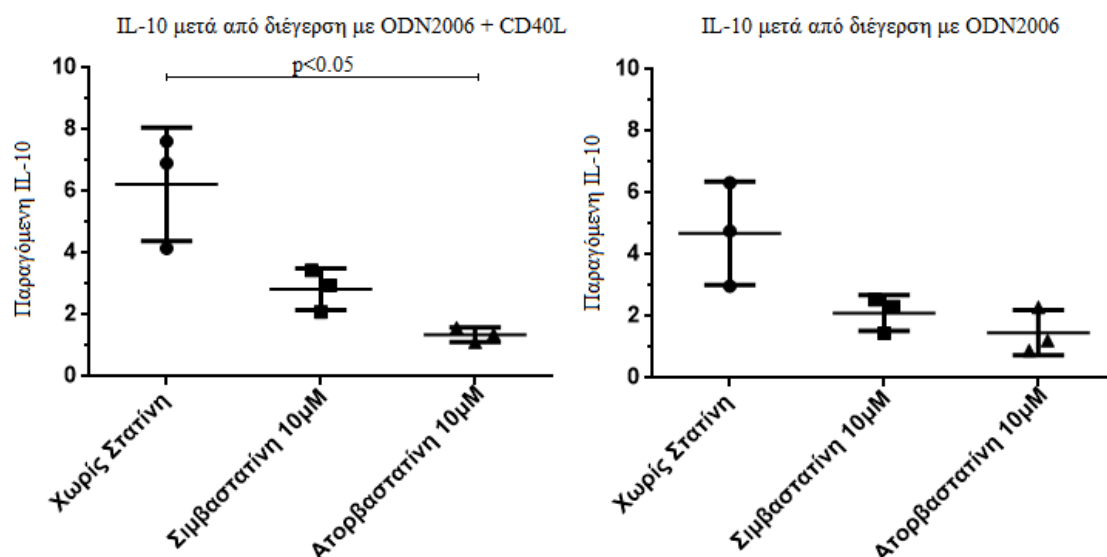


Κύτταρα διεγερμένα με 10μg/ml ODN2006 + 1μg/ml CD40L



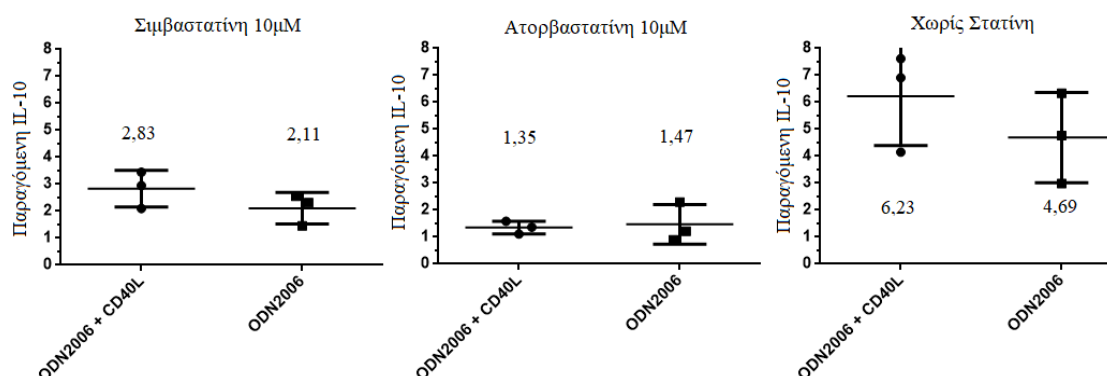
Εικόνα 21: Dot plots κυτταρομετρίας ροής στα οποία παρουσιάζεται η παραγωγή της IL-10 από τα B κύτταρα (B10).

Μπορούμε από την παραπάνω χαρακτηριστική εικόνα να παρατηρήσουμε ότι απουσία του CD40L, η παραγωγή της IL-10 από τα B κύτταρα είναι σχετικά μικρότερη. Αν γίνει ομαδοποίηση όλων των αποτελεσμάτων, η εικόνα που παίρνουμε είναι η ακόλουθη:



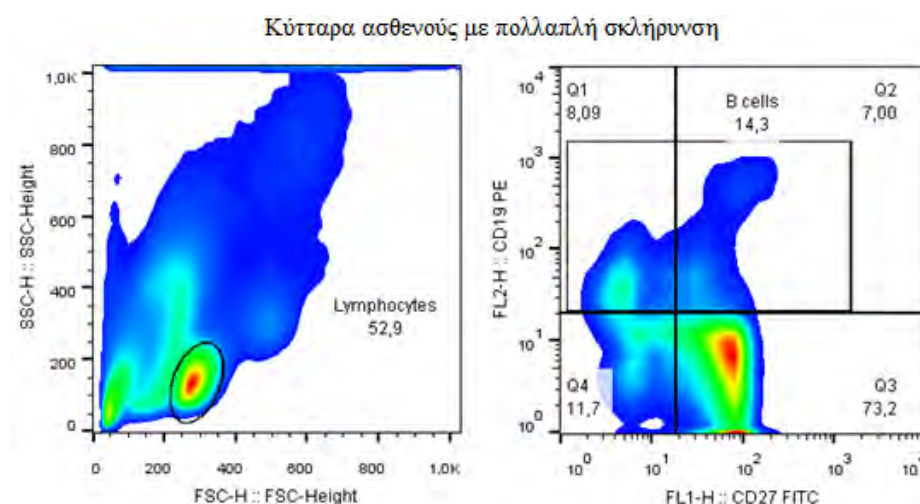
Εικόνα 22: Διάγραμμα διασποράς της παραγόμενης IL-10 παρουσία ή όχι στατίνης μετά από επώαση με 10μg/ml ODN2006 και 1μg/ml CD40L ή μόνο με 10μg/ml ODN2006 για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα αφορούν υγιείς δότες. Η στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση των δοκιμασιών Student's t-test σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

Από την παραπάνω γραφική απεικόνιση μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι στατίνες φαίνεται να έχουν μία αρνητική επίδραση στην παραγωγή της IL-10 από τα B κύτταρα. Η ατορβαστατίνη φαίνεται να έχει μία κάπως σημαντικότερη επίδραση σε σύγκριση με τη συμβαστατίνη. Αυτό φαίνεται άλλωστε και από το γεγονός ότι η διαφορά παραγόμενης IL-10 μεταξύ 10μM ατορβαστατίνης και απουσία στατίνης είναι στατιστικά σημαντική σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% όσον αφορά την επώαση με 10μg/ml ODN2006 και 1μg/ml CD40L. Αξίζει να αναφερθεί ότι αν και διαφαίνεται μία ελαφρά μείωση της παραγόμενης IL-10 όταν από τις διεγερτικές ουσίες λείπει το CD40L, η μείωση αυτή δεν παρατηρείται στην περίπτωση της ατορβαστατίνης, όπως παρουσιάζεται στην ακόλουθη εικόνα.



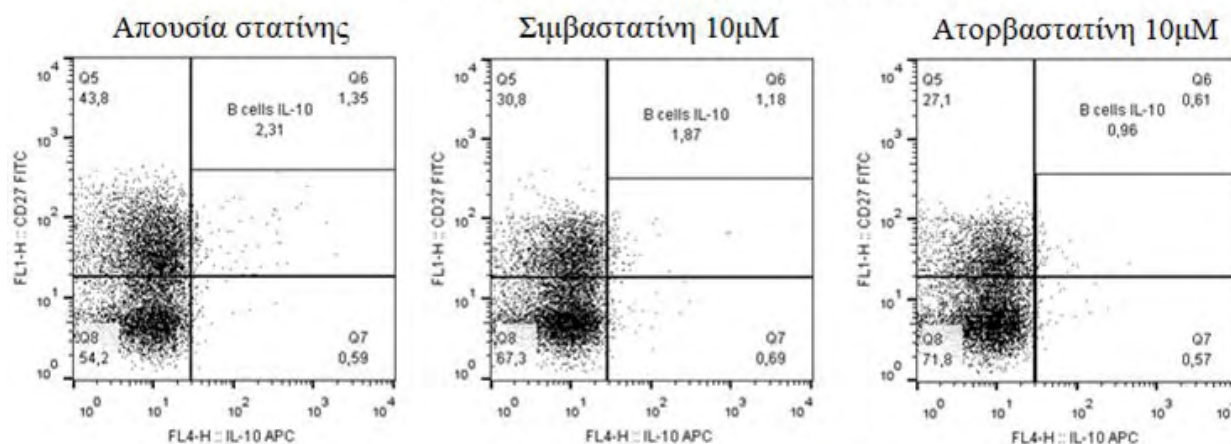
Εικόνα 23: Γραφική σύγκριση της διαφοράς στην παραγωγή IL-10 παρουσία ή όχι του CD40L. Τα αποτελέσματα αφορούν υγιείς δότες.

Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι οι διεγερτικές ουσίες μπορούν να έχουν διαφορετική αλληλεπίδραση με διαφορετικά αντιδραστήρια και να παράγουν ένα διαφορετικό αποτέλεσμα. Στη συνέχεια, έγινε το ίδιο πείραμα παρουσία του CD40L με κύτταρα ασθενή.

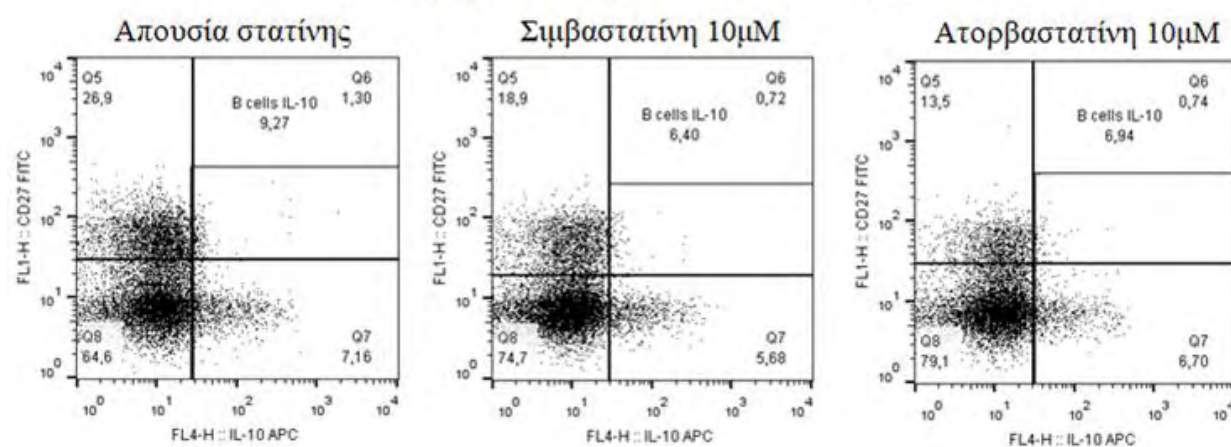


Εικόνα 24: Αριστερά: Density plot σημάτων πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης στα οποία είναι επιλεγμένος ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων. Δεξιά: Παρουσίαση των προηγουμένως επιλεγμένων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών στην οποία αναγνωρίζονται τα αντιγόνα επιφάνειας CD19 και CD27. Σημειώνονται τα B λεμφοκύτταρα (CD19+), τα οποία μπορούν να χωριστούν σε άωρα (CD19+CD27-) και μνήμης (CD19+CD27+).

Κύτταρα απουσία διεγερτικών ουσιών

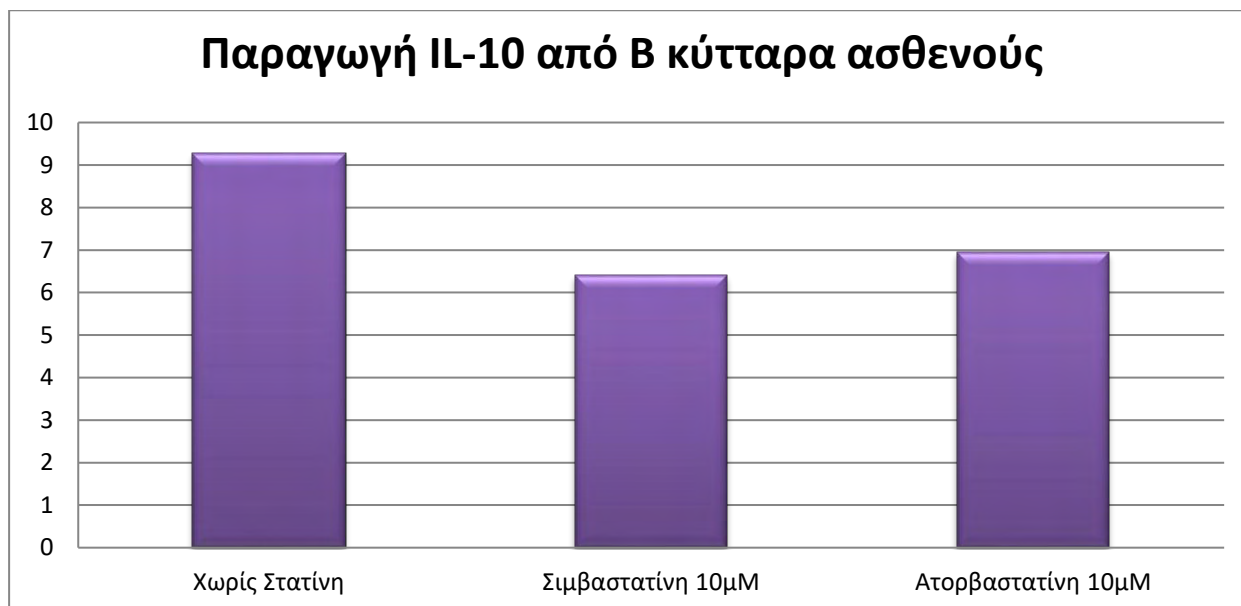


Κύτταρα διεγερμένα με 10μg/ml ODN2006 + 1μg/ml CD40L



Εικόνα 25: Dot plots κυτταρομετρίας ροής στα οποία παρουσιάζεται η παραγωγή της IL-10 από τα B κύτταρα (B10).

Αξίζει να αναφερθεί ότι απουσία διεγερτικών ουσιών, μεγάλο μέρος της IL-10 παράγεται από τα B κύτταρα μνήμης (CD27+). Η εικόνα αυτή αντιστρέφεται μετά από διέγερση με ODN2006 και CD40L: Η παραγωγή της IL-10 γίνεται σχεδόν κατά πλειοψηφία από «transitional» (CD27-) B λεμφοκύτταρα.

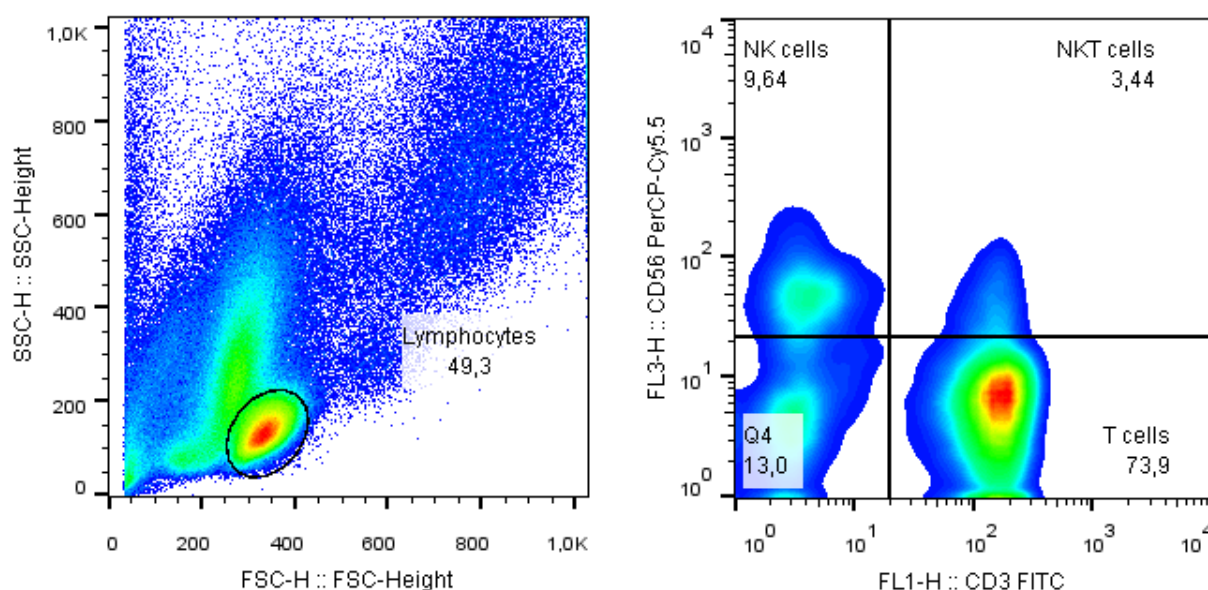


Πίνακας 4: Γραφική απεικόνιση των διαφορών στην παραγωγή της IL-10 από τα B κύτταρα ασθενούς.

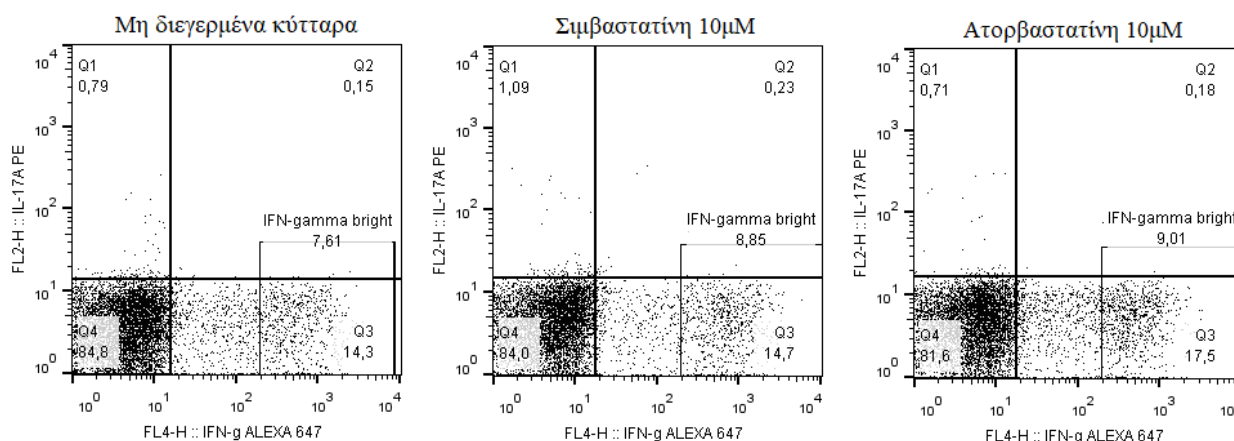
Παρατηρείται, μία μείωση της IL-10 στα κύτταρα που δέχθηκαν στατίνη. Το αποτέλεσμα αυτό μάλλον αναμενόταν με βάση τα προκαταρκτικά πειράματα. Η μείωση αυτή ίσως δεν είναι της τάξης των υγιών δοτών αλλά είναι εντούτοις εξίσου σημαντική. Στη συνέχεια, και εφόσον οι στατίνες έχουν επίδραση στην παραγωγή της ανοσορυθμιστικής κυτταροκίνης IL-10, έγιναν πειράματα με μεγαλύτερες των 24 ωρών επώσεις. Σκοπός ήταν η *in vitro* μεγιστοποίηση της παρατηρούμενης διαφοράς, όσον αφορά τα B10 και η εμφάνιση κάποιας ξεκάθαρης επίδρασης στην έκφραση της IFN-γ, η παραγωγή της οποίας απαιτεί και μεγαλύτερο χρόνο επώασης.

4.5 Επίδραση των στατινών στην παραγωγή IFN- γ από T κύτταρα μετά από επώαση 48h

Κατ' αντιστοιχία με το προηγούμενο πείραμα, έγιναν επωάσεις των κυττάρων υγιών δοτών είτε με 10 μ M συμβαστατίνη, είτε με 10 μ M ατορβαστατίνη, είτε απουσία στατίνης για 48 ώρες, ακολουθούμενες από διέγερση με 20ng/ml PMA και 1 μ g/ml Ιονομυκίνη για 5 ώρες παρουσία Brefeldin A. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής με αντισώματα τα αντι-CD3 και αντι-IFN γ .



Εικόνα 26: Αριστερά: Σήματα πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης στα οποία είναι επιλεγμένος ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων. Δεξιά: Κυτταρομετρία ροής στην οποία αναγνωρίζονται τα αντιγόνα επιφάνειας CD3 και CD56. Οι διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί χωρίζονται στα τεταρτημόρια. Σημειώνονται τα T λεμφοκύτταρα (CD3+CD56-), τα NK κύτταρα (CD3-CD56+) και τα NKT κύτταρα (CD3+CD56+). Τα κύτταρα ανήκουν σε νγιή δότη.

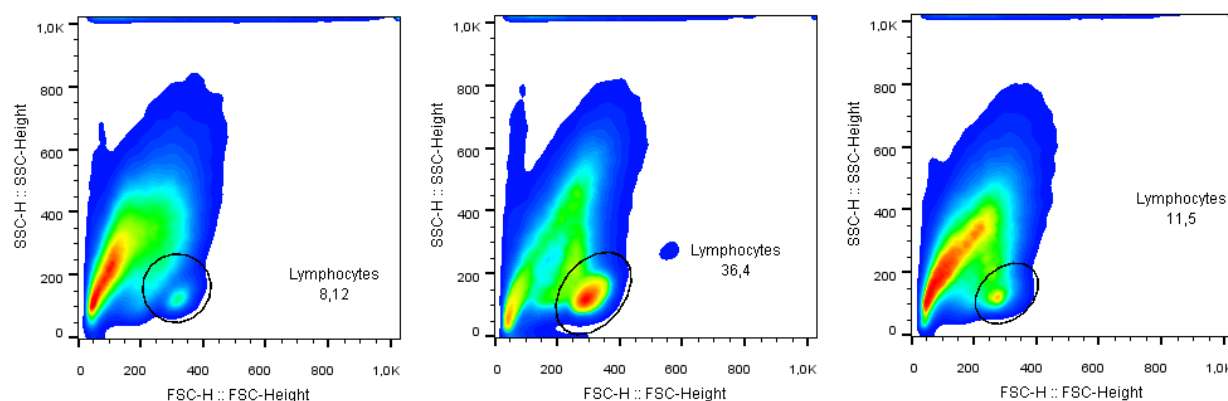


Εικόνα 27: Κυτταρομετρία ροής στην οποία παρουσιάζεται η παραγωγή της IFN- γ και της IL-17 από τα T λεμφοκύτταρα. Είναι σημειωμένος ο πληθυσμός των T λεμφοκυττάρων τα οποία παράγουν IFN- γ σε μεγάλες ποσότητες (IFN-gamma bright). Τα κύτταρα ανήκουν σε νγιή δότη

Όπως φαίνεται και στις παραπάνω ενδεικτικές εικόνες, οι στατίνες μετά και από επώαση 48 ωρών έχουν επίσης μία ελάχιστη – αν και ίσως πιο εμφανή – επιρροή στην παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Παρατηρείται, επιπλέον, μία μικρή αύξηση στο ποσοστό των T κυττάρων τα οποία παράγουν μεγάλες ποσότητες IFN- γ . Τα αποτελέσματα αυτά σίγουρα βρίσκονται στο όριο του πειραματικού λάθους και δεν μπορούν να θεωρηθούν στατιστικά σημαντικά, ειδικά από τη στιγμή που δεν έχει πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός επαναλήψεων, λόγω περιορισμένου αριθμού μονοκυττάρων από τον ίδιο ασθενή/δότη. Κατά συνέπεια, αποφασίστηκε η πραγματοποίηση πειραμάτων μεγαλύτερης επώασης.

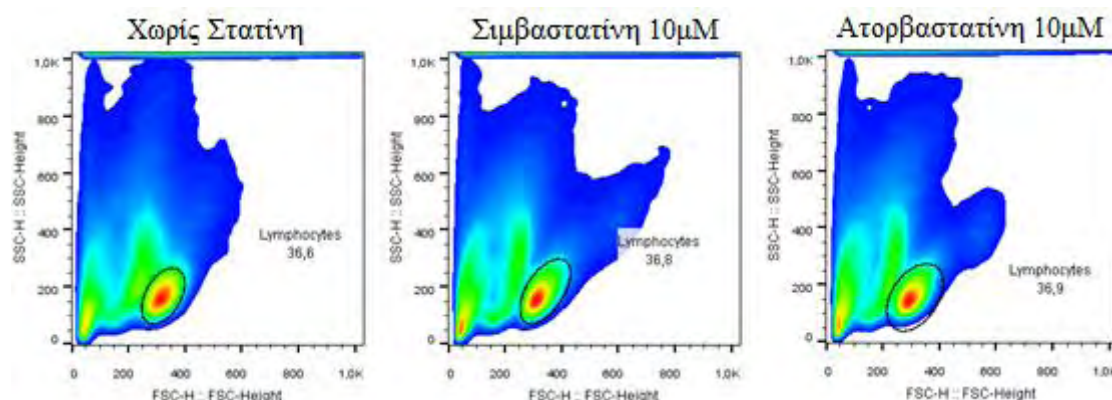
4.6 Επίδραση των στατινών στην παραγωγή IFN- γ από T κύτταρα μετά από επώαση 96h

Μετά από επώαση των κυττάρων παρουσία ή όχι στατίνης για 96 ώρες τα παρατηρούμενα αποτελέσματα ήταν τα εξής:



Εικόνα 28: Density plot σημάτων πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης στα οποία είναι επιλεγμένος ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων μετά από επώαση 96h απουσία IL-2.

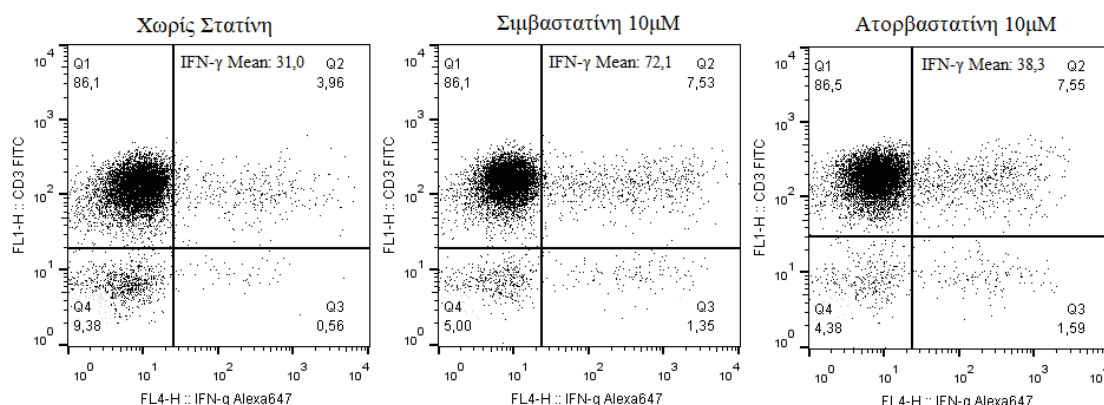
Όπως είναι εμφανές τα κύτταρα έχουν υποστεί σε μεγάλο βαθμό αποπτωτικό θάνατο λόγω της μακροχρόνιας επώασης. Κατά συνέπεια, και μετά από αναζήτηση στη σχετική βιβλιογραφία, έγινε παράλληλη χρήση της ιντερλευκίνης 2. Η IL-2 είναι μία κυτταροκίνη που οδηγεί σε μεγαλύτερη επιβίωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Με βάση τα παραπάνω, πραγματοποιήθηκε επανάληψη των πειραμάτων παρουσία της κυτταροκίνης. Τα συλλεγμένα αποτελέσματα εμφανίζονται στις κάτωθι εικόνες.



Εικόνα 29: Density plot σημάτων πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης στα οποία είναι επιλεγμένος ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων μετά από επώαση 96h παρουσία IL-2. Τα κύτταρα ανήκουν σε υγιή δότη.

Όπως γίνεται αντιληπτό η προσθήκη της IL-2 επέφερε σημαντικές αλλαγές στη βιωσιμότητα του δείγματος. Είναι εμφανές πως ένα σημαντικό ποσοστό των λεμφοκυττάρων έχει επιβιώσει της

τετραήμερης επώασης και οπότε μπορεί να γίνει αξιόπιστη ανάλυση της παραγωγής της IFN- γ , όπως παρουσιάζεται στην ακόλουθη εικόνα.



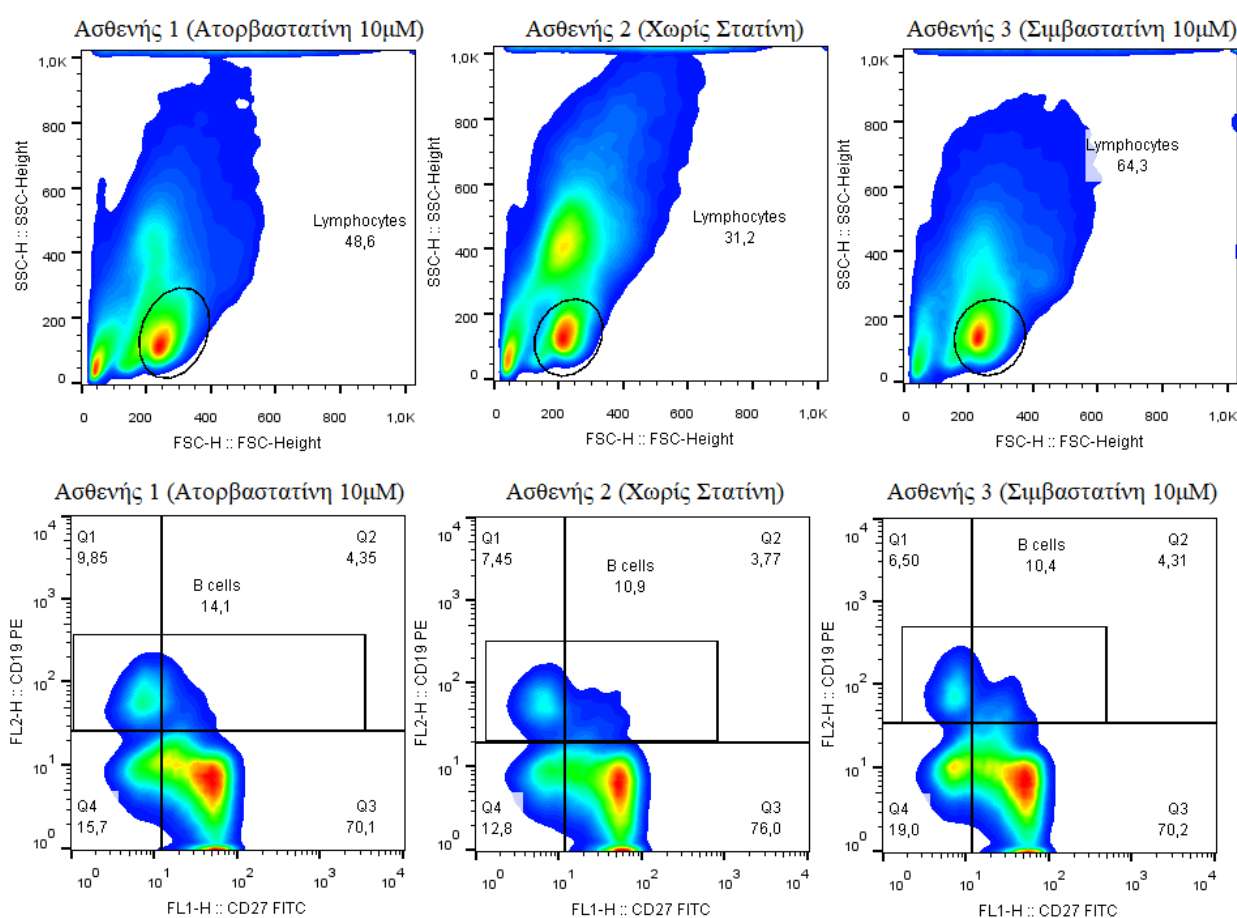
Εικόνα 30: Dot plots κυτταρομετρίας ροής στα οποία παρουσιάζεται η παραγωγή της IFN- γ από τα T λεμφοκύτταρα (πάνω δεξιά τεταρτημόριο) καθώς και από άλλα λεμφοκύτταρα, πιθανότατα από τα NK κύτταρα (κάτω δεξιά τεταρτημόριο). Είναι σημειωμένος ο μέσος όρος των θετικών απορροφήσεων όσον αφορά την IFN- γ .

Στην εικόνα του παραδείγματος διαφαίνεται πως οι στατίνες έχουν προκαλέσει αύξηση της IFN- γ στα T λεμφοκύτταρα, καθώς και στα CD3- λεμφοκύτταρα, από τα οποία τα πιο πιθανά να παράγουν IFN- γ είναι τα NK κύτταρα. Παρατηρείται, δηλαδή, μία γενικότερη αύξηση, σχεδόν διπλασιασμός, της εκφραζόμενης IFN- γ από τον πληθυσμό των λεμφοκυττάρων. Η επιρροή των στατινών όμως δεν αφορά μόνο τον αριθμό των κυττάρων που παράγουν την προφλεγμονώδη αυτή κυτταροκίνη. Η διερεύνηση του μέσου όρου των θετικών απορροφήσεων της IFN- γ , ο οποίος είναι ένα μέτρο της ποσότητας της IFN- γ η οποία παράγεται από τα κύτταρα είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα. Ο μέσος όρος δείχνει πως και οι δύο στατίνες, αλλά κυρίως η συμβαστατίνη, εκτοξεύουν την ποσότητα της κυτταροκίνης που παράγουν τα λεμφοκύτταρα.

Συμπερασματικά, είναι εμφανές ότι μετά από αρκετές μέρες επώασης (96 ώρες) τόσο η συμβαστατίνη όσο και η ατορβαστατίνη επηρεάζουν ιδιαίτερα την παραγωγή της IFN- γ . Προκαλούν μια μεγάλη αύξηση τόσο στον αριθμό των κυττάρων που εκφράζουν IFN- γ , όσο και στην ποσότητα της παραγόμενης κυτταροκίνης. Η ανωτέρω εικόνα δείχνει ένα αποτέλεσμα το οποίο επιβεβαιώνει τα προηγούμενα πειράματα, τα οποία έδειξαν πως οι στατίνες μειώνουν την παραγωγή της IL-10. Είναι σημαντικό παρά ταύτα να δειχθεί αν οι στατίνες έχουν την ικανότητα να μειώνουν την IL-10 ταυτόχρονα με την αύξηση της IFN- γ . Κρίθηκε οπότε απαραίτητο να γίνει αντίστοιχο πείραμα για την παραγωγή της IL-10 παρουσία της IL-2.

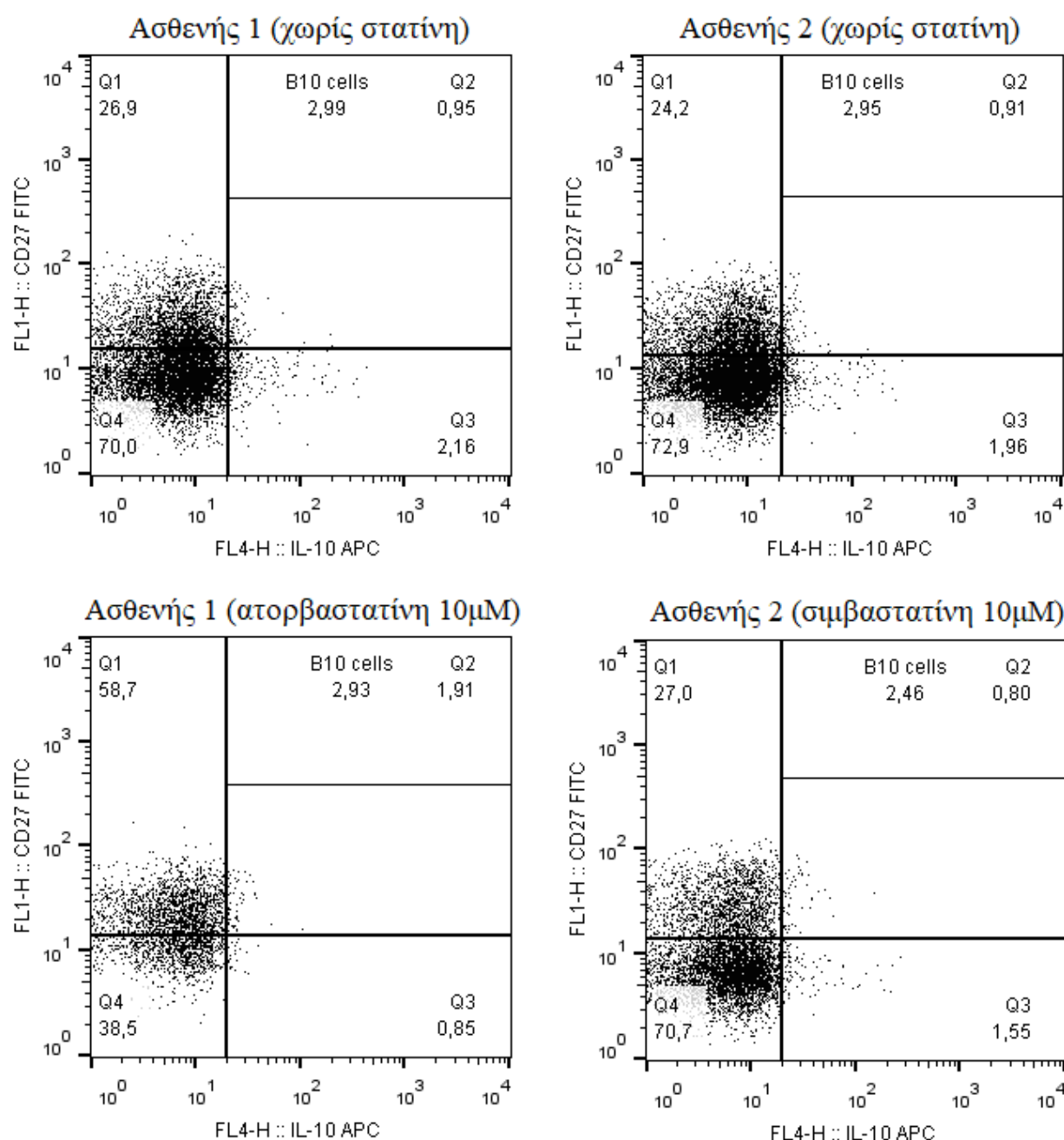
4.7 Επίδραση των στατινών στην παραγωγή της IL-10 από B κύτταρα μετά από επώαση 96h

Πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων με κύτταρα ασθενών που πάσχουν από ΚΠΣ και οι οποίοι δεν έχουν πάρει θεραπεία. Οι ασθενείς αυτοί επιλέχθηκαν λόγω προηγούμενης κυτταρομετρίας ροής στην οποία είχε γίνει εκτίμηση των B10 κυττάρων τους και αυτή ήταν ιδιαίτερα υψηλή (μεγαλύτερη του 10% ως προς τα B λεμφοκύτταρα). Αναμενόταν, κατά συνέπεια, μία υψηλή παραγωγή IL-10. Στα πειράματα αυτά έγινε επώαση των κυττάρων για 96 ώρες με IL-2 παρουσία ή όχι συμβαστατίνης ή ατορβαστατίνης. Τις τελευταίες 24 ώρες της επώασης έγινε διέγερση με 10μg/ml ODN2006 σε συνδυασμό με 1μg/ml CD40L.



Εικόνα 31: Πάνω: Density plot σημάτων πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης στα οποία είναι επιλεγμένος ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων μετά από επώαση 96h παρουσία IL-2. Κάτω: Παρουσίαση των προηγούμενως επιλεγμένων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών στην οποία αναγνωρίζονται τα αντιγόνα επιφάνειας CD19 και CD27. Σημειώνονται τα B λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα ανήκουν σε 3 διαφορετικούς ασθενείς, όπως φαίνονται στην εικόνα.

Τα κύτταρα των ασθενών, κάποια εκ των οποίων παρουσιάζονται ενδεικτικά στην παραπάνω εικόνα, παρουσίασαν ικανοποιητική βιωσιμότητα παρουσία της IL-2, όπως αναμενόταν. Στη συνέχεια, έγινε ανάλυση των B10 των ασθενών, παρουσία ή όχι στατίνης (συμβαστατίνης ή ατορβαστατίνης).



Εικόνα 32: Dot plots κυτταρομετρίας ροής στα οποία παρουσιάζεται η παραγωγή της IL-10 από τα B κύτταρα (B10).

Οι παραπάνω ενδεικτικές εικόνες είναι χαρακτηριστικές όλων των αποτελεσμάτων για όλους τους ασθενείς. Τα B10 κύτταρα δεν παρουσιάζουν διαφορά ανάμεσα σε παρουσία ή όχι στατίνης, ενώ ταυτόχρονα βρίσκονται κάτω από το 30% της προηγούμενης μέτρησής τους, η οποία, όπως προαναφέρθηκε, ξεπερνούσε το 10% ως προς τα B κύτταρα. Συμπερασματικά, υπήρξε κατακερματισμός της παραγωγής IL-10 μετά από 96 ώρες επώασης παρουσία IL-2, ο οποίος δεν έχει σχέση με τις στατίνες.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σκλήρυνση κατά πλάκας είναι μία αυτοάνοση απομυελινωτική νόσος του ΚΝΣ. Αποτελεί τη συχνότερη χρόνια νευρολογική διαταραχή σε νέους ενήλικες με περίπου 2,5 εκατομμύρια νοσούντες παγκοσμίως. Χαρακτηρίζεται από εστιακή λεμφοκυτταρική διήθηση η οποία οδηγεί σε καταστροφή της μυελίνης και των νευρικών ινών. Κατά τη διάρκεια της ασθένειας εμφανίζεται εκτενής μικρογλοιακή ενεργοποίηση, η οποία προκαλεί διαδεδομένο νευροεκφυλισμό με αποτέλεσμα τη σταδιακή συσσώρευση αναπηρίας. Έχει παρατηρηθεί πως τα ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα νοσούντων από ΚΠΣ αποτυγχάνουν να καταστείλουν τα κύτταρα τελεστές. Οι ρυθμιστικές αυτές ελλείψεις έχουν βασικό ρόλο στην εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου (2-6).

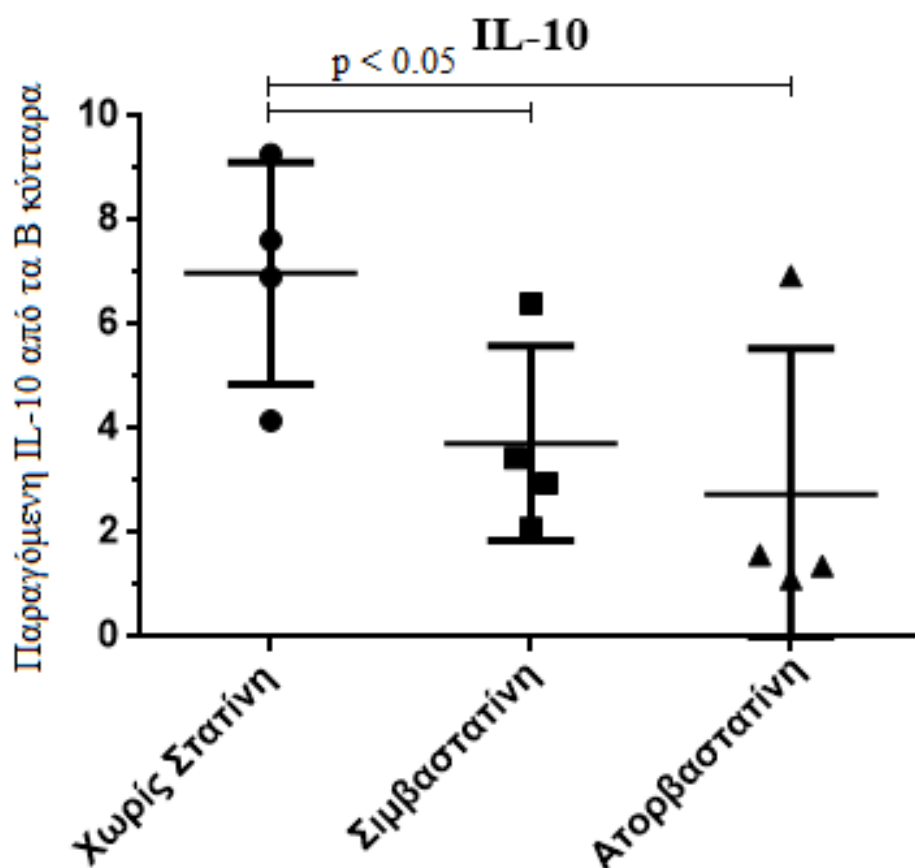
Οι στατίνες είναι γνωστές ως ευρέως χρησιμοποιούμενες οικογένειες φαρμάκων που μειώνουν τη χοληστερόλη για τη θεραπεία των δυσλιπιδαιμιών (175, 177). Ο μεγαλύτερος όγκος της βιβλιογραφίας υποστηρίζει πως οι στατίνες έχουν αντιφλεγμονώδεις και ανοσορυθμιστικές επιδράσεις σε κυτταρικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, πολλές έρευνες έχουν αναλύσει τη θετική επίδραση των στατινών στα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (179, 181, 186).

Ορμώμενοι από τα βιβλιογραφικά δεδομένα αυτά, πραγματοποιήσαμε διερεύνηση της δράσης των στατινών στην ισορροπία ανάμεσα σε ρυθμιστικούς και προφλεγμονώδεις κυτταρικούς πληθυσμούς σε ασθενείς με ΚΠΣ. Πιο συγκεκριμένα, σκοπός ήταν η αξιολόγηση της παραγωγής IFN-γ από τα T λεμφοκύτταρα (TH1 απόκριση) καθώς και της IL-10 από τα B λεμφοκύτταρα (B10 κυτταρικός πληθυσμός).

Κατ' αρχάς, πραγματοποιήθηκε μια αξιολόγηση των διαθέσιμων διεγερτικών μορίων και βρέθηκαν οι βέλτιστες συγκεντρώσεις για κυτταροκαλλιέργειες. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν επώσεις με στατίνες ή χωρίς για 24 ώρες και αξιολόγηση της IFN-γ και της IL-10. Ακολούθως, μετρήθηκε η IFN-γ στις 48 ώρες επώσης. Τέλος, έγιναν πειράματα επώσης 96 ωρών, όπου και χρησιμοποιήθηκε και η IL-2 με στόχο την αποφυγή υπέρμετρης κυτταρικής απόπτωσης από τις μακροχρόνιες επώσεις.

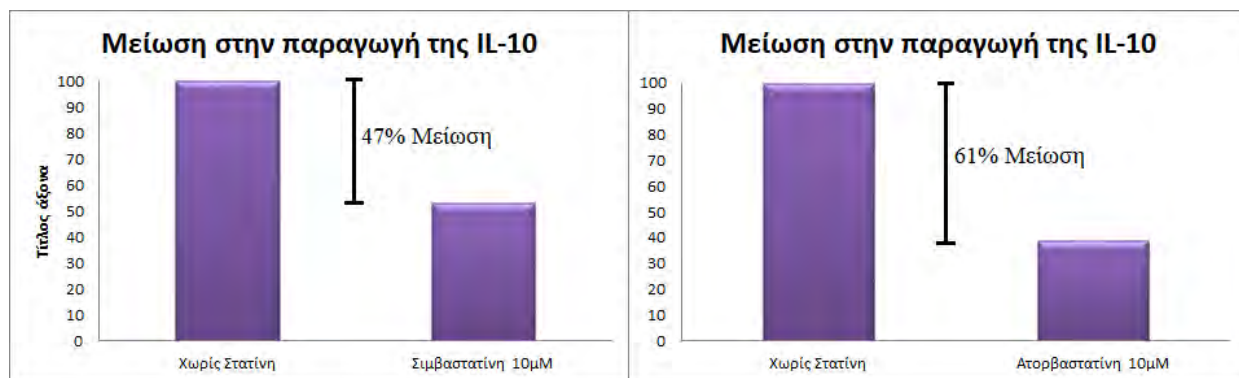
5.1 Οι στατίνες προκαλούν μείωση της IL-10 από τα B κύτταρα

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που προηγήθηκαν δείχνουν ξεκάθαρα πως τόσο η σιμβαστατίνη όσο και η ατορβαστατίνη προκαλούν μία μείωση της παραγόμενης IL-10 από τα B λεμφοκύτταρα. Συνολικά έγινε επώαση στα κύτταρα τεσσάρων δοτών για 24 ώρες. Οι τρεις ήταν υγιείς και ο ένας ήταν διαγνωσμένος με ΚΠΣ. Αν συλλεχθούν όλα αυτά τα αποτελέσματα σε μια κοινή ανάλυση, σχηματίζεται η παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 33: Διάγραμμα διασποράς της παραγόμενης IL-10 παρουσία ή όχι στατίνης μετά από επώαση με 10μg/ml ODN2006 και 1μg/ml CD40L για 24 ώρες. Η στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση των δοκιμασιών Student's t-test σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

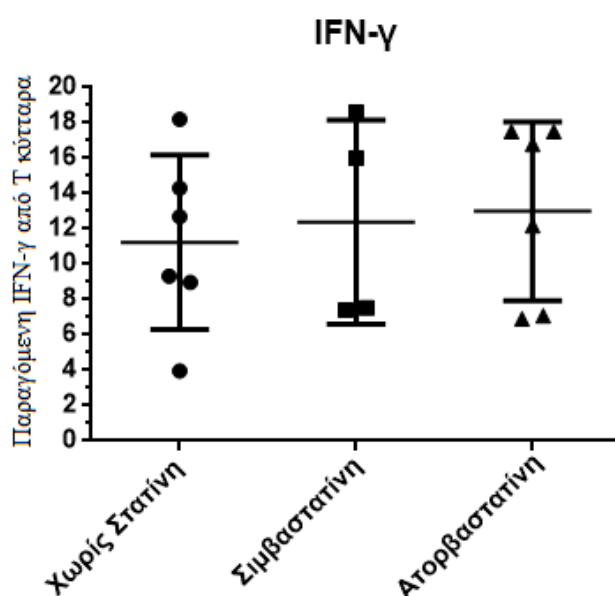
Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε δείχνει προς μία στατιστικά σημαντική διαφορά στην παραγωγή της IL-10 μετά από επώαση με στατίνες σε σύγκριση με το δείγμα χωρίς στατίνες στις 24 ώρες μετά από χρήση ίδιων διεγερτικών μορίων. Μπορούμε, λοιπόν, να συμπεράνουμε πως η διαφορά αυτή οφείλεται στις ίδιες τις στατίνες.



Εικόνα 34: Γραφική απεικόνιση της ποσοστιαίας μείωσης στην παραγωγή της IL-10 λόγω της επώασης με στατίνες. Η μείωση αφορά τον μέσο όρο των δύο δειγμάτων.

Μείωση της παραγωγής IL-10 παρατήρησαν και οι Desai et al.(184) όπου 10μM συμβαστατίνης, μείωσαν και την παραγωγή IL-10 κατά 62% σε ασθενείς με ΚΠΣ, ενώ σε υγιείς δότες η μείωση ήταν της τάξης του 30%. Αντίστοιχα, στα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήσαμε, σημειώθηκε μέση μείωση όλων των δειγμάτων κατά 47% για τη συμβαστατίνη και κατά 61% για την ατορβαστατίνη. Μείωση στην IL-10 ανέφεραν, επίσης, και οι Ferrari et al. (185) μετά από επώαση με συμβαστατίνη και LPS των κυττάρων ασθενών με οξεία νεφρική βλάβη.

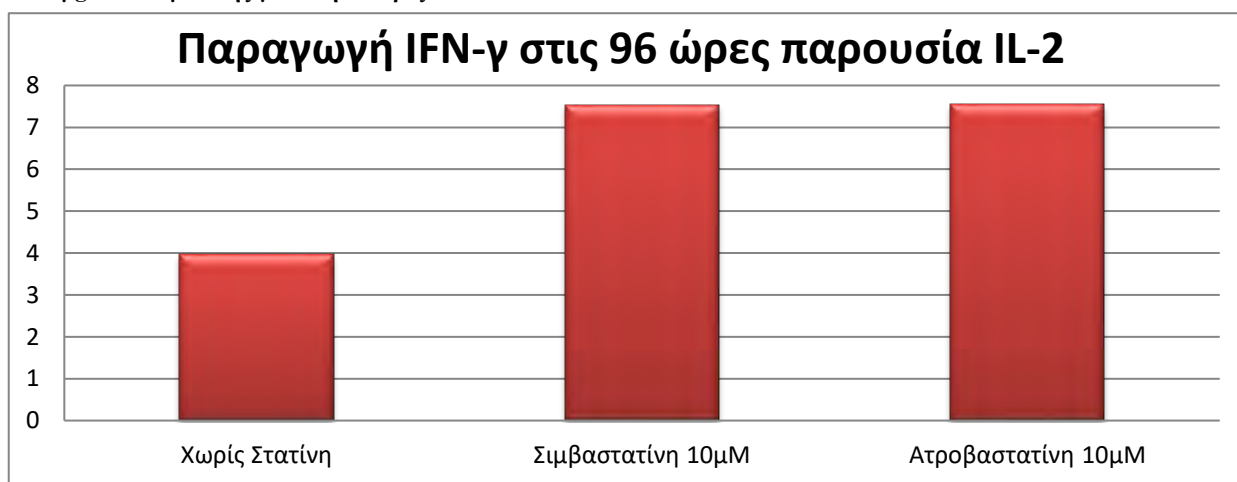
5.2 Ένδειξη πως οι στατίνες αυξάνουν την IFN- γ από τα Τ κύτταρα



Εικόνα 36: Διάγραμμα διασποράς της παραγόμενης IFN- γ παρουσία ή όχι στατίνης μετά από επώαση με 20ng/ml PMA και 1μg/ml Ιονομυκίνης για 24 ή 48 ώρες.

Πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων για τη διερεύνηση της επιρροής των στατινών στην IFN- γ . Οι επώσεις έγιναν στις 24, 48 και 96 ώρες. Στις 24 και στις 48 ώρες δε διαφάνηκε κάποια διαφορά ανάμεσα στην παρουσία και την απουσία στατίνης. Στις 96 ώρες κρίθηκε απαραίτητη η χρήση της IL-2, για να επιτευχθεί η επιβίωση ενός ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων ώστε να θεωρηθεί αξιόπιστη η μέτρηση. Στις συνθήκες αυτές εμφανίστηκε

ένα ενδιαφέρον αποτέλεσμα:



Εικόνα 35: Γραφική απεικόνιση των διαφορών στην παραγωγή της IFN- γ από τα Τ κύτταρα υγιούς δότη.

Στην παραπάνω γραφική απεικόνιση βλέπουμε μία ξεκάθαρη αύξηση στα Τ λεμφοκύτταρα τα οποία εκφράζουν την IFN- γ μετά από 96 ώρες επώασης. Επιπλέον, όπως έχει δείχθει προηγουμένως, παρατηρήθηκε πως οι στατίνες ενισχύουν και την ποσότητα της κυτταροκίνης που παράγουν τα λεμφοκύτταρα. Αυτά τα δεδομένα, αν και εξαιρετικά ενδεικτικά λόγω του μικρού αριθμού ατόμων που αναλύθηκαν, συγκλίνουν στο αρχικό συμπέρασμα ότι οι στατίνες μάλλον στρέφουν τα κύτταρα προς μια φλεγμονώδη Th1 αντίδραση. Αύξηση της παραγόμενης IFN- γ από Τ κύτταρα ανέφεραν, εξάλλου, και οι Coward et al., (183) οι οποίοι, επίσης, χρησιμοποίησαν σιμβαστατίνη και ατορβαστατίνη. Οι ερευνητές ισχυρίστηκαν ότι οι στατίνες προκάλεσαν προφλεγμονώδεις αντιδράσεις σε ενεργοποιημένα PBMCs υγιών δοτών μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-1, της IL-18 και της IL-12 από μονοκύτταρα.

5.3 Επίδραση των στατινών στην ισορροπία ανάμεσα σε ρυθμιστικούς και προφλεγμονώδεις κυτταρικούς πληθυσμούς σε ασθενείς με ΚΠΣ

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έριξαν αρκετό φως στο ποια είναι η επιρροή των στατινών στο ισοζύγιο μεταξύ ρυθμιστικών και προφλεγμονοδών κυτταρικών πληθυσμών. Βέβαια, μεγάλο μέρος των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε σε υγιείς δότες, όπως και αναφέρεται άλλωστε, οπότε δεν μπορούμε να βγάλουμε ένα ασφαλές συμπέρασμα για τους ασθενείς που πάσχουν από πολλαπλή σκλήρυνση. Παρά ταύτα, τα περισσότερα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον μία φορά σε ασθενή και τα αποτελέσματα, όπως και παρουσιάστηκε, συνάδουν με αυτά των υγιών δοτών. Κατά συνέπεια, δίνεται η δυνατότητα να γίνει μία συζήτηση πάνω στο ρόλο των στατινών στην ήδη διαταραγμένη ισορροπία ανάμεσα σε ανοσολογική ρύθμιση και φλεγμονή σε ασθενείς που πάσχουν από ΚΠΣ.

Κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, αποδείχθηκε πως οι στατίνες προκαλούν μια μείωση της IL-10 από τα Β κύτταρα. Το συγκεκριμένο εύρημα είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον καθώς μέρος της κυτταροκίνης αυτής παράγεται από τα B10 κύτταρα. Όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή, ο κυτταρικός αυτός υποπληθυσμός ανοίκει στα Bregs και χαρακτηρίζεται από την παραγωγή της IL-10. Όπως φαίνεται από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, οι στατίνες, αν και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αυξάνουν τον αριθμό και τη λειτουργικότητα των Tregs, δεν κάνουν κάτι αντίστοιχο για τα B10. Αντιθέτως, φαίνεται να τα καταστέλλουν.

Αντίστοιχα υποδεικνύεται μία επίδραση των στατινών στην παραγωγή της IFN- γ από τα T λεμφοκύτταρα. Αν και στις επώσεις 24 και 48 ωρών δεν υπάρχει εμφανής διαφορά από τη δράση των στατινών, η εικόνα αλλάζει άρδην στις επώσεις 96 ωρών, παρουσία IL-2. Αν και, λόγω έλλειψης ικανοποιητικού αριθμού πειραμάτων δεν μπορούμε να βγάλουμε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα, η εικόνα που εμφανίζεται είναι ξεκάθαρη. Οι στατίνες οδήγησαν σχεδόν σε διπλασιασμό των κυττάρων που εκφράζουν την IFN- γ , ταυτόχρονα με μία αύξηση της ποσότητας που παράγεται ανά κύτταρο. Η IFN- γ , όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, είναι μία προφλεγμονώδης κυτταροκίνη η οποία οδηγεί στη διαφοροποίηση των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων προς ένα φλεγμονώδη T_H1 φαινότυπο. Μπορούμε, κατά συνέπεια, να ισχυριστούμε πως υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις ότι οι στατίνες προκαλούν στροφή προς μία T_H1 λεμφοκυτταρική απόκριση, τουλάχιστον σε κάποια άτομα. Αυτό είναι ένα φαινόμενο που σε περιπτώσεις αυτοανοσίας, όπως είναι η ΚΠΣ, θεωρείται αρνητικό για την ανοσορύθμιση.

5.4 Επίλογος

Με βάση τα συμπεράσματα που συζητήθηκαν εκτενώς στο προηγούμενο κεφάλαιο μπορεί κάποιος να αναρωτηθεί: Έχουν πράγματι οι στατίνες αντιφλεγμονώδεις και ανοσορυθμιστικές επιδράσεις σε κυτταρικό επίπεδο ή συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο; Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν δείχνουν να αμφισβητούν την πρώτη τοποθέτηση και συγκλίνουν προς την δεύτερη. Παρά ταύτα, η αλήθεια ίσως είναι πιο πολύπλοκη από μία απλή καταφατική ή αρνητική απάντηση. Είναι σημαντικό να γίνει ένας μεγάλος αριθμός πειραμάτων κάτω από τις ίδιες συνθήκες ώστε να μπορέσουμε να καταλήξουμε σε ένα ασφαλές συμπέρασμα. Λόγω του περιορισμένου αριθμού κυττάρων ανά δόση και του περιορισμένου συνολικού χρόνου εκπόνησης της μελέτης δεν κατέστη δυνατόν να μελετηθεί μεγάλος αριθμός δειγμάτων. Ωστόσο, η μελέτη οδήγησε στην ανεύρεση των καταλληλότερων συνθηκών επώασης και ερεθισμάτων στα οποία πρέπει να επικεντρωθεί η μελέτη των μεγάλων ομάδων από ασθενείς και υγιείς δότες. Θα μπορούσε μελλοντικά να γίνει μία προσπάθεια για μακροχρόνιες επώσεις με στατίνες για να διερευνηθεί ο ρόλος τους τόσο στην παραγωγή IFN- γ όσο και στην παραγωγή IL-10. Για να είναι αποτελεσματικό κάτι τέτοιο και να είναι δυνατή η παρατήρηση διαφορών όσων αφορά την IL-10 θα πρέπει να αποφευχθεί η χρήση της IL-2 στα B κύτταρα. Ένας πιθανός τρόπος για να επιτευχθεί αυτό θα ήταν να γίνει μαγνητικός διαχωρισμός των T και των B λεμφοκυττάρων από κάθε δείγμα και να ακολουθήσουν ξεχωριστές επώσεις με στατίνες. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η χρήση IL-2 στα B κύτταρα και αυξάνονται οι πιθανότητες για κάποιο καλύτερο αποτέλεσμα.

Παρά τον όγκο της βιβλιογραφίας για τις επιδράσεις πάνω στα Tregs, δυστυχώς δεν υπάρχουν αντίστοιχες έρευνες που να αφορούν τα Bregs. Μία διερεύνηση της επίδρασης των στατινών πάνω στους δύο αυτούς ρυθμιστικούς κυτταρικούς πληθυσμούς και στο πώς επηρεάζεται η μεταξύ τους σχέση και αλληλεπίδραση θα μπορούσε να είναι ιδιαίτερα διαφωτιστικό. Τέλος, μια τέτοια έρευνα θα μπορούσε να φανεί και ιδιαίτερα χρήσιμη, μιας και οι στατίνες – στο ενδεχόμενο που έχουν πράγματι μια αποδεδειγμένη αντιφλεγμονώδη, ανοσορυθμιστική και νευροπροστατευτική δράση – θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν σε περιπτώσεις ασθενών που πάσχουν από ΚΠΣ – ή από άλλα αυτοάνοσα, νευρολογικά ή μη, νοσήματα – με στόχο τη βελτίωση των συμπτωμάτων και κατ' επέκταση την ποιότητα ζωής των ασθενών.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annual review of immunology*. 2012;30:221-41.
2. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2000;343(13):938-52.
3. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008;372(9648):1502-17.
4. Dargahi N, Katsara M, Tselios T, Androutsou ME, de Courten M, Matsoukas J, et al. Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. *Brain sciences*. 2017;7(7).
5. Salapa HE, Lee S, Shin Y, Levin MC. Contribution of the Degeneration of the Neuro-Axonal Unit to the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Brain sciences*. 2017;7(6).
6. Ghasemi N, Razavi S, Nikzad E. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. *Cell journal*. 2017;19(1):1-10.
7. Kaunzner UW, Gauthier SA. MRI in the assessment and monitoring of multiple sclerosis: an update on best practice. *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2017;10(6):247-61.
8. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-52.
9. Schmidt C. Biology: A degenerative affliction. *Nature*. 2016;540(7631):S2-S3.
10. Howard J, Trevick S, Younger DS. Epidemiology of Multiple Sclerosis. *Neurologic clinics*. 2016;34(4):919-39.
11. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Multiple sclerosis and related disorders*. 2017;14:35-45.
12. Salzer J, Hallmans G, Nystrom M, Stenlund H, Wadell G, Sundstrom P. Vitamin D as a protective factor in multiple sclerosis. *Neurology*. 2012;79(21):2140-5.
13. Kimball SM, Ursell MR, O'Connor P, Vieth R. Safety of vitamin D3 in adults with multiple sclerosis. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;86(3):645-51.
14. Wandinger K, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenber P, Wagner H, et al. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology*. 2000;55(2):178-84.
15. Pilli D, Zou A, Tea F, Dale RC, Brilot F. Expanding Role of T Cells in Human Autoimmune Diseases of the Central Nervous System. *Frontiers in immunology*. 2017;8:652.
16. Paz-Ballesteros WC, Monterrubio-Flores EA, de Jesus Flores-Rivera J, Corona-Vazquez T, Hernandez-Giron C. Cigarette Smoking, Alcohol Consumption and Overweight in Multiple Sclerosis: Disability Progression. *Archives of medical research*. 2017;48(1):113-20.
17. Sadovnick AD, Ebers GC, Dymment DA, Risch NJ. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet*. 1996;347(9017):1728-30.
18. Willer CJ, Dymment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC, Canadian Collaborative Study G. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(22):12877-82.
19. Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe JW, Miller DH, Compston DA. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology*. 1994;44(1):11-5.
20. Robertson NP, Clayton D, Fraser M, Deans J, Compston DA. Clinical concordance in sibling pairs with multiple sclerosis. *Neurology*. 1996;47(2):347-52.
21. Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature*. 1995;377(6545):150-1.
22. Ebers GC, Sadovnick AD, Dymment DA, Yee IM, Willer CJ, Risch N. Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations in half-siblings. *Lancet*. 2004;363(9423):1773-4.
23. Lindsey JW. Familial recurrence rates and genetic models of multiple sclerosis. *American journal of medical genetics Part A*. 2005;135(1):53-8.

24. International Multiple Sclerosis Genetics C, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *The New England journal of medicine*. 2007;357(9):851-62.
25. De Jager PL, Jia X, Wang J, de Bakker PI, Ottoboni L, Aggarwal NT, et al. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nature genetics*. 2009;41(7):776-82.
26. Australia, New Zealand Multiple Sclerosis Genetics C. Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nature genetics*. 2009;41(7):824-8.
27. Jakkula E, Leppa V, Sulonen AM, Varilo T, Kallio S, Kemppinen A, et al. Genome-wide association study in a high-risk isolate for multiple sclerosis reveals associated variants in STAT3 gene. *American journal of human genetics*. 2010;86(2):285-91.
28. Ban M, Goris A, Lorentzen AR, Baker A, Mihalova T, Ingram G, et al. Replication analysis identifies TYK2 as a multiple sclerosis susceptibility factor. *European journal of human genetics : EJHG*. 2009;17(10):1309-13.
29. International Multiple Sclerosis Genetics C. Comprehensive follow-up of the first genome-wide association study of multiple sclerosis identifies KIF21B and TMEM39A as susceptibility loci. *Human molecular genetics*. 2010;19(5):953-62.
30. Ban M, McCauley JL, Zuvich R, Baker A, Bergamaschi L, Cox M, et al. A non-synonymous SNP within membrane metalloendopeptidase-like 1 (MMEL1) is associated with multiple sclerosis. *Genes and immunity*. 2010;11(8):660-4.
31. Sanna S, Pitzalis M, Zoledziwska M, Zara I, Sidore C, Murru R, et al. Variants within the immunoregulatory CBLB gene are associated with multiple sclerosis. *Nature genetics*. 2010;42(6):495-7.
32. Renaudineau Y, Youinou P. Epigenetics and autoimmunity, with special emphasis on methylation. *The Keio journal of medicine*. 2011;60(1):10-6.
33. Mastronardi FG, Noor A, Wood DD, Paton T, Moscarello MA. Peptidyl argininedeiminase 2 CpG island in multiple sclerosis white matter is hypomethylated. *Journal of neuroscience research*. 2007;85(9):2006-16.
34. Lill CM. Recent advances and future challenges in the genetics of multiple sclerosis. *Frontiers in neurology*. 2014;5:130.
35. Morris AC, Spangler WE, Boss JM. Methylation of class II trans-activator promoter IV: a novel mechanism of MHC class II gene control. *Journal of immunology*. 2000;164(8):4143-9.
36. Calabrese R, Valentini E, Ciccarone F, Guastafierro T, Bacalini MG, Ricigliano VA, et al. TET2 gene expression and 5-hydroxymethylcytosine level in multiple sclerosis peripheral blood cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1842(7):1130-6.
37. Maiti A, Drohat AC. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(41):35334-8.
38. Fagone P, Mangano K, Di Marco R, Touil-Boukoffa C, Chikovan T, Signorelli S, et al. Expression of DNA methylation genes in secondary progressive multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2016;290:66-9.
39. Bos SD, Page CM, Andreassen BK, Elboudwarej E, Gustavsen MW, Briggs F, et al. Genome-wide DNA methylation profiles indicate CD8+ T cell hypermethylation in multiple sclerosis. *PloS one*. 2015;10(3):e0117403.
40. Webb LM, Guerau-de-Arellano M. Emerging Role for Methylation in Multiple Sclerosis: Beyond DNA. *Trends in molecular medicine*. 2017;23(6):546-62.
41. Sokratous M, Dardiotis E, Tsouris Z, Bellou E, Michalopoulou A, Siokas V, et al. Deciphering the role of DNA methylation in multiple sclerosis: emerging issues. *Auto- immunity highlights*. 2016;7(1):12.

42. Bielekova B, Sung MH, Kadom N, Simon R, McFarland H, Martin R. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4⁺ T cells in multiple sclerosis. *Journal of immunology*. 2004;172(6):3893-904.
43. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *The New England journal of medicine*. 2006;354(9):942-55.
44. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(2):233-40.
45. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(7):971-9.
46. Shi Y, Feng Y, Kang J, Liu C, Li Z, Li D, et al. Critical regulation of CD4⁺ T cell survival and autoimmunity by beta-arrestin 1. *Nature immunology*. 2007;8(8):817-24.
47. Steinman L, Zamvil S. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(6):483-92.
48. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 1998;338(5):278-85.
49. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Bruck W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain : a journal of neurology*. 2002;125(Pt 10):2202-12.
50. Anderson JM, Hampton DW, Patani R, Pryce G, Crowther RA, Reynolds R, et al. Abnormally phosphorylated tau is associated with neuronal and axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2008;131(Pt 7):1736-48.
51. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Bruck W, Rauschka H, Bergmann M, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2005;128(Pt 11):2705-12.
52. Stampanoni Bassi M, Mori F, Buttari F, Marfia GA, Sancesario A, Centonze D, et al. Neurophysiology of synaptic functioning in multiple sclerosis. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*. 2017;128(7):1148-57.
53. Love S. Demyelinating diseases. *Journal of clinical pathology*. 2006;59(11):1151-9.
54. Michael C Levin SL, Lidia A Gardner, Yoojin Shin, Joshua N Douglas, Chassidy J Groover. Pathogenic mechanisms of neurodegeneration based on the phenotypic expression of progressive forms of immune-mediated neurologic disease. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*. 2012;2012:2:175-87.
55. Huizinga R, Gerritsen W, Heijmans N, Amor S. Axonal loss and gray matter pathology as a direct result of autoimmunity to neurofilaments. *Neurobiology of disease*. 2008;32(3):461-70.
56. Levin MC, Lee S, Gardner LA, Shin Y, Douglas JN, Cooper C. Autoantibodies to Non-myelin Antigens as Contributors to the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Journal of clinical & cellular immunology*. 2013;4.
57. Black JA, Newcombe J, Trapp BD, Waxman SG. Sodium channel expression within chronic multiple sclerosis plaques. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2007;66(9):828-37.
58. Orr HT. Are polyglutamine diseases expanding? *Neuron*. 2011;70(3):377-8.
59. Ramaswami M TJ, Parker R. Altered ribostasis: RNA-protein granules in degenerative disorders. *Cell*. 2013;15(154(4)):727-36.
60. Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Hoftberger R, Botond G, et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain : a journal of neurology*. 2011;134(Pt 7):1914-24.
61. Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nature reviews Neurology*. 2014;10(4):225-38.

62. Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends in immunology*. 2007;28(1):5-11.
63. Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunological reviews*. 2012;248(1):87-103.
64. Broux B, Stinissen P, Hellings N. Which immune cells matter? The immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Critical reviews in immunology*. 2013;33(4):283-306.
65. Dolei A, Garson JA, Arru G, Clerici M, Germi R, Marche PN, et al. Multiple sclerosis-associated retrovirus and related human endogenous retrovirus-W in patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2014;266(1-2):87-8.
66. Hoglund RA, Maghazachi AA. Multiple sclerosis and the role of immune cells. *World journal of experimental medicine*. 2014;4(3):27-37.
67. Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunology today*. 2000;21(10):479-83.
68. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological reviews*. 2004;202:8-32.
69. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annual review of immunology*. 2003;21:713-58.
70. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology*. 2005;6(11):1123-32.
71. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology*. 2005;6(11):1133-41.
72. van der Gast CJ, Gosling P, Tiwari B, Bending GD. Spatial scaling of arbuscular mycorrhizal fungal diversity is affected by farming practice. *Environmental microbiology*. 2011;13(1):241-9.
73. Ma CS, Chew GY, Simpson N, Priyadarshi A, Wong M, Grimbacher B, et al. Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(7):1551-7.
74. Crome SQ, Wang AY, Kang CY, Levings MK. The role of retinoic acid-related orphan receptor variant 2 and IL-17 in the development and function of human CD4⁺ T cells. *European journal of immunology*. 2009;39(6):1480-93.
75. Marwaha AK, Leung NJ, McMurchy AN, Levings MK. TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic? *Frontiers in immunology*. 2012;3:129.
76. Hoe E, Anderson J, Nathanielsz J, Toh ZQ, Marimla R, Balloch A, et al. The contrasting roles of Th17 immunity in human health and disease. *Microbiology and immunology*. 2017;61(2):49-56.
77. Montes M, Zhang X, Berthelot L, Laplaud DA, Brouard S, Jin J, et al. Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. *Clinical immunology*. 2009;130(2):133-44.
78. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scandinavian journal of immunology*. 2011;74(1):1-13.
79. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain : a journal of neurology*. 2007;130(Pt 4):1089-104.
80. Hestvik AL. The double-edged sword of autoimmunity: lessons from multiple sclerosis. *Toxins*. 2010;2(4):856-77.
81. Yang Q, Goding SR, Hokland ME, Basse PH. Antitumor activity of NK cells. *Immunologic research*. 2006;36(1-3):13-25.
82. Kaur G, Trowsdale J, Fugger L. Natural killer cells and their receptors in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2013;136(Pt 9):2657-76.

83. Oberg L, Johansson S, Michaelsson J, Tomasello E, Vivier E, Karre K, et al. Loss or mismatch of MHC class I is sufficient to trigger NK cell-mediated rejection of resting lymphocytes in vivo - role of KARAP/DAP12-dependent and -independent pathways. *European journal of immunology*. 2004;34(6):1646-53.
84. Maghazachi AA. Role of Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis,. *ISRN Immunology*. 2012; vol. 2012.
85. Xu W, Fazekas G, Hara H, Tabira T. Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*. 2005;163(1-2):24-30.
86. Huang D, Shi FD, Jung S, Pien GC, Wang J, Salazar-Mather TP, et al. The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(7):896-905.
87. Winkler-Pickett R, Young HA, Cherry JM, Diehl J, Wine J, Back T, et al. In vivo regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by NK cells: alteration of primary adaptive responses. *Journal of immunology*. 2008;180(7):4495-506.
88. Vollmer TL, Liu R, Price M, Rhodes S, La Cava A, Shi FD. Differential effects of IL-21 during initiation and progression of autoimmunity against neuroantigen. *Journal of immunology*. 2005;174(5):2696-701.
89. Claes N, Fraussen J, Stinissen P, Hupperts R, Somers V. B Cells Are Multifunctional Players in Multiple Sclerosis Pathogenesis: Insights from Therapeutic Interventions. *Frontiers in immunology*. 2015;6:642.
90. Nylander A, Hafler DA. Multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(4):1180-8.
91. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology*. 1995;155(3):1151-64.
92. Saverino D, Simone R, Bagnasco M, Pesce G. The soluble CTLA-4 receptor and its role in autoimmune diseases: an update. *Auto- immunity highlights*. 2010;1(2):73-81.
93. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(2):303-10.
94. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*. 2003;4(4):330-6.
95. Devaud C, Darcy PK, Kershaw MH. Foxp3 expression in T regulatory cells and other cell lineages. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2014;63(9):869-76.
96. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007;110(4):1225-32.
97. Kronenberg M, Rudensky A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature*. 2005;435(7042):598-604.
98. Moreira-Teixeira L, Resende M, Devergne O, Herbeuval JP, Hermine O, Schneider E, et al. Rapamycin combined with TGF-beta converts human invariant NKT cells into suppressive Foxp3+ regulatory cells. *Journal of immunology*. 2012;188(2):624-31.
99. Kleinewietfeld M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunological reviews*. 2014;259(1):231-44.
100. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450(7169):566-9.

101. Reddy J, Illes Z, Zhang X, Encinas J, Pyrdol J, Nicholson L, et al. Myelin proteolipid protein-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(43):15434-9.
102. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology*. 2002;169(9):4712-6.
103. Korn T, Anderson AC, Bettelli E, Oukka M. The dynamics of effector T cells and Foxp3⁺ regulatory T cells in the promotion and regulation of autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*. 2007;191(1-2):51-60.
104. Montero E, Nussbaum G, Kaye JF, Perez R, Lage A, Ben-Nun A, et al. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4⁺, CD25⁺ and CD8⁺ T cells: analysis using depleting antibodies. *Journal of autoimmunity*. 2004;23(1):1-7.
105. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical and experimental immunology*. 2010;162(1):1-11.
106. Schubert RD, Hu Y, Kumar G, Szeto S, Abraham P, Winderl J, et al. IFN-beta treatment requires B cells for efficacy in neuroautoimmunity. *Journal of immunology*. 2015;194(5):2110-6.
107. Venken K, Hellings N, Thewissen M, Somers V, Hensen K, Rummens JL, et al. Compromised CD4⁺ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology*. 2008;123(1):79-89.
108. Haas J, Fritzsche B, Trubswetter P, Korporal M, Milkova L, Fritz B, et al. Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *Journal of immunology*. 2007;179(2):1322-30.
109. Nicoletti F, Patti F, Cocuzza C, Zaccone P, Nicoletti A, Di Marco R, et al. Elevated serum levels of interleukin-12 in chronic progressive multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 1996;70(1):87-90.
110. Dominguez-Villar M, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Identification of T helper type 1-like, Foxp3⁺ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nature medicine*. 2011;17(6):673-5.
111. Astier AL, Hafler DA. Abnormal Tr1 differentiation in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2007;191(1-2):70-8.
112. Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP. Activation of human CD4⁺ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature*. 2003;421(6921):388-92.
113. Kalampokis I, Yoshizaki A, Tedder TF. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis research & therapy*. 2013;15 Suppl 1:S1.
114. Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *International immunology*. 2015;27(10):479-86.
115. Tedder TF. B10 cells: a functionally defined regulatory B cell subset. *Journal of immunology*. 2015;194(4):1395-401.
116. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Science translational medicine*. 2013;5(173):173ra23.
117. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 2011;117(2):530-41.
118. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 2015;42(4):607-12.

119. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity*. 2014;41(6):1040-51.
120. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Munoz-Suano A, Kamanaka M, et al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *Journal of immunology*. 2011;186(10):5569-79.
121. Tian J, Zekzer D, Hanssen L, Lu Y, Olcott A, Kaufman DL. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Journal of immunology*. 2001;167(2):1081-9.
122. Parekh VV, Prasad DV, Banerjee PP, Joshi BN, Kumar A, Mishra GC. B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1. *Journal of immunology*. 2003;170(12):5897-911.
123. Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature immunology*. 2002;3(10):944-50.
124. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, Fujimoto M, Tedder TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(10):3420-30.
125. Egwuagu CE, Yu CR. Interleukin 35-Producing B Cells (i35-Breg): A New Mediator of Regulatory B-Cell Functions in CNS Autoimmune Diseases. *Critical reviews in immunology*. 2015;35(1):49-57.
126. Khan AR, Hams E, Floudas A, Sparwasser T, Weaver CT, Fallon PG. PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nature communications*. 2015;6:5997.
127. Ray A, Wang L, Dittel BN. IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action. *International immunology*. 2015;27(10):531-6.
128. Murphy KM, Nelson CA, Sedy JR. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(9):671-81.
129. M'Hidi H, Thibault ML, Chetaille B, Rey F, Bouadallah R, Nicollas R, et al. High expression of the inhibitory receptor BTLA in T-follicular helper cells and in B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia. *American journal of clinical pathology*. 2009;132(4):589-96.
130. Han J, Sun L, Fan X, Wang Z, Cheng Y, Zhu J, et al. Role of regulatory b cells in neuroimmunologic disorders. *Journal of neuroscience research*. 2016;94(8):693-701.
131. Ray A, Mann MK, Basu S, Dittel BN. A case for regulatory B cells in controlling the severity of autoimmune-mediated inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2011;230(1-2):1-9.
132. Mavropoulos A, Simopoulou T, Varna A, Liaskos C, Katsiari CG, Bogdanos DP, et al. Breg Cells Are Numerically Decreased and Functionally Impaired in Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis & rheumatology*. 2016;68(2):494-504.
133. Knippenberg S, Peelen E, Smolders J, Thewissen M, Menheere P, Cohen Tervaert JW, et al. Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naive/memory Breg ratio during a relapse but not in remission. *Journal of neuroimmunology*. 2011;239(1-2):80-6.
134. Michel L, Chesneau M, Manceau P, Genty A, Garcia A, Salou M, et al. Unaltered regulatory B-cell frequency and function in patients with multiple sclerosis. *Clinical immunology*. 2014;155(2):198-208.
135. Hirotani M, Niino M, Fukazawa T, Kikuchi S, Yabe I, Hamada S, et al. Decreased IL-10 production mediated by Toll-like receptor 9 in B cells in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2010;221(1-2):95-100.
136. Lublin F. History of modern multiple sclerosis therapy. *Journal of neurology*. 2005;252 Suppl 3:iii3-iii9.

137. Wingerchuk DM, Weinshenker BG. Disease modifying therapies for relapsing multiple sclerosis. *Bmj*. 2016;354:i3518.
138. Olesen J, Gustavsson A, Svensson M, Wittchen HU, Jonsson B, group Cs, et al. The economic cost of brain disorders in Europe. *European journal of neurology*. 2012;19(1):155-62.
139. Robak T, Robak E. New anti-CD20 monoclonal antibodies for the treatment of B-cell lymphoid malignancies. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2011;25(1):13-25.
140. Quan C, Zhang Bao J, Lu J, Zhao C, Cai T, Wang B, et al. The immune balance between memory and regulatory B cells in NMO and the changes of the balance after methylprednisolone or rituximab therapy. *Journal of neuroimmunology*. 2015;282:45-53.
141. Moreno Torres I, Garcia-Merino A. Anti-CD20 monoclonal antibodies in multiple sclerosis. *Expert review of neurotherapeutics*. 2017;17(4):359-71.
142. Sorensen PS, Lisby S, Grove R, Derosier F, Shackelford S, Havrdova E, et al. Safety and efficacy of ofatumumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2 study. *Neurology*. 2014;82(7):573-81.
143. von Budingen HC, Palanichamy A, Lehmann-Horn K, Michel BA, Zamvil SS. Update on the autoimmune pathology of multiple sclerosis: B-cells as disease-drivers and therapeutic targets. *European neurology*. 2015;73(3-4):238-46.
144. Herbst R, Wang Y, Gallagher S, Mittereder N, Kuta E, Damschroder M, et al. B-cell depletion in vitro and in vivo with an afucosylated anti-CD19 antibody. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2010;335(1):213-22.
145. Tedder TF. CD19: a promising B cell target for rheumatoid arthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2009;5(10):572-7.
146. Chen D, Blazek M, Ireland S, Ortega S, Kong X, Meeuwissen A, et al. Single dose of glycoengineered anti-CD19 antibody (MEDI551) disrupts experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting pathogenic adaptive immune responses in the bone marrow and spinal cord while preserving peripheral regulatory mechanisms. *Journal of immunology*. 2014;193(10):4823-32.
147. Zhang X, Tao Y, Chopra M, Ahn M, Marcus KL, Choudhary N, et al. Differential reconstitution of T cell subsets following immunodepleting treatment with alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of immunology*. 2013;191(12):5867-74.
148. De Mercanti S, Rolla S, Cucci A, Bardina V, Cocco E, Vladic A, et al. Alemtuzumab long-term immunologic effect: Treg suppressor function increases up to 24 months. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*. 2016;3(1):e194.
149. Heidt S, Hester J, Shankar S, Friend PJ, Wood KJ. B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naive B cells. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012;12(7):1784-92.
150. Havrdova E, Horakova D, Kovarova I. Alemtuzumab in the treatment of multiple sclerosis: key clinical trial results and considerations for use. *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2015;8(1):31-45.
151. Mancuso R, Franciotta D, Rovaris M, Caputo D, Sala A, Hernis A, et al. Effects of natalizumab on oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients: a longitudinal study. *Multiple sclerosis*. 2014;20(14):1900-3.
152. Warnke C, Stettner M, Lehmsiek V, Dehmel T, Mausberg AK, von Geldern G, et al. Natalizumab exerts a suppressive effect on surrogates of B cell function in blood and CSF. *Multiple sclerosis*. 2015;21(8):1036-44.
153. Putzki N, Baranwal MK, Tettenborn B, Limmroth V, Kreuzfelder E. Effects of natalizumab on circulating B cells, T regulatory cells and natural killer cells. *European neurology*. 2010;63(5):311-7.

154. Stenner MP, Waschbisch A, Buck D, Doerck S, Einsele H, Toyka KV, et al. Effects of natalizumab treatment on Foxp3⁺ T regulatory cells. *PloS one*. 2008;3(10):e3319.
155. Mitsdoerffer M, Kuchroo V, Korn T. Immunology of neuromyelitis optica: a T cell-B cell collaboration. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013;1283:57-66.
156. Li Y, Wang H, Long Y, Lu Z, Hu X. Increased memory Th17 cells in patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2011;234(1-2):155-60.
157. Dos Passos GR, Sato DK, Becker J, Fujihara K. Th17 Cells Pathways in Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Pathophysiological and Therapeutic Implications. *Mediators of inflammation*. 2016;2016:5314541.
158. Haas J, Schwarz A, Korporal-Kunke M, Jarius S, Wiendl H, Kieseier BC, et al. Fingolimod does not impair T-cell release from the thymus and beneficially affects Treg function in patients with multiple sclerosis. *Multiple sclerosis*. 2015;21(12):1521-32.
159. Blumenfeld S, Staun-Ram E, Miller A. Fingolimod therapy modulates circulating B cell composition, increases B regulatory subsets and production of IL-10 and TGFbeta in patients with Multiple Sclerosis. *Journal of autoimmunity*. 2016;70:40-51.
160. Piancone F, Saresella M, Marventano I, La Rosa F, Zoppis M, Agostini S, et al. B Lymphocytes in Multiple Sclerosis: Bregs and BTLA/CD272 Expressing-CD19⁺ Lymphocytes Modulate Disease Severity. *Scientific reports*. 2016;6:29699.
161. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2012;367(12):1087-97.
162. Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2012;367(12):1098-107.
163. Lundy SK, Wu Q, Wang Q, Dowling CA, Taitano SH, Mao G, et al. Dimethyl fumarate treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis influences B-cell subsets. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*. 2016;3(2):e211.
164. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Klinsing S, Posevitz-Fejfar A, Wiendl H, Klotz L. Dimethyl fumarate treatment alters circulating T helper cell subsets in multiple sclerosis. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*. 2016;3(1):e183.
165. Ochoa-Reparaz J, Colpitts SL, Kircher C, Kasper EJ, Telesford KM, Begum-Haque S, et al. Induction of gut regulatory CD39⁺ T cells by teriflunomide protects against EAE. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*. 2016;3(6):e291.
166. Oh J, O'Connor PW. Teriflunomide in the treatment of multiple sclerosis: current evidence and future prospects. *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2014;7(5):239-52.
167. Dhib-Jalbut S. Mechanisms of action of interferons and glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology*. 2002;58(8 Suppl 4):S3-9.
168. Duda PW, Schmied MC, Cook SL, Krieger JI, Hafler DA. Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(7):967-76.
169. Racke MK, Lovett-Racke AE, Karandikar NJ. The mechanism of action of glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;74 Suppl 1:S25-30.
170. Ireland SJ, Guzman AA, O'Brien DE, Hughes S, Greenberg B, Flores A, et al. The effect of glatiramer acetate therapy on functional properties of B cells from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *JAMA neurology*. 2014;71(11):1421-8.
171. Jiang H, Milo R, Swoveland P, Johnson KP, Panitch H, Dhib-Jalbut S. Interferon beta-1b reduces interferon gamma-induced antigen-presenting capacity of human glial and B cells. *Journal of neuroimmunology*. 1995;61(1):17-25.
172. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;74 Suppl 1:S17-24.

173. Meinl E, Krumbholz M, Hohlfeld R. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Annals of neurology*. 2006;59(6):880-92.
174. Kasper LH, Reder AT. Immunomodulatory activity of interferon-beta. *Annals of clinical and translational neurology*. 2014;1(8):622-31.
175. Barone E, Di Domenico F, Butterfield DA. Statins more than cholesterol lowering agents in Alzheimer disease: their pleiotropic functions as potential therapeutic targets. *Biochemical pharmacology*. 2014;88(4):605-16.
176. Jones PJ. Statin rebound effect? *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 2003;141(4):235-6.
177. Saeedi Saravi SS, Saeedi Saravi SS, Arefidoust A, Dehpour AR. The beneficial effects of HMG-CoA reductase inhibitors in the processes of neurodegeneration. *Metabolic brain disease*. 2017;32(4):949-65.
178. van der Most PJ, Dolga AM, Nijholt IM, Luiten PG, Eisel UL. Statins: mechanisms of neuroprotection. *Progress in neurobiology*. 2009;88(1):64-75.
179. Chalubinski M, Broncel M. Influence of statins on effector and regulatory immune mechanisms and their potential clinical relevance in treating autoimmune disorders. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2010;16(11):RA245-51.
180. Rodriguez-Perea AL, Montoya CJ, Olek S, Chougnet CA, Velilla PA. Statins increase the frequency of circulating CD4+ FOXP3+ regulatory T cells in healthy individuals. *Journal of immunology research*. 2015;2015:762506.
181. Tricarico PM, Marcuzzi A, Piscianz E, Monasta L, Crovella S, Kleiner G. Mevalonate kinase deficiency and neuroinflammation: balance between apoptosis and pyroptosis. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(12):23274-88.
182. Blaschke S, Viereck V, Schwarz G, Klinger HM, Guerluek S, Muller GA. Anti-inflammatory effects of atorvastatin on peripheral blood mononuclear cells and synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2009;38(4):235-9.
183. Coward WR, Marei A, Yang A, Vasa-Nicotera MM, Chow SC. Statin-induced proinflammatory response in mitogen-activated peripheral blood mononuclear cells through the activation of caspase-1 and IL-18 secretion in monocytes. *Journal of immunology*. 2006;176(9):5284-92.
184. Desai F, Ramanathan M, Fink CS, Wilding GE, Weinstock-Guttman B, Awad AB. Comparison of the immunomodulatory effects of the plant sterol beta-sitosterol to simvastatin in peripheral blood cells from multiple sclerosis patients. *International immunopharmacology*. 2009;9(1):153-7.
185. Ferrari GL, Quinto BM, Queiroz KC, Iizuka IJ, Monte JC, Dalboni MA, et al. Effects of simvastatin on cytokines secretion from mononuclear cells from critically ill patients with acute kidney injury. *Cytokine*. 2011;54(2):144-8.
186. Kim YC, Kim KK, Shevach EM. Simvastatin induces Foxp3+ T regulatory cells by modulation of transforming growth factor-beta signal transduction. *Immunology*. 2010;130(4):484-93.
187. Leung BP, Sattar N, Crilly A, Prach M, McCarey DW, Payne H, et al. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. *Journal of immunology*. 2003;170(3):1524-30.
188. Peng X, Jin J, Giri S, Montes M, Sujkowski D, Tang Y, et al. Immunomodulatory effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase inhibitors, potential therapy for relapsing remitting multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2006;178(1-2):130-9.
189. Pereira MC, Cardoso PR, Da Rocha LF, Jr., Rego MJ, Goncalves SM, Santos FA, et al. Simvastatin inhibits cytokines in a dose response in patients with rheumatoid arthritis. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2014;63(4):309-15.

190. Zhang X, Tao Y, Troiani L, Markovic-Plese S. Simvastatin inhibits IFN regulatory factor 4 expression and Th17 cell differentiation in CD4⁺ T cells derived from patients with multiple sclerosis. *Journal of immunology*. 2011;187(6):3431-7.
191. Caraher EM, Parenteau M, Gruber H, Scott FW. Flow cytometric analysis of intracellular IFN-gamma, IL-4 and IL-10 in CD3(+)4(+) T-cells from rat spleen. *Journal of immunological methods*. 2000;244(1-2):29-40.
192. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 1995;374(6522):546-9.
193. Gantner F, Hermann P, Nakashima K, Matsukawa S, Sakai K, Bacon KB. CD40-dependent and -independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides. *European journal of immunology*. 2003;33(6):1576-85.
194. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-8.
195. Schuerwegh AJ, Stevens WJ, Bridts CH, De Clerck LS. Evaluation of monensin and brefeldin A for flow cytometric determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. *Cytometry*. 2001;46(3):172-6.
196. Kirchner M, Sonnenschein A, Schoofs S, Schmidtke P, Umlauf VN, Mannhardt-Laakmann W. Surface expression and genotypes of Toll-like receptors 2 and 4 in patients with juvenile idiopathic arthritis and systemic lupus erythematosus. *Pediatric rheumatology online journal*. 2013;11(1):9.

US National Library of Medicine; Genetics Home Reference; 2012.
<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/multiple-sclerosis>