

## INVESTIGAREA MECANISMELOR INHIBITORII ALE RĂSPUNSULUI AUTOIMUN: LIMFOCITELE CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, IL-10 ÎN LUPUS ERITEMATOS SISTEMIC ȘI CUTANAT

ALECU M.\*, URSACIUC C\*\*, COMAN GABRIELA\*, SURCEL MIHAELA\*\*, CIOTARU D\*\*, DOBRE MARIA\*\*

București

### Rezumat

Limfocitele T reglatoare CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (high) reprezintă o subpopulație de limfocite care au capacitatea de a inhiba expresia limfocitelor T autoreactive caracteristice răspunsului autoimun din bolile autoimune, inclusiv lupusul eritematos.

În studiul nostru am investigat valorile limfocitelor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> în sângele periferic precum și valorile serice ale IL-10, IL-2, IL-2R la 13 pacienți cu lupus sistemic și 15 pacienți cu lupus cutanat.

Rezultatele au evidențiat o scădere semnificativă a valorilor limfocitelor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> în toate cazurile de lupus sistemic și în 13 cazuri de lupus cutanat. Valorile IL-10 au fost crescute în 10 cazuri de lupus sistemic și în 10 cazuri de lupus cutanat, corelându-se în mai mică măsură cu valorile limfocitelor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

Scăderea limfocitelor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> în ambele forme de lupus sugerează o carență în inhibarea răspunsului autoimun caracteristică acestei afecțiuni.

**Cuvinte cheie:** lupus eritematos sistemic și cutanat, T reg, IL-10, IL-2.

### Summary

T regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> lymphocytes are representing a T subgroup of lymphocytes being able to inhibit T autoreactive expression characteristic to autoimmune response in autoimmune diseases including lupus erithematosus.

In our study we have investigated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> lymphocytes values from peripheral blood and serological values of IL-10, IL-2 and IL-2R in 13 patients with systemic lupus erithematosus and 15 patients with cutaneous lupus.

Results have revealed a significant decrease of the values of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> lymphocytes in all systemic lupus cases and in 13 cases of cutaneous lupus. The raised IL-10 values, in 10 cases of systemic lupus erithematosus and in 10 of cutaneous lupus were less correlated with the values of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> lymphocytes.

The decrease of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> lymphocytes in both lupus forms suggests a lack of autoimmune response inhibition characteristic to the disease.

**Keywords:** lupus erithematosus systemic and cutaneous, Treg, IL-10, IL-2

DermatoVenerol. (Buc.), 52: 67-71

Apariția unui răspuns imun dirijat împotriva propriilor antigene (self) poate fi considerată atât ca un proces patogen care stă la baza a numeroase afecțiuni din patologia umană, dar și ca un simplu proces descoperit întâmplător fără semnificație clinică (teste pozitive la autoanticorpi) sau ca un proces încadrat la limita normalului (procesele autoimune din cursul îmbătrânirii) [1].

S-a demonstrat pe modele umane că există trei tipuri majore de modificări la nivelul căilor de reglare a răspunsului imun care pot conduce la apariția unui răspuns autoimun suficient de semnificativ pentru a constitui mecanismul principal al unui larg grup de afecțiuni numite boli autoimune. Prima modificare apare la nivelul genelor ce codifică cuplul proapoptotic de receptor-ligand, FAS-FASL. A doua modificare

\* Centrul Dermato-Venerologic, Spital Clinic de Dermatologie „Prof. Dr. Scarlat Longhin” - București.

\*\* Institutul Național de Cercetare Dezvoltare „Victor Babeș” - București.

este dată de deficiența antigenului 4 asociat limfocitelor T citotoxice și a treia modificare apare la nivelul receptorului de mare afinitate pentru IL-2 (CD25) de la nivelul limfocitelor CD4 [1].

În prezent s-a demonstrat că la om crește o subpopulație de limfocite T helper caracterizate prin fenotipul CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> și care reprezintă aproximativ 10% din totalul limfocitelor T helper. Aceasta subpopulație de limfocite T exprimă pe membrană lanțul alfa al receptorului pentru IL-2, molecula CD25 la un nivel foarte înalt spre deosebire de limfocitele T helper propriu-zise (inductoare) care fie nu exprimă molecula CD25 (CD25<sup>-</sup>) sau o exprimă la un nivel scăzut [2,3,4].

S-a demonstrat că această subpopulație de celule T (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) denumite și limfocite T reglatoare (T-reg) nu răspunde sau cea mai mare parte dintre ele nu răspund la stimulii obișnuiți ai limfocitelor T helper și au un rol extrem de important în apariția răspunsului autoimun îndreptat împotriva autoantigenelor celulare [4,5].

Modul de acțiune a limfocitelor T reglatoare CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> este parțial cunoscut dar se pare că IL-2 (în exces?) poate abroga capacitatea acestor celule de a supresa limfocitele T. Activitatea limfocitelor T reglatoare este puțin influențată de stimulii convenționali pentru limfocitele T, dar se pare că supresia limfocitelor T autoreactive se face prin contactul direct cu aceste celule [6,7,8].

S-a demonstrat că transferul celulelor T reglatoare CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> de la un șoarece normal la alt șoarece poate proteja șoarecele gazdă împotriva fenomenelor de autoimunitate [9,10].

În studiul nostru am căutat să investigăm prezența acestor limfocite în mai multe forme clinice ale lupusului eritematos sistemic și strict cutanat.

Totodată am căutat să corelam investigarea limfocitelor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cu valorile serice ale IL-10, citokină cu proprietăți supresoare ale răspunsului imun și cu valorile serice ale IL-2 citokină produsă de limfocitele T activate și care au un rol esențial în dezvoltarea răspunsului imun [1,2].

## Pacienți

Au fost investigați 28 de pacienți dintre care 13 pacienți au prezentat lupus eritematos sistemic

cu nefrită și un număr de 15 pacienți cu lupus eritematos cronic (diseminat).

Pacienții cu lupus eritematos sistemic au prezentat o vârstă medie de 46 ani (între 28 și 70 ani). Repartiția pe sexe a fost de 9 femei și 4 bărbați. Debutul bolii la acești pacienți a fost de peste 6 ani, cu evoluție ondulantă necesitând mai multe cure de ciclofosamidă și prednison. În afara atingerii renale (funcție renală normală dar proteinurie de 1-5g/24 h, cilindriurie, etc.) pacienții din acest lot au prezentat atingeri articulare tipice în toate cazurile, atingeri cardiace în 2 cazuri, leziuni cutanate în 4 cazuri.

Sindromul biologic a fost tipic pentru lupusul sistemic: VSH crescut, leucopenie și/sau trombocitopenie, prezența anticorpilor anti ADN dc, ANA, complement total și fracțiunea C3 scăzute.

Dintre pacienții cu lupus eritematos cutanat (discoïd diseminat), 15 cazuri au prezentat o vârstă medie de 38 ani (32-64 ani) cu o repartiție pe sexe de 9 femei și 6 bărbați. Debutul bolii a fost de peste 5 ani, cu evoluție a simptomatologiei cutanate care a necesitat mai multe cure de prednison. În afară de simptomatologia cutanată, 2 pacienți au prezentat algii articulare sugestive pentru lupus și 3 pacienți au prezentat astenie fizică. Sindromul biologic a evidențiat VSH crescut în 12 cazuri, limfopenie 1 caz, Ac anti ADN dc prezenți în 4 cazuri, ANA prezenți în 5 cazuri și complementul seric total și fracțiunea C3 scăzute în 5 cazuri.

Toate aceste simptome și investigații au constituit criterii pozitive de admitere în studiu.

## Investigații

Au fost efectuate 2 tipuri de investigații. Primul cuprinde investigațiile uzuale și în același timp specifice pentru stabilirea diagnosticului pozitiv, a formei și fazei clinice a acestei afecțiuni. În această categorie au intrat investigațiile clinice, biologice, imunologice, histopatologice.

Al doilea grup de investigații cuprinde determinarea subpopulațiilor limfocitare T și B, a celulelor NK și a limfocitelor T reglatoare CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Determinarea subpopulațiilor limfocitare se face prin intermediul citometriei de flux. Analiza fluorescenței celulare s-a efectuat prin metodologie pe 4 culori (anticorpi marcați cu

4 fluorocromi pentru grupe celulare) cu evaluare prin sistemele multitest și cellquest.

IL-10 se determină în ser prin metoda ELISA, valori normale 2-24 pg/ml.

IL-2 și receptorul pentru IL-2 (IL-2R) se determină în ser tot prin metoda ELISA. Valorile normale sunt IL-2 15 pg/ml, IL-2R 460-2000 pg/ml.

Toate determinările au fost efectuate în puseu înainte de administrarea terapiei imunosupresoare sau a altor tipuri de medicație.

## Rezultate

Pacienții cu lupus eritematos sistemic au prezentat o scădere a limfocitelor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> în toate cazurile investigate. Valoarea medie a limfocitelor T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> la pacienții investigați a fost de 1,22% reprezentând 24% din valoarea limitei inferioare a valorilor normale a acestor limfocite.

Interleukina 10 a prezentat valori crescute în 9 cazuri. Valoarea serică medie a acestei interleukine a fost la pacienții investigați de 28pg/ml. Pacienții cu valoare crescută a IL-10 respectiv 9 cazuri, au prezentat o valoare medie de 35,5pg/ml reprezentând o valoare de 140%

față de limita superioară a valorilor normale ale IL-10 în ser.

Interleukina 2 a prezentat valori serice crescute în toate cazurile, obținându-se o valoare medie de 41,2 pg/ml respectiv o creștere de 8 ori comparativ cu valorile normale.

Receptorul pentru IL-2 a prezentat valori crescute în 9 cazuri. Valorile medii obținute la toți pacienții cu lupus sistemic fiind de 2246pg/ml. Pacienții cu valori crescute la determinarea IL-2R (9 cazuri) au prezentat o medie de 2733 pg/ml respectiv o medie crescută la 136% față de limita maximă a mediei valorilor normale.

Pacienții cu lupus sistemic au prezentat în ansamblu valorile limfocitelor T și B la limita maximă a normalului cu un raport Th/Ts în limite normale dar cu o scădere masivă a celulelor NK. Rezultatele detaliate pe fiecare caz investigat sunt prezentate în tabelul 1.

Pacienții cu lupus eritematos cutanat au prezentat o scădere a limfocitelor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> în 14 cazuri din 15 investigate. Valoarea medie a limfocitelor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> la pacienții investigați a fost de 3,4% reprezentând 42,5% din valoarea limitei inferioare a valorilor normale ale acestor limfocite.

Tabelul I. Rezultate obținute la pacienții cu lupus sistemic

Nr.	Nume	Tt (%)	Th (%)	Ts (%)	Th/Ts	B (%)	NK (%)	T Reg	IL-10 pg/ml	IL-2 pg/ml	IL-2R pg/ml
1	BM	65	38	28	1,4	28	7	0,9	30	20	1000
2	CS	88	58	33	1,8	11	2	0,7	30	60	1600
3	RA	63	38	25	1,5	27	7	0,7	40	60	800
4	GT	64	45	21	2,1	30	7	0,7	40	40	3000
5	AA	83	47	37	1,3	16	0	0,7	35	50	800
6	NS	68	50	19	2,6	28	3	3,9	10	40	2400
7	GV	75	37	37	1,0	17	7	0,4	10	40	1800
8	GM	81	59	23	2,6	17	1	6,4	40	36	2600
9	TZ	71	31	43	0,7	11	19	0,15	10	40	2800
10	PA	86	49	38	1,3	9	5	0,4	15	40	3100
11	GC	73	39	35	1,1	2,4	3	0,4	30	40	2700
12	RS	86	45	39	1,15	8	3	0,25	30	30	2800
13	BL	89	49	36	1,3	8	1	0,3	45	40	2800
Valori medii		76	45	318	1,4	16,3	5	1,22	28	41,2	2246
Valori normale		67-77	38-46	30-40	1-1,5	10-16	10-18	8-10	2-24	<5	400-2000

Interleukina 10 a prezentat valori crescute în 10 cazuri și valori normale în 5 cazuri. Valoarea serică medie a acestei interleukine a fost la pacienții investigați de 28,3 pg/ml. Pacienții cu valori crescute ale IL-10 (10 cazuri) au prezentat o medie de 33,5 pg/ml reprezentând o valoare de 140% față de limita maximă a valorilor normale.

Receptorul pentru IL-2 a prezentat valori crescute în 4 cazuri. Valoarea medie obținută la toți pacienții cu lupus sistemic a fost de 1313 pg/ml încadrându-se în ansamblu în limitele valorilor normale. Cei patru pacienți cu valori serice crescute ale IL-2R au prezentat o valoare medie de 2200 pg/ml.

Investigarea limfocitelor T cu subpopulații și a limfocitelor B și a celulelor NK a evidențiat în lupusul sistemic prezența limfocitelor T la valori maxime, un raport normal de 1,4 Th/Ts, prezența limfocitelor B la limita maximă a valorilor normale și o scădere a celulelor NK.

În cadrul lupusului cutanat limfocitele T au prezentat valori situate la nivelul limitei maxime a normalului, raportul Th/Ts a fost de 1,7, limfocitele B în limite normale cu scăderea celulelor NK (tabel 2).

## Discuții

Investigarea limfocitelor T reglatoare (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) la pacienții cu lupus eritematos a evidențiat faptul că la acești pacienți există o scădere semnificativă a valorilor acestor limfocite care s-a întâlnit la 27 din 28 de pacienți investigați. Valorile limfocitelor CD4<sup>+</sup>CD25 au fost scăzute chiar cu variația de ± 3% care rezultă din fenotipare.

Semnificația scăderii valorilor limfocitelor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> este interpretată ca o scădere a mecanismelor reglatoare care inhibă apariția sau dezvoltarea unui răspuns autoimun.

Scăderea limfocitelor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> a fost întâlnită în ambele forme de lupus eritematos, sistemic și cutanat, determinarea făcându-se în ambele cazuri în puseu chiar dacă pacienții cu lupus eritematos sistemic au prezentat în toate cazurile anticorpi anti ADN dublu catenar prezenți, iar în cazul pacienților cu lupus cutanat aceștia au fost prezenți în numai 4 cazuri.

La pacienții investigați s-au întâlnit o serie de dezechilibre ale subpopulațiilor limfocitare dar

Tabelul I. Rezultate obținute la pacienții cu lupus cutanat

Nr.	Nume	Tt (%)	Th (%)	Ts (%)	Th/Ts	B (%)	NK (%)	T Reg	IL-10 pg/ml	IL-2 pg/ml	IL-2R pg/ml
1	BZ	80	48	32	1,5	13	6	0,7	30	12	2200
2	PP	74	44	30	1,4	20	4	1,7	30+	10	800
3	CS	76	51	25	2	16	3	5,6	40	6	1100
4	RM	86	59	28	2,1	12	1	0,2	40	6	800
5	IA	77	51	35	1,4	19	3	0,4	30	6	800
6	MV	74	45	29	1,5	18	8	0,7	20	10	1700
7	CR	64	48	16	3	23	8	4,5	30	8	2400
8	BG	78	49	30	1,6	11	9	2,2	40	4	2100
9	CA	69	42	28	1,5	21	6	3,6	30	8	600
10	SM	74	44	30	1,9	9	6	10,3	20	12	1300
11	AR	78	50	28	1,8	14	6	1,9	20	4	1600
12	RM	77	44	33	1,3	16	4	2,8	35	4	2100
13	BG	75	49	26	1,8	15	7	3	20	10	800
14	CS	73	45	28	1,5	15	9	3	15	12	800
15	AV	80	52	27	1,9	11	5	3,4	15	10	600
Valori medii		75,6	48	28	1,7	15,5	5,6	3,4	28,3	8,13	1313
Valori normale		67-77	38-46	30-40	1-1,5	10-16	10-18	8-10	2-24	< 5	400-2000

pe ansamblu nu au existat modificări majore. Pacienții din ambele loturi cu valori mai mari ale raportului Th/Ts peste 1,5, 11 cazuri, nu au prezentat valori deosebite ale limfocitelor T reglatoare. În această grupă s-a încadrat pacientul nr. 10 (SM) cu raport Th/Ts 1,9 dar cu valori normale ale limfocitelor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Media valorilor determinărilor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> la acești 12 pacienți a fost de 3,5% sugerând faptul că valorile scăzute ale acestor limfocite sunt în mai mică măsură influențate de dezechilibrul subpopulațiilor Th și Ts.

Determinarea valorilor serice ale IL-2R a evidențiat valori crescute în 10 cazuri (medie 24900 pg/ml) de lupus sistemic și în 4 cazuri de lupus cutanat (2200 pg/ml). Evoluția valorilor IL-2R pare să fie legată de forma clinică a IL-2 și de amploarea răspunsului imun (autoimun). Nu s-a putut stabili o corelație între valorile limfocitelor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> și valorile serice ale IL-2R.

## Concluzii

Investigarea valorilor limfocitelor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> la pacienții cu lupus arată valori semnificativ scăzute ale acestor limfocite în 27 din 28 de cazuri investigate. Ținând cont de rolul de supresor al autoimunității al acestor limfocite, valorile scăzute ale CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sugerează o carență a protecției împotriva inițierii și/sau dezvoltării unui răspuns autoimun.

Valorile scăzute ale limfocitelor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> s-au întâlnit în condițiile unui dezechilibru relativ minor al subpopulațiilor limfocitare Th și Ts în care raportul Th/Ts nu este major modificat. Acest fapt sugerează, fără însă a putea fi demonstrat, o reconvertire a limfocitelor Th către limfocitele CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> fără ca valoarea totală a limfocitelor Th să se modifice semnificativ.

Valorile scăzute ale limfocitelor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> s-au întâlnit în ambele forme clinice de lupus eritematos, mai accentuate în forma sistemică a acestei afecțiuni sugerând că scăderea acestor limfocite este un factor general de inițiere /dezvoltare a autoimunității.

În acest studiu nu s-au putut evidenția argumente pentru a demonstra existența unor corelații pozitive sau negative între valorile scăzute ale limfocitelor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> și valorile IL-10, IL-2, și IL-2R.

Intrat în redacție: 15 septembrie 2007

## Bibliografie

1. Ermann J., Fathman G. – Autoimmune diseases: gene bugs and failed regulation. *Nature Immunology* 2001, 2, 759-761.
2. Baecher-Allan C., Viglietta V., Hafler D.A. – Inhibition of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (high) regulatory T cell function. *J. Immunol.* 2002, 169, 6210-6218
3. Mc. Hugh R.S., Shevach E.M. – The role of supressor T cells in regulation of immune responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002, 110, 693-698.
4. Curoto de Lafaille M.A., Lafaille J.J. – CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr. Opin. Immunol* 2002, 14(6), 771-778.
5. Piccirillo C.A., Shevach E.M. – Cutting edge: control of CD8<sup>+</sup> T cell activation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 2001, 167(3), 1137-1140.
6. Mudd P.A., Teagre B.N., Farris A.D. – Regulatory T cells and systemic lupus erithematosus. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2006, 64, 211-218.
7. Valencia X., Yarboro C., Illei C., Lipsky P.E. – Deficient CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erithematosus. *Journal of Immunology* 2007, 178(4), 2578-2579.
8. Alvarado- Sanchez B., Hernandez-Castro B., Portales-Perez D. – Regulatory T cells in patients with systemic lupus erithematosus. *Journal of Autoimmunity* 2006, 27(2), 110-118.
9. Kang H.K., Datta S.C. – Regulatory T cells in lupus. *International Reviews of Immunology*, 2006, 25 (1-2), 5-25.
10. Miyara M., Amoura Z., Parizot C. – Global natural regulatory T cell depletion in active synergic lupus erithematosus. *J. Immunol.* 2005, 175, 8392-8396.