Uloga B limfocita u razvoju multiple skleroze i eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa

Role of B cells in the development of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis

Nemanja Jovičić¹, Ilija Jeftić², Uglješa Jovičić³

1. Katedra za Histologiju i embriologiju, Fakultet Medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac
2. Katedra za Patološku fiziologiju, Fakultet Medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac
3. Uprava za vojno zdravstvo, Ministarstvo odbrane Republike Srbije, Beograd

PRIMLJEN 08.05.2013.

PRIHVAĆEN 10.06.2013.

Nemanja Jovicic¹, Ilija Jeftic², Ugljesa Jovicic³

1. Department of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia
2. Department of Pathophysiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia
3. Military Health Department, Republic of Serbia Ministry of Defence, Belgrade, Serbia

PRIMLJEN 08.05.2013.

PRIHVAĆEN 10.06.2013.

APSTRAKT

Multipla skleroza (Multiple sclerosis, MS) je hronično oboljenje nervnog sistema koje karakterišu oštećenje mijelinskog omotača aksona i širok spektar kliničkih znakova i simptoma. Urok nastanka multiple skleroze još uvek nije poznat. Smatra se da ulogu u nastanku i razvoju bolesti imaju genetska osnova, mehanizmi autoimunosti kao i različiti faktori okoline. Multipla skleroza se smatra autoimunskim oboljenjem pošto imunski sistem domaćina razvija imunski odgovor na molekule prisutne u sopstvenom nervnom sistemu. Do nedavno je preovladavalo mišljenje da najveći značaj u razvoju određenih autoimunskih bolesti, uključujući i multiplu sklerozu, imaju T limfociti. Pojačano interesovanje proteklih godina za ispitivanje fiziološke i patološke uloge B limfocita, donelo je nova saznanja o značaju ovih ćelija. Zahvaljujući novim istraživanjima, pokazano je da pored humoralne imunosti, čiji su nosioci, B limfociti imaju veliki značaj i u razvoju i regulaciji ćelijske imunosti, kao i u povezivanju urođenog i stečenog imunskog odgovora. Značaj B limfocita u razvoju multiple skleroze i u životinjskom modelu bolesti, eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu (Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE), je danas nedvosmisleno pokazana, ali još uvek nisu razjašnjeni svi mehanizmi kojima ove ćelije doprinose patogenezi bolesti. Njihov značaj potvrđuju i savremene terapijske opcije za lečenje multiple skleroze.

Ključne reči: multipla skleroza; autoimunost; B limfociti; eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis; T limfociti.

ABSTRACT

Multiple sclerosis, also known as MS, is a chronic disease that attacks the central nervous system and is characterized by damaged myelin sheaths around the axons accompanied by broad spectrum of signs and symptoms. The cause of MS remains unknown. It is considered that MS occurs as a result of combination of genetic, autoimmune mechanisms and environmental factors. MS is regarded to be autoimmune disease due to development of host immune response against its own molecules in nervous system. Until recently, the prevalent opinion was that T cells have the greatest importance in the development of certain autoimmune diseases, including multiple sclerosis. In recent years, increased interest to examine the physiological and pathological roles of B cells, has made a new understanding of the importance of these cells. Thanks to new research, it has been shown that in addition to humoral immunity, B lymphocytes are of great importance in the development and regulation of cellular immunity and in linking innate and acquired immune responses. The importance of B cells in the development of multiple sclerosis and in animal model of the disease, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), is now clearly demonstrated, but all of the mechanisms used by these cells that contribute to the pathogenesis of the disease are still not clear. Importance of B cells is confirmed by modern therapeutic options for the treatment of multiple sclerosis.

Key words: Multiple sclerosis; autoimmunity; B cells; Experimental autoimmune encephalomyelitis; T cells.

KORESPONDENCIJA / CORRESPONDENCE

Nemanja Jovičić, Nikole Pašića 22-2-13, 34000 Kragujevac, Srbija, nemanjajovicic.kg@gmail.com; telefon: 0631028270
Nemanja Jovicic, Nikole Pasica 22-2-13, 34000 Kragujevac, Serbia, nemanjajovicic.kg@gmail.com; Phone: 0631028270

UVOD

Uloga B limfocita u razvoju celularnog imunskog odgovora na antigene i autoantigene još uvek nije potpuno razjašnjena. Rane studije na miševima koji su deficitarni za B limfocite su pokazale da njihov nedostatak ima nepovoljan uticaj na razvoj imunskog odgovora CD4+ i CD8+ T limfocita. Druge studije su pak pokazale da nedostatak B limfocita nema uticaja na nastanak i održavanje specifičnog odgovora T limfocita.¹ Dodatnu zabunu su uneli podaci iz studija koji su ukazivali na mnogobrojne funkcionalne i morfološke abnormalnosti komponenti imunskog sistema koje su nastale u toku embrionalnog razvoja kod miševa deficitarnih za B limfocite. Na osnovu tih podataka je bilo teško nedvosmisleno odrediti ulogu B limfocita u razvoju celularnog imunskog odgovora na različite antigene i autoantigene.

Pojava novih podataka o efikasnosti deplecije B limfocita u terapiji različitih autoimunskih oboljenja koja su posredovana T limfocitima, iznova aktualizuje istraživanja njihovog uticaja u razvoju ovih oboljenja. Studije na mišijim modelima kao i kliničke studije su pokazale različite efekte deplecije B limfocita. Kod pojedinih modela, kao što su artritis i hronični kolitis, deplecija B limfocita je pogoršala kliničku sliku bolesti, što je ukazalo na njihovu regulatornu ulogu.² Kod nekih modela je deplecija B limfocita u različitim fazama razvoja bolesti imala suprotne efekte na razvoj kliničke slike bolesti. Ubedljive dokaze o ulozi B limfocita u T zavisnom imunskom odgovoru su pružile studije privremene deplecije, u kojima je razdvojena uloga B limfocita u fazi inicijacije i razvoja, i fazi efektorske funkcije imunskog odgovora.

Dosadašnje studije ukazuju na kompleksnu ulogu B limfocita u modulaciji imunskog odgovora. Pokazano je da ove ćelije nemaju isključivo pasivnu ulogu u kooperaciji sa T helper limfocitima, već da aktivno učestvuju u celularnom imunskom odgovoru, usmeravajući jačinu i kvalitet celularnog imunskog odgovora na strane i sopstvene antigene.¹ Stoga je njihova uloga u patogenezi autoimunskih oboljenja mnogo kompleksnija od produkcije patogenih autoantitela.

Konvencionalno mišljenje je da u nastanku nekih autoimunskih bolesti, kao što je sistemski lupus, osnovnu ulogu imaju B limfociti, dok kod sistemske skleroze, multiple skleroze i dijabetesa tip I, dominantnu ulogu imaju T limfociti. Ovo stanovište je proisteklo iz rezultata eksperimenata u kojima je adoptivnim transferom T limfocita iz obolele životinje bolest indukovana kod zdravih životinja.³ Nova saznanja i novi eksperimentalni modeli bolesti omogućavaju mnogo bolji uvid u veoma kompleksnu ulogu B limfocita u razvoju autoimunskih bolesti. B limfociti doprinose pato-

genezi autoimunskih bolesti pored produkcije autoantitela i sintezom citokina kojima regulišu funkciju T limfocita i inflamaciju.³

Uloga antitela u patogenezi MS i EAE

Multipla skleroza (Multiple sclerosis, MS) je hronično oboljenje nervnog sistema koje karakterišu oštećenje mijelinskog omotača aksona, nastanak lezija i širok spektar kliničkih znakova i simptoma. Eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis (Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) je animalni model inflamacije nervnog tkiva koji se najčešće koristi za ispitivanje demijelinizacionih oboljenja ljudi.

Iako se u patogenezi MS-a često ističe dominantna uloga T limfocita, efektorska uloga B limfocita ali i regulatorna uloga ovih ćelija je predmet velikog broja studija. B limfociti mogu na različite načine doprineti patogenezi MS (Tabela 1): kao izvor autoantitela na različite komponente mijelina, aksona i neurona koji doprinose demijelinizaciji i oštećenju aksona, kao antigen prezentujuće ćelije za autoreaktivne T limfocite, ili kao regulatorne ćelije koje produkuju supresivne citokine i koje utiču na aktivnost regulatornih T limfocita.⁴ B limfociti ne mogu proći intaktnu krvno-moždanu barijeru, ali nakon započinjanja inflamacije i njenog oštećenja, B limfociti dospevaju u tkivo CNS-a.

Tabela 1. Funkcija B limfocita u regulaciji imunskog odgovora i razvoju MS

Funkcija B limfocita	Značaj	
Produkcija antitela	Ćelijska citotoksičnost posredovana antitelima, ADCC	
	Opsonizacija i fagocitoza	
	Aktivacija sistema komplementa	
	Moguć pozitivan uticaj na remijelinizaciju (nedovoljno ispitan)	
Prezentacija antigena i kostimulacija T limfocita	Inicijacija odgovora autoreaktivnih T limfocita, klonska ekspanzija citotoksičnih T limfocita i produkcija citokina	
Produkcija citokina	IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IFN- γ , TNF- α	Efektorska uloga B limfocita
	IL-10	Regulatorna uloga B limfocita
Ektopična neolimfogeneza	Formiranje i održavanje ektopičnih limfnih struktura u intermeningealnom prostoru	
Latentna infekcija EBV (Epstein-Barr virus)	Moguća uloga EBV infekcije u razvoju MS (nedovoljno ispitana)	

U meningeama pacijenata sa MS se takođe mogu naći strukture koje se nazivaju tercijski limfni folikuli, koje sadrže B limfocite i folikulske dendritske ćelije. Postojanje ovih struktura je povezano sa ranijim razvojem bolesti i sa težom kliničkom slikom.^{4,5}

Elvin Kabat (Elvin Kabat) i njegovi saradnici su 1942. godine metodom elektroforeze, prvi dokazali intratekalnu sintezu i prisustvo IgG u cerebrospinalnoj tečnosti.⁶ Ovo istraživanje se često navodi kao ključno u otkrivanju oligoklonskih traka, mada je tek razvoj elektroforetskih tehnika pedesetih godina, omogućio istraživačima razdvajanje IgG molekula na osnovu klonova B limfocita koji ih sintetizuju. Radovi Karčera (Karcher), van Sanda (van Sande) i Louentala (Lowenthal) 1959. i 1960. godine su pokazali prisustvo različitih frakcija IgG u cerebrospinalnoj tečnosti, dok je termin "oligoklonske" nekoliko godina kasnije uveo Kristijan Later (Christian Laterre).⁶

Značaj oligoklonskih traka je veliki i one predstavljaju "zlatni standard" pri postavljanju dijagnoze MS, a takođe imaju značaja i u praćenju i prognozi toka bolesti.⁷ Prisustvo dve ili više oligoklonskih traka IgG u cerebrospinalnoj tečnosti i njihovo istovremeno odsustvo u serumu pacijenta, ukazuju na imunoski odgovor u CNS i intratekalnu sintezu antitela.⁷ Intratekalna produkcija IgG se u nekim istraživanjima javlja kod 50-60% pacijenata sa MS.⁸ U drugim studijama je navedeno da se kod 95% pacijenata sa dijagnostikovanim bolešću mogu detektovati oligoklonske trake u cerebrospinalnoj tečnosti.^{7,9} Nedavno objavljena meta analiza više od 70 studija je pokazala da je prevalenca pojave oligoklonskih traka kod obolelih od MS 87,7%.¹⁰ Potvrda da B limfociti koji su prisutni u CNS mogu biti izvor oligoklonskih traka je dobijena tek nedavno ispitivanjem korelacije Ig proteoma i transkripcije u B limfocitima.^{8,11,12} Rezultati ovog istraživanja su pokazali i da je intratekalna produkcija antitela relevantna za patofiziološke procese u razvoju MS, ali i da se obrasci oligoklonskih traka razlikuju među pacijentima. Taj podatak ukazuje da se kod obolelih razvija specifičan odgovor B limfocita ali jedinstven za svakog pacijenta.^{11,12}

Oligoklonske trake nisu specifične za MS. Njihovo prisustvo se takođe može ustanoviti i kod infektivnih oboljenja CNS, kao što su neuroborreliozna, herpes simplex encephalitis, HIV infekcija ili subakutni sklerozirajući panencefalitis, pri čemu prisutna antitela specifično prepoznaju antigene koji učestvuju u nastanku bolesti.⁸ Iako su intratekalna antitela predmet brojnih istraživanja već više decenija, njihov značaj u patogenezi, kao i njihova specifičnost, odnosno ciljni autoantigeni, još uvek nisu precizno definisani.¹³ Među autoantigenima koji najverovatnije imaju ulogu u iniciranju i patogenezi bolesti, najznačajnije

mesto zauzimaju proteini koji ulaze u sastav mijelinskog omotača: mijelinski oligodendrocitni glikoprotein (myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG), mijelinski bazni protein (myelin basic protein, MBP), proteolipid protein (proteolipid protein, PLP), glikoprotein udružen sa mijelinom (myelin-associated glycoprotein, MAG), fosfatidilholin i galaktocerebrozid (galactocerebroside, GalC), oligodendrocitni protein 2', glijalni fibrilarni kiseli protein (glial fibrillary acidic protein, GFAP).^{12,14,15} Ovoj grupi mogućih autoantigena treba dodati i molekule koji ne ulaze u sastav mijelinskog omotača kao što je α B-kristalin, mali heat-shock protein koji ima antiinflamatornu aktivnost. Antitela specifična za ovaj molekul su detektovana u likvoru pacijenata sa MS.¹³

Intratekalno sintetisana antitela oligoklonskih traka u najvećoj meri pripadaju IgG klasi. Prisustvo IgM u oligoklonskim trakama se najčešće smatra lošim prognostičkim biomarkerom koji je u korelaciji sa progresijom bolesti.¹⁶ Nasuprot ovom mišljenju, podaci nekih studija govore da ne postoji korelacija između prisustva IgM u oligoklonskim trakama i nepovoljnog toka bolesti.¹⁷

Pored antitela koja su prisutna u likvoru, kod pacijenata sa MS se i u serumu mogu detektovati autoantitela različite specifičnosti. U serumu jednog broja pacijenata sa MS su detektovana antitela specifična za nativnu formu proteina neurofascina (neurofascin, NF). Detektovana su antitela za izoformu NF186, koja se nalazi koncentrisana u Ranvijerovim čvorovima mijelinizovanog aksona, kao i za izoformu NF155 koja je specifična za oligodendrocite. Ispitivanja ovih antitela u eksperimentalnim modelima, pokazala su da ona izazivaju akumulaciju komponenti komplementa, oštećenje aksona i egzacerbaciju bolesti.^{13,18,19,20} Prisustvo antitela koja su specifična za obe izoforme neurofascina sugerise njihovu ulogu u oštećenju mijelinskog omotača i u centralnom i u perifernom nervnom sistemu.

U traganju za ključnim autoantigenom odgovornim za nastanak i razvoj MS, najveća pažnja je usmerena ka dva mijelinska antigena, MOG i MBP. Do sada su prikupljeni podaci iz velikog broja studija o ulozi i prisustvu anti-MOG i anti-MBP antitela u MS i EAE. Zaključci ovih istraživanja su često kontradiktorni. Pored toga, antitela specifična za proteine mijelina su identifikovana i u drugim neurološkim oboljenjima, a pronađena su i kod zdravih ispitanika.²¹ U MS lezijama su identifikovana anti-MOG antitela, a povećan titar anti-MOG i anti-MBP antitela je pronađen i serumu i CSF pacijenata, kao i u serumu dece sa prvim epizodama demijelinizacije CNS.⁸ Podaci o ulozi ovih antitela u demijelinizaciji u eksperimentalnim modelima bolesti takođe pokazuju različite rezultate.

Primer je često korišćen model MOG 35-55 indukovnog EAE kod C57/BL6 miševa, za koji se smatra da je dominantno posredovan imunskim odgovorom CD4+ T limfocita.⁸ U nedavno objavljenoj studiji, istraživači su identifikovali prisustvo anti-MOG antitela u ovom modelu bolesti.²² Pokazano je da je imunizacija MOG 35-55 peptidom, koji je imunodominantni epitop MOG proteina za T limfocite, dovoljna i za aktivaciju B limfocita i produkciju anti-MOG antitela visokog afiniteta. U ovoj studiji je takođe, prvi put u ovom modelu bolesti, pokazano prisustvo autoantitela specifičnih za nukleinske kiseline. Anti-DNA i anti-RNK antitela su sekundarna karakteristika oštećenja tkiva i nastaju nakon oslobađanja nukleinskih kiselina iz nekrotičnih ili apoptotskih ćelija na mestima inflamacije. Smatra se da anti-DNA i anti-RNK antitela preko stimulacije TLR9 i TLR7 (Toll-like receptor, TLR) mogu imati značajnu ulogu u aktivaciji B limfocita i dendritskih ćelija, što za posledicu ima širenje i održavanje autoimunskog odgovora.²² Anti-DNA i anti-RNK antitela su pre više decenija otkrivena i u serumu i likvoru pacijenata sa MS.

Efektorski mehanizmi kojima antitela doprinose patogenezi MS i EAE su mnogostruki. Ćelijska citotoksičnost posredovana antitelima (antibody-dependant cellular cytotoxicity, ADCC), predstavlja mehanizam u kom ulogu imaju ćelije urođene imunosti kao što su NK (natural killer) ćelije. NK ćelije pomoću receptora FCγRIII prepoznaju konstantni region IgG molekula koji su vezani za površinu ciljne ćelije, i zatim oslobađaju medijatore koji liziraju ciljnu ćeliju. Opsonizacija i fagocitoza je drugi mehanizam u kom ulogu imaju fagociti, pre svega makrofagi. Oni prepoznaju antitela koja opsonizuju antigen, fagocituju kompleks antigen-antitelo, a zatim ga uništavaju. U moždanom tkivu obolelih od MS, kao i u eksperimentalnim modelima, pronađeni su fagociti koji su sadržali antitela i proteine mijelina.⁸ Dodatni mehanizam koji učestvuje u demijelinizaciji je aktivacija sistema komplementa, formiranje MAC kompleksa (membrane attack complex) i destrukcija ciljnog antigena. Na različitim eksperimentalnim modelima je pokazano da dekomplementacija odnosno izostanak funkcije komplementa u toku imunizacije autoantigenom, sprečava razvoj EAE.²³ Pored pomenutih mehanizama, samo vezivanje antitela za antigen može indukovati demijelinizaciju. Pokazano je da vezivanje anti-MOG antitela za MOG aktivira proteine unutar ćelije koji su zaduženi za odgovor ćelije na stres i stabilnost citoskeleta.²⁴

Smatra se da pored mehanizama demijelinizacije koji su posredovani antitelima, antitela mogu imati i pozitivan efekat u razvoju MS. Takođe postoji mišljenje da antitela mogu usmeriti obrazac sekrecije citokina prema TH2 citokinima, a da takođe antitela specifična za određene komponente CNS-a mogu podsticati remijelinizaciju.¹⁵

IMUNOREGULATORNA ULOGA B LIMFOCITA

B limfociti kao pozitivni i negativni regulatori imunskog odgovora

B limfociti se pre svega smatraju pozitivnim regulatorom imunskog odgovora. Njihova efektorska funkcija podrazumeva diferencijaciju u plazmocite koji sintetišu antitela, a takođe su neophodni ćelijski adjuvansi za optimalnu aktivaciju CD4+ T limfocita. Međutim, noviji podaci ukazuju da određene podgrupe B limfocita mogu i negativno da regulišu imunski odgovor, što je potvrđeno u brojnim animalnim modelima autoimunskih i zapaljenskih bolesti.²⁵ Mnoge studije potvrđuju da B limfociti modulišu efektorsku, memorijsku i regulatornu ulogu T ćelija nezavisno od produkcije antitela.

Pored uloge u prezentovanju antigena i pružanju ko-stimulatornih signala, B limfociti sekretuju citokine i hemokine, bilo konstitutivno ili u odgovoru na antigen. Mada je decenijama unazad poznato da B limfociti sekretuju citokine, koncept da citokini produkovani od strane B limfocita mogu da modulišu T ćelijski odgovor relativno je skoro potvrđen.^{26,27} B limfociti proizvode citokine uključene u regulaciju kako humoralnog tako i celularnog odgovora. Na primer pokazano je da regulatorne T ćelije (Treg) proliferišu u kulturi koja sadrži B i T limfocite poreklom iz slezine i da je ona zavisna od B ćelijske produkcije TGF-β (Transforming growth factor beta). Slično tome, TGF-β proizvodeće ćelije indukovane in vivo bile su dovoljne da promovišu konverziju CD4+ CD25+ u FoxP3 regulatorne ćelije.²⁸ B limfociti imaju sposobnost da proizvode različite citokine, i na osnovu toga se svrstavaju u dve efektorske grupacije Be-1 i Be-2 analogno TH1 i TH2 T limfocitima. B limfociti koji u prisustvu TH1 citokinskog profila sekretuju IFNγ (interferon-gama) i IL-12 (interleukin 12) nazivaju se efektorske ćelije tip 1 (Be-1). Ove ćelije stvaraju male količine IL-4, IL-13 i IL-2, ali mogu da sekretuju i IL-10, TNFα (tumor necrosis factor-alpha) i IL-6 [29]. Nasuprot tome su B limfociti koji u prisustvu TH2 citokina (Be-2) sekretuju IL-2, IL-4 i IL-13, ali veoma male količine IFNγ i IL-12 [30]. Be-2 ćelije takođe mogu sekretovati IL-10, TNFα i IL-6.²⁹

U inicijaciji imunskog odgovora, B limfociti imaju i funkciju antigen prezentujućih ćelija. Studije su pokazale da B limfociti, zajedno sa dendritskim ćelijama, imaju ključnu ulogu u aktivaciji CD4+ T limfocita kao odgovor na nisku dozu antigena.^{3,31} Ukoliko se antigen primeni u

visokoj dozi kod miševa sa deplecijom B limfocita, pokazano je da njihova uloga u prezentaciji antigena i aktivaciji CD4+ T limfocita nije neophodna.³ B limfociti takođe nemaju ulogu u aktivaciji CD8+ T limfocita. Pokazano je da CD8+ T limfociti imaju ulogu u patogenezi MS, da u lezijama njihov broj dominira u odnosu na CD4+ T limfocite i da pokazuju oligoklonalnu ekspanziju. Iako je njihovo prisustvo u lezijama CNS-a pokazano, još uvek nije poznato da li oni imaju isključivo patogenu ili možda i protektivnu ulogu.³²

Interakcija T i B limfocita

Između T i B limfocita postoji direktna interakcija koja ima značaja u indukciji imunskog odgovora i u njegovom razvoju, pre svega proliferaciji specifičnog klona CD4+ T limfocita. Interakcija ovih ćelija se obavlja pre svega preko kostimulativnih molekula B7/CD28, CD40-CD40L, OX40/OX40.³ Ovi kostimulativni signali određuju obim ekspanzije CD4+ T limfocita nakon aktivacije kod mišijih modela i kod ljudi.³

Dvosmerna interakcija ovih ćelija se može posmatrati i odnosu na inicijaciju autoimunskih bolesti. B limfociti pružaju T limfocitima signal preko prezentacije antigena, dok T limfociti utiču na B limfocite preko citokina i površinskih liganda. Ovakav odnos stvara potencijal za nastanak pozitivne povratne sprege i *circulus vitiosus*. Postavlja se pitanje koja od ove dve ćelije čini ključnu grešku koja predstavlja okidač za nastanak autoimunskog oboljenja.³³

U regulaciji proliferacije T limfocita od strane B limfocita, ulogu ima CD40L molekul kao i grupa molekula koji još uvek nisu identifikovani. B limfociti regulišu diferencijaciju TH1 limfocita preko IL-10, ali i preko kostimulativnih molekula CD80 i CD86. Pokazano je *in vivo* da su B limfociti deficitarni za CD80 i CD86, manje efikasni u stimulaciji memorijskih T limfocita.³⁴

Regulatorni B limfociti smanjuju inflamatorni potencijal efektorskih ćelija, menjaju aktivnost antigen prezentujućih ćelija (APC) i pospešuju razvoj i ekspanziju T regulatornih limfocita (Treg). Izraz „regulatorne B ćelije“ (B reg) prvi put je uveden 2006. godine od strane Mizoguchi i Brana.³⁵ Ova populacija regulatornih B ćelija pretežno je identifikovana u brojnim animalnim modelima autoimunskih bolesti, što ukazuje na to da autoimuni proces sam po sebi promovise ekspanziju ovih ćelija kao kompenzatorni mehanizam koji ima za cilj da ograniči oštećenje. Dugo se nije znalo da li su regulatorna svojstva opšta karakteristika B limfocita koja nastaje kao posledica opšte aktivacije ovih ćelija ili je u pitanju samo određena podklasa B limfocita koja ima ova svojstva. U različitim studijama je opisano više feno-

tipa regulatornih B limfocita koji svoju funkciju ostvaruju produkcijom IL-10. Stoga se smatra da populaciju regulatornih B limfocita najverovatnije čine različite podklase sa određenim fenotipom i biološkom funkcijom.³⁶ Nedavno je pokazano da je najverovatnije reč o regulatornim, fenotipski jedinstvenim (CD1dhiCD5+) ćelijama poreklom iz slezine miševa koje mogu da utiču na aktivaciju T limfocita.³⁷ Ovi B limfociti, koji imaju regulatornu ulogu (Breg) često se označavaju i kao B-10, s obzirom da je njihova najbitnija osobina sposobnost produkcije interleukina 10 (IL-10). Identifikacija regulatornih B limfocita i mehanizam njihovog dejstva još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Ipak, do sada su mnoge studije potvrdile značaj imunoregulatorne uloge B limfocita. Kada je produkcija IL-10 u pitanju, pokazano je da ovu osobinu imaju pojedini B limfociti poreklom iz slezine kao i peritonealni B limfociti. Pokazano je da B limfociti poreklom iz slezine (CD1dhiCD23+) mogu da spreče autoimuni proces posredstvom produkcije IL-10.³⁸ Konkretno, B limfociti poreklom iz marginalne zone (marginal zone, MZ) slezine produkuju IL-10 u odgovoru na prisustvo apoptotičnih ćelija.³⁹ Kada su u pitanju CD5+ B limfociti poreklom iz slezine, pokazano je da ove ćelije produkuju IL-10 nakon stimulacije sa IL-12, dok CD5- B limfociti nemaju tu osobinu.⁴⁰ Prema tome, IL-10 produkujuće ćelije dele neke fenotipske karakteristike sa CD5+ B-1a limfocitima, T-2 MZ (CD1dhiCD23+) prekursorskim ćelijama i MZ B limfocitima (CD1dhiCD21hi). Efektorske B ćelije funkcionišu kao akceleratori CD4+ T ćelijskog odgovora dok regulatorne B ćelije funkcionišu kao „kočnice“ ovom odgovoru.⁴¹ B regulatorne ćelije su opisane u oba roda B limfocita, kako B-1 tako i B-2, imajući u vidu zajedničke fenotipske karakteristike. Iako su kod miševa identifikovani progenitori B10 limfocita (B10pro), još uvek nije u potpunosti jasno da li B10 limfociti predstavljaju novu podklasu B limfocita ili MZ ili B-1a limfocite u određenom stanju aktivacije.^{36,42} Sa druge strane je pokazano da B10 limfociti ekspimiraju karakterističnu kombinaciju površinskih markera i predloženo je da predstavljaju jedinstven podtip ćelija. Breg ostvaruju svoju regulatornu odnosno supresorsku funkciju interakcijom sa drugim imunokompetentnim ćelijama i sekrecijom imunomodulatornih citokina.⁴³

B10 limfociti regulišu imunski odgovor posredovan T limfocitima preko IL-10 zavisnih mehanizama. Ove ćelije nemaju direktan uticaj na regulaciju proliferacije T limfocita i pokazano je da *in vitro* značajno smanjuju produkciju IFN- γ i TNF- α od strane CD4+ T limfocita. B10 limfociti mogu indirektno modulirati proliferaciju T limfocita smanjujući sposobnost dendritskih ćelija da prezentuju antigen.⁴² IL-10 suprimira proliferaciju antigen specifičnih

CD4⁺ T limfocita inhibirajući antigen prezentujući kapacitet monocita i dendritskih ćelija, kao i inhibicijom produkcije proinflammatoryh citokina od strane makrofaga.⁴² IL-10 takođe inhibira polarizaciju u pravcu TH1 i TH2 odgovora. Ograničavajući sekreciju IL-6 i IL-12 iz dendritskih ćelija, IL-10 inhibira diferencijaciju TH17 limfocita.

Eksperimentalno je potvrđeno da CD5⁺ B limfociti imaju značajnu protektivnu ulogu u razvoju EAE.⁴⁴ Međutim, nedavno objavljena studija je pokazala da je kod pacijenata sa tzv. klinički izolovanim sindromom, prisustvo CD5⁺ B limfocita povezano sa većim rizikom rane konverzije ovog sindroma u manifestni oblik MS.⁴⁵

Eksperimenti koje su izveli Džejnvej (Janeway) i saradnici pre skoro dve decenije su pokazali da B limfociti imaju regulatornu ulogu u razvoju EAE. Ove studije su ispitivale ulogu B limfocita u indukciji EAE kao i u daljem toku bolesti. Rezultati su pokazali da odsustvo B limfocita kod B deficijentnih μ MT miševa nije imalo uticaja na indukciju bolesti i da se kod takvih miševa u kasnoj fazi bolesti razvio teži oblik.³¹ Njihovo istraživanje baziralo se na ispitivanju regulatorne uloge B limfocita u autoimunskom procesu, na modelu miševa deficijentnih za B limfocite (μ MT miševi), kojima je indukovana bolest primenom MOG-a (myelin oligodendrocyte glycoprotein). Odsustvo B limfocita nije sprečilo nastanak bolesti, međutim nedostatak B limfocita doveo je do pogoršanja ishoda bolesti (μ MT miševi u kasnijoj fazi razvijaju težu formu bolesti i ne oporavljaju se u potpunosti u poređenju sa divljim sojem). Zaključeno je da je prisustvo B limfocita i produkcija patogenih antitela, neophodno tokom oporavka, iako njihovo prisustvo nije neophodno u fazi indukcije bolesti. Mnogo češće, regulatorna uloga B limfocita u toku EAE povezuje se sa sposobnošću ovih ćelija da stvaraju IL-10.⁴⁶ Konkretno, adoptivni transfer B limfocita poreklom divljih sojeva ali ne i IL-10^{-/-} normalizuje EAE kod μ MT miševa. Pored toga, oporavak od bolesti zavisi od prisustva autoreaktivnih B limfocita. B limfociti izolovani iz miševa sa razvijenom bolešću produkuju IL-10 u odgovoru na stimulaciju autoantigenom. U odsustvu produkcije IL-10 od strane B limfocita, proinflammatory TH1 posredovani imunski odgovor perzistira i miševi ne mogu da se oporave od EAE. Stoga su IL-10 produkujući B limfociti označeni kao važni u procesu kontrole EAE, a potencijalno i drugih autoimunskih bolesti.

Takođe je ispitivana uloga B limfocita u EAE, korišćenjem miševa deficijentnih za CD19 (CD19^{-/-}), površinski marker specifičan za B limfocite i kritičan za aktivaciju ovih ćelija.⁴⁷ Iako je, CD19 eksprimiran od najranijih pre-B limfocita, pa do terminalne diferencijacije u plazma ćelije, to ne sprečava CD19^{-/-} miševima da razviju normalan profil B limfocita. B limfociti CD19^{-/-} miševa su slabije reaktivni na transmem-

branske signale i generišu skromniji imunski odgovor na T zavisne antigene, sa smanjenom mogućnošću produkcije prirodnih antitela.⁴⁸ Indukcija EAE MOG-om rezultuje težom formom bolesti kod CD19^{-/-} miševa u odnosu na divlji soj. Ozbiljnija forma bolesti kod miševa deficijentnih za CD19 objašnjava se polarizacijom u pravcu TH1 i povećanom produkcijom IFN- γ od strane B limfocita, ali ne i povećanom produkcijom autoreaktivnih antitela. Ovi rezultati pokazuju da CD19^{-/-} B limfociti ne mogu da utiču na tok autoimunskog procesa, a da je potencijalni mehanizam nedostatak regulatornih B limfocita.

Uloga B limfocita na ulogu i nastanak regulatornih T limfocita (Treg)

Studije na eksperimentalnim modelima su pokazale da se u kasnim fazama razvoja EAE povećava broj regulatornih T limfocita koje imaju FoxP3⁺ fenotip. Smatra se ove ćelije imaju dominantnu u sintezi IL-10 u kasnim fazama bolesti, za razliku od B10 limfocita koji tu funkciju imaju u toku inicijacije bolesti i njenoj ranoj fazi.⁴² Pretpostavka je da ova dva tipa regulatornih ćelija imaju nezavisnu ulogu u razvoju EAE u ranoj i kasnoj fazi, ali da se njihove uloge preklapaju i da oblikuju fazu razvoja bolesti.⁴²

Pokazano je da ekspanzija Treg nastaje pod uticajem IL-10 i B7 kostimulacijom, signalima koje pružaju regulatorni B limfociti. I druge studije su pokazale jake dokaze da B limfociti in vitro i in vivo regulišu broj Treg limfocita indukujući eksprimiranje FoxP3⁺ različitim mehanizmima, pre svega produkcijom IL-10 i TGF- β .⁴² Treg zatim preuzimaju ulogu u sekreciji IL-10 i regulaciji autoreaktivnih CD4⁺ T limfocita.

Pored direktnog uticaja regulatornih B limfocita na proliferaciju T limfocita mehanizmima koji nastaju direktnim međućelijskim kontaktom, indirektni uticaj se ostvaruje indukcijom nastanka Treg. Smatra se da je za indukciju nastanka funkcionalnih Treg neophodan signal koje ćelije dobijaju preko CD40 molekula, a da ovaj signal obezbeđuju T limfociti.⁴⁹ Stoga je pretpostavljeno, i u mišijim modelima pokazano, da T limfociti indukuju razvoj regulatornih B limfocita, koji zatim indukuju razvoj regulatornih T limfocita. Pretpostavka je da ovim mehanizmom i humani T limfociti indukuju sopstvenu regulaciju aktivacijom regulatornih B limfocita.²

Pošto Treg suprimiraju autoimunski odgovor, postavljeno je pitanje da li B limfociti kontrolišu autoimunost održavanjem broja Treg limfocita. Skorije studije su pokazale da B limfociti i drugim mehanizmima, osim sekrecije IL-10, utiču na proliferaciju Treg u modelima EAE. Jedan od mehanizama čiji je značaj pokazan je nezavisan od IL-10

i zasniva se na eksprimiranju GITR (glucocorticoid-induced TNFR ligand) na B limfocitima. B limfociti koji eksprimiraju ovaj ligand kontrolišu proliferaciju i homeostazu regulatornih T limfocita.⁵⁰

Deplecija B limfocita kao vid terapije autoimunskih bolesti

Imunski odgovor na patogene često zahteva kako humoralni odgovor zavisen od B limfocita, tako i T zavisen celularni odgovor. CD4+ T limfociti dokazano učestvuju u humoralnom imunskom odgovoru, pružajući pomoć B limfocitima, a produkcijom citokina pomažu celularni imunski odgovor. Mogućnost da B limfociti učestvuju u oba tipa odgovora, humoralnom i celularnom, nije opšte prihvaćena. Neke ranije studije na miševima deficitarnim za B limfocite su pokazale da odsustvo B limfocita negativno utiče kako na CD4+ tako i na CD8+ T ćelijski odgovor.⁵¹ Međutim, druge studije pokazuju da B limfociti nisu neophodni za nastanak i održavanje antigen specifičnog T ćelijskog odgovora.⁵² Ovi kontradiktorni rezultati dodatno stvaraju konfuziju ako se zna da gubitak B limfocita tokom embrionalnog razvoja miševa ima za posledicu mnoge imunološke abnormalnosti.⁵³ S obzirom na mnoge razvojne defekte i nedostatke, koji će nedvosmisleno uticati na T ćelijski odgovor, teško je ove poremećaje sa sigurnošću pripisati B limfocitima i njihovom uticaju na celularni imunski odgovor, bilo da su u pitanju patogeni ili autoantigeni. Ponovno interesovanje, kada je uloga B limfocita u regulisanju T ćelijskog odgovora u pitanju, potkrepljeno je kliničkim podacima koji pokazuju da je deplecija B limfocita efikasan vid terapije za nekoliko autoimunskih bolesti koje su posredovane T limfocitima.^{54,55} Studije na miševima i ljudima su takođe pokazale da deplecija B limfocita ne mora nužno da korelira sa promenama u nivou cirkulišućih antitela, što ukazuje da B limfociti mogu da doprinose nastanku autoimunskih poremećaja nezavisno od produkcije antitela.⁵⁶ Veoma je važno, što je i potvrđeno, da prolazna deplecija B limfocita zaista utiče na T ćelijski odgovor. Na ovaj način su razdvojene razvojne i uloge B limfocita u imunskom odgovoru. Ovi radovi pokazuju da B limfociti nisu pasivni primaoci T ćelijske pomoći već aktivno učestvuju u celularnom imunskom odgovoru, utičući kako na kvantitet tako i na kvalitet T ćelijskog odgovora na strane i autoantigene. Tako primena Rituximaba, monoklonskog antitela specifičnog za CD20, dovodi do deplecije naivnih i memorijskih B limfocita, dok je antitelo manje efikasno u odstranjivanju B limfocita marginalne zone i germinalnog centra (ne ispoljava efekat na dugoživeće plazma ćelije, s obzirom da one ne eksprimiraju CD20).^{54,57,58} Imajući u vidu relativno efikasnu deleciju B limfocita primenom Rituximab-a, ovaj lek je ispitivan u mnogim bolestima. Odobren je za primenu kod non Hočkin limfoma (Non-Hodgkin lymphoma) i za lečenje

pacijenata koji boluju od reumatoidnog artritisa. Rituximab je takođe ispitivan kao potencijalni lek i za druge autoimunske bolesti.⁵⁹ Interesantno je da deplecija B limfocita dovodi do pada titra antitela samo kod nekih bolesti, dok kod drugih ne, što sugeriše da neka antitela nastaju kao posledica aktivacije CD20+ B limfocita, dok druga nastaju produkcijom od strane dugoživećih plazma ćelija koje su CD20-. Bez obzira na to, potvrđeno je da deplecija B limfocita dovodi do kliničkog poboljšanja čak i kod pacijenata kod kojih nije došlo do pada titra antitela.⁵⁶

ZAKLJUČAK

Antitela su od ključnog značaja kada je zaštita od mnogih patogena u pitanju. Međutim, B limfociti obavljaju i brojne druge efektorske i imunoregulatorne funkcije tokom imunskog odgovora. Deplecija B limfocita u terapiji nekih autoimunskih bolesti, omogućila je otkrivanje brojnih funkcija B limfocita, koje su nezavisne od produkcije antitela. Brojne studije su pokazale da B limfociti sarađuju sa T limfocitima modulirajući humoralni i celularni imunski odgovor, kako na patogene, tako i na autoantigene. Iako su napravljeni krupni koraci kada je razumevanje višestruke uloge B limfocita u humoralnom i celularnom imunskom odgovoru u pitanju, postoji puno toga što i dalje stvara nedoumice. Pored autoimunskih bolesti, potrebno je ispitati ulogu ovih ćelija i u drugim oboljenjima.⁶⁰ Brojni podaci uverljivo pokazuju da B limfociti moduliraju T ćelijski odgovor putem prezentacije antigena, obezbeđujući kostimulatorne signale i produkciju citokina. Osim toga, pokazano je da B limfociti ostvaruju brojne efektorske i imunoregulatorne funkcije koje su strogo regulisane. Ono što je nejasno je da li su u pitanju funkcionalne grupe efektorskih i regulatornih B limfocita zapravo različite subpopulacije ćelija. Osim toga, nije poznato da li su efektorske i regulatorne funkcije B limfocita karakteristike određenih ćelija, ili su B limfociti sposobni da menjaju svoje funkcionalne karakteristike u zavisnosti od njihovog lokalnog okruženja. Još jedna od nedoumica je da li je razvoj efekorskog i regulatornog fenotipa krajnja sudbina ovih B limfocita, ili oni mogu da diferenciraju u memorijske ili plazma ćelije, zadržavajući neke ili sve efektorske i regulatorne funkcije. Konačno, potrebno je identifikovati sve in vivo signale koji su neophodni za pokretanje, razvoj i aktivaciju B limfocita sa efektorskim i regulatornim funkcijama. Postoji veliki broj nerazjašnjenih pitanja na koja je potrebno dati odgovor, međutim očigledno je da su saznanja o efektorskim i regulatornim ulogama B limfocita, izdvojila ove ćelije iz van svojih početnih granica humoralnog imuniteta, kako bi obuhvatile šire polje koje uključuje imunske reakcije posredovane T limfocitima.

LITERATURA

1. Lund. EF, Randall DT. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat Rev Immunol* 2010; 10 (4): 236-247.
2. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun* 2011; 36: 228-38.
3. Yanaba K, Bouzaziz JD, Matsushita T, Magro CM, St Clair EW, Tedder TF. B-lymphocyte contribution to human autoimmune disease. *Immunol Rev* 2008; 223: 284-99.
4. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 393-407.
5. Meier UC, Giovannoni G, Tzartos JS, Khan G. Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. B cells in multiple sclerosis: drivers of disease pathogenesis and Trojan horse for Epstein-Barr virus entry to the central nervous system. *Clin Exp Immunol* 2012; 167: 1-6.
6. Holmøy T. The discovery of oligoclonal bands: a 50-year anniversary. *Eur Neurol* 2009; 62: 311-5.
7. Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 2006; 180: 17-28.
8. Weber MS, Hemmer B, Cepok S. The role of antibodies in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 239-45.
9. Huttner HB, Schellinger PD, Struffert T, et al. MRI criteria in MS patients with negative and positive oligoclonal bands: equal fulfillment of Barkhof's criteria but different lesion patterns. *J Neurol* 2009; 256: 1121-5.
10. Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; [Epub ahead of print]
11. Obermeier B, Mentele R, Malotka J, et al. Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nat Med* 2008; 14: 688-93.
12. 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. *J Neuroimmunol* 2011; 230: 1-9.
13. Franciotta D, Salvetti M, Lolli F, Serafini B, Aloisi F. B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008; 7: 852-58.
14. Fraussen J, Vrolix K, Martinez-Martinez P, et al. B cell characterization and reactivity analysis in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 2009; 8: 654-8.
15. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 683-747.
16. Katsavos S, Anagnostouli M. Biomarkers in Multiple Sclerosis: An Up-to-Date Overview. *Mult Scler Int* 2013; 2013: 340508
17. Schneider R, Euler B, Rauer S. Intrathecal IgM-synthesis does not correlate with the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event. *Eur J Neurol* 2007; 14: 907-11.
18. Mathey EK, Derfuss T, Storch MK, et al. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med* 2007; 204: 2363-72.
19. Hohlfeld R, Meinl E, Dornmair K. B- and T-cell responses in multiple sclerosis: novel approaches offer new insights. *J Neurol Sci* 2008; 274: 5-8.
20. Batoulis H, Addicks K, Kuerten S. Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/T(H)1 paradigm. *Ann Anat* 2010; 192: 179-93.
21. Karni A, Bakimer-Kleiner R, Abramsky O, Ben-Nun A. Elevated levels of antibody to myelin oligodendrocyte glycoprotein is not specific for patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1999; 56: 311-5.
22. Lalive PH, Molnarfi N, Benkhoucha M, Weber MS, Santiago-Raber ML. Antibody response in MOG (35-55) induced EAE. *J Neuroimmunol* 2011; 240-241: 28-33.
23. Hundgeburth LC, Wunsch M, Rovituso D, et al. The complement system contributes to the pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis by triggering demyelination and modifying the antigen-specific T and B cell response. *Clin Immunol* 2013; 146: 155-64.

24. Marta CB, Montano MB, Taylor CM, Taylor AL, Bansal R, Pfeiffer SE. Signaling cascades activated upon antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein: potential implications for multiple sclerosis. *J Biol Chem* 2005; 280: 8985-93.
25. Mauri C, Ehrenstein MR. The 'short' history of regulatory B cells. *Trends Immunol* 2008; 29: 34-40.
26. Pistoia V. Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunol Today* 1997; 18: 343-50.
27. Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 332-8.
28. Gros MJ, Naquet P, Guinamard RR. Cell intrinsic TGF-beta 1 regulation of B cells. *J Immunol* 2008; 180: 8153-8.
29. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol* 2000; 1: 475-82.
30. Harris DP, Goodrich S, Mohrs K, Mohrs M, Lund FE. Cutting edge: the development of IL-4-producing B cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor alpha, and Th2 cells. *J Immunol* 2005; 175: 7103-7.
31. Bouaziz JD, Yanaba K, Tedder TF. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol Rev* 2008; 224: 201-14.
32. Anderson AC, Chandwaskar R, Lee DH, et al. A transgenic model of central nervous system autoimmunity mediated by CD4+ and CD8+ T and B cells. *J Immunol* 2012; 188: 2084-92.
33. Edwards JC, Cambridge G. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 394-403.
34. O'Neill SK, Cao Y, Hamel KM, Doodes PD, Hutás G, Finnegan A. Expression of CD80/86 on B cells is essential for autoreactive T cell activation and the development of arthritis. *J Immunol* 2007; 179: 5109-16.
35. Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *J Immunol* 2006; 176: 705-10.
36. Li X, Braun J, Wei B. Regulatory B cells in autoimmune diseases and mucosal immune homeostasis. *Autoimmunity* 2011; 44: 58-68.
37. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD-1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 2008; 28: 639-50.
38. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med* 2003; 197: 489-501.
39. Gray M, Miles K, Salter D, Gray D, Savill J. Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 14080-5.
40. Spencer NE, Daynes RA. IL-12 directly stimulates expression of IL-10 by CD5+ B cells and IL-6 by both CD5+ and CD5- B cells: possible involvement in age-associated cytokine dysregulation. *Int Immunol* 1997; 9: 745-54.
41. Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4(+) T cell immunity. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 236-47.
42. Matsushita T, Horikawa M, Iwata Y, Tedder TF. Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *J Immunol* 2010; 185: 2240-52.
43. Vitale G, Mion F, Pucillo C. Regulatory B cells: evidence, developmental origin and population diversity. *Mol Immunol* 2010; 48: 1-8.
44. Begum-Haque S, Christy M, Ochoa-Reparaz J, et al. Augmentation of regulatory B cell activity in experimental allergic encephalomyelitis by glatiramer acetate. *J Neuroimmunol* 2011; 232: 136-44.
45. Villar LM, Espiño M, Roldán E, et al. Increased peripheral blood CD5+ B cells predict earlier conversion to MS in high-risk clinically isolated syndromes. *Mult Scler* 2011; 17: 690-4.
46. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 2002; 3: 944-50.
47. Matsushita T, Fujimoto M, Hasegawa M, et al. Inhibitory role of CD19 in the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating cytokine response. *Am J Pathol* 2006; 168: 812-21.

48. Sato S, Steeber DA, Jansen PJ, Tedder TF. CD19 expression levels regulate B lymphocyte development: human CD19 restores normal function in mice lacking endogenous CD19. *J Immunol* 1997; 158: 4662-9.
49. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Regulatory B cells in autoimmune diseases: how do they work?. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1173: 260-7.
50. Ray A, Basu S, Williams CB, Salzman NH, Dittel BN. A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. *J Immunol* 2012; 188: 3188-98.
51. Homann D, Tishon A, Berger DP, Weigle WO, von Herrath MG, Oldstone MB. Evidence for an underlying CD4 helper and CD8 T-cell defect in B-cell-deficient mice: failure to clear persistent virus infection after adoptive immunotherapy with virus-specific memory cells from muMT/muMT mice. *J Virol* 1998; 72: 9208-16.
52. Phillips JA, Romball CG, Hobbs MV, Ernst DN, Shultz L, Weigle WO. CD4+ T cell activation and tolerance induction in B cell knockout mice. *J Exp Med* 1996; 183: 1339-44.
53. Ngo VN, Cornall RJ, Cyster JG. Splenic T zone development is B cell dependent. *J Exp Med* 2001; 194: 1649-60.
54. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2008; 358: 676-88.
55. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med* 2009; 361: 2143-52.
56. Levesque MC, St Clair EW. B cell-directed therapies for autoimmune disease and correlates of disease response and relapse. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 13-21.
57. Taylor RP, Lindorfer MA. Immunotherapeutic mechanisms of anti-CD20 monoclonal antibodies. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 444-9.
58. Ahuja A, Anderson SM, Khalil A, Shlomchik MJ. Maintenance of the plasma cell pool is independent of memory B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 4802-7.
59. Dörner T, Isenberg D, Jayne D, et al. Current status on B-cell depletion therapy in autoimmune diseases other than rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2009; 9: 82-9.
60. Miletic M, Ilic S, Tanaskovic I, Rosic V, Jovicic N, Sazdanovic M. Histological characteristics and classifications of coarctation of the aorta. *Rac Ter*; in press