

Received: 2016.04.12
Accepted: 2017.01.10
Published: 2017.04.12

Immunoregulacyjna rola limfocytów B w odpowiedzi na alloprzeszczep nerki

Immunoregulatory role of B lymphocytes in alloresponse to kidney transplant

Tomasz Baran, Maria Boratyńska

Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej UM we Wrocławiu

Streszczenie

Limfocyty B tworzą zróżnicowaną fenotypowo i funkcjonalnie grupę komórek, która może stymulować lub hamować odpowiedź immunologiczną na alloprzeszczep. Limfocyty B biorą udział w procesie odrzucania przeszczepu przez wpływ na zróżnicowanie, proliferację i funkcję efektorową limfocytów T. Uszkadzają przeszczep w reakcji cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC) oraz w procesie humoralnego odrzucania w wyniku wytwarzania alloswoistych przeciwciał przez komórki plazmatyczne.

Inna, niedawno opisana, supresyjna rola limfocytów B ma się przyczyniać do rozwoju tolerancji i ochrony przeszczepu przed odrzucaniem. Tę funkcję pełnią regulatorowe limfocyty B, które kontrolują negatywnie odpowiedź immunologiczną przez wydzielanie supresyjnych cytokin (IL-10, IL-35, TGF-beta), naturalnych przeciwciał oraz przez interakcje komórkowe. W wyniku tych procesów hamują wytwarzanie limfocytów efektorowych Th1 i Th17 oraz stymulują powstawanie regulatorowych komórek T.

U pacjentów po przeszczepieniu nerki z tolerancją operacyjną stwierdzono zwiększenie liczby limfocytów B naiwnych i przejściowych o charakterze komórek regulatorowych oraz zwiększenie ekspresji genów różnicowania limfocytów B. Natomiast w przewlekłym odrzucaniu zależnym od przeciwciał obserwowano zaburzenia dystrybucji i funkcji limfocytów regulatorowych B, co wskazuje na ich istotną rolę w akceptacji przeszczepu.

Obecne leczenie immunosupresyjne w sposób neselektywny hamuje działanie limfocytów T i B upośledzając ich funkcje efektorowe i immunoregulatorowe. Nie w pełni kontroluje proces przewlekłego odrzucania, który jest główną przyczyną utraty przeszczepu. Lepsze poznanie mechanizmów homeostazy immunologicznej zależnej od limfocytów B, może pomóc w doborze tolerogennych protokołów immunosupresyjnych.

Słowa kluczowe: regulatorowe limfocyty B • transplantacja nerki • tolerancja operacyjna • odrzucanie przeszczepu • leczenie immunosupresyjne

Summary

B cells are a group of diverse phenotype and function subsets, which can both stimulate and inhibit the immune response to an allograft. They participate in the rejection process by influencing differentiation, proliferation and effector functions of T lymphocytes. B cells injure the graft via the ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) reaction and humoral rejection through plasmocyte production of donor-specific antibodies.

	<p>A converse, suppressive mode of B cells can attribute to the development of tolerance and protect the graft from rejection. This function is provided by the regulatory B cells, which negatively control the immune response by producing suppressor cytokines (IL-10, IL-35, TGF-β), natural antibodies and through cellular interactions. In effect they inhibit the development of Th1 and Th17 effector cells, and induce differentiation of regulatory T cells.</p> <p>Operational immune tolerance in human kidney transplant recipients was associated with increased number of naïve and transitional B cells of regulatory function, and increased gene expression for differentiation of B cells. However, in chronic alloantibody transplant rejection the distorted distribution and function of regulatory B cells was found, which implies their pivotal role in graft tolerance.</p> <p>Currently, the immunosuppressive regimens unselectively inhibit the activity of T and B cells, by interfering with their effector and immunoregulatory functions. They do not fully control the chronic rejection reaction, which is the major cause of graft loss. Comprehension of the mechanisms of immunologic homeostasis dependent on B cells can help develop immunosuppressive protocols targeted at tolerance.</p>
<p>Keywords:</p>	<p>regulatory B cells • kidney transplantation • operational tolerance • allograft rejection • immunosuppressive treatment</p>
<p>Full-text PDF:</p>	<p>http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1235579</p>
<p>DOI:</p>	<p>10.5604/01.3001.0010.3811</p>
<p>Word count:</p>	<p>5777</p>
<p>Tables:</p>	<p>1</p>
<p>Figures:</p>	<p>–</p>
<p>References:</p>	<p>90</p>

Adres autorki: prof. Maria Boratyńska, Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej UM we Wrocławiu, ul. Borowska 213, 50-529 Wrocław; e-mail: maria.boratynska@op.pl

WSTĘP

Postęp w leczeniu immunosupresyjnym znacznie ograniczył występowanie incydentów ostrego odrzucania przeszczepionej nerki i poprawił roczne przeżycie przeszczepu. Wieloletnie funkcjonowanie przeszczepu jest ciągle niezadowolające i po 10 latach 50% pacjentów traci przeszczep [21,53]. Poznanie mechanizmów przyczyniających się do utrzymania długoletniego funkcjonowania przeszczepionej nerki pozostaje nadal wyzwaniem. Obecne leczenie immunosupresyjne w sposób nieselektywny hamuje działanie limfocytów T i B, upośledzając funkcje efektorowe i jednocześnie immunoregulatorowe odpowiedzialne za tolerancję na alloantygeny. Nie w pełni kontroluje reakcje przewlekłego odrzucania oraz zwiększa ryzyko rozwoju chorób nowotworowych, infekcji, chorób układu krążenia zwiększając śmiertelność biorców przeszczepu [11,80].

Istotną rolę w reakcji odrzucania przeszczepu pełnią limfocyty B, które są zróżnicowaną fenotypowo i funkcjonalnie grupą komórek. Wspomagają komórki T w odpowiedzi immunologicznej, prezentują antygen receptorowi TCR (T cell receptor) na limfocytach CD4, dostarczają sygnałów kostymulacji przez cząsteczki CD80 i CD86, wpływają na rozwój limfocytów T pamięci, pro-

liferację limfocytów T i ich funkcję efektorową. Limfocyty B uszkadzają przeszczep w reakcji cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC), a po zróżnicowaniu do komórek plazmatycznych przez wytwarzanie alloprzeciwciał [3,48]. Oprócz znanego działania limfocytów B odpowiadającego za ostre i przewlekłe odrzucanie przeszczepu, istnieje przeciwstawne działanie hamujące odpowiedź immunologiczną i chroniące przeszczep przed reakcją odrzucania w wyniku licznych niezupełnie jeszcze poznanych mechanizmów [15,62]. Funkcjonalną grupę limfocytów B działającą antyzapalnie i supresywnie nazwano komórkami B regulatorowymi (Breg), przez analogię do regulatorowych limfocytów T [55,56]. W artykule omówiono regulatorowe komórki B w klinicznej transplantacji, z uwzględnieniem ich rozwoju, mechanizmu działania oraz możliwości wykorzystania w monitorowaniu biorców przeszczepu.

ROZWÓJ I DOJRZEWANIE LIMFOCYTÓW B

Limfocyty B, podobnie jak wszystkie komórki krwi, pochodzą z hematopoetycznych komórek macierzystych (HSC – hematopoietic stem cells) znajdujących się w szpiku kostnym. Z komórek HSC powstają komórki progenitorowe limfopoety, z których rozwijają się limfocyty T i B. Rozwój limfocytów B w szpiku jest

procesem złożonym i dynamicznym obejmującym proliferację oraz selekcję komórek w mechanizmie apoptozy [19]. Wiadomości na ten temat pochodzą głównie z badań prowadzonych na myszach. Wieloetapowy proces dojrzewania prekursorów limfocytów do komórek B z ekspresją immunoglobulin jest związany z antygenami różnicowania (CD10, CD19, CD 21, CD23, CD34, CD45). Jest kontrolowany przez czynniki transkrypcyjne, oddziaływanie z komórkami podścieliska szpiku przez cząsteczki adhezyjne (VCAM-1, VLA-4) i cytokiny (IL-7, IL-4, IL-1 alfa, TGF-beta, TNF-alfa). We wczesnym etapie rozwoju, w limfocytach pre-pro-B o fenotypie CD34, CD10, B220, rozpoczyna się ekspresja genów, których produkty uczestniczą w rearanżacji genów receptora immunoglobulinowego. W następnym etapie, na limfocytach pro-B pojawiają się cząsteczki CD19, CXCR4, MHC klasy II, receptor IL-7 oraz pierwotny receptor immunoglobulinowy limfocytów B (pre-B cell receptor – pre-BCR) zbudowany z łańcuchów alfa- i beta-immunoglobulin. Pojawienie się w cytoplazmie i na powierzchni limfocytu łańcucha ciężkiego immunoglobulin oznacza powstanie komórek pre-B. Przemiana w niedojrzały limfocyt B następuje po zakończeniu rearanżacji genów łańcuchów lekkich i pojawieniu się dojrzałego receptora immunoglobulinowego BCR, zmniejszeniu ekspresji antygeny CD10 i pojawieniu się na powierzchni komórki IgM oraz wysokiej ekspresji antygenów CD24 i CD38. Fenotyp niedojrzałej/prześciowej komórki B można przedstawić następująco: CD19⁺sIgM⁺sigD⁻, CD24⁺, CD38⁺, CD43⁺. Kolejny etap dojrzewania limfocytów B następuje po wytworzeniu łańcucha ciężkiego delta i pojawieniu się, oprócz powierzchniowej immunoglobuliny IgM, immunoglobuliny IgD, ekspresji CD21 i CD23, a zmniejszeniu ekspresji cząsteczek CD38 i CD43 [18,26,51,90]. Fenotyp naiwnego dojrzałego limfocytu B jest następujący: CD19⁺CD10⁺D24^{low}CD38^{low}IgD⁺IgM⁺.

SUBPOPULACJE LIMFOCYTÓW B WE KRWI OBWODOWEJ

Zarówno niedojrzałe, nazwane prześciowymi, jak i naiwne dojrzałe limfocyty B przechodzą do krwi krążącej i do ośrodków rozmnażania w obwodowych narządach limfatycznych. Aby w takiej postaci mogły przeżyć kilka miesięcy, niezbędny jest udział wielu cytokin, z których najważniejszymi są IL-7 i należący do rodziny czynnika martwicy nowotworów czynnik aktywujący limfocyty B (B cell activating factor – BAFF) [10]. Dalszy proces różnicowania limfocytów B odbywa się po kontakcie ze swoistym antygenem. Każdego dnia około 10 milionów limfocytów B przechodzi ze szpiku do krwi, natomiast pula limfocytów B jest szacowana na 10 miliardów [26,57].

Niedojrzałe/prześciowe limfocyty B, będące prekursorami dojrzałych naiwnych limfocytów, zasiedlają śledzionę i po kontakcie z antygenem ulegają aktywacji lub zróżnicowaniu. W czasie tego procesu zwiększa się ekspresja markerów CD10 i IgD [73]. Dojrzewanie prześciowych limfocytów B może się odbywać także we krwi, na co wskazują badania u ludzi z wrodzonym brakiem śle-

dziony [9]. Prześciowe limfocyty B odpowiadają na stymulację TLR9 oraz antygeny niezależne grasiczo (m.in. na lipopolisacharydy bakteryjne) wytwarzając przeciwciała bez konieczności prezentacji antygeny przez MHC i bez udziału sygnałów pochodzących z limfocytów T. Wytwarzają naturalne przeciwciała klasy IgM o niskim powinowactwie. Wśród prześciowych limfocytów B stwierdzono największy odsetek komórek wykazujących funkcje regulatorowe.

Dojrzałe naiwne limfocyty B ulegają aktywacji po kontakcie ze swoistymi antygenowo limfocytami T. Migrują do centrów rozmnażania, gdzie proliferują, podlegają hipermutacji somatycznym w regionie zmiennym immunoglobulin, przełączeniu klas syntetyzowanych immunoglobulin przez rekombinację łańcucha ciężkiego oraz dojrzewaniu powinowactwa receptora BCR do antygeny w celu rozwoju komórek B pamięci.

Markerem komórek B pamięci jest glikoproteina CD27, jej ekspresję wykazuje połowa limfocytów B we krwi. Wśród komórek pamięci znajdują się komórki o fenotypie CD19⁺CD27⁺CD38⁻IgD⁺IgM⁺ nieprzełączone oraz o fenotypie CD19⁺CD27⁻CD38⁺IgD⁻ – po przełączeniu klas [1].

Aktywacja limfocytów B pamięci swoistym antygenem powoduje powstawanie plazmablastów CD19⁺CD24⁻CD38⁺CD138⁻ – oraz krótko i długo żyjących plazmacytów CD19⁺CD24⁺CD38⁺CD138⁺, które krążą między szpikiem kostnym a krwią obwodową. Są najważniejszym źródłem przeciwciał o dużym powinowactwie do antygeny. Komórki plazmatyczne w zależności od ekspresji chemokin, mogą się umiejscawiać w szpiku [16], tkankach zmienionych zapalnie, w tym w odrzucanych przeszczepach, tworząc trzyczlorodowe struktury limfatyczne. Takie komórki nie proliferują, natomiast długotrwałe wytwarzają przeciwciała klasy IgG przyczyniając się do przewlekłego odrzucania przeszczepu.

ROZWÓJ REGULATOROWYCH LIMFOCYTÓW B

Pochodzenie regulatorowych limfocytów B nie jest jeszcze dokładnie poznane. Nie jest pewne, czy opisane liczne podtypy limfocytów B o właściwościach regulatorowych są wynikiem pochodzenia z różnych linii komórkowych, czy do ich powstania doszło w czasie dojrzewania limfocytów B, jakie czynniki sprzyjają ich różnicowaniu i jaki wpływ na ich rozwój mają zmiany środowiska. Jest możliwe, iż podczas różnicowania limfocytów B dochodzi do zaburzenia równowagi między limfocytami B wydzielającymi immunosupresyjne cytokiny (IL-10, IL-35 lub TGF-beta) a wydzielającymi cytokiny prozapalne lub wytwarzającymi przeciwciała.

Jedna z hipotez zakłada, że Breg są oddzielną linią komórek B, która nabyła właściwości regulatorowych pod wpływem swoistych czynników kontrolujących ekspresję genów odpowiedzialnych za właściwości supresyjne. Sugeruje się też, że Breg pochodzą z różnych

populacji oddzielnych podgrup i komórek B, a właściwości regulatorowe nabywają w wyniku swoistej stymulacji antygenowej i interakcji z pokrewnymi limfocytami T. Zgodnie z tą hipotezą, swoiste antygenowo regulatorowe limfocyty B powstają w następstwie adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej przez drogę sygnałów pochodzącą z BCR i stymulacji CD40 i TLR (Toll-like receptors) [2,38]. W hodowlach *in vitro*, ludzkie niedojrzałe limfocyty B (proB) w wyniku wiązania CD154 i CpG (fragment DNA bakterii rozpoznawany przez TLR 9) przekształcały się w dojrzałe komórki wydzielające IL-10. Regulatorowe limfocyty B mogą się rozwijać z niedojrzałych komórek strefy brzożnej śledziony, jak i dojrzałych naiwnych foliularnych limfocytów B, w odpowiedzi na zapalenie (np. stymulacji IL-1 beta, IL-6, IL-21, TLR), aby zapobiegać niekontrolowanej ekspansji prozapalnych limfocytów np. Th17. Sygnały do wytwarzania Breg wydzielających IL-10 mogą pochodzić z komórek apoptotycznych. Czynniki BAFF może także selektywnie indukować B komórki o właściwościach regulatorowych. Breg mogą być indukowane przez regulatorowe komórki dendrytyczne przez INF-beta i CD40L [66].

Inna hipoteza wysunięta przez Rosser i Mauri, sugeruje, że Breg są krótko żyjącymi efektorowymi komórkami, które ulegają ekspansji w odpowiedzi na zapalenie lub są indukowane zapaleniem, a proces przebiega podobnie jak dojrzewanie niedojrzałych limfocytów B w plazmablasty [68].

Regulatorowe limfocyty B wytwarzające IL-10, najlepiej poznany ich marker, tworzą około 0,8% całkowitej puli limfocytów krwi obwodowej. Stwierdzano je też w śledzionie, migdałkach, węzłach chłonnych drenujących miejsce zapalenia jak i we krwi pępowinowej.

FENOTYP REGULATOROWYCH LIMFOCYTÓW B

Regulatorowe limfocyty B wykazują różnorodność fenotypową [27]. Znajdują się głównie w obrębie subpopulacji niedojrzałych limfocytów B, takich jak limfocyty przejściowe, naiwne, a także wśród komórek pamięci plazmo-

blastów i plazmocytów (tabela 1). Nie znaleziono jeszcze pojedynczego czynnika służącego do identyfikacji Breg na wzór transkrypcyjnego czynnika FOXP3 charakterystycznego dla regulatorowych limfocytów T. Na powierzchni Breg znajdują się różne układy licznych cząsteczek będących markerami limfocytów B, takich jak: CD1d, CD5, CD19, CD24, CD27, CD148, CD38 i CD40 oraz IgD i IgM [54,68]. Każda z nich ma określone funkcje. Cząsteczka CD1d prezentuje antygen lipidowy komórkom prezentującym antygen (APC). CD5 negatywnie reguluje sygnały z receptora limfocytów B. Marker limfocytów B CD19 jest włączony w aktywację receptora BCR. Cząsteczki CD24 i CD27 dostarczają sygnałów kostymulacji do aktywacji i proliferacji limfocytów T. Wśród komórek CD27⁺ znajdują się komórki wytwarzające IL-10, hamujące syntezę cytokin przez monocyty [27]. Cząsteczka CD38 stymuluje wzrost komórek i wytwarzanie cytokin przez limfocyty B oraz zapobiega ich apoptozie. Cząsteczka kostymulacyjna CD40 po związaniu liganda CD40L indukuje proliferację i zróżnicowanie limfocytów B, indukuje ekspresję FAS i wytwarzanie cytokin, w tym IL-10. Cząsteczka immunoglobuliny IgD aktywuje limfocyty B, a IgM dopełniacz.

Dużą liczbę regulatorowych limfocytów B wykazano wśród niedojrzałych/przejściowych komórek B o fenotypie CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}, o czym pisano wcześniej. W doświadczeniu, w którym stymulowano limfocyty krwi obwodowej przez CD40, stwierdzono najwyższy odsetek komórek wydzielających IL-10 wśród limfocytów o tym fenotypie. Limfocyty przejściowe hamowały różnicowanie limfocytów T naiwnych w komórki Th1 i Th17, zwiększały zdolność do różnicowania w kierunku regulatorowych limfocytów T zależnie od CD40 oraz od ekspresji IL-10. Hamowały swoistą odpowiedź limfocytów CD8 na wirusy i utrzymywały homeostazę indukowanych komórek NK. W populacji osób zdrowych, Breg hamowały proliferację limfocytów T i uwalnianie INF-gamma i TNF-alfa. Zwiększoną liczbę komórek przejściowych stwierdzano w operacyjnej tolerancji, natomiast zmniejszenie liczby i zaburzenie ich funkcji supresyjnej obserwowano w toczniu układowym trzewnym, reumatoidalnym zapaleniu stawów oraz autoimmunologicznej małopłytkowości [25].

Tabela 1. Zróżnicowanie fenotypowe regulatorowych limfocytów B

Subpopulacje limfocytów B z funkcją regulatorową	Fenotyp regulatorowych limfocytów B
Niedojrzałe/przejściowe komórki B	CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD38 ^{high}
Komórki aktywacji/pamięci B	CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD48 ⁺ i CD148 ⁺
Komórki B pamięci	CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD27 ⁺
Plazmablasty	CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD27 ^{int} ; CD19 ⁺ CD27 ^{int} CD38 ⁺ CD19 ⁺ CD27 ^{high} CD38 ⁺
Komórki plazmatyczne wytwarzające IL-10 i IL-35	CD138 ⁺ CD38 ⁺
Komórki Br 1	CD19 ⁺ CD25 ^{high} CD71 ^{high}
Komórki B	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD24 ^{high} CD38 ^{high} CD5 ^{high}
Komórki B	CD19 ⁺ CD1d ^{high} CD5 ⁺

Większość regulatorowych limfocytów B wykazuje wysoką ekspresję cząsteczek CD27, CD48 i CD148, które są wskaźnikami aktywacji/pamięci. Zmniejszenie liczby komórek o tym fenotypie stwierdzano w chorobach autoimmunologicznych, podobnie jak komórek o fenotypie CD5, CD24⁺CD38⁺IgD⁺.

Właściwości regulatorowe wykazano w podgrupie komórek o fenotypie CD24^{high}CD27⁺, czyli charakterystycznym dla komórek B pamięci. IL-10 wydzielana przez tę podgrupę komórek hamowała wytwarzanie TNF-alfa przez monocyty, a w doświadczalnym zapaleniu stawów hamowała wytwarzanie komórek Th 17, zmniejszając nasilenie zmian zapalnych [87]. Iwata i wsp. wykazali, że komórki B10 wytwarzały także cytokiny prozapalne, takie jak IL-6, IL-12 i IFN- γ [33]. Właściwości regulatorowe wykazywały komórki o fenotypie CD19⁺CD38⁺CD147, IgM, stwierdzane w nadmiarze w procesach nowotworowych oraz komórki CD73⁺CD25⁺CD75⁺, których niedobór obserwowano w alergii. Supresyjne właściwości wykazywały także subpopulacje limfocytów B o fenotypie CD19⁺IgD⁺CD24^{high}CD38^{high}CD5^{high} oraz CD1d^{high}CD5⁺.

Plazmablasty o fenotypie CD19⁺CD24^{high}CD27^{int}, zwłaszcza IgM pozytywne, stwierdzane we krwi u człowieka wytwarzały IL-10 i działały supresyjnie na komórki dendrytyczne i efektorowe komórki CD4. Również plazmablasty o fenotypie CD27^{int}CD38⁺ oraz CD27^{high}CD38⁺ uwalniały IL-10 po stymulacji BCR [2,49]. Komórki plazmatyczne z markerem CD138⁺, które wytwarzały IL-35 i IL-10 hamowały komórki NK, neutrofile i komórki CD4. Działały przeciwzapalnie podczas indukcji doświadczalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu [71,81].

Van der Veen opisał we krwi komórki B regulatorowe 1 (Br 1) o fenotypie CD19⁺CD25^{high}CD71^{high}, które oprócz IL-10, wytwarzały antyzapalne swoiste dla alergenu przeciwciała IgG4 przyczyniając się do obwodowej tolerancji [78].

Wspólną cechą regulatorowych limfocytów B, mimo różnic fenotypowych, jest ich zdolność do wytwarzania IL-10 o właściwościach supresyjnych, stąd też są nazywane komórkami B10. Około 60% komórek B10 wykazuje ekspresję CD38 i stanowi 25% wszystkich limfocytów B w populacji ludzi zdrowych. Wykazują większą proliferację w odpowiedzi na mitogeny niż inne limfocyty B. W chorobach autoimmunologicznych obserwowano obniżenie IL-10 w supernatantach hodowli limfocytów B, o fenotypie regulatorowym, stymulowanych CD40L. Obniżenie Breg we krwi korelowało z aktywnością reumatoidalnego zapalenia stawów [33,75].

IMMUNOMODULUJĄCE DZIAŁANIE LIMFOCYTÓW B

Pierwsze spostrzeżenia dotyczące supresyjnego działania limfocytów B na odpowiedź immunologiczną pochodzą z lat siedemdziesiątych ub.w., z badań doświadczalnych nad nadwrażliwością kontaktową.

Zwierzęta pozbawione limfocytów B wykazywały nasilenie cięższej nadwrażliwości kontaktowej zależnej od limfocytów T, co sugerowało, że limfocyty B hamowały aktywację lub regulowały czynność limfocytów T [37,59]. W innych badaniach doświadczalnych wykazano hamujące działanie limfocytów B na odpowiedź antynowotworową limfocytów T, hamowanie wytwarzania zapalnych cytokin w doświadczalnym nieswoistym zapaleniu jelit i regresję autoimmunologicznego zapalenia mózgu pod wpływem obecności limfocytów B wytwarzających IL-10 [8,23,47,52,55]. Natomiast eliminacja limfocytów B przyspieszała progresję chorób autoimmunologicznych. Wykazano, że myszy z doświadczalnym autoimmunologicznym zapaleniem mózgu i z niedoborem limfocytów B nie były zdolne do osiągnięcia remisji choroby w porównaniu z myszami z zachowanymi limfocytami B [82].

Badania kliniczne ostatnich lat również przybliżyły znaczenie limfocytów B w utrzymaniu homeostazy immunologicznej w zdrowiu i w chorobie [8,43,85,86]. U zdrowych osób zapalenie jest procesem samoograniczającym dzięki uwalnianiu antyzapalnych mediatorów i cytokin, natomiast przewlekłe zapalenie i przetrwale aktywowany układ odpornościowy jest wynikiem braku funkcji supresorowej limfocytów w krążeniu i w miejscu zapalenia. Blair i wsp. wykazali, że u osób zdrowych, regulatorowe limfocyty B o fenotypie komórek przejściowych CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} po stymulacji CD40 wydzielają IL-10 i hamowały różnicowanie limfocytów pomocniczych Th1 [4]. Takiego działania nie wykazywały limfocyty B stymulowane CD40 pobrane od pacjentów z toczeniem układowym, które wytwarzały mniej IL-10. Na tej podstawie autorzy wnioskują, że uszkodzona funkcja regulatorowa limfocytów B może być czynnikiem patogenetycznym chorób autoimmunologicznych [4].

MECHANIZM MOLEKULARNEGO DZIAŁANIA REGULATORYWYCH KOMÓREK B (BREG)

Mechanizm regulatorowego działania limfocytów B na odpowiedź immunologiczną nie jest dokładnie poznany. Różnorodne fenotypowo komórki Breg mogą wywierać funkcje regulatorowe przez różne mechanizmy. Działanie immunoregulacyjne Breg nie tyle wynika z liczby limfocytów Breg, co z ich stanu funkcjonalnego i zależy od sygnału, który otrzymują ze środowiska. Funkcjonują w sposób swoisty antygenowo, który wymaga interakcji z pokrewnymi limfocytami T.

Jak już wspomniano, najbardziej stałą cechą komórek regulatorowych jest wydzielanie IL-10 i z tą cytokiną przede wszystkim jest związany mechanizm działania Breg [68,75]. Do ekspansji i funkcji limfocytów B wydzielających IL-10 jest niezbędna IL-21 wydzielana przez limfocyty T. W modelu zapalenia stawów, cukrzycy i tocznia układowego komórki B wytwarzające IL-10 hamowały odpowiedź immunologiczną na autoantygeny [52]. W wyniku bezpośredniej interakcji Breg z efektorowymi limfocytami T CD4⁺CD25⁻ – zwiększa się wytwa-

rzanie regulatorowych komórek T. IL-10 odpowiada za supresję różnicowania komórek Th17, obniżenie zdolności prezentowania antygeny przez komórki dendrytyczne, monocyty i inne komórki prezentujące antygen oraz zmniejszenie wytwarzania prozapalnych cytokin i cząsteczek kostymulujących. IL-10 przywraca równowagę między komórkami Th1 i Th2 oraz wpływa na równowagę między komórkami T FoxP3⁺ a komórkami wydzielającymi IL-17. IL-10 i droga sygnałowa za pośrednictwem cząsteczek CD80 i CD86 umożliwiają supresyjne działanie komórkom Breg. Wykazano, że mechanizm działania IL-10 wytwarzanej przez przejściowe limfocyty B obniża ekspresję cząsteczki CD86 w mechanizmie autokrynnym doprowadzając do zahamowania proliferacji limfocytów T i wytwarzania TNF-alfa [63].

Cherukuri i wsp zwrócili uwagę, że limfocyty B z markerami powierzchniowymi, charakterystycznymi dla limfocytów naiwnych, pamięci oraz limfocytów przejściowych wykazywały podobną ekspresję IL-10, natomiast różniły się wytwarzaniem TNF-alfa [13]. Autorzy stwierdzili, że stosunek ekspresji IL-10/TNF-alfa może być lepszym wskaźnikiem funkcji regulatorowej limfocytów B niż sama ekspresja IL-10. Najwyższy stosunek IL-10 do TNF-alfa wykazywały limfocyty B przejściowe. W badaniu *in vitro* silniej hamowały wytwarzanie Th1 cytokin niż limfocyty B pamięci, mimo podobnego poziomu ekspresji IL-10 [13].

Limfocyty Breg mogą pełnić funkcję supresyjną bez udziału IL-10 przez uwalnianie TGF-beta, który hamuje aktywność prezentowania antygeny, indukuje regulatorowe komórki T Foxp3⁺ oraz indukuje konwersję efektorowych komórek T (CD4⁺CD25⁻) w regulatorowe komórki T [41,67].

Z badań Chesneau i wsp. wynika, że supresyjny wpływ limfocytów B na limfocyty T może być niezależny od obydwu antyzapalnych cytokin (IL-10 i TGF-beta) [14]. Autorzy wykazali, że eliminacja IL-10 i TGF-beta, po dodaniu do hodowli komórkowych przeciwciał przeciwko tym cytokinom, nie zmieniała hamującego wpływu limfocytów B na proliferację limfocytów T CD4⁺ CD25⁻. Dowiedli, że niezbędny w tym procesie jest bezpośredni kontakt między komórkami B i T oraz konieczna jest ekspresja przez limfocyty B granzymu B (GzmB). GzmB jest znany jako składnik cytotoksycznych ziarnistości limfocytów T i komórek NK. Hamowanie proliferacji limfocytów T przez mechanizm zależny od granzymu B stwierdzano we wczesnym okresie zakażenia HIV i chorobach autoimmunologicznych [28,34]. Zaobserwowano również, że liczba komórek B wytwarzających GzmB jest znacząco większa w grupie pacjentów z operacyjną tolerancją, którzy mimo zaprzestania terapii immunosupresyjnej wykazywali stabilną funkcję przeszczepionej nerki. Limfocyty B z ekspresją GzmB charakteryzowały się zwiększoną ekspresją cząsteczek CD5, CD27, CD38 i CD138 [14].

Inny mechanizm supresji odpowiedzi immunologicznej przez Breg może być wynikiem działania IL-35,

która może hamować funkcję efektorową limfocytów T [71,81]. Ponadto IL-35 po związaniu receptora, aktywuje STAT1 i STAT3 w limfocytach B oraz indukuje komórki Breg. IL-35 sprzyjała konwersji ludzkich limfocytów B do komórek Breg wytwarzających zarówno IL-35 jak i IL-10. Uważa się, że IL-35 może być wykorzystana do indukowania autologicznych Breg *in vitro*, które mogłyby być użyte w leczeniu chorób autoimmunologicznych.

Hamowanie odpowiedzi immunologicznej przez komórki B jest też wynikiem interakcji Fas ligandu z limfocytami Th1 lub naciekającymi komórkami odpornościowymi z ekspresją Fas, co może powodować ich apoptozę. W modelu alloprzeszczepu skóry, komórki B FasL⁺ przeniesione od dawcy do biorcy powodowały długotrwałą tolerancję przeszczepu, natomiast komórki z defektem Fas ligandu nie zabezpieczyły przeszczepioną tkankę przed reakcją odrzucania [5,67].

Funkcje immunosupresyjne mogą pełnić wydzielane przez komórki B naturalne i swoiste antygenowo przeciwciała. Mogą się wiązać do powierzchni komórek ulegających apoptozie zwiększając skuteczność fagocytarną makrofagów i komórek dendrytycznych. Przeciwciała upośledzają prezentację antygeny przez komórki prezentujące antygen hamując ich dojrzewanie i ekspresję cząsteczek MHC, przez co hamują odpowiedź zapalną. Swoiste antygenowo sialylowane przeciwciała klasy IgG hamują aktywację komórek B i patogenne reakcje odpornościowe. Wootla i wsp. wykazali, że zwiększenie katalitycznej aktywności krążących IgG zmniejsza ryzyko rozwoju przewlekłej nefropatii przeszczepu [83].

Z przedstawionych danych wynika, że regulatorowa funkcja limfocytów B jest wynikiem złożonych mechanizmów, zależnych od uwalniania antyzapalnych cytokin jak i wynikających z bezpośredniego kontaktu między komórkami, a nawet z wytwarzania przeciwciał naturalnych jak i swoistych antygenowo.

Nadmierna stymulacja komórek Breg może sprzyjać rozwojowi procesu nowotworowego, ponieważ aktywacja Breg wytwarzających TGF-beta jest wykorzystywana przez komórki guza do ucieczki spod kontroli immunologicznej [64,90]. Rozwojowi przerzutów nowotworowych sprzyja konwersja spoczynkowych limfocytów CD4 do regulatorowych limfocytów T. Również wirusy HCV, HIV i EBV chronią się przed Th1 odpowiedzią stymulując limfocyty Breg z ekspresją cząsteczek FAS, co sprzyja przewlekłej infekcji.

ROLA LIMFOCYTÓW B W IMMUNOREGULACJI ODPOWIEDZI NA ALLOPRZESZCZEP

Badania w transplantacji doświadczalnej

Wyniki badań pochodzące z transplantacji doświadczalnej potwierdzają udział limfocytów B w tolerancji immunologicznej na alloprzeszczep. Przeniesienie limfocytów B od myszy z tolerancją na MHC klasy I niezgodnego

przeszczepu skóry przedłużało przeżycie przeszczepu w sposób swoisty antygenowo i zależny od liczby podanych limfocytów B [58]. Szczury, którym w czasie transplantacji nerki podano limfocyty B pochodzące od dawcy nerki wykazywały długotrwałą akceptację przeszczepu [84]. Długotrwała tolerancja alloprzeszczepu serca u szczurów, wywołana krótkotrwałym podaniem leku immunosupresyjnego, analogu dezoksypergualiny, charakteryzowała się nagromadzeniem we krwi i w przeszczepie limfocytów B z ekspresją genów charakterystycznych dla tolerancji [40]. Limfocyty B od biorcy z tolerancją były zdolne do przeniesienia tolerancji na przeszczep na drugiego osobnika. Wywołanie tolerancji na alloantygeny było możliwe jedynie w obecności limfocytów B [24].

Deplecja limfocytów B po zastosowaniu przeciwciała anti-CD20 lub anti-CD19, wpływała na zwiększenie proliferacji alloswoistych komórek CD4 i przyspieszała odrzucanie alloprzeszczepu skóry, natomiast nie miała wpływu na ostre odrzucanie nerki lub serca [22]. Natomiast w transplantacji wysepek trzustkowy po podaniu przeciwciała anti-CD20, obserwowano rekonstrukcję limfocytów B z dominacją komórek przejściowych i niedojrzałych, co wpłynęło na wydłużenie czasu funkcjonowania przeszczepu [44]. W modelu transplantacji serca u myszy, z deplecją regulatorowych limfocytów T CD4⁺CD25⁺ przed przeszczepem dochodziło do odrzucania przeszczepu mimo zwiększenia populacji komórek B o właściwościach regulatorowych, wskazując na istotną rolę regulatorowych limfocytów T oraz na interakcję między regulatorowymi limfocytami T i B w indukcji tolerancji. U zwierząt z tolerancją na przeszczep obserwowano nagromadzenie limfocytów B o fenotypie regulatorowym i tworzenie centrów rozmnażania w obrębie alloprzeszczepów [40]. Zdolność limfocytów B do przedłużenia przeżycia alloprzeszczepu w przedstawionych modelach transplantacji wskazuje na ich ważną rolę w rozwoju tolerancji na przeszczep.

BADANIA W TRANSPLANTACJI KLINICZNEJ

Wyniki badań u biorców przeszczepu z tolerancją operacyjną

W transplantacji klinicznej rola limfocytów B w tolerancji nie jest tak jednoznaczna, chociaż przedstawiono wiele przykładów popierających supresyjny wpływ limfocytów B na alloodpowiedź [6,7,30,32,46,65,79].

Najwięcej informacji o roli limfocytów B w tolerancji immunologicznej u biorców przeszczepionej nerki przyniosły 2 wielośrodkowe badania pochodzące ze Stanów Zjednoczonych i z Europy, a opublikowane w 2010 r. w *Journal of Clinical Investigation* [60,69]. Badaniami objęto grupę 36 chorych z operacyjną tolerancją, czyli biorców przeszczepu, którzy z różnych powodów zaprzestali leczenia immunosupresyjnego przez co najmniej rok, a mimo to nie wystąpiła u nich reakcja odrzucania i przeszczepiona nerka zachowała prawidłową czynność.

Ta niewielka grupa biorców, którą udało się zebrać na 2 kontynentach wskazuje jak rzadko zdarza się tolerancja na niezgodne antygeny HLA w transplantacji nerek.

Newell i wsp., badali ekspresję genów obejmującą znaczną część genomu (w tym geny regionu zmiennego w łańcuchu kappa i lambda immunoglobulin) oraz fenotyp limfocytów B i T w grupie 25 pacjentów z tolerancją operacyjną, a uzyskane wyniki porównywali z grupą 27 pacjentów leczonych immunosupresyjnie z dobrym funkcjonowaniem przeszczepionej nerki oraz z 12-osobową grupą zdrowych ochotników [60] (Immune Tolerance Network). Autorzy wykazali, że tolerancja na przeszczep korelowała z grupą genów charakterystycznych dla limfocytów B. Z 30 genów różnicujących pacjentów z tolerancją od pacjentów leczonych immunosupresyjnie 22 było swoistych dla limfocytów B. Pacjenci z operacyjną tolerancją wykazywali zwiększenie całkowitej liczby limfocytów B, komórek przejściowych o fenotypie CD19⁺CD38⁺CD24⁺IgD⁻, komórek naiwnych i pamięci oraz podwyższoną wewnątrzkomórkową ekspresję regulatorowej cytokiny IL-10 w porównaniu do grupy leczonej immunosupresyjnie. W porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej, pacjenci z tolerancją mieli większą liczbę limfocytów B naiwnych oraz wytwarzających IL-10, wyższy w moczu i w surowicy poziom mRNA dla CD20 [60].

Komórki B o fenotypie komórek naiwnych mają ograniczoną sprawność prezentowania antygeny limfocytom T naiwnym. Prezentacja antygeny przez naiwne limfocyty B stymuluje rozwój komórek regulatorowych, sprzyjając tolerancji [12]. Natomiast komórki B pamięci, których liczba jest także podwyższona u pacjentów z tolerancją, wytwarzają więcej IL-10.

W innym wielośrodkowym badaniu europejskim (Indices of Tolerance/RISSET) ustalono parametry i biomarkery związane ze stanem immunologicznej tolerancji na podstawie porównania wyników badania 11 pacjentów z operacyjną tolerancją z 9. pacjentami z przewlekłym odrzucaniem, z 51. pacjentami ze stabilną funkcją nerki, ale leczonymi immunosupresyjnie oraz ze zdrową grupą kontrolną (9 osób) [69].

Podobnie jak w badaniu Immune Tolerance Network, u pacjentów z tolerancją obserwowano większą liczbę limfocytów B w wyniku zwiększenia komórek naiwnych CD19⁺CD27-IgD⁺ i przejściowych CD19⁺CD27-CD24⁺CD38⁺IgD⁺ oraz więcej komórek NK we krwi w porównaniu z pacjentami z przewlekłym odrzucaniem lub z pacjentami leczonymi immunosupresyjnie. Zwiększonej liczbie limfocytów B u pacjentów z operacyjną tolerancją towarzyszyła zwiększona ekspresja genów charakterystycznych dla limfocytów B, m.in.: *TCL1A*, *CD20*, *CD79b*. Geny *TCL1A* i *CD79B*, wykazywały zmniejszoną ekspresję u pacjentów z incydentem ostrego odrzucania w porównaniu z pacjentami ze stabilną funkcją przeszczepu [32]. U pacjentów z tolerancją operacyjną obserwowano też zmiany w populacji limfocytów T, które obejmowały

wały zmniejszoną liczbę aktywowanych limfocytów T CD4⁺, zmniejszoną odpowiedź immunologiczną komórek T CD4⁺ na antygeny dawcy (obniżenie wytwarzania interferonu gamma w teście ELISPOT) i wysoki stosunek ekspresji genu dla czynnika transkrypcyjnego FOXP3 w porównaniu z genem α -1,2-mannozydazy w komórkach krwi obwodowej, zwłaszcza u pacjentów z brakiem niezgodnych antygenów HLA. W tym badaniu zidentyfikowano 10 genów, które pozwalają na selekcję pacjentów z tolerancją na przeszczep ze 100% czułością i 100% swoistością [60].

Podobne zmiany dystrybucji limfocytów B we krwi obwodowej obserwowali Chesneau i wsp. u 9 pacjentów z operacyjną tolerancją [14,15]. Wykazali większą całkowitą liczbę limfocytów B, komórek przejściowych i naiwnych, natomiast obniżenie zróżnicowanych komórek plazmatycznych CD20⁺CD38⁺CD138⁺CD19⁺ oraz obniżenie ekspresji genów różnicowania i genów antyapoptotycznych limfocytów B w porównaniu z pacjentami leczonymi immunosupresyjnie. Pacjenci z tolerancją mieli więcej limfocytów B z ekspresją GzmB⁺. Odsetek tych komórek korelował ze stopniem zahamowania proliferacji komórek efektorowych CD4⁺CD25⁻. Jednocześnie ze zwiększeniem Breg obserwowano wyższe stężenie Treg i niższe limfocytów cytotoksycznych CD8. Nie odnotowano różnic w liczbie limfocytów B pamięci w badanych grupach biorców przeszczepu.

W badaniach *in vitro* limfocyty B proliferowały prawidłowo, lecz wytwarzały więcej IL-10 oraz wykazywały defekt ekspresji czynników różnicowania w komórki plazmatyczne i większą skłonność do apoptozy, aniżeli limfocyty pacjentów leczonych immunosupresyjnie. Autorzy sugerują, że przewaga limfocytów B wytwarzających IL-10 oraz deficyt komórek plazmatycznych może zmieniać mikrośrodowisko sprzyjając utrzymaniu tolerancji. Sugerują też integracyjną rolę limfocytów B w sieci regulacji odpowiadającej za rozwój tolerancji na alloprzeszczep.

Badania Silvy i wsp. także wskazują na udział limfocytów B w tolerancji operacyjnej. Badania przeprowadzone na zaledwie 5-osobowej grupie biorców wykazały porównywalne wyniki odsetka jak i bezwzględnej liczby limfocytów B, komórek naiwnych, Breg (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}) oraz podobną zmienność receptora limfocytów B (BCR) jak w zdrowej grupie kontrolnej [72]. Ponadto limfocyty Breg wykazywały większą aktywację szlaku sygnałowego CD40/STAT3, który odgrywa główną rolę w wielu procesach komórkowych, takich jak wzrost, apoptoza i jest istotny dla funkcji Breg.

WYNIKI BADAŃ U BIORCÓW Z PRZEWLEKŁYM ODRZUCANIEM PRZESZCZEPU

W grupie pacjentów z przewlekłym odrzucaniem przeszczepu dystrybucja i funkcja limfocytów B wykazywała przeciwny trend do opisywanego w tolerancji operacyjnej. Głównymi zaburzeniami były: obniżenie odsetka

i liczby bezwzględnej limfocytów B oraz zmniejszenie liczby Breg o fenotypie komórek przejściowych CD24^{hi}CD38^{high}CD5⁺ [13,61,72,74]. Pacjenci z przewlekłym odrzucaniem mieli mniejszą liczbę komórek pamięci oraz zredukowany stosunek aktywowanych limfocytów B do komórek pamięci, a także obniżoną zdolność do aktywacji szlaku CD40 i STAT3 w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną [72]. Na uszkodzenie supresyjnej funkcji limfocytów B w porównaniu z biorcami ze stabilną funkcją przeszczepu, zwrócili uwagę Nouel i wsp., którzy wykazali brak skutecznego hamowania proliferacji autologicznych limfocytów T przez limfocyty B aktywowane CpG [61]. Limfocyty B izolowane od tych pacjentów znacznie słabiej hamowały wytwarzanie Th1 prozapalnych cytokin (INF- γ i TNF- α) w porównaniu z limfocytami B pochodzącymi od pacjentów ze stabilną funkcją przeszczepionej nerki lub od osób zdrowych [61]. Ekspresja antygenów HLA-DR była istotnie wyższa na komórkach pamięci IgD⁺CD27⁺ u pacjentów z przewlekłym odrzucaniem, sugerując zwiększoną zdolność prezentacji antygeny w tej grupie chorych [61].

Cherukuri i wsp. zwrócili uwagę na niekorzystną polaryzację wydzielanych cytokin u pacjentów z przewlekłym odrzucaniem [13]. Przejściowe limfocyty B wykazywały znacznie większą ekspresję TNF-alfa, natomiast podobną ekspresję IL-10 jak limfocyty od biorców stabilnych, co spowodowało redukcję stosunku IL-10/TNF-alfa. W badaniach *in vitro*, przejściowe limfocyty pobrane od pacjentów z odrzucaniem nie tylko nie hamowały wytwarzanie cytokin przez limfocyty Th1, lecz zmniejszały wydzielanie cytokin przez limfocyty Th2. U pacjentów z dysfunkcją przeszczepu niewielkie wydzielanie IL-10 w stosunku do wydzielanego TNF-alfa przez przejściowe limfocyty korelowało z gorszymi wynikami przeszczepienia w czasie ponad 3-letniej obserwacji [13].

Obserwacje prowadzone przez Shabir i wsp. przez 4 lata po transplantacji wykazały, że pacjenci, którzy wytworzyli *de novo* przeciwciała DSA i jednocześnie wykazywali zwiększony odsetek przejściowych komórek B nie mieli cech klinicznych ani histopatologicznych odrzucania przeszczepu [70]. Wyniki tego badania sugerują, że regulatorowe limfocyty B chroniły przeszczep przed uszkodzeniem związanym z przeciwciałami.

WPLYW LECZENIA IMMUNOSUPRESYJNEGO NA LIMFOCYTY B O WŁAŚCIWOŚCIACH REGULATORYWYCH

Z dotychczasowych badań wynika, że leczenie immunosupresyjne utrudnia utrzymanie stanu równowagi między funkcją efektorową a supresyjną limfocytów u pacjentów po przeszczepieniu nerki. Deplecja limfocytów B zwiększała częstość ostrego odrzucania, potwierdzając hamujące działanie limfocytów B na alloodpowiedź. Clatworthy i wsp. zastosowali indukcję przeciwciałem anti-CD20 u pacjentów przed przeszczepieniem nerki i u większości (83%) chorych wystąpiło ostre odrzucanie, natomiast po zastosowaniu indukcji przeciwciałem anti-CD25 częstość odrzucania wyno-

siła 14% [17]. Również u chorych bez indukcji epizody ostrego odrzucania występowały znacznie rzadziej niż u pacjentów, którym podano przeciwciało anti-CD20 [33]. Taki wynik sugeruje szkodliwość usunięcia komórek B, w tym regulatorowych i stawia pytanie czy stosowanie przeciwciał deplecyjnych w indukcji immunosupresji lub w leczeniu ostrego odrzucania nie utrudni rozwoju tolerancji na allop przeszczep. Analiza pacjentów z tolerancją operacyjną wykazała, że wśród tej grupy było dwukrotnie mniej pacjentów, którzy otrzymali indukcję przeciwciałami antylimfocytarnymi (poliklonalne surowice antytymocytarne; ATG), aniżeli w grupie pacjentów ze stabilną funkcją lub z reakcją odrzucania przeszczepu, co sugeruje, że deplecja limfocytów nie sprzyja rozwojowi tolerancji [60,88].

Przeciwnie wnioski płyną z niektórych badań doświadczalnych z zastosowaniem przeciwciał anti-CD20. Wynika z nich, że po deplecji limfocytów B, nowo generowane limfocyty mają głównie charakter komórek przejściowych, czyli regulatorowych oraz naiwnych, co sugeruje, że takie leczenie nie uszkadza subpopulacji limfocytów B odpowiadających za negatywną regulację odpowiedzi immunologicznej. Zwierzęta leczone przeciwciałem anti-CD20 oraz ATG wykazywały istotne wydłużenie czasu przeżycia wszczepionych wysepek trzustkowych [44].

U pediatrycznych biorców przeszczepu również obserwowano tolerogenną redystrybucję limfocytów B po leczeniu ostrego odrzucania przeciwciałem anti-CD20. Rok po leczeniu stwierdzono przywrócenie obniżonego stosunku limfocytów B naiwnych do limfocytów B pamięci i rekonstytucję naiwnych limfocytów B do poziomu stwierdzanego u stabilnych biorców przeszczepu [89]. W populacji dorosłych biorców przeszczepu, którzy otrzymali pojedynczą dawkę przeciwciała anti-CD20 (375 mg/m²), oprócz standardowej immunosupresji, stwierdzano długotrwałą, prawie całkowitą deplecję limfocytów B. Badanie węzłów chłonnych pobranych 4 tygodnie po podaniu rituksymabu wykazało niższy odsetek naiwnych (IgD⁺CD27⁻), wyższy przełączonych komórek pamięci i brak komórek przejściowych oraz zmiany funkcjonalne limfocytów B [35].

Wynik działania przeciwciał anti-CD20 na homeostazę immunologiczną u biorców przeszczepu zależy prawdopodobnie od czasu podania przeciwciała: przed, w czasie lub po kontakcie limfocytów B z alloantygenami. Takie wnioski wypływają też z badań nad doświadczalnym zapaleniem mózgu (EAE). Przeciwciało podane przed indukcją EAE zastrzało zmiany z powodu eliminacji Breg, a podane w czasie trwania choroby łagodziło jej objawy, przez eliminację efektorowych komórek B zapobiegając aktywacji limfocytów CD4 [50].

Niekorzystny wpływ na rozwój tolerancji wykazywał alemtuzumab (skierowany przeciw cząsteczce CD52). Po początkowej deplecji następowała regeneracja limfocytów B z towarzyszącym wzrostem wytwarzania przeciw-

ciał anti-HLA skierowanych przeciw dawcy przeszczepu [76]. Heidt i wsp. w badaniach prowadzonych przez jeden rok u 19 pacjentów po indukcji alemtuzumabem stwierdzili krótkotrwały, przejściowy wzrost liczby komórek B o fenotypie regulatorowym oraz długotrwałe utrzymującą się dominację naiwnych limfocytów B, co może zmniejszać odpowiedź na allop przeszczep i sprzyjać utrzymaniu homeostazy immunologicznej [31].

Leczenie belataceptem, selektywnym inhibitorem kostymulacji limfocytów T (CTLA4-Ig) pozytywnie wpływało na tolerogenny profil limfocytów B przez zwiększenie proporcji przejściowych i naiwnych limfocytów B kosztem komórek pamięci [42].

O wpływie przewlekłe stosowanego leczenia immunosupresyjnego na kinetykę subpopulacji limfocytów B oraz ich funkcję u biorców przeszczepu nerki mniej wiadomo, chociaż w ostatnim czasie zajmowało się tym zagadnieniem kilka grup badaczy [20,29,45,36]. Kamburova i wsp. w czasie dwuletniej obserwacji 26 pacjentów leczonych takrolimusem, mykofenolanem mofetylu (MMF) i steroidami wykazali przesunięcie fenotypu limfocytów B w kierunku komórek pamięci [36]. Obserwowali zmniejszenie odsetka limfocytów naiwnych (IgD⁺CD27⁻), przejściowych (CD24^{high}CD38^{high}) i dojrziałych (CD24⁺CD38⁺), przy względnym wzroście liczby komórek pamięci o fenotypie CD24^{high}CD38⁻ oraz przełączonych IgD⁺CD27⁺. Fenotypowi komórek pamięci towarzyszył wzrost odsetka limfocytów B CD80⁺ i CD95⁺ w 12 i 24 miesiącu obserwacji. Opisane zmiany profilu limfocytów B są przeciwnie do profilu obserwowanego u pacjentów z tolerancją operacyjną, wskazując, że obecnie stosowane leczenie nie sprzyja rozwojowi tolerancji na przeszczep. Większość limfocytów wykazywała ekspresję receptora BAFF, którego intensywność ekspresji rosła z czasem obserwacji.

Viklicky i wsp. monitorowali przez jeden rok kinetykę limfocytów za pomocą markerów CD45, CD19, CD 27, CD38, CD 24, IgD, IgM i CD21 u 98 biorców przeszczepu nerki, którzy otrzymali ATG (74 pacjentów) lub bazyliksymab (24 pacjentów), a w leczeniu przewlekłym takrolimusem, MMF i prednison [74]. Autorzy wykazali mniejszą liczbę plazmablastów o fenotypie IgM⁺CD38^{high}CD27^{high} oraz limfocytów B przejściowych o fenotypie IgM^{high}CD24^{high}CD38^{high}, zwłaszcza w pierwszych 3 miesiącach po przeszczepieniu. Zmniejszenie liczby przejściowych limfocytów w 3. miesiącu korelowało z ostrym odrzucaniem przeszczepu. Niższe wartości limfocytów przejściowych stwierdzano u pacjentów z uczuleniem na antygeny transplantacyjne (PRA>50%), jak i u pacjentów z ostrym lub przewlekłym odrzucaniem przeszczepu. Liczba komórek naiwnych (IgM⁺IgD⁺CD27⁻) i komórek B pamięci przełączonych i nieprzełączonych IgM⁺CD27⁺, poza 7 dobą, nie ulegała większej zmianie w czasie rocznej obserwacji [74].

Chung i wsp. w badaniach wykonanych miesiąc po transplantacji u 21 pacjentów leczonych takrolimusem, MMF

i prednisonem oraz bazyliksymbabem w indukcji wykazali istotne obniżenie liczby komórek przejściowych o fenotypie CD24⁺CD38⁺/CD19⁺ wraz z obniżeniem stężenia immunosupresyjnych cytokin IL-10 i IL-21 oraz obniżeniem ekspresji mRNA BLNK (B-cell linker) w porównaniu z badaniami pobranymi przed przeszczepem. Subpopulacja dojrzałych komórek B i komórek B pamięci nie uległa zmianie [16].

W innym badaniu Van de Berg i wsp. badali fenotyp limfocytów T i B w szóstym miesiącu, drugim i piątym roku po przeszczepieniu u 56 biorców nerki, leczonych podobnie jak w wyżej omówionych pracach [77]. Wykazali niższy odsetek i niższą całkowitą liczbę limfocytów B u biorców przeszczepu w porównaniu z osobami zdrowymi w każdym badanym punkcie czasowym. Zarówno u biorców przeszczepu ze stabilną czynnością nerki, jak i z subklinicznym lub ostrym odrzucaniem przeszczepu, obserwowano bardziej zróżnicowaną pulę krążących limfocytów B z niższym odsetkiem naiwnych CD27⁺IgD⁺ i wyższym odsetkiem zarówno nieprzełączonych CD27⁺IgD⁺ i przełączonych CD27⁺ IgD⁺ komórek pamięci w porównaniu ze zdrową kontrolą. Obserwowano również obniżenie odsetka regulatorowych limfocytów T i cytotoksycznych limfocytów CD8⁺. Zmiany dystrybucji limfocytów autorzy tłumaczyli przewlekłą stymulacją antygenową.

Wpływ inhibitorów mTOR na populacje limfocytów B nie różnił się od działania inhibitorów kalcyneuryny. Inhibitory mTOR przyczyniały się do ekspansji regulatorowych limfocytów T, w porównaniu z leczonymi inhibitorami kalcyneuryny, co dowiedziono już we wcześniejszych badaniach, natomiast nie miały takiego wpływu na regulatorowe komórki B. Niezależnie od stosowanego leczenia liczba przejściowych limfocytów B CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} rosła z czasem po transplantacji i korelowała z odległym przeżyciem przeszczepu, niemniej była istotnie niższa w porównaniu z populacją zdrową [39]

Heterogenne, niezbyt liczne grupy biorców przeszczepu, uczestniczących w różnych programach immunosupresyjnych, badane w różnym okresie po transplantacji z użyciem różnych metod utrudniają jednoznaczna ocenę wpływu leczenia immunosupresyjnego na dystrybucję i funkcję regulatorową limfocytów B. Z większości badań wynika brak korzystnego wpływu immunosupresji na rozwój tolerogenicznego profilu limfocytów B.

PODSUMOWANIE

W miarę rozwoju badań nad regulatorowymi limfocytami B, okazało się, że ta populacja komórek jest niezwykle złożona, ze względu na heterogenność receptora limfocytów B (BCR), różnorodność fenotypową, mnogość funkcji wykorzystujących liczne mechanizmy do regulacji odpowiedzi immunologicznej, które mogą działać łącznie i na zasadzie sprzężenia zwrotnego.

U biorców przeszczepu z tolerancją operacyjną wykazano wyższą proporcję i liczbę regulatorowych limfocytów

B we krwi. Tworzyły je limfocyty B w różnym stadium rozwoju, chociaż głównie o fenotypie przejściowym CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}. Ich wspólną cechą była przewaga wydzielania supresyjnej IL-10, nad wydzielaniem cytokin prozapalnych. Nie wiadomo, czy zwiększona obecność Breg jest niezbędna do utrzymania stanu tolerancji operacyjnej, czy też jest jego następstwem. Przeciwnie niż u pacjentów z tolerancją były zmiany dystrybucji i funkcji limfocytów B z przewagą wydzielania cytokin prozapalnych w przewlekłym odrzucaniu przeszczepu.

Nie wyjaśniono dlaczego sygnały, które otrzymują limfocyty B u pacjentów z tolerancją operacyjną wpływają na przewagę wydzielania cytokin hamujących odpowiedź immunologiczną (IL-10, TGF-beta), a u biorców z przewlekłym odrzucaniem zależnym od przeciwciał na przewagę wydzielania cytokin prozapalnych (TNF-alfa, INF-gamma).

Badania fenotypu i funkcji limfocytów B mogą być wykorzystane w transplantacji klinicznej do monitorowania pacjentów po przeszczepieniu nerki.

- Określanie profilu limfocytów B i ich funkcji regulatorowej może być biomarkerem stanu homeostazy immunologicznej u biorców przeszczepu. Regularne, prospektywne badania w powiązaniu ze stanem klinicznym mogą pomóc w dobraniu siły immunosupresji.

- Poszukiwanie i stosowanie takiego leczenia immunosupresyjnego, które będzie chroniło funkcje regulatorowe limfocytów B lub też zwiększało różnicowanie limfocytów B w kierunku komórek regulatorowych. Wydaje się, że będzie możliwa indukcja *in vitro* komórek regulatorowych pobranych od biorcy i podawanie ich przed przeszczepem, podobnie jak w modelu transplantacji doświadczalnej. Nie należy jednak zapominać, że nadmierna ekspansja komórek regulatorowych B może być przyczyną rozwoju nowotworu lub infekcji, które wymykają się spod kontroli immunologicznej. Przykładem takiego nowotworu jest chłoniak złośliwy, w którym dominują regulatorowe limfocyty B CD5 z jednoczesną ekspresją FASL i IL-10.

- Problemem do wnikliwego przeanalizowania pozostaje leczenie preparatami, które w sposób nieselektywny wpływają na limfocyty B (przeciwciało anti-CD20; rituksymab, anti-CD52; alemtuzumab, anti-BAFF-R; belimumab, inhibitor proteasomu; bortezomib). Rituksymab, powszechnie stosowany w prewencji uszkodzenia przeszczepu przez alloprzeciwciała oraz w leczeniu odrzucania zależnego od przeciwciał, powoduje wielomiesięczną deplecję limfocytów B (z wyjątkiem pro-B i komórek plazmatycznych), niekorzystnie wpływając na profil limfocytów B i w odniesieniu do przedstawionych badań, raczej nie wydłuży przeżycie przeszczepu.

Trzeba też pamiętać, że regulatorowe limfocyty B, nie działają w izolacji, lecz są włączone w sieć powiązań z innymi komórkami odpowiedzi immunologicznej, odpornością wrodzoną, cytokinami, komórkami ulegają-

cymi apoptozie, komórkami przeszczepionego narządu, a zatem manipulacja nimi będzie zaburzać homeostazę immunologiczną. Konieczne są dalsze badania w celu lepszego poznania mechanizmów regulacji odpowiedzi immunologicznej zależnej zarówno od fenotypu limfocytów B, zróżnicowania genów regionu zmiennego immunoglobulin i wydzielania przeciwciał i cytokin,

co może pomóc w doborze tolerogennych protokołów immunosupresyjnych i wydłużyć przeżycie biorców i przeszczepionego narządu. Znalezienie jednolitego markera identyfikacji regulatorowych limfocytów B, czy to czynnika transkrypcyjnego czy też powierzchniowej molekuly mogło by przyspieszyć kliniczne wykorzystanie regulatorowych limfocytów B.

PIŚMIENICTWO

- [1] Agematsu K., Hokibara S., Nagumo H., Komiya A.: CD27: a memory B-cell marker. *Immunol. Today*, 2000; 21: 204-206
- [2] Baba Y., Matsumoto M., Kurosaki T.: Signals controlling the development and activity of regulatory B-lineage cells. *Int. Immunol.*, 2015; 27: 487-493
- [3] Banasik M., Boratyńska M., Kościelska-Kasprzak K., Mazanowska O., Bartoszek D., Zabińska M., Mysza M., Nowakowska B., Hałoń A., Szyber P., Patrzalek D., Klinger M.: Long-term follow-up of non-HLA and anti-HLA antibodies: incidence and importance in renal transplantation. *Transplant. Proc.*, 2013; 45: 1462-1465
- [4] Blair P.A., Norena L.Y., Flores-Borja F., Rawlings D.J., Isenberg D.A., Ehrenstein M.R., Mauri C.: CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*, 2010; 32: 129-140
- [5] Bohana-Kashtan O., Civin C.I.: Fas ligand as a tool for immunosuppression and generation of immune tolerance. *Stem Cells*, 2004; 22: 908-924
- [6] Brouard S., Le Bars A., Dufay A., Gosselin M., Foucher Y., Guillet M., Cesbron-Gautier A., Thervet E., Legendre C., Dugast E., Pallier A., Guillot-Gueguen C., Lagoutte L., Evanno G., Giral M., Souillou J.P.: Identification of a gene expression profile associated with operational tolerance among a selected group of stable kidney transplant patients. *Transpl. Int.*, 2011; 24: 536-547
- [7] Brouard S., Pallier A., Renaudin K., Foucher Y., Danger R., Devys A., Cesbron A., Guillot-Gueguen C., Ashton-Chess J., Le Roux S., Harb J., Roussey G., Subra J.F., Villemain F., Legendre C. i wsp.: The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. *Am. J. Transplant.*, 2012; 12: 3296-3307
- [8] Candando K.M., Lykken J.M., Tedder T.F.: B10 cell regulation of health and disease. *Immunol. Rev.*, 2014; 259: 259-272
- [9] Capolunghi F., Cascioli S., Giorda E., Rosado M.M., Plebani A., Auriti C., Seganti G., Zuntini R., Ferrari S., Cagliuso M., Quinti I., Carsetti R.: CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J. Immunol.*, 2008; 180: 800-808
- [10] Carsetti R., Rosado M.M., Wardmann H.: Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol. Rev.*, 2004; 197: 179-191
- [11] Chapman J.R.: Clinical renal transplantation: where are we now, what are our key challenges? *Transplant. Proc.*, 2010; 42 (Suppl. 9): S3-S6
- [12] Chen X., Jensen P.E.: Cutting edge: primary B lymphocytes preferentially expand allogeneic FoxP3⁺ CD4 T cells. *J. Immunol.*, 2007; 179: 2046-2050
- [13] Cherukuri A., Rothstein D.M., Clark B., Carter C.R., Davison A., Hernandez-Fuentes M., Hewitt E., Salama A.D., Baker R.J.: Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF- α expression ratio in regulatory B cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2014; 25: 1575-1585
- [14] Chesneau M., Michel L., Dugast E., Chenouard A., Baron D., Pallier A., Durand J., Braza F., Guerif P., Laplaud D.A., Souillou J.P., Giral M., Degauque N., Chiffolleau E., Brouard S.: Tolerant kidney transplant patients produce B Cells with regulatory properties. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2015; 26: 2588-2598
- [15] Chesneau M., Pallier A., Braza F., Lacombe G., Le Gallou S., Baron D., Giral M., Danger R., Guerif P., Aubert-Wastiaux H., Neel A., Michel L., Laplaud D.A., Degauque N., Souillou J.P., Tarte K., Brouard S.: Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *Am. J. Transplant.*, 2014; 14: 144-155
- [16] Chung B.H., Kim K.W., Yu J.H., Kim B.M., Choi B.S., Park C.W., Kim Y.S., Cho M.L., Yang C.W.: Decrease of immature B cell and interleukin-10 during early-post-transplant period in renal transplant recipients under tacrolimus based immunosuppression. *Transpl. Immunol.*, 2014; 30: 159-167
- [17] Clatworthy M.R., Watson C.J., Plotnek G., Bardsley V., Chaudhry A.N., Bradley J.A., Smith K.G.: B-cell-depleting induction therapy and acute cellular rejection. *N. Engl. J. Med.*, 2009; 360: 2683-2685
- [18] Cobaleda C., Schebesta A., Delogu A., Busslinger M.: Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat. Immunol.*, 2007; 8: 463-470
- [19] Cooper M.D.: Exploring lymphocyte differentiation pathways. *Immunol. Rev.*, 2002; 185: 175-185
- [20] De Bruyne R., Bogaert D., De Ruyck N., Lambrecht B.N., Van Winckel M., Gevaert P., Dullaers M.: Calcineurin inhibitors dampen humoral immunity by acting directly on naive B cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2015; 180: 542-550
- [21] Dharnidharka V.R., Lamb K.E., Zheng J., Schechtman K.B., Meier-Kriesche H.U.: Lack of significant improvements in long-term allograft survival in pediatric solid organ transplantation: a US national registry analysis. *Pediatr. Transplant.*, 2015; 19: 477-483
- [22] DiLillo D.J., Griffiths R., Seshan S.V., Magro C.M., Ruiz P., Coffman T.M., Tedder T.F.: B lymphocytes differentially influence acute and chronic allograft rejection in mice. *J. Immunol.*, 2011; 186: 2643-2654
- [23] DiLillo D.J., Matsushita T., Tedder T.F.: B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2010; 1183: 38-57
- [24] Ding Q., Yeung M., Camirand G., Zeng Q., Akiba H., Yagita H., Chalasani G., Sayegh M.H., Najafian N., Rothstein D.M.: Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *J. Clin. Invest.*, 2011; 121: 3645-3656
- [25] Evans J.G., Chavez-Rueda K.A., Eddaoudi A., Meyer-Bahlburg A., Rawlings D.J., Ehrenstein M.R., Mauri C.: Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J. Immunol.*, 2007; 178: 7868-7878
- [26] Feliksbrodt M.E., Król M.A., Dwilewicz-Trojaczek J.: Limfopoeza komórek B u człowieka. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2005; 14: 1033-1040
- [27] Gray D., Gray M.: What are regulatory B cells? *Eur. J. Immunol.*, 2010; 40: 2677-2679
- [28] Hagn M., Schwesinger E., Ebel V., Sontheimer K., Maier J., Beyer T., Syrovets T., Laumonier Y., Fabricius D., Simmet T., Jahrsdörfer

- B.: Human B cells secrete granzyme B when recognizing viral antigens in the context of the acute phase cytokine IL-21. *J. Immunol.*, 2009; 183: 1838-1845
- [29] Haneda M., Owaki M., Kuzuya T., Iwasaki K., Miwa Y., Kobayashi T.: Comparative analysis of drug action on B-cell proliferation and differentiation for mycophenolic acid, everolimus, and prednisolone. *Transplantation*, 2014; 97: 405-412
- [30] Haynes L.D., Jankowska-Gan E., Sheka A., Keller M.R., Hernandez-Fuentes M.P., Lechler R.I., Seyfert-Margolis V., Turka L.A., Newell K.A., Burlingham W.J.: Donor-specific indirect pathway analysis reveals a B-cell-independent signature which reflects outcomes in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant.*, 2012; 12: 640-648
- [31] Heidt S., Hester J., Shankar S., Friend P.J., Wood K.J.: B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naive B cells. *Am. J. Transplant.*, 2012; 12: 1784-1792
- [32] Heidt S., Vergunst M., Anholts J.D., Reinders M.E., de Fijter J.W., Eikmans M., Claas F.H.: B cell markers of operational tolerance can discriminate acute kidney allograft rejection from stable graft function. *Transplantation*, 2015; 99: 1058-1064
- [33] Iwata Y., Matsushita T., Horikawa M., Dilillo D.J., Yanaba K., Venturi G.M., Szabolcs P.M., Bernstein S.H., Magro C.M., Williams A.D., Hall R.P., St Clair E.W., Tedder T.F.: Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, 2011; 117: 530-541
- [34] Kaltenmeier C., Gawanbacht A., Beyer T., Lindner S., Trzaska T., van der Merwe J.A., Härter G., Grüner B., Fabricius D., Lotfi R., Schwarz K., Schütz C., Hönig M., Schulz A., Kern P. i wsp.: CD4⁺ T cell-derived IL-21 and deprivation of CD40 signaling favor the *in vivo* development of granzyme B-expressing regulatory B cells in HIV patients. *J. Immunol.*, 2015; 194: 3768-3777
- [35] Kamburova E.G., Koenen H.J., Borgman K.J., ten Berge I.J., Joosten I., Hilbrands L.B.: A single dose of rituximab does not deplete B cells in secondary lymphoid organs but alters phenotype and function. *Am. J. Transplant.*, 2013; 13: 1503-1511
- [36] Kamburova E.G., Koenen H.J., van den Hoogen M.W., Baas M.C., Joosten I., Hilbrands L.B.: Longitudinal analysis of T and B cell phenotype and function in renal transplant recipients with or without rituximab induction therapy. *PLoS One*, 2014; 9: e112658
- [37] Katz S.I., Parker D., Turk J.L.: B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature*, 1974; 251: 550-551
- [38] Lampropoulou V., Hoehlig K., Roch T., Neves P., Calderón Gómez E., Sweenie C.H., Hao Y., Freitas A.A., Steinhoff U., Anderton S.M., Fillatreau S.: TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J. Immunol.*, 2008; 180: 4763-4773
- [39] Latorre I., Esteve-Sole A., Redondo D., Giest S., Argilagué J., Alvarez S., Peligero F., Forstmann I., Crespo M., Pascual J., Meyerhans A.: Calcineurin and mTOR inhibitors have opposing effects on regulatory T cells while reducing regulatory B cell populations in kidney transplant recipients. *Transpl. Immunol.*, 2016; 35: 1-6
- [40] Le Texier L., Thebault P., Lavault A., Usal C., Merieau E., Quillard T., Charreau B., Souillou J.P., Cuturi M.C., Brouard S., Chiffolleau E.: Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am. J. Transplant.*, 2011; 11: 429-438
- [41] Lee K.M., Stott R.T., Zhao G., SooHoo J., Xiong W., Lian M.M., Fitzgerald L., Shi S., Akrawi E., Lei J., Deng S., Yeh H., Markmann J.F., Kim J.I.: TGF- β -producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *Eur. J. Immunol.*, 2014; 44: 1728-1736
- [42] Leibler C., Matignon M., Pilon C., Montespan F., Bigot J., Lang P., Carosella E.D., Cohen J., Rouas-Freiss N., Grimbart P., Menier C.: Kidney transplant recipients treated with belatacept exhibit increased naïve and transitional B cells. *Am. J. Transplant.*, 2014; 14: 1173-1182
- [43] Lenert P., Brummel R., Field E.H., Ashman R.F.: TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production. *J. Clin. Immunol.*, 2005; 25: 29-40
- [44] Liu C., Noorchashm H., Sutter J.A., Naji M., Prak E.L., Boyer J., Green T., Rickels M.R., Tomaszewski J.E., Koeberlein B., Wang Z., Paessler M.E., Velidedeoglu E., Rostami S.Y., Yu M., Barker C.F., Naji A.: B lymphocyte-directed immunotherapy promotes long-term islet allograft survival in nonhuman primates. *Nat. Med.*, 2007; 13: 1295-1298
- [45] Longshan L., Dongwei L., Qian F., Jun L., Suxiong D., Yitao Z., Yunyi X., Huiting H., Lizhong C., Jiguang F., Changxi W.: Dynamic analysis of B-cell subsets in *de novo* living related kidney transplantation with induction therapy of basiliximab. *Transplant. Proc.*, 2014; 46: 363-367
- [46] Lozano J.J., Pallier A., Martinez-Llordella M., Danger R., López M., Giral M., Londoño M.C., Rimola A., Souillou J.P., Brouard S., Sánchez-Fueyo A.: Comparison of transcriptional and blood cell-phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients. *Am. J. Transplant.*, 2011; 11: 1916-1926
- [47] Mann M.K., Maresz K., Shriver L.P., Tan Y., Dittel B.N.: B cell regulation of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 2007, 178: 3447-3456
- [48] Mao Q., Terasaki P.I., Cai J., Briley K., Catrou P., Haisch C., Rebellato L.: Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study. *Am. J. Transplant.*, 2007; 7: 864-871
- [49] Matsumoto M., Baba A., Yokota T., Nishikawa H., Ohkawa Y., Kayama H., Kallies A., Nutt S.L., Sakaguchi S., Takeda K., Kurosaki T., Baba Y.: Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity*, 2014; 41: 1040-1051
- [50] Matsushita T., Yanaba K., Bouaziz J.D., Fujimoto M., Tedder T.F.: Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J. Clin. Invest.*, 2008; 118: 3420-3430
- [51] Matthias P., Rolink A.G.: Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005; 5: 497-508
- [52] Mauri C., Gray D., Mushtaq N., Londe M.: Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J. Exp. Med.*, 2003; 197: 489-501
- [53] Meier-Kriesche H.U., Schold J.D., Srinivas T.R., Kaplan B.: Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am. J. Transplant.*, 2004; 4: 378-383
- [54] Mizoguchi A., Bhan A.K.: A case for regulatory B cells. *J. Immunol.*, 2006; 176: 705-710
- [55] Mizoguchi A., Mizoguchi E., Smith R.N., Preffer F.I., Bhan A.K.: Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor α mutant mice. *J. Exp. Med.*, 1997; 186: 1749-1756
- [56] Mizoguchi A., Mizoguchi E., Takedatsu H., Blumberg R.S., Bhan A.K.: Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*, 2002; 16: 219-230
- [57] Morbach H., Eichhorn E.M., Liese J.G., Girschick H.J.: Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin. Exp. Immunol.*, 2010; 162: 271-279
- [58] Moreau A., Blair P.A., Chai J.G., Ratnasothy K., Stolarczyk E., Alhabbab R., Rackham C.L., Jones P.M., Smyth L., Elgueta R., Howard J.K., Lechler R.I., Lombardi G.: Transitional-2 B cells acquire regulatory function during tolerance induction and contribute to allograft survival. *Eur. J. Immunol.*, 2015; 45: 843-853
- [59] Neta R., Salvin S.B.: Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity. *J. Immunol.*, 1974; 113: 1716-1725

- [60] Newell K.A., Asare A., Kirk A.D., Gisler T.D., Bourcier K., Suthanthiran M., Burlingham W.J., Marks W.H., Sanz I., Lechler R.I., Hernandez-Fuentes M.P., Turka L.A., Seyfert-Margolis V.L., Immune Tolerance Network ST507 Study Group: Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.*, 2010; 120: 1836-1847
- [61] Nouël A., Ségalen I., Jamin C., Doucet L., Caillard S., Renaudineau Y., Pers J.O., Le Meur Y., Hillion S.: B cells display an abnormal distribution and an impaired suppressive function in patients with chronic antibody-mediated rejection. *Kidney Int.* 2014; 85: 590-599
- [62] Nouël A., Simon Q., Jamin C., Pers J.O., Hillion S.: Regulatory B cells: an exciting target for future therapeutics in transplantation. *Front. Immunol.*, 2014; 5: 11
- [63] Nova-Lamperti E., Fanelli G., Becker P.D., Chana P., Elgueta R., Dodd P.C., Lord G.M., Lombardi G., Hernandez-Fuentes M.P.: IL-10-produced by human transitional B-cells down-regulates CD86 expression on B-cells leading to inhibition of CD4⁺T-cell responses. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 20044
- [64] Olkhanud P.B., Damdinsuren B., Bodogai M., Gress R.E., Sen R., Wejksza K., Malchinkhuu E., Wersto R.P., Biragyn A.: Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res.*, 2011; 71: 3505-3515
- [65] Pallier, A., Hillion S., Danger R., Giral M., Racapé M., Degauque N., Dugast E., Ashton-Chess J., Pettré S., Lozano J.J., Bataille R., Devys A., Cesbron-Gautier A., Braudeau C., Larrose C., Souillou J.P., Brouard S.: Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int.*, 2010; 78: 503-513
- [66] Qian L., Qian C., Chen Y., Bai Y., Bao Y., Lu L., Cao X.: Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19^{hi}FcγIIb^{hi} regulatory B cells through IFN-β and CD40L. *Blood*, 2012; 120: 581-591
- [67] Ray A., Wang L., Dittel B.N.: IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action. *Int. Immunol.*, 2015; 27: 531-536
- [68] Rosser E.C., Mauri C.: Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*, 2015; 42: 607-612
- [69] Sagoo P., Perucha E., Sawitzki B., Tomiuk S., Stephens D.A., Miqueu P., Chapman S., Craciun L., Sergeant R., Brouard S., Rovis F., Jimenez E., Ballou A., Giral M., Rebollo-Mesa I. i wsp.: Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.*, 2010; 120: 1848-1861
- [70] Shabir S., Girdlestone J., Briggs D., Kaul B., Smith H., Daga S., Chand S., Jham S., Navarrete C., Harper L., Ball S., Borrow R.: Transitional B lymphocytes are associated with protection from kidney allograft rejection: a prospective study. *Am. J. Transplant.*, 2015; 15: 1384-1391
- [71] Shen P., Roch T., Lampropoulou V., O'Connor R.A., Stervbo U., Hilgenberg E., Ries S., Dang V.D., Jaimes Y., Daridon C., Li R., Jouneau L., Boudinot P., Wilantri S., Sakwa I. i wsp.: IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*, 2014; 507: 366-370
- [72] Silva H.M., Takenaka M.C., Moraes-Vieira P.M., Monteiro S.M., Hernandez M.O., Chaara W., Six A., Agena F., Sesterheim P., Barbé-Tuana F.M., Saitovitch D., Lemos F., Kalil J., Coelho V.: Preserving the B-cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. *Mol. Med.*, 2012; 18: 733-743
- [73] Sims G.P., Ettinger R., Shiota Y., Yarburo C.H., Illei G.G., Lipsky P.E.: Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*, 2005; 105: 4390-4398
- [74] Svachova V., Sekerkova A., Hruha P., Tycova I., Rodova M., Cerdlova E., Slatinska J., Honsova E., Striz I., Viklicky O.: Dynamic changes of B-cell compartments in kidney transplantation: lack of transitional B cells is associated with allograft rejection. *Transpl. Int.*, 2016; 29: 540-548
- [75] Tedder T.F.: B10 cells: a functionally defined regulatory B cell subset. *J. Immunol.*, 2015; 194: 1395-1401
- [76] Todeschini M., Cortinovis M., Perico N., Poli F., Innocente A., Cavinato R.A., Gotti E., Ruggenenti P., Gaspari F., Noris M., Remuzzi G., Casiraghi F.: In kidney transplant patients, alemtuzumab but not basiliximab/low-dose rabbit anti-thymocyte globulin induces B cell depletion and regeneration, which associates with a high incidence of de novo donor-specific anti-HLA antibody development. *J. Immunol.*, 2013; 191: 2818-2828
- [77] van de Berg P.J., Hoevenaars E.C., Yong S.L., van Donselaar-van der Pant K.A., van Tellingen A., Florquin S., van Lier R.A., Bemelman F.J., ten Berge I.J.: Circulating lymphocyte subsets in different clinical situations after renal transplantation. *Immunology*, 2012; 136: 198-207
- [78] van de Veen W., Stanic B., Yaman G., Wawrzyniak M., Söllner S., Akdis D.G., Rückert B., Akdis C.A., Akdis M.: IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013; 131: 1204-1212
- [79] Viklicky O., Krystufkova E., Brabcova I., Sekerkova A., Wohlfahrt P., Hribova P., Wohlfahrtova M., Sawitzki B., Slatinska J., Striz I., Volk H.D., Reinke P.: B-cell-related biomarkers of tolerance are up-regulated in rejection-free kidney transplant recipients. *Transplantation*, 2013; 95: 148-154
- [80] Walsh L., Dinavahi R.: Current unmet needs in renal transplantation: a review of challenges and therapeutics. *Front. Biosci.*, 2016; 8: 1-14
- [81] Wang R.X., Yu C.R., Dambuza I.M., Mahdi R.M., Dolinska M.B., Sergeev Y.V., Wingfield P.T., Kim S.H., Egwuagu C.E.: Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat. Med.*, 2014; 20: 633-641
- [82] Wolf S.D., Dittel B.N., Hardardottir F., Janeway C.A.Jr.: Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 1996; 184: 2271-2278
- [83] Wootla B., Nicoletti A., Patey N., Dimitrov J.D., Legendre C., Christophe O.D., Friboulet A., Kaveri S.V., Lacroix-Desmazes S., Thaumatzopoulos O.: Hydrolysis of coagulation factors by circulating IgG is associated with a reduced risk for chronic allograft nephropathy in renal transplanted patients. *J. Immunol.*, 2008; 180: 8455-8460
- [84] Yan Y., van der Putten K., Bowen D.G., Painter D.M., Kohar J., Sharland A.F., McCaughan G.W., Bishop G.A.: Postoperative administration of donor B cells induces rat kidney allograft acceptance: lack of association with Th2 cytokine expression in long-term accepted grafts. *Transplantation*, 2002; 73: 1123-1130
- [85] Yanaba K., Bouaziz J.D., Matsushita T., Magro C.M., St Clair E.W., Tedder T.F.: B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunol. Rev.*, 2008; 223: 284-299
- [86] Yanaba K., Hamaguchi Y., Venturi G.M., Steeber D.A., St Clair E.W., Tedder T.F.: B cell depletion delays collagen-induced arthritis in mice: arthritis induction requires synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J. Immunol.*, 2007; 179: 1369-1380
- [87] Yang M., Deng J., Liu Y., Ko K.H., Wang X., Jiao Z., Wang S., Hua Z., Sun L., Srivastava G., Lau C.S., Cao X., Lu L.: IL-10-producing regulatory B10 cells ameliorate collagen-induced arthritis via suppressing Th17 cell generation. *Am. J. Pathol.*, 2012; 180: 2375-2385
- [88] Zand M.S., Vo T., Huggins J., Felgar R., Liesveld J., Pellegrin T., Bozorgzadeh A., Sanz I., Briggs B.J.: Polyclonal rabbit antithymocyte globulin triggers B-cell and plasma cell apoptosis by multiple pathways. *Transplantation*, 2005; 79: 1507-1515
- [89] Zarkhin V., Lovelace P.A., Li L., Hsieh S.C., Sarwal M.M.: Phenotypic evaluation of B-cell subsets after rituximab for treatment of acute renal allograft rejection in pediatric recipients. *Transplantation*, 2011; 91: 1010-1018
- [90] Zhang Y., Gallastegui N., Rosenblatt J.D.: Regulatory B cells in anti-tumor immunity. *Int. Immunol.*, 2015; 27: 521-530

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.