

Monika Anna Grygorowicz

Wpływ lenalidomidu na interakcje regulatorowych limfocytów T z komórkami chłoniaków z komórek B.

Aktywowane limfocyty regulatorowe T $CD4^+CD25^+$ (Treg) hamują proliferację i różnicowanie prawidłowych limfocytów B. W większości badań obserwowano, że wysoki odsetek limfocytów Treg naciekających chłoniaka jest powiązany z dłuższym przeżyciem chorych na rozlanego chłoniaka z dużych komórek B, chłoniaka grudkowego i klasyczną postać chłoniaka Hodgkina. Sugerowało to, że limfocyty Treg mogą regulować proliferację komórek chłoniaka podobnie jak prawidłowych limfocytów B. Powstało też pytanie czy i jak lenalidomid jako lek przeciwnowotworowy o udokumentowanym szerokim działaniu immunomodulującym może wpływać na regulację proliferacji komórek chłoniaka przez limfocyty Treg.

Celem pracy było zbadanie zdolności allogenicznych limfocytów Treg do supresji proliferacji komórek linii chłoniaków wywodzących się z obwodowych limfocytów B, zależności działania regulacyjnego limfocytów Treg od warunków ich aktywacji oraz określenie wpływu lenalidomidu na oddziaływania regulacyjne limfocytów Treg wobec komórek chłoniaków.

Ustalone linie komórkowe chłoniaka grudkowego, rozlanego chłoniaka z dużych komórek B, chłoniaka Burkitta, szpiczaka plazmocytozy i chłoniaka Hodgkina kokulturowano ze świeżo wyodrębnionymi lub namnożonymi *in vitro* limfocytami Treg. Limfocyty T $CD4^+CD25^+$ otrzymywano z krwi obwodowej zdrowych dawców metodą separacji magnetycznej. Limfocyty Treg namnażano poliklonalnie lub w obecności allogenicznych komórek dendrytycznych, w obecności interleukiny 2 (IL-2) i rapamycyny, z populacji limfocytów T $CD4^+CD25^+$ oraz sortowanych limfocytów T $CD4^+CD25^+CD127^{lo}$ i T $CD4^+CD25^+CD127^{hi}$. Hodowle mieszane limfocytów Treg i komórek chłoniaka prowadzono bez obecności rapamycyny, bez obecności oraz w obecności lenalidomidu. Proliferację komórek chłoniaka i limfocytów Treg badano metodami cytometrii przepływowej.

Limfocyty Treg namnożone *in vitro* poliklonalnie z populacji limfocytów T $CD4^+CD25^+$ i T $CD4^+CD25^+CD127^{lo}$ w obecności rapamycyny i niskich dawek IL-2 hamowały proliferację 11 spośród 12 ustalonych linii chłoniaków wywodzących się z obwodowych limfocytów B oraz proliferację poliklonalnie aktywowanych autologicznych i allogenicznych

konwencjonalnych limfocytów T. Świeżo wyodrębnione limfocyty Treg w większości przypadków częściowo hamowały proliferację linii komórek linii chłoniaków, ale w paru przypadkach wspomagały proliferację komórek chłoniaka. Linie komórkowe chłoniaków wykazywały różną podatność na działanie hamujące lenalidomidu. W hodowlach mieszanych lenalidomid wzmacniał supresję proliferacji komórek chłoniaka przez świeżo wyodrębnione limfocyty $CD4^+CD25^+$ Treg, jak też przez limfocyty $CD4^+CD25^+$ Treg i $CD4^+CD25^+CD127^{lo}$ Treg namnożone *in vitro* w obecności rapamycyny, pomimo jednoczesnego hamowania proliferacji limfocytów Treg. Lenalidomid wzmacniał również supresję proliferacji komórek chłoniaka przez limfocyty Treg namnożone w obecności allogenicznych komórek dendrytycznych i rapamycyny. Lenalidomid nie zmniejszał efektu supresyjnego namnożonych limfocytów Treg wobec konwencjonalnych limfocytów T.

Limfocyty Treg stabilnie utrzymywały funkcję regulacyjną i ekspresję FOXP3 podczas 5-tygodniowego namnażania w obecności rapamycyny, pomimo stopniowego wzrostu metylacji DNA intronowego regionu genu *FOXP3* demetylowanego swoiście w limfocytach Treg (TSDR, ang. *Treg-specific demethylated region*). Limfocyty Treg regulowały proliferację komórek chłoniaka zarówno w kontakcie bezpośrednim jak i poprzez czynniki rozpuszczalne. Namnożone limfocyty Treg wydzielaly IL-10 i IFN- γ , wykazywały ekspresję CTLA-4, CD39, CD73, GARP, TIGIT, GITR, granzymu A, ale nie granzymu B. Ekspozycja namnożonych limfocytów Treg na lenalidomid nie zmieniała istotnie ekspresji badanych markerów. Limfocyty Treg namnażane bez rapamycyny proliferowały przez krótszy okres czasu i nie rozwijały funkcji regulacyjnej w takim samym stopniu jak limfocyty Treg namnożone w obecności rapamycyny.

Limfocyty $CD4^+CD25^+$ Treg lub $CD4^+CD25^+CD127^{lo}$ Treg namnożone *in vitro* w obecności rapamycyny mogłyby być użyte do hamowania odnowy przetrwałych komórek chłoniaka po autologicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych oraz do przeciwdziałania reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi i wznowie chłoniaka po allogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych u chorych, których chłoniak jest wrażliwy na regulacyjne działanie limfocytów Treg. Połączenie terapii lenalidomidem z terapią adoptywną namnożonymi *ex vivo* limfocytami $CD4^+CD25^+$ Treg lub $CD4^+CD25^+CD127^{lo}$ Treg mogłoby znaleźć zastosowanie w celu hamowania proliferacji przetrwałych komórek chłoniaka u wybranych pacjentów, u których chłoniak jest podatny na bezpośrednie przeciwnowotworowe działanie lenalidomidu oraz regulację przez limfocyty Treg.