

Ανοσορυθμιστικά κύτταρα μετά από ενδοδερμική χορήγηση Bacillus Calmette-Guérin (BCG) - Σχέση με την πανδημία COVID-19;

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΙ ΥΠΕΥΘΥΝΟΙ (ΕΥ)

Σούζαν Βεργκίζι

Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (Ε.Δι.Π.), Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΑΠΘ

Ιωάννης Νικολακάκης

Καθηγητής Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΑΠΘ



ΓΝΩΣΤΙΚΗ/ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ

Ιατρική και Επιστήμες Υγείας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αναδεικνύεται ο ρόλος των ανοσορρυθμιστικών κυττάρων του τραχηλικού λεμφαδένα σε πειραματόζωα εμβολιασμένα με BCG (Bacillus Calmette Guerin). Παρατηρήθηκε ότι στο σύνολό τους, τα κύτταρα των λεμφαδένων δεν πολλαπλασιάστηκαν, όταν καλλιεργήθηκαν παρουσία PPD ή Ieprosin, (σημαντικές διαλυτές μυκοβακτηριακές ουσίες), αλλά πολλαπλασιάστηκαν παρουσία ακατέργαστου μυκοβακτηριδίου. Το εύρημα διερευνήθηκε περαιτέρω και ο κυτταρικός πληθυσμός του λεμφαδένα χωρίστηκε σε δυο κλάσματα μετά από πέρασμα από στήλη πληρωμένη με συνθετικές ίνες (nylon wool). Το ένα κλάσμα αποτελούνταν από προσκολλημένα στη στήλη κύτταρα (nylon wool adherent) που περιείχαν, κυρίως, μονοκύτταρα/μακροφάγα και ομάδα T κυττάρων. Το κλάσμα (μη-προσκολλημένο, non-adherent) περιείχε μία δεύτερη ομάδα T κυττάρων που στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν ως αποκριτικά (responders) κύτταρα σε μικτές κυτταροκαλλιέργειες. Είναι αξιοσημείωτο ότι η αναστολή του πολλαπλασιασμού οφειλόταν στο προσκολλημένο κλάσμα και ότι η βαθμιαία προσθήκη τους σε μεικτές καλλιέργειες μείωσε τον βαθμό διέγερσης των κυττάρων. Ακολουθώντας, βρέθηκε ότι στο προσκολλημένο κλάσμα υπήρχαν υποπληθυσμοί T κυττάρων και μονοκυττάρων/μακροφάγων που συνεργιστικά ανέστειλαν τη διέγερση των αποκριτικών κυττάρων T στις μεικτές καλλιέργειες. Πιθανώς, αυτή η ανασταλτική δράση κάποιων κυττάρων να ευθύνεται για τον περιορισμό της φλεγμονής στους λεμφαδένες μετά από τον εμβολιασμό με BCG.

Όπως είναι γνωστό, τα BCG κοκκίωμα αυτοπεριορίζονται και επουλώνονται σε σημαντικά μικρότερο χρονικό διάστημα από τα κοκκίωμα άλλων μυκοβακτηριδίων, όπως *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). Επίσης, είναι γνωστό ότι ο εμβολιασμός με BCG προκαλεί έμμεση ανοσία σε αλλογενή νοσήματα αναπνευστικών λοιμώξεων. Επομένως, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν πρόσφατα δημοσιεύματα ότι ασθενείς με SARS-CoV-2 (COVID-19) εμβολιασμένοι με BCG παρουσίασαν ήπια κλινικά συμπτώματα.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΡΘΡΟΥ

27

ΠΗΓΗ ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ

Από ιδίους πόρους

AUTH

RC19

Research

Covid-19

Εισαγωγή

Τα ρυθμιστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος έχουν σημαντικό ελεγκτικό ρόλο στην ανοσοαπόκριση του οργανισμού. Τα κύτταρα αυτά ενισχύουν ή αναστέλλουν τη λειτουργία άλλων κυττάρων με τελικό αποτέλεσμα την απομάκρυνση ή/και καταστροφή του εισβολέα/παθογόνου προκαλώντας ελάχιστη βλάβη στον ξενιστή. Ελλείψεις και κενά στη διαδικασία αυτήν μπορεί να επιφέρει εκτεταμένη βλάβη στον οργανισμό ή/και υποχώρηση σε νοσήματα. Συνήθως, κάτω από ιδανικές συνθήκες μετά από την έκθεση του ξενιστή στο αντιγόνο/παθογόνο οι μηχανισμοί της ανοσο-διέγερσης και ανοσο-καταστολής βρίσκονται σε ισορροπία. Ποιο από τα δύο αυτά χαρακτηριστικά της ανοσο-απόκρισης θα επικρατήσει θα εξαρτηθεί από την κατάσταση του ίδιου του ξενιστή ή/και από τα χαρακτηριστικά του εισβολέα και αυτό δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί. Όμως, είναι πλέον αποδεκτό ότι η τελική ανοσοαπόκριση του ξενιστή είναι αποτέλεσμα συνεργασίας μεταξύ των διάφορων κυτταρικών πληθυσμών και υπο-πληθυσμών (Kar and Joosten, 2020).

Είναι πλέον γνωστό ότι στην λειτουργία της χημικής αλλά και κυτταρικής ανοσίας βοηθητικό ρόλο παίζουν, κυρίως τα Τ κύτταρα, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα δενδριτικά και τα Β κύτταρα (Grey and Chesnut, 1985). Από την άλλη πλευρά, πιστεύεται ότι στην καταστολή αυτών των λειτουργιών συμμετέχουν, κυρίως, τα Τ ρυθμιστικά (πρώην Τ κατασταλτικά) κύτταρα, υποπληθυσμός μονοκυττάρων/μακροφάγων και Β κύτταρα (Becker et al., 1981; Turcotte, 1987; Boer et al., 2014). Σε αρκετές ασθένειες σχετιζόμενες με χαμηλή κυτταρική ανοσία, τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα συνδράμουν ενεργά, είτε άμεσα ή σε συνδυασμό με άλλα κύτταρα. Επίσης, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα μπορούν να παίξουν ανοσο-διεγερτικό ή ανοσο-κατασταλτικό ρόλο επιδεικνύοντας επιθετική ή κατασταλτική δράση (Rosenthal and Shevach, 1973; Weinberg and Unanue, 1981; Holt, 1979; Ley et al., 2017) όχι μόνο παρουσιάζοντας το αντιγόνο στα Τ και Β κύτταρα αλλά και εκκρίνοντας κυτταροκίνες που κατευθύνουν λειτουργίες άλλων ανοσορυθμιστικών κυττάρων. Έτσι, τα μακροφάγα συμμετέχουν, κυρίως, στις ακόλουθες λειτουργίες:

- Θρυμματίζουν με την βοήθεια των ενζύμων και άλλων παραγόντων ό,τι ξένο σώμα δεν αναγνωρίζουν, ακόμα και αποπτωτικά ή νεκρά κύτταρα.
- Προκαλούν και ενισχύουν τη δράση των λεμφοκυττάρων.
- Δρουν ανασταλτικά (Mosser and Edwards, 2008; Kono and Rock 2008) βοηθώντας την ανάπτυξη κατασταλτικών κυττάρων (Bullock et al., 1982; Tomioka et al., 2012) ή

ελευθερώνοντας προσταγλανδίνες και ανοσορυθμιστικές κυτταροκίνες (π.χ. ιντερ-λευκίνη-10 και άλλες). Έτσι, ως αποτέλεσμα της ανοσοκατασταλτικής δράσης, ελαττώνουν την παραγωγή των φλεγμονωδών ουσιών από άλλα κύτταρα, περιορίζοντας έτσι και μια εκτεταμένη βλάβη στον αντίστοιχο ιστό (Sabat, 2010). Όσον αφορά τα Β κύτταρα, αυτά μπορεί να συμμετέχουν στη ανοσοκαταστολή επάγοντας ανασταλτικά Τ λεμφοκύτταρα [(Katz et al., 1974; Sy et al., 1977; Morikawa et al., 1990; James et al., 1982), όπως για παράδειγμα, στην περίπτωση της σκλήρυνσης κατά πλάκας [24].

Τα μυκοβακτηρίδια όπως και το στέλεχος του εμβολίου BCG προκαλούν κοκκίωμα στον ξενιστή. Όμως, τα κοκκίωμα από το BCG διαφέρουν πολύ από του μυκοβακτηριδίου της λέπρωσης (*M. leprae*). Το εμβόλιο BCG δημιουργεί κοκκίωμα «ανοσολογικού τύπου» (immunogenic) που, συνήθως, αυτοπεριορίζεται με θανάτωση και θρυμματισμό του παθογόνου, αντίθετα με το *M. leprae* που οδηγεί σε «μη-ανοσολογικού τύπου» (non-immunogenic) κοκκίωμα. Με το BCG, η πλειοψηφία των μονοκυττάρων/φαγοκυττάρων είναι επιθηλιοειδής με εκτεταμένο τραχύ (rough) ενδοπλασματικό δίκτυο (RER). Από την άλλη πλευρά, στο κοκκίωμα που δημιουργείται από *M. leprae* παρατηρούνται μακροφάγα με αργό θρυμματισμό του παθογόνου. Επίσης, δεν παρατηρούνται επιθηλιοειδή κύτταρα αλλά μη-διαφοροποιημένα μακροφάγα γεμάτα από μυκοβακτήρια (Narayanan et al., 1982). Εδώ και έναν αιώνα το εμβόλιο BCG χρησιμοποιείται για προφύλαξη από φυματίωση, ενώ θεωρείται ότι σε ένα βαθμό προστατεύει και από τη λέπρα.

Τελευταία έχει αναφερθεί η σχέση του εμβολιασμού με BCG με ηπιότερα κλινικά συμπτώματα και θνησιμότητα σε ασθενείς με COVID-19 (Berg et al., 2020; Covián et al., 2020; Hegarty et al., 2020; Miller et al., 2020; Osama El-Gendy et al., 2020). Αυτή η παρατήρηση συνδέθηκε με επίκτητη ανοσία (Covián et al., 2020; Covián, Fernández-Fierro et al., 2019) που είχε αναπτυχθεί σε πληθυσμούς που είχαν εμβολιαστεί στο παρελθόν. Έχει προταθεί ακόμα ότι ο εμβολιασμός με BCG θα ήταν ένας καλός τρόπος για την αύξηση της θετικής ανοσοαπόκρισης του οργανισμού στον ιό SARS-CoV-2 σε ευαίσθητες ομάδες, όπως ασθενείς με χρόνια υποκείμενα νοσήματα ή υπερήλικες και υγειονομικό προσωπικό (Dhochak et al., 2020; Moorlag et al., 2020; Klinger et al., 2020).

Επομένως, ο σκοπός της έρευνας ήταν να διερευνηθεί ο ανοσορυθμιστικός μηχανισμός που ευθύνεται για τη δημιουργία «ανοσολογικού τύπου» κοκκίωματος στους λεμφαδένες μετά από εμβολιασμό με BCG και να συγκριθεί με *M. leprae*, χρησιμοποιώντας ινδικά χοιρίδια ως πειραματικό μοντέλο. Τα ευρήματα σχολιάζονται και σε σχέση με τη νόσο COVID-19.

Μέθοδοι

1. Πειραματόζωα

Για την ανάπτυξη κοκκιωμάτων χρησιμοποιήθηκαν ινδικά χοιρίδια της σειράς Dunkin Hartley (David Hall, Newchurch, Staffs UK) ακολουθώντας αυστηρά το πρωτόκολλο συντήρησής τους [Legislation for Animal Research of The Animal (Scientific Procedures) Act, UK 1986].

2. Αντιγόνο και μιτογόνο για κυτταροκαλλιέργειες

Για τις *in vitro* μελέτες πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε καλλιέργειες, χρησιμοποιήθηκαν PPD (tuberculin purified protein derivative) σε συγκέντρωση 25 µg/ml ή Ieprosin (διαλυτό μέρος του εκχυλίσματος του *M. leprae*) σε συγκέντρωση των 10 µg/ml. Το εμβόλιο BCG (Bacillus Calmette- Guérin, εξασθενημένοι βάκιλοι *Mycobacterium bovis*) ήταν δωρεά του Ινστιτούτου Pasteur, Παρίσι, και *M. leprae*, που ήταν υποχρεωτικά θανατωμένα για λόγους ασφαλείας με έκθεση σε ακτινοβολία cobalt (2 megarads, co-irr), ήταν δωρεά του Clinical Research Center, Harrow, London.

3. Εμβολιασμός

Τα πειραματόζωα εμβολιάζονταν στο πτερύγιο του αυτιού με 1×10^7 BCG ή με 1×10^9 co-irr *M. leprae*, σε 0,05 ml φυσιολογικό ορό.

4. In vitro πολλαπλασιασμός κυττάρων του αυχενικού ή τραχηλικού λεμφαδένα

Δυο εβδομάδες μετά από τον εμβολιασμό με BCG και πέντε εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με *M. leprae*, αφαιρέθηκαν οι οπισθοωτιαίοι (PA) και τραχηλικοί (CER) λεμφαδένες με χειρουργική εκτομή, ακολουθώντας τη βιβλιογραφία ως προς τον απαιτούμενο χρόνο για την ανάπτυξη των κοκκιωμάτων (Narayanan et al., 1981). Ακολούθησε η χρώση των ιστολογικών τομών των λεμφαδένων με αιματοξυλίνη και ηωσίνη (H&E) και έγινε η μικροσκοπική παρατήρηση των κοκκιωμάτων. Για λεπτομερέστερη εξέταση των κυτταρικών τύπων χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Για τις κυτταροκαλλιέργειες, τεμαχίστηκαν προσεχτικά με απαλές κινήσεις οι λεμφαδένες μέσα σε θρεπτικό υγρό Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) και περάστηκαν από λεπτό κόσκινο, ώστε να απελευθερωθούν μεμονωμένα τα κύτταρα. Αυτά πλύθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό υγρό σε κατάλληλες συγκεντρώσεις. Από αυτά καλλιεργήθηκαν 5×10^5 κύτταρα σε 200 µl σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας παρουσία 25 µg/ml PPD ή 10 µg/ml Ieprosin για 66 h ή 3 µg/ml Con A για 72 h στους 37°C σε επωαστικό κλίβανο με 5% CO₂. Σε κάθε καλλιέργεια προστέθηκε 1 µCi ³H thymidine και μετά από 24 h μετρήθηκε η πρόσληψη της από τα κύτταρα σε liquid scintillation counter (Packard, Berks UK) (Gupta et al., 1985; Verghese et al., 1988). Σε άλλα πειράματα, καλλιεργήθηκαν κύτταρα παρουσία εξασθενημένου BCG, heat-killed BCG ή co-irr BCG για 5 ημέρες. Όλες οι καλλιέργειες έγιναν εις τετραπλούν.

Τα αποτελέσματα εκφράζονταν ως T/C (stimulation index ή δείκτης διέγερσης) που ορίζεται ως η πρόσληψη/min ³H thymidine από κύτταρα που πολλαπλασιάστηκαν διά της πρόσληψης από κύτταρα που δεν πολλαπλασιάστηκαν (δείγμα αναφοράς απουσία αντιγόνου/μιτογόνου). Επιπλέον, προστέθηκε ινδομεθακίνη (10 µg/ml) σε αντίστοιχες καλλιέργειες, ώστε να αποκλειστεί η πιθανότητα καταστολής λόγω πολλαπλασιασμού της δράσης προσταγλανδινών.

5. Διαχωρισμός κυττάρων τραχηλικών λεμφαδένων από πειραματόζωα εμβολιασμένα με BCG

Το σύνολο των κυττάρων του τραχηλικού λεμφαδένα χωρίστηκε σε δυο κλάσματα μετά από πέρασμα από στήλη πληρωμένη με συνθετικό ύφασμα (Nylon Wool). Το ένα κλάσμα ήταν αυτά που προσκολλήθηκαν (NW adherent) και το άλλο αυτά που πέρασαν χωρίς να προσκολληθούν (NW non-adherent). Αυτή η τεχνική πραγματοποιείται σε ένα μόνο στάδιο, είναι σύντομη και έχει χαμηλό κόστος. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι τα κύτταρα που λαμβάνονται στα δυο κλάσματα παρουσιάζουν υψηλή βιωσιμότητα (Klinger et al., 2020; Narayanan et al., 1981; Gupta et al., 1985), που είναι σημαντικό για την περαιτέρω χρήση τους. Συνοπτικά, στην αρχή, επώαστηκαν για 45s 10^8 κύτταρα σε 4 ml θρεπτικό υλικό σε στήλη που περιείχε συνθετικές ίνες εμποτισμένες με 5% FCS. Τα μη-προσκολλημένα (NW non-adherent) κύτταρα που περνούσαν απομονώθηκαν πρώτα και ακολούθησε η απομάκρυνση των προσκολλημένων κυττάρων (NW adherent) με ήπιο τίναγμα της στήλης παρουσία θρεπτικού υλικού. Για την επανααίωρηση των κλασμάτων (συγκέντρωση 5×10^6 βιώσιμα κύτταρα/ml) χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υγρό.

6. In vitro καλλιέργεια μειγμάτων μη-προσκολλημένων και προσκολλημένων κυττάρων τραχηλικού λεμφαδένα παρουσία αντιγόνου και αντιγόνο- παρουσιαστικών κυττάρων

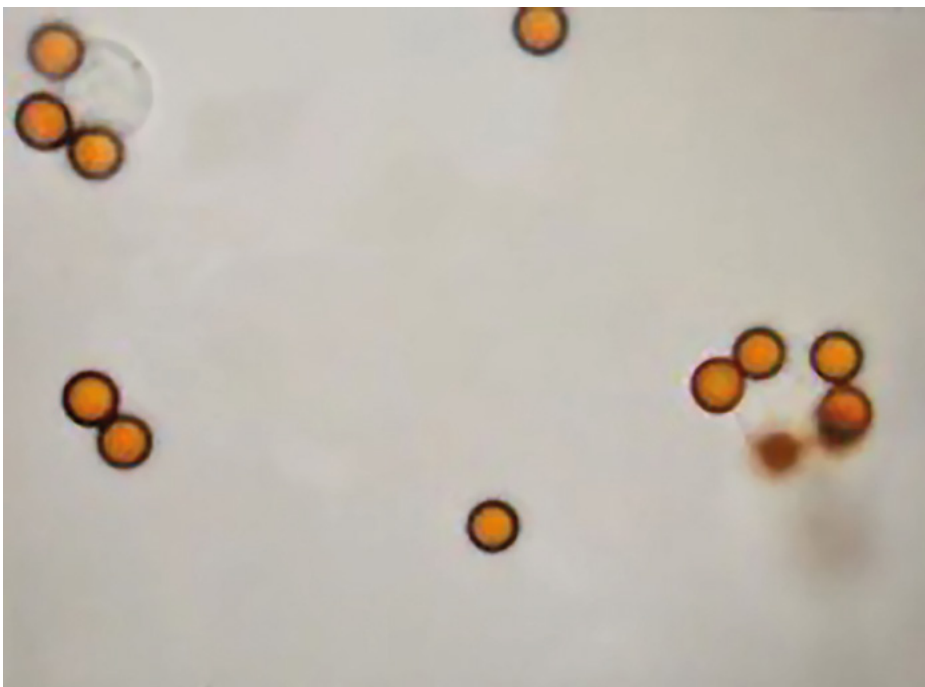
Τα κλάσματα των μη-προσκολλημένων και προσκολλημένων κυττάρων αναμείχθηκαν σε αναλογίες των 0:100, 25:75, 50:50, και 100:0 αντίστοιχα σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας σε 100 µl θρεπτικό υλικό, σε τελικό αριθμό κυττάρων να είναι 5×10^5 ανά αντίδραση. Τα μείγματα επώαστηκαν με 25 µg/ml PPD ως αντιγόνο και 5×10^5 ακτινοβολημένα (1800 rads) κύτταρα περιτοναϊκού εξιδρώματος (PECs) από το ίδιο ζώο ως αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα (Ενότητα «In vitro καλλιέργεια μειγμάτων μη-προσκολλημένων και προσκολλημένων κυττάρων τραχηλικού λεμφαδένα παρουσία αντιγόνου και αντιγόνο- παρουσιαστικών κυττάρων»).

7. Προσδιορισμός κυτταρικών φαινοτύπων στο προσκολλημένο κλάσμα

Η ταυτοποίηση των κυττάρων που προσκολλήθηκαν έγινε με τη χρήση μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο ή ήταν δωρεές άλλων ιδρυμάτων (Gupta et al., 1985; Baker et al., 1988). Επώαστηκαν για 30 min, 1×10^6 προσκολλημένα κύτταρα μαζί με 100 µl από ένα από τα ακόλουθα αντισώματα: MSgp7, pan T marker antibodies; CT6, putative T suppressor cell marker antibodies (Free University Amsterdam); MSgpM, anti-macrophage antibodies ή CT9 (B cell marker). Στη συνέχεια, τα κύτταρα πλύθηκαν σε PBS και επώαστηκαν για 30' παρουσία fluorescein isothiocyanate labeled anti mouse IgM ή IgG (dilution 1:20, Sigma, UK). Μετά το δεύτερο πλύσιμο μετρήθηκε ο αριθμός των θετικά βαμμένων κυττάρων στη συσκευή κυτταρομετρίας (FACS-1, Becton-Dickinson, Rutherford, N.J., USA).

8. *In vitro* καλλιέργεια των μη-προσκολλημένων κυττάρων παρουσία προσκολλημένων κυτταρικών υπο-κλασμάτων σε μεικτή καλλιέργεια

Για να διευκρινιστεί ο πιθανός ρόλος των T κυττάρων ή μονοκυττάρων/μακροφάγων του προσκολλημένου κλάσματος στην καταστολή των κυττάρων του τραχηλικού λεμφαδένα, ελήφθησαν κυτταρικά υπο-κλάσματα απομακρύνοντας το άλλο υπο-κλάσμα με ανοσομαγνητική τεχνική διαχωρισμού κυτταρικών πληθυσμών με την ακόλουθη διαδικασία. Επώαστηκαν $10-15 \times 10^6$ προσκολλημένα κύτταρα παρουσία 0.5 ml of MSgpM ή MSgp7 για 30 min, πλύθηκαν και επώαστηκαν ξανά για 20 min στους 4°C μαζί με μαγνητικά ανοσοσφαιρίδια στα οποία είχε προσδεθεί anti-mouse IgG (για MSgpM) ή anti-mouse IgM (για MSgp7) (Dyna, Oslo, Norway). Ο αριθμός των μαγνητικών ανοσοσφαιριδίων που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση ήταν 3-4 για κάθε κύτταρο. Στη συνέχεια, τα μείγματα αραιώθηκαν 5-10 φορές σε θρεπτικό υλικό και, τοποθετήθηκαν σε συσκευή cobalt-samarium magnet (Magnetic Development, Swindon, Wilts, UK) η οποία προσέλκυσε με μαγνητισμό τα συνδεδεμένα με ανοσοσφαιρίδια κύτταρα, στην εσωτερική επιφάνεια του σωληνάριου (Εικ. 1). Απομακρύνθηκαν τα μη-δεσμευμένα στα σφαιρίδια κύτταρα και επαναλήφθηκε η διαδικασία άλλες δυο φορές. 2.5×10^5 από τα κύτταρα κάθε υπο-κλάσματος καλλιεργήθηκαν μαζί με αντίστοιχο αριθμό μη-προσκολλημένων κυττάρων που λειτούργησαν ως ανταποκριτικά κύτταρα, παρουσία 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PPD και 1×10^5 ακτινοβολημένων PECs ως αντιγόνο-παρουσιαστικών κυττάρων (Ενότητα «*In vitro* καλλιέργεια των μη-προσκολλημένων κυττάρων παρουσία προσκολλημένων κυτταρικών υπο-κλασμάτων σε μεικτή καλλιέργεια»).



Εικ. 1. Ροζέτες που δημιουργούνται επάζοντας κύτταρα δεσμευμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα MsgrM μαζί με μαγνητικά ανοσοσφαιρίδια επαλειμμένα με anti IgG (μεγέθυνση $\times 320$)

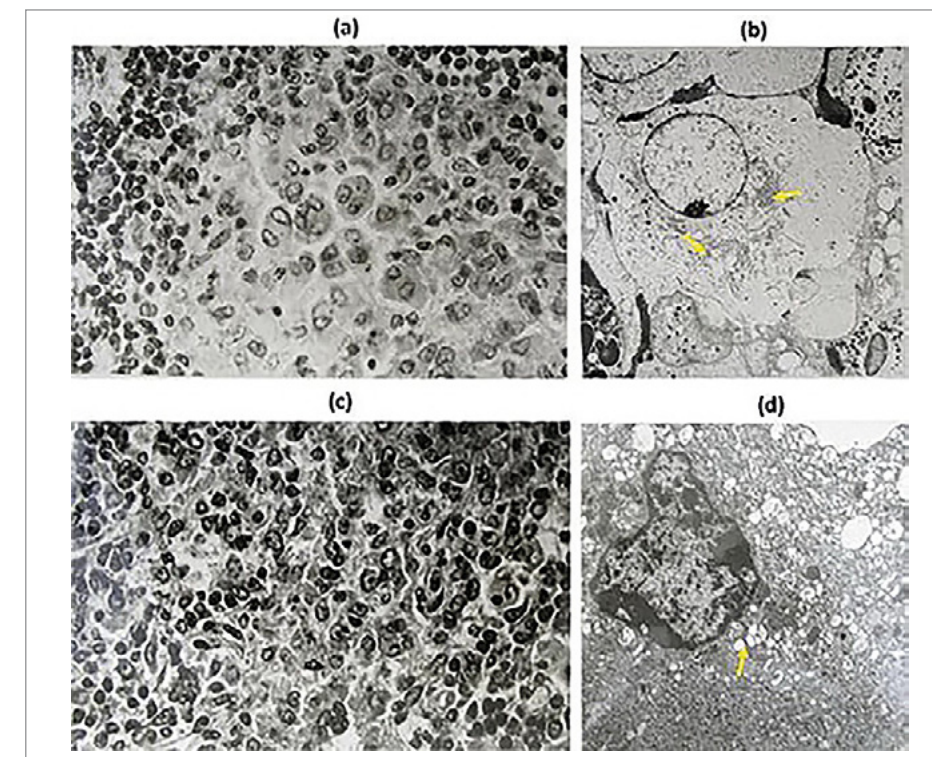
Εικ. 2. (α) Εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο ($\times 320$) από τομές των BCG κοκκιωμάτων από αυχενικούς λεμφαδένες (PA) και (β) εικόνα από αντίστοιχη περιοχή στον ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ενός επιθηλιοειδούς κυττάρου (transmission electron microscope $\times 6000$, το βέλος τονίζει εξογκωμένο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο): (γ) εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο ($\times 320$) από τομές των *M. leprae* κοκκιωμάτων από αυχενικούς λεμφαδένες (PA) και (δ) εικόνα από αντίστοιχη περιοχή στον ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ενός μακροφάγου (transmission electron microscope $\times 6000$, το βέλος τονίζει άπεπτα *M. leprae* σώματα).

9. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η επίδραση του εμβολιασμού με BCG ή *M. leprae* στην τιμή του δείκτη T/C των κυττάρων του αυχενικού ή τραχηλικού λεμφαδένα μετά από καλλιέργεια παρουσία PPD, leprosin, concavalin A ή, BCG: live, heat killed ή co-irr εκτιμήθηκε και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τη δοκιμασία Student's t-test. Λόγω του ότι τα δύο εμβόλια BCG και *M. leprae* χορηγήθηκαν σε διαφορετικά ζώα η σύγκριση έγινε με δοκιμασία ανεξαρτήτων δειγμάτων. Σημαντικότητα στις διαφορές μεταξύ των τιμών του δείκτη T/C θεωρήθηκε το επίπεδο $p < 0,5$.

Αποτελέσματα

Στην Εικ. 2 παρουσιάζονται κοκκιώματα που αναπτύχθηκαν στον αυχενικό λεμφαδένα μετά από εμβολιασμό με BCG ή co-irr *M. leprae*. Μελετήθηκαν ιστολογικές τομές μετά από χρώση με Hematoxylin & Eosin. Όπως φαίνεται στις εικόνες, η δημιουργία κοκκιωμάτων στους αυχενικούς λεμφαδένες, όπως φαίνεται από τον βαθμό διήθησης και τον τύπο των κυττάρων, είναι μέγιστη μετά από 2 εβδομάδες για το BCG και 5 εβδομάδες για το co-irr *M. leprae*. Μετά από αυτήν την χρονική περίοδο τα κοκκιώματα υποχωρούν. Από την άλλη πλευρά, οι τραχηλικοί λεμφαδένες παρουσίασαν κοκκιώματα με εκτεταμένη διέγερση λεμφοκυττάρων. Στην Εικ. 2α φαίνονται κοκκιώματα στον πισθωτιαίο



λεμφαδένα μετά από εμβολιασμό με BCG, όπου διακρίνονται μεγάλα επιθηλιοειδή κύτταρα που περιβάλλονται από λεμφοκύτταρα και ινοβλάστες χωρίς να παρατηρούνται οξεάντοχα μυκοβακτηριδία BCG. Στην Εικ. 2b φαίνεται μετά από μεγέθυνση ένα μόνο επιθηλιοειδές κύτταρο με γνώριμα χαρακτηριστικά, όπως παρουσία μεγάλου πυρήνα, εμφανής πυρηνίσκος και εξογκωμένο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο (βέλος). Στην Εικ. 2c παρουσιάζεται μια ιστολογική τομή αντίστοιχου λεμφαδένα μετά από εμβολιασμό με *M. leprae*. Παρατηρείται ότι η πλειοψηφία των κυττάρων είναι μακροφάγα φαγοκύτταρα (Εικ. 2d) που περιέχουν κυτταρικά κενοτόπια, μαζί με θρυμματισμένα άπεπτα *M. leprae* (βέλος). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές (Narayanan et al., 1981; Gupta et al., 1985; Verghese et al., 1988; Litvin and Rosenstreich, 1984; Baker et al., 1988; Mathew et al., 1983).

1. Πολλαπλασιασμός των κυττάρων αυχενικού και τραχηλικού λεμφαδένα μετά από εμβολιασμό με BCG ή *M. leprae*

Στην Εικ. 3Α εμφανίζονται διαγράμματα του δείκτη πολλαπλασιασμού (T/C) του συνόλου των κυττάρων του λεμφαδένα για BCG (στήλες a, b σε κάθε συστάδα) και *M. leprae* (στήλες c, d) παροχετευόμενων λεμφαδένων παρουσία των δύο διαλυτών μυκοβακτηριδιακών αντιγόνων PPD and Leprosin. Στην Εικ. 3B παρουσιάζονται αντίστοιχα διαγράμματα στηλών παρουσία του μη ειδικού μιτογόνου Con A.

Όπως φαίνεται στην Εικ. 3Α, τα κύτταρα των BCG λεμφαδένων πολλαπλασιάζονται σε μικρότερο βαθμό από του *M. leprae* όταν καλλιεργούνται με PPD, με εξαίρεση τα αυχενικά (σύγκριση στηλών b με d στις δύο συστάδες και στήλη a με c στη δεύτερη). Δηλαδή, τα κύτταρα λεμφαδένων BCG ανταποκρίθηκαν σε μικρότερο βαθμό στα ειδικά αντιγόνα, όπως PPD και Leprosin από τα κύτταρα λεμφαδένων *M. leprae* και αυτό είναι εμφανές στα κύτταρα του τραχηλικού λεμφαδένα. Οι διαφορές επιβεβαιώθηκαν και στατιστικά (Πίνακας 1). Εκτός από την περίπτωση κυττάρων PA με PPD όπου, οι αποκρίσεις των ζώων που εμβολιαστήκαν με BCG και *M. leprae* ήταν σημαντικά διαφορετικές μεταξύ PA παρουσία Leprosin ($p = 0,25$), μεταξύ CER παρουσία PPD ($p = 0,032$) και μεταξύ CER παρουσία Leprosin ($p = 0,002$). Αυτό δεν οφειλόταν στη κακή κατάσταση των κυττάρων, καθώς η καλή κατάστασή τους αποδείχθηκε μετά από καλλιέργεια με το μιτογόνο Con A (διάγραμμα 3B, η κλίμακα του άξονα Y-axis στο διάγραμμα 3B είναι x10 μεγαλύτερη από το 3A). Επίσης, προσθήκη ινδομεθακίνης (10 $\mu\text{g/ml}$) στις καλλιέργειες δεν επηρέασε την καταστολή του πολλαπλασιασμού των BCG κυττάρων στο PPD (πρώτη συστάδα, η μικρότερη από τις δύο στήλες στην b) υποδηλώνοντας ότι η καταστολή δεν οφειλόταν στη δράση προσταγλανδινών.

2. Πολλαπλασιασμός των κυττάρων λεμφαδένων παρουσία ολικών ακατέργαστο BCG

Παρατηρώντας τη μη-απόκριση των κυττάρων του τραχηλικού λεμφαδένα σε διαλυτές μορφές μυκοβακτηριδιακών αντιγόνων, εξετάστηκε η απόκριση τους παρουσία ολικών βακτηριακών BCG κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις μορφές BCG: live εξασθενημένα,

Πίνακας 1. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης (σύγκριση μέσων, δοκιμασία t-test)

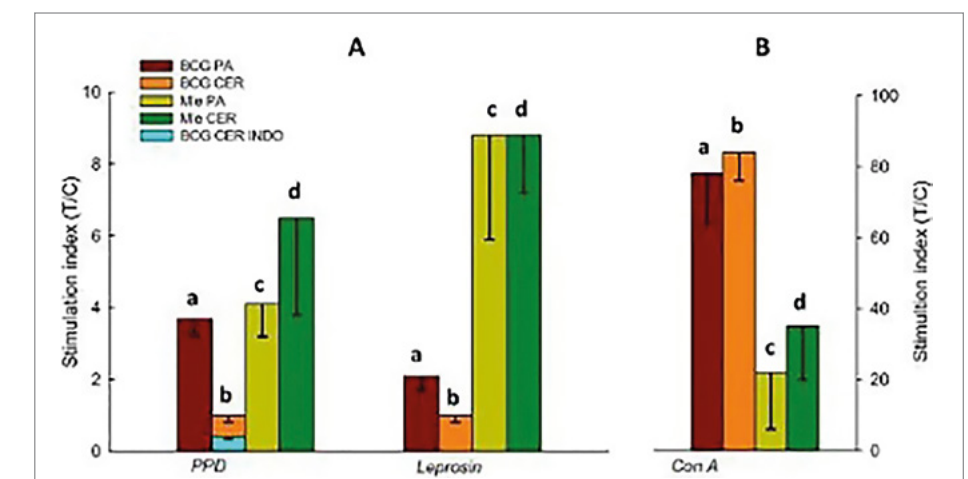
COMPARISONS	LEVENE		STUDENT'S T TEST	
	F	p-value	t	p-value
BCG/PA/PPD – Mle/PA/PPD	0.874	0.386	-0.771	0.470
BCG/CE/PPD – Mle/CE/PPD	7.631	0.033	-4.125	0.025
BCG/PA/LSN – Mle/PA/LSN	6.182	0.047	-3.728	0.032
BCG/CE/LSN – Mle/CE/LSN	4.405	0.081	-9.693	0.002

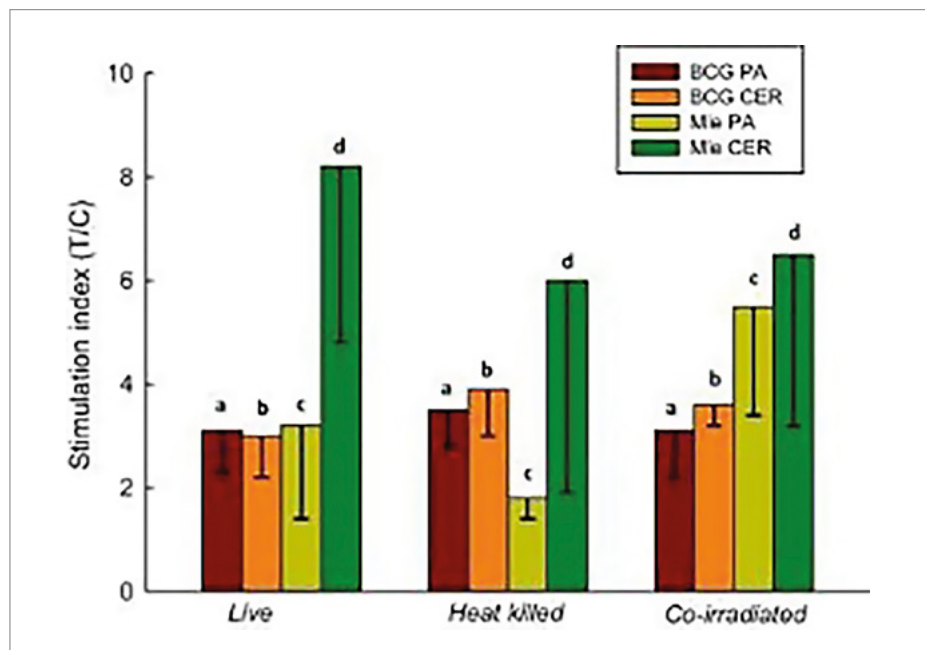
Abbreviations: BCG, Bacillus Calmette-Guerin Vaccine; PA, post auricular; PPD, purified protein derivative Pan T cells; Mle, *M. leprae*; CE, cervical; LSN, leprosin

heat killed ή co-irr. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικ. 4, όπου βλέπουμε ότι αντίθετα με τη μη-απόκριση στις διαλυτές μυκοβακτηριακές ουσίες PA και Leprosin, τα κύτταρα από BCG λεμφαδένες [πρώτες δύο στήλες (a, b)], όπως και από *M. leprae* [τελευταίες δύο (c, d)] λεμφαδένες αποκρίθηκαν με πολλαπλασιασμό σε ολικά BCG. Παρατηρήθηκε ακόμα ότι κύτταρα αυχενικών και τραχηλικών λεμφαδένων πολλαπλασιάστηκαν 3-4 φορές (T/C μεταξύ 3 και 4) δηλώνοντας την παρουσία ευαισθητοποιημένων κυττάρων ικανών να αποκριθούν σε BCG. Επίσης, δεν βρέθηκαν έντονες διαφορές μεταξύ των αυχενικών και τραχηλικών λεμφαδένων (σύγκριση στηλών a και b σε κάθε συστάδα).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (Πίνακας 2) έδειξε ότι οι BCG λεμφαδένες παρουσίασαν μικρότερο πολλαπλασιασμό ($p=0,044$), όπως είχε παρατηρηθεί και με τα διαλυτά μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα PPD και Leprosin (Εικ. 3).

Εικ. 3. Α. Δείκτης διέγερσης των συνολικών κυτταρικών πληθυσμών από αυχενικούς και τραχηλικούς λεμφαδένες μετά από εμβολιασμό με BCG ή *M. leprae* παρουσία PPD ή Leprosin και Β. παρουσία concavalin A.





Εικ. 4. Δείκτης διέγερσης των συνολικών κυτταρικών πληθυσμών από αυχενικούς και τραχηλικούς λεμφαδένες μετά από εμβολιασμό με BCG ή *M. leprae* παρουσία 107 BCG μυκοβακτηριδίων.

Πίνακας 2.

Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης (μέσες τιμές, δοκιμασία, t-test) επιδράσεων χορήγησης BCG και *M. leprae* στον δείκτη διέγερσης (T/C) αυχενικών και τραχηλικών λεμφαδένων παρουσία ζωντανών, θανατωμένων (heat killed) ή ακτινοβολημένων (co-irr BCG).

COMPARISONS	LEVENE'S TEST		STUDENT'S T TEST	
	F	P-value	t	P-value
BCG/PA/LV – MLE/PA/LV	1.534	0.262	-0.104	0.920
BCG/CE/LV – MLE/CE/L	2.964	0.136	-2.535	0.044
BCG/PA/HK – MLE/PA/HK	0.474	0.517	4.298	0.005
BCG/CE/HK – MLE/CE/HK	7.190	0.036	-1.005	0.383
BCG/PA/IR – MLE/PA/IR	1.483	0.269	-0.165	0.874
BCG/CE/IR – MLE/CE/IR	3.587	0.107	-1.751	0.131

Abbreviations: BCG, Bacillus Calmette-Guerin Vaccine; PA, post auricular; LV, live BCG; HK, heat killed BCG; IR, cobalt irradiated BCG

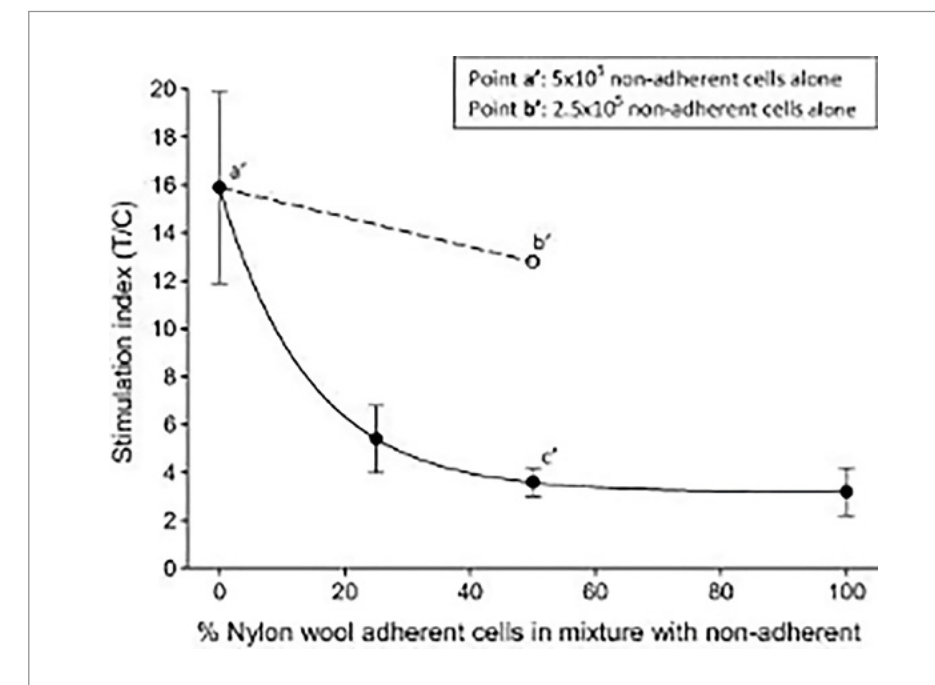
3. Πολλαπλασιασμός των προσκολλημένων και μη-προσκολλημένων κυττάρων από BCG τραχηλικούς λεμφαδένες σε μεικτές καλλιέργειες

Για περαιτέρω διερεύνηση του ερωτήματος, ποια ήταν τα κύτταρα που εμπόδισαν τον πολλαπλασιασμό του συνόλου των BCG τραχηλικών κυττάρων παρουσία διαλυτών μυκοβακτηρικών αντιγόνων, αυτά χωρίστηκαν σε προσκολλημένα και μη-προσκολλημένα με τη μέθοδο που περιγράφηκε προηγουμένως. Στη συνέχεια, αυτά αναμείχθηκαν σε μια σειρά αναλογίων και καλλιεργήθηκαν παρουσία PPD και PECs ως αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα. Όπως φαίνεται στην Εικ. 5, τα μη-προσκολλημένα κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν και έδωσαν δείκτη T/C=16, όταν καλλιεργήθηκαν μόνο τους με τα PECs. Από την άλλη πλευρά, η προσθήκη των προσκολλημένων κυττάρων σε αυξημένες αναλογίες (X) έφερε εκθετική μείωση του T/C. Αυτό εκφράζεται με την εξίσωση (1) η οποία περιγράφει πολύ καλά τα δεδομένα όπως φαίνεται από την τιμή του δείκτη προσαρμογής ($R^2 = 0,999$). X είναι το ποσοστό προσκολλημένων κυττάρων.

$$T/C = 3.12 + 12.7e(-0.070X) \quad (1)$$

Η απότομη πτώση του T/C με προσθήκη μόνο του 20% των προσκολλημένων κυττάρων υπογραμμίζει τον σημαντικό ρόλο τους στην καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που παρατηρείται στην Εικ. 3.A.

Εικ. 5. Καμπύλη δεικτών διέγερσης των μεικτών καλλιεργειών των μη-προσκολλημένων κυττάρων με αυξημένη αναλογία των προσκολλημένων κυττάρων παρουσία PPD και PECs ως αντιγόνο-παρουσιαστικών κυττάρων (μέσος \pm SD, n = 4). Η διακεκομμένη γραμμή συνδέει τιμές T/C απουσία προσκολλημένων κυττάρων: αριθμός των κυττάρων στο σημείο a'=5 \times 10⁶ και στο σημείο b'=5 \times 10⁵.



4. Φαινοτυπική ταυτοποίηση των κυττάρων στο προσκολλημένο κλάσμα του BCG τραχηλικού λεμφαδένα

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3, μετά από χρώση με αντίστοιχα μονοκλωνικά/πολυκλωνικά αντισώματα, παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα προσκολλημένου κλάσματος του τραχηλικού λεμφαδένα αποτελούνταν από μακροφάγα (16,6%), T κύτταρα (16,6%) και B κύτταρα (32,8%). Είναι αξιοσημείωτο ότι στα ετερογενή πειραματοζώα το σύνολο των T κυττάρων σε αυτό το κλάσμα ήταν της T κατασταλτικής σειράς, καθώς δεσμευθήκαν με CT6, το ειδικό αντίσωμα. Διαφορές στα ποσοστά των κυτταρικών πληθυσμών οφείλονται, πιθανώς, που χρησιμοποιήθηκαν.

5. Πολλαπλασιασμός των μη-προσκολλημένων κυττάρων παρουσία υποκλασμάτων προσκολλημένου κλάσματος μακροφάγων ή προσκολλημένου κλάσματος T κυττάρων.

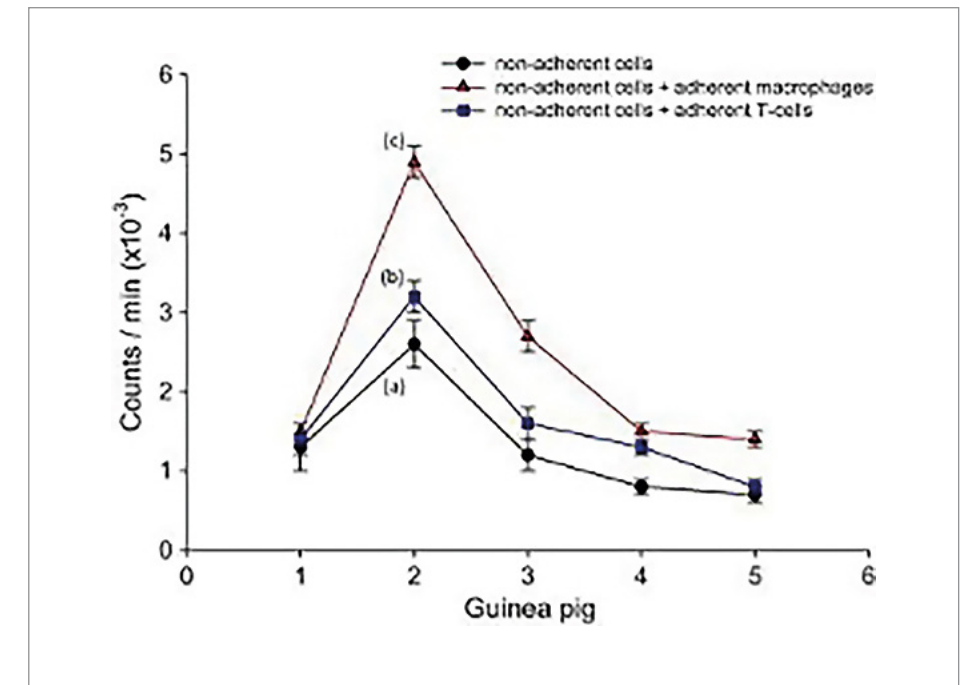
Χρησιμοποιήθηκαν μεικτές καλλιέργειες μη-προσκολλημένων κυττάρων και αναλογίες υποκλασμάτων προσκολλημένων κυττάρων εμπλουτισμένων με μακροφάγα ή T κύτταρα, όπως αυτό περιγράφηκε προηγουμένως (Ενότητα «In vitro καλλιέργεια των μη-προσκολλημένων κυττάρων παρουσία προσκολλημένων κυτταρικών υποκλασμάτων σε μεικτή καλλιέργεια»). Οι καλλιέργειες έγιναν παρουσία του PPD (25 μg/ml) και 1×10^5 αντιγόνο-παρουσιαστικών κυττάρων PECs, πάντα διατηρώντας σταθερό συνολικό αριθμό κυττάρων. Σκοπός του πειράματος ήταν να ταυτοποιηθούν τα κύτταρα που ανέστειλλαν των πολλαπλασιασμό του συνόλου των κυττάρων από τους τραχηλικούς λεμφαδένες.

Πίνακας 3.

Κυτταρικοί φαινότυποι Cell phenotypes in the nylon wool adherent fraction of cells from the cervical lymph node

GP NO.	MSGP7 ^A (CT6 ^B)	MSGPM ^C	MSGP9 ^D
1	14 (114.3%)	41	42
2	13 (92.3%)	39	48
3	15 (100%)	50	28
4	15 (100%)	48	27
5	26 (46.2)	55	19
Total	16.6+5.3	46.6+6.6	32.8+11.9

Εικ. 6. Πολλαπλασιασμός (counts/min) των (a) non-adherent κυττάρων (κύκλοι) μόνο τους; (b) non-adherent κυττάρων παρουσία υποκλάσματος T κυττάρων εμπλουτισμένων από NW adherent κύτταρα (τετράγωνα); NW non-adherent κυττάρων παρουσία με μακροφάγα εμπλουτισμένα από NW adherent κύτταρα (τετράγωνα). Οι καλλιέργειες έγιναν επίσης παρουσία PPD και PECs



Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικ. 6, όπου παρά τις διαφορές μεταξύ των πειραματοζώων, φαίνεται ότι σε τέσσερα από τα πέντε ζώα, ή παρουσία μακροφάγων ή T κυττάρων από μόνο τους ενίσχυσε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό υποδηλώνοντας ότι η καταστολή του πολλαπλασιασμού συνολικά των κυττάρων των τραχηλικών λεμφαδένων (Εικ. 3Α, Εικ. 5) οφείλεται στην ταυτόχρονη παρουσία και συνέργεια των μακροφάγων και κυττάρων T.

Συζήτηση

Σε πειραματοζώα το BCG προκαλεί κοκκιώματα που έχουν χαρακτηριστικά «tuberculoid» ή φυματιοειδών (ανοσολογικών) δερματικών αλλοιώσεων της λέπρας (νόσος Hansen), ενώ τα κοκκιώματα του *M. leprae* έχουν χαρακτηριστικά lepromatous ή λεπρωματοειδών (μη-ανοσολογικών) αλλοιώσεων (Turk and Narayanan, 1982). Στην παρούσα εργασία, επιλέχθηκε η μελέτη ανάπτυξης των μυκοβακτηριδιακών κοκκιωμάτων να γίνει σε ινδικά χοιρίδια τα οποία αποτελούν εξαιρετικό πειραματικό μοντέλο για αυτό το σκοπό. Τέτοιες μελέτες θα ήταν αδύνατο να γίνουν σε ανθρώπους.

Αρχικά, η μελέτη έδειξε ότι, σε αντίθεση με ζώα που εμβολιάστηκαν με *M. leprae*, τα κύτταρα των τραχηλικών λεμφαδένων ζώων που εμβολιάστηκαν με BCG δεν ανταποκρίθηκαν (πολλαπλασιάστηκαν), όταν αυτά καλλιεργήθηκαν μαζί με PPD ή Ieprosin. Αντιθέτως, πολλαπλασιάστηκαν σε μεγάλο βαθμό, όταν καλλιεργήθηκαν μαζί με ολόκληρα BCG μυκοβακτήρια υποδηλώνοντας ότι στους λεμφαδένες υπήρχαν αποκριτικά σε BCG κύτταρα, άρα ο πολλαπλασιασμός τους καταστέλλονταν με κάποιον

άλλο μηχανισμό και αυτός δεν είχε σχέση με ανοσοκαταστολή από προσταγλανδίνης. Επίσης, βρέθηκε ότι η παρατηρούμενη καταστολή προερχόταν από κύτταρα του προσκολλημένου κλάσματος κυττάρων. Περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου αυτού του κλάσματος κυττάρων έδειξε ότι αποτελείται, κυρίως, από κατασταλτικά Τ κύτταρα και μονοκύτταρα/μακροφάγα και ότι για την εκδήλωση της καταστολής είναι απαραίτητη η ταυτόχρονη παρουσία τους που αποδεικνύει τη συνεργιστική τους δράση.

Είναι γνωστό ότι ο εμβολιασμός με BCG παράγει Τ κατασταλτικούς/ρυθμιστικούς κυτταρικούς φαινότυπους που ευθύνονται για τη μη-εξάπλωση της φλεγμονής (Boer et al., 2015). Επιπλέον, έχει επιβεβαιωθεί η παρουσία μονοκυττάρων/μακροφάγων σε αλλοιώσεις που προκαλούνται από μυκοβακτήρια και άλλα ενδοκυττάρια παθογόνα (Murray et al., 1986; Vincendeau and Bouteille, 2006). Ο τρόπος λειτουργίας των κυττάρων αυτών μπορεί να είναι αποτέλεσμα μιας φυσικής επαφής τους με άλλα κύτταρα ή μέσω απελευθέρωσης εκκριτικών παραγόντων (Ptak and Gershon, 1975; Goodwin and Webb, 1980). Ωστόσο, έχει αποδειχτεί, επίσης, ότι τα Τ κύτταρα και τα μονοκύτταρα/μακροφάγα λειτουργούν σε συνέργεια όταν πρόκειται για καταστολή των λειτουργιών άλλων κυττάρων (Bullock et al., 1978; Turcotte, 1981; Turcotte and Lemieux, 1982; Ohkawa et al., 1987).

Πρέπει να αναφερθεί ότι η καταστολή πολλαπλασιασμού *in vitro* που παρατηρήθηκε σε τραχηλικά κύτταρα μετά από εμβολιασμό με BCG σε καμία περίπτωση δεν οφειλόταν σε μη-ανταπόκριση του πειραματόζωου στα μυκοβακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν, επειδή τα κύτταρα του διπλανού οπισθοωτιαίου λεμφαδένα έδειξαν αυξημένη ανταπόκριση. Οπότε, υποτέθηκε ότι στην περίπτωση αυτήν πρέπει να λειτουργεί ένας ελεγκτικός ανοσολογικός μηχανισμός που, στη συνέχεια, περιορίζει και την προκληθείσα φλεγμονή από τον εμβολιασμό, και την επούλωση των αλλοιώσεων μέσα σε 2 εβδομάδες συνοδευόμενη με αντικατάσταση των αλλοιωμένων περιοχών από ινοβλάστες και μείωση του βάρους του λεμφαδένα σε φυσιολογικό υποδηλώνοντας ίαση. Να ληφθεί υπόψη ότι για την επούλωση αντίστοιχων αλλοιώσεων από *M. leprae* χρειάζονται 5 εβδομάδες. Παρόμοια αντίδραση με σύντομη επούλωση των αλλοιώσεων παρατηρείται σε υγιή άτομα μετά από εμβολιασμό με BCG, καθώς, επίσης, και στην περίπτωση του φυματιοειδούς τύπου λέπρας (tuberculoïd, immunological) αλλά όχι του λεπροματοειδούς τύπου (lepromatous, non-immunological), όπου οι δερματικές αλλοιώσεις είναι διηθητικού τύπου και εκτενείς. Επομένως, όσον αφορά τις μυκοβακτηριακές αλλοιώσεις, έχει υπονοηθεί ότι η κατασταλτική δράση που διακρίνεται στην περίπτωση του φυματιοειδούς τύπου λέπρας ή BCG είναι αποτέλεσμα μιας καλά ρυθμιζόμενης ανοσολογικής απόκρισης (Nath et al., 1984). Δεν αποκλείεται, λοιπόν, ένας παρόμοιος μηχανισμός να λειτουργεί στους τραχηλικούς λεμφαδένες μετά από τον εμβολιασμό με BCG σε πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν.

Το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου λειτουργεί με έναν μηχανισμό που μοιάζει με «δίκικο μαχαίρι» και ελέγχεται αυστηρά (Jiang and Chess, 2004) από τον ίδιο τον οργανισμό. Όπως έχει προαναφερθεί, ο εμβολιασμός με το BCG προσφέρει ανοσολογική προστασία σε ετερόλογους αλλογενείς παράγοντες μέσω των τροποποιημένων αντιδράσεων στα επακόλουθα ερεθίσματα, μηχανισμός που ονομάζεται

«εκπαιδευμένη ανοσία» (Angelidou et al., 2020). Για τους λόγους αυτούς, η χρήση του BCG ως ανοσοτροποποιητικού παράγοντα παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τη θεραπεία των αυτοάνοσων και άλλων ασθενειών (Nath et al., 1984). Στην περίπτωση της πανδημίας COVID-19, έχει παρατηρηθεί χαμηλότερο ποσοστό θνησιμότητας σε χώρες, όπου είναι υποχρεωτικός ο εμβολιασμός με BCG. Πρέπει να τονιστεί ότι ακόμα δεν έχει διερευνηθεί με ποιούς μηχανισμούς ο ιός SARS-CoV-2 προκαλεί κυτταρική ανοσία στον άνθρωπο και, ποια κύτταρα εμπλέκονται στη διαδικασία αυτήν. Όπως, επίσης, τι ρόλο παίζουν τα αναμνηστικά κύτταρα (memory cells) στη συντήρηση της ανοσίας στο COVID-19. Ακόμα, χρειάζεται να απαντηθούν αρκετά ερωτήματα για το πώς ακριβώς συμπεριφέρεται ο ιός, αφού εισβάλλει στον οργανισμό, ή ποια είναι η πορεία του.

Συνοψίζοντας, η εργασία αυτή, μέσα από *in vitro* πειραματικά δεδομένα, δείχνει ότι το εμβόλιο BCG που είναι γνωστό εδώ και έναν αιώνα «πυροδοτεί»/διεγείρει έναν ανοσο-ρυθμιστικό μηχανισμό ικανό να περιορίζει βλαβερές ανοσολογικές αντιδράσεις/διεγέρσεις με την επαγωγή των ανοσο-κατασταλτικών κυττάρων.

Συμπέρασμα

Στην παρούσα μελέτη χορηγήθηκαν ενδοδερμικά σε ινδικά χοιρίδια μυκοβακτηρίδιο φυματίωσης (BCG) και μυκοβακτηρίδιο λέπρας (*M. leprae*). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η χορήγηση BCG προκάλεσε την εμφάνιση κοκκιώματος το οποίο υποχώρησε σύντομα εντός 2 εβδομάδων. Αυτό οφείλεται στη συνεργιστική δράση δύο σημαντικών κυτταρικών πληθυσμών, των ανοσο-ρυθμιστικών κυττάρων Τ και των σειρά κυττάρων μονοκυττάρων/μακροφάγων. Αντιθέτως, η χορήγηση *M. leprae* προκάλεσε την εμφάνιση λεπροματώδους κοκκιώματος μη-ανοσολογικού χαρακτήρα που υποχώρησε πολύ αργότερα, μετά από 5 εβδομάδες. Τα παραπάνω ευρήματα πιθανώς σχετίζονται με πρόσφατα δημοσιεύματα που αναφέρουν ότι ασθενείς με SARS-CoV-2 (COVID-19) εμβολιασμένοι με BCG παρουσίασαν ήπια κλινικά συμπτώματα.

Βιβλιογραφία

1. Kar U.K., Joosten L.A.B. Training the trainable cells of the immune system and beyond. *Nat Immunol.* 2020;21:115–119.
2. Grey H.M., Chesnut R. Antigen processing and presentation to T cells. *Immunol Today.* 1985;6:101–106.
3. Becker M.J., Drucker I., Farkas R., Steiner Z., Klajman A. Monocyte-mediated regulation of cellular immunity in humans: loss of suppressor activity with ageing. *Clin Exp Immunol.* 1981;45:439–446.
4. Turcotte R. A suppressor B lymphocyte inhibiting IL-2 consumption in spleen cell cultures from *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice. *Immunology.* 1987;62:439–444.
5. Boer MC, van Meijgaarden KE, Joosten SA, Ottenhoff THM. CD8+ regulatory T cells, and not CD4+ T cells, dominate suppressive phenotype and function after in vitro live *Mycobacterium bovis*-BCG activation of human cells. *PLoS One.* 2014;9:e94192-e.
6. Ellner J.J. Suppressor adherent cells in human. *Tuberculosis.* 1978;121:2573–2579.
7. Twomey J.J., Laughter A.H., Farrow S., Douglass C.C. Hodgkin's disease. An immunodepleting and immunosuppressive disorder. *J Clin Invest.* 1975;56:467–475.
8. Shevach EM. The resurrection of T cell-mediated suppression. 2011;186:3805–7.
9. Rosenthal A.S., Shevach I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J Exp Med.* 1973;138:1194–1212.
10. Weinberg D.S., Unanue E.R. Antigen-presenting function of alveolar macrophages: uptake and presentation of *Listeria monocytogenes*. *J Immunol (Baltimore, Md : 1950)* 1981;126:794–799.
11. Holt P.G. Alveolar macrophages. II. Inhibition of lymphocyte proliferation by purified macrophages from rat lung. *Immunology.* 1979;37:429–436.
12. Ley K., Gerdes N., Winkels H. ATVB distinguished scientist award: how costimulatory and coinhibitory pathways shape atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37:764–777.
13. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:958–969. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
14. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger 2008;8:279–89.
15. Bullock W.E., Watson S., Nelson K.E., Schauf V., Makonkawkeyoon S., Jacobson R.R. Aberrant immunoregulatory control of B lymphocyte function in lepromatous leprosy. *Clin Exp Immunol.* 1982;49:105–114.
16. Tomioka H, Tatano Y, Maw WW, Sano C, Kanehiro Y, Shimizu T. Characteristics of suppressor macrophages induced by mycobacterial and protozoal infections in relation to alternatively activated M2 macrophages. 2012;2012.
17. Walker C, Kristensen F, Bettens F, DeWeck A. Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes. I. Prostaglandin E2-induced inhibition of interleukin 2 production. 1983;130:1770–3.
18. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. 2016;44:450–62.
19. Sabat R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(5):315–324. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.11.001.
20. Katz S, Parker D, Turk J. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. 1974;251:550–1.
21. Sy M-S, Miller SD, Claman HN. Immune suppression with supraoptimal doses of antigen in contact sensitivity: I. Demonstration of suppressor cells and their sensitivity to cyclophosphamide. 1977;119:240–244.
22. Morikawa Y, Kuribayashi K, Saito K. B-cell-mediated regulation of delayed-type hypersensitivity. 1990;131:338–51.
23. James S, Yenokida G, Graeff A, Strober W. Activation of suppressor T cells by autologous lymphoblastoid cells: a mechanism for feedback regulation of immunoglobulin synthesis. 1982;128:1149–54.
24. Baker D., Pryce G., Amor S., Giovannoni G., Schmierer K. Learning from other autoimmunities to understand targeting of B cells to control multiple sclerosis. *Brain : A J Neurol.* 2018;141:2834–2847.
25. Narayanan R, Badenoch-Jones P, Curtis J, Turk J. Comparison of mycobacterial granulomas guinea-pig lymph nodes. 1982;138:219–33.
26. Merle C.S., Cunha S.S., Rodrigues L.C. BCG vaccination and leprosy protection: review of current evidence and status of BCG in leprosy control. *Expert Rev Vaccines.* 2010;9:209–222.
27. Berg MK, Yu Q, Salvador CE, Melani I, Kitayama S. Mandated *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) vaccination predicts flattened curves for the spread of COVID-19. 2020:2020.04.05.20054163.

28. Covián C, Retamal-Díaz A, Bueno SM, Kalergis AM. Could BCG Vaccination Induce Protective Trained Immunity for SARS-CoV-2? 2020;11.
29. Hegarty PK, Ashish K, Zafirakis H, DiNardo A. <Hegarty et al. 2020 BCGvCovid-19_20200326.pdf>. 2020.
30. Miller A, Reandelar MJ, Fasciglione K, Roumenova V, Li Y, Otazu GH. Correlation between universal BCG vaccination policy and reduced morbidity and mortality for COVID-19: an epidemiological study. 2020.
31. Osama El-Gendy A., Saeed H., Ali A.M.A., Zawbaa H.M., Gomaa D., Harb H.S. Bacillus Calmette-Guérin vaccine, antimalarial, age and gender relation to COVID-19 spread and mortality. *Vaccine*. 2020;38:5564–5568.
32. Covián C, Fernández-Fierro A, Retamal-Díaz A, Díaz FE, Vasquez AE, Lay MK, et al. BCG-induced cross-protection and development of trained immunity: implication for vaccine design. 2019;10.
33. Dhochak N, Singhal T, Kabra S, Lodha R. Pathophysiology of COVID-19: Why Children Fare Better than Adults? 2020;1.
34. Moorlag Simone J.C.F.M., van Deuren Rosanne C., van Werkhoven Cornelis H., Bonten Marc, van Crevel Reinout, Netea Mihai G. Safety and COVID-19 symptoms in individuals recently vaccinated with BCG: a retrospective cohort study. *Cell Rep Med*. 2020;1:100073. doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100073.
35. Klinger D., Blass I., Nadav R., Michal Linia M. Significantly Improved COVID-Outcomes in Countries with Higher BCG Vaccination Coverage. 2020 A Multivariable Analysis *Vaccines*. 2020;8(3),378.
36. Narayanan RB, Badenoch -Jones P, Turk JL. Experimental mycobacterial granulomas in guinea pig lymph nodes: Ultrastructural observations. 1981;134:253– 65.
37. Gupta S, Curtis J, Turk JL. Accessory cell function of cells of the mononuclear phagocyte system isolated from mycobacterial granulomas. 1985;91:425–33.
38. Verghese S., Healey D.G., Curtis J., Turk J.L. Accessory cell function of dendritic cells from lymph nodes containing *Mycobacterium leprae* induced granulomas. *Int Arch Allergy Immunol*. 1988;87:392–399.
39. Litvin D.A., Rosenstreich D.L. Separation of lymphoid cells on nylon wool columns. *Methods Enzymol*. 1984;108:298–302.
40. Baker D., Healey D.G., Verghese S., Schäfer H., Turk J.L. Phenotypic analysis of guinea pig langerhans cells with antibodies directed against leucocyte surface antigens. *Int Arch Allergy Immunol*. 1988;86:350–355.]

41. Mathew RC, Gupta SK, Katayama I, Curtis J, Turk JL. Macrophage specific antigen is expressed by resting microglia in the CNS but not by Langerhans cells in the skin. 1983;141:435–40.
42. Turk J, Narayanan R. The origin, morphology, and function of epithelioid cells. 1982;161:274–82.
43. Boer MC, Joosten SA, Ottenhoff THM. Regulatory T-cells at the interface between human host and pathogens in infectious diseases and vaccination. 2015;6.
44. Murray HW, Carriero SM, Donnelly DM. Presence of a macrophage-mediated suppressor cell mechanism during cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. 1986;54:487–93.
45. Vincendeau P, Bouteille B. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. 2006;78:645–65.
46. Ptak W, Gershon RK. Immunosuppression effected by macrophage surfaces. 1975;115:1346–50.
47. Goodwin J.S., Webb D.R. Regulation of the immune response by prostaglandins. *Clin Immunol Immunopathol*. 1980;15:106–122.
48. Bullock WE, Carlson EM, Gershon RK. The evolution of immunosuppressive cell populations in experimental mycobacterial infection. 1978;120:1709–16.
49. Turcotte R. Evidence for two distinct populations of suppressor cells in the spleens of *Mycobacterium bovis* BCG-Sensitized mice. *Infect Immun*. 1981;34:315– 322.
50. Turcotte R, Lemieux S. Mechanisms of action of *Mycobacterium bovis* BCG- induced suppressor cells in mitogen-induced blastogenesis. 1982;36:263–70.
51. Ohkawa S, Martin L, Fukunishi Y, Gormus B. Regulatory role of FcR+ and FcR- monocyte subsets in mycobacterium leprae-induced lymphoproliferative response in vitro. 1987;67:43.
52. Nath I., Sathish M., Jayaraman T., Bhutani L.K., Sharma A.K. Evidence for the presence of *M. leprae* reactive T lymphocytes in patients with lepromatous leprosy. *Clin Exp Immunol*. 1984;58:522–530.
53. Jiang H., Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Investig*. 2004;114:1198–1208.
54. Angelidou A, Diray-Arce J, Conti MG, Smolen KK, van Haren SD, Dowling DJ, et al. BCG as a case study for precision vaccine development: lessons from vaccine heterogeneity, trained immunity, and immune ontogeny. 2020;11.