

Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

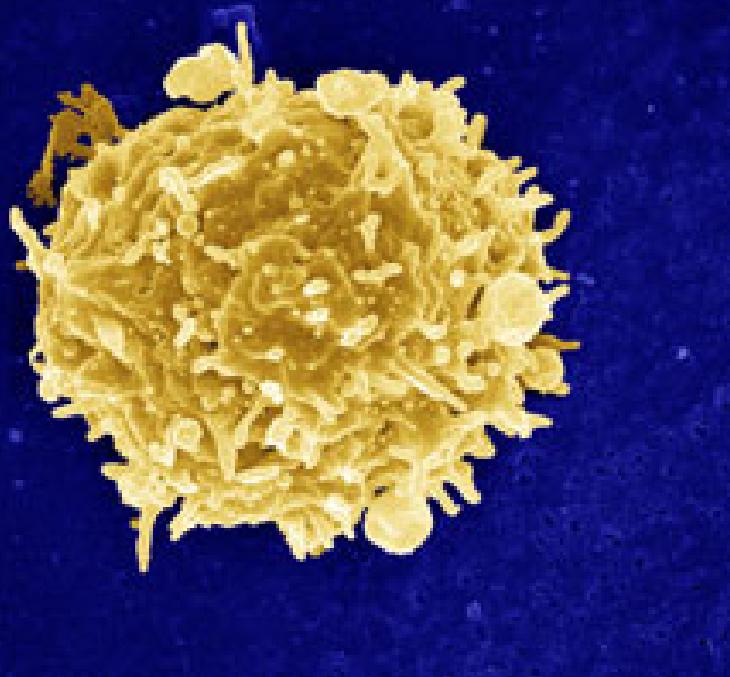
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



# Τα ηπατικά επίπεδα του FOXP3 mRNA στη χρόνια ηπατίτιδα Β εξαρτώνται από την έκφραση των οδών Fas/FasL και PD-1/PD-L1

Γ. Γερμανίδης, Ν. Αργέντου, Θ. Βασιλειάδης, Κ. Πατσιαούρα,  
Κ. Μαντζούκης, Α. Θεοχαρίδου, Π. Νικολαίδης, Α. Γερμενής, Μ. Σπελέτας





Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ FOXP3 ΣΤΟ ΗΠΑΡ  
ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΒΑΘΜΟ ΑΛΛΑ ΟΧΙ  
ΜΕ ΤΟ ΑΙΤΙΟ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

Πρόσφατα δημοσιεύσαμε ότι η έκφραση του *Foxp3* στο ήπαρ (*nTregs*), συσχετίζεται θετικά με τον βαθμό της ηπατικής φλεγμονής, καθώς και με ένα ειδικό πρότυπο έκφρασης των μεσολαβητών της απόπτωσης *Fas*, *FasL* και *TRAIL*

*Speletas M et al., Mediators of Inflammation 2011*



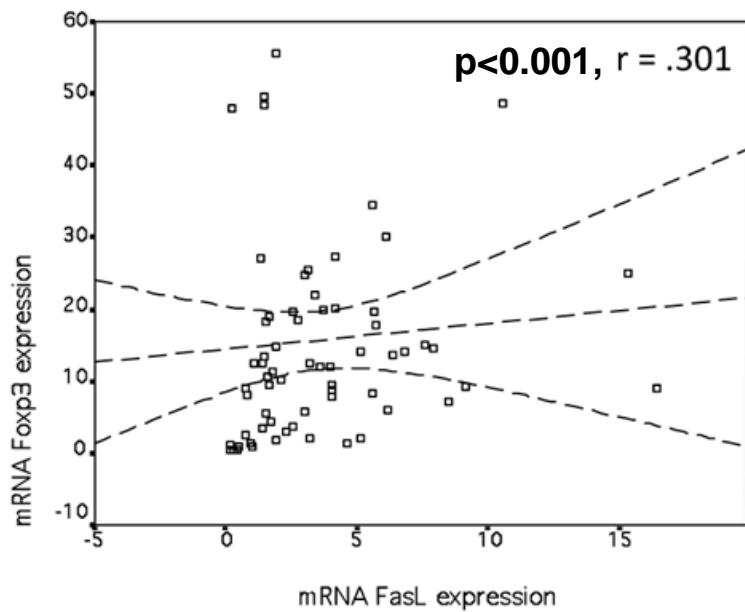
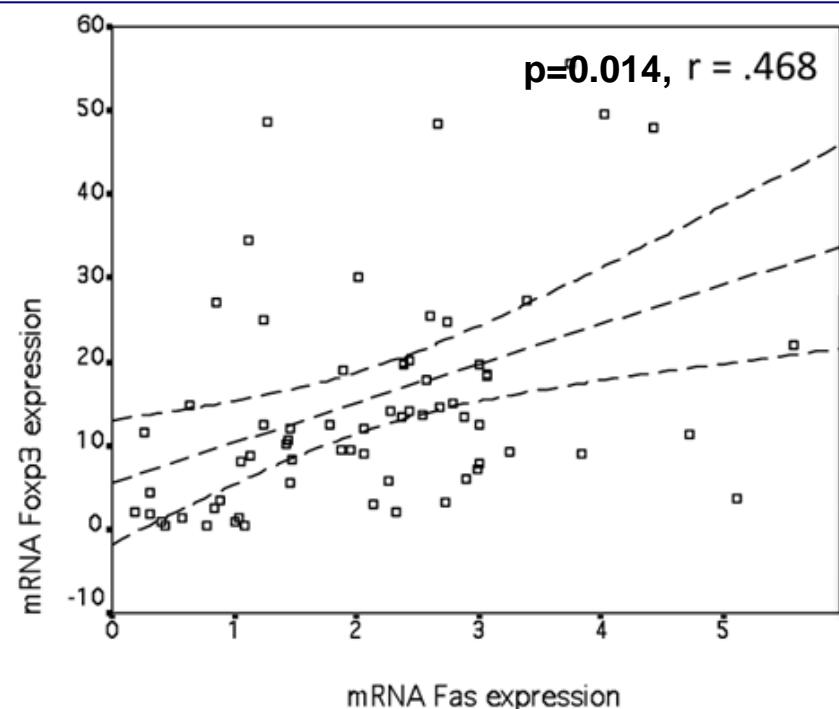
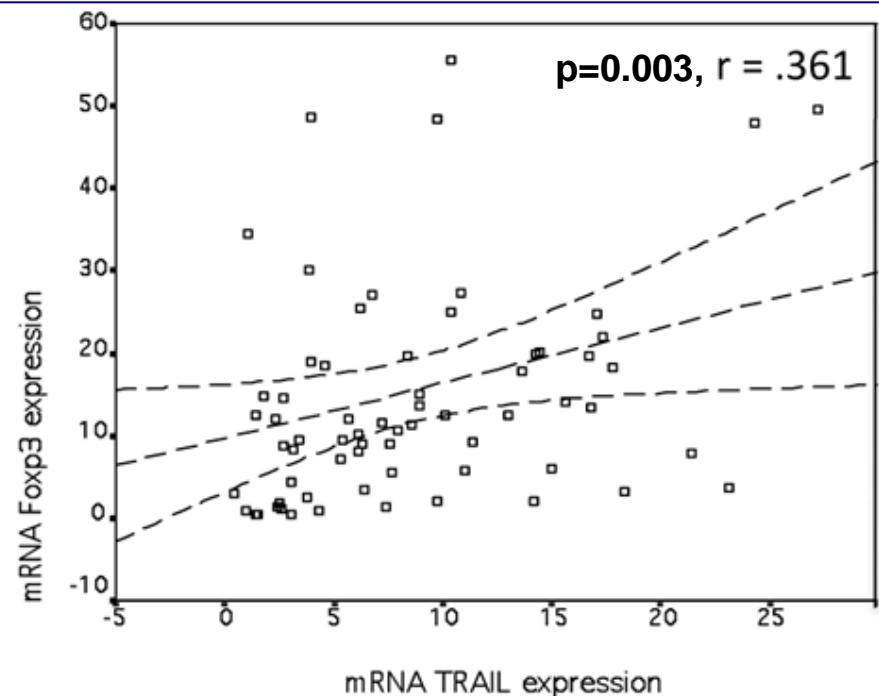
# Results\_ Gene expression in relation to liver diseases

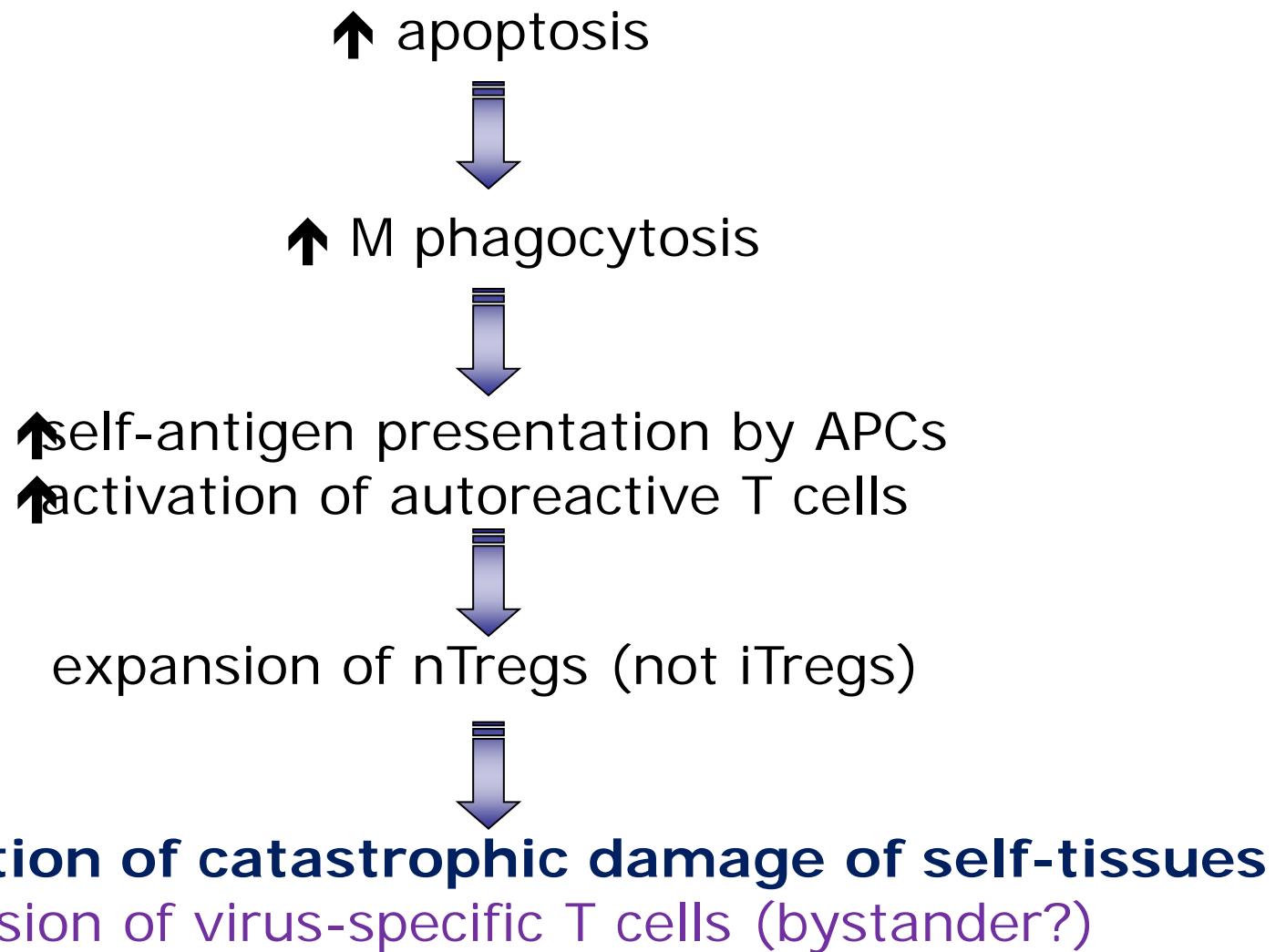
Mann-Whitney U Test

Gene	Normals (no 8)	Chronic HBV hepatitis				Chronic HCV hepatitis (no 14)		NAFLD <sup>b</sup> (no 11)		Autoimmune diseases <sup>c</sup> (no 8)		MTX-toxicity <sup>d</sup> (no 2)
		Diagnosis (no 19)		Treatment/Relapse (no 7)								
	mean±SD	mean±SD	p <sup>a</sup>	mean±SD	p <sup>a</sup>	mean±SD	p <sup>a</sup>	mean±SD	p <sup>a</sup>	mean±SD	p <sup>a</sup>	mean±SD
Foxp3	1.11±0.71	20.3±16.0	<0.001	10.4±5.47	0.001	12.7±12.3	0.001	18.4±11.9	<0.001	16.0±15.2	0.001	28.4±27.8
TGF-β1	1.56±1.49	1.10±0.84	0.710	0.53±0.31	0.053	0.73±0.58	0.065	1.60±1.01	0.620	1.43±1.04	0.834	0.72±0.17
IL-10	1.50±1.02	0.66±1.33	0.011	0.20±0.24	0.016	0.48±0.77	0.017	0.79±0.77	0.131	0.64±0.94	0.093	0.59±0.62
Fas	0.82±0.24	2.25±0.70	<0.001	2.12±0.78	0.003	1.55±1.07	0.179	3.51±1.17	<0.001	1.56±0.94	0.132	4.14±0.41
FasL	1.05±1.47	4.20±2.05	0.001	3.05±1.98	0.028	4.20±4.09	0.004	3.94±4.42	0.004	4.33±3.69	0.008	0.49±0.39
TRAIL	2.89±2.04	7.28±4.34	0.007	11.3±6.29	0.015	8.86±4.56	0.001	15.3±6.64	<0.001	3.52±2.11	0.355	15.3±12.7
Casp-3	1.87±1.85	1.13±0.74	0.915	0.76±0.43	0.366	1.66±1.34	0.700	1.97±1.05	0.283	3.19±2.23	0.093	2.28±0.66
TNF-α	3.43±4.70	1.77±3.12	0.307	1.54±1.93	0.201	2.73±3.58	0.544	8.17±11.0	0.480	6.63±9.11	0.186	1.21±0.93
IFN-γ	1.92±1.77	5.47±5.99	0.202	4.17±2.46	0.186	2.19±1.77	0.628	4.18±4.93	0.572	8.43±7.25	0.059	0.37±0.26
IL-1β	1.37±1.05	0.51±1.39	0.022	0.41±0.66	0.055	0.33±0.26	0.042	0.99±0.95	0.322	1.15±1.12	0.571	0.30±0.23



## Results\_ Correlation analysis between Foxp3 and apoptosis mediators

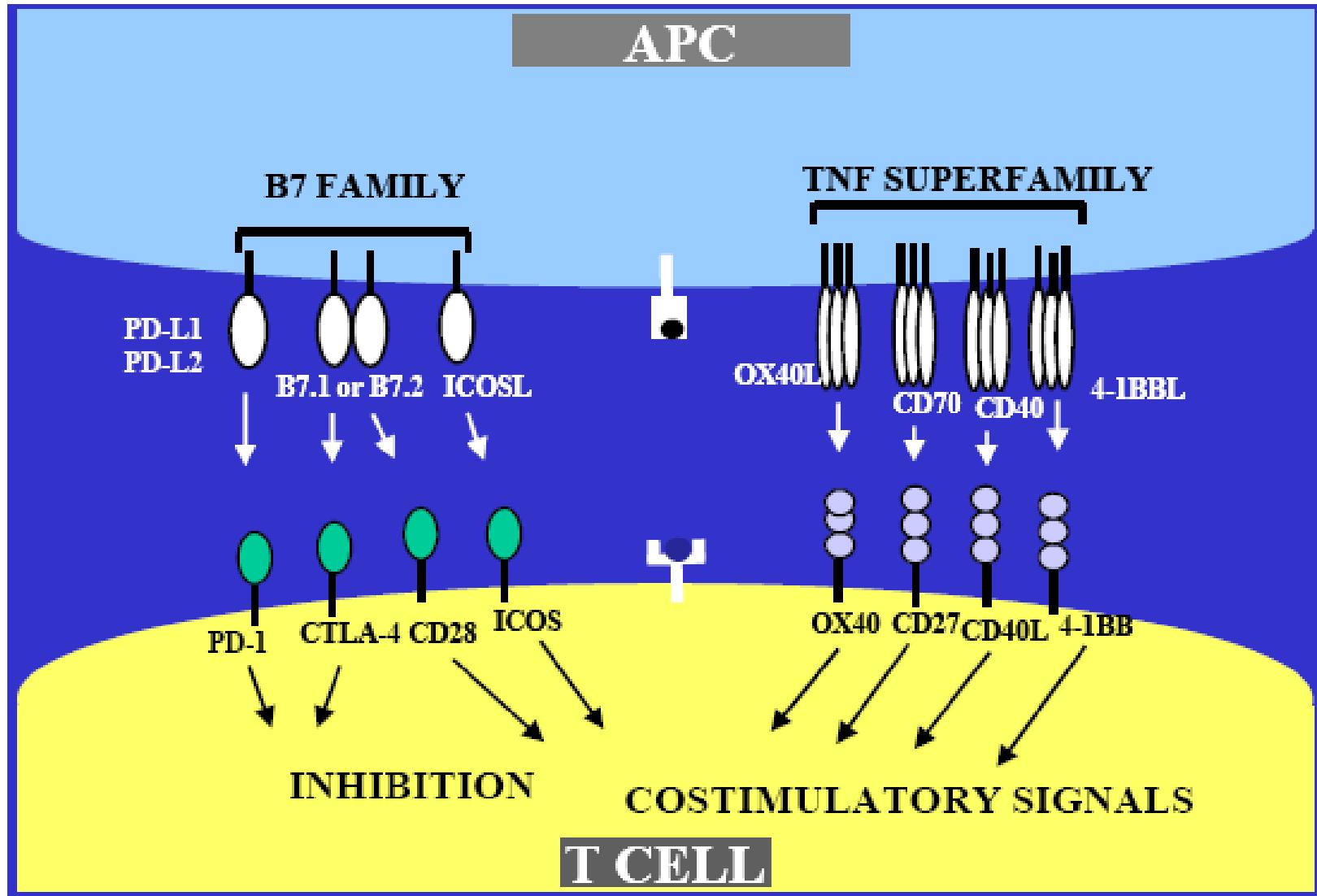




# Εισαγωγή και σκοπός

**Ο σκοπός της νέας μελέτης ήταν να διερευνηθεί σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (ΧΗΒ) εάν η αντιική αγωγή επιδρά σε αυτό το πρότυπο σε συσχέτιση με μία άλλη οδό απόπτωσης που εμπλέκεται στη δυσλειτουργία των δραστικών T-λεμφοκυττάρων, την οδό *PD-1/PD-L1***





# Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice

Jeong M Kim<sup>1</sup>, Jeffrey P Rasmussen<sup>1</sup> & Alexander Y Rudensky<sup>1,2</sup>



Kim et al, *Nature Immunol* 2007;8: 191-197

- CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3 regulatory T Cells protect against T Cell-mediated fulminant hepatitis in a TGF-β-dependent manner in mice Wei et al, 2008
- ▲ In a new mouse model of autoimmune hepatitis (AIH), a concurrent loss of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and PD-1 mediated signaling, induces fatal AIH (Aoki N et al, *Gastroenterology* 2011;140:1322-33)



# Introduction\_ Chronic Liver Diseases and Tregs

- Increased levels of Tregs in the blood of patients with chronic HBV infection  
Stoop et al, 2005
- Accumulation of Tregs in the liver of patients with chronic HBV infection  
Franzese et al, 2005
- Positive correlation between the HBV DNA level and the frequency of Tregs in the blood of chronically infected patients  
Stoop et al, 2007
- Higher frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs in peripheral blood of chronically HCV infected vs healthy/recovered persons  
Sugimoto et al, 2003; Cabrera et al, 2004
- Presence of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T cells in the liver of chronically HCV infected persons  
Scott et al, 2007



# Ασθενείς και μέθοδοι

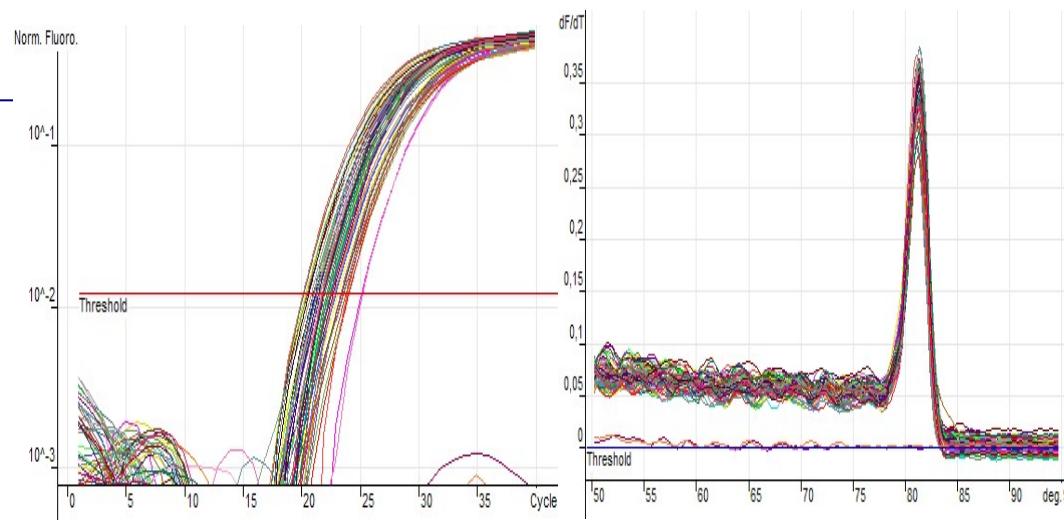
---

Μελετήθηκαν νωπές βιοψίες ήπατος από 62 ασθενείς με XHB:  
[Α/Γ: 39/23, ΜΗ ± ΣΑ (SDEV): 47.6±12.47]

- 33 με XHB στη διάγνωση (18Α/15Γ)
- 7 με XHB μετά αγωγή έτους/υποτροπή (4Α/3Γ)
- 22 με XHB σε διατηρούμενη ύφεση υπό συνεχή αντιική θεραπεία επί 5 έτη (17Α/5Γ)

Ο βαθμός ιστολογικής ενεργότητας (HAI) και η σταδιοποίηση της ίνωσης αναλύθηκαν σε τμήματα βιοψιών σε φορμόλη

## Study Design



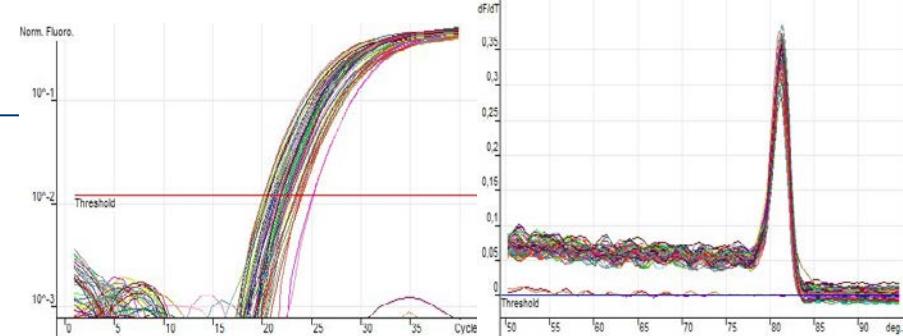
RNA → cDNA → Real Time PCR

Reference gene: b2M

Relative expression analysis:  $\Delta\Delta CT$  method

Livak and Schmittgen, 2001





## *Relative expression analysis of...*

***FOXP3***

Genes associated with Treg function

***Fas/FasL, TRAIL***

Mediators of apoptosis

***Caspase 3***

Effector molecules of apoptosis

***IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$***

Inflammatory cytokines

***IL-10, TGF- $\beta$ 1***

Inducible Tregs

***PD-1/PD-L1***

T-cell exhaustion/dysfunction



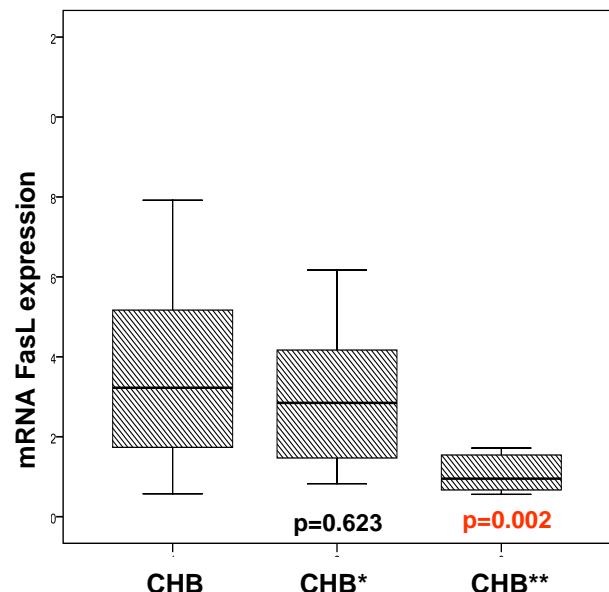
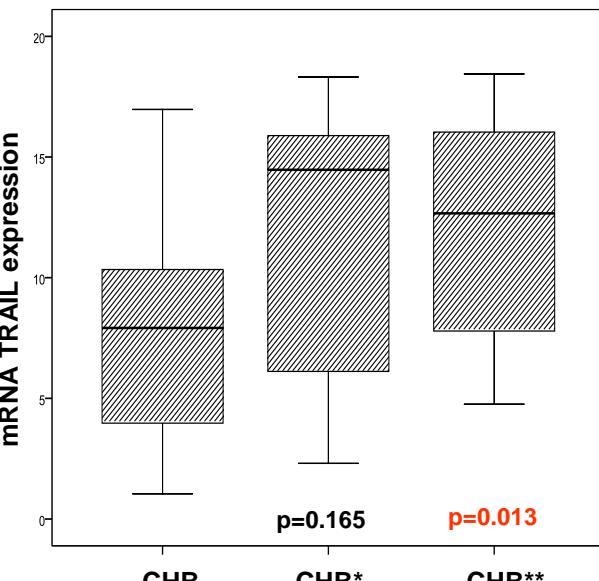
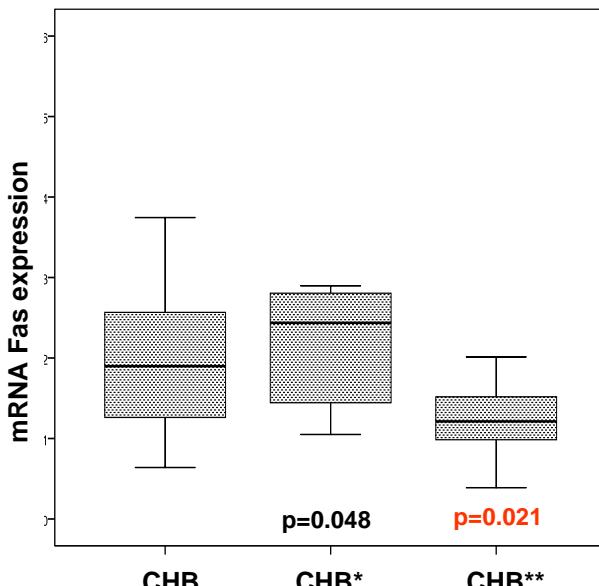
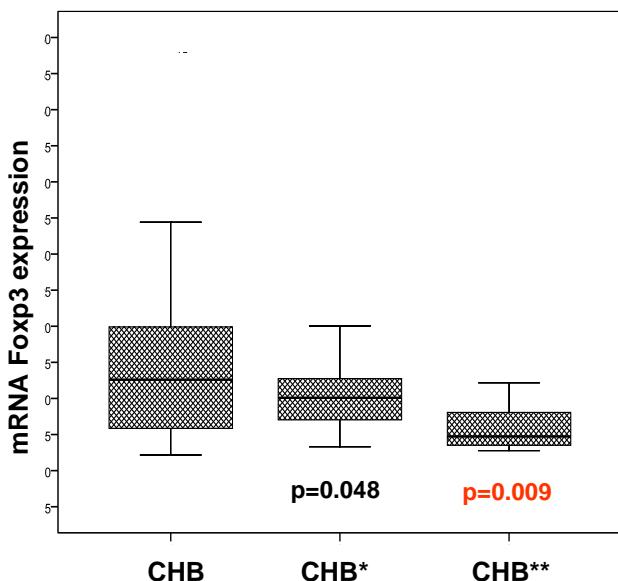
# Results\_ Gene expression in relation to CHB

Mann-Whitney U Test

Gene	Chronic HBV hepatitis				
	Diagnosis (No 33)	Treatment / Relapse (No 7)	Treatment / Remission (No 22)		
	mean±SD	mean±SD	p <sup>a</sup>	mean±SD	p <sup>a</sup>
Foxp3	18.3±19.3	10.43±5.48	0.480	5.87±3.16	<b>0.009</b> ↓
IL-10	0.50±1.09	0.20±0.24	0.202	0.36±0.50	0.765
TGF-β1	0.87±0.75	0.52±0.32	0.187	0.69±0.45	0.543
Fas	1.98±0.84	2.13±0.77	0.480	1.23±0.49	<b>0.021</b> ↓
FasL	3.62±2.01	3.05±1.98	0.623	1.95±2.84	<b>0.002</b> ↓
TRAIL	7.80±4.19	11.3±6.3	0.165	12.±4.67	<b>0.013</b> ↑
IFN-γ	5.95±5.47	4.18±2.46	0.856	4.08±6.47	0.079
IL-1β	0.37±1.12	0.41±0.66	0.741	0.14±0.14	0.192
PD-1					<0.001 ↓
PD-L1					<b>0.031</b> ↓



## Results\_ Gene expression in relation to CHB treatment/remission



CHB\* → chronic hepatitis B after treatment/relapse  
 CHB\*\* → chronic hepatitis B on long term treatment remission

# Αποτελέσματα : Εκφράσεις γονιδίων σε συσχέτιση με την ηπατική φλεγμονή /ίνωση

Θετικές συσχετίσεις βρέθηκαν μεταξύ της ποσοτικής έκφρασης του *Foxp3* με εκείνες των

*Fas* ( $r=.498$ ,  $p<.001$ ) ,

*FasL* ( $r=.479$ ,  $p<.001$ ),

*PD-1* ( $r=.566$   $p<.001$ ) και

*PD-L1* ( $r=.436$ ,  $p=.003$ ), και αρνητική συσχέτιση με αυτή του

*TRAIL* ( $r=-.348$ ,  $p=.013$ )

- Η έκφραση των *Foxp3*, *Fas*, *FasL* *PD-1* και *PD-L1* είχε ισχυρή θετική συσχέτιση με το HAI και τον βαθμό ίνωσης
- Αντίθετα το *TRAIL* είχε αρνητική συσχέτιση με το HAI ( $r=-.423$ ,  $p=.002$ ) και την ίνωση ( $r=-.314$ ,  $p=.026$ )
- Η έκφραση του *PD-1* επίσης συσχετίστηκε με την έκφραση των *Fas* και *FasL* ( $r=.386$ ,  $p=.012$  και  $r=.812$ ,  $p<.001$ )



# Συμπεράσματα

- ✓ Η ελάττωση ηπατικής έκφρασης της οδού *Fas/FasL* στη XHB σε διατηρούμενη ύφεση υπό συνεχή αντιική θεραπεία ,  
συνοδεύεται
- ✓ από ελάττωση των *nTregs (Foxp3)* στον ηπατικό ιστό

Η παράλληλη **ελάττωση** έκφρασης της οδού ***PD-1/PD-L1***, πιθανά αποτελεί έναν επιπρόσθετο μηχανισμό που συμμετέχει στην ύφεση της φλεγμονής (Τ-κυτταρική λειτουργική αποκατάσταση; )



- Speletas M., et al. Foxp3 expression in liver correlates with the degree but not the cause of inflammation

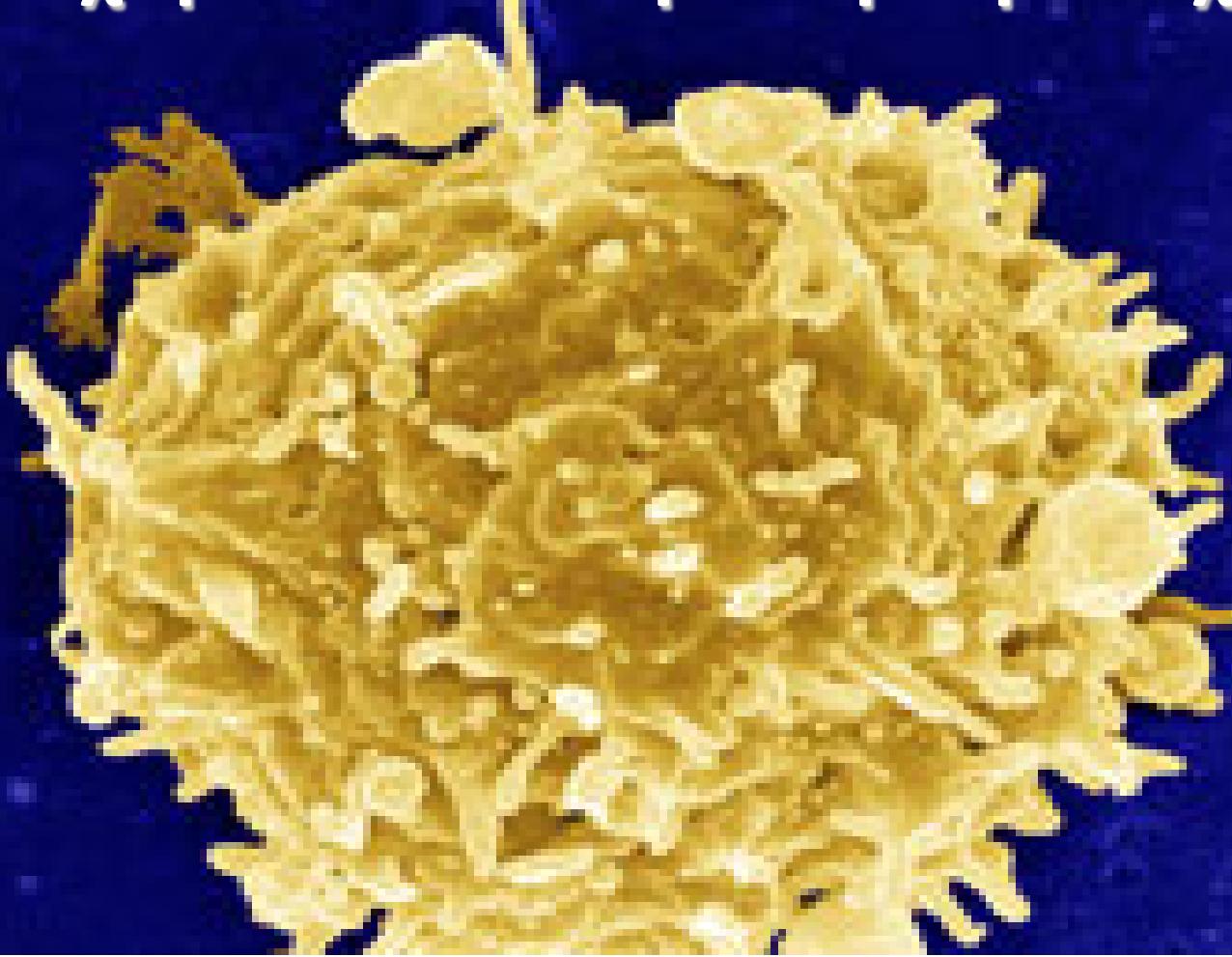
Mediators of Inflammation 2011, ID 827565, 9 pages

(doi: 10.1155/2011/827565)

- Funded by the Hellenic Association for the study of the Liver
- Funded by the Basic Research Programme Herakleitos (2007-13)
- Presented in part: AASLD 2008, EASL 2010
- Analysis of IL 2 , CD4 , CD8 , IFN- $\gamma$  (T-cell restoration) and correlation with liver mRNA PD-1/PD L-1,2 before submitting
  - ▲ Analysis of TGF- $\beta$ 1,2,3 mRNA and SMAD 2,3,4,7 pathway in CHB



# Σας Ευχαριστώ πολύ για την προσοχή σας



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
**ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ**  
επένδυση στην υποτροφία της χνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ  
2007-2013  
πρόγραμμα για την ανάπτυξη  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ