

# FAMILIA CITOKINELOR IL-17 ȘI SUBPOPULAȚIILE LIMFOCITARE THCD4+ (TH1, TH17, TREG) – IMPLICAȚII ÎN PATOLOGIA BOLILOR AUTOIMUNE

*IL-17 family and CD4+ TH cell subsets (TH1, TH17, Treg) –  
roles in autoimmune disease pathogenesis*

Alexandru G. Croitoru, Dan Piperea-Șianu, Carina Mihai, Daniela Bădiță, Cătălin Tilișcan,  
Victoria Aramă, Ștefan Sorin Aramă  
Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București

## Rezumat

Citokinele sunt molecule de tip polipeptidic cu funcții de mesageri intercelulari, având roluri esențiale în reglarea funcțiilor sistemului imunitar. Principalele subtipuri limfocitare eliberează citokine specifice, prin intermediul cărora își îndeplinesc funcțiile caracteristice. Limfocitele T Helper 17 (LTH17) au un rol esențial în controlul patogenilor extracelulari. Studii recente atrag însă atenția asupra contribuției esențiale a acestui subtip limfocitar major în declanșarea și menținerea unor procese inflamatorii cronice. Astfel, în poliartrita reumatoidă (PR) stadiile inițiale ale bolii se caracterizează prin selectarea unui anumit fenotip limfocitar, ce sintetizează interleukina-17A (IL-17A), cu efecte proinflamatorii locale semnificative, astfel încât se constată o relație de proporționalitate directă între expresia IL-17 și distrucția articulară. De asemenea, interacțiunea dintre IL-17 și factorul de necroză tumorală (TNF) poate contribui semnificativ la distrucția tisulară și la persistența sindromului inflamator întâlnite în această afecțiune. Mecanisme similare au fost observate și în cazul spondilitei anchilozante sau artritei psoriazice. Descoperirea implicațiilor fiziopatologice ale IL-17 în patogenia bolilor autoimune a condus la deschiderea unor noi orizonturi de tratament, fiind studiate în prezent noi metode de terapie biologică, cu acțiune directă sau indirectă. Articolul de față sintetizează cele mai recente date referitoare la implicarea LTH17, dar și a limfocitelor T helper 1 (LTH1) și T regulatorii (LTreg) în patogeniza afecțiunilor autoimune.

**Cuvinte cheie:** citokine, limfocite, afecțiuni autoimune

## Abstract

Cytokines are polypeptides functioning as intercellular messengers, with essential roles in the regulation of immune functions. The main lymphocytic subtypes release specific cytokines, by which they are fulfilling a part of their functions. T-17 helper lymphocytes (LTH17) are of utter importance in the control of extracellular pathogens. Recent studies have shown the role of this lymphocytic subset in the onset and maintaining of chronic inflammation. In rheumatoid arthritis (RA), disease initiation is characterised by the selection of a certain lymphocytic phenotype synthesising interleukin 17 A (IL-17A), exerting local proinflammatory effects, demonstrated by the strong association between local IL-17 levels and articular destruction. Furthermore, the interaction between IL-17 and the tumor necrosis factor (TNF) contributes significantly to the damage and persistent inflammation of RA. Similar mechanisms have been demonstrated in ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. The discovery of the pathogenic implications of IL-17 in autoimmune diseases led to new treatment targets, currently several biologic agents aimed at IL-17 being in trial. The present paper is reviewing the most recent data showing the role of IL-17, of LTH17, and also of T helper 1 and T regulatory lymphocytes in the pathogenesis of autoimmune arthritides.

**Keywords:** cytokines, lymphocytes, autoimmune disease

## DATE GENERALE

Citokinele sunt molecule de tip polipeptidic, eliberate de mai multe tipuri de celule, având funcție de

mesageri intercelulari, cu roluri în dezvoltarea, reglarea și exercitarea funcției celulelor imune. Pot avea efect antiinflamator (IL-27, IL-10) sau proinflamator (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL6) (1).

Adresă de corespondență:

Alexandru G. Croitoru, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, Str. Dionisie Lupu nr. 37, București

Familia citokinelor IL-17 reprezintă un grup particular de mediatori intercelulari, recent decoperit, ce se împarte în 6 subtipuri: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E/ IL-25 și IL-17F. Caracteristica principală a subtipurilor este asemănarea din punct de vedere structural, prezentând secvențe de aminoacizi și nuclee cisteinice comune de la o specie la alta, diferențe importante înregistrându-se doar la capătul N-terminal. Dintre acestea, IL-25 prezintă cel mai mare grad de diferențiere, păstrând doar 17% din caracteristicile comune. Pe de altă parte, cele mai asemănătoare din punct de vedere structural (50%) sunt IL-17A și IL-17F, glicoproteine homodimerice disulfidice alcătuite din 155 de aminoacizi (2-5).

Codificarea citokinelor IL-17A și IL-17F are loc la nivelul situsului cromozomial 2q31, de către două gene adiacente, iar secreția lor se realizează, în principal, sub formă homodimerică (IL-17A/A și IL-17F/F). Din punctul de vedere al codificării și secreției sunt importante de menționat două aspecte: (a) poziția adiacentă a celor două gene și sensul opus de transcriere al acestora susțin teoria conform căreia originea acestor citokine implică un proces de duplicare ce poate fi responsabil pentru mecanismele reglatoare similare ale IL-17A și IL-17F, și (b) există posibilitatea eliberării acestor două citokine și sub formă heterodimerică (IL-17A/F), însă cu diminuarea activității biologice (6-8).

Cele mai importante subtipuri din familia IL-17 sunt IL-17A și IL-17F ce îndeplinesc roluri multiple, atât în cadrul imunității înnăscute, cât și în cadrul imunității dobândite, fapt susținut de varietatea de celule producătoare (celule NK, limfocite  $T_{\gamma\delta}$ , limfocite  $T_{NK}$ , celule Paneth și neutrofile). Până de curând, dintre cele două, IL-17A a fost mai intens studiată, cunoscându-se efectele sale proinflamatorii. Exerciță influențe asupra factorilor transcripționali (pe căile NF- $\kappa$ B și MAPK) și conduce la stimularea genelor care codifică alte citokine (IL-6, IL-8) sau chemokine (CXC) (9-14).

## SURSE CELULARE DE IL-17

Interleukinele din familia IL-17 au ca principală sursă limfocitul T, însă pot proveni de la diferite tipuri celulare (neutrofile, limfocite  $T_{\gamma\delta}$ , celule NK, limfocite  $T_{NK}$ , celule Paneth). Mecanismul de secreție este reglat parțial pe căile fosfatidil-inozitol 3 kinazei (PI3K), expresia receptorilor IL-17A fiind stimulată de IL-21 și IL-15, dar inhibată de IL-2 (15).

Ulterior activării limfocitelor T naive (imature) și în relație cu numeroși co-factori secretori (IL-23,

IL-21, IL-15) se dezvoltă o linie limfocitară distinctă  $T_H17$  responsabilă de secreția IL-17A și IL-17F. Deși principala cale de formare este prin limfocitele T, IL-17A are și roluri asemănătoare citokinelor implicate în apărarea imună nespecifică (IL-1, TNF- $\alpha$ ), iar cercetările arată existența unor multiple interacțiuni sinergice între IL-17A și elemente precum IL-22, factorul activator al limfocitelor B (BAFF), limfotoxinele și interferonul  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (13,16).

Surse alternative de producție ale IL-17, excepând limfocitele T CD4+, sunt limfocitele T CD8+ în condițiile stimulării de către sistemul format din factorul de creștere transformator  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-6 și IL-23, și limfocitele  $T_{NK}/T_{\gamma\delta}$  prin stimulare de către IL-23 (17,18).

Linia limfocitară T CD4+ helper are trei posibilități de diferențiere:  $T_H1$ ,  $T_H17$  și  $T_{reg}$ . Subfamilia limfocitară  $T_H17$  este cea mai recent descoperită și responsabilă de producția de IL-17, sub formă de IL-17A și IFN- $\gamma$  sau IL-17A și IL-4 (Fig. 1).

### Limfocitele $T_H1$

Sub influență antigenică, limfocitele T naive se diferențiază în limfocite  $T_H1$ .  $LT_H1$  produc o cantitate mare de IFN- $\gamma$ , fiind responsabile de răspunsul imun celular. IL-12 induce transformarea  $LT_{CD4+}$  în  $LT_H1$  prin intermediul activării familiei factorilor de transcripție STAT4 (Signal Transducers and Activators of Transcription – transductori de semnal și activatori de transcripție). Semnalele IFN- $\gamma$  sunt convertite de STAT1, ce activează factorul de transcripție T-bet, sporind expresia genelor specifice  $LT_H1$  (1).

$LT_H1$  produc IFN- $\gamma$  în cantitate mare. Acesta are rol în activarea celulelor fagocitare de tipul macrofagelor și în producția de anticorpi (opsonizare și fixare a complementului), realizând o protecție împotriva patogenilor intracelulari, bacterii, fungi sau protozoare, dar și în reacțiile de hipersensibilitate imediată și întârziată. Gately *et al* sugerează implicarea  $LT_H1$  în patogenia afecțiunilor autoimune specifice de organ și inflamatorii cronice precum boala Crohn, sarcoidoza sau ateroscleroza (1,19).

### Limfocitele $T_H17$

Subfamilia limfocitară  $T_H17$  reprezintă principală sursă celulară de IL-17 și se formează în urma activării limfocitelor T CD4+ și acțiunii unor factori transcripționali: IRF4 (Interferon Regulatory Factor – factorul reglator al interferonului), receptorul aryl-hidrocarbon (AHR), STAT3, ROR $\alpha$  și ROR $\gamma$ t (retinoic acid receptor-related orphan receptor). Citokinele

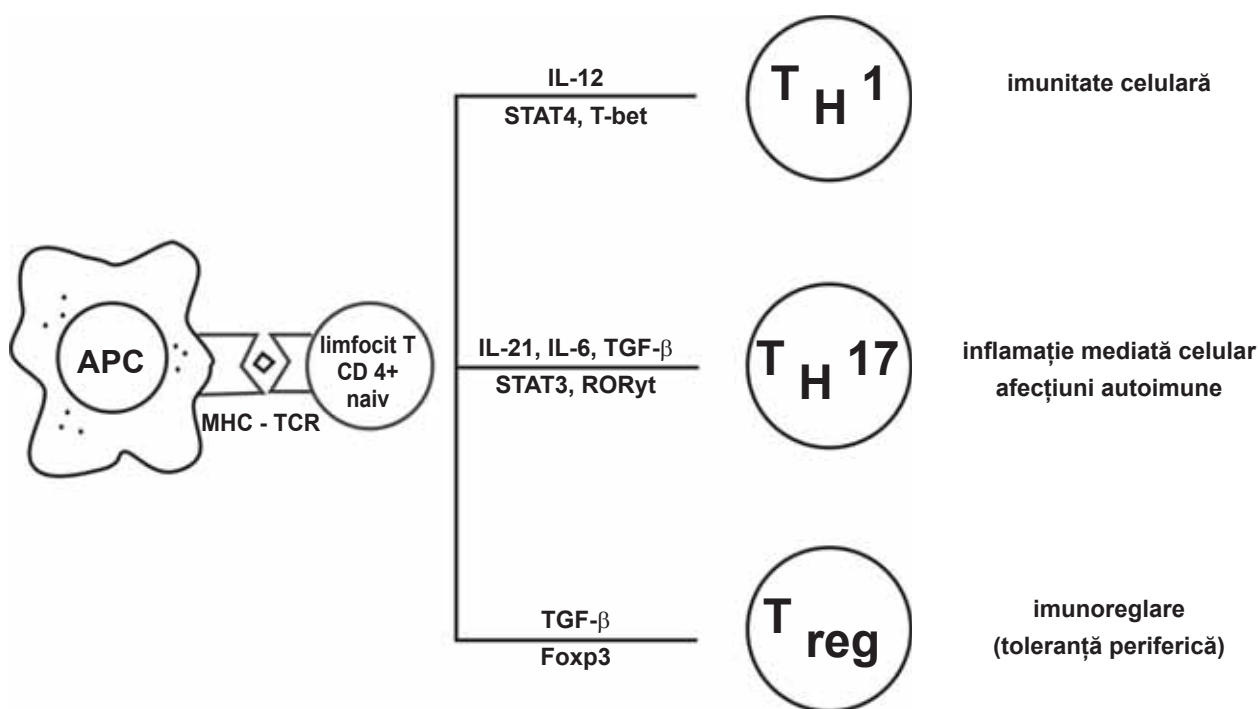


FIGURA 1. Posibilitățile de diferențiere ale liniei celulare limfocitare T CD4+ (după Jiang S) (1)

implicate în procesele de diferențiere ale  $T_H17$  sunt reprezentate de IL-6 și TGF $\beta$ , cu roluri cheie, și de IL-1 $\beta$ , IL-21, IL-23 (1).

Diferențierea celulelor  $LT_H17$  este indusă de TGF $\beta$  și IL-6 sau IL-21 și accelerată de activitatea coordonată a TNF și IL-1. IL-6 activează STAT3 care, în combinație cu TGF $\beta$ , mărește expresia factorilor de transcripție ROR $\alpha$  și ROR $\gamma$ t, ceea ce conduce la apariția  $LT_H17$ . Ulterior este nevoie de IL-23 pentru supraviețuirea, creșterea și realizarea funcției celulare efectorii prin producția de IL-17A, IL-17F, IL-9, IL-21 și IL-22 (20-23).

TGF $\beta$  are rol în diferențierea atât a  $LT_H17$ , cât și a  $LT_{reg}$ . Astfel, IL-6 are o importanță deosebită pentru linia celulară  $T_H17$  întrucât, în lipsa ei, TGF $\beta$  ar promova expresia factorilor de transcripție Foxp3 (Forkhead box protein 3), care inhibă activitatea ROR $\alpha$  și ROR $\gamma$ t și permit limfocitelor T CD4+ să se diferențieze în  $LT_{reg}$  (24,25).

TGF $\beta$  nu are un efect direct asupra  $T_H17$ , dar favorizează indirect diferențierea acestora prin inhibarea expresiei factorilor T-bet, STAT4 și GATA-3, prevenind astfel diferențierea CD4+ naive în  $T_H1$ . Acest fapt este confirmat de DeBeaucoudrey *et al* care, în urma unui studiu, au ajuns la concluzia că pacienții care prezentau mutații ale TGF $\beta$ 1 sau TGF $\beta$ 2 aveau același număr de celule T producătoare de IL-17A în comparație cu lotul martor, însă cei care aveau mutații ale STAT-3 și ale receptorului IL-12 prezentau un deficit de  $LT_H17$  (26-28).

O structură membranară importantă de pe suprafața  $LT_H17$  este glicoproteina CD161. În două studii desfășurate recent, Cosmi *et al* și Kleinschek *et al* au ajuns la rezultate asemănătoare studiind patologiei diferite, și anume că toate limfocitele T CD4+ producătoare de IL-17A erau incluse în fracția de limfocite CD161+ circulante, dar și în fracția de limfocite CD161+ de la nivelul infiltratului inflamator intestinal de la pacienții cu boală Crohn sau cutanat de la cei cu psoriazis (29,30).

#### Limfocitele $T_{reg}$

TGF- $\beta$  este elementul comun în procesul de diferențiere al limfocitelor  $T_H17$  și  $T_{reg}$ . În cazul limfocitelor imunoreglatoare este necesară absența IL-6, situație în care TGF- $\beta$  promovează expresia factorului de transcripție Foxp3, inhibând activitatea ROR $\gamma$ t/ROR $\alpha$  și favorizând dezvoltarea  $T_{reg}$  în detrimentul  $T_H17$ .

$LT_{reg}$  suprimă activitatea limfocitelor efectorie și diminuează efectele autodistructive ale răspunsului imun asupra organismului. Ele co-exprimă markeri membranari, indicatori ai originii lor (CD4 și CD25), alături de factorul de transcripție Foxp3. Pentru expresia Foxp3 este necesară acțiunea citokinelor cu lanț  $\gamma$  comun (IL-2, IL-7 și IL-15). Foxp3 are o importanță deosebită în funcționalitatea  $T_{reg}$ , defectele genetice care afectează structura sa determinând alterări în procesul de diferențiere a liniei celulare imunoreglatoare. Poliendocrino-enteropatia X-linkată

cu componentă imunologică sau bolile inflamatorii genetice recesive X-linkate sunt exemple de fenotipuri caracteristice acestor defecte (31-36).

În funcție de organul de maturare,  $LT_{reg}$  sunt de două tipuri:  $nT_{reg}$  și  $iT_{reg}$ . Limfocitele  $nT_{reg}$  au origine în timus și necesită pentru dezvoltare o co-stimulare TCR-CD28. TCR (T-cell receptors) proprii  $nT_{reg}$  au afinitate maximă pentru antigenele self, ceea ce le conferă rolul principal în suprimarea răspunsului imun la acest tip de stimulare, inhibând proliferarea populațiilor  $T_H1$  și  $T_H17$  patologice. Limfocitele  $iT_{reg}$  au origine în organele limfoide periferice și sunt mai instabile decât  $LnT_{reg}$ . Diferențierea lor este indusă de celulele dendritice CD103+ localizate la nivelul limfonodulilor intestinali și mezenterici. Rolul limfocitelor  $iT_{reg}$  este unul supresor, controlând activarea și funcția  $LT$  reactive la auto-antigene, menținând astfel toleranța periferică (25,31,37-41).

Anderton *et al* menționează că, în cadrul patologiilor autoimune, subfamilia limfocitară T auto-reactivă se caracterizează printr-un prag de activare redus. La pacienții cu poliartrită reumatoidă (PR), datorită modificărilor post-tranșlaționale ale Foxp3, celulele  $CD4^+CD25^{hi}T_{reg}$  se găsesc în număr mare în lichidul sinovial, coexistând cu  $LT_H17$  și  $LT_H1$ , ca mecanism compensator pentru lipsa eficacității lor prin alterarea profundă a funcției. Ele nu au o prezență semnificativă în sânge, ceea ce arată distribuția lor predilectă în zonele afectate. La acești pacienți putem vorbi despre o afectare funcțională importantă, celulele  $T_{reg}$  nefiind apte funcțional, incapabile să suprime celulele T auto-reactive și nici producția citokinelor proinflamatorii de către limfocitele T sau de către monocite (42-45).

Funcția imunosupresivă a  $LT_{reg}$  Foxp3+ este exercitată prin intermediul a trei mecanisme principale: (a) inhibarea producției de limfocite T efectoare prin contact direct intercelular sau prin intermediul unor mediatori (IL-10, IL-35 sau galectin-1); (b) citoliza limfocitelor T efectoare în exces prin intermediul granzimei A sau B; și (c) influența asupra celulelor prezentatoare de antigen (APC), catalitic prin intermediul CD39 asupra ATP-ului extracelular, sau inhibând receptorii CD80/86 ai APC (46-50).

## ROLUL $LT_H17$ ÎN PATOLOGIA AUTOIMUNĂ

În afara rolului protectiv prin controlul patogenilor extracelulari, un rol major a  $LT_H17$  este contribuția la declanșarea și menținerea proceselor inflamatorii cronice. În patologia bolilor inflamatorii și autoimune, rolul  $T_H17$  a fost studiat experimental folo-

sind animale de laborator ce prezentau una dintre următoarele afecțiuni: encefalomielită autoimună experimentală (EAE), artrită colagenică indusă (CIA), boli inflamatorii intestinale (IBD) sau uveită autoimună.

Kroenke *et al*, într-un studiu pe șoareci cu encefalomielita experimentală, menționează rolul patogen al  $LT_H17$  în EAE cu infiltrat granulocitar, și al  $LT_H1$  în EAE cu infiltrat celular mononuclear (51).

În trecut,  $LT_H17$  și  $LT_H1$  se credeau a fi implicate, practic, în toate afecțiunile inflamatorii cronice. Recent, în urma unor studii pe șoareci, a apărut ideea că  $LT_H17$  au rol patologic, în timp ce  $LT_H1$  au rol protector. Divergența mare dintre cele două teorii a necesitat concentrarea cercetărilor în acest sens.

În încercarea de a determina relații de cauzalitate între diferitele familii limfocitare, interleukine și afecțiuni sistemice, s-au realizat studii pe animale transgenice. Rezultatele au arătat capacitatea  $LT_H17$  ca, în anumite condiții, să se transforme în  $LT_H1$ . Bending *et al* arată că, în urma inoculării de  $LT_H17$  nesecretoare de IFN- $\gamma$  de la șoareci BDC2.5NOD la șoareci NOD/SCD, acestea au suferit un proces de transformare, de la forma  $LT_H17$  nesecretoare de IFN- $\gamma$  la  $LT_H1$ , secretoare de interferon. Martin-Orozco *et al* confirmă ipoteza potrivit căreia  $LT_H17$  pot induce un sindrom inflamator pancreatic, însă declanșarea diabetului zaharat tip1 la șoarecii limfocitopenici are loc doar după transformarea lor în  $LT_H1$ . Bending *et al*, în studiul menționat anterior, a folosit rezultatele lui Martin-Orozco, arătând eficiența terapiei anti-IFN- $\gamma$  în prevenirea apariției DZ tip 1, dar nu și a Ac anti-IL-17A specifici (52,53).

Capacitatea  $LT_H17$  de a se transforma în anumite condiții în  $LT_H1$  este un aspect important în patogenia afecțiunilor autoimune și inflamatorii cronice (1).

Annunziato *et al* susțin existența permanentă a unei fracții limfocitare T care poate secreta atât IL-17A, cât și IFN- $\gamma$ , aceste celule fiind numite limfocite  $T_H17/T_H1$ . Același studiu arată asemănările dintre  $T_H17$  și  $T_H17/T_H1$  (expresia RORc, T-bet, prezența markerilor IL-23R, CCR6, CD161) și, în urma unor experimente desfășurate pe culturi *in vitro*, se arată că  $LT_H17$  devin secretoare de IFN- $\gamma$  (suplimentar producției de IL-17) în urma stimulării IL-12. Acest efect se datorează creșterii expresiei T-bet și diminuării RORc (28).

Tot experimental, Lee *et al* au putut obține din limfocite T CD4+ toate cele trei variante  $T_H17$ ,  $T_H1$  și  $T_H17/T_H1$ , folosindu-se o combinație de IL-1 $\beta$  și IL-23. Acest aspect explică eficacitatea tratamentului



cu **Ustekinumab** (anticorp monoclonal uman ce se leagă de sub-unitatea P40 comună pentru IL-12 și IL-23) la pacienții cu psoriazis (54).

În concluzie, variabilitatea morfo-funcțională a  $LT_H17$  observată la oameni este confirmată și susține teoria rolul patogenetic al derivărilor  $LT_H17$  în bolile autoimune și în afecțiunile inflamatorii cronice (1,28).

### **Poliartrita reumatoidă**

PR este o afecțiune inflamatorie cronică distructivă ce afectează sinoviala, cartilajul și osul articular, afecțiune ce persistă consecutiv producției de metaloproteinaze și de citokine proinflamatorii. Stadiile inițiale ale bolii se caracterizează prin activarea și migrarea LT împreună cu dezvoltarea unui fenotip limfocitar proinflamator. IL-17A, o citokină proinflamatorie importantă în patogenia PR, este produsă de tipuri limfocitare localizate în lichidul și infiltratul inflamator sinovial:  $LT_H1$  și  $LT_H17$  (55). Înainte de descoperirea subtipului limfocitar  $LT_H17$  se credea că singurul tip limfocitar  $LT_H$  implicat este  $LT_H1$ , însă în prezent nu este clar dacă patogenia PR este dominată de  $LT_H1$  sau  $LT_H17$  (56,57).

Datele din literatura de specialitate nu sunt concludente. Aarvak *et al* (1999) menționează prezența predominantă a  $LT_H1$ , însă rezultatele trebuie privite cu circumspecție referitor la relația  $LT_H1$ - $LT_H17$ -PR, dată fiind vechimea studiului și cunoștințele reduse referitoare la  $LT_H17$  la acea vreme (55).

Colin *et al* și Van Hamburg *et al* au arătat prezența unui număr mare de  $LT_H17$  în cadrul PBMC (celule mononucleare din sângele periferic) la pacienții cu PR netratată, însă datele actuale furnizează proporții variabile ale  $LT_H17$  în PBMC și SFMC (celule mononucleare din lichidul sinovial). Yamada *et al* menționează o proporție similară a  $LT_H17$  la nivelul SFMC comparativ cu circulația periferică la aceiași pacienți cu PR, în timp ce  $LT_H1$  predominau la nivelul articulațiilor în detrimentul PBMC. De asemenea, proporția  $LT_H17$  nu a fost crescută la acești pacienți și nu s-a corelat cu scorul DAS28 de activitate a bolii (58-60).

Deși există numeroase tipuri celulare care produc IL-17 (neutrofile, limfocite  $T_{\gamma\delta}$ , limfocite  $T_{NK}$ ), momentan, pentru patologia PR cel mai important rămâne  $LT_H17$ . Acestea exprimă pe suprafață ligandul RANKL (Receptor Activator Nk  $\beta$  – Ligand) ce le permite interacțiunea cu alte tipuri celulare (din cadrul liniei albe leucocitare sau celule specifice de la nivel articular) (61).

Atât studiile mai vechi, cât și cele recente, arată rolul LT și al citokinelor IL-17-A și TNF- $\alpha$  în activarea fibroblaștilor sinoviali în PR (RASf), cu producție de mediatori ai inflamației articulare (IL-6, IL-8), însă subtipurile celulare T implicate nu au fost încă descoperite. De asemenea, se cunoaște că IL-17A declanșează un feedback pozitiv al ciclului semnalizator al IL-6 pentru fibroblaști în cadrul artritelor experimentale studiate pe șoareci, însă rolul  $LT_H17$  umane în cadrul acestui mecanism nu este cunoscut (62-64).

La pacienții cu PR netratată se pot identifica, în cadrul populației celulare mononucleare din circulația periferică,  $LT_H17$  producătoare de IL-17A și TNF- $\alpha$ . Aceste tipuri celulare au fost examinate prin culturi celulare împreună cu RASf din PR incipientă, observându-se că  $LT_H17$  CCR+ sunt producătoare puternice de IL-6 și IL-8, inducând producția de metalo-proteinaze matriceale (MMP) MMP1 și MMP3 de către RASf. De asemenea, producția de IL-17A a fost crescută în rândul culturilor ce asociau  $LT_H17$ -RASf, indicând apariția unei secvențe repetitive proinflamatorii. Van Hamburg *et al* au studiat posibilitatea apariției unei secvențe repetitive între  $LT_H17$  și RASf, ca mecanism responsabil de caracterul trenant al artritelor. Aceștia au ajuns la concluzia că, pentru obținerea unei supresii optime, este nevoie de inhibarea simultană a IL-17A și TNF, rezultatele cele mai bune obținându-se asupra nivelurilor MMP1 și MMP3, care se reduc mult. Astfel, se confirmă potențialul patogen al  $LT_H17$  în PR, iar studiile clinice desfășurate în prezent arată rezultate promițătoare referitoare la utilizarea terapiei anti-IL-17A în tratamentul pacienților cu PR (1,59).

### **Spondilartritele**

Este demonstrat faptul că pacienții cu spondilartrite prezintă și inflamație subclinică persistentă la nivel intestinal. Ciccia *et al* justifică acest fenomen printr-o transcripție intensă a subunității p19 a IL-23 în porțiunea terminală a ileonului la pacienții cu spondilită anchilozantă (SA) și cu boală Crohn (BC). De asemenea, IL-23 de la acest nivel este produsă preponderent de celulele monocit-like din mucoasa inflamată și de celulele Paneth, la pacienții cu SA și BC. Takahashi *et al* menționează posibilitatea celulelor Paneth de a produce IL-17A după stimulare cu TNF- $\alpha$  la șoareci, iar Ciccia afirmă că, la pacienții cu SA, spre deosebire de cei cu BC, IL-23 nu este influențată de IL-17 sau de interleukinele inductoare ale

acesteia (IL-6, IL-1 $\beta$ ). Astfel, inflamația subclinică intestinală în SA are la bază supraproducția de IL-23, nu de IL-17 (12,65).

Comparativ între cele două patologii, Singh *et al* menționează niveluri crescute ale IL-17A, IL-6, TGF- $\beta$  și IFN- $\gamma$  la pacienții cu spondilartropatii nediferențiate în comparație cu PR, sugerând rolul inflamator major al LT<sub>H</sub>1 și LT<sub>H</sub>17 în spondilartropatii. De asemenea, Jandus *et al* au obținut un număr mare de LT<sub>H</sub>17 circulante în sângele periferic la pacienții cu SA, dar nu și la cei cu PR (66,67).

Aceste studii sugerează că limfocitele T producătoare la IL-17 contribuie în patogenia diferitelor artrite cronice și că stadiul de evoluție și locul de manifestare este important pentru rolul acestor limfocite în patologia autoimună (1).

## IL-17 – CONTRIBUȚII ÎN PATOGENIA POLIARTRITEI REUMATOIDE

Descoperirea IL-17 este strâns legată de PR, lichidul sinovial al articulațiilor afectate fiind prima sursă de LT producătoare de IL-17. IL-17A este reprezentantul principal al familiei IL-17 care cuprinde subtipuri A-F. Este bine cunoscut faptul că IL-17F are o activitate biologică redusă în raport cu IL-17A, inducând expresia a doar 27 de gene (niciuna specifică pentru IL-17F), spre deosebire de IL-17A care influențează 165 de gene. Cu toate acestea, s-a demonstrat experimental că TNF potențează acțiunea IL-17F asupra sinoviocitelor, într-o măsură asemănătoare cu IL-17A (1,68).

Studiile pe piese de biopsie de la nivel articular au arătat titruri mari de IL-17A și IL-17F la nivelul sinovialelor și osului articular la pacienții cu PR, asociate cu valori serice mai mici. Kirkham *et al* au arătat că nivelul crescut al IL-17 articular se asociază cu progresia rapidă și severitatea crescută a bolii, existând o relație de proporționalitate directă între expresia IL-17 și distrucția articulară (69,70).

IL-17 are capacitatea de a induce secreția de IL-8, responsabilă de chemotactismul neutrofilelor la nivelul diferitelor focare inflamatorii. Astfel, IL-17 are rol în mecanismele de apărare imediate ale organismului, prin chemotactism și maturare asupra neutrofilelor, iar în cazul PR, prin creșterea duratei de viață a neutrofilelor, contribuie la caracterul trenant al bolii. De asemenea, este important de precizat că influența chemotactică nu este uniformă la nivel articular, numărul de neutrofile fiind mai mare în lichidul sinovial decât în membrana sinovială (71,72).

Studiile pe cobai cu artrită colagenică indusă (model pentru PR umană) confirmă că IL-17 contribuie la procesele inflamatorii responsabile de distrucția articulară. Administrarea repetată de IL-17 în genunchiul de șoarece determină distrucții importante prin: chemotactism leucocitar (neutrofile), degradare condrală și eroziune osoasă. De asemenea, o singură inoculare de IL-17 este suficientă pentru a induce modificări degenerative incipiente la nivel articular. În afară de inflamația sinovială și resorbția osoasă, IL-17 este implicată și în patogenia bolii parodontale și slăbirea protezelor articulare (69,73-77).

În ceea ce privește rolul IL-17 în funcție de stadiul de evoluție al bolii, Koenders *et al* menționează că, în artrita colagenică indusă, IL-17 este dependentă de TNF în fazele incipiente ale bolii, urmând ca ulterior afecțiunea să fie TNF independentă, susținută doar de activitatea IL-17 (73,78).

Prin studierea receptorului IL-17RA s-a aflat că, în PR, IL-17 contribuie la caracterul trenant al procesului inflamator prin reducerea receptivității celulare. Astfel, la cobaii transgenici cu lipsa IL-17RA, s-au putut înregistra un infiltrat sinovial redus și o formă mai ușoară de boală, asociate cu o activitate apoptotică normală la nivel articular (1).

## TERAPIA BIOLOGICĂ ANTI-IL17

Descoperirea rolului IL-17 în patogenia bolilor autoimune a condus la orientarea cercetărilor în sensul studierii terapiei de blocarea mecanismelor pro-inflamatorii ale IL-17. Terapia biologică poate acționa direct sau indirect.

### *Terapii biologice cu acțiune directă*

Modalitățile directe prin care se pot preveni efectele biologice ale IL-17 sunt: (a) blocarea IL-17 și (b) blocarea receptorului specific. Cercetările în acest sens utilizează anticorpi monoclonali împotriva IL-17A, IL-17F, IL-17RA și IL-17RC. Schemele terapeutice urmărite constau în folosirea inhibitorilor de interleukină și a receptorilor, separat, cât și în asociere (1).

Studiile clinice desfășurate până în prezent indică rezultate promițătoare, în sensul că administrarea de Ac anti-IL-17 este însoțită de diminuarea afectării cutanate în psoriazis, dar și de ameliorarea manifestărilor în PR. În ceea ce privește efectele secundare, studiile arată o toleranță bună a terapiei, fără apariția unor reacții adverse importante (79).

### Terapii biologice cu acțiune indirectă

Modalitățile indirecte prin care se pot preveni efectele biologice ale IL-17 constau în blocarea mecanismelor răspunsului imun premergător. Astfel, de interes în acest caz sunt terapiile orientate asupra IL-21, IL-22, IL-23. IL-23 este o citokină responsabilă de diferențierea LT<sub>H</sub>17, intervenind astfel în răspunsul imun, înaintea IL-17. În prezent se testează anticorpi monoclonali împotriva secvenței p40 comune IL-23 și IL-12, care, conform lui Mannon *et al* sunt eficienți în psoriazis, boala Crohn, dar mai puțin în PR. Alte terapii netestate încă se referă la inhibitori specifici de IL-23, dar și de IL-21 și IL-22 (80).

### CONCLUZII

De la descoperirea lor, LT<sub>H</sub>17 și IL-17 au fost asociate cu bolile autoimune, în special cu PR. Stu-

diile din ultimii ani au încercat să aducă date noi cu privire la asocierea dintre cele trei și la mecanismele etiopatogenice prin care IL-17 este implicată în autoimunitate. Importanță mare o are interacțiunea dintre IL-17 și TNF care conduce la distrucția articulară și la persistența sindromului inflamator. În afară de PR, același mecanism este valabil și pentru SA sau artrita psoriazică. Literatura de specialitate este încă săracă în date despre LT<sub>H</sub>17, LT<sub>H</sub>1, LT<sub>reg</sub> și familia IL-17, astfel că sunt necesare studii suplimentare care să aducă informații și să stabilească conexiuni noi. Totuși, informațiile actuale au condus la dezvoltarea de terapii biologice eficiente, după studii clinice preliminare.

### BIBLIOGRAFIE

- Jiang S. TH17 Cells in Health and Disease, 2011, Springer, ISBN:978-1-4419-9370-0.
- Lee J., Ho W.H., Maruoka M. et al. IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1, *The Journal of biological chemistry*, 2011; 276:1660-1664.
- Hymowitz S.G., Filvaroff E.H., Yin J.P. et al. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding, *The EMBO journal*, 2011; 20:5332-5341.
- Starnes T., Broxmeyer H.E., Robertson M.J. et al. Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis, *Journal of immunology*, 2002; 169:642-646.
- Starnes T., Robertson M.J., Sledge G. et al. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production, *Journal of immunology*, 2001; 167:4137-4140.
- Chang S.H., Dong C. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory response, *Cell research*, 2007; 17:435-440.
- Liang S.C., Long A.J., Bennett F. et al. An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment, *Journal of immunology*, 2007; 179:7791-7799.
- Wright J.F., Guo Y., Quazi A. et al. Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells, *The Journal of biological chemistry*, 2007; 282:13447-13455.
- Li L., Huang L., Vergis A.L. et al. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury, *The Journal of clinical investigation*, 2010; 120:331-342.
- Lockhart E., Green A.M., Flynn J.L. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection, *Journal of immunology*, 2006; 177:4662-4669.
- Michel M.L., Keller A.C., Paget C. et al. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia, *The Journal of experimental medicine*, 2007; 204:995-1001.
- Takahashi N., Vanlaere I., de Rycke R. et al. IL-17 produced by Paneth cells drives TNF-induced shock, *The Journal of experimental medicine*, 2008; 205:1755-1761.
- Gaffen S.L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family, *Nature reviews. Immunology*, 2009; 9:556-567.
- Shen F., Gaffen S.L. Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy, *Cytokine*, 2008; 41:92-104.
- Lindemann M.J., Hu Z., Benczik M. et al. Differential regulation of the IL-17 receptor by gammac cytokines: inhibitory signaling by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway, *The Journal of biological chemistry*, 2008; 283:14100-14108.
- Yu J.J., Gaffen S.L. Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity, *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 2008; 13:170-177.
- He D., Wu L., Kim H.K. et al. CD8+ IL-17 producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses, *Journal of immunology*, 2006; 177: 6852-6858.
- Stumhofer J.S., Laurence A., Wilson E.H. et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system, *Nature immunology*, 2006; 7:937-945.
- Gately M.K., Renzetti L.M., Magram J. et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses, *Annual review of immunology*, 1998; 16:495-521.
- Ivanov I.I., McKenzie B.S., Zhou L. et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells, *Cell*, 2006; 126:1121-1133.
- Yang X.O., Panopoulos A.D., Nurieva R. et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells, *The Journal of biological chemistry*, 2007; 282:9358-9363.
- Liu X., Lee Y.S., Yu C.R. et al. Loss of STAT3 in CD4+ T cells prevents development of experimental autoimmune diseases, *Journal of immunology*, 2008; 180:6070-6076.
- Serada S., Fujimoto M., Mihara M. et al. IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis, *Proceedings of the*



- National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008; 105:9041-9046.
24. Bettelli E., Carrier Y., Gao W. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells, *Nature*, 2006; 441:235-238.
  25. Zhou L., Lopes J.E., Chong M.M. et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function, *Nature*, 2008; 453:236-240.
  26. De Beaucoudrey L., Puel A., Filipe-Santos O. et al. Mutations in STAT3 and IL12RB1 impair the development of human IL-17-producing T cells, *The Journal of experimental medicine*, 2008; 205:1543-1550.
  27. Santarlasci V., Maggi L., Capone M. et al. TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells, *European journal of immunology*, 2009; 39:207-215.
  28. Annunziato F., Romagnani S. Do studies in humans better depict Th17 cells?, *Blood*, 2009; 114:2213-2219.
  29. Cosmi L., De Palma R., Santarlasci V. et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor, *The Journal of experimental medicine*, 2008; 205:1903-1916.
  30. Kleinschek M.A., Boniface K., Sadekova S. et al. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation, *The Journal of experimental medicine*, 2009; 206:525-534.
  31. Curotto de Lafaille M.A., Lafaille J.J. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?, *Immunity*, 2009; 30:626-635.
  32. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses, *Annual review of immunology*, 2004; 22:531-562.
  33. Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells, *Nature immunology*, 2003; 4:330-336.
  34. Khattri R., Cox T., Yasayko S.A. et al. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells, *Nature immunology*, 2003; 4:337-342.
  35. Bayer A.L., Lee J.Y., de la Barrera A. et al. A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells, *Journal of immunology*, 2008; 181:225-234.
  36. Soper D.M., Kasproicz D.J., Ziegler S.F. IL-2Rbeta links IL-2R signaling with Foxp3 expression, *European journal of immunology*, 2007; 37:1817-1826.
  37. Yang X.O., Nurieva R., Martinez G.J. et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs, *Immunity*, 2008; 29:44-56.
  38. Yang L., Anderson D.E., Baecher-Allan C. et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells, *Nature*, 2008; 454:350-352.
  39. Coombes J.L., Siddiqui K.R., Arancibia-Carcamo C.V. et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism, *The Journal of experimental medicine*, 2007; 204:1757-1764.
  40. Sun C.M., Hall J., Blank R. et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid, *Journal of experimental medicine*, 2007; 204:1775-1785.
  41. Huter E.N., Punksosy G.A., Glass D.D. et al. TGF-beta-induced Foxp3+ regulatory T cells rescue scurfy mice, *European journal of immunology*, 2008; 38:1814-1821.
  42. Anderton S.M. Avoiding autoimmune disease-T cells know their limits, *Trends in immunology*, 2006; 27:208-214.
  43. Sarkar S., Fox D.A. Regulatory T cell defects in rheumatoid arthritis, *Arthritis and rheumatism*, 2007; 56:710-713.
  44. Valencia X., Stephens G., Goldbach-Mansky R. et al. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells, *Blood*, 2006; 108:253-261.
  45. Chen X., Fang L., Song S. et al. Thymic regulation of autoimmune disease by accelerated differentiation of Foxp3+ regulatory T cells through IL-7 signaling pathway, *Journal of immunology*, 2009; 183:6135-6144.
  46. Collison L.W., Workman C.J., Kuo T.T. et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function, *Nature*, 2007; 450:566-569.
  47. Garin M.I., Chu C.C., Golshayan D. et al. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells, *Blood*, 2007; 109:2058-2065.
  48. Grossman W.J., Verbsky J.W., Barchet W. et al. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death, *Immunity*, 2004; 21:589-601.
  49. Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P. et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function, *Science*, 2008; 322:271-275.
  50. Borsellino G., Kleiweiefeld M., Di Mitri D. et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression, *Blood*, 2007; 110:1225-1232.
  51. Kroenke M.A., Carlson T.J., Andjelkovic A.V. et al. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition, *The Journal of experimental medicine*, 2008; 205:1535-15341.
  52. Bending D., De la Peña H., Veldhoen M. et al. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice, *The Journal of clinical investigation*, 2009; 119:565-572.
  53. Martin-Orozco N., Chung Y., Chang S.H. et al. Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells, *European journal of immunology*, 2009; 39:216-224.
  54. Lee Y.K., Turner H., Maynard C.L. et al. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage, *Immunity*, 2009; 30:92-107.
  55. Aarvak T., Chabaud M., Källberg E. et al. Change in the Th1/Th2 phenotype of memory T-cell clones from rheumatoid arthritis synovium, *Scandinavian Journal of Immunology*, 1999; 50:1-9.
  56. Firestein G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis, *Nature*, 2003; 423:356-361.
  57. Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis?, *Cytokine*, 2008; 41:84-91.
  58. Colin E.M., Asmawidjaja P.S., van Hamburg J.P. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates Th17 polarization and interleukin-22 expression by memory T cells from patients with early rheumatoid arthritis, *Arthritis and rheumatism*, 2010; 62:132-142.
  59. van Hamburg J.P., Asmawidjaja P.S., Davelaar N. et al. Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production, *Arthritis and rheumatism*, 2011; 63:73-83.
  60. Yamada H., Nakashima Y., Okazaki K. et al. Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis, *Annals of the rheumatic diseases*, 2008; 67:1299-1304.
  61. Hueber A.J., Asquith D.L., Miller A.M. et al. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium, *Journal of immunology*, 2010; 184:3336-3340.
  62. Parsonage G., Filer A., Bik M. et al. Prolonged, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent, neutrophil survival following rheumatoid synovial fibroblast activation by IL-17 and TNFalpha, *Arthritis Research & Therapy*, 2008; 10: R47.
  63. Tran C.N., Lundy S.K., White P.T. et al. Molecular interactions between T cells and fibroblast-like synoviocytes: role of membrane tumor necrosis factor-alpha on cytokine-activated T cells, *The American journal of pathology*, 2007; 171:1588-1598.
  64. McInnes I.B., Leung B.P., Liew F.Y. Cell-cell interactions in synovitis. Interactions between T lymphocytes and synovial cells, *Arthritis research*, 2000; 2:374-378.
  65. Ciccia F., Bombardieri M., Principato A. et al. Overexpression of interleukin-23, but not interleukin-17, as an immunologic signature of subclinical intestinal inflammation in ankylosing spondylitis, *Arthritis and rheumatism*, 2009; 60:955-965.
  66. Singh R., Aggarwal A., Misra R. Th1/Th17 cytokine profiles in patients with reactive arthritis/undifferentiated spondyloarthritis, *The Journal of rheumatology*, 2007; 34:2285-2290.
  67. Jandus C., Bioley G., Rivals J.P. et al. Increased numbers of circulating polyfunctional Th17 memory cells in patients with seronegative spondylarthritides, *Arthritis and rheumatism*, 2008; 58:2307-2317.
  68. Zrioual S., Toh M.L., Tournadre A. et al. IL-17RA and IL-17RC receptors are essential for IL-17A-induced ELR+ CXC chemokine



- expression in synoviocytes and are overexpressed in rheumatoid blood, *Journal of immunology*, 2008; 180:655-663.
69. **Sato K., Suematsu A., Okamoto K. et al.** Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction, *The Journal of experimental medicine*, 2006; 203:2673-2682.
70. **Kirkham B.W., Lassere M.N., Edmonds J.P. et al.** Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort), *Arthritis and rheumatism*, 2006; 54:1122-1131.
71. **Fossiez F., Djossou O., Chomarat P. et al.** T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines, *The Journal of experimental medicine*, 1996; 183:2593-2603.
72. **Turrel-Davin F., Tournadre A., Pachot A. et al.** FoxO3a involved in neutrophil and T cell survival is overexpressed in rheumatoid blood and synovial tissue, *Annals of the rheumatic diseases*, 2010; 69:755-760.
73. **Koenders M.I., Joosten L.A., van den Berg W.B.** Potential new targets in arthritis therapy: interleukin (IL)-17 and its relation to tumour necrosis factor and IL-1 in experimental arthritis, *Annals of the rheumatic diseases*, 2006; 65:29-33.
74. **Melis L., Vandooren B., Kruihof E. et al.** Systemic levels of IL-23 are strongly associated with disease activity in rheumatoid arthritis but not spondyloarthritis, *Annals of the rheumatic diseases*, 2010; 69:618-623.
75. **Chabaud M., Lubberts E., Miossec P. et al.** IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis, *Arthritis research*, 2001; 3:168-177.
76. **Lubberts E., Joosten L.A., van de Loo F.A. et al.** Overexpression of IL-17 in the knee joint of collagen type II immunized mice promotes collagen arthritis and aggravates joint destruction, *Inflammation research*, 2002; 51:102-104.
77. **Oda T., Yoshie H., Yamazaki K.** Porphyromonas gingivalis antigen preferentially stimulates T cells to express IL-17 but not receptor activator of NF-kappaB ligand in vitro, *Oral microbiology and immunology*, 2003; 18:30-36.
78. **Koenders M.I., Lubberts E., van de Loo F.A. et al.** Interleukin-17 acts independently of TNF-alpha under arthritic conditions, *Journal of immunology*, 2006; 176:6262-6269.
79. **Genovese M.C., Van den Bosch F., Roberson S.A. et al.** LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study, *Arthritis and rheumatism*, 2010; 62:929-939.
80. **Mannon P.J., Fuss I.J., Mayer L. et al.** Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease, *The New England journal of medicine*, 2004; 351:2069-2079.