

PATOFIZIOLOŠKI MEHANIZMI U NASTANKU I LIJEČENJU ALERGIJSKIH BOLESTI

BRANKO PEVEC, MIRA RADULOVIĆ PEVEC,
ASJA STIPIĆ MARKOVIĆ i IRENA BATIŠTA¹

*Odjel za kliničku imunologiju, pulmologiju i reumatologiju i ¹Imunološki laboratorij,
Klinička bolnica "Sveti Duh", Zagreb, Hrvatska*

Zašto izloženost bezazlenim i široko rasprostranjenim tvarima iz okoliša u nekih osoba izaziva neprimjereno jake reakcije imunološkog sustava klinički prepoznatljive kao alergijske bolesti te na koji način ponavljana izloženost istim tim tvarima u obliku specifične imunoterapije preusmjerava imunološku reaktivnost, za sada su samo djelomično razjašnjena pitanja. Zbivanja tijekom alergijskog upalnog odgovora relativno su dobro poznata, kao i glavni mehanizmi kojima specifična imunoterapija, kao jedina uzročna metoda liječenja, mijenja taj odgovor. Ipak, svakodnevne nove spoznaje dopunjavaju slagalicu i naše razumijevanje ovih složenih zbivanja. Cilj je ovoga rada prikazati do danas upoznate mehanizme nastanka i liječenja alergijskih bolesti, uz poseban osvrt na ključnu ulogu T-limfocita u tim procesima.

Ključne riječi: alergija, specifična imunoterapija, T-limfociti, Treg, Th1, Th2, T-BET, GATA-3, FOXP3

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. Branko Pevec, dr. med.
Odjel za kliničku imunologiju,
pulmologiju i reumatologiju
Klinička bolnica "Sveti Duh"
Sveti Duh 64
10000 Zagreb, Hrvatska
Tel: +3851 3712 230; faks: +3851 3712 207
E-pošta: branko.pevec@gmail.com

Alergijske bolesti nastaju kao posljedica promijenjenog imunološkog odgovora u organizmu predisponirane osobe. Zašto u određenom trenutku dolazi do pojave bolesti nije sasvim jasno, ali brojna istraživanja ukazuju na važnost interakcije genetskih i okolišnih čimbenika. Unatoč tome, patofiziološka zbivanja pri nastanku bolesti relativno su dobro poznata. Specifična imunoterapija alergenskim ekstraktima učinkovita je metoda liječenja, koja složenim mehanizmima djeluje upravo na promijenjeni imunološki odgovor osobe s alergijom. U oba spomenuta procesa ključnu ulogu imaju različite populacije T-limfocita.

ULOGA T-LIMFOCITA U IMUNOLOŠKOM ODGOVORU

Ulaskom u organizam antigeni pokreću niz složenih reakcija imunološkog sustava koje nazivamo imunološkim odgovorom. Kakav će taj odgovor biti ovisi

ponajprije o vrsti antigena koji ga je pokrenuo. U nastanku imunološkog odgovora ključnu ulogu igraju pomoćnički T-limfociti (engl. *T helper cells - Th*), dok su za njegovu kontrolu odgovorni regulatorni T-limfociti (engl. *T regulatory cells - Treg*).

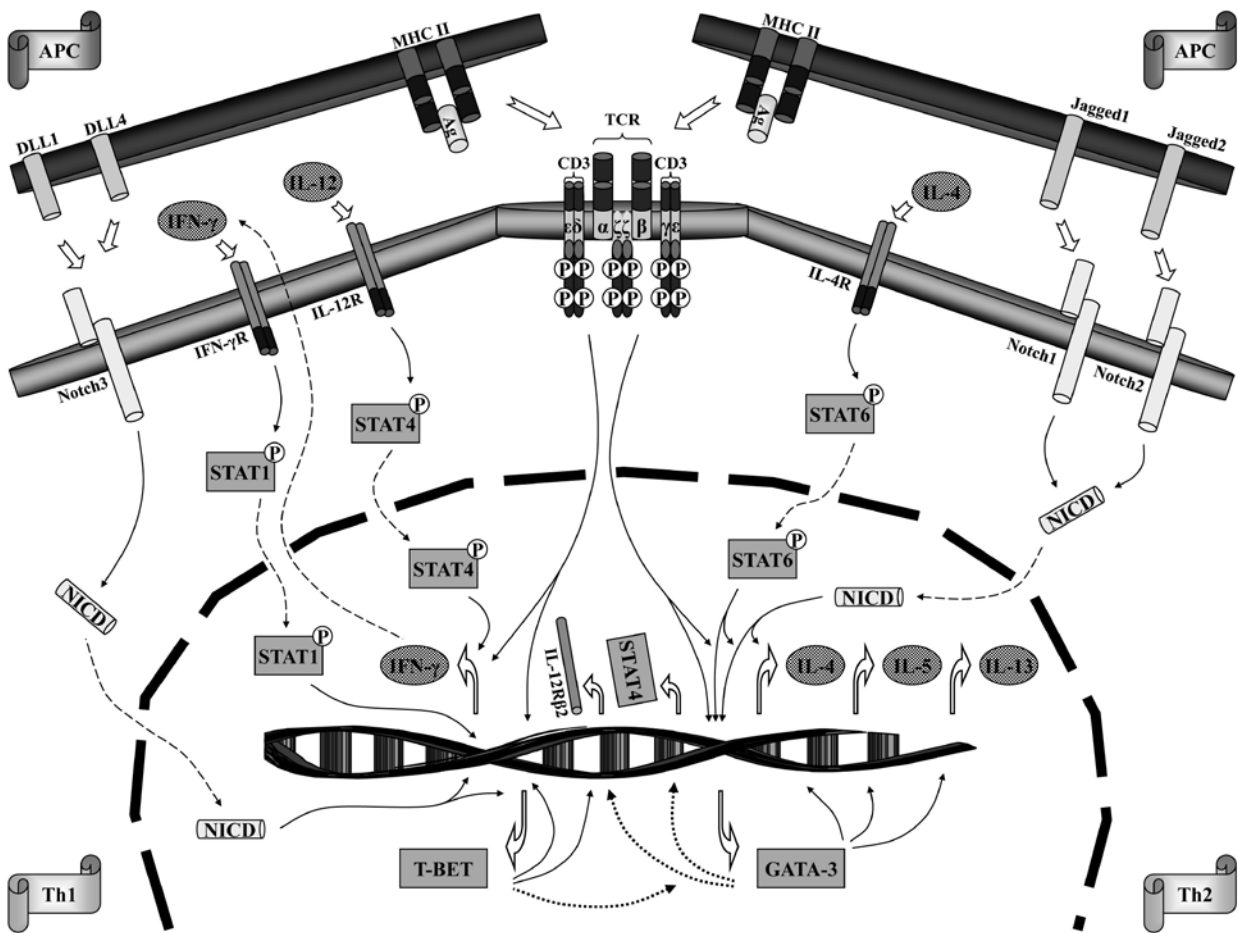
Pomoćnički T-limfociti

U različitim tipovima imunološkog odgovora sudjeluje nekoliko podvrsta pomoćničkih T-limfocita - Th1, Th2, Th9 ili Th17 (1, 2). Za ostvarivanje svojih uloga svaka podvrsta stvara određene efektorske citokine, odnosno ima karakteristični citokinski profil. Primarna uloga Th1-limfocita je imunološki odgovor na unutarstanične patogene, dok su pri alergijskim reakcijama odgovorni za supresiju alergijske upale. Njihov je efektorski citokin interferon- γ (IFN- γ). Th2-limfociti važni su pri infestaciji parazitima, ali i pri nizu zbivanja tijekom alergijskih reakcija koja uključuju stvaranje specifičnih IgE-protutijela, nastanak eozinofilije te

novačenje upalnih stanica. Njihov spektar efektorskih citokina obuhvaća interleukine IL-4, IL-5 i IL-13 te u novije vrijeme upoznate IL-25, IL-31 i IL-33. Th9-limfociti nedavno su otkrivene stanice koje potiču nastanak upale u različitim tkivima. Efektorski citokin im je IL-9. Th17-limfociti važni su pri upalnom odgovoru na izvanstanične patogene te imaju ulogu u kroničnim bolestima koje karakterizira neutrofilna upala. Njihovi su efektorski citokini IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-8, IL-22 i IL-26.

Podvrste Th-limfocita diferenciraju se iz CD4⁺ naivnih T-limfocita nakon izlaganja antigenu, kao odgovor na signale i citokine koji potječu od stanica za predočavanje antigena (engl. *antigen presenting cells* - APC) te na citokine prisutne u mikrookolišu (2, 3). Pritom signaliziranje putem T-staničnog receptora (engl. *T-cell receptor* - TCR) dovodi do niske razine ekspresije određenih gena. Ovisno o vrsti dodatnih

signala koje limfocit prima iz okoline, početna se genska ekspresija pojačava, a diferencijacija usmjerava prema određenom fenotipu. Tako je za diferencijaciju u Th1-fenotip potrebna prisutnost IL-12, IL-18, odnosno IL-27, za diferencijaciju u Th2-fenotip prisutnost IL-4, za diferencijaciju u Th9-fenotip istodobna prisutnost IL-4 i transformirajućeg čimbenika rasta β (engl. *transforming growth factor* β - TGF- β), dok su za diferencijaciju u Th17-fenotip odgovorni TGF- β , IL-6, IL-21 te IL-23 (2). Konačnu diferencijaciju u jedan od fenotipova određuje aktivacija specifičnog transkripcijskog čimbenika, koji dovodi do ekspresije citokinskih gena i posljedičnog stvaranja za taj fenotip karakterističnih citokina. Tako aktivacijom transkripcijskog čimbenika T-BET (engl. *T-box expressed in T cells*) dolazi do diferencijacije u Th1-fenotip, dok aktivacija transkripcijskog čimbenika GATA-3 (engl. *GATA binding protein 3*) dovodi do diferencijacije u Th2-fenotip (sl. 1).



Sl. 1. Model diferencijacije naivnih CD4⁺ limfocita u Th1- ili Th2-fenotip. Predočavanje antigena (Ag) izloženog u sklopu molekula klase II glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex class II molecules* - MHCII) stanica za predočavanje antigena (engl. *antigen presenting cells* - APC) dovodi do aktivacije kompleksa T-staničnog receptora (engl. *T-cell receptor* - TCR; receptorski kompleks čini TCR s pripadajućim signalnim lancima) na naivnom Th-limfocitu te početnog signaliziranja. Pokreće se kaskada koja aktivacijom niza signalnih molekula dovodi do niske razine ekspresije određenih gena.

Tako potaknuta ekspresija pojačava se signaliziranjem putem interleukinskih i Notch receptora. Vežanje interleukina s odgovarajućim receptorom aktivira uz receptor vezane Janus-kinaze, koje fosforilacijom aktiviraju transkripcijske čimbenike nazvane pretvornicima signala i aktivatorima transkripcije (engl. *signal transducers and activators of transcription* - STAT). Oni tada u obliku dimera prelaze iz citoplazme u jezgru gdje vezanjem na DNA aktiviraju određene gene. Vežanje liganda prisutnog na stanici za predočavanje antigena s odgovarajućim Notch receptorom na T-limfocitu, dovodi do γ -sekretazom posredovanog otkidanja unutarstanične domene receptora (engl. *Notch intracellular domain* - NICD). Otkinuta domena prelazi iz citoplazme u jezgru gdje u obliku trimolekularnog kompleksa s proteinom koji veže DNA i koaktivatorom transkripcije aktivira ciljne gene.

Diferencijacija u Th1-fenotip: Početno signaliziranje putem T-staničnog receptora dovodi do niske razine ekspresije gena za IFN- γ i T-BET. U prisutnosti IL-12, signaliziranje putem receptora za IL-12 (IL-12R) posredstvom transkripcijskog čimbenika STAT4 dovodi do pojačanja ekspresije gena za IFN- γ . Mala količina posljedično stvorenog IFN- γ tada signaliziranjem putem receptora za IFN- γ (IFN- γ R) posredstvom transkripcijskog čimbenika STAT1 dovodi do pojačanja ekspresije gena za T-BET. Vežanje DLL1 ili DLL4 liganda (engl. *delta-like ligand* - DLL) prisutnih na stanici za predočavanje antigena s Notch3 receptorom na T-limfocitu dodatno pojačava ekspresiju oba gena, za IFN- γ i T-BET. Stvoreni transkripcijski čimbenik T-BET dalje pojačava transkripciju gena za IFN- γ kao i ekspresiju β 2 podjedinice receptora za IL-12 (IL-12R β 2), a oba učinka zajedno dovode do stvaranja većih količina IFN- γ , efekorskog citokina Th1-limfocita. T-BET također inhibira stvaranje transkripcijskog čimbenika GATA-3 i tako spriječava diferencijaciju u Th2-fenotip.

Diferencijacija u Th2-fenotip: Početno signaliziranje putem T-staničnog receptora dovodi do niske razine ekspresije gena za IL-4 i GATA-3. U prisutnosti IL-4, signaliziranje putem receptora za IL-4 (IL-4R) posredstvom transkripcijskog čimbenika STAT6 dovodi do pojačanja njihove ekspresije. Vežanje Jagged1 ili Jagged2 liganda prisutnih na stanici za predočavanje antigena s Notch1 ili Notch2 receptorom na T-limfocitu dodatno pojačava ekspresiju oba gena. Stvoreni transkripcijski čimbenik GATA-3 pojačava transkripciju gena za IL-4, IL-5 i IL-13, što dovodi do stvaranja odgovarajućih efekorskih citokina Th2-limfocita. GATA-3 također inhibira transkripciju gena za IL-12R β 2 kao i gena za STAT4 te tako spriječava diferencijaciju u Th1-fenotip.

Citokini (raster): IFN- γ - interferon- γ , IL-12 - interleukin-12, IL-4 - interleukin-4, IL-5 - interleukin-5, IL-13 - interleukin-13. Transkripcijski čimbenici (siva boja): STAT4 - *signal transducer and activator of transcription 4*, STAT1 - *signal transducer and activator of transcription 1*, STAT6 - *signal transducer and activator of transcription 6*, T-BET - *T-box expressed in T cells*, GATA-3 - *GATA binding protein 3*.

Strelice: prozirne urezane - vežanje liganda i receptora, puna crta - pozitivan učinak (aktivacija), istočkana crta - negativan učinak (inhibicija), iscrtkana crta - premještanje (translokacija), prozirne zakrivljene - prepisivanje (transkripcija).

Čini se da početna genska ekspresija do koje dovodi signaliziranje putem T-staničnog receptora, ovisi o jačini signala odnosno koncentraciji peptida (4). Tako pri nižim koncentracijama peptida dolazi do slabe i prolazne aktivacije izvanstaničnim signalom regulirane kinaze (engl. *extracellular-signal-regulated kinase* - Erk) što dovodi do početne ekspresije transkripcijskog čimbenika GATA-3 te pojačane osjetljivosti na IL-2. Oba učinka dovode do endogenog stvaranja IL-4, potrebnog za diferencijaciju u Th2-fenotip. Pri višim koncentracijama peptida aktivacija Erk je jača i dugotrajnija što rezultira početnom ekspresijom transkripcijskog čimbenika T-BET i smanjenom osjetljivošću na IL-2. Budući da IL-2 signalizirajući putem receptora za IL-2 (IL-2R) posredstvom transkripcijskog čimbenika STAT5 dovodi do stvaranja IL-4, smanjena osjetljivost na IL-2 rezultira supresijom stvaranja IL-4. Zajedno ti učinci dovode do endogenog stvaranja IFN- γ , potrebnog za diferencijaciju u Th1-fenotip. Rezultati ovih istraživanja ukazuju na važnost jačine signala koji se putem T-staničnog receptora prenosi u stanicu pri određivanju tipa imunološkog odgovora. Slabiji signal bez istodobne aktivacije *Toll-like* receptora pogoduje nastanku Th2 odgovora i tako stvara predispoziciju za nastanak alergijske upale.

Transkripcijski čimbenik T-BET. T-BET je transkripcijski čimbenik iz skupine *T-box* proteina, specifičan za Th1-limfocite (5). Ovaj transkripcijski čimbenik ima središnju ulogu u razvoju Th1-limfocita, budući da njegova aktivacija usmjerava CD4⁺ naivne T-limfocite u Th1-fenotip (3,5). Svoju ulogu T-BET ostvaruje putem aktivacije Th1-, ali i putem supresije Th2-genetičkog programa. Pojačavanjem transkripcije gena za IFN- γ , T-BET neposredno povećava stvaranje IFN- γ . Pojačavanjem ekspresije β 2 podjedinice receptora za IL-12 (IL-12R β 2) i posljedično samog receptora za IL-12 (IL-12R), T-BET povećava osjetljivost prema IL-12 te tako i posrednim putem dodatno povećava stvaranje IFN- γ . Stvaranje većih količina IFN- γ odraz je aktivacije Th1-genetičkog programa. S druge strane, T-BET inhibira stvaranje transkripcijskog čimbenika GATA-3 i tako suprimira Th2-genetički program.

Osim što usmjerava diferencijaciju naivnih T-limfocita u Th1-fenotip, dokazano je da aktivacija T-BET u Th2-limfocitima također može dovesti do njihovog preusmjeravanja prema Th1-fenotipu (5). Rezultati ovih istraživanja pokazali su da aktivacija transkripcijskog čimbenika T-BET može promijeniti fenotipska obilježja pomoćničkih T-limfocita prema Th1-fenotipu, čak i ako se radi o potpuno diferenciranim Th2-limfocitima.

Transkripcijski čimbenik GATA-3. GATA-3 je transkripcijski čimbenik specifičan za Th2-limfocite te ima središnju ulogu u nastanku Th2 imunološkog odgovora (6). Njegova aktivacija usmjerava CD4⁺ naivne T-limfocite u Th2-fenotip (3). Ovu ulogu ostvaruje aktivacijom Th2- i supresijom Th1-genetičkog programa. Pojačavanjem transkripcije gena tzv. Th2-lokusa dovodi do stvaranja efektorskih citokina Th2-limfocita - IL-4, IL-5 i IL-13. Inhibicijom transkripcije gena za IL-12Rβ2 te gena za transkripcijski čimbenik STAT4 smanjuje osjetljivost na IL-12, a time posredno i stvaranje IFN-γ - efektorskog citokina Th1-limfocita. GATA-3 je nužan za stvaranje Th2 efektorskih citokina tijekom diferencijacije, ali i u već diferenciranim limfocitima (6). Pri stvaranju IL-4, GATA-3 surađuje s transkripcijskim čimbenikom STAT5 koji je aktiviran putem IL-2R. Zbog sinergističkog učinka se u diferenciranim Th2-limfocitima IL-4 može stvarati i bez prisutnosti GATA-3. Suprotno tome, za stvaranje IL-5 i IL-13 nužna je prisutnost GATA-3 čak i u potpuno diferenciranim Th2-limfocitima.

Ekspresija GATA-3 nakon podražaja perifernih CD4⁺CD45RO⁺ memorijskih Th2-limfocita alergenom razlikuje se u osoba s alergijskom bolešću i u zdravih osoba (7). U osoba preosjetljivih na grinje kućne prašine zabilježen je značajan porast, a u zdravih osoba značajan pad ekspresije GATA-3 nakon podražaja alergenom. Takav je rezultat u skladu s predominacijom Th2 imunološkog odgovora u osoba s atopijom odnosno Th1 imunološkog odgovora u zdravih osoba.

Regulatorni T-limfociti

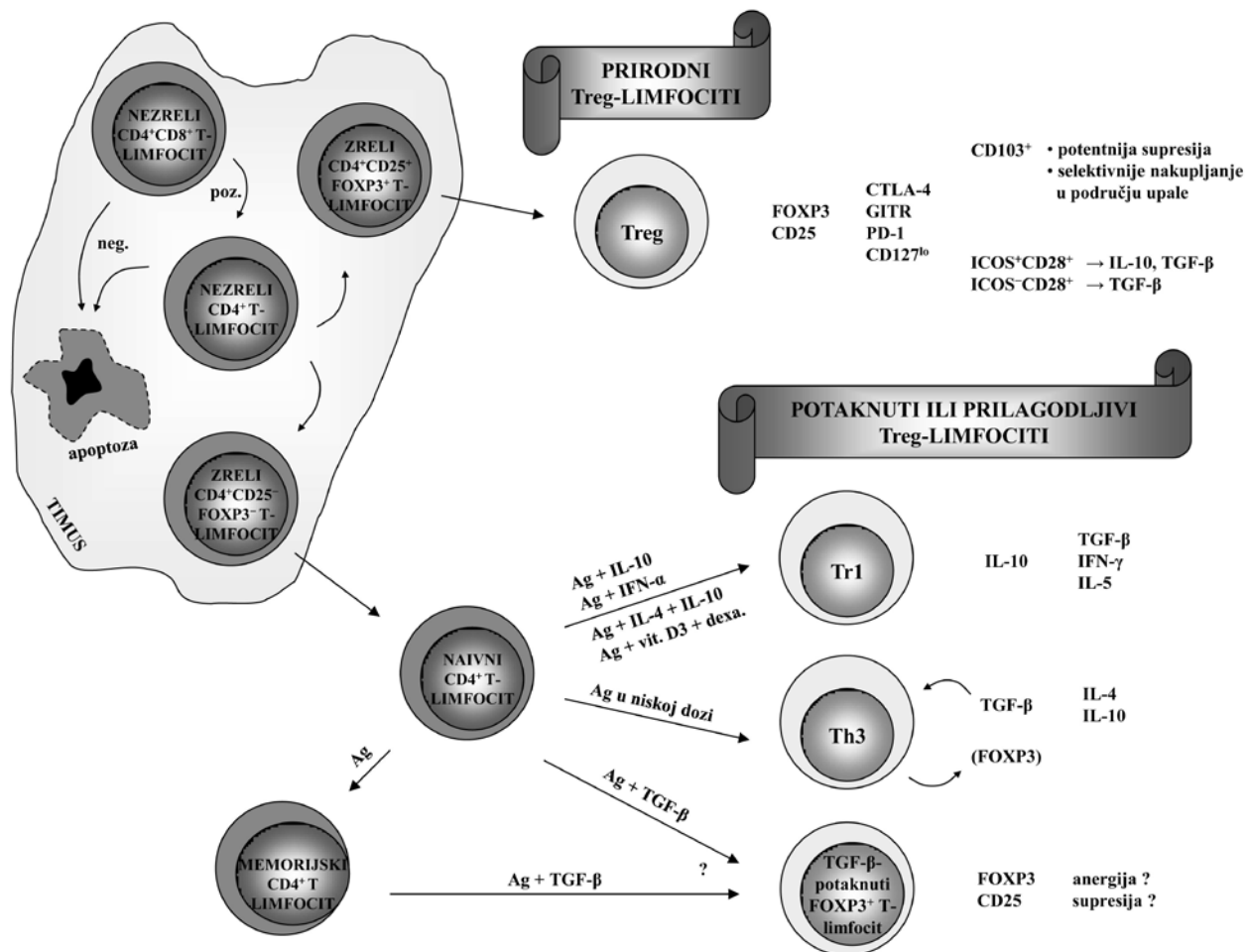
Unatrag nekoliko godina prepoznata je važnost regulatornih T-limfocita u bolestima imunološkog sustava te se njihova uloga i mehanizmi djelovanja u autoimunim, tumorskim, kroničnim upalnim i drugim bolestima intenzivno istražuju (8, 9). Posebno je značajna uloga tih stanica u alergijskim bolestima (10-12), ali i u imunološkom odgovoru zdravih osoba na bezazlene alergene iz okoliša (13). Nove spoznaje na tom području znatno su poboljšale razumijevanje mehanizama nastanka i patofizioloških zbivanja tijekom alergijskih bolesti. Sve bolje upoznavanje Treg-limfocita otvara i nove mogućnosti u liječenju. U tijeku su istraživanja različitih terapijskih protokola kojima se bilo *in vivo* ili *in vitro* nastoji aktivirati i umnožiti određene subpopulacije Treg-limfocita te njihovim djelovanjem preusmjeriti poremećeno imunološko zbijanje (14-16).

Regulatorne T-limfocite karakteriziraju anergija i supresivna aktivnost. Anergija podrazumijeva nereaktivnost prema stimulaciji antigenom, a supresivna aktivnost zaustavljanje aktivacije i funkcije različitih efektorskih stanica (11). Regulatorni T-limfociti svoje

učinke ostvaruju u direktnom kontaktu s drugim stanicama i/ili otpuštanjem regulatornih citokina - IL-10 i TGF-β (17). Među najvažnije učinke Treg-limfocita u alergijskim bolestima pripadaju supresija upalnih te poticanje ne-upalnih (koje stvaraju IL-10) dendritičnih stanica, supresija efektorskih Th1-, Th2- i Th17-limfocita, supresija stvaranja sIgE-protutijela te poticanje stvaranja sIgG₄- i sIgA-protutijela u B-limfocitima, supresija mastocita, bazofila i eozinofila, sprječavanje migracije efektorskih T-limfocita u tkiva, a u kontaktu sa stanicama pojedinih tkiva imaju i utjecaj na proces remodeliranja (2, 18).

Pri uspostavljanju kontroliranog imunološkog odgovora u organizmu sudjeluje nekoliko različitih subpopulacija regulatornih T-limfocita (sl. 2).

Razvojno i funkcionalno određenu subpopulaciju regulatornih T-limfocita predstavljaju CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T-limfociti ili prirodni Treg-limfociti (engl. *natural Treg cells*) (17, 19, 20). Oni čine 5-10% perifernih CD4⁺ T-limfocita. Razvijaju se u timusu kao limfociti predodređeni za obavljanje supresivnih funkcija pa su važni za održavanje tolerancije vlastitog te za održavanje periferne homeostaze unutar imunološkog sustava. Karakterizira ih konstitutivna ekspresija α lanca receptora za IL-2 (CD25) i transkripcijskog čimbenika FOXP3 (engl. *forkhead box protein 3*). Ovi limfociti ekspimiraju i nekoliko površinskih molekula koje se u određenim uvjetima mogu naći i na drugim, ne-regulatornim T-limfocitima. Tako Treg-limfociti normalno ekspimiraju s citotoksičnim T-limfocitima povezan protein 4 (engl. *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4* - CTLA-4), glukokortikoidom potaknut TNF receptor (engl. *glucocorticoid-induced TNF receptor* - GITR) i receptor programirane stanične smrti (engl. *programmed death-1* - PD-1), ali se te molekule mogu naći i na drugim podvrstama T-limfocita za vrijeme njihove aktivacije (19,20). Osim toga, Treg-limfociti normalno pokazuju nisku ekspresiju receptora za IL-7 (CD127), dok druge podvrste T-limfocita također mogu smanjiti ekspresiju tog receptora prilikom aktivacije (21). Stoga se ni ekspresija CTLA-4, GITR i PD-1 kao niti CD127^{lo}-fenotip ne mogu smatrati specifičnim za Treg-limfocite. Na temelju ekspresije pojedinih molekula mogu se razlikovati i podvrste prirodnih Treg-limfocita. Tako subpopulacija koja ekspimirira integrin α_Eβ₇ (CD103) pokazuje potentniju supresivnu aktivnost *in vitro* te selektivnije nakupljanje u upalnim područjima *in vivo*, za razliku od subpopulacije koja ne ekspimirira CD103 (22). Limfociti koji ekspimiraju inducibilni kostimulator (engl. *inducible co-stimulator* - ICOS) ovisni su o kostimulaciji putem tog receptora, a za svoj supresivni učinak koriste IL-10 i TGF-β, dok su ICOS⁻ limfociti ovisni o kostimulaciji putem receptora CD28, a supresiju ostvaruju uglavnom putem TGF-β (23).



Sl. 2. Nastanak i karakteristike različitih subpopulacija CD4⁺ regulatornih T-limfocita. Prirodni Treg-limfociti nastaju iz CD4⁺ T-limfocita čiji su prekursori u timusu preživjeli procese pozitivne (poz.) i negativne (neg.) selekcije te počeli ekspresirati transkripcijski čimbenik FOXP3 i molekulu CD25. Osim ovih glavnih obilježja, Treg-limfocite karakterizira i konstitutivna ekspresija površinskih molekula CTLA-4, GITR i PD-1 kao i niska razina ekspresije molekule CD127 (CD127^{lo}). Subpopulacije ovih stanica koje ekspresiraju molekulu CD103 (CD103⁺) pokazuju potentniju supresiju i selektivnije nakupljanje u upalnim područjima. Subpopulacije koje ekspresiraju molekulu ICOS (ICOS⁺CD28⁺) za supresivni učinak koriste IL-10 i TGF-β, a one koje je ne ekspresiraju (ICOS⁻CD28⁺) supresiju ostvaruju putem TGF-β.

Potaknute ili prilagodljive Treg-limfocite čini heterogena skupina stanica u koje spadaju Tr1-, Th3- i citokinom TGF-β potaknuti FOXP3⁺ T-limfociti. Nastaju na periferiji iz prekursora koji tijekom razvoja u timusu nisu počeli ekspresirati FOXP3 i CD25 već su recirkulacijom kroz periferna limfna tkiva dobili obilježja naivnih CD4⁺ T-limfocita. Tr1-limfociti nastaju pri izlaganju naivnih T-limfocita antigenu (Ag), u prisustvu IL-10, IFN-α, kombinacije IL-4 i IL-10 ili kombinacije vitamina D3 (vit. D3) i deksametazona (dexa). Karakterizira ih stvaranje velike količine IL-10 te male količine TGF-β, IFN-γ i IL-5. Ne ekspresiraju FOXP3. Th3-limfociti nastaju pri izlaganju naivnih T-limfocita niskim dozama antigena, a karakterizira ih stvaranje velike količine TGF-β te male količine IL-4 i IL-10. Autokrinim djelovanjem TGF-β te stanice mogu početi ekspresirati FOXP3 i time se barem djelomično preklapati s populacijom TGF-β-potaknutih FOXP3⁺ T-limfocita. Citokinom TGF-β potaknuti FOXP3⁺ T-limfociti nastaju pri izlaganju naivnih i/ili memorijskih (prethodno izloženih antigenu) T-limfocita antigenu u prisustvu TGF-β. Posljedično oni počinju ekspresirati FOXP3 i CD25. Anergija i supresivna aktivnost tih stanica u ljudi još uvijek nije jednoznačno potvrđena.

Transkripcijski čimbenik: FOXP3 - *forkhead box protein 3*. Površinske molekule: CTLA-4 - *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*, GITR - *glucocorticoid-induced TNF (tumor necrosis factor) receptor*, PD-1 - *programmed death-1*, ICOS - *inducible co-stimulator*. Citokini: IL-10 - *interleukin-10*, TGF-β - *transforming growth factor β*, IFN-α - *interferon-α*, IL-4 - *interleukin-4*, IFN-γ - *interferon-γ*, IL-5 - *interleukin-5*.

Drugu skupinu regulatornih T-limfocita čini heterogena populacija nazvana potaknuti ili prilagodljivi Treg-limfociti (engl. *induced or adaptive Treg cells*) (17,19,20). Oni nastaju na periferiji iz CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻ T-limfocita nakon podražaja antigenom. Međutim, iako su sami specifični za antigen koji ih je potaknuo, ti limfociti mogu suprimirati i ciljne stanice koje ne dijele tu specifičnost (17). U tu skupinu spadaju Tr1-limfociti koji stvaraju IL-10 (engl. *IL-10-producing T regulatory 1 cells*), Th3-limfociti koji ekspresiraju TGF-β (engl. *TGF-β-expressing Th3 cells*) te citokinom TGF-β potaknuti FOXP3⁺ T-limfociti (engl. *TGF-β-induced FOXP3⁺ T cells*).

Tr1-limfociti *in vitro* nastaju pri izlaganju naivnih CD4⁺ limfocita antigenu u prisustvu IL-10, IFN-α, kombinacije IL-4 i IL-10 ili kombinacije vitamina D3 i deksametazona (20). Tijekom različitih vrsta infekcija (bakterijske, virusne, gljivične, parazitarne), kao i pri imunološkom odgovoru na različite alergene iz okoliša, *in vivo* se mogu naći Tr1-limfociti specifični za patogen odnosno alergen (19,13). Stoga se smatra da im je biološka uloga kontrola upalnog odgovora i smanjenje oštećenja okolnog tkiva pri tom odgovoru. Kao efektorske citokine, ovi limfociti stvaraju velike količine IL-10 te male količine TGF-β, IFN-γ i IL-5 (19). Ne ekspresiraju transkripcijski čimbenik FOXP3 (24). Supresivna aktivnost tih limfocita ostvaruje se uglavnom putem IL-10, a po učinkovitosti odgovara onoj koju pokazuju prirodni Treg-limfociti (19).

Th3-limfociti prvi su puta izolirani u pokusima oralne tolerancije pri primjeni niskih doza antigena (19). To su za antigen specifični CD4⁺ T-limfociti koji kao efektorske citokine stvaraju velike količine TGF-β te manje količine IL-4 i IL-10 (20). Budući da TGF-β može potaknuti stvaranje transkripcijskog čimbenika FOXP3, glavni je mehanizam djelovanja Th3-limfocita poticanje stvaranja FOXP3⁺ T-limfocita na periferiji, iako Th3-limfociti i sami pokazuju supresivnu aktivnost (25). Zbog mogućeg autokrinog djelovanja TGF-β, smatra se da se barem dio te stanične populacije preklapa s populacijom TGF-β-potaknutih FOXP3⁺ T-limfocita (17).

Citokinom TGF-β potaknuti FOXP3⁺ T-limfociti nastaju iz CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻ T-limfocita koji su pod utjecajem TGF-β počeli ekspresirati transkripcijski čimbenik FOXP3. U ranijim radovima nije razjašnjeno jesu li ishodne stanice naivne ili mirujuće memorijske stanice, dok su rezultati novijih istraživanja proturječni. Istraživanje na mišjem modelu pokazalo je da se ne radi o naivnim CD45RB^{high} T-limfocitima, već o CD45RB^{low} T-limfocitima koji su prethodno bili u kontaktu s antigenom (26). U istraživanju na ljudskim stanicama samo su naivni CD45RA⁺ T-limfociti uspješno započeli ekspresirati FOXP3 te poprimili re-

gulatorni fenotip, dok je ekspresija FOXP3 u memorijskim CD45RO⁺ T-limfocitima bila slabija i tranzitorna, odnosno nedovoljna za promjenu fenotipa (27). Za nastanak TGF-β-potaknutih FOXP3⁺ T-limfocita potrebno je istodobno signaliziranje putem TGF-β receptora i T-staničnog receptora, što dovodi do ekspresije FOXP3, koja potom dovodi do ekspresije CD25 (28). Tako nastale stanice su CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, odnosno dobivaju fenotipska obilježja prirodnih Treg-limfocita. U mišjem modelu i funkcionalno odgovaraju prirodnim Treg-limfocitima jer imaju sposobnost supresije efektorskih Th1- i Th2-limfocita *in vitro* kao i alergenom potaknutog upalnog odgovora *in vivo* (28). Međutim, uočeno je da ljudski TGF-β-potaknuti FOXP3⁺ T-limfociti ne moraju nužno biti anergični i supresivni, već umjesto toga mogu imati efektorske uloge (29). Za sada je otvoreno pitanje u kojoj mjeri ovako nastale stanice u ljudi doprinose ukupnoj populaciji FOXP3⁺ T-limfocita s regulatornom funkcijom te o čemu ovisi hoće li njihova uloga konačno biti regulatorna ili efektorska.

Transkripcijski čimbenik FOXP3. FOXP3 je transkripcijski čimbenik iz skupine proteina zbog karakteristične građe nazvanih, glava viljuške/krilata uzvojnica (engl. *forkhead/winged-helix*). Specifičan je za prirodne Treg-limfocite te ima ulogu glavnog regulatora njihovog razvoja i funkcije (30,31). Tu ulogu ostvaruje interakcijama s različitim genima djelujući kao aktivator ili represor njihove transkripcije. Na taj način FOXP3 posredno ili neposredno kontrolira nekoliko stotina gena uključujući transkripcijske čimbenike, citokine, molekule stanične površine, molekule za prijenos signala u stanici, enzime staničnog metabolizma te mikroRNA (17). Vežući se za transkripcijske komplekse koji u njegovoj odsutnosti dovode do diferencijacije T-limfocita u efektorske Th1-, Th2- ili Th17-limfocite, FOXP3 preusmjerava njihov razvoj u Treg-limfocite (17,32). Posljedično dolazi do supresije stvaranja efektorskih citokina IFN-γ, IL-4, odnosno IL-17 te do ekspresije CD25, CTLA-4, GITR i drugih molekula karakterističnih za Treg-limfocite. FOXP3 također suprimira stvaranje IL-2, citokina potrebnog za proliferaciju T-limfocita. Budući da više ne mogu stvarati vlastiti IL-2, a ekspresiraju visokoafinitetni receptor za taj citokin (molekula CD25 je njegov α lanac), Treg-limfociti postaju ovisni o egzogenom IL-2. Tako nakon kontakta s antigenom zbog odsutnosti IL-2 ne dolazi do proliferacije Treg-limfocita, čime se objašnjava njihova anergija. Suprotno tome, u kontaktu s aktiviranim efektorskim T-limfocitima koji stvaraju IL-2 dolazi do proliferacije i ekspanzije kлона Treg-limfocita te njihove supresivne aktivnosti (17).

Budući da ekspresija CD25 u različitim uvjetima može znatno varirati, FOXP3 se smatra osjetljivijim biljgom za prepoznavanje Treg-limfocita (33). Međutim, kako

je već spomenuto, ovaj transkripcijski čimbenik u ljudi mogu ekspimirati različite populacije T-limfocita od kojih neki nemaju regulatornu funkciju. Također je dokazano da je prolazna ekspresija FOXP3 normalna posljedica aktivacije CD4⁺ T-limfocita te da svi efektorski T-limfociti za vrijeme diobe prolazno ekspimiraju FOXP3, ali je razina ekspresije u oba slučaja niža od one koju pokazuju prirodni Treg-limfociti (34,35). Za supresivnu aktivnost potrebna je visoka razina ekspresije FOXP3 (36), a budući da u većine spomenutih stanica njegova ekspresija konačno prestaje, one ne postaju Treg-limfociti.

U jednom novijem istraživanju (37), ljudski CD4⁺ T-limfociti koji ekspimiraju FOXP3 podijeljeni su u tri podskupine s različitim fenotipskim i funkcionalnim karakteristikama. Dvije podskupine imaju supresivnu aktivnost: aktivirani Treg-limfociti (engl. *activated Treg cells - aTreg*) fenotipa FOXP3^{hi}CD45RA⁻, koji ekspimiraju visoke razine FOXP3, a ne pokazuju ekspresiju biljega naivnih T-limfocita CD45RA i mirujući Treg-limfociti (engl. *resting Treg cells - rTreg*) fenotipa FOXP3^{lo}CD45RA⁺, u kojih je razina ekspresije FOXP3 niska, a uz njega ekspimiraju i CD45RA. Prvi su potpuno diferencirani Treg-limfociti koji obavljaju potentnu supresivnu aktivnost te potom brzo umiru putem apoptoze. Drugi su naivni T-limfociti koji nakon kontakta s antigenom procesom proliferacije i diferencijacije prelaze u aktivirane Treg-limfocite. Stalnim podraživanjem imunološkog sustava antigenima iz okoliša u organizmu se opetovano iz rTreg-limfocita stvaraju aTreg-limfociti, koji nakon obavljanja svoje regulatorne uloge propadaju. Na taj način imunološki sustav uspijeva održati homeostazu i odoljeti okolišnim antigenima. Treća podskupina ima karakteristike efektorskih stanica: ne-regulatorni T-limfociti (engl. *non-Treg cells*) fenotipa FOXP3^{lo}CD45RA⁻, s niskom razinom ekspresije FOXP3, a bez ekspresije CD45RA. Ove stanice imaju sposobnost stvaranja citokina IL-2, IFN- γ te IL-17, a najvjerojatnije odgovaraju efektorskim stanicama koje zbog aktivacije prolazno ekspimiraju FOXP3.

Iz tih je istraživanja jasno da se zbog zastupljenosti u različitim limfocitnim populacijama FOXP3 u ljudi ne može smatrati isključivo biljekom Treg-limfocita.

MEHANIZMI NASTANKA ALERGIJSKE BOLESTI

U razvoju alergijske bolesti početno zbivanje predstavlja stvaranje velikog broja za alergen specifičnih Th2-limfocita (20). Kako je ranije objašnjeno, oni nastaju diferencijacijom iz naivnih CD4⁺ T-limfocita pod utjecajem IL-4, uz prethodnu aktivaciju putem stanica za predočavanje antigena. Istraživanje imunološkog od-

govora na alergen u zdravih osoba te osoba s alergijskom bolešću pokazalo je da se i u jednih i u drugih može naći kombinacija triju fenotipova za alergen specifičnih T-limfocita - Th1, Th2 i Tr1 (38). Značajna je međutim razlika u proporciji njihove pojavnosti s predominacijom Tr1-fenotipa u zdravih osoba odnosno Th2-fenotipa u osoba s alergijskom bolešću. Osim Tr1, u zdravih osoba i u osoba s alergijskom bolešću prisutni su i CD4⁺CD25⁺ regulatorni T-limfociti koji su sposobni suprimirati Th1 i Th2 imunološki odgovor (39). Međutim, supresivna sposobnost CD4⁺CD25⁺ regulatornih T-limfocita osoba s alergijskom bolešću značajno je smanjena u odnosu na supresivnu sposobnost istih stanica zdravih osoba (40). U tom je istraživanju smanjenje bilo posebno izraženo u bolesnika s polinozom tijekom sezone polinacije, dok je u odsutnosti podražaja alergenom izvan sezone smanjenje supresivne sposobnosti još uvijek prisutno, ali u znatno manjoj mjeri. Naknadno je razjašnjeno da na supresivnu aktivnost CD4⁺CD25⁺ T-limfocita, osim atopijskog statusa, utječu vrsta i koncentracija alergena (41). Tako je u bolesnika preosjetljivih na pelud trava, supresivna funkcija tih stanica pri *in vitro* izlaganju nižim koncentracijama alergena uredna, a pri višim zakazuje. Takav rezultat odgovara njenom smanjenju tijekom sezone polinacije u prethodnom istraživanju. Dakle, u osoba s alergijskom bolešću ne dolazi do zadovoljavajuće aktivacije supresivne funkcije regulatornih T-limfocita, što u određenim uvjetima može dovesti do pojačane proliferacije i aktivacije Th2-limfocita (42). Rezultati tih istraživanja ukazali su na važnost ravnoteže između efektorskih Th2-limfocita i regulatornih T-limfocita te na činjenicu da upravo njihov odnos određuje hoće li se razviti normalan ili alergijski imunološki odgovor.

Nekoliko čimbenika smatra se važnima za nastanak predominacije Th2-fenotipa. Jedan od njih je jačina signaliziranja putem T-staničnog receptora, pri čemu slabiji signal bez istodobne aktivacije *Toll-like* receptora (karakterističan za niže koncentracije peptida kakve nastaju pri predočavanju alergena) pogoduje nastanku Th2 odgovora (4). Transkripcijski čimbenik GATA-3 tada aktivacijom Th2- i supresijom Th1-genetičkog programa usmjerava naivne T-limfocite u Th2-fenotip (3,6). Osim toga, GATA-3 može direktnim vezanjem na FOXP3 promotor spriječiti diferencijaciju naivnih T-limfocita u potencijalno supresivne citokinom TGF- β potaknute FOXP3⁺ T-limfocite (27), što podržava predominaciju Th2-limfocita. Aktivacija upalnih dendritičnih stanica koje posreduju daljnje stvaranje efektorskih Th2-limfocita (za razliku od neupalnih, tolerogenih, dendritičnih stanica koje u zdravih osoba putem IL-10 posreduju stvaranje regulatornih Tr1-limfocita) (43-49), kao i pojačana apoptoza Th1-limfocita (50), dodatni su čimbenici u održavanju Th2 predominacije.

Daljnja zbivanja tijekom razvoja alergijske bolesti posljedica su djelovanja efektorskih citokina Th2-limfocita, prvenstveno IL-4, IL-5 i IL-13 te niza upalnih medijatora oslobođenih iz mastocita i drugih upalnih stanica. Uključuju stvaranje specifičnih IgE-protutijela, novačenje upalnih stanica, nastanak eozinofilije, pojačanu kontraktilnost glatkih mišića i pojačano stvaranje sluzi te remodeliranje (20).

B-limfociti imaju sposobnost alergena koji su prepoznali putem B-staničnog receptora (engl. *B-cell receptor* - BCR) povući u unutrašnjost stanice, razgraditi ga na peptide te u obliku peptid:MHCII kompleksa vratiti na površinu stanice. Kada Th2-limfocit prepozna tako izložene peptide dolazi do interakcija tih dviju stanica. Pritom je osim veze peptid:MHCII kompleks-TCR ključna i veza CD40-CD40L (CD40 je receptor na staničnoj površini B-limfocita, a CD40L njegov ligand na T-limfocitu), kao i otpuštanje efektorskih citokina iz Th2-limfocita. Nastalim interakcijama Th2-limfocit potiče B-limfocit na izotipsko prekapčanje, proliferaciju i diferencijaciju u zrele plazma stanice, a konačni rezultat je stvaranje IgE-protutijela specifičnih za alergen koji je reakciju pokrenuo (51). Stvorena IgE-protutijela vežu se na visokoafinitetne receptore mastocita i bazofila. Premošćavanje protutijela vezanih na staničnu površinu alergenom dovodi do aktivacije tih stanica te one počinju ekspimirati CD40L i otpuštati IL-4. Na taj način mastociti i bazofili također mogu poticati izotipsko prekapčanje i stvaranje specifičnih IgE-protutijela u B-limfocitima, što dovodi do stvaranja sve većih količina tih protutijela pri svakom ponovnom kontaktu s alergenom (52).

Mastociti su kao stanice urođene imunosti strateški smješteni u koži i sluznicama, kako bi mogli brzo reagirati na podražaje iz okoliša (53). Zbog takvog položaja te stanice imaju u središnju ulogu u nastanku alergijske upale. Ulaskom u organizam putem sluznice dišnog ili probavnog sustava te nešto rjeđe putem kože, alergen dolazi u kontakt sa specifičnim IgE-protutijelima oboružanim mastocitima te ih aktivira. Oslobođanjem upalnih medijatora iz mastocita dolazi do novačenja i aktivacije drugih upalnih stanica, poput eozinofila, bazofila i Th2-limfocita, koje i same mogu otpuštati različite upalne medijatore i tako pojačavati i podržavati nastalu upalnu reakciju. Na taj način mastociti su odgovorni za naseljavanje upalnih stanica u sluznici pojedinih organa što pri svakom izlaganju alergenu rezultira pojavom lokaliziranih simptoma vezanih upravo uz dotični organ.

Glavni etiološki čimbenik u nastanku eozinofilije je Th2 efektorski citokin IL-5, koji potiče proliferaciju, diferencijaciju i sazrijevanje prekursora eozinofila u koštanoj srži te posreduje novačenje i aktivaciju eozinofila na mjestu upale (54). Eozinofili su granu-

lociti uključeni u patogenezu brojnih upalnih stanja uključujući infestaciju parazitskim helmintima, bakterijske i virusne infekcije, ozljede tkiva, kao i alergijske bolesti. Sadrže velik broj prethodno sintetiziranih citokina, kemokina i lipidnih medijatora. Nakon što bivaju privučeni u područje upale otpuštanjem tih medijatora mogu modulirati njezin tijek. Također mogu djelovati kao stanice za predočavanje antigena i tako u direktnom kontaktu aktivirati Th2-limfocite. Prepoznatljivi su po citoplazmatskim granulama koje se karakteristično boje eozinom, a sadrže četiri bazična proteina: glavni bazični protein (engl. *major basic protein* - MBP), eozinofilni kationski protein (engl. *eosinophil cationic protein* - ECP), iz eozinofila dobiven neurotoksin (engl. *eosinophil-derived neurotoxin* - EDN) te eozinofilnu peroksidazu (engl. *eosinophil peroxidase* - EPO). Otpuštanjem sadržaja citoplazmatskih granula eozinofili dovode do oštećenja okolnog tkiva u području alergijske upale.

Tkivna eozinofilija posebno je značajna u patofiziologiji alergijske astme koju karakteriziraju kronična upalna infiltracija donjih dišnih putova, bronhalna hiperreaktivnost, pojačana kontraktilnost glatkog mišićja te pojačano stvaranje sluzi i remodeliranje. Zbog kronične infiltracije velikim brojem eozinofila dolazi do neposrednog (bazični proteini iz citoplazmatskih granula) i posrednog (reaktivni radikali kisika nastali djelovanjem EPO) oštećenja sluznice i živčanih završetaka bronha. Bronhalna hiperreaktivnost vjerojatno je posljedica djelovanja Th2 efektorskih citokina, neurogenih mehanizama, kao i promjena glatke muskulature bronha. Pojačana kontraktilnost glatkog mišićja te pojačano stvaranje sluzi pripisuje se djelovanju lipidnih medijatora. Proces remodeliranja nastaje kao reparatorni odgovor na ponavljana oštećenja respiratorne sluznice. Sastoji se u povećanju mase glatkog mišićja bronha, odlaganju kolagena i drugih proteina međustanične tvari te stvaranju novih krvnih žila, što konačno dovodi do zadebljanja stijenke bronha. Budući da stvaraju nekoliko čimbenika rasta i fibrogenih čimbenika, uključujući TGF- α i TGF- β , čimbenik rasta fibroblasta FGF-2 (engl. *fibroblast growth factor* - FGF), čimbenik rasta endotela krvnih žila (engl. *vascular endothelial growth factor* - VEGF), matriksmetaloproteinazu MMP-9, IL-1 β , IL-13 te IL-17, smatra se da eozinofili imaju značajnu ulogu u procesu remodeliranja (54).

MEHANIZMI DJELOVANJA SPECIFIČNE IMUNOTERAPIJE

Specifična imunoterapija (SIT) alergenskim ekstraktima učinkovita je metoda liječenja alergijskih bolesti u čijoj su podlozi alergijske reakcije ovisne o IgE-protutijelima (I. tip preosjetljivosti). Osnovni mehanizam dje-

lovanja SIT-e jest stvaranje periferne tolerancije alergena odnosno usmjeravanje perifernih T-limfocita da na podražaj alergenu ne reagiraju upalnim alergijskim odgovorom (2,55-58). Pritom je ključno poticanje stvaranja regulatornih T-limfocita koji svojim supresivnim djelovanjem zaustavljaju proliferaciju stanica i stvaranje citokina na više razina razvoja upalne kaskade.

Proces stvaranja regulatornih T-limfocita tijekom SIT-e započinje tako što rastuće doze alergena potiču nastanak za alergen specifičnih regulatornih limfocita sličnih Tr1-limfocitima (engl. *Tr1-like cells*). Ove stanice stvaraju velike količine IL-10, kao glavnog efektorskog citokina putem kojeg ostvaruju svoj supresivni učinak (59, 60). Iako stvaraju IL-10 kao Tr1-limfociti, većina tih stanica je fenotipa CD4⁺CD25⁺ (61, 62), čime se razlikuju od CD4⁺CD25⁻ Tr1-limfocita. Stoga nije sasvim jasno jesu li stanice koje nastaju tijekom SIT-e citokinom TGF- β potaknuti FOXP3⁺ T-limfociti ili aktivirani prirodni Treg-limfociti (što je manje vjerojatno). Ako se radi o citokinom TGF- β potaknutim FOXP3⁺ T-limfocitima, oni bi mogli nastati iz Tr1-limfocita autokrinim djelovanjem tog citokina (Tr1-limfociti osim IL-10 stvaraju i male količine TGF- β), odnosno iz naivnih ili memorijskih CD4⁺ T-limfocita njegovim parakrinim djelovanjem. U prilog tome govori istraživanje kojim su u nosnoj sluznici bolesnika s polinozom liječenih specifičnom imunoterapijom osim CD3⁺FOXP3⁻ T-limfocita koji stvaraju IL-10 (Tr1-limfociti) nađeni i CD3⁺FOXP3⁺ T-limfociti koji stvaraju IL-10 (prilagodljivi Treg-limfociti) (63). Nađeni su i veći broj CD25⁺FOXP3⁺ T-limfocita u usporedbi s bolesnicima koji imaju polinozu a nisu primali SIT-u te sa zdravim dobrovoljcima. Dodatnim povećava-

njem broja tih stanica u nosnoj sluznici tijekom sezone polinacije, objašnjava se postignuta supresija alergijskog upalnog odgovora u bolesnika liječenih specifičnom imunoterapijom.

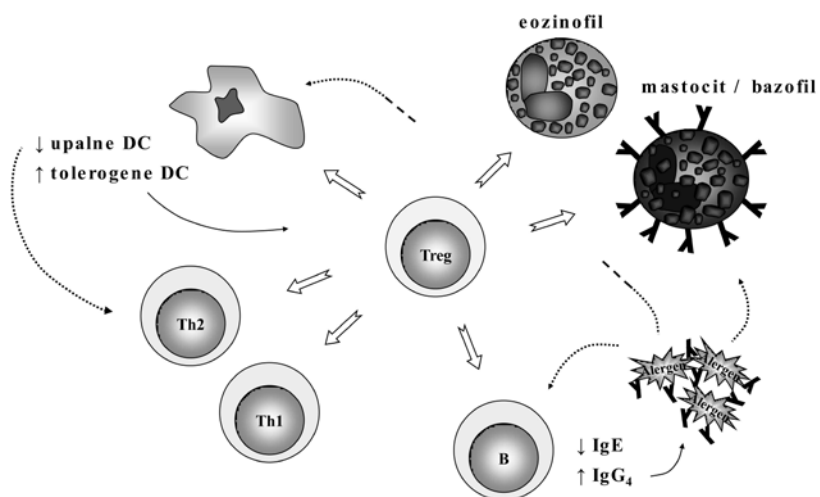
Čine li prirodni Treg-limfociti dio populacije CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T-limfocita aktiviranih specifičnom imunoterapijom, nije sasvim razjašnjeno. Poznato je da prirodni Treg-limfociti sazrijevajući u timusu ekspimiraju TCR s većim afinitetom vezanja za vlastite tkivne antigene te upravo u kontaktu s tim antigenima postaju funkcionalno zreli regulatorni limfociti, važni pri održavanju tolerancije vlastitog (17). Također je poznato da su ovisni o egzogenom IL-2 pa u kontaktu s aktiviranim efektorskim T-limfocitima koji stvaraju može doći do proliferacije, ekspanzije i supresivne aktivnosti Treg-limfocita (17). Ovaj ili sličan mehanizam mogao bi objasniti umnažanje Treg-limfocita tijekom SIT-e. Suprotno tome, istraživanje kojim je uspoređivan *in vitro* odgovor Th2-limfocita na podražaj alergenu u osoba s alergijom i zdravih osoba, pokazalo je da se dobivena razlika ne može pripisati Treg-limfocitima (64). Tako se za sada ipak čini da regulatorne stanice odgovorne za učinke SIT-e čini mješovita populacija Tr1-limfocita i njima sličnih (engl. *Tr1-like*) citokinom TGF- β potaknutih FOXP3⁺ T-limfocita koji stvaraju IL-10.

Stvoreni regulatorni T-limfociti usmjeravaju daljnja zbivanja tijekom SIT-e djelujući supresivno na različite stanice uključene u alergijski upalni odgovor - stanice za predočavanje antigena, Th-limfocite, B-limfocite, efektorske stanice rane i kasne faze alergijske reakcije, kao i stanice pojedinih tkiva u kojima se reakcija događa (sl. 3).

Sl. 3. Uloge regulatornih T-limfocita potaknutih specifičnom imunoterapijom.

Regulatorni T-limfociti (Treg) stvoreni tijekom specifične imunoterapije mijenjaju alergijski upalni odgovor na nekoliko razina: 1. supresijom upalnih i poticanjem nastanka tolerogenih dendritičnih stanica (DC) dovode do smanjenog stvaranja efektorskih Th2-limfocita i povećanog stvaranja novih Treg; 2. suprimiraju efektorske Th1-, Th2- i Th17- (nije prikazano) limfocite; 3. dovode do izotipskog prekapčanja u B-limfocitima te posljedično smanjenog stvaranja specifičnih IgE- i povećanog stvaranja specifičnih IgG₄-protutijela (blokirajuća protutijela koja sprječavaju vezanje alergena za mastocite / bazofile, B-limfocite i DC te posljedično procese degranulacije, stvaranja IgE-protutijela i olakšanog predočavanja alergena); 4. suprimiraju efektorske stanice - mastocite, bazofile i eozinofile.

Strelice: prozirne urezane - zahvatna mjesta djelovanja Treg, puna crta - pozitivan učinak (aktivacija), istočkana crta - negativan učinak (inhibicija).



Počevši od razine stanica za predočavanje antigena, regulatorni T-limfociti suprimiraju upalne dendritične stanice odgovorne za stvaranje efektorskih Th2-limfocita, a potiču ne-upalne (tolerogene) dendritične stanice koje putem IL-10 posreduju daljnje stvaranje novih regulatornih Th1-limfocita (2). Sazrijevanjem u prisutnosti IL-10 dendritične stanice poprimaju nepotpuno diferencirani oblik koji se očituje smanjenom ekspresijom MHC molekula klase II kao i određenih kostimulatornih i adhezijskih molekula te tako dobivaju tolerogena svojstva (65). Ove stanice imaju sposobnost suprimirati limfocite Th1- kao i Th2-fenotipa (44). Za nastanak regulatornih limfocita koji su sposobni dalje suprimirati Th2 imunološki odgovor u osoba s alergijskom bolešću potrebna je istodobna prisutnost tolerogenih dendritičnih stanica i TGF- β (66). Upravo regulatorni T-limfociti koji nastaju pri SIT-i istodobno stvaraju IL-10 i TGF- β pa mogu osigurati mikrookoliš pogodan za daljnje usmjeravanje imunološkog odgovora prema stvaranju novih regulatornih umjesto efektorskih Th2-limfocita.

Iako je brojnim radovima pokazano da SIT dovodi do preusmjeravanja iz dominacije Th2- u također proupalni Th1-limfocitni fenotip, konačni učinak terapije ipak nije tkivna upalna reakcija već tolerancija alergena. Razlog tome je što regulatorni T-limfociti osim na Th2 imaju supresivni učinak i na druge podvrste pomoćničkih T-limfocita, Th1 i Th17. Zbog značajne podudarnosti s težinom simptoma učinak na Th2 odgovor smatra se važnijim za kliničku učinkovitost SIT-e (67). Mehanizmi kojima regulatorni T-limfociti tijekom SIT-e suprimiraju Th2 odgovor su anergija Th2-limfocita, ali i njihova pojačana apoptoza (68).

Smanjenje omjera sIgE/sIgG₄ tijekom SIT-e posljedica je stvorene dominacije regulatornih T-limfocita. Putem IL-10 ti limfociti neposredno utječu na izotipsko prekapčanje u B-limfocitima što dovodi do smanjenja stvaranja IgE-protutijela te povećanjem stvaranja IgG₄-protutijela (69). Međutim, do značajnog smanjenja omjera sIgE/sIgG₄ dolazi tek nekoliko mjeseci nakon početka SIT-e, iako regulatorni T-limfociti nastaju unutar nekoliko dana. Ta se vremenska razlika ne može objasniti vremenom poluživota protutijela, koje je za IgE znatno kraće (2,5 dana) nego za IgG₄ (23 dana). Smatra se da je za razliku odgovorno postojanje dugo živućih plazma stanica u koštanoj srži.

Stvorena IgG₄-protutijela imaju posebne strukturne i funkcionalne karakteristike. Građena su od dvije polu-molekule (odnosno dva para teški lanac-laki lanac) međusobno povezane disulfidnim i nekovalentnim vezama. Zbog slabog afiniteta za Fc γ receptore i C1q komponentu komplementa ne dovode do aktivacije stanica i komplementa. Nemaju mogućnost stvaranja velikih imunokompleksa (funkcionalno mono-

valentna protutijela), a dvije polu-molekule mogu se izmjenjivati između odvojenih molekula protutijela stvarajući kombinacije s različitom specifičnošću unutar istog protutijela (bispecifična protutijela) (70). Funkcionalno se ponašaju kao blokirajuća protutijela (71). Vezanjem za alergen sprječavaju njegovo vezanje za IgE na površini mastocita i bazofila te posljedičnu degranulaciju. Slično tome, sprječavaju vezanje alergena za BCR memorijskih B-limfocita i daljnje stvaranje IgE-protutijela. U oba slučaja učinak IgG₄-protutijela može se pojačati vezanjem IgE-alergen-IgG₄ kompleksa za inhibicijske receptore, čime se poništava istodobno signaliziranje putem IgE-receptora odnosno BCR. Nadalje, IgG₄-protutijela također sprječavaju vezanje alergena za IgE koji je preko visokoafinitetnog (Fc ϵ RI) ili niskoafinitetnog (Fc ϵ RII) receptora vezan za površinu stanica za predočavanje antigena. Na taj način zauzstavljaju proces IgE-protutijelima olakšanog predočavanja alergena Th2-limfocitima.

Porast koncentracije sIgG₄-protutijela tijekom specifične imunoterapije nije uvijek podudaran s kliničkom učinkovitošću. Razlog tome je što osim porasta koncentracije, za vrijeme SIT-e dolazi i do promjena biološke aktivnosti tih protutijela. Ponavljanom izloženosti većim koncentracijama alergena povećava se njihov afinitet za alergen. Dolazi i do promjena u specifičnosti stvorenih protutijela prema pojedinim epitopima alergena. Uspješna terapija povezana je s pojačanim blokirajućim učinkom sIgG₄-protutijela, a taj učinak nije ovisan isključivo o njihovoj koncentraciji. Stoga je mjerenje funkcionalne blokirajuće sposobnosti sIgG₄-protutijela u staničnim testovima, bolji pokazatelj uspješnosti SIT-e u odnosu na mjerenje njihove koncentracije u serumu (71).

Učinci regulatornih T-limfocita na efektorske stanice obuhvaćaju povišenje praga podražljivosti mastocita i bazofila, smanjenje IgE-protutijelima posredovanog oslobađanja upalnih medijatora iz tih stanica te smanjenje aktivacije i funkcije eozinofila. Među učinke važne za kasnu fazu alergijske reakcije spadaju smanjena infiltracija nosne i bronhalne sluznice mastocitima i eozinofilima te posljedično smanjena hiperreaktivnost tih sluznica na nespecifične podražaje. Supresivni učinak na eozinofile i druge stanice uključene u proces remodeliranja rezultira njegovim smanjenjem (2).

ZAKLJUČAK

Svakodnevne nove spoznaje o patofiziološkim mehanizmima alergijskih bolesti doprinose njihovom boljem razumijevanju, a time i sve boljim mogućnostima liječenja. Specifična imunoterapija, iako rijetko uz primjenu kvalitetnih i dobro standardiziranih alergena

skih ekstrakata, nosi određene rizike alergijskih reakcija nakon aplikacije. Stoga se nastoje dobiti alergenski pripravci koji bi zadržali svoja imunogena svojstva, odnosno učinkovitost, uz istodobno smanjeni alergogeni potencijal. Istražuju se fizikalno-kemijskim metodama modificirani alergenski ekstrakti, molekularnim metodama dobiveni hipoalergeni pripravci alergena, male proteinske molekule koje oponašaju konformacijske epitope alergena nazvane mimotopima, kao i različite druge vrste molekula. Takva istraživanja čine imperativ za usavršavanje raspoloživih načina liječenja sve raširenijih alergijskih bolesti.

LITERATURA

1. Akdis CA. New insights into mechanisms of immunoregulation in 2007. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 700-9.
2. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 735-46.
3. Amsen D, Spilianakis CG, Flavell RA. How are T_H1 and T_H2 effector cells made? *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 153-60.
4. Yamane H, Zhu J, Paul WE. Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive $CD4^+$ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment. *J Exp Med* 2005; 202: 793-804.
5. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; 100: 655-69.
6. Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res* 2006; 16: 3-10.
7. Macaubas C, Lee PT, Smallacombe TB i sur. Reciprocal patterns of allergen-induced GATA-3 expression in peripheral blood mononuclear cells from atopics vs. non-atopics. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 97-106.
8. Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 227-35.
9. Bacchetta R, Gregori S, Roncarolo MG. $CD4^+$ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 491-6.
10. Foley SC, Préfontaine D, D'Antoni M, Hamid Q. Images in allergy and immunology: regulatory T cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 482-6.
11. Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 961-8.
12. Robinson DS, Larché M, Durham SR. Tregs and allergic disease. *J Clin Invest* 2004; 114: 1389-97.
13. Akdis M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 738-44.
14. Miyara M, Wing K, Sakaguchi S. Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3⁺ regulatory T-cell activation and expansion. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 749-55.
15. Elkord E. Role of regulatory T cells in allergy: implications for therapeutic strategy. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2006; 5: 211-7.
16. Suttmuller RPM, Offringa R, Melief CJM. Revival of the regulatory T cell: new targets for drug development. *Drug Discov Today* 2004; 9: 310-6.
17. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133: 775-87.
18. Akdis M. Immune tolerance in allergy. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 700-7.
19. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006; 25: 195-201.
20. Taylor A, Verhagen J, Akdis CA, Akdis M. T regulatory cells and allergy. *Microbes Infect* 2005; 7: 1049-55.
21. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z i sur. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human $CD4^+$ T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1701-11.
22. Stephens GL, Andersson J, Shevach EM. Distinct subsets of FoxP3⁺ regulatory T cells participate in the control of immune responses. *J Immunol* 2007; 178: 6901-11.
23. Ito T, Hanabuchi S, Wang YH i sur. Two functional subsets of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 2008; 28: 870-80.
24. O'Garra A. Development and function of IL-10-secreting regulatory T cells: comparison with naturally occurring $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells. *Int Congr Ser* 2005; 1285: 160-8.
25. Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF- β T cell-transgenic mice. *J Immunol* 2007; 178: 179-185.
26. Pyzik M, Piccirillo CA. TGF- β 1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct $CD4^+$ T cell subsets. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 335-46.
27. Mantel PY, Kuipers H, Boyman O i sur. GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF- β 1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol* 2007; 5: 2847-61.
28. Chen W, Jin W, Hardegen N i sur. Conversion of peripheral $CD4^+CD25^-$ naive T cells to $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198: 1875-86.
29. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human $CD4^+FOXP3^-$ T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor- β -dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* 2007; 110: 2983-90.
30. Yagi H, Nomura T, Nakamura K i sur. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human $CD25^+CD4^+$ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004; 16: 1643-56.
31. Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect* 2004; 6: 745-51.
32. Ziegler SF, Buckner JH. FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. *Microbes Infect* 2009; 11: 594-8.

33. Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev* 2008; 7: 370-5.
34. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EIH, Huizinga TWJ, Toes REM. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 2007; 37: 129-38.
35. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK i sur. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 2007; 19: 345-54.
36. Allan SE, Song-Zhao GX, Abraham T, McMurphy AN, LeVings MK. Inducible reprogramming of human T cells into Treg cells by a conditionally active form of FOXP3. *Eur J Immunol* 2008; 38: 3282-9.
37. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A i sur. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009; 30: 899-911.
38. Akdis M, Verhagen J, Taylor A i sur. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004; 199: 1567-75.
39. Bellinghausen I, Klostermann B, Knop J, Saloga J. Human CD4⁺CD25⁺ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress T_H1 and T_H2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 862-8.
40. Ling EM, Smith T, Nguyen XD i sur. Relation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; 363: 608-15.
41. Bellinghausen I, König B, Böttcher I, Knop J, Saloga J. Regulatory activity of human CD4⁺CD25⁺ T cells depends on allergen concentration, type of allergen and atopy status of the donor. *Immunology* 2005; 116: 103-11.
42. Shi HZ, Qin XJ. CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes in allergy and asthma. *Allergy* 2005; 60: 986-95.
43. Bellinghausen I, Brand U, Knop J, Saloga J. Comparison of allergen-stimulated dendritic cells from atopic and nonatopic donors dissecting their effect on autologous naive and memory T helper cells of such donors. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 988-96.
44. Bellinghausen I, Brand U, Steinbrink K, Enk AH, Knop J, Saloga J. Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 242-9.
45. De Wit D, Amraoui Z, Vincart B i sur. Helper T-cell responses elicited by Der p 1-pulsed dendritic cells and recombinant IL-12 in atopic and healthy subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 346-52.
46. Hammad H, Charbonnier AS, Duez C i sur. Th2 polarization by Der p 1-pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood* 2001; 98: 1135-41.
47. Charbonnier AS, Hammad H, Gosset P i sur. Der p 1-pulsed myeloid and plasmacytoid dendritic cells from house dust mite-sensitized allergic patients dysregulate the T cell response. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 91-9.
48. Rutella S, Lemoli RM. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunol Lett* 2004; 94: 11-26.
49. Smits HH, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 2005; 26: 123-9.
50. Akdis M, Trautmann A, Klunker S i sur. T helper (Th) 2 predominance in atopic diseases is due to preferential apoptosis of circulating memory/effector Th1 cells. *FASEB J* 2003; 17: 1026-35.
51. Bacharier LB, Geha RS. Molecular mechanisms of IgE regulation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: S547-58.
52. Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G i sur. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 1993; 365: 340-3.
53. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev* 1997; 77: 1033-79.
54. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R i sur. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 709-50.
55. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 780-9.
56. Jutel M, Akdis M, Blaser K, Akdis CA. Mechanisms of allergen specific immunotherapy – T-cell tolerance and more. *Allergy* 2006; 61: 796-807.
57. Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 2000; 55: 522-30.
58. André C, Fadel R. Mechanisms of allergen specific immunotherapy. *Rev Fr Allergol* 1998; 38: S227-31.
59. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wüthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998; 102: 98-106.
60. Nouri-Aria KT, Wachholz PA, Francis JN i sur. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol* 2004; 172: 3252-9.
61. Jutel M, Akdis M, Budak F i sur. IL-10 and TGF- β cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1205-14.
62. Francis JN, Till SJ, Durham SR. Induction of IL-10⁺CD4⁺CD25⁺ T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 1255-61.
63. Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR, Nouri-Aria KT. Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4⁺CD25⁺ cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 1467-72.
64. Skrindo I, Farkas L, Kvale EO, Johansen FE, Jahnsen FL. Depletion of CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} regulatory T cells does not increase allergen-driven T cell activation. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 1752-9.
65. Bellinghausen I, Knop J, Saloga J. The role of interleukin 10 in the regulation of allergic immune responses. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 126: 97-101.
66. Bellinghausen I, König B, Böttcher I, Knop J, Saloga J. Inhibition of human allergic T-helper type 2 immune responses by induced regulatory T cells requires the combination of interleukin-10-treated dendritic cells and transforming growth factor- β for their induction. *Clin Exp Allergy* 2006; 36: 1546-55.

67. Tanaka A, Ohashi Y, Kakinoki Y, Nakai Y. Immunotherapy suppresses both Th1 and Th2 responses by allergen stimulation, but suppression of the Th2 response is a more important mechanism related to the clinical efficacy of immunotherapy for perennial allergic rhinitis. *Scand J Immunol* 1998; 48: 201-11.

68. Tsai YG, Chien JW, Chen WL, Shieh JJ, Lin CY. Induced apoptosis of TH₂ lymphocytes in asthmatic children treated with *Dermatophagoides pteronyssinus* immunotherapy. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16: 602-8.

69. Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 2008; 63: 1455-63.

70. van der Neut Kofschoten M, Schuurman J, Losen M i sur. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* 2007; 317: 1554-7.

71. Wachholz PA, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4: 313-8.

SUMMARY

PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF ALLERGIC DISEASE OCCURRENCE AND TREATMENT

B. PEVEC, M. RADULOVIĆ PEVEC, A. STIPIĆ MARKOVIĆ and I. BATIŠTA¹

Department of Clinical Immunology, Pulmology and Rheumatology and ¹Immunological Laboratory, Sveti Duh University Hospital, Zagreb, Croatia

Why the exposure to the harmless and ubiquitous environmental substances causes inappropriately strong reactions of the immune system clinically manifested as allergies in some people, and how repeated exposures to the same substances during the specific immunotherapy divert immunologic reactivity, are so far only partially answered questions. The events that occur during the allergic inflammatory response are relatively well-known, as are the major operative mechanisms through which the specific immunotherapy, the only causative treatment method, changes that response. Nevertheless, everyday new findings are completing the puzzle and our understanding of these complex processes. The aim of this paper was to review the up-to-date known mechanisms of allergic disease occurrence and treatment, with regard to the key role of T cells in these processes.

Key words: allergy, specific immunotherapy, T cells, Treg, Th1, Th2, T-BET, GATA-3, FOXP3