

# Limfocyty regulatorowe

## Regulatory T Cells

MATEUSZ JAGŁA, EWA CICHOCKA-JAROSZ

Klinika Chorób Dzieci Katedry Pediatrii Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, Uniwersytecki Szpital Dziecięcy w Krakowie

### Streszczenie

Limfocyty regulatorowe ( $T_{reg}$ ) są niejednorodną fenotypowo grupą komórek odpowiedzialną za kontrolę funkcji układu immunologicznego. Komórki te odpowiadają za regulację odpowiedzi immunologicznej i odgrywają fundamentalną rolę w procesach nabywania tolerancji immunologicznej na drodze aktywnej supresji. Dotychczas wyodrębniono kilka subpopulacji komórek regulatorowych, z których do najważniejszych należą limfocyty  $CD4^+CD25^+$ , limfocyty NK oraz limfocyty  $Th_1$  i  $Tr_3$ . Mechanizm działania komórek regulatorowych opiera się o uwalanie cytokin o działaniu supresorowym (IL-10, TGF- $\beta$ ) bądź zachodzi na drodze bezpośredniego oddziaływania z komórką docelową poprzez prezentację na ich powierzchni cząstek supresyjnych. Zaburzenia działania  $T_{reg}$  odgrywają istotne znaczenie w patogenezie licznych chorób autoimmunologicznych, alergicznych czy przewlekłych zakażeń zarówno w modelach zwierzęcych, jak i u człowieka. Pełne poznanie i zrozumienie mechanizmów działania tych komórek w istotny sposób wyjaśniłoby mechanizmy kontroli aktywności układu immunologicznego, a farmakologiczna bądź immunologiczna modyfikacja ich funkcji, mogłaby w przyszłości posłużyć jako forma immunoterapii. Celem poniższego opracowania jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy o mechanizmach działania limfocytów regulatorowych, ich znaczeniu w różnorodnych zaburzeniach immunologicznych oraz przyszłych perspektywach ich klinicznego zastosowania.

**Słowa kluczowe:** limfocyty regulatorowe, limfocyty  $CD4^+CD25^+$ , limfocyty  $Tr_1$ , limfocyty  $Th_3$ , tolerancja immunologiczna

### Summary

Regulatory T cells ( $T_{reg}$ ) are a phenotypic diverse group of cells responsible for controlling the function of the immune system. These cells are responsible for regulation of immune response and play a leading role in developing immune tolerance through active suppression. To-date, several subtypes of regulatory lymphocytes have been described, the most important of them being  $CD4^+CD25^+$ , NK,  $Th_1$  lymphocytes and  $Tr_3$  cells. The mechanism, by which regulatory T cells function is dependent on the release of suppressive cytokine (IL-10, TGF- $\beta$ ) or is mediated by cell-to-cell interaction via suppressive surface molecules. Abnormalities in the function of regulatory T cells are important in pathogenesis of numerous autoimmune, allergic and chronic infectious diseases both in animal and human studies. Gaining a full understanding of the physiology of these cells will be helpful in explaining mechanisms important in controlling the immune system activity, and the immunologic or pharmacologic modification of their function may be useful in the future as a new approach to immunotherapy. The objective of this review is to clarify the physiology of regulatory cells, explain their role in various immunologic diseases and show future perspectives for their clinical application.

**Key words:** Regulatory T cells, lymphocytes  $CD4^+CD25^+$ , lymphocytes  $Tr_1$ , lymphocytes  $Th_3$ , immunotolerance

© Alergia Astma Immunologia, 2006, 12(1): 175-182

www.mediton.pl/aa

Nadesłano: 02.08.2006

Zakwalifikowano do druku: 16.09.2006

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Mateusz Jagła

Klinika Chorób Dzieci, Uniwersytecki Szpital Dziecięcy w Krakowie

ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków

tel. (12) 658 20 11 wew.1612, fax (12) 658 44 46

e-mail: mjadla@cm-uj.krakow.pl

### Wykaz skrótów używanych w tekście:

AHR (*airway hyperresponsiveness*) – nadreaktywność dróg oddechowych

APC (*antigen presenting cell*) – komórka prezentująca antygen

DC (*dendritic cell*) – komórka dendrytyczna

NK (*natural killer*) – limfocyt typu naturalnego zabójcy

SCID (*severe combined immunodeficiency*) – ciężki złożony niedobór odporności

TCR (*T-cell receptor*) – receptor limfocytów T

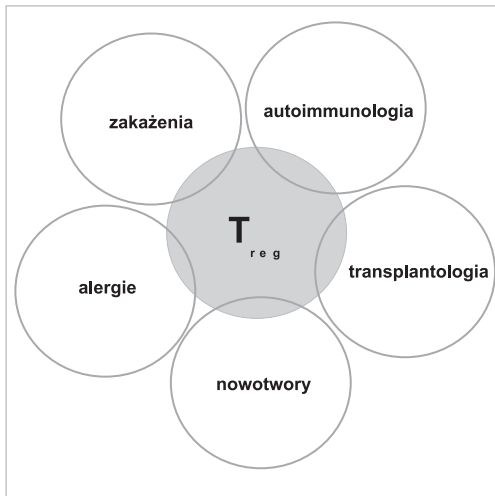
$Th_3$  (*helper T-cells type 3*) – limfocyt pomocniczy typu 3

$Tr_1$  (*regulatory T-cells type 1*) – limfocyt regulatorowy typu 1

$T_{reg}$  (*regulatory T cells*) – limfocyty regulatorowe

### Wstęp

Układ immunologiczny wypracował szereg metod pozwalających na kontrolę stopnia nasilenia antygenowo-swoistej odpowiedzi immunologicznej. Właściwie zrównoważona odpowiedź immunologiczna ma bowiem kluczowe znaczenie dla sprawnego rozpoznawania i eliminacji obcych antygenów, gwarantując równocześnie bezpieczeństwo tkanek i narządów gospodarza (ryc. 1). W grasicy dochodzi do delecji klonalnej autoreaktywnych limfocytów, podczas gdy w obwodowych narządach układu immunologicznego tolerancja nabywana jest na drodze anergii bądź poprzez aktywną supresję z udziałem limfocytów regulatorowych (supresorowych).



Ryc. 1. Udział limfocytów regulatorowych w różnych funkcjach układu immunologicznego

Limfocyty regulatorowe ( $T_{reg}$ ) stanowią niejednorodną fenotypowo grupę komórek odpowiedzialnych za kontrolę funkcji układu immunologicznego na drodze aktywnej supresji. Funkcjonalnie w obrębie tej populacji można wyróżnić dwie podgrupy komórek. W pierwszej, działanie supresorowe wymaga bezpośredniego kontaktu z komórką docelową i związane jest molekułami powierzchniowymi (np.: GITR, CTLA-4), natomiast w drugiej, mechanizm działania oparty jest o produkcję i uwalnianie supresyjnych cytokin (IL-10, TGF- $\beta$ ). Od szeregu lat trwają intensywne badania nad licznymi populacjami limfocytów supresorowych, najwięcej danych dotyczy jednak limfocytów  $CD4^+CD25^+$ ,  $Th_3$ ,  $Tr_1$  i NK (tab. I).

**Charakterystyka poszczególnych populacji limfocytów regulatorowych**

**Limfocyty  $CD4^+CD25^+$**

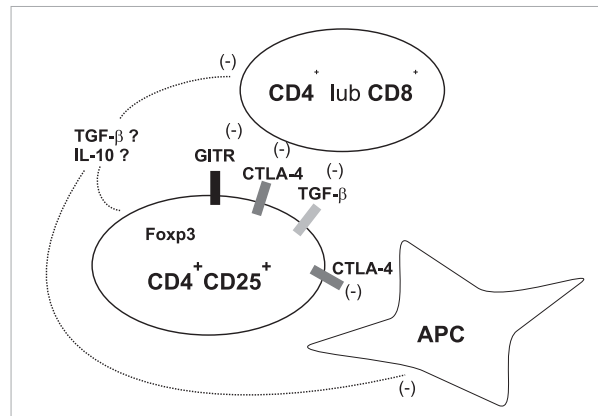
W latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku Sakagushi i wsp. wykazali na powierzchni błony komórkowej około 10% limfocytów  $CD4^+$  obecność łańcucha  $\alpha$  receptora dla IL-2 (CD25). Przeszczep limfocytów T pozbawionych populacji  $CD4^+CD25^+$  bezgranicznie (*null*) myszom prowadził do wystąpienia schorzeń autoimmunologicznych, których rozwój mógł być powstrzymany

Tabela I. Typy komórek regulatorowych

Typ limfocyta	Profil uwalnianych cytokin	Marker powierzchniowy	Komentarz
$Th_3$	TGF- $\beta$	CD4	Supresyjne działanie oparte o uwalnianie TGF- $\beta$ . Odgrywają kluczowe znaczenie w tolerancji antygenów pokarmowych
$Tr_1$	IL-10	CD4, CCR7, CD25-	Mechanizm działania oparty na uwalnianiu supresyjnych cytokin (IL-10, TGF- $\beta$ ) hamujących aktywność $Th_1$ , $Th_2$ , APC oraz ograniczających proliferację $Th_0$
$CD4^+CD25^+$	IL-10, TGF- $\beta$	CD4, CD25, CD45RO, CD122, GITR, CTLA-4	Wydzielają niewielkie ilości cytokin supresyjnych (IL-10, TGF- $\beta$ ), brak jednak dowodów potwierdzających ich znaczenie w mechanizmie działania komórek $CD4^+CD25^+$ . Działanie supresyjne uzależnione jest od ekspresji na powierzchni limfocyta cząstek supresyjnych i bezpośredniego kontaktu z komórką docelową
NK	IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$	CD4 lub $CD4^+CD8^+$ CD161c, NKR-P1	Wykazują działanie wielokierunkowe, mogą prowadzić do supresji lub aktywacji odpowiedzi immunologicznej. Szeroki profil uwalnianych cytokin

poprzez wstrzyknięcie oczyszczonej populacji  $CD4^+CD25^+$  [1]. W ciągu ostatniej dekady w licznych badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano regulatorowe działanie limfocytów  $CD4^+CD25^+$ , potwierdzając tym samym ich kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej. U człowieka w obrębie powyższej subpopulacji można wyróżnić grupę komórek o wysokiej ekspresji CD25 oraz  $CD45RO^+$ , które jako jedyne wykazują właściwe działanie supresorowe [2]. Mimo tych obserwacji większość badań wskazuje  $CD25^+$  jako marker swoisty dla limfocytów regulatorowych [2,3,4].

Zasadniczy mechanizm supresyjnego działania limfocytów  $CD4^+CD25^+$  opiera się o bezpośrednie oddziaływanie na komórkę docelową. Po pobudzeniu receptora limfocytów T (*T cell receptor* – TCR), komórki  $CD4^+CD25^+$  na drodze aktywnej supresji hamują aktywność i proliferację limfocytów  $CD4^+$  i  $CD8^+$  [5,6]. Istnieją także pojedyncze publikacje mówiące o możliwości pośredniego działania supresyjnego poprzez wpływ na komórki prezentujące antygen (*antigen presenting cells* – APC) bądź poprzez uwalnianie przez komórki  $CD4^+CD25^+$  cytokin supresyjnych (IL-10) (ryc. 2) [6,7].



Ryc. 2. Postulowany mechanizm działania supresyjnego limfocytów  $CD4^+CD25^+$

Wśród najważniejszych molekuł powierzchniowych biorących udział w aktywnej supresji wymieniane są GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*), CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) oraz

TGF- $\beta$  związane z błoną komórkową [6,8,9,10,11]. W najnowszych badaniach podkreślana jest rola czynnika transkrypcyjnego Foxp3, którego ekspresja jest swoista dla komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> i konieczna do ich właściwego różnicowania (tab. II) [12,13].

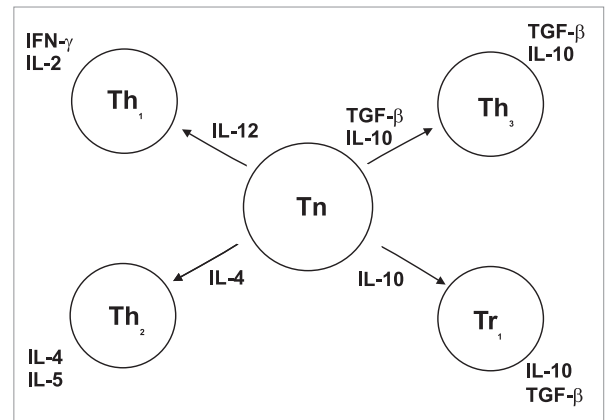
### Limfocyty Th<sub>3</sub>

Komórki Th<sub>3</sub> zostały opisane w pracach Chen i wsp. jako subpopulacja limfocytów CD4<sup>+</sup> powstająca w węzłach chłonnych krezkowych po ekspozycji na doustny antygen [14]. Komórki te odgrywają kluczową rolę w rozwoju tolerancji immunologicznej na antygeny pokarmowe, a zaburzenia ich funkcji mogą wywoływać różnorodne schorzenia autoimmunologiczne u zwierząt i ludzi [15].

Różnicowanie natywnych limfocytów Tn w kierunku Th<sub>3</sub> wymaga prezentacji antygeny przez APC i kostymulacji przy udziale cząstki CD86 lub CD80. Komórki dendrytyczne, pełniące rolę najważniejszych komórek prezentujących antygen w przewodzie pokarmowym, ukierunkowują różnicowanie limfocytów Th<sub>0</sub> w kierunku Th<sub>3</sub> [16,17]. Obecność TGF- $\beta$  lub IL-4 promuje powstawanie Th<sub>3</sub> bezpośrednio, natomiast stosowanie przeciwciał monoklonalnych anti-IL-2 lub anti-IL-10 może pośrednio nasilać powstawanie Th<sub>3</sub> poprzez hamowanie różnicowania w kierunku Th<sub>1</sub> [18]. Mechanizm działania supresyjnego limfocytów Th<sub>3</sub> oparty jest w głównej mierze o uwalnianie TGF- $\beta$  oraz, w mniejszym stopniu, IL-10 [7,19]. Istniejące funkcjonalne podobieństwo pomiędzy limfocytami Th<sub>3</sub> i Tr<sub>1</sub> wymaga dalszych badań, natomiast różnice w mechanizmach działania Th<sub>3</sub> i limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pozwalają na wyraźne odróżnienie tych subpopulacji (ryc. 2) [8].

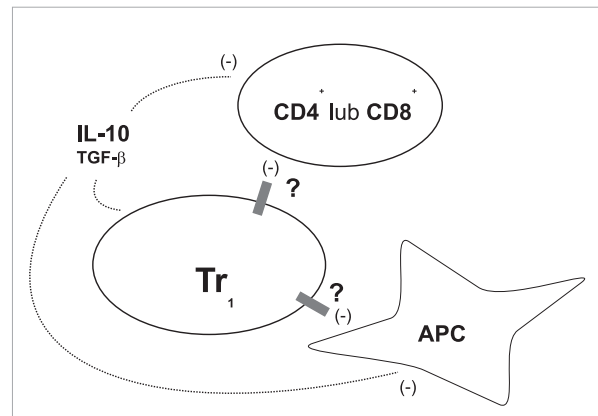
### Limfocyty Tr<sub>1</sub>

Groux i wsp. wykazali, że długotrwała stymulacja limfocytów CD4<sup>+</sup> w środowisku IL-10 prowadzi do różnicowania natywnych limfocytów T w kierunku o niskim potencjale proliferacyjnym, uwalniających IL-10 oraz niewielkie ilości IL-2. Limfocyty te wykazywały właściwości supresorowe, hamując eksperymentalne, autoimmunologiczne zapalenie jelita grubego u myszy z ciężkim złożonym niedoborem odporności (*severe combined immunodeficiency* – SCID) [20]. Komórki te określono mianem limfocytów regulatorowych typu pierwszego (Tr<sub>1</sub>). Późniejsze badania wykazały, że uwalniają one również inne cytokiny supresyjne (TGF- $\beta$ ), prezentują swoiste receptory chemokinowe (CCR7) oraz proliferują pod wpływem IL-15 [21].



Ryc. 3. Różnicowanie limfocytów Tr<sub>1</sub> i Th<sub>3</sub>

Podobnie jak w przypadku limfocytów Th<sub>1</sub>, Th<sub>2</sub> i Th<sub>3</sub> prekursorami komórek Tr<sub>1</sub> są natywne limfocyty T, których kierunki różnicowania uzależnione są od lokalnego stężenia cytokin (ryc. 3) [22,23]. Wykazano także, że związki o działaniu immunosupresyjnym, takie jak aktywna postać witaminy D (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) czy deksametazon, indukują różnicowanie limfocytów T w kierunku Tr<sub>1</sub> *in vitro* [24]. Wyniki licznych obserwacji dowodzą, że limfocyty Tr<sub>1</sub> biorą czynny udział w mechanizmach regulacyjnych antygenowo-swoistej odpowiedzi immunologicznej i ograniczają proliferację limfocytów T *in vivo* głównie poprzez uwalnianie IL-10 i TGF- $\beta$  (ryc. 4) [25,26]. Supresyjne właściwości limfocytów Tr<sub>1</sub> są znoszone w obecności przeciwciał monoklonalnych anti-IL-10 lub anti-TGF- $\beta$  [25]. Istnieją również pewne dowody wskazujące na możliwość bezpośredniego oddziaływania limfocytów Tr<sub>1</sub> na komórki prezentujące antygen [25].



Ryc. 4. Postulowany mechanizm działania supresyjnego limfocytów Tr<sub>1</sub>

Tabela II. Charakterystyka wybranych markerów komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (pism)

Foxp3	Czynnik transkrypcyjny Foxp3 ( <i>forkhead transcription factor</i> ) jest specyficzny dla komórek CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , warunkuje ich różnicowanie. Dotychczas najbardziej swoisty marker CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>
GITR	GITR ( <i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor</i> ) jest powierzchniowym, konstytutywnym białkiem o działaniu supresyjnym
CTLA-4	CTLA-4 ( <i>cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i> ) jest niezbędnym białkiem zarówno w trakcie różnicowania, jak i w fazie efektorowej komórek CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>

Właściwości regulatorowe komórek  $Tr_1$  zostały potwierdzone w licznych modelach zwierzęcych, wykazano również ich znacznie w chorobach alergicznych, przewlekłych zakażeniach i transplantologii człowieka.

Wzajemne relacje pomiędzy komórkami  $Th_3$  i  $Tr_1$  nie są jasne, konieczne są dalsze badania pozwalające na ściśle określenie różnic i podobieństw pomiędzy powyższymi subpopulacjami limfocytów. Mechanizm działania supresyjnego obu grup komórek jest podobny i opiera się głównie o uwalnianie IL-10 i TGF- $\beta$ . W badaniach grupy Foussata jednoznacznie udowodniono odmienny mechanizm działania limfocytów  $CD4^+CD25^+$  i komórek  $Tr_1$ , potwierdzając tym samym różnice pomiędzy obu powyższymi subpopulacjami limfocytów regulatorowych [27].

### Limfocyty NK

Limfocyty NK zostały zidentyfikowane w latach pięćdziesiątych poprzedniego stulecia jako efektorowy składnik nieswoistej odpowiedzi immunologicznej. Komórki NK są populacją limfocytów, dla których charakterystyczny jest brak interakcji TCR z peptydami prezentowanymi w kontekście klasycznych antygenów zgodności tkankowej klasy I lub II. Komórki te posiadają natomiast unikatową możliwość rozpoznawania glikolipidów prezentowanych przez CD1d, nietypową cząstkę prezentującą. Identyfikacja limfocytów NK możliwa jest dzięki swoistym markerom błonowym (CD161c, NKR-P1) [28,29].

Poza potencjalnymi możliwościami działania cytotoksycznego, limfocyty NK biorą także udział w regulacji komórkowej odpowiedzi immunologicznej poprzez uwalnianie szeregu cytokin takich jak IL-4, IL-10, IL-13 oraz IFN- $\gamma$  i TNF [30]. W przeciwieństwie do innych  $T_{reg}$  regulacyjne działanie komórek NK nie ogranicza się jedynie do działania supresyjnego, niekiedy może bowiem prowadzić do nasilenia odpowiedzi immunologicznej. Wynika to z różnorodności poszczególnych subpopulacji komórek NK oraz zmienności profilu uwalnianych cytokin, uzależnionej m.in. od zewnętrznych sygnałów pobudzających czy też typu antygeny pobudzającego TCR.

Pobudzenie komórek NK może zatem w części przypadków prowadzić do działania supresyjnego, wywołanego produkcją profilu cytokin typowych dla  $Th_2$  lub IL-10, z kolei w innych modelach nasila odpowiedź immunologiczną poprzez uwalnianie cytokin charakterystycznych dla  $Th_1$  [31,32]. Opisywano również przypadki jednoczesnej produkcji obu grup cytokin przez zaktywowane limfocyty NK [33]. Dotychczas ostatecznie nie wyjaśniono mechanizmów odpowiedzialnych za polaryzację odpowiedzi komórek NK, a tym samym nie określono roli limfocytów NK w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Właściwości regulacyjne powyższych komórek zostały jednak wykazane w licznych chorobach autoimmunologicznych, alergicznych, zapalnych i nowotworowych oraz w nabywaniu tolerancji na tkanki przeszczepione.

## Rola limfocytów regulatorowych w patofizjologii wybranych chorób

### Limfocyty regulatorowe w chorobach autoimmunologicznych

Znaczenie limfocytów regulatorowych w schorzeniach autoimmunologicznych u człowieka nie jest do końca jasne. Pewne obserwacje kliniczne, wyniki badań przeprowadzonych *in vitro*, eksperymenty na zwierzętach oraz pojedyncze doniesienia o próbach immunoterapii modulujących funkcję limfocytów regulatorowych przemawiają za ich istotnym znaczeniem w zaburzeniach tolerancji immunologicznej na antygeny własne. Najczęściej opisywane są zaburzenia funkcji limfocytów  $CD4^+CD25^+$ , choć wykazano także przypadki dysfunkcji innych subpopulacji limfocytów regulatorowych m.in.  $Tr_1$  czy  $Th_3$ .

U zwierząt jednoznacznie wykazano związek pomiędzy utratą czynności limfocytów regulatorowych a występowaniem zapalenia jelita grubego, cukrzycy typu 1, zapalenia żołądka czy tarczycy [1,34]. U ludzi z zespołem delecji 22q11, którego integralną częścią jest wrodzona aplazja lub hipoplazja grasicy, częściej dochodzi do schorzeń autoimmunologicznych, choć ścisły mechanizm tego zjawiska nie jest wyjaśniony [35,36]. Zaburzenia funkcji komórek  $CD4^+CD25^+$  wykazano u ludzi chorujących na stwardnienie rozsiane, w zespole Kawasaki czy autoimmunologicznym zespole wielogruczołowym typu 2 [2,37,38]. Podobne zaburzenia funkcji limfocytów, z towarzyszącą zmniejszoną ekspresją Foxp3, stwierdzono także u pacjentów z miastenią [39]. U pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów oraz postacią nielicznostawową młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów zwiększona liczba komórek  $CD4^+CD25^+$  w zajętych stawach wiązała się z lepszym rokowaniem [40,41]. Owocem powyższych odkryć są próby immunoterapii wykorzystujące działanie limfocytów regulatorowych do modulacji odpowiedzi immunologicznej w schorzeniach autoimmunologicznych [42,43]. U pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów doustna immunoterapia z wykorzystaniem autoantygenów prowadziła do supresji proliferacji autoreaktywnych limfocytów, nasilenia ekspresji Foxp3 i zmiany profilu uwalnianych cytokin z  $Th_1$  na  $Th_2$  [43].

Istnieją również dowody sugerujące zaburzenia działania limfocytów regulatorowych  $CD4^+CD25^+$  lub  $Tr_1$  w pęcherzycy zwyczajnej i pemfigoidzie u człowieka [44,45]. W modelu zwierzęcym komórki  $Tr_1$  hamują ponadto rozwój autoimmunologicznego zapalenia jelita grubego [44]. Wykazano również, że stosowanie witaminy D, nasilającej różnicowanie natywnych limfocytów  $CD4^+$  w kierunku  $Tr_1$ , może odgrywać pewną rolę terapeutyczną u części pacjentów ze stwardnieniem guzowatym, reumatoidalnym zapaleniem stawów czy cukrzycą [47].

Zaburzenia funkcji regulatorowych komórek NK prowadzą u myszy do wystąpienia cukrzycy typu 1,

reumatoidalnego zapalenia stawów, autoimmunologicznego zapalenia jelita grubego czy tocznia trzewnego, natomiast u ludzi mogą wywoływać stwardnienie rozsiane i cukrzycę typu 1 [48,49,50,51]. Brak dotychczas danych na temat możliwości terapeutycznego zastosowania komórek NK do modyfikacji odpowiedzi immunologicznej.

### **Limfocyty regulatorowe w zakażeniach**

Zaburzenia czynności limfocytów regulatorowych w trakcie zakażenia mogą prowadzić do różnorodnych niekorzystnych konsekwencji dla ustroju. Nadmierne ich pobudzenie może prowadzić do ograniczenia odpowiedzi immunologicznej i tym samym może utrudniać eliminację patogenów, co z kolei predysponuje do przewlekłego lub nawrotowego zakażenia. Z drugiej jednak strony, upośledzona funkcja komórek regulatorowych na wczesnym etapie ostrego zakażenia, może być przyczyną nadmiernej, niekontrolowanej odpowiedzi immunologicznej z towarzyszącym uszkodzeniem własnych tkanek. Zachowanie równowagi pomiędzy komórkami regulatorowymi i efektorowymi jest zatem zasadniczym mechanizmem kontrolującym stopień nasilenia odpowiedzi immunologicznej podczas infekcji [52].

Na mysim modelu malarii przeżycie zarodźców możliwe jest dzięki supresyjnemu działaniu komórek  $CD4^+CD25^+$ , prowadzącemu tym samym do przewlekłego zakażenia [53]. W badaniach dotyczących przewlekłego zakażenia retrowirusowego (Friend) oraz zakażenia HCV u ludzi komórki  $CD4^+CD25^+$  hamują przeciwwirusową odpowiedź immunologiczną [54,55]. Ponadto u człowieka wykazano, że liczba komórek  $T_{reg} CD4^+CD25^+$  w krwi obwodowej wykazuje ujemną korelację ze stopniem uszkodzenia wątroby w wirusowym zapaleniu wątroby typu C [56]. Powyższe obserwacje wskazują na kluczową rolę odpowiedzi immunologicznej w mechanizmie uszkodzenia wątroby w trakcie zakażenia HCV. Na modelu zakażenia *Pneumocystis carinii* u myszy wykazano, że limfocyty  $CD4^+CD25^+$  wykazują działanie ochronne, hamując nadmierną odpowiedź komórek efektorowych wywołaną zakażeniem [57]. Niektóre patogeny mogą bezpośrednio atakować komórki supresorowe upośledzając tym samym regulację odpowiedzi immunologicznej. Wykazano, że deplecja komórek  $CD4^+CD25^+$  spowodowana zakażeniem HIV może prowadzić do postępu choroby [58].

### **Limfocyty regulatorowe w transplantologii**

Udział limfocytów regulatorowych w nabywaniu tolerancji na przeszczep postulowany był od dawna, jednak dopiero wyniki ostatnich badań pozwoliły ostatecznie potwierdzić wcześniejsze przypuszczenia. Znaczenie limfocytów NK w transplantologii zostało wykazane w badaniach przeprowadzanych u pacjentów po przeszczepie szpiku kostnego, u których stwierdzono, że komórki NK jako naturalne komórki regulatorowe, hamują reakcję typu

przeszczep przeciwko biocy (graft versus host – GvH) [59]. Wykazano także znaczenie tych komórek w indukcji tolerancji immunologicznej na allogeniczny przeszczep rogówki i serca u myszy [60,61].

Dotychczasowe stosowanie allopeptydów siedem dni przed przeszczepem serca wiązało się z przedłużonym przeżyciem przeszczepu u myszy [62]. Mechanizm tego zjawiska zbliżony był do indukcji limfocytów  $Tr_1$  sugerując również udział tych komórek w nabywaniu tolerancji na przeszczep.

Znaczenie limfocytów  $CD4^+CD25^+$  w nabywaniu tolerancji na przeszczep wydaje się być głównie pośrednie, choć wykazano tworzenie allospecyficznego  $CD4^+CD25^+$  hamujących bezpośrednio wystąpienie reakcji *GvH* po allogenicznym przeszczepie szpiku [63].

### **Limfocyty regulatorowe w chorobach alergicznych**

Rola  $T_{reg}$  zaznacza się zarówno w patofizjologii chorób alergicznych, jak i w możliwościach ich leczenia. Limfocyty  $Th_3$  funkcjonalnie wydają się być związane przede wszystkim z immunotolerancją w zakresie przewodu pokarmowego, podczas gdy fenotyp  $Tr_1$  z układem oddechowym. Wynika to z faktu, że komórki dendrytyczne (*dendritic cells* – DC) układu oddechowego wytwarzają jedynie IL-10, niezbędną do powstania  $Tr_1$ , podczas gdy DC przewodu pokarmowego wytwarzają zarówno IL-10 jak i TGF $\beta$  potrzebne do tworzenia komórek linii  $Th_3$ . Wykazano, że w drogach oddechowych fenotyp  $Tr_1$  hamuje zarówno odpowiedź  $Th_2$  jak i  $Th_1$  oraz wpływa na nadreaktywność dróg oddechowych (*airway hyperresponsiveness* – AHR). U chorych w trakcie wczesnego etapu immunoterapii swoistej dochodzi *in vivo* do tworzenia subpopulacji komórek  $Tr_1$  (tzw. indukowanych), co wskazuje, że bodźcem stymulującym ich syntezę są wysokie i wzrastające dawki alergenu. Komórki NK odgrywają istotną rolę w rozwoju AHR u myszy, ich rola u ludzi w przebiegu astmy i innych chorób alergicznych jest niejednoznaczna [64]. Komórki  $CD4^+CD25^+$ , zwane także konstytutywnymi, hamują dojrzewanie komórek  $Th_2$  poprzez zahamowanie syntezy IL-4, wywołują supresję odpowiedzi  $Th_2$  w drogach oddechowych (poprzez bezpośredni kontakt z komórką  $Th_2$ , wytwarzanie IL-10 i TGF $\beta$ ), hamują rozwój zapalenia eozynofilowego. Badania na zwierzętach wskazują na rolę  $CD4^+CD25^+$  w indukcji długofalowej tolerancji błon komórkowych [65]. U zdrowych osobników obserwuje się wyższe stężenie komórek  $CD4^+CD25^+$  produkujących IL-10 w porównaniu do tych z chorobami alergicznymi i astmą. Jeśli zdrowe osobniki zostaną pozbawione komórek  $CD4^+CD25^+$  nasila się proliferacja i odpowiedź  $Th_2$  po stymulacji alergenami mleka, niku, traw, co wskazuje na aktywne działanie supresyjne  $CD4^+CD25^+$  w stosunku do alergenowo swoistych komórek  $Th_2$  [66]. W badaniach u dzieci chorych na astmę wykazano zmniejszoną ekspresję mRNA dla Foxp3 i SOCS1 (*suppressor of cytokine signal 1*), jako

markerów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, co sugeruje związek pomiędzy obniżeniem odsetka komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> a patogenezą astmy [67]. Coraz liczniejsze badania wskazują na związek odpowiedzi limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> z glikokortykosteroidoterapią. Wykazano zależność pomiędzy obniżeniem syntezy IL-10 przez T<sub>reg</sub> ze słabą odpowiedzią na glikokortykosteroidy (GKS), oraz znamienny wzrost ekspresji mRNA dla Foxp3 i IL-10 u chorych na astmę leczonych wziewnymi lub systemowymi glikokortykosteroidami [68,69]. Także połączenia GKS z innymi lekami immunomodulującymi m.in. takimi jak 1,25(OH)<sub>2</sub>D3, mykofenolan mofetylu czy agoniści receptorów β-adrenergicznych wykazują wpływ stymulujący na T<sub>reg</sub> [66].

Przykładem jednostki chorobowej, w której wskutek mutacji czynnika transkrypcyjnego Foxp3, dochodzi do izolowanego braku subpopulacji o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> jest zespół XLAAD/IPEX. Obok objawów autoimmunologicznych, jak zapalenie tarczycy, cukrzyca typu I, zapalenie stawów, występują w nim zaburzenia immunologiczne skojarzone z chromosomem X, objawy nasilonego wyprysku, enteropatii oraz podwyższone stężenie całkowitych IgE i eozynofilia [70].

Doniesienia ostatnich kilku lat wskazują na zasadniczą rolę limfocytów regulatorowych o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> w mechanizmach wytwarzania immunotolerancji pod wpływem immunoterapii swoistej zarówno u chorych odczulanych na alergen inhalacyjny, jak i na jady owadów błonkoskrzydłych. Uwalniane przez nie i oddziaływujące w mikrośrodkowisku cytokiny IL-10 oraz TGF-β wpływają na obniżenie aktywności (*down regulation*) alergenowo-swoistych limfocytów T, powodując przesunięcie równowagi fenotypów limfocytów pomocniczych z Th<sub>2</sub> w kierunku Th<sub>1</sub> [71].

Na podstawie ostatnich badań u chorych dorosłych można przypuszczać, że subpopulacje konstytutywnych limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> oraz indukowanych Tr<sub>1</sub> nakładają się na siebie i część komórek Tr<sub>1</sub> wykazuje także ekspresję cząstki CD25 [72].

Powszechne zainteresowanie patofizjologią limfocytów regulatorowych wynika z możliwości terapeutycznego wykorzystania tych komórek jako czynnika modyfikującego odpowiedź immunologiczną w różnorodnych chorobach. Osłabienie czy zniesienie ich działania może posłużyć jako narzędzie nasilające odpowiedź układu odpornościowego skierowaną przeciw komórkom nowotworowym czy obcym antygenom, jak również może poprawiać odpowiedź na szczepienia. Z kolei aktywacja tych komórek mogłaby przyczynić się do hamowania odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw autoantygenom, ograniczać reakcje alergiczne czy indukować tolerancję przeszczepów. Pierwsze próby terapeutycznego wykorzystania limfocytów regulatorowych wydają się obiecujące, jednakże konieczne są dalsze badania pogłębiające wiedzę na temat mechanizmów i efektów ich działania, bowiem niewłaściwe zastosowanie tych komórek może okazać się niebezpieczne, prowadząc do zaburzeń regulacji odpowiedzi immunologicznej. Szczególnym wyzwaniem dla przyszłych badań jest ostateczne wyjaśnienie mechanizmów supresorowego działania poszczególnych subpopulacji limfocytów regulatorowych oraz ścisłego określenia ich fenotypu i pochodzenia. Osiągnięcia biologii molekularnej oraz możliwości inżynierii genetycznej wydają się kluczowym narzędziem pomocnym w modyfikowaniu funkcji limfocytów regulatorowych oraz ich terapeutycznym zastosowaniu.

## Piśmiennictwo

1. Sakagushi S, Sakagushi N, Asano M i wsp. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25), breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune disease. *Journal of Immunology*. 1995; 155: 1151-1164.
2. Holm T, Nielsen J, Claesson M. CD4CD25 regulatory T cells: Phenotype and physiology. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2004; 112: 629-641.
3. McHugh R, Shevach E. The role of suppressor T cells in regulation of immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2002; 110: 693-702.
4. Shi H, Qin X. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes in allergy and asthma. *Allergy*. 2005; 60: 986-995.
5. Thornton A, Shevach E. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *Journal of Experimental Medicine*. 1998; 188: 287-296.
6. Boehmer von H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature Immunology*. 2005; 5: 338-344.
7. Asseman C, Mauze S, Leach M i wsp. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*. 1999; 190: 995-1004.
8. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells is mediated by cell surface-bound transforming growth-factor beta. *Journal of Experimental Medicine*. 2001; 194: 629-644.
9. Shi H, Qin X. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes in allergy and asthma. *Allergy*. 2005; 60: 986-995.
10. Seroogy C, Gern J. The role of T regulatory cells in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005; 116: 996-999.
11. McHugh R, Whitters M, Piccirillo C i wsp. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. 2002; 16: 311-323.
12. Ziegler S. Foxp3: Of mice and man. *Annual review of immunology*. 2006; 24: 209-26.
13. Mantel PY, Ouaked N, Ruckert B i wsp. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *Journal of Immunology*. 2006; 176: 3593-3602.

14. Chen Y, Kuchroo V, Inobe J i wsp. Regulatory T-cell clones induced by oral tolerance suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. 1994; 265: 1237-1240.
15. Weiner H. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- $\beta$ -secreting Th3 regulatory cells. *Immunological Reviews*. 2001; 182: 207-214.
16. Everson M, Lemak D, McGhee J i wsp. FACS-sorted spleen and Peyer's patch dendritic cells induced different response in T<sub>h</sub> clones. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1997; 417: 357-362.
17. Weiner H. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF- $\beta$ -secreting regulatory cells. *Microbes Infectious*. 2001; 11: 947-954.
18. Seder R i wsp. Factor involved in the differentiation of TGF- $\beta$ -producing cells from naive CD4<sup>+</sup> T-cells: IL-4 i IFN- $\gamma$  have opposing effects, while TGF- $\beta$  positively regulates its own production. *Journal of Immunology*. 1998; 160: 5719-5728.
19. Akbari O, Stock P, DeKruyff R i wsp. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Current Opinion in Immunology*. 2003; 15: 627-633.
20. Groux H, O'Garra A, Bigler M i wsp. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997; 389: 737-742.
21. Roncarolo M, Bacchetta R, Bordignon C i wsp. Type 1 T regulatory cells. *Immunological Reviews*. 2001; 182: 68-79.
22. Fleisher T, Oliveira J. Functional and molecular evaluation of lymphocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004; 114: 227-234.
23. Umetsu D, Akbari O, DeKruyff H. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003; 112: 480-487.
24. Barrat F, Cua D, Boonstra A i wsp. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *Journal of Experimental Medicine*. 2002; 195 :603-616.
25. Cottrez F, Hurst S, Coffman R i wsp. T Regulatory Cells 1 Inhibit a Th2-Specific Response In Vivo. *Journal of Immunology*. 2000; 165: 4848-4853.
26. Zeller J i wsp. Induction of CD4<sup>+</sup> T cell allo-antigen hyporesponsiveness by IL-10 and TGF- $\beta$ . *Journal of Immunology*. 1999; 163: 3684-3691.
27. Foussat A, Cottrez F, Brun V i wsp. A Comparative Study between T Regulatory Type 1 and CD4CD25 T Cells in the Control of Inflammation. *Journal of Immunology*. 2003; 171: 5018-5026.
28. Godfrey D, MacDonald H, Kronenberg M i wsp. NKT cells: what's in a name? *Nature Reviews Immunology*. 2004; 4: 231-237.
29. Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nature Reviews Immunology*. 2002; 2: 557-568.
30. Godfrey D, Kronenberg M. Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *Journal of Clinical Investigation*. 2004; 114: 1379-1388.
31. Smyth M, Godfrey D. NKT cells and tumor immunity – a double-edged sword. *Nature Immunology*. 2000; 1: 459-460.
32. Wilson S, Delovitch T. Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumor immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2003; 3: 211-222.
33. Matsuda J i wsp. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *Journal of Experimental Medicine*. 2000; 192: 741-754.
34. Lan R, Ansarib A, Liana Z i wsp. Regulatory T cells: Development, function and role in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 2005; 4: 351-363.
35. Online Mendelian Inheritance in Man; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>
36. Yamagishi H. The 22q11 deletion syndrome. *Keio Journal of Medicine*. 2002; 51: 77-88.
37. Kriegel M, Lohmann T, Gabler C i wsp. Defective suppression function of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *Journal of Experimental Medicine*. 2004; 199: 1285-1291.
38. Viglieta V, Baecher-Allan C, Weiner H i wsp. Loss of functional suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cells in patients with multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*. 2004; 199: 971-979.
39. Balandina A, Lecart S, Dartevelle P i wsp. Functional defect of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood*. 2005; 105: 735-741.
40. Cao D, van Vollenhoven R, Klareskog L i wsp. CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Research and Therapy*. 2004; 6: 335-346.
41. Kleer de I, Wedderburn L, Taams i wsp. CD4<sup>+</sup>CD25bright Regulatory T Cells Actively Regulate Inflammation in the Joints of Patients with the Remitting Form of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Journal of Immunology*. 2004; 172: 6435-6443.
42. Chen Y, Inobe JI, Kuchroo V i wsp. Oral tolerance in myelin basic protein T-cell receptor transgenic mice: Suppression of autoimmune encephalomyelitis and dose-dependent induction of regulatory cells. *Immunology*. 1996; 93: 388-391.
43. Prakken B, Samodal R, Lee T i wsp. Epitope-specific immunotherapy induce immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101: 4228-4233.
44. Hertl M, Eming R, Veldman C. T cell control in autoimmune bullous skin disorders. *Journal of Clinical Investigation*. 2006; 116:1150-1166.
45. Veldman C, Hohne A, Dieckmann D i wsp. Type I Regulatory T Cells Specific for Desmoglein 3 Are More Frequently Detected in Healthy Individuals than in Patients with Pemphigus Vulgaris. *Journal of Immunology*. 2004; 172: 6468-6475.
46. Groux H, O'Garra A, Bigler M i wsp. CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997; 389: 737-742.
47. Zittermann A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *British Journal of Nutrition*. 2003; 89: 552-572.
48. Jiang S, Lechler R. Regulatory T Cells in the Control of Transplantation Tolerance and Autoimmunity. *American Journal of Transplantation*. 2003; 3: 516-524.
49. Zeng D, Lee MK, Tung J i wsp. A role for CD1 in pathogenesis of lupus in NZB/NZW mice. *Journal of Immunology*. 2000; 164: 5000-5004.
50. Hong S, Wilson M, Serizawa I i wsp. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide treatment prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nature Medicine*. 2001; 7: 1067-1056.
51. Sharif S, Arreaza G, Zucker P i wsp. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nature Medicine*. 2001; 7: 1057-1062.

52. Chatila T. Role of regulatory T cells in human diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005; 116: 949-959.
53. Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D i wsp. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nature Medicine*. 2004; 10:29-30.
54. Iwashiro M, Messer R, Peterson K i wsp. Immunosuppression by CD4 regulatory cells induced by chronic retroviral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98: 9226-9230.
55. McDonald A, Duffy M, Brady M i wsp. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-induced patients. *Journal of Infectious Disease*. 2002; 185: 720-727.
56. Cabrera R, Tu Z, Xu Y i wsp. An immunomodulatory role for CD4CD25 regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2004; 40: 1062-71.
57. Hori S, Carvalho T, Demengeot J. CD25CD4 regulatory cells suppress CD4 T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *European Journal of Immunology*. 2002; 32: 1289-1291.
58. Oswald-Richter K, Grill SM, Shariat N i wsp. HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells. *PLoS Biology*. 2004; 2: 198.
59. Zeng D, Lewis D, Dejbakhsh-Jones S i wsp. Bone marrow NK1.1(-) and NK1.1(+) T cells reciprocally regulate acute graft versus host disease. *Journal of Experimental Medicine*. 1999; 189: 1073-1081.
60. Seino K, Fukao K, Muramoto K i wsp. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98: 2577-2581.
61. Sonoda KH, Taniguchi M, Stein-Streilein J. Long-term survival of corneal allografts is dependent on intact CD1d-reactive NKT cells. *Journal of Immunology*. 2002; 168: 2028-2034.
62. Akiyama Y, Shibutani S, Matsumoto K i wsp. CD25<sup>+</sup> regulatory cells generated by intratracheal delivery of alloantigen. *Transplantation Proceedings*. 2002; 34: 1443-1444.
63. Cohen J, Trenado A, Vasey D i wsp. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *Journal of Experimental Medicine*. 2002; 196: 401-406.
64. Umetsu D, Akbari O, DeKruyff R. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003, 112: 480-487.
65. Winkler B, Hufnagi K, Spittler A i wsp. The role of Foxp3<sup>+</sup> T cells in long-term efficacy of prophylactic and therapeutic mucosal tolerance induction in mice. *Allergy*. 2006; 61: 173-180.
66. Taams L, Palmer D, Akbar A i wsp. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology*. 2006; 118: 1-9.
67. Zu Y, Li C, Zheng J i wsp. The role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells in the pathogenesis of asthma in children. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2006; 86: 35-38.
68. Chen X, Murakami T, Oppenheim J i wsp. Differential response of murine CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells to dexamethasone-induced cell death. *European Journal of Immunology*. 2004; 34: 859-869.
69. Karagiannis C, Akdis M, Holopainen P i wsp. Glucocorticoids upregulate Foxp3 expression and regulatory T cells in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004; 114: 1425-1433.
70. Verhagen J, Akdis M, Traidl-Hoffmann C i wsp. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006; 117: 176-183.
71. Jutel M, Akdis M, Budak F i wsp. IL-10 and TGF- $\beta$  cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *European Journal of Immunology*. 2003; 33: 1205-1124.