

Praca poglądowa • Review article

Rola limfocytów T regulatorowych CD4⁺CD25⁺ w rozwoju zaburzeń o podłożu immunologicznym

The role of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in immunopathologies

Beata Śledź – Gawrońska

APC – ANALIZY MEDYCZNE, Łódź

Streszczenie

Od momentu sklasyfikowania, subpopulacja limfocytów T regulatorowych CD4⁺CD25⁺ jest źródłem badań w wielu ośrodkach naukowych. Komórki te mają zdolność immunosupresji limfocytów efektorowych, zależnie od kontaktu komórka-komórka. Ze względu na pełnioną przez nie kluczową rolę w mechanizmach odpornościowych trwają próby manipulacji tymi komórkami w terapii licznych chorób, których podstawą są zaburzenia układu immunologicznego. W tej pracy opisano charakterystykę i mechanizm działania limfocytów T regulatorowych CD4⁺CD25⁺ oraz powiązanie tych komórek z rozwojem procesów autoimmunizacyjnych, nowotworowych, zapalnych a także związanych z niepowodzeniem w transplantologii oraz z patologią ciąży. Omówiono możliwości diagnostyczne i terapeutyczne z użyciem limfocytów Treg.

Summary

Since their discovery, CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells have been investigated in many laboratories. These cells are able to suppress functions of effector cells, depending on the cell-cell contact. Because of their critical role in immune response, there are attempts to therapeutic manipulate these cells in many diseases, which are based on immunopathologies. This paper describes the characterization and action mechanism of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and their role in development of autoimmune diseases, neoplasma diseases, infection, allograft rejection and reproductive failure. It describes diagnostic and therapeutic possibilities of using regulatory T cells.

Słowa kluczowe: limfocyty T regulatorowe CD4⁺CD25⁺, immunosupresja, zaburzenia immunologiczne

Key words: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, immunosuppression, immunopathologies

Charakterystyka limfocytów T regulatorowych CD4⁺CD25⁺

Limfocyty T regulatorowe (Treg) to subpopulacja limfocytów T, które występują jako naturalne komórki regulatorowe (powstające podczas różnicowania w grasicy) oraz indukowane na obwodzie Treg. Te limfocyty mają zdolności immunosupresyjne w stosunku do komórek efektorowych [6]. Stanowią ok. 2-4% obwodowych limfocytów CD4⁺.

Limfocyty T regulatorowe biorą udział m.in. w: wytwarzaniu tolerancji na antygeny, w odpowiedzi przeciwnowotworowej, immunologicznej po szczepieniach ochronnych, przebiegu ciąży, powstawaniu tolerancji wobec przeszczepianych narządów, hamują limfocyty autoreaktywne [10]. Zarówno naturalne Treg jak i indukowane na obwodzie Treg zapobiegają migracji komórek efektorowych

oraz hamują ich kooperację z komórkami prezentującymi antygen [36].

Manipulacja limfocytami regulatorowymi jest sprawą przyszłościową, jednakże niebezpieczną ze względu na fakt, iż zarówno niedobór jak i nadmiar tych komórek niesie za sobą poważne konsekwencje kliniczne.

Nadreaktywność komórek Treg powoduje wyciszenie reakcji immunologicznej, co prowadzić może do rozwoju zjawisk nowotworowych bądź niedostatecznego procesu usuwania czynników infekcyjnych powodujących proces zapalny [13]. Rolę limfocytów Treg upatruje się także w zaburzeniach immunologicznych towarzyszących otyłości i miażdżycy. Uważa się iż, niedobór i/lub dysfunkcja tych komórek prowadzi do rozwoju stanu zapalnego i generacji blaszki miażdżycowej oraz że transfer Treg może spowodować re-

dukcję zmian miażdżycowych [17].

Limfocyty T regulatorowe CD4⁺CD25⁺ wykazują na swojej powierzchni ekspresję wielu cząsteczek. Do najbardziej charakterystycznych cząsteczek dla Treg CD4⁺CD25^{high} należą: CD25 (łańcuch α receptora IL-2), FOXP3, CTLA-4 (CD152), cząsteczka GITR (indukowany przez glukokortykoidy receptor TNF – czynnika martwicy nowotworu), CD45RO, CD122 (łańcuch β receptora IL-2) HLA DR, CD62L, PD1, Notch, OX40 (CD134) CD103. Limfocyty Treg CD4⁺CD25⁺ wykazują ekspresję mRNA dla IL-10, TGF- β , IL-4, natomiast nie obserwuje się obecności mRNA dla IL-2. Komórki Treg nie wydzielają tych cytokin, choć sugeruje się wydzielanie IL-10 *in vivo* [10, 26, 39].

Mechanizm działania

Treg CD4⁺CD25⁺ utrzymują tolerancję immunologiczną poprzez hamowanie funkcji komórek CD4⁺ i CD8⁺, makrofagów, komórek dendrytycznych i komórek NK.

Treg CD4⁺CD25⁺ wykazują anergię po stymulacji receptorów TCR w hodowli w obecności komórek prezentujących antygen (APCs). Egzogenne IL-2 w hodowli odwraca stan anergii i anuluje supresorowe funkcje Treg CD4⁺CD25⁺, a po usunięciu egzogennej IL-2 wracają właściwości immunosupresyjne *in vitro*.

Treg wykazują ekspresję na swojej powierzchni TGF- β (LAP-TGF- β) oraz receptora II TGF- β (T β RII), co tłumaczy anergię Treg po stymulacji receptora TCR. Zbadano, iż TGF- β jest niezbędna do immunosupresji wywoływanej przez Treg, gdyż w obecności niektórych przeciwciał anti-TGF- β nie dochodziło do supresji. TGF- β może być produkowany poza Treg przez: makrofagi/monocyty, komórki dendrytyczne, komórki nabłonkowe [5], łożysko i pełni istotną rolę w przetrwaniu płodu w organizmie matki [20].

FOXP3 – czynnik transkrypcyjny, aktywuje transkrypcję białka skurfiny, pełni główną rolę w powstawaniu i pełnieniu funkcji przez Treg, a mutacje w obrębie tego czynnika zaburzają ich czynność w konsekwencji prowadząc do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych [39]. CTLA-4 (CD152, antygen 4 związany z limfocytami T cytotoksycznymi) jest odpowiedzialny za wspomaganie supresyjnej aktywności komórek Treg. Wiązanie powierzchniowego CTLA-4 i B7 powoduje przekazanie limfocytowi T sygnału negatywnego prowadzącego do zahamowania aktywności [4]. Treg z ekspresją HLA-DR hamują proliferację limfocytów T i produkcję cytokin poprzez mechanizm zależny od kontaktu, powiązany z indukcją FOXP3 (Treg MHC-II⁺ indukują wczesnej sekrecję IL-4 i IL-10 i późną supresję zależną od kontaktu, powiązaną z FOXP3) [2]. CD69 uważany jest za marker aktywacji, jednakże ostatnie dane mówią, że może wywierać funkcje regulatorowe [9].

Generacja środowiska uprzywilejowanego immunologicznie przy udziale komórek Treg CD4⁺CD25⁺ następuje różnymi ścieżkami, jak poprzez: produkcję HO (oksygenazy hemu), IL-10, TGF- β , LIF (czynnika hamującego białaczkę). Wiele źródeł podaje dodatkowo IDO (2,3- dioksygenaza indolaminy).

Do diagnostyki rutynowej limfocytów T regulatorowych wykorzystuje się metodę cytometrii przepływowej, używając przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciw najczęściej: CD4, CD25, FOXP3. W pracach naukowych używa się przeciwciał skierowanych również przeciw innym markerom limfocytów Treg, a także innych metod, np.: biologii molekularnej (RT-PCR), immunohistochemii, testów ELISA (do oceny wydzielanych cytokin), izolacji komórek na kolumnie separacyjnej. Problemem diagnostycznym jest oddzielenie limfocytów T regulatorowych CD4⁺CD25⁺ naturalnych od aktywowanych *in vivo*, ze względu na fakt, iż charakterystyczne markery powierzchniowe są wspólne dla tych komórek. Metoda cytometryczna umożliwia izolację komórek w oparciu o intensywność ekspresji CD25, a uważa się że tylko komórki z wysoką ekspresją cząsteczki CD25 (CD25^{high}) są naturalnymi komórkami regulatorowymi, natomiast te z niską ekspresją CD25 (CD25^{low}) mogą być limfocytami aktywowanymi.

Limfocyty T regulatorowe a choroby autoimmunizacyjne

W 1995 r. *Sakaguchi* i wsp. opisał jako pierwszy rolę limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺ w patofizjologii chorób autoimmunizacyjnych. Odkrył, że limfocyty T CD4⁺ są kluczem do poznania mechanizmu rozwoju tych schorzeń. Zauważył, że transfer limfocytów T CD4⁺, które wykazują na swojej powierzchni ekspresję cząsteczki CD25 (łańcucha α receptora IL-2), do myszy zapobiega u nich swoistym narządowo i ogólnoustrojowym chorobom autoimmunizacyjnym oraz chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD), jako że komórki te wpływają na utrzymanie tolerancji immunologicznej poprzez ujemną regulację odpowiedzi immunologicznej na antygeny własne i egzogenne [27]. Zmniejszenie liczby Treg poprzez tymektomię bądź zablokowanie cząsteczki CD25 przeciwciałami anti-CD25 powoduje wystąpienie wielonarządowych chorób autoimmunizacyjnych, natomiast transfer tych komórek zapobiega rozwojowi schorzeń autoimmunizacyjnych, a także reakcjom zapalnym i powikłaniom potransplantacyjnych [5].

Naturalnie występujące limfocyty T regulatorowe CD4⁺CD25⁺ biorą udział w utrzymaniu tolerancji na własne antygeny. Niedobór bądź dysfunkcja tych komórek może powodować choroby autoimmunizacyjne (cukrzyca typu 1, zapalenie jelita, alergię pokarmowe), odporność organizmu na komórki nowotworowe. Te limfocyty biorą udział w tolerancji organizmu na przeszczepione tkanki i narządy, bowiem komórki układu immunologicznego mają za zadanie rozróżniać antygeny własne od obcych [28]. Limfocyty Treg wywołują efekt supresorowy wobec komórek efektorowych poprzez: cytokiny (IL-10, TGF- β), powodowanie cytolizy komórek (rola granzymu B i perforyn), zaburzenie metabolizmu (powodujące apoptozę limfocytów CD4⁺ oraz hamowanie ich funkcji) oraz wpływ na funkcje bądź dojrzewanie komórek dendrytycznych [21]. Dane na podstawie licznych badań donoszą, iż Treg z ekspresją CTLA-4 podnoszą poziom IDO w komórkach prezentujących antygen (komórkach den-

drytycznych i makrofagach) [26].IDO – 2,3- dioksygenaza indolaminy (około 45 kDa), jest enzymem katabolizującym tryptofan. Mechanizm supresji komórek układu immunologicznego powodowanej przez IDO nie jest jasny. Faktem jest, że zmniejszenie poziomu tryptofanu powoduje zahamowanie proliferacji limfocytów, gdyż pozbawia limfocyty aminokwasów. Jednakże *in vivo* niedobór tryptofanu jest natychmiast uzupełniany z otaczających tkanek, osocza lub komórek prozapalnych. Wykazano, że katabolity tryptofanu, jak: kynurenina, 3-hydroksykynurenina, kwas 3-hydroksy-antranilowy powodują zahamowanie proliferacji i aktywacji limfocytów T i B. Te metabolity powodują apoptozę *in vitro* tymocytów i komórek Th1 u myszy a podanie syntetycznych pochodnych metabolitów tryptofanu spowodowało zahamowanie autoimmunologicznego modelu miażdżycy [1]. IDO jest obecny w zdrowych tkankach i wykazuje ekspresję w komórkach dendrytycznych, makrofagach błony doczesnej, w łożysku, jelitach, płucach i w trofoblaście [32].

Nieprawidłowości w markerach powierzchniowych charakterystycznych dla limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ powodują zaburzenia w ich funkcjach. Zaobserwowano np. mutacje w obrębie genu FOXP3 u pacjentów z ciężkimi zaburzeniami immunologicznymi IPEX (zespół immunodysregulacji, poliendokrynopatii, enteropatii) [10, 28]

Terapia u pacjentów z chorobami autoimmunizacyjnymi polega na zapobieganiu aktywacji limfocytów autoreaktywnych, bądź ich eliminacji. Zaobserwowano zwiększenie odsetka oraz przywrócenie prawidłowych funkcji limfocytom Treg po stosowaniu immunosupresji [10, 13]. Zmniejszony odsetek limfocytów Treg stwierdzono m.in. u pacjentów z cukrzycą typu 1, aftach nawracających jamy ustnej. Nieprawidłową funkcję Treg obserwuje się np. u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym, reumatoidalnym zapaleniem stawów, łuszc-

zyca, chorobami alergicznymi, zespołem Sjögrena, toczniem układowym. W przebiegu mieszanej krieglobulinemii wykazano zarówno nieprawidłową funkcję jak i liczbę Treg. Przykładowe zaburzenia przebiegające z dysfunkcjami limfocytów CD4⁺CD25⁺ zawiera Tabela I [10, 13, 21].

Rola limfocytów Treg w procesach nowotworowych

Komórki Treg wykazują funkcje supresorowe w stosunku do limfocytów T efektorowych, hamując proces prezentacji antygeny oraz powodując immunosupresję innych komórek układu immunologicznego. W ten sposób hamują odpowiedź organizmu przeciw komórkom nowotworowym. Wykazano korelację pomiędzy zaawansowaniem nowotworu a zwiększonym odsetkiem limfocytów Treg, które hamują efektorowe limfocyty. Zwiększony odsetek limfocytów Treg obserwowany jest u pacjentów z nowotworami (czerniak złośliwy, nowotwory przewodu pokarmowego, raku płuca, piersi, jajnika)

Badano wpływ blokowania limfocytów Treg u zwierząt z chorobami nowotworowymi. Używano przeciwciał anti-CD25 i anti –CTLA-4. U myszy nie doszło do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych [13], natomiast zwiększyła się odpowiedź przeciw komórkom nowotworowym [23].

Również stosowanie napromieniowania powodowało zwiększenie reakcji przeciwnowotworowej, przy jednoczesnym zmniejszeniu odsetka komórek Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ [16].

Jednakże rola limfocytów T regulatorowych w nowotworzeniu jest nie do końca poznana. Dlatego stosowanie terapii blokowania ich jest dokładnie badane. Wykazano bowiem, że Treg nie zawsze są złym prognostykiem w rokowaniu przeżycia chorych na nowotwory. Badania ukazały, iż w nowotworach odbytu Treg nie mają związku z prognozowaniem

Tabela I.

Przykładowe zaburzenia przebiegające z dysfunkcjami ilościowymi i/lub jakościowymi limfocytów T regulatorowych CD4⁺CD25⁺

Choroba autoimmunizacyjna	Defekt ilościowy/jakościowy limfocytów Treg
Cukrzyca typu 1	Zmniejszony odsetek limfocytów Treg Zaburzone hamowanie proliferacji limfocytów Treg
Afty nawracające jamy ustnej	Zmniejszony odsetek limfocytów Treg
Stwardnienie rozsiane	Obniżona zdolność limfocytów Treg do hamowania proliferacji limfocytów efektorowych i wydzielania cytokin
Reumatoidalne zapalenie stawów	Brak hamowania limfocytów Treg wytwarzania cytokin prozapalnych przez limfocyty efektorowe i monocyty
Choroby alergiczne	Brak hamowania przez limfocyty Treg wytwarzania cytokin przez limfocyty efektorowe
Mieszana krieglobulinemia	Zmniejszony odsetek limfocytów Treg Zaburzona funkcja limfocytów Treg
Zespół Sjögrena	Upośledzenie funkcji limfocytów Treg
Toczeń układowy	Upośledzona funkcja supresyjno-efektorowa limfocytów Treg oraz zmniejszony odsetek limfocytów Treg w aktywnym okresie choroby
Miastenia	Brak hamowania proliferacji limfocytów CD4 ⁺ CD25 ⁻ przez limfocyty Treg
Łuszczyca	Obniżona zdolność limfocytów Treg do hamowania proliferacji limfocytów efektorowych
Liszaj twardzinowy	Zwiększony odsetek limfocytów Treg

choroby. Natomiast korzystne rokowanie zaobserwowano w przypadku zwiększonego odsetka limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ u chorych z chłoniakiem i rakiem jelita grubego. W przypadku nowotworów żołądka badania są sprzeczne. W badaniach nad nowotworem zlokalizowanym we wpuście żołądka zaobserwowano, że przy małej liczbie makrofagów i jednocześnie zwiększonej liczbie Treg rokowanie jest dobre. Tłumaczy się to obniżeniem przez komórki Treg stężenia cytokin prozapalnych, promujących karcinogenezę. Natomiast ze względu na rolę makrofagów w promowaniu angiogenezy, zmniejszenie ich liczby daje pozytywne wyniki [8].

Limfocyty Treg w przebiegu ciąży

Limfocyty T regulatorowe CD4⁺CD25⁺ indukowane w czasie ciąży odgrywają istotną rolę w tworzeniu tolerancji immunologicznej organizmu matki na płód. Ta tolerancja jest tłumaczona tworzeniem środowiska immunologicznie uprzywilejowanego, przez swoiste, aktywowane limfocyty Treg CD4⁺CD25⁺ w błonie doczesnej, która wraz z trofoblastem stanowi obszar styku tkanek maczyno-płodowych. Jednym z pośrednich dowodów jest obserwowany na obwodzie podwójny wzrost liczby tych komórek w przebiegu ciąży ze szczytem od drugiego trymestru a utrzymującym się do 6-8 tygodnia po porodzie. W badaniach na zwierzętach wykazano, iż podczas prawidłowo przebiegającej ciąży komórki nowotworowe ojca są tolerowane przez organizm matki do kilku tygodni po porodzie. Po upływie tego czasu (6-8 tygodni po porodzie) następuje zdecydowane odrzucanie przeszczepów komórek ojca przez organizm matki. Limfocyty Treg swoje funkcje regulatorowe (np. eliminacji autoreaktywnych limfocytów) pełnią w obwodowych i centralnym narządzie limfatycznym (śledzionie, pachwinowych węzłach chłonnych, grasicy), z kolei funkcje tworzenia środowiska uprzywilejowanego immunologicznie w błonach śluzowych (m.in. w błonie doczesnej, jamie ustnej). Niedobór limfocytów Treg lub zaburzenie ich funkcji *in vivo* z jednej strony może powodować nieprawidłową tolerancję immunologiczną na antygeny ojca, a z drugiej zaburzenia w tworzeniu miejscowego środowiska uprzywilejowanego w doczesnej. Oba mechanizmy mogą być przyczyną powikłań w ciąży [38].

W ośrodkach na całym świecie prowadzone są badania dotyczące odgrywanej roli limfocytów Treg w przebiegu ciąży. Doświadczenia prowadzone są przede wszystkim na zwierzętach, głównie na myszach. Badania na modelu zwierzęcym poronień nawykowych mają odzwierciedlenie w obserwacjach klinicznych. Wzrost limfocytów Treg we krwi u kobiet z przebiegającą prawidłowo ciążą jest największy w I trymestrze i maleje wraz z czasem trwania ciąży, aby w III trymestrze nie różnić się znacznie od ilości u kobiet nieciążarnych [29].

U kobiet z nawracającymi spontanicznymi poronieniami ilość komórek Treg CD4⁺CD25^{high} (z wysoką ekspresją receptora dla IL-2 (CD25)) w błonie doczesnej i we krwi obwodowej jest niższa niż u kobiet u których ciąża przebiega prawidłowo. Odsetek komórek CD25^{high} wśród wszystkich CD4⁺

w błonie doczesnej u tych kobiet jest niższy niż w grupie kontrolnej zdrowych kobiet ciężarnych. U kobiet z prawidłowo przebiegającą ciążą odsetek CD25^{high} wśród wszystkich CD4⁺ w błonie doczesnej jest wyższy niż we krwi obwodowej, podczas gdy u kobiet z nawracającymi poronieniami różnice między poziomem we krwi i w błonie doczesnej nie są widoczne [37].

Zenclussen i wsp. badali czy zaburzenia w funkcjonowaniu Treg mogą być przyczyną poronień i czy odrzuceniem płodu można zapobiec poprzez transfer Treg CD4⁺CD25⁺ od ciężarnych z prawidłowo przebiegającą ciążą. Transfer zapobiegał spontanicznym poronieniom, ale wtedy gdy dokonany był między 0 a 2 dniem ciąży, co sugeruje, że Treg są niezbędne do implantacji. Ich badania sugerują, iż Treg działają protekcyjnie, zapobiegając poronieniom, gdy wcześniej były narażone na ekspozycję ojcowskich antygenów. Autorzy sugerują, iż kontakt z antygenami obecnymi w nasieniu ojca może rozpoczynać swoistą w stosunku do antygenów ojca odpowiedź immunosupresyjną [38]. Do takiego kontaktu z nasieniem i aktywacji swoistych Treg prawdopodobnie dochodzi w obwodowych narządach limfatycznych (węzłach chłonnych) [33].

W rozważaniach na temat roli limfocytów Treg w utrzymaniu ciąży nie można pominąć kwestii ich wpływu na układ humoralny matki i odwrotnie, hormonów na aktywność swoistych limfocytów Treg. Transfer Treg od ciężarnych i nie będących w ciąży myszy do myszy ze skłonnościami do poronień powoduje wzrost ekspresji receptorów dla progesteronu na powierzchni płodowo-matczynej [38]. Z drugiej strony poziom hormonów (progesteronu, estradiolu, estronu) u myszy z różnym przebiegiem ciąży nie różni się znacznie, co sugeruje, że niski poziom progesteronu wyklucza możliwość utrudnienia ekspansji Treg. [33]. Jednakże sugeruje się, że estrogen promuje tolerancję organizmu matki na płód poprzez wzrost liczby limfocytów T regulatorowych [25, 26].

Poziom CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ u kobiet wzrasta w fazie folikularnej 9-13 dnia cyklu (wraz ze wzrostem poziomu estradiolu) i spada w fazie lutealnej. U kobiet z nawykowymi poronieniami poziom Treg był niski w obu fazach cyklu menstrualnego, porównywalnego do poziomu Treg u kobiet w okresie pomenopauzalnym [1].

Powierzchniowy marker komórek Treg - CTLA-4 odgrywa rolę w immunoregulacji. Komórki Treg w doczesnej są stymulowane antygenami płodu, ponieważ 5-7 % tych komórek wykazuje ekspresję powierzchniowego CTLA-4 [26].

Bardzo interesującą obserwacją kliniczną jest to, iż przewlekłe infekcje oraz ogólnoustrojowe reakcje zapalne powodują zniesienie supresorowych właściwości limfocytów T CD4⁺CD25⁺, a co za tym idzie: spontaniczne poronienia oraz stany przedzrucawkowe. Jest to prawdopodobnie zależne od wysokiego poziomu IL-6, która jest cytokiną zapalną i hamuje funkcje komórek dendrytycznych CD8α⁺ z ekspresją enzymu rozkładającego tryptofan (IDO) oraz Treg CD4⁺CD25⁺ [26]. Stan przedzrucawkowy - późne powikłanie immunologiczne ciąży, jest nieprawidłową aktywacją syste-

mu immunologicznego. Obserwowany wzrost odpowiedzi typu Th1 występuje zarówno we krwi obwodowej oraz na powierzchni maczyny-łożyskowej, może być spowodowany wadliwym działaniem limfocytów Treg (podobnie jak w stanach nawykowych poronień). Paeschke i wsp. oceniali na limfocytach Treg szereg antygenów powierzchniowych: CD4, CD25, CD8, CTLA-4 u kobiet ze stanami przedzucawkowymi i kobiet z prawidłowo przebiegającą ciążą, aby zbadać czy stan przedzucawkowy charakteryzują cechy jak w stanach nawykowych poronień. Analizy porównawcze poziomów powierzchniowych antygenów limfocytów Treg u kobiet ze stanami przedzucawkowymi i z prawidłową ciążą nie wykazał istotnych różnic co pośrednio może świadczyć, iż pierwotną przyczyną nie jest zaburzenie kontaktu bezpośredniego limfocytu Treg z komórką efektorową. Tak więc stan przedzucawkowy prawdopodobnie nie jest zależny od poziomu i aktywności limfocytów Treg, a co się z tym wiąże, inny mechanizm odpowiada za regulację układu immunologicznego matki przeciw antygenom płodu w późnym okresie ciąży [22].

Limfocyty T regulatorowe a transplantologia

Utrzymanie i przeciwdziałanie odrzuceniu przeszczepionych tkanek zależy od równowagi między komórkami T efektorowymi a T regulatorowymi. Komórki Treg CD4⁺CD25⁺ są kluczowe w indukowaniu stanu tolerancji immunologicznej w stosunku do antygenów dawcy przeszczepów, czyli tolerancji transplantologicznej [7] oraz zapobiegają reakcji przeszczep przeciwko biorcy [13, 39]. Znanych jest kilka mechanizmów warunkujących powstawanie tolerancji immunologicznej. Zalicza się do nich: sekwestrację anatomiczną, delecję klonalną, anergię klonalną, aktywną supresję. Limfocyty Treg CD4⁺CD25⁺ odgrywają właśnie rolę supresyjną wobec komórek efektorowych oraz komórek prezentujących antygen zależnie od bezpośredniego kontaktu. Hamują również nieswoiście odpowiedź na inne antygeny. Wykazano obecność limfocytów Treg w tkance śródmiąższowej okołocerkowej przeszczepionych nerek małych, u których występowała tolerancja, natomiast nie stwierdzono ich obecności, gdy nie dochodziło do tolerancji. Uważa się, że nacieki z komórek regulatorowych z ekspresją latentnych postaci TGF-β są wskaźnikiem stanu tolerancji [11]. Transfer Treg nie hamuje odpowiedzi przeciwnowotworowej. Komórki regulatorowe hamują aktywację i/lub proliferację limfocytów efektorowych w przeszczepionej tkance/narządzie, tworząc mikrośrodowisko immunologicznie uprzywilejowane [13, 39]. Dzieje się tak dzięki procesowi „zaraźliwej tolerancji”, który polega na tym, iż komórki CD4⁺CD25⁺ powodują przekształcanie się limfocytów CD4⁺CD25⁻ w komórki CD25⁺, które w dalszych etapach hamują następne limfocyty CD4⁺CD25⁻ [6]. Rozwój tolerancji immunologicznej następuje m.in. poprzez produkcję oksygenazy hemu. Oksygenaza hemu (HO) jest enzymem biorącym udział w katabolizmie hemu i ochraniającym tkanki, poprzez zapobieganie ich niszczeniu przez wolny hem. Enzym posiada właściwości antyapoptotyczne

oraz ma udział w tolerancji przeszczepów, gdyż hamuje reakcję zapalną i zmniejsza ryzyko wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. Leczenie protoporfiryną kobaltu (Co-PP), który powoduje wzrost ekspresji HO, daje pozytywne efekty w przyjęciu przeszczepów [30].

W rozwijaniu tolerancji immunologicznej dopatruje się udziału IL-10, jako że niedobór bądź zablokowanie receptora dla IL-10 (u myszy) powoduje ostre odrzucenie przeszczepu. Niebezpiecznym powikłaniem przeszczepu jest reakcja przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD). W celu uniknięcia tego problemu stosuje się metody mające bezpośredni związek z komórkami T regulatorowymi; usuwanie limfocytów T dawcy przed przeszczepem, podawanie przeciwciał anti-CD4, anti-CD8, anti-CD154, transfuzja krwi dawcy przed przeszczepem (z co najmniej jednym antygenem MHC dawcy), bądź podawanie komórek regulatorowych, swoistych względem antygenów biorcy, po ich namnożeniu [39]. Wykazano, iż transfer hematopoetycznych komórek macierzystych szpiku kostnego u myszy wraz z podaniem komórek Treg powoduje spadek częstości wystąpienia GVHD, przy zachowanej odpowiedzi przeszczep przeciwko białaczce [23].

Badania ukazały, że niski poziom Treg koreluje ze wzrostem częstości występowania GVHD. U pacjentów, u których doszło do wystąpienia ostrej bądź przewlekłej GVHD poziom komórek Treg oraz TGFβ był znacznie niższy w porównaniu do grupy kontrolnej. Poziom TNFα natomiast wzrasta u tych pacjentów [14]. Ilość Treg u pacjentów z występującą chorobą GVHD była zmniejszona o 40% w stosunku do pacjentów bez GVHD. Odsetek komórek Treg u pacjentów po przeszczepie autologicznym był taki sam jak u pacjentów, u których po przeszczepie allogenicznym nie wystąpiła choroba GVHD [18]. W przypadku wystąpienia ostrej GVHD odsetek komórek Treg jest niższy w porównaniu z chroniczną GVHD [19].

Uważa się, że równowaga między CD4⁺CD25⁺ Treg dawcy i limfocytami T CD4⁺CD25⁻ ma istotny wpływ na przebieg kliniczny ostrej GVHD. Zdolność limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺ do hamowania alloreaktywności, a tym samym do wywoływania zjawiska tolerancji, zależy między innymi od wytwarzania IL-10 przez te limfocyty, obecności TGF-β oraz zdolności do hamowania molekuł kostymulujących. Ponadto stwierdzono, że efekt protekcyjny mają tylko limfocyty Treg CD4⁺CD25⁺ pochodzące od dawcy. Limfocyty T CD4⁺CD25⁺ poddane ekspansji *ex vivo*, a uzyskane po wcześniejszej stymulacji komórkami prezentującymi antygen pochodzącymi od biorcy przeszczepu, hamują ostrą chorobę przeszczep przeciwko gospodarzowi (aGVHD) [24].

Limfocyty T regulatorowe CD4⁺CD25⁺ a reakcje zapalne

Komórki regulatorowe Treg CD4⁺CD25⁺ odgrywają rolę w odpowiedzi przeciwbakteryjnej, przeciwwirusowej, przeciwgrzybiczej, przeciwpierwotniakowej. Biorą udział w powstawaniu pamięci immunologicznej (limfocyty T pamięci) [13]. Limfocyty Treg hamują komórki układu immunologicznego, które biorą udział w odpowiedzi przeciwzakaźnej, zależnie

od kontaktu komórka-komórka. W hodowli z Cytomegalowirusem Treg hamują proliferację i działanie efektorowych komórek T [15].

Treg wywierają funkcje supresorowe wobec neutrofilów. Treg aktywowane lipopolisacharydem hamują funkcje neutrofilów i powodują ich apoptozę. Mogą hamować tylko te komórki, które nie zostały wcześniej zaktywowane. W ten sposób Treg kontrolują odpowiedź przeciwważną i zapobiegają ewentualnym szkodliwym skutkom reakcji zapalnej (jak niszczenie własnych tkanek) [12]. Jednakże odpowiadają również za nieskuteczną odpowiedź przeciwważną i eliminację mikroorganizmów [13].

Przed nieskuteczną odpowiedzią przeciwważną limfocytów Treg chronią różne mechanizmy. Piśmiennictwo podaje, iż w obecności silnego sygnału limfocyty efektorowe są niewrażliwe na działanie limfocytów T regulatorowych, co zabezpiecza organizm przed supresją odpowiedzi immunologicznej przez komórki regulatorowe kiedy jest ona niezbędna. Ponadto Treg hamując wydzielanie cytokin przez komórki efektorowe, zwrotnie hamują własną aktywność - gdy dochodzi do zmniejszenia w środowisku IL-2. IL-6 wydzielana przez aktywowane komórki APC hamuje Treg [39].

Z funkcją limfocytów T regulatorowych w procesach zapalnych powiązana jest cytokina TGF- β . TGF- β jest zaangażowana w działanie indukowanych limfocytów Treg poprzez utrzymanie jądrowego czynnika transkrypcyjnego FOXP3 na stałym poziomie [3, 35]. TGF- β (25 kDa) jest cytokiną, której spektrum działania jest bardzo szerokie. Podkreśla się jej dualistyczny charakter wynikający z przeciwstawnych ról, jakie odgrywa w procesie zapalnym. Początkowo opisywana była jej rola w nowotworzeniu. Cytokina ta hamuje różnicowanie limfocytów Th1 i Th2, jest zaangażowana w rozwój przewlekłych procesów zapalnych, w tym autoimmunologicznych, rozwój guzów i naprawę tkanek (ze względu na powszechne występowanie receptorów TGF β R) [34].

W przypadku działania samodzielnego i gdy w środowisku następuje obniżenie IL-6, cytokina TGF- β posiada charakter przeciwzapalny, natomiast w obecności IL-6 (m.in. pochodzącej z komórek dendrytycznych, makrofagów, limfocytów B), promuje różnicowanie limfocytów w kierunku Th17 z dziewięciu limfocytów CD4⁺ [35]. Limfocytom Th17 przypisuje się rolę w patogenezie chorób autoimmunizacyjnych. Komórki te wykazują funkcje prozapalne, poprzez pozyskiwanie neutrofilów do ogniska zapalnego [31]. Limfocyty Th17 produkują między innymi IL-17 (stąd nazwa tej subpopulacji). IL-17 to rodzina cytokin, w skład której wchodzi 6 interleukin: IL-17 A, B, C, D, E (IL-25), F [3]. IL-17 pobudza granulopoezę i odpowiada za rozwój zapalenia w błonach śluzowych [34]. IL-17 działa jak chemoatraktant dla innych cytokin, chemokin i metaloproteinaz [3]. Zastosowanie przeciwciał przeciw TGF β może znieść objawy chorób zapalnych, bo zahamuje powstawanie limfocytów Th17 [34].

Piśmiennictwo:

1. Arruvito L, Sanz M, Banham AH i wsp. Expansion of CD4⁺C-

D25⁺and FOXP3⁺ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: Implications for human reproduction. *J Immunol* 2007; 178: 2572-2578

- Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol* 2006; 176: 4622-4631
- Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 652-657
- Chambers CA, Kuhns MS., Egen JG i wsp. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 565-594
- Chen WJ. Dendritic cells and CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells: Crosstalk between two professionals in immunity versus tolerance. *Front Biosci* 2006; 11: 1360-1370
- Choraży-Massalska M, Kontny E, Maśliński W. Naturalne komórki regulatorowe (CD4+CD25+). *Postępy Biologii Komórki* 2006; 33: 71-80
- Coenen JJA, Koenen HJPM, Emmer M i wsp. Allogeneic stimulation of naturally occurring CD4+CD25+ T cells induces strong regulatory capacity with increased donor-reactivity. *Transpl Immunol* 2007; 17: 237-242
- Haas M, Dimmler A, Hohenberger W i wsp. Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia. *BMC Gastroenterol* 2009; 9: 65
- Han Y, Guo Q, Zhang M i wsp. CD69⁺ CD4⁺ CD25⁻ T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* 2009; 182: 111-120
- Krajewska M, Weyde W, Klinger M. Limfocyty regulatorowe CD4+CD25+ - znaczenie w patogenezie i leczeniu chorób nerek. *Postępy Hig Med Dosw* 2007; 61: 178-184
- Krajewska M, Weyde W, Klinger M. Tolerancja immunologiczna po przeszczepieniu nerki. *Postępy Hig Med Dosw* 2006; 60: 163-169
- Lewkowicz P, Lewkowicz N, Sasiak A i wsp. Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J Immunol* 2006; 177: 7155-7163
- Lewkowicz P, Lewkowicz N, Tchórzewski H. Limfocyty regulatorowe CD4+CD25+ w patofizjologii i terapii chorób o podłożu immunologicznym. *Postępy Hig Med Dosw* 2005; 59: 371-376
- Li Q, Zhai Z, Xu X i wsp. Decrease of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and TGF-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. *Leuk Res* 2010; w druku
- Li YN, Liu XL, Huang F i wsp. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress the immune responses of mouse embryo fibroblasts to murine cytomegalovirus infection. *Immunol Lett* 2010; 131: 131-138
- Liu R, Xiong S, Zhang L, Chu Y. Enhancement of antitumor immunity by low-dose total body irradiation associated with selectively decreasing the proportion and number of T regulatory cells. *Cell Mol Immunol* 2010; 7: 157-162
- Łuczynski W, Bossowski A, Głowińska-Olszewska B i wsp. Rola limfocytów T-regulatorowych w patogenezie zaburzeń immunologicznych towarzyszących otyłości i miażdżycy. *Postępy Hig Med Dosw* 2010; 64: 156-160
- Magenau JM, Qin X, Tawara I i wsp. Frequency of CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ Regulatory T Cells has Diagnostic and Prognostic Value as a Biomarker for Acute Graft-Versus-Host-Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16: 907-914
- Matsuoka K, Kim HT, McDonough S i wsp. Altered regulatory T cell homeostasis in patients with CD4⁺ lymphopenia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest* 2010; 120: 1479-1493

20. McLennan IS, Koishi K. Fetal and maternal transforming growth factor- β 1 may combine to maintain pregnancy in mice. *Biol Reprod* 2004; 70: 1614-1618
21. Mellanby RJ, Thomas DC, Lamb J. Role of regulatory T-cells in autoimmunity. *Clin Sci (Colch)* 2009; 116: 639-649
22. Paeschke S, Chen F, Horn N i wsp. Pre-eclampsia is not associated with changes in the levels of regulatory T cells in peripheral blood. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54: 384-389
23. Pakravan N, Hassan AT, Hassan ZM. Naturally occurring self-tolerance CD4+CD25+ regulatory T cells: universal immune code. *Cell Mol Immunol* 2007; 4: 197-201
24. Piątkowska-Jakubas B, Krawczyk J, Skotnicki AB. Nowe aspekty immunologiczne ostrej reakcji przeszczep przeciwko biocy po allogenicznej transplantacji szpiku kostnego. *Adv Clin Exp Med* 2004; 13: 1003-1011
25. Polańczyk MJ, Carson BD, Subramanian S i wsp. Cutting Edge: Estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J Immunol* 2004; 173: 2227-2230
26. Saito S, Sasaki Y, Sakai M. CD4(+)CD25high regulatory T cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol* 2005; 65: 111-120
27. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M i wsp. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cell expressing IL-2 receptor α -chain (CD25). *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164
28. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-352
29. Seol HJ, Oh MJ, Lim JE i wsp. The role of CD4+CD25bright regulatory T cells in the maintenance of pregnancy, premature rupture of membranes and labor. *Yonsei Med J* 2008; 49: 366-371
30. Sollwedel A, Bertoja AZ, Zenclussen ML i wsp. Protection from abortion by heme oxygenase-1 up-regulation is associated with increased levels of bag-1 and neuropilin-1 at the fetal-maternal interface. *J Immunol* 2005; 175: 4875-4885
31. Stetson DB., Medzhitov R. T helper 17 cells get the NOD. *Immunity* 2007; 27: 546-548
32. Terness P, Kallikourdis M, Betz AG i wsp. Tolerance signaling molecules and pregnancy: IDO, galectins and the renaissance of regulatory T cells. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58: 238-254
33. Thuere C, Zenclussen ML, Schumacher A i wsp. Kinetics of regulatory T cells during murine pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58: 514-523
34. Veldhoen M, Stockinger B. TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends Immunol* 2006; 27: 358-361
35. Wahl SM. Transforming growth factor- β : innately bipolar. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 55-62
36. Wilczyński JR, Radwan M, Kalinka J. The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions. *Front Biosci* 2008; 13: 2266-2274
37. Yang H, Qiu L, Chen G i wsp. Proportional change of CD4+CD25+ regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril* 2008; 89: 656-661
38. Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML i wsp. Abnormal T-Cell Reactivity against Paternal Antigens in Spontaneous Abortion. Adoptive Transfer of Pregnancy-Induced CD4+CD25+ T Regulatory Cells Prevents Fetal Rejection in a Murine Abortion Model. *Am J Pathol* 2005; 166: 811-822
39. Żylicz M, Bocian K., Korczak-Kowalska G. Komórki regulatorowe: powstawanie, mechanizmy i efekty działania oraz możliwe wykorzystanie w transplantologii. *Postepy Hig Med Dosw* 2005; 59: 160-171

Adres Autora:

Beata Śledź-Gawrońska
26-200 Końskie, ul. Kołłątaja 2/2
beatasledz@vp.pl

(Praca wpłynęła do Redakcji: 2010.06.14)

(Praca przekazana do opublikowania: 2010.07.21)