

Received: 2005.05.04  
 Accepted: 2005.06.29  
 Published: 2005.08.08

## Limfocyty regulatorowe CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> w patofizjologii i terapii chorób o podłożu immunologicznym\*

### CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells in clinical immunology and therapy

Przemysław Lewkowicz<sup>1</sup>, Natalia Lewkowicz<sup>2</sup>, Henryk Tchórzewski<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

<sup>2</sup> Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

#### Streszczenie

Naturalnie występujące limfocyty T regulatorowe CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> biorą aktywny udział w utrzymaniu stanu tolerancji w stosunku do własnych i obcych antygenów. Limfocyty Treg hamują odpowiedź proliferacyjną i wytwarzanie cytokin przez limfocyty efektorowe, głównie wskutek bezpośrednich interakcji komórka-komórka. Niedobór lub dysfunkcja tych komórek może być przyczyną powstawania chorób autoimmunizacyjnych. Limfocyty Treg mają ponadto wpływ na przebieg odpowiedzi przeciwinfekcyjnej i potransplantacyjnej, rozwoju nowotworów, alergii, a nawet niektórych postaci niepłodności u kobiet. Wzmocnienie lub blokada funkcji limfocytów Treg może być metodą terapii wielu chorób związanych z dysfunkcją układu immunologicznego. Jednakże limfocyty Treg często działają jako obusieczny miecz, dlatego też wszelkie próby modyfikacji aktywności, jak i liczby tych komórek u ludzi powinny być prowadzone z wielką ostrożnością.

**Słowa kluczowe:**

**limfocyty regulatorowe CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> • immunoregulacja • immunoterapia**

#### Summary

Naturally arising CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells actively maintain immunological tolerance to self and non-self antigens. Treg cells inhibit proliferative response and cytokine production by effector cells, basically via cell-cell contact. Deficiency or dysfunction in these cells may result in autoimmune diseases. Treg cells may also influence the outcome of infection, cancer, transplantation, allergy, and even some forms of infertility. Enhancement or blockade of natural Treg cells may represent a therapeutic approach to many immunopathologies. However, Treg cells act like a 'double-edged sword', which is why all therapeutic manipulation of these cells on humans should be done with great caution.

**Key words:**

**CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells • immunoregulation • immunotherapy**

**Full-text PDF:**

[http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_59/7853.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7853.pdf)

**Word count:**

2318

**Tables:**

2

**Figures:**

–

**References:**

51

**Adres autora:**

dr n. med. Przemysław Lewkowicz, Zakład Immunologii Klinicznej I-CZMP w Łodzi, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź, e-mail: natalewk@wp.pl

\* Praca finansowana w ramach grantów KBN nr 2 P05E 091 26 i nr 3 P05A 067 25

Zachowanie równowagi pomiędzy aktywacją i supresją odpowiedzi limfocytów T jest jednym z najważniejszych celów klinicznych, jakie stoją przed badaczami i lekarzami zajmującymi się immunologią kliniczną. W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się roli limfocytów T regulatorowych (Treg) w nadzorowaniu odpowiedzi immunologicznej. Identyfikacja małej subpopulacji limfocytów T CD4<sup>+</sup> z konstytutywnie wysoką ekspresją receptora CD25 była początkiem licznych badań nad oceną ich funkcji i znaczenia w patogenezie wielu chorób. Limfocyty Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> w wyniku bezpośrednich interakcji pomiędzy komórkami są zdolne do hamowania proliferacji limfocytów T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> w warunkach *in vitro*. Obserwowane zahamowanie proliferacji komórek efektorowych jest prawdopodobnie wynikiem zmniejszonego wytwarzania IL-2 [3]. Postuluje się, że dzięki swoim właściwościom limfocyty Treg są zaangażowane w immunopatogenezę chorób autoimmunizacyjnych, alergicznych, nowotworowych, a także odpowiedź immunologiczną po aloprzeszczepach czy szczepieniach ochronnych.

Prawidłowa odpowiedź układu immunologicznego zarówno w stosunku do obcych, jak i własnych antygenów jest precyzyjnie regulowana. Edukacja komórek immunokompetentnych, mająca na celu umożliwienie im rozróżnianie pomiędzy obcymi a własnymi antygenami obejmuje procesy tolerancji centralnej zachodzącej w grasicy. Również komórki znajdujące się na obwodzie podlegają mechanizmom kontrolującym ich funkcje, a limfocyty Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> mogą być uniwersalnymi strażnikami immunologicznej tolerancji obwodowej. Zaburzenie tego nadzoru spowodowane brakiem lub też upośledzeniem funkcji limfocytów Treg, może prowadzić do rozwoju procesów autoimmunizacyjnych lub alergicznych. Z kolei nadreaktywność limfocytów Treg może być przyczyną nadmiernego wyciszenia odpowiedzi immunologicznej i prowadzić do nieprawidłowego rozpoznania własnych, zmienionych autoantygenów i w konsekwencji np. do braku skutecznej eliminacji komórek nowotworowych. Nadreaktywność limfocytów Treg może być również niepożądana podczas rozpoznania obcych antygenów, powodując niedostateczną obronę przeciwniekcyjną i przetrwanie patogenu w ustroju.

#### **ROLA LIMFOCYTÓW TREG CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> W ROZWOJU CHOROÓB AUTOIMMUNIZACYJNYCH**

Limfocyty Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> po raz pierwszy opisano jako komórki mogące zapobiegać rozwojowi autoimmunizacji u myszy. Początkowo wykazano, że myszy pozbawione grasicy w trzecim dniu życia stają się podatne na rozwój chorób autoimmunizacyjnych narządowo swoistych [32]. Transfer limfocytów od zdrowych dorosłych myszy zapobiegał rozwojowi chorób autoimmunizacyjnych. Następne badania pozwoliły wykazać, iż uzyskane zahamowanie procesów autoimmunizacyjnych zachodzi dzięki obecności limfocytów o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. W doświadczeniach na myszach *nude* (nu/nu), charakteryzujących się brakiem limfocytów T, wykazano, że podanie limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sprzyjało rozwojowi chorób autoimmunizacyjnych narządowo swoistych, podczas gdy transfer limfocytów o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> powodował hamowanie tego typu autoimmunizacji [2,31]. Podobne obserwacje poczyniono w badaniach na myszach RAG<sup>-/-</sup>, które charakteryzują się niedoborem limfocytów T i B oraz myszach scid/

scid, które mają niewielką liczbę dojrzałych limfocytów T oraz B [28,37]. Dodatkowo wiedza na temat roli limfocytów Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> w rozwoju chorób autoimmunizacyjnych została poszerzona w badaniach na myszach NOD (non-obese diabetic mice) – modelu zwierzęcym cukrzycy typu I u człowieka, oraz na modelu mysim stwardnienia rozsianego [20,33].

W późniejszych latach wykazano związek pomiędzy nieprawidłowościami ilościowymi i jakościowymi limfocytów Treg a obecnością chorób autoimmunizacyjnych u ludzi. Zmniejszony odsetek limfocytów Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> stwierdzono m.in. u pacjentów z cukrzycą typu I oraz aftach nawracających jamy ustnej [21,22]. U chorych ze stwardnieniem rozsianym populacja limfocytów Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cechowała się obniżoną zdolnością do hamowania proliferacji limfocytów efektorowych i wydzielania cytokin w porównaniu z osobami zdrowymi [46]. Natomiast upośledzenie funkcji limfocytów Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, wykazane u chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów, dotyczyło braku hamowania wytwarzania cytokin prozapalnych przez limfocyty efektorowe oraz monocyty w mieszanych hodowlach z limfocytami CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [11]. Zaburzenia funkcji limfocytów Treg stwierdzono ponadto u chorych z łuszczycą [39].

Najważniejszym celem w leczeniu chorób autoimmunizacyjnych jest zapobieganie aktywacji lub też eliminacji limfocytów autoreaktywnych i wszystkich konsekwencji z tym związanych. W warunkach, gdy swoiste dla danej choroby autoantygeny nie są znane, nie wyklucza to skutecznego zastosowania limfocytów Treg w terapii, gdyż aktywowane limfocyty Treg mogą hamować odpowiedź immunologiczną niezależnie od antygeny [16]. Ze względu na to, iż w przebiegu niektórych chorób autoimmunizacyjnych u człowieka stwierdza się zaburzenie funkcji limfocytów Treg bez zmiany ich odsetka, ewentualna terapia powinna uwzględniać próby przywrócenia prawidłowej funkcji limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> za pomocą środków farmakologicznych, bądź też transferu limfocytów Treg od osób zdrowych. Co ciekawe, zastosowanie immunosupresji w leczeniu chorób o podłożu autoimmunizacyjnym miało nieoczekiwane korzystny wpływ na funkcje limfocytów Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Ehrenstein i wsp. opisali wpływ terapii anti-TNF- $\alpha$  (Infliximab) u chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów na przywrócenie prawidłowego działania limfocytów Treg i zwiększenia ich odsetka w krwi obwodowej [11]. W innym doświadczeniu wykazano wpływ glikokortykosteroidów na zwiększenie odsetka limfocytów Treg i ekspresji Foxp3 w przebiegu stwardnienia rozsianego [30].

#### **ROLA KOMÓREK TREG W KONTROLI TOLERANCJI TRANSPLANTACYJNEJ**

Zdolność limfocytów Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> do hamowania odpowiedzi limfocytów efektorowych CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> stwarza realną szansę wykorzystania ich do terapii immunosupresyjnej osób po przeszczepach alogenicznych. Badania na myszach po przeszczepie szpiku kostnego wykazały skuteczność limfocytów Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> w zapobieganiu powstawania choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (graft-versus-host disease – GVHD) [8,15,45]. Jednocześnie transfer limfocytów Treg nie hamował odpowiedzi typu przeszczep przeciwko białaczce (graft-versus-leukemia – GVL), czy odpowiedzi przeciwnowotworowej [10,17,45].

Tabela 1. Zestawienie chorób, w których wykazano dysfunkcję bądź też nieprawidłowy odsetek limfocytów regulatorowych CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> u ludzi

Choroba	Badania	Piśmiennictwo
Cukrzyca typu I	zmniejszony odsetek limfocytów Treg w krwi obwodowej	[21]
Stwardnienie rozsiane	obniżona zdolność do hamowania proliferacji i wytwarzania cytokin przez limfocyty efektorowe w kontakcie bezpośrednim z Treg	[46]
Reumatoidalne zapalenie stawów	brak hamowania wytwarzania cytokin prozapalnych przez limfocyty efektorowe oraz monocyty w kontakcie bezpośrednim z Treg	[11]
Łuszczyca	obniżona zdolność do hamowania proliferacji limfocytów efektorowych w kontakcie bezpośrednim z Treg	[39]
Afty nawracające jamy ustnej	zmniejszony odsetek limfocytów Treg w krwi obwodowej	[22]
Nowotwory przewodu pokarmowego	zwiększony odsetek limfocytów CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> w krwi obwodowej	[34]
Czerniak złośliwy	zwiększony odsetek limfocytów CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> w węzłach chłonnych	[47]
Rak płuc	obecność antygenowo swoistych Treg w obrębie tkanki nowotworowej	[49]
Choroby alergiczne	brak hamowania wytwarzania cytokin IL-5 i IL-13 przez limfocyty efektorowe w kontakcie bezpośrednim z Treg, obniżona zdolność limfocytów Treg do hamowania limfocytów efektorowych stymulowanych alergenem	[13,23]
Poronienia samoistne	zmniejszony odsetek limfocytów Treg w krwi obwodowej i w błonie doczesnej	[14,35]
Liszaj twardzinowy	zwiększony odsetek limfocytów Treg w krwi obwodowej	[44]

Limfocyty regulatorowe zastosowane w tych badaniach były poddane stymulacji *in vitro* przed powrotnym transferem. Aktywacja ta poprzez zwiększenie proliferacji miała na celu uzyskanie wystarczająco dużej liczby komórek zachowujących pierwotne właściwości inhibicyjne co limfocyty „macierzyste”. Niektórzy badacze proponują schemat postępowania polegający na podawaniu limfocytów Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> w okresie przedtransplantacyjnym, a następnie kilkakrotnie po transplantacji narządu [45]. Wyniki zaprezentowanych badań są bardzo obiecujące, gdyż sugerują możliwość zapobiegania rozwojowi GVHD przy braku niepożądanych reakcji immunologicznych. Jednakże, istnieją pośrednie dowody na to, że obecność nawet zwiększonego odsetka funkcjonalnie zdolnych limfocytów Treg nie chroni przed rozwojem GVHD u ludzi [7].

#### **ROLA KOMÓREK TREG W ODPOWIEDZI PRZECIWNOWOTWOROWEJ**

Badania z ostatnich lat dotyczące immunopatologii nowotworów wskazują na czynny udział limfocytów Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> w rozwoju tych chorób. Wykazano korelację pomiędzy zaawansowaniem nowotworu a zwiększonym odsetkiem limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> we krwi obwodowej [34]. Zwiększony odsetek limfocytów Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> wykazano także w biopsjach węzłów chłonnych objętych przerzutami czerniaka złośliwego [47]. W obu przypadkach wyizolowane limfocyty Treg działały hamująco na funkcje limfocytów efektorowych w warunkach *in vitro*. Badania Woo i wsp. wskazują na obecność w obrębie nowotworu płuc limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> antygenowo swoistych, które działają hamująco tylko na limfocyty autogeniczne, a nie mają wpływu na limfocyty alogeniczne [49].

Wyniki przeprowadzonych badań klinicznych wskazują na nowe możliwości terapeutyczne w leczeniu nowotworów,

polegających na zastosowaniu technik hamujących aktywność limfocytów Treg u osób chorych. Teoretycznie jest to możliwe przez użycie przeciwciał monoklonalnych blokujących anty-CD25, co częściowo zostało potwierdzone na modelach zwierzęcych nowotworów [29,36]. W badaniach na myszach wykazano, iż neutralizacja komórek Treg poprzez wielokrotne iniekcje przeciwciał anty-CD25 lub wybiórcze usunięcie subpopulacji limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> skutkuje zwiększoną odpowiedzią przeciwnowotworową u zwierząt, którym wszczepiono komórki nowotworowe. Jednocześnie zaobserwowano, że takie postępowanie nie miało wpływu na rozwój autoimmunizacji u tych zwierząt, które nie były do niej predysponowane. Badania nad wykorzystaniem przeciwciał neutralizujących komórki Treg zostały ukierunkowane na poszukanie dodatkowego markera, który zwiększyłby swoistość działania takiej terapii. Jako dodatkowe przeciwciało neutralizujące wybrano anty-CTLA-4. Terapia skojarzona z zastosowaniem mAb anty-CD25 i anty-CTLA-4 dała istotnie lepszy wynik, niż z zastosowaniem poszczególnych mAb podawanych z osobna [40]. Mimo że w badaniach na myszach nie wykazano negatywnego wpływu inaktywacji bądź eliminacji limfocytów Treg, ewentualne zastosowanie tych metod w leczeniu nowotworów u ludzi powinno odbywać się ze szczególną ostrożnością.

#### **LIMFOCYTY TREG CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> A ALERGIA**

Choroby alergiczne są m.in. związane z aktywacją limfocytów T i wytwarzaniem cytokin typu 2, w wyniku czego dochodzi do wytwarzania IgE swoistej dla danego alergenu i eozynofili. Wykazano, że Treg są zdolne do hamowania funkcji nie tylko limfocytów Th1, ale również Th2, dzięki czemu mogą kontrolować odpowiedź immunologiczną w stosunku do alergenów [6,18]. W badaniach na zwierzę-

Tabela 2. Udział limfocytów Treg w odpowiedzi przeciwzakaźnej przeciwko niektórym patogenom

Patogen	Gatunek	Swoisty antygen
<i>Helicobacter pylori</i>	myszy	-
	człowiek	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	mysz	-
<i>Pneumocystis carinii</i>	mysz	-
<i>Leishmania major</i>	mysz	+
<i>Schistosoma masoni</i>	mysz	+
<i>Candida albicans</i>	mysz	-
<i>Herpes simplex virus</i>	mysz	-
<i>Human immunodeficiency virus</i>	człowiek	+
<i>Hepatitis C virus</i>	człowiek	+
<i>Cytomegalovirus</i>	człowiek	-

Opracowano na podstawie [5]

tach wykazano ponadto rolę limfocytów Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> w ograniczeniu nacieku eozynofili w drogach oddechowych w przebiegu reakcji nadwrażliwości [41]. Jednakże u osób z alergią na pyłki brzozy stwierdzono, iż limfocyty CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nie są w stanie skutecznie zahamować wytwarzania IL-5 i IL-13, podczas gdy zdolność do hamowania wytwarzania IFN- $\gamma$  była zachowana [13]. U chorych z atopią dodatkowo stwierdzono obniżoną, w porównaniu do osób zdrowych, zdolność limfocytów Treg do hamowania limfocytów efektorowych stymulowanych alergenem [23]. Zastosowanie glikokortykoidów wziewnie bądź systemowo przyczyniało się do zwiększenia odsetka limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> i poprawę ich zdolności do supresji limfocytów efektorowych w badaniach *in vitro* [9,19].

#### ROLA KOMÓREK TREG W KONTROLI ODPOWIEDZI PRZECIWINFEKCYJNEJ

Funkcje regulatorowe limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nie ograniczają się wyłącznie do nadzorowania odpowiedzi immunologicznej w stosunku do własnych antygenów. Wyniki ostatnich badań wskazują na udział limfocytów Treg w odpowiedzi immunologicznej w stosunku do patogenów. Jest to szczególnie ważne w przypadku przewlekłych zakażeń i przetrwałej obecności niektórych patogenów w organizmie gospodarza. Wykazano zaangażowanie limfocytów Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> w odpowiedzi przeciwinfekcyjnej w przypadku zakażeń wywołanych bakteriami, wirusami, pierwotniakami oraz grzybami (tabela 2) [4,24,25,26,48].

Wydaje się, że limfocyty Treg mogą być częściowo odpowiedzialne za nieskuteczną eliminację patogenów, ale też przeciwdziałają skutkom niszczenia własnych tkanek związanych z nadmierną aktywnością immunologiczną. Wykazano m.in. że limfocyty Treg bezpośrednio hamują czynność limfocytów cytotoksycznych CD8<sup>+</sup> indukowanych przez wirusy [42]. Ponadto limfocyty Treg naciekają miejsca objęte zakażeniem i ograniczają odpowiedź typu Th1, która jest niezbędna do zwalczania drobnoustrojów [27]. Uważa się, iż skutkiem niekontrolowanej eliminacji limfocytów Treg

z ustroju może być zwiększenie niekorzystnego działania układu immunologicznego związanego z niszczeniem własnych tkanek [5]. Limfocyty Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nadzorują ponadto rozwój pamięci immunologicznej. Są one odpowiedzialne za powstawanie limfocytów T pamięci, gdyż u zwierząt pozbawionych limfocytów Treg nie dochodziło do wykształcenia odporności na ponowne zakażenie [42]. Jednak limfocyty Treg mają znaczący wpływ na ograniczenie liczby komórek pamięci powstających w odpowiedzi na szczepienia przeciwzakaźne [5].

W celu przeciwdziałania powstawaniu tolerancji immunologicznej w stosunku do antygenów drobnoustrojów celowe wydaje się zablokowanie funkcji limfocytów Treg swoistych dla danego patogenu tak, aby nie zaburzyć działania ochronnego nieswoistych Treg. Zablokowanie funkcji limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> może być ponadto przydatne w przypadku szczepień o małej immunogenności, gdy zachodzi konieczność silniejszej aktywacji układu immunologicznego.

#### ROLA LIMFOCYTÓW REGULATOROWYCH W PRZEBIEGU CIĄŻY

Badania nad udziałem mechanizmów immunologicznych w patogenezie niektórych patologii ciąży, takich jak spontaniczne powtarzające się poronienia, stan przedrzucawkowy czy niektóre postaci niepłodności, wykazały znaczenie limfocytów Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dla prawidłowego rozwoju płodu. Obserwacje kobiet z ciążą niepowikłaną wykazały wzrost odsetka limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> we krwi obwodowej wraz z czasem trwania ciąży [38]. Wzrost ten był powiązany z funkcjonalną aktywnością limfocytów regulatorowych potwierdzoną wysoką ekspresją czynnika transkrypcyjnego Foxp3 i zwiększoną odpowiedzią w hodowlach mieszanych limfocytów w badaniach *in vitro*. Inni badacze potwierdzili zwiększoną liczbę CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg we krwi, a także w błonie doczesnej u kobiet ciężarnych, przy czym odsetek Treg był większy w doczesnej kobiet z poronieniem indukowanym, niż u kobiet z poronieniem samoistnym [14,35]. Wyniki tych badań wskazują na zaangażowanie Treg w regulację odpowiedzi immunologicznej w przebiegu ciąży.



Doświadczenia na myszach potwierdziły poczynione wcześniej obserwacje w badaniach u ludzi i umożliwiły poznanie niektórych szczegółów działania limfocytów Treg w ciąży. Wykazano, że Treg są niezbędne w hamowaniu odpowiedzi limfocytów T efektorowych w stosunku do płodowych alloantygenów [1]. Jednocześnie zaobserwowano, że ekspansja Treg nie jest uzależniona od obecności alloantygenów płodowych, gdyż wystąpiła również u myszy z ciążą syngeniczną (antygeny samicy i samca były identyczne), a transfer Treg pochodzący zarówno od ciąży allogenicznej, jak i syngenicznej był jednakowo skuteczny w zapobieganiu odrzuceniu płodu allogenicznego. Sugeruje się, że ekspansja Treg w ciąży nie jest antygenowo swoista i jest prawdopodobnie związana ze zmianami hormonalnymi [1].

Dalsze badania w tym kierunku mogą być pomocne w leczeniu niektórych postaci niepłodności i powikłań w przebiegu ciąży związanych z patologiczną funkcją układu immunologicznego.

### ZASTOSOWANIE KLINICZNE LIMFOCYTÓW T REGULATORYCH CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

Większość układów badawczych zakłada manipulację ilościową limfocytami Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, postulując transfer dodatkowych limfocytów Treg w przypadkach pożądanej immunosupresji (autoimmunizacja, atopia, allotransplantacja) lub neutralizacji Treg w przypadkach chęci zwiększenia odpowiedzi przeciwko określonym antygenom (nowotwory, przetrwałe zakażenia, szczepienia ochronne). Początkowo, limfocyty Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> zostały określone mianem komórek anergicznyc, gdyż nie proliferowały na skutek standardowej stymulacji *via* TCR. Jednakże w późniejszych badaniach wykazano, że są one zdolne do proliferacji w określonych warunkach bez utraty swoich właściwości [3]. Z technicznego punktu widzenia zwiększenie liczby limfocytów Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> można uzyskać na dwa sposoby. Pierwszym jest proliferacja limfocytów Treg – może być stymulowana w warunkach *in vivo* przez cytokiny, cząsteczki kostymulujące lub leki. Drugą możliwością to ekspansja limfocytów Treg uprzednio wyizolowanych od pacjenta w hodowli *in vitro* po stymulacji TCR i w obecności IL-2 i/lub IL-15. Do stymulacji limfocytów były stosowane przeciwciała anti-CD3 w po-

staci rozpuszczalnej lub związanej oraz komórki dendrytyczne, co w połączeniu ze stymulacją cytokinami dawało 5–10-krotną proliferację komórek w przeciągu 2 tygodni hodowli [43,45]. Po namnożeniu odpowiedniej liczby komórek i ich stymulacji następowałyby ich powrotne przetoczenie danemu pacjentowi. Dodatkową zaletą takiej metody jest możliwość wyindukowania antygenowo swoistych Treg w przypadku, gdy znany jest swoisty dla danej choroby antygen. Limfocyty Treg mogą być ponadto namnożone *de novo* z limfocytów CD4<sup>+</sup> naiwnych w obecności IL-2 i TGF-β [50,51]. Badania nad optymalnym protokołem umożliwiającym uzyskanie jak największej liczby limfocytów Treg z zachowaniem ich właściwości supresyjnych w warunkach *in vitro* wciąż trwają. Ostatnie doświadczenia przeprowadzone na komórkach ludzkich wykazały, że w wyniku hodowli limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> w obecności anti-CD3, anti-CD28, IL-2 i naświetlonych limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> uzyskiwano 100-krotną ekspansję limfocytów Treg, które zachowywały właściwości supresyjne do 6 tygodni [12].

Zniesienie funkcji limfocytów Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> można uzyskać przez zastosowanie przeciwciał blokujących anti-CD25. Część cząsteczka CD25 nie jest idealnym antygenem docelowym do blokowania funkcji limfocytów Treg, gdyż marker ten jest również obecny na aktywowanych limfocytach T. Dlatego też podjęto próby blokowania innych cząsteczek związanych z funkcją limfocytów Treg, takich, jak CTLA-4 czy TGF-β. Jednakże takie postępowanie było tylko częściowo skuteczne w ograniczaniu działania hamującego tych komórek.

Manipulacja limfocytami Treg w celach terapeutycznych jest dziedziną ogromnie obiecującą, ale jednocześnie niosącą zagrożenie dysregulacji układu immunologicznego, gdyż zarówno nadmiar, jak i niedobór funkcjonalnie aktywnych limfocytów Treg może doprowadzić do immunopatologii. Uzyskanie dynamicznej równowagi pomiędzy stanem aktywacji i supresji w obrębie układu immunologicznego w zależności od bieżących potrzeb może się stać kluczem do immunoterapii wielu chorób. Należy pamiętać, że limfocyty Treg często działają jako obusieczny miecz, dlatego też wszelkie próby modyfikacji tych komórek u ludzi powinny być prowadzone z wielką ostrożnością.

### PIŚMIENICTWO

- [1] Aluvihare V.R., Kallikourdis M., Betz A.G.: Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.*, 2004; 5: 266–271
- [2] Asano M., Toda M., Sakaguchi N., Sakaguchi S.: Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.*, 1996; 184: 387–396
- [3] Baecher-Allan C., Viglietta V., Hafler D.A.: Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Semin. Immunol.*, 2004; 16: 89–98
- [4] Belkaid Y., Piccirillo C.A., Mendez S., Shevach E.M., Sacks D.L.: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, 2002; 420: 502–507
- [5] Belkaid Y., Rouse B.T.: Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat. Immunol.*, 2005; 6: 353–360
- [6] Bellinghausen I., Klostermann B., Knop J., Saloga J.: Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003; 111: 862–868
- [7] Clark F.J., Gregg K., Piper K., Dunnion D., Freeman L., Griffiths M., Begum G., Mahendra P., Craddock C., Chakraverty R.: Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells. *Blood*, 2004; 103: 2410–2416
- [8] Cohen J.L., Trenado A., Vasey D., Klatzmann D., Salomon B.L.: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.*, 2002; 196: 401–406
- [9] Dao Nguyen X., Robinson D.S.: Fluticasone propionate increases CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cell suppression of allergen-stimulated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells by an IL-10-dependent mechanism. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004; 114: 296–301
- [10] Edinger M., Hoffmann P., Ermann J., Drago K., Fathman C.G., Strober S., Negrin R.S.: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat. Med.*, 2003; 9: 1144–1150
- [11] Ehrenstein M.R., Evans J.G., Singh A., Moore S., Warnes G., Isenberg D.A., Mauri C.: Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFα therapy. *J. Exp. Med.*, 2004; 200: 277–285

- [12] Godfrey W.R., Ge Y.G., Spoden D.J., Levine B.L., June C.H., Blazar B.R., Porter S.B.: *In vitro*-expanded CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. *Blood*, 2004; 104: 453–461
- [13] Grindebacke H., Wing K., Andersson A.C., Suri-Payer E., Rak S., Rudin A.: Defective suppression of Th2 cytokines by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in birch allergies during birch pollen season. *Clin. Exp. Allergy*, 2004; 34: 1364–1372
- [14] Heikkinen J., Mottonen M., Alanen A., Lasilla O.: Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004; 136: 373–378
- [15] Hoffmann P., Ermann J., Edinger M., Fathman C.G., Strober S.: Donor-type CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.*, 2002; 196: 389–399
- [16] Horwitz D.A., Zheng S.G., Gray J.D., Wang J.H., Ohtsuka K., Yamagiwa S.: Regulatory T cells generated *ex vivo* as an approach for the therapy of autoimmune disease. *Semin. Immunol.*, 2004; 16: 135–143
- [17] Jones S.C., Murphy G.F., Korngold R.: Post-hematopoietic cell transplantation control of graft-versus-host disease by donor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells to allow an effective graft-versus-leukemia response. *Biol. Blood Marrow. Transplant.*, 2003; 9: 243–256
- [18] Jutel M., Akdis M., Budak F., Aebischer-Casaulta C., Wrzyszczyk M., Blaser K., Akdis C.A.: IL-10 and TGF- $\beta$  cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur. J. Immunol.*, 2003; 33: 1205–1214
- [19] Karagiannidis C., Akdis M., Holopainen P., Woolley N.J., Hense G., Ruckert B., Mantel P.Y., Menz G., Akdis C.A., Blaser K., Schmidt-Weber C.B.: Glucocorticoids upregulate Foxp3 expression and regulatory T cells in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004; 114: 1425–1433
- [20] Kohm A.P., Carpentier P.A., Anger H.A., Miller S.D.: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 2002; 169: 4712–4716
- [21] Kukreja A., Cost G., Marker J., Zhang C., Sun Z., Lin-Su K., Ten S., Sanz M., Exley M., Wilson B., Porcelli S., Maclaren N.: Multiple immunoregulatory defects in type-1 diabetes. *J. Clin. Invest.*, 2002; 109: 131–140
- [22] Lewkowicz N., Lewkowicz P., Banasik M., Kurnatowska A., Tchórzewski H.: Predominance of type 1 cytokines and decreased number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> high T regulatory cells in peripheral blood of patients with recurrent aphthous ulcerations. *Immunol. Lett.*, 2005; 15: 57–62
- [23] Ling E.M., Smith T., Nguyen X.D., Pridgeon C., Dallman M., Arbery J., Carr V.A., Robinson D.S.: Relation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*, 2004; 363: 608–615
- [24] Lundgren A., Stromberg E., Sjoling A., Lindholm C., Enarsson K., Edebo A., Johnsson E., Suri-Payer E., Larsson P., Rudin A., Svennerholm A.M., Lundin B.S.: Mucosal FOXP3-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Infect. Immun.*, 2005; 73: 523–531
- [25] Lundgren A., Suri-Payer E., Enarsson K., Svennerholm A.M., Lundin B.S.: *Helicobacter pylori*-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells suppress memory T-cell responses to *H. pylori* in infected individuals. *Infect. Immun.*, 2003; 71: 1755–1762
- [26] McDonald A.J., Duffy M., Brady M.T., McKiernan S., Hall W., Hegarty J., Curry M., Mills K.H.: CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J. Infect. Dis.*, 2002; 185: 720–727
- [27] McKee A.S., Pearce E.J.: CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J. Immunol.*, 2004; 173: 1224–1231
- [28] Mombaerts P., Iacomini J., Johnson R.S., Herrup K., Tonegawa S., Papaioannou V.E.: RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*, 1992; 68: 869–877
- [29] Onizuka S., Tawara I., Shimizu J., Sakaguchi S., Fujita T., Nakayama E.: Tumor rejection by *in vivo* administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor  $\alpha$ ) monoclonal antibody. *Cancer Res.*, 1999; 59: 3128–3133
- [30] Putheti P., Morris M., Stawiarz L., Teleshova N., Kivisakk P., Pashenkov M., Kouwenhoven M., Wiberg M.K., Bronge L., Huang Y.M., Soderstrom M., Hillert J., Link H.: Multiple sclerosis: a study of chemokine receptors and regulatory T cells in relation to MRI variables. *Eur. J. Neurol.*, 2003; 10: 529–535
- [31] Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M.: 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 diseases. *J. Immunol.*, 1995; 155: 1151–1164
- [32] Sakaguchi S., Takahashi T., Nishizuka Y.: Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer. *J. Exp. Med.*, 1982; 156: 1565–1576
- [33] Salomon B., Lenschow D.J., Rhee L., Ashourian N., Singh B., Sharpe A., Bluestone J.A.: B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, 2000; 12: 431–440
- [34] Sasada T., Kimura M., Yoshida Y., Kanai M., Takabayashi A.: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer*, 2003; 98: 1089–1099
- [35] Sasaki Y., Sakai M., Miyazaki S., Higuma S., Shiozaki A., Saito S.: Decidual and peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol. Hum. Reprod.*, 2004; 10: 347–353
- [36] Shimizu J., Yamazaki S., Sakaguchi S.: Induction of tumor immunity by removing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells: a common basic between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.*, 1999; 163: 5211–5218
- [37] Shinkai Y., Rathbun G., Lam K.P., Oltz E.M., Stewart V., Mendelsohn M., Charron J., Datta M., Yonng F., Stall A.M.: RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, 1992; 68: 855–867
- [38] Somerset D.A., Zheng Y., Kilby M.D., Sansom D.M., Drayson M.T.: Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T-cell subset. *Immunology*, 2004; 112: 38–43
- [39] Sugiyama H., Gyulai R., Toichi E., Garaczi E., Shimada S., Stevens S.R., McCormick T.S., Cooper K.D.: Dysfunctional blood and target tissue CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J. Immunol.*, 2005; 174: 164–173
- [40] Suttmuller R.P., van Duivenvoorde L.M., van Elsas A., Schumacher T.N., Wildenberg M.E., Allison J.P., Toes R.E., Offringa R., Melief C.J.: Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.*, 2001; 194: 823–832
- [41] Suto A., Nakajima H., Kagami S.I., Suzuki K., Saito Y., Iwamoto I.: Role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in Th2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001; 164: 680–687
- [42] Suvas S., Kumaraguru U., Pack C.D., Lee S., Rouse B.T.: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells regulate virus-specific primary and memory CD8<sup>+</sup> T cell response. *J. Exp. Med.*, 2003; 198: 889–901
- [43] Taylor P.A., Lees C.J., Blazar B.R.: The infusion of *ex vivo* activated and expanded CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*, 2002; 99: 3493–3499
- [44] Tchórzewski H., Rotsztein H., Banasik M., Lewkowicz P., Glowacka E.: The involvement of immunoregulatory T cells in the pathogenesis of lichen sclerosis. *Med. Sci. Monit.*, 2005; 11(1): CR39–CR43
- [45] Trenado A., Charlotte F., Fisson S., Yagello M., Klatzmann D., Salomon B.L., Cohen J.L.: Recipient-type specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-host-leukemia. *J. Clin. Invest.*, 2003; 112: 1688–1696
- [46] Viglietta V., Baecher-Allan C., Weiner H.L., Hafler D.A.: Loss of functional suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.*, 2004; 199: 971–979
- [47] Viguier M., Lemaitre F., Verola O., Cho M.S., Gorochov G., Dubertret L., Bachelez H., Kourilsky P., Ferradini L.: Foxp3 expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J. Immunol.*, 2004; 173: 1444–1453
- [48] Weiss L., Donkova-Petrini V., Caccavelli L., Balbo M., Carbonnel C., Levy Y.: Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients. *Blood*, 2004; 104: 3249–3256
- [49] Woo E.Y., Yeh H., Chu C.S., Schlienger K., Carroll R.G., Riley J.L., Kaiser L.R., June C.H.: Regulatory T cells form lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J. Immunol.*, 2002; 168: 4272–4276
- [50] Yamagiwa S., Gray J.D., Hashimoto S., Horwitz D.A.: A role for TGF- $\beta$  in the generation and expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells from human peripheral blood. *J. Immunol.*, 2001; 166: 7282–7289
- [51] Zheng S.G., Wang J.H., Gray J.D., Soucier H., Horwitz D.A.: Natural and induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells educate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF- $\beta$ , and IL-10. *J. Immunol.*, 2004; 172: 5213–5221