

Received: 2007.01.26
Accepted: 2007.03.23
Published: 2007.04.10

Limfocyty regulatorowe CD4+CD25+ – znaczenie w patogenezie i leczeniu chorób nerek

The significance of regulatory CD4+CD25+ T cells in the pathogenesis and treatment of kidney disease

Magdalena Krajewska, Wacław Weyde, Marian Klinger

Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Akademii Medycznej we Wrocławiu

Streszczenie

Dzięki precyzyjnie regulowanej odpowiedzi układ immunologiczny dąży do zachowania homeostazy, a jednym z istotnych mechanizmów tej regulacji są limfocyty T-regulatorowe. W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy dotyczący naturalnie występujących komórek regulatorowych o fenotypie CD4+CD25+ oraz ich udziału w patogenezie schorzeń immunologicznych. Zaburzenia funkcjonalne oraz ilościowe tej populacji komórek stwierdzone są w wielu chorobach, w przebiegu których dochodzi do zajęcia nerek, np. mieszanej krioglobulinemii, reumatoidalnym zapaleniu stawów, chorobie Sjögrena, toczniu układowym i cukrzycy typu 1. Przedstawiono rolę limfocytów T i zależnych od limfocytów T mechanizmów efektorowych i regulatorowych w rozwoju i progresji kłębuszkowych zapaleń nerek. Omówiono również znaczenie komórek regulatorowych w powstawaniu i progresji przewlekłej niewydolności nerek. Wątpliwości, czy zmniejszona liczba i/lub upośledzona funkcja komórek regulatorowych promują rozwój chorób autoimmunizacyjnych, czy są fenomenem wtórnym, rozstrzygają obserwacje kliniczne, w których odbudowa puli tych komórek, zapobiega dalszemu uszkodzeniu tkanek. Wzmocnienie lub blokada funkcji limfocytów regulatorowych i uzyskanie równowagi między stanem aktywacji i supresji w obrębie układu immunologicznego w zależności od bieżących potrzeb może się stać kluczem do immunoterapii wielu chorób. Kolejnym przedstawionym w pracy zagadnieniem są perspektywy leczenia komórkami regulatorowymi, przy zastrzeżeniu, że próby modyfikacji aktywności, jak i zmian liczby tych komórek muszą być prowadzone z wielką ostrożnością, ponieważ takie postępowanie stwarza zagrożenie dysregulacją układu immunologicznego.

Słowa kluczowe:

limfocyty regulatorowe • kłębuszkowe zapalenia nerek • przewlekła niewydolność nerek

Summary

Thanks to a precisely regulated response, the immune system works to maintain homeostasis, and one of the significant mechanisms of this regulation is regulatory T cells. This paper presents the latest knowledge concerning the occurrence of natural regulatory T cells of CD4+CD25+ phenotype and their role in the pathogenesis of immune system diseases. Functional and quantitative disorders in this population of cells are found in many diseases which in their course attack the kidney, for instance mixed cryoglobulinemia, rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome, lupus erythematosus, and type 1 diabetes mellitus. The role of T cells and the effector and regulatory mechanisms dependent on them in the development and progression of glomerulonephritis is presented. The role of regulatory T cells in the development and progression of chronic kidney disease is discussed as well. Qualms whether a decreased number and/or disrupted function of regulatory T cells promote the development of autoimmune diseases or whether they are secondary phenomena are settled by clinical observations in which restoration of the number of

the cells prevents further tissue damage. Strengthening or blocking regulatory T-cell functions and obtaining a balance between activation and suppression in the immune system depending on current needs may become the key to the immunotherapy of many diseases. Another problem presented in this paper is the perspective of regulatory T cell therapy; however, attempts to modify their activity and change the number of cells must be carried with the greatest of care because such a procedure may result in dysregulation of the immune system.

Key words: regulatory T cells • glomerulonephritis • chronic renal failure

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10352.pdf

Word count: 3299

Tables: –

Figures: 1

References: 51

Adres autorki: dr n med Magdalena Krajewska, Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Akademii Medycznej we Wrocławiu, ul. Traugutta 57/59, 50-417 Wrocław; e-mail: magda@softstar.pl

Dzięki precyzyjnie regulowanej odpowiedzi układ immunologiczny dąży do zachowania homeostazy, a jednym z istotnych mechanizmów tej regulacji są limfocyty T-regulatorowe. Limfocyty T-regulatorowe (Treg) uczestniczą m.in. w wytwarzaniu tolerancji na antygeny pokarmowe i antygeny bakterii saprofitycznych, biorą udział w odpowiedzi przeciwinfekcyjnej i przeciwnowotworowej, odpowiedzi immunologicznej po szczepieniach ochronnych, powstawaniu tolerancji transplantacyjnej oraz hamują limfocyty autoreaktywne [17]. Niedobór i upośledzenie funkcji tych komórek mogą być przyczyną powstawania chorób autoimmunizacyjnych, alergii i niektórych postaci bezpłodności kobiet. Nadmierna aktywność limfocytów regulatorowych, „wyciszająca” odpowiedź immunologiczną może natomiast prowadzić do nieprawidłowego rozpoznania zmienionych autoantygenów i w konsekwencji do braku skutecznej eliminacji komórek nowotworowych oraz niedostatecznej obrony przeciwinfekcyjnej. Nieprawidłowości dotyczące tej populacji odgrywają również rolę w patogenezie wielu chorób nerek.

LIMFOCYTY REGULATOROWE

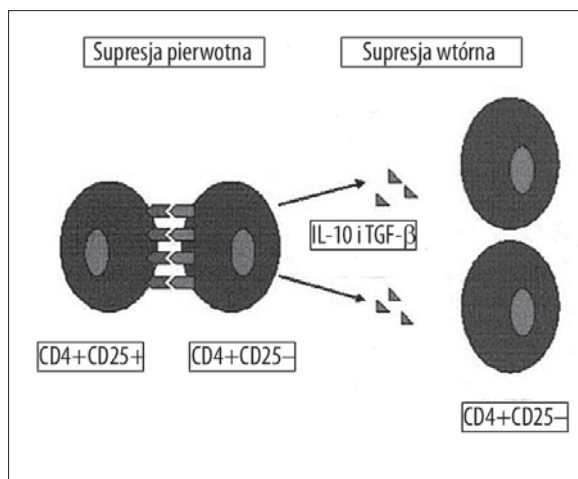
Populacja limfocytów regulatorowych jest zróżnicowana. Funkcje regulatorowe pełnią limfocyty o fenotypie CD8+CD28–, limfocyty T $\gamma\delta$ i NKT i niektóre limfocyty cytotoksyczne. Aktywacja dojrzałych komórek T w warunkach suboptymalnej prezentacji antygeny lub/i suboptymalnej kostymulacji prowadzi do powstania limfocytów Th3 i Tr1 – tzw. populacji nabytych komórek regulatorowych. Limfocyty Tr1 uczestniczą w mechanizmie wydzielania interleukiny 10 (IL-10) i transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β), natomiast Th3 wytwarzają głównie TGF- β . Do limfocytów regulatorowych są zaliczane również limfocyty Th2, które wykazują swoje funkcje regulatorowo-supresorowe głównie wobec limfocytów Th1 i odpowiedzi typu komórkowego. Limfocyty Th1 hamują aktywność limfocytów Th2 i odpowiedź humoralną. Zjawisko to nazywamy dewiacją immunologiczną [14].

Najważniejszą rolę spełniają naturalnie występujące komórki regulatorowe o fenotypie CD4+CD25+ stanowiące 5–10% wszystkich limfocytów T.

Mechanizmy odpowiedzialne za indukcję różnych rodzajów komórek regulatorowych są przedmiotem intensywnych badań. Podkreślana jest rola komórek dendrytycznych, ponieważ jeżeli antygen jest prezentowany przez niedojrzałą komórkę dendrytyczną, to dziewiczy limfocyt T różnicuje się w komórkę regulatorową a nie efektorową [31]. Interesujące jest spostrzeżenie, że do aktywacji komórek regulatorowych CD4+CD25+ potrzebne są mniejsze stężenia antygeny, niż do stymulacji komórek CD4+CD25–. W badaniach doświadczalnych potwierdzono, że jakościowe i ilościowe różnice pobudzania receptora limfocytu T (TCR) powodują powstawanie różnych sygnałów i różnicowanie komórek dendrytycznych w kierunku komórek regulatorowych lub efektorowych [1,3,7]. Rola kostymulacji CD28/B7 w utrzymaniu homeostazy komórek regulatorowych dokumentują badania, w których podanie w modelu mysim antagonisty CD28 – CTLA4-Ig powodowało znaczne zmniejszenie liczby obwodowych limfocytów CD4+CD25+ (o 80%) [39]. Blokada CD28, z użyciem preparatu LEA29Y (zmutowana postać CTLA4-Ig) jest uzasadniona w celu zahamowania aktywacji i wczesnej ekspansji komórek efektorowych, jednak zaobserwowany niekorzystny wpływ takiego postępowania na komórki regulatorowe, stwarza potrzebę prowadzenia dalszych badań [3]. Liczba komórek regulatorowych wzrasta po podaniu antygeny donosowo, doustnie i w wyniku wielokrotnej stymulacji antygenem dożylnie [14].

LIMFOCYTY T CD4+CD25+

Komórki te wykazują stałą ekspresję łańcucha alfa receptora interleukiny 2 (IL-2) – CD25, ale siła ekspresji tej cząsteczki jest różna. Aktywne komórki regulatorowe o fenotypie CD4+CD25^{high} stanowią 1–2% całej puli limfocytów T. Limfocyty Treg stale ekspozycja cząsteczki CD45RO i charakteryzują się dużą ekspresją cząsteczek HLA DR. Pozostałe markery komórek regulatorowych to CD122 – łańcuch γ receptora IL-2, CTLA-4 i CD62L. Istotną rolę spełnia GITR (glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor), poprzez który funkcje tych komórek podlegają regulacji. Związanie GITR zwiększa poziom czynnika jądrowego NF B, natomiast jego zablokowanie przeciwdział



Ryc.1. Model tzw. fenomenu tolerancji infekcyjnej

łem poliklonalnym powoduje zmniejszenie supresji komórek T CD25⁻ przez komórki CD25⁺ w mieszanej hodowli [3]. Ligand GITR (GITR-L) znosi hamowanie wywołane przez Treg. Być może interwencje terapeutyczne w układ GIRT/GIRT-L pozwolą wpływać na supresyjne działanie Treg [37]. Istotnym, swoistym markerem Treg jest czynnik transkrypcyjny *Foxp3* (forkhead box p3). Kontroluje on różnicowanie się limfocytów regulatorowych i ekspresję ich supresyjnego fenotypu [41]. Jego działanie można określić jako „wyciszacz” promotorów genów cytokin. Mutacja genu *Foxp3* powoduje brak powstawania scurfiny, stanowiącej produkt genu, potrzebnej do generacji komórek regulatorowych CD4⁺CD25⁺ i w konsekwencji powstanie zespołu immunodysregulacji, poliendokrynopatii i enteropatii w wyniku niczym nieograniczonego działania aktywowanych komórek CD4⁺ [43]. Wykazano, że glikokortykosteroidy aktywują *Foxp3* i generują powstanie komórek regulatorowych [3]. Komórki regulatorowe, które można wytworzyć *in vitro* transferując gen *Foxp3* do komórek dziewiczych mają zdolność kontroli procesów autoimmunologicznych i procesu odrzucania, co w przyszłości może stanowić opcję terapeutyczną. Ukazały się prace, w których w modelu doświadczalnym transfer genu *Foxp3* do komórek CD4⁺CD25⁻ hamował rozwój zapalenia jelita [16].

Na powierzchni Treg stale występują także molekuly PD1 oraz Notch. U szczepów dzikich myszy w cukrzycy autoimmunologicznej wywołanej streptozotocyną komórki CD4⁺ uzyskane od myszy Notch transgenicznych hamowały rozwój stanu zapalnego wysp trzustkowych i hiperlikiemie [28].

Działanie hamujące komórek regulatorowych CD4⁺CD25⁺ wydaje się zależeć od ich bezpośredniego kontaktu z komórkami docelowymi, co potwierdzono w badaniach *in vivo*. Prawdopodobnie istotną rolę odgrywają w tym mechanizmie cząsteczki PD1 oraz Notch. Badania *in vitro* wykazują natomiast, że komórki regulatorowe działają również w sposób zależny od cytokin, wykorzystując supresyjne działanie TGF- β i IL-10. Uważa się, że zdolności supresyjne Treg warunkowane są intensywną ekspresją postaci błonowych TGF- β . Zastosowanie przeciwciała anti-TGF- β zmniejsza zdolność Treg do hamowania proliferacji komórek CD4⁺CD25⁻, a także wytwarzania immunoglobulin przez

limfocyty B [26]. W mechanizmie zależnym od cytokin hamowaniu przez komórki regulatorowe podlegają zarówno limfocyty T, jak i inne komórki układu immunologicznego, w tym komórki układu odporności wrodzonej [2].

Naturalnie występujące komórki regulatorowe mają cechy komórek w stanie anergii, tzn. wykazują znacznie osłabioną zdolność proliferacji, a po aktywacji nie wytwarzają cytokin. W badaniach przeprowadzonych na mikromacierzach DNA u myszy wykazano, że w aktywowanych limfocytach regulatorowych dochodzi do indukcji trzech molekuł bioaktywnych udział w procesie SOCS (suppression of cytokine signaling). Może to tłumaczyć brak wytwarzania IL-2 nawet w niewielkich, wystarczających do własnej proliferacji ilościach. Limfocyty T-regulatorowe CD4⁺CD25⁺ hamują w sposób zależny od dawki proliferację limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ oraz wytwarzanie przez nie cytokin [12,19].

Aktywacja limfocytów Treg i uruchomienie funkcji regulatorowych wymaga swoistej antygenowo stymulacji przez TCR, jednak raz aktywowane komórki mogą wywierać efekt supresorowy w sposób nieswoisty antygenowo, co ma ogromne znaczenie w leczeniu chorób autoimmunizacyjnych, w przebiegu których dochodzi do odpowiedzi na bardzo liczne, w większości niezidentyfikowane antygeny [14].

Komórki regulatorowe to grupa komórek, w odróżnieniu od swoistych antygenowo limfocytów cytotoksycznych (Tc) i pomocniczych (Th), które mogą również oddziaływać w sposób niezależny od antygeny, cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej (MHC) i komórek prezentujących antygen (APC), co udało się to wykazać *in vitro*. Niezależność funkcji od tych czynników wskazuje na rolę Treg w regulacji odporności wrodzonej [28].

Komórki regulatorowe są anergiczne *in vitro*, natomiast *in vivo*, chociaż ich fenotyp nie ulega zmianie, zachowują się dynamicznie. Na mysich komórkach regulatorowych wykazano ekspresję receptorów Toll-like (TLR) 4, 5, 7 i 8. Gdy Treg inkubowano z lipopolisacharydami (LPS) – ligandem TLR4, ich aktywność supresyjna wzrosła 10-krotnie, wydłużyło się przeżycie oraz uległa zwiększeniu ekspresja markerów powierzchniowych. Zmienić działanie komórek regulatorowych *in vivo* można modyfikując aktywację Treg, a przez to wpływając na zwiększoną obecnością patogenów ekspresję molekuł kostymulacyjnych na APC. Ligandy TLR oraz cytokiny wytwarzane zarówno podczas wrodzonej, jak i nabytej odpowiedzi immunologicznej anezją brak zdolności tych komórek do wytwarzania IL-2 i anergii w odpowiedzi na związanie receptora TCR. W ten sposób zmniejszają hamowanie układu immunologicznego w sytuacji zagrożenia infekcją, natomiast gdy infekcja jest opanowana, supresyjne właściwości tych komórek powracają. Inna koncepcja zakłada, że antygeny bakteryjne oddziałując poprzez TLR, znajdujących się na Treg powodują zwiększoną ekspresję CTLA4 i indukcję Th supresorowych wytwarzających IL-10 i TGF- β [47]. Sposób, w jaki stosunkowo mała liczba komórek regulatorowych indukuje wysoki poziom supresji wyjaśnia przedstawiony na rycinie model tzw. fenomenu tolerancji infekcyjnej.

W wyniku kontaktu międzykomórkowego limfocyty CD4⁺CD25⁺ oddziałują pierwotnie na komórki

ki CD4+CD25⁻ wywołując ich anergię. Anergiczne CD4+CD25⁻ wydzielają IL-10 i TGF- β hamując dalsze CD4+CD25⁻. Zarówno IL-10, jak i TGF- β *in vivo* wpływają supresyjnie także na komórki dendrytyczne, makrofagi i inne komórki hematopoetyczne [46].

ROLA KOMÓREK REGULATORYWYCH W PATOGENEZIE SCHORZEŃ IMMUNOLOGICZNYCH

Limfocyty regulatorowe spełniają główną rolę w utrzymaniu homeostazy immunologicznej. Myszy pozbawione grasicy w trzecim dniu życia stają się podatne na rozwój swoistych narządowo chorób autoimmunizacyjnych, a transfer limfocytów od zdrowych, dorosłych myszy zapobiega ich rozwojowi. Podanie myszom puli limfocytów pozbawionej komórek CD4+CD25+ sprzyjało rozwojowi chorób autoimmunizacyjnych, podczas gdy transfer limfocytów CD4+CD25+ powodował hamowanie autoimmunizacji [25].

Udowodniono, że komórki regulatorowe dzięki swoim właściwościom pełnią rolę w utrzymaniu tolerancji [11]. W ostatnim okresie – na modelach swoistych narządowo chorób autoimmunologicznych – udało się wykazać, że komórki regulatorowe nie tylko chronią przed wystąpieniem chorób autoimmunologicznych, ale również mogą hamować odpowiedź limfocytów T na antygeny egzogenne [13]. Zdolność hamowania patologii zależnej od komórek T jest intensywnie badana.

U ludzi ze schorzeniami immunologicznymi stwierdzane są różnego rodzaju zaburzenia funkcji komórek regulatorowych. W stwardnieniu rozsianym populacja limfocytów regulatorowych wykazuje obniżoną zdolność hamowania proliferacji i wydzielania cytokin przez limfocyty efektorowe w porównaniu z osobami zdrowymi [40]. Takie zaburzenia dotyczą również wielu schorzeń, w których dochodzi do zajęcia nerek. W mieszanej krioalbuminemii wykazano deficyt zarówno liczbowy, jak i funkcjonalny Treg [4]. W reumatoidalnym zapaleniu stawów komórki regulatorowe hamują proliferację limfocytów T *in vitro*, ale wykazują zmniejszoną zdolność hamowania wytwarzania prozapalnych cytokin zarówno przez limfocyty efektorowe, jak i monocyty w mieszanych hodowlach [10]. W zespole Sjögrena upośledzenie funkcji limfocytów T-supresorowych jest podstawowym zaburzeniem immunologicznym. Nacieki zapalne w gruczołach wydzielania zewnętrznego zawierają nieliczne komórki supresorowe. Wśród limfocytów obwodowych także jest stwierdzana zmniejszona liczba tych komórek. Obserwuje się również obniżoną aktywność komórek NK, a nadmierną aktywność limfocytów B. W toczniu układowym utrata tolerancji na własne antygeny wynika z upośledzenia funkcji supresyjno-regulatorowych limfocytów T, prowadzącej do poliklonalnej aktywacji komórek B i wytwarzania autoprzeciwciał [29], ale opisywano także zmniejszenie liczby tych komórek w aktywnym okresie choroby [8]. Zaburzoną funkcję komórek regulatorowych wykazują chorzy na cukrzycę typu 1 [22]. Jest to choroba autoimmunizacyjna, w której antygenami mogą być m.in. insulina, białko transportujące glukozę i dekarboksylaza kwasu glutaminowego (GAD). Wykazano, że podanie zdrowym szczurom limfocytów T od szczepu szczurów DP-BB (rozwijających tzw. przyspieszoną postać cukrzycy) wywołuje chorobę, natomiast ich

podanie jednocześnie z limfocytami T CD4+CD25+ zapobiega wystąpieniu cukrzycy [3]. U pacjentów ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1 ilość Treg jest taka sama jak u zdrowych, natomiast ich zdolność do hamowania proliferacji *in vitro* jest znamiennej mniejsza niż w grupie kontrolnej, a dodatkowo komórki wykazują bardziej prozapalny fenotyp – ze zwiększonym wytwarzaniem interferonu γ (IFN- γ) i zmniejszonym wytwarzaniem IL-10.

KŁĘBUSZKOWE ZAPALENIA NEREK

Kłębuszkowe zapalenie nerek (KZN) to schorzenie, do rozwoju którego dochodzi w wyniku zaburzenia homeostazy w układzie immunologicznym, a wiele postaci KZN uważane jest za choroby autoimmunizacyjne. W patogenezie KZN uczestniczy zarówno humoralna, jak i komórkowa odpowiedź immunologiczna skierowana przeciwko antygenom kłębuszka lub osadzonym w kłębuszku. Na podstawie badań kłębuszkowych zapaleń nerek u ludzi, jak i na modelach zwierzęcych trzeba podkreślić rolę limfocytów T i zależnych od limfocytów T mechanizmów efektorowych i regulatorowych w rozwoju i progresji uszkodzenia kłębuszka. Wykazano, że niezależnie od odkładania się przeciwciał komórki T są w stanie zainicjować i nasilać uszkodzenia zapalne [50]. Typ zmian morfologicznych rozwijających się w kłębuszku nie jest uzależniony jedynie od rodzaju antygeny. Podstawowe znaczenie ma genetycznie determinowana zdolność do określonego rodzaju reaktywności immunologicznej. Porównano przebieg nefrotoksycznego KZN w odpowiedzi na ten sam antygen u dwóch szczepów myszy predysponowanych genetycznie do odpowiedzi typu Th1 lub Th2. Morfologia i nasilenie zmian zapalnych w kłębuszkach były zupełnie różne. U myszy prezentujących aktywność typu Th1, czyli wytwarzających głównie IL-2 i IFN- γ obserwowano rozplem komórek kłębuszków, napływ limfocytów i makrofagów oraz formowanie półksiężyców. U myszy wytwarzających w tych samych warunkach przede wszystkim IL-4 i IL-10, czyli wykazujących reaktywność typu Th2, zmiany polegały na masywnej ekspansji macierzy mezangium, pogrubieniu błon podstawnych ze złogami immunoglobulin i dopełniacza wzdłuż błony podstawnej. Obserwacje na ludziach potwierdzają, że w błoniastorozplemowym KZN i chorobie Goodpasture'a przeważa odpowiedź Th1, podczas gdy w chorobie zmian minimalnych, nefropatii błoniastej i nefropatii IgA odpowiedź Th2. Oprócz czynników genetycznych wpływ na typ odpowiedzi ma środowisko, bo częstsza ekspozycja na antygeny patogenów w dzieciństwie prowadzi do przewagi odpowiedzi Th1, natomiast mniejsza liczba przeżytych infekcji, do przetrwania niemowlęcej odpowiedzi typu Th2 [18].

W chorobie Goodpasture'a (anty-GBM nephritis) autoantygen jest rozpoznawany zarówno przez limfocyty B, jak i limfocyty T, ale dotychczas tylko epitopy komórek B zostały w sposób przekonywający scharakteryzowane [48]. Limfocyty reagują z determinantą w niekolagenowej domenie łańcucha $\alpha 3$ kolagenu typu IV, określaną jako antygen Goodpasture'a [27]. Rzadkość choroby, spontaniczne znikanie autoprzeciwciał i zmniejszenie liczby autoreaktywnych komórek T w wyniku leczenia sugeruje istotne znaczenie funkcjonalnej tolerancji, a tym samym roli komórek regulatorowych w tym schorzeniu. Grasicza ekspresja autoantygeny wskazuje, że proces tolerancji odbywa się na

poziomie delecji centralnej, a do potencjalnych mechanizmów należy także anergia [45]. Autoreaktywne, swoiste wobec błony podstawowej (GBM) limfocyty T znajdowano w tzw. puli obwodowej zarówno u pacjentów z ostrymi objawami choroby, jak i u osób bez objawów klinicznych. Nie ma więc wątpliwości, że w zapobieganiu ujawnienia się schorzenia musi uczestniczyć obwodowa aktywna regulacja tolerancji. Potwierdzają to obserwacje zwiększania się populacji swoistych antygenowo Treg po ustąpieniu zaostrzenia choroby [34].

Wątpliwości, czy zmniejszona liczba i upośledzona funkcja komórek regulatorowych promują rozwój chorób autoimmunizacyjnych, czy są fenomenem wtórnym, rozstrzyga obserwacja kliniczna, w której odbudowa puli tych komórek, np. przez ich podanie po wytworzeniu *ex vivo* zapobiega dalszemu uszkodzaniu tkanek [15]. Niedawno ukazały się pierwsze doniesienia na temat możliwości leczenia kłębuszkowych zapaleń nerek podawaniem Treg w modelach zwierzęcych. W modelu anty-GBM transfer komórek regulatorowych znacząco zmniejszał uszkodzenie kłębuszków i nacieki komórkowe przy niezmiennych wielkościach złożeń immunoglobulin, tak więc protekcyjne działanie nie wynikało z zahamowania odpowiedzi humoralnej [44]. W patologii choroby anty-GBM podstawowe znaczenie mają cytokiny Th1. Treg, co udowodniono wielokrotnie, zmniejszają ekspresję prozapalnych cytokin [32]. Podanie Treg w wyżej opisywanym modelu zmniejszało ekspresję mRNA czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α) i IFN- γ . TGF- β jest głównym mediatorem procesu włóknienia nerki, zwiększającym ekspresję wielu białek macierzy i hamujących jej proteolityczną degradację. Nie jest więc zaskoczeniem zmniejszona ekspresja TGF- β u myszy leczonych Treg w porównaniu z grupą kontrolną, chociaż nie należy zapominać o dominującej roli TGF- β w różnicowaniu się komórek regulatorowych poprzez indukcję ekspresji Foxp3.

Zmniejszenie ekspresji czynników niszczenia tkanek (TNF- α , IFN- γ , TGF- β) po podaniu komórek regulatorowych mogłoby sugerować, że komórki regulatorowe gromadzą się w nerkach myszy, i tam zmniejszają szkodliwe działania komórek efektorowych. Autorem nie udało się jednak wykazać mRNA *Foxp3* w nerkach zwierząt leczonych Treg. Wykazano natomiast akumulację tych komórek we wtórnych narządach limfatycznych – głównie śledzionie i węzłach chłonnych. Na tej podstawie można sądzić, że Treg nie wnikają do nerki, inaczej niż w modelu eksperymentalnym zapalenia jelita, gdzie komórki regulatorowe zasiedlają jelito grube i krezkowe węzły chłonne, a następnie migrują do śledziony. W modelu anty-GBM podane Treg w pierwszej kolejności zasiedlały układ chłonny – miejsce, gdzie rozpoczyna się odpowiedź immunologiczna. W tym modelu protekcyjne działanie Treg nie było spowodowane zmniejszeniem wytwarzania Ig przez limfocyty B, chociaż limfocyty Treg mają takie właściwości [36]. Mechanizm regulujący migrację Treg, tzw. homing nie jest wyjaśniony. Ukazało się doniesienie, w którym wykazano, że migracja Treg może się odbywać poprzez CCR4, czyli wyjaśnieniem dystrybucji podanych Treg mogłaby być modulacja tzw. repertuaru receptorów chemokin [9].

Oprócz dotychczas stosowanego leczenia kłębuszkowych zapaleń nerek nakierowanego na zahamowanie aktywacji

komórek autoreaktywnych i zmniejszenia ich klonalnej ekspansji alternatywę stanowić może podawanie komórek regulatorowych. Możliwość namnażania funkcjonalnych komórek regulatorowych pozwala mieć nadzieję na zastosowanie tych komórek w terapii, umożliwiając zmniejszenie nieswoistej immunosupresji i jej powikłań [21].

PRZEWLEKŁA CHOROBA NEREK

W klinicznej, a także we wszystkich eksperymentalnych postaciach przewlekłej choroby nerek stwierdzany jest naciek zapalny w śródmiąższu. Jego nasilenie oraz towarzyszące włóknienie korelują z postępowaniem choroby nerek. Będące istotną składową odporności wrodzonej nacieki z monocytów/makrofagów, wydzielających prozapalne cytokiny (TNF- α , IL-12) oraz stymulujących limfocyty T, stanowią przyczynę przewlekłego uszkodzenia nerki [30]. Limfocyty regulatorowe, jak wykazują badania *in vitro*, mogą działać zarówno w sposób niezależny, jak i zależny od cytokin, a supresyjne cytokiny TGF- β i IL-10 wpływają hamująco na limfocyty T, ale i na komórki uczestniczące w odporności wrodzonej [2]. Niedawno ukazały się prace na temat roli Treg w zapobieganiu postępowi przewlekłej niewydolności nerek [23]. Hamowanie przez Treg aktywności komórek odporności wrodzonej w mechanizmie zależnym od cytokin zostało potwierdzone wcześniej w oparzeniach i chorobach zapalnych jelit [24]. Na modelu nefropatii adriamycynowej (odpowiadającej FSGS i zapaleniu śródmiąższowemu) wykazano, że usunięcie limfocytów CD4+ nasila uszkodzenie nerki, co sugeruje, że któraś z subpopulacji tych komórek działa ochronnie i zapobiega progresji choroby. Aby wykazać, że działanie to jest swoiste dla komórek regulatorowych CD4+CD25+, podano myszom Treg uzyskując znaczące zmniejszenie twardnienia kłębuszków, mniejsze nacieki w śródmiąższu i mniej znaczone uszkodzenia cewek w porównaniu z grupą kontrolną [42]. Badania mechanizmu działania Treg wykazały *in vitro*, że CD4+CD25+ mogą hamować powstawanie efektorowego fenotypu makrofagów oraz ich funkcje, m.in. wydzielanie cytokin w sposób zależny od TGF- β [38]. Tak więc TGF- β , który jest głównym mediatorem włóknienia w nerce *via* Treg może działać ochronnie [49].

Efektywna generacja komórek regulatorowych np. poprzez retrowirusowy transfer genu *Foxp3* do komórek dziewicznych, a następnie ich transfuzja będzie może stanowić sposób zwalniania progresji przewlekłej choroby nerek [51].

Komórki regulatorowe mogą kontrolować proces tolerancji alogenicznego narządu. Zdolność limfocytów regulatorowych do hamowania odpowiedzi limfocytów efektorowych CD4+ i CD8+ stwarza szansę wykorzystania ich w terapii immunosupresyjnej po przeszczepach alogenicznych, w tym po przeszczepieniu nerki [35].

PERSPEKTYWY LECZENIA KOMÓRKAMI REGULATORYMI

Celem leczenia chorób immunologicznych powinna być eliminacja limfocytów autoreaktywnych lub zapobieganie ich aktywacji. Gdy swoiste dla danej choroby autoantygeny nie są znane, teoretycznie możliwa jest terapia limfocytami Treg i hamowanie odpowiedzi immunologicznej niezależnej od antygeny. Choroby nerek, w których swoiste antygenowo limfocyty powodują rozwój choroby oraz te,

w których patomechanizmie uczestniczą komórki regulatorowe są intensywnie badane. Wykazano, że terapia immunosupresyjna może przywracać funkcję Treg. Leczenie preparatem Infliximab (anty-TNF- α) chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów powodowało przywrócenie prawidłowej funkcji i zwiększenia odsetka Treg we krwi obwodowej [10]. Wykazano również wzrost liczby Treg oraz ekspresji *Foxp3* w przebiegu stwardnienia rozsianego po terapii steroidami. Zaobserwowano, że podawanie niewielkich dawek peptydów stanowiących autoantygen normalizuje defekt regulatorowy w toczeniu, powodując generację długo żyjących, wytwarzających TGF- β komórek regulatorowych [20].

Po początkowo nieudanych próbach okazało się, że Treg są zdolne do proliferacji w określonych warunkach bez utraty swoich właściwości. Z technicznego punktu widzenia zwiększenie liczby komórek regulatorowych można uzyskać na dwa sposoby. Pierwszym jest proliferacja Treg stymulowana w warunkach *in vivo* cytokinami, cząstkami kostymulującymi lub lekami. Druga możliwość to ekspansja limfocytów uprzednio wyizolowanych od pacjenta w hodowli *in vitro*. Próby i badania nad optymalnym protokołem wciąż trwają. Po stymulacji przeciwciałem anty CD3 w postaci rozpuszczalnej lub związanej oraz w obecności IL-2 lub IL-15 uzyskiwano 5–10-krotną proliferację komórek w ciągu dwu tygodni hodowli [6]. Ostatnie doświadczenia na komórkach ludzkich wykazały, że w hodowlach w obecności anty-CD3, anty-CD28, IL-2 i naświetlonych limfocytów CD4+CD25⁻ występowała 100-krotna ekspansja limfocytów, zachowujących swoje zdolności supresyjne do 6 tygodni [3]. Zaletą metody *in vitro* jest możliwość wyindukowania swoistych antygenowo Treg.

Bez odpowiedzi pozostaje ciągle wiele pytań – na przykład jak długo po podaniu komórki regulatorowe są w stanie hamować odpowiedź immunologiczną (u myszy przez co najmniej 2 tygodnie). Problematiczna też jest terapia Treg, powodująca nieswoistą immunosupresję w sytuacji zakażeń wirusowych [33].

Nowe próby leczenia obejmują retrowirusowy transfer genu *Foxp3* do komórek CD4+CD25⁻ *in vitro*, powodujący powstanie anergicznyc komórek, o stabilnym, typowym dla

komórek regulatorowych fenotypie, zdolnych do hamowania proliferacji komórek T, a *in vivo* wytworzenia tolerancji [5]. Prowadzone są również próby podawania nieswoistych antygenowo szcziponek (plazmidem DNA kodującym autoantygen np. w cukrzycy typu 1 i stwardnieniu rozsianym) powodujące generację komórek regulatorowych.

W indukcji tolerancji na przeszczep nerki istnieją dwie teoretyczne możliwości wykorzystania naturalnie występujących komórek regulatorowych. Jedną z nich polega na redukcji liczby (lub blokowaniu aktywacji) komórek efektorowych w sposób możliwie najbardziej swoisty, przy jednoczesnym uczulaniu komórek regulatorowych na alloantygen, tak by doszło do zwiększenia populacji Treg. Podawane krótko przeciwciała monoklonalne, a także niektóre leki immunosupresyjne mogą wywoływać tolerancję immunologiczną pod wpływem tego właśnie mechanizmu. Drugim sposobem indukcji tolerancji z użyciem komórek regulatorowych jest izolacja tych komórek od biorcy, ich stymulacja *ex vivo* komórkami dawcy, a następnie podanie ich biorcy przed zabiegiem przeszczepienia. Jest to możliwe jedynie przy przeszczepianiu od dawców żywych. Obecnie bardziej realne wydaje się stworzenie leków lub szcziponek, które powodowałyby ekspansję tych komórek *in vivo* [3].

Limfocyty Treg mogą indukować powstawanie innych regulatorowych limfocytów T, co umożliwia przeniesienie tolerancji z jednego osobnika na drugiego. Prowadzone są badania dotyczące wykorzystania tego zjawiska w wywoływaniu tolerancji transplantacyjnej. Teoretycznie istnieje możliwość transfuzji komórek regulatorowych zwierząt, które wytworzyły tolerancję do tzw. nieuczulonych biorców. Dochodzi wtedy do hamowania odpowiedzi na oryginalny antygen, ale też na inne antygeny przedstawiane przez tę samą komórkę prezentującą.

Wzmocnienie lub blokada funkcji limfocytów regulatorowych i uzyskanie równowagi między stanem aktywacji i supresji w obrębie układu immunologicznego w zależności od bieżących potrzeb może się stać podstawą immunoterapii wielu chorób. Takie postępowanie stwarza jednak zagrożenie dysregulacją układu immunologicznego, a próby modyfikacji aktywności, jak i zmian liczby tych komórek muszą być prowadzone z wielką ostrożnością.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Apostolou I., Sarukhan A., Klein L., von Boehmer H.: Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat. Immunol.*, 2002; 8: 756–763
- [2] Asseman C., Mauze S., Leach M.W., Coffman R.L., Powrie F.: An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.*, 1999; 190: 995–1004
- [3] Bluestone J.A., Tang Q.: Therapeutic vaccination using CD4+CD25+ antigen specific regulatory cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101 (Suppl. 2): 14622–14626
- [4] Boyer O., Saadoun D., Abriol J., Dodille M., Piette J.C., Cacoub P., Klatzmann D.: CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood*, 2004; 103: 3428–3430
- [5] Chai J.G., Xue S., Coe D., Addey C., Bartok I., Scott D., Simpson E., Stauss H.J., Hori S., Sakaguchi S., Dyson J.: Regulatory T cells, derived from naive CD4+CD25⁻ T cells by *in vitro* *Foxp3* gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation*, 2005; 79: 1310–1316
- [6] Chatenoud L., Bach J.F.: Resetting the functional capacity of regulatory T cells: a novel immunotherapeutic strategy to promote immune tolerance. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2005; 5 (Suppl. 1): S73–S81
- [7] Coutinho A., Caramalho I., Seixas E., Demengeot J.: Thymic commitment of regulatory T cells is a pathway of TCR-dependent selection that isolates repertoires undergoing positive or negative selection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2005; 293: 43–71
- [8] Crispin J.C., Martinez A., Alcocer-Varela J.: Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.*, 2003; 21: 273–276
- [9] Curriel T.J., Coukos G., Zou L., Alvarez X., Cheng P., Mottram P., Evdemon-Hogan M., Conejo-Garcia J.R., Zhang L., Burow M., Zhu Y., Wei S., Kryczek I., Daniel B., Gordon A., Myers L., Lackner A., Disis M.L., Knutson K.L., Chen L., Zou W.: Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.*, 2004; 10: 942–949

- [10] 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-TNF α therapy. *J. Exp. Med.*, 2004; 200: 277–285
- [11] Fehervari Z., Sakaguchi S.: CD4+ Tregs and immune control. *J. Clin. Invest.*, 2004; 114: 1209–1217
- [12] Fehervari Z., Sakaguchi S.: Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 2004; 16: 203–208
- [13] Feunou P., Poulin L., Habran C., Le Moine A., Goldman M., Braun M.Y.: CD4+CD25+ and CD4+CD25– T cells act respectively as inducer and effector T suppressor cells in superantigen-induced tolerance. *J. Immunol.*, 2003; 171: 3475–3484
- [14] Gołab J., Jakóbsiak M., Lasek W.: *Immunologia*. PWN SA, Warszawa 2002
- [15] Hocegger K., Wolf D., Rosenkranz A.R.: CD4+CD25+ regulatory T cells: a new treatment option in glomerulonephritis. *Kidney Int.*, 2005; 68: 1898–1899
- [16] Hori S., Nomura T., Sakaguchi S.: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003; 299: 1057–1061
- [17] Hori S., Takahashi T., Sakaguchi S.: Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Adv. Immunol.*, 2003; 81: 331–371
- [18] Hurtado A., Johnson R.J. Hygiene hypothesis and prevalence of glomerulonephritis. *Kidney Int. Suppl.*, 2005; 68 (Suppl. 97): S62–S67
- [19] Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M., Tuettenberg A., Knop J., Enk A.H.: Identification and functional characterization of human CD4+CD25+ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.*, 2001; 193: 1285–1294
- [20] Kang H.K., Michaels M.A., Berner B.R., Datta S.K.: Very low-dose tolerance with nucleosomal peptides controls lupus and induces potent regulatory T cell subset. *J. Immunol.*, 2005; 174: 3247–3255
- [21] Levings M.K., Sangregorio R., Roncarolo M.G.: Human CD25+CD4+ T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded *in vitro* without loss of function. *J. Exp. Med.*, 2001; 193: 1295–1302
- [22] Lindley S., Dayan C.M., Bishop A., Roep B.O., Peakman M., Tree T.I.: Defective suppressor function in CD4+CD25+ T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 2005; 54: 92–99
- [23] Mahajan D., Wang Y., Qin X., Wang Y., Zheng G., Wang Y.M., Alexander S.I., Harris D.C.: CD4+CD25+ regulatory T cells protect against injury in an innate murine model of chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2006; 17: 2731–2741
- [24] Maloy K.J., Salaun L., Cahill R., Dougan G., Saunders N.J., Powrie F.: CD4+CD25+ TR cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J. Exp. Med.*, 2003; 197: 111–119
- [25] Mason D., Powrie F.: Control of immune pathology by regulatory T cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 1998; 6: 649–655
- [26] Nakamura K., Kitani A., Fuss I., Pedersen A., Harada N., Nawata H., Strober W.: TGF- β 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J. Immunol.*, 2004; 172: 834–842
- [27] Netzer K.O., Leinonen A., Boutaud A., Borza D.B., Todd P., Gunwar S., Langeveld J.P., Hudson B.G.: The Goodpasture autoantigen. Mapping the major conformational epitope(s) of α 3(IV) collagen to residues 17–31 and 127–141 of the NC1 domain. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 11267–11274
- [28] Ng W.F., Duggan P.J., Ponchel F., Matarese G., Lombardi G., Edwards A.D., Isaacs J.D., Lechler R.I.: Human CD4+CD25+ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood*, 2001; 98: 2736–2744
- [29] Ni Choileain N., Redmond H.P.: Regulatory T-cells and autoimmunity. *J. Surg. Res.*, 2006; 130: 124–135
- [30] Nicolic-Paterson D.J., Lan H.Y., Atkins R.C.: Macrophages in immune renal injury. In: *Immunology of Renal Diseases*, Ed.: Neilson E.G., Couser W.G. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia 1997: 575–592
- [31] Rutella S., Lemoli R.M.: Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunol. Lett.*, 2004; 94: 11–26
- [32] Sakaguchi S.: Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004; 22: 531–562
- [33] Salama A.D.: Tipping the balance in glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2005; 16: 1169–1171
- [34] Salama A.D., Chaudhry A.N., Holthaus K.A., Mosley K., Kalluri R., Sayegh M.H., Lechler R.I., Pusey C.D., Lightstone L.: Regulation by CD25+ lymphocytes of autoantigen-specific T-cell responses in Goodpasture's (anti-GBM) disease. *Kidney Int.*, 2003; 64: 1685–1694
- [35] Salama A.D., Najafian N., Clark M.R., Harmon W.E., Sayegh M.H.: Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2003; 14: 1643–1651
- [36] Seo S.J., Fields M.L., Buckler J.L., Reed A.J., Mandik-Nayak L., Nish S.A., Noelle R.J., Turka L.A., Finkelman F.D., Caton A.J., Erikson J.: The impact of T helper and T regulatory cells on the regulation of anti-double-stranded DNA B cells. *Immunity*, 2002; 16: 535–546
- [37] Shimizu J., Yamazaki S., Takahashi T., Ishida Y., Sakaguchi S.: Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.*, 2002; 3: 135–142
- [38] Taams L.S., van Amelsfort J.M., Tiemessen M.M., Jacobs K.M., de Jong E.C., Akbar A.N., Bijlsma J.W., Lafey F.P.: Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hum. Immunol.*, 2005; 66: 222–230
- [39] Tang Q., Henriksen K.J., Boden E.K., Tooley A.J., Ye J., Subudhi S.K., Zheng X.X., Strom T.B., Bluestone J.A.: Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2003; 171: 3348–3352
- [40] Viglietta V., Baecher-Allan C., Weiner H.L., Hafler D.A.: Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.*, 2004; 199: 971–979
- [41] Walker M.R., Kasprowitz D.J., Gersuk V.H., Benard A., Van Landeghen M., Buckner J.H., Ziegler S.F.: Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25– T cells. *J. Clin. Invest.*, 2003; 112: 1437–1443
- [42] Wang Y., Wang Y., Feng X., Bao S., Yi S., Kairaitis L., Tay Y.C., Rangan G.K., Harris D.C.: Depletion of CD4+ T cells aggravates glomerular and interstitial injury in murine adriamycin nephropathy. *Kidney Int.*, 2001; 59: 975–984
- [43] Wildin R.S., Freitas A.: IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives. *J. Autoimmun.*, 2005; 25 (Suppl. 1): 56–62
- [44] Wolf D., Hocegger K., Wolf A.M., Rumpold H.F., Gastl G., Tilg H., Mayer G., Gonsilius E., Rosenkranz A.R.: CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement glomerulonephritis in mice. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2005; 16: 1360–1370
- [45] Wong D., Phelps R.G., Turner A.N.: The Goodpasture antigen is expressed in the human thymus. *Kidney Int.*, 2001; 60: 1777–1783
- [46] Wood K.J., Luo S., Akl A.: Regulatory T cells: potential in organ transplantation. *Transplantation*, 2004; 77 (Suppl. 1): S6–S8
- [47] Wraith D.C., Nicolson K.S., Whitley N.T.: Regulatory CD4+ T cells and the control of autoimmune disease. *Curr. Opin. Immunol.*, 2004; 16: 695–701
- [48] Wu J., Hicks J., Borillo J., Glass W.F.2nd, Lou Y.H.: CD4+ T cells specific to a glomerular basement membrane antigen mediate glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.*, 2002; 109: 517–524
- [49] Yu L., Border W.A., Anderson I., McCourt M., Huang Y., Noble N.A.: Combining TGF- β inhibition and angiotensin II blockade result in enhanced antifibrotic effect. *Kidney Int.*, 2004; 66: 1774–1784
- [50] Zakheim B., McCafferty E., Phillips S.M., Clavman M., Neilson E.G.: Murine interstitial nephritis. II. The adoptive transfer of disease with immune T lymphocytes produces a phenotypically complex interstitial lesion. *J. Immunol.*, 1984; 133: 234–239
- [51] Zheng G., Wang Y., Mahajan D., Qin X., Wang Y., Wang Y., Alexander S.I., Harris D.C.: The role of tubulointerstitial inflammation. *Kidney Int.*, 2005; 67 (Suppl. 94): S96–S100