



## Središnja medicinska knjižnica

**Ajduk, Jakov (2013) *Promjene regulacijskih limfocita T nakon specifične imunoterapije cjelogodišnjim i sezonskim uzročnim alergenima [Regulatory T cells during immunotherapy with chronic and seasonal allergens].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/1940>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Jakov Ajduk**

**Promjene regulacijskih limfocita T  
nakon specifične imunoterapije  
cjelogodišnjim i sezonskim uzročnim  
alergenima**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2013.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Jakov Ajduk**

**Promjene regulacijskih limfocita T  
nakon specifične imunoterapije  
cjelogodišnjim i sezonskim uzročnim  
alergenima**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2013.

Disertacija je izrađena u Imunološkom zavodu, Zagreb, Dječjoj bolnici Srebrnjak, Zagreb i Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“, Slavonski Brod.

Voditeljica: doc. dr. sc. Alenka Gagro, dr. med.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Alenki Gagro na strpljenju i motivaciji pri izradi ove disertacije.

Zahvaljujem roditeljima koji su cijelo vrijeme bili uz mene.

Ovaj rad posvećujem supruzi Vesni te kćerima Klari i Ani koje su imale puno razumijevanja i strpljenja pri izradi ove disertacije.

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	1
1.1. Alergijske bolesti i specifična imunoterapija.....	4
1.1.1. Komponente imunološkog sustava i alergijske reakcije.....	4
1.1.1.1. Urođena imunost.....	4
1.1.1.2. Stečena imunost.....	8
1.1.1.3. Mehanizmi alergijskih reakcija.....	10
1.1.2. Alergeni.....	14
1.1.2.1. Grinje iz kućne prašine.....	14
1.1.2.2. Otrovi opnokrilaca.....	16
1.2. Specifična imunoterapija .....	18
1.3. Regulacijski limfociti T.....	23
<b>2. Hipoteza</b> .....	30
<b>3. Cilj istraživanja</b> .....	30
<b>4. Materijal i metode</b> .....	31
4.1. Ispitanici.....	31
4.1.1. Djeca s alergijskom reakcijom na grinju iz kućne prašine.....	31
4.1.2. Djeca s alergijskom reakcijom na otrove opnokrilaca.....	32
4.1.3. Kontrolna skupina zdrave djece.....	33
4.2. Materijal.....	34
4.2.1. Monoklonska antitijela.....	34
4.2.2. Popis ostalih korištenih kemikalija i otopina.....	35

4.3. Metode.....	36
4.3.1. Izdvajanje mononuklearnih stanica iz ljudske periferne krvi.....	36
4.3.2. Zamrzavanje mononuklearnih stanica periferne krvi.....	37
4.3.3. Obilježavanje površinskih i unutarstaničnih antigena.....	37
4.3.4. Stimulacija i određivanje unutarstaničnih citokina .....	38
4.3.5. Analiza stanica protočnim citometrom.....	41
4.4. Statistička obrada podataka.....	50
<b>5. Rezultati.....</b>	<b>51</b>
5.1. Promjene regulacijskih limfocita T i imunosupresivnih citokina tijekom specifične imunoterapije na grinju iz kućne prašine.....	51
5.2. Promjene regulacijskih limfocita T i imunosupresivnih citokina tijekom specifične imunoterapije na otrove opnokrilaca.....	57
<b>6. Rasprava .....</b>	<b>62</b>
<b>7. Zaključak.....</b>	<b>70</b>
<b>8. Sažetak.....</b>	<b>72</b>
<b>9. Summary.....</b>	<b>74</b>
<b>10. Popis literature.....</b>	<b>75</b>
<b>11. Životopis.....</b>	<b>96</b>

## **Popis kratica**

APC – engl. allophycocyanin

CTLA-4 – engl. cytotoxic lymphocyte associated antigen 4

CCL11 – engl. chemokine C-C motif ligand 11

FcεRI – visokoafinitetni receptor za IgE

FEV1 – engl. forced expiratory volume in one second

FITC – engl. fluorescein isothiocyanate

FOXP3 – engl. forkhead-winged helix transcription factor

GITR – engl. glucocorticoid-induced tumor necrosis factor

IL10 – interleukin 10

IFN-γ – interferon gama

IL-2 – interleukin 2

IL-4 – interleukin 4

IL-5 – interleukin 5

IL-9 – interleukin 9

IL-13 – interleukin 13

IL-17 – interleukin 17

IL-22 – interleukin 22

IPEX – engl. immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked syndrome

LAG 3 – engl. lymphocyte activation gene-3

LTC4 – leukotrien C4

LTD4 – leukotrien D4

LTE4 – leukotrien E4

PBMC – engl. peripheral blood mononuclear cells

PD-1 – engl. program cell death protein1

PE-Cy5 – engl. phycoerithrin Cy5

PE – engl. phycoerithrin

PEFR – engl. peak expiratory flow rate

SIT – engl. specific immunotherapy

TCR – engl. T-cell receptor

TGF beta 1 – engl. transforming growth factor beta 1

TLR – engl. Toll-like receptor

TNF alpha – engl. tumor necrosis factor alpha

Treg – regulacijski limfociti T

VIT – engl. venom immunotherapy



## 1. Uvod

Alergijska reakcija je preosjetljivost s pretjeranim upalnim odgovorom, posredovanim putem IgE antitijela, na inače bezazlene tvari (alergene) koje su normalno prisutne u okolišu. Klinička manifestacija alergijske reakcije jako se razlikuje, od jedva primjetnog alergijskog rinitisa do sistemske anafilaktičke reakcije i akutne ugroženosti života. Izloženost alergenu može biti kratkotrajna kao kod uboda insekta ili dugotrajna kao kod alergijske reakcije na grinju iz kućne prašine. Danas se alergijske bolesti liječe lijekovima koji smanjuju simptome, ali nemaju trajni učinak na alergijsku reakciju (npr. kortikosteroidi, antagonisti leukotrienskih receptora, antihistaminici, anti-IgE protutijela).

Za razliku od ovih lijekova, specifična imunoterapija ili hiposenzibilizacija dugotrajno mijenja mehanizam alergijske reakcije.<sup>1-3</sup>

Alergen-specifična imunoterapija je liječenje primjenom postupno rastućih doza alergena, do konačne doze koja je učinkovita za nestanak simptoma u alergičnih osoba koji se pojavljuju nakon izlaganja istom uzročnom alergenu.

Specifična hiposenzibilizacija je kao oblik uspješne imunoterapije prvi put opisana prije više od stotinu godina, a cilj joj je uspostava trajne tolerancije na alergene.<sup>4</sup> Primjenjuje se najčešće kod alergijske reakcije na grinju iz kućne prašine (*Dermatophagoides pteronyssinus* /Der p/), pelud, dlaku životinja i otrove opnokrilaca. Najčešće se koristi supkutana ili, u novije vrijeme, sublingvalna aplikacija alergena. Usprkos velikom broju istraživanja mehanizama specifične imunoterapije, točan način djelovanja kojim se uspostavlja tolerancija na alergene još nije poznat.<sup>5-9</sup>

Tijekom imunoterapije mijenja se broj i funkcija velikog broja stanica odgovornih za alergijsku reakciju (npr. antigen-predočnih stanica, limfocita T i B, izlučivanje alergen-specifičnih protutijela klasa IgE i IgG4, itd.).<sup>9,13</sup>

Dendritičke stanice koje smatramo najvažnijim antigen-predočnim stanicama, pod djelovanjem specifične imunoterapije izražavaju zreli fenotip koji dovodi do tolerantne interakcije s limfocitima T u limfnim čvorovima.<sup>10</sup> Ovakav oblik dendritičkih stanica potiče stvaranje određene vrste regulacijskih stanica, tzv. Tr1-limfocita, koji izlučuju velike količine interleukina

10 (IL-10).<sup>11</sup> Porast IL-10 na više načina utječe na imunoreakciju: suprimira izlučivanje IL-5, inhibira stimulaciju mastocita i stimulira produkciju IgG4.<sup>13-18</sup>

Tijekom imunoterapije smanjuje se broj eozinofila i mastocita u tkivu te izostaje porast broja tih stanica u sluznici tijekom sezone.<sup>19</sup>

Tijekom imunoterapije također raste sekrecija citokina TGF-beta koji ima imunosupresivno djelovanje.<sup>11-14</sup> Umjesto alergena-specifične tzv. Th2-imunoreakcije obilježene izlučivanjem citokina IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13, prevladava tzv. Th1-imunoreakcija obilježena izlučivanjem IL-12 i IFN- $\gamma$ .<sup>12</sup> Osim opisanih promjena u vrsti i količini citokina koje izlučuju limfociti T, dolazi do porasta IgG i pada alergena-specifičnih antitijela IgE.

Posljednjih nekoliko godina posebna pažnja posvećuje se ulozi CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulacijskih limfocita T u kontroli alergijskih bolesti, autoimunskih bolesti, tumorskoj imunologiji i infekcijama.<sup>20-23</sup> Ove stanice smatraju se esencijalnim u uspostavljanju tolerancije, ograničavanju autoimunskih i kroničnih bolesti, ali imaju i nepovoljan učinak zbog ograničavanja imunoreakcije u tumorskim bolestima.

Regulacijske limfocite T dijelimo na one koji nastaju u timusu (engl. natural occurring) te one koji su inducirani na periferiji: pomoćnički limfociti T tip 3, (Th3 od engl. T helper type 3) i regulacijski limfociti T tip 1 (Tr1).<sup>20-22</sup>

Opisane su i regulacijske stanice drugih fenotipova: npr. CD8<sup>+</sup> u usnoj šupljini, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>  $\alpha\beta$ <sup>+</sup> kod nekih autoimunskih bolesti te  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> povezane s tumorima.<sup>23-25</sup>

Regulacijski limfociti T prvi put su opisani u miševa, a zatim su stanice sličnih obilježja pronađene i opisane u ljudi.<sup>26-32</sup>

Fenotip regulacijskih limfocita T još uvijek nije potpuno definiran. Do sada poznati i najčešće upotrebljavani biljezi regulacijskih limfocita T su CD4, CD25, CTLA-4, FOXP3, CD45RO, HLA-DR i CD69.<sup>27-29</sup>

Opisan je veliki broj drugih biljega, kao što su PD-1, NOTCH i GITR za koje nije u potpunosti objašnjena funkcija i sigurna povezanost s regulacijskim limfocitima.<sup>29</sup> FOXP3 je u novijim istraživanjima naznačen kao pouzdan biljeg regulacijskih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> limfocita T.<sup>33</sup>

Imunosupresivni mehanizam regulacijskih limfocita T u alergijskim bolestima još uvijek nije u potpunosti poznat.<sup>34</sup>

Regulacijski limfociti T stvaraju ili induciraju druge stanice na stvaranje imunosupresivnih citokina IL-10 i TGF-beta koji blokiranjem proizvodnje IL-2 inhibiraju stanični ciklus CD4+ i CD8+ limfocita T.<sup>20,37,38</sup>

U odraslih bolesnika s astmom pronađen je povišen broj regulacijskih limfocita T.<sup>39</sup> Rijetka istraživanja na djeci s blagim alergijskim rinitisom i astmom pokazuju da je broj regulacijskih limfocita T smanjen u djece s alergijom u usporedbi sa zdravom djecom.<sup>40</sup> Djeca s teškim oblikom astme i perzistentnim alergijskim rinitisom imaju povećan broj regulacijskih limfocita T u odnosu na djecu sa sezonskim alergijskim rinitisom ili blažim oblikom astme.<sup>41</sup>

Regulacijski limfociti T opisani su i u bronhoalveolarnom lavatu djece s astmom, a njihov je broj manji nego u zdrave djece.<sup>41</sup> U djece alergične na kravlje mlijeko uspostavljanjem tolerancije na mlijeko raste broj specifičnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulacijskih limfocita T zajedno s njihovim supresivnim učinkom na ostale CD4<sup>+</sup> limfocite T.<sup>42,43</sup>

U odraslih bolesnika s alergijskom reakcijom na pelud i grinju iz kućne prašine, u *in vitro* ispitivanjima, izloženost alergenu povećava sekreciju IL-10 i TGF-beta.<sup>37,44</sup> Tijekom provođenja imunoterapije na grinju iz kućne prašine dolazi do porasta broja stanica koje izlučuju IL-10.<sup>38</sup>

Broj regulacijskih limfocita T u odraslih bolesnika alergičnih na otrov opnokrilaca raste tijekom provođenja specifične imunoterapije.<sup>44</sup>

Alergijsku bolest na grinje iz kućne prašine karakterizira cjelogodišnja izloženost alergenu dok je alergijska reakcija na otrov insekata iznenadna izloženost velikim dozama alergena koja se javlja sezonski. U alergiji na grinju iz kućne prašine imunološki sustav stimulira se preko sluznice kroz cijelu godinu. Alergijska reakcija na otrov insekata obično je jednokratna izloženost velikoj količini alergena koji se izravno aplicira u organizam. Alergijski proces u oba slučaja posredovan je IgE antitijelima. Specifična imunoterapija provodi se s podjednakim uspjehom u pacijenata sa sezonskom i cjelogodišnjom izloženošću alergena bez obzira na to što je potpuno drugačiji kontakt s alergenom. Regulacijski limfociti T smatraju se odgovornim za uspješnost specifične imunoterapije u alergijskoj bolesti.<sup>45-49</sup> Upravo zbog toga odlučili smo se usporediti ulogu regulacijskih limfocita T na dva modela alergijskih reakcija.

## **1.1. Alergijske bolesti i specifična imunoterapija**

### **1.1.1. Komponente imunološkog sustava i alergijske reakcije**

Imunološki sustav prema načinu djelovanja dijeli se u dvije osnovne podskupine: urođenu i stečenu imunost. Urođena imunost sudjeluje u prvoj fazi obrane organizma od mikroorganizama te je nespecifična dok stečenu imunost karakterizira visoka specifičnost i sposobnost imunološkog pamćenja.

#### **1.1.1.1. Urođena imunost**

Prvu liniju obrane tijela od mikroorganizama čine koža, odnosno epitel i stanice urođenog imunološkog odgovora. Stanice mijeloidnog podrijetla (neutrofil, eozinofil, bazofil i monocit) i različiti solubilni faktori (citokini, komponente komplementa i proteini plazme) odgovorni su za tu vrstu imunosti.

Dendritičke stanice jako su važne za urođeni imunološki odgovor i imaju ključnu ulogu u usmjeravanju specifičnih imunoreakcija. Dendritičke stanice u krvi čovjeka, prema ekspresiji CD11c i  $\beta$ 2-integrina, dijele se na mijeloidne i plazmacitoidne dendritičke stanice.<sup>45</sup> Mijeloidne dendritičke stanice na površini imaju Toll-u slične receptore (TLR, engl. Toll like receptor) 6 i 8 te nakon bakterijske i virusne stimulacije proizvode IL-12. Plazmacitoidne dendritičke stanice na površini imaju TLR7 i TLR9, izlučuju velike količine interferona tip 1 i smatra se da stimuliraju regulacijske limfocite T.<sup>46,47</sup> U tkivima nalazimo Langerhansove i upalne tkivne dendritičke stanice. Langerhansove stanice usmjeravaju imunoreakciju prema Th2-odgovoru.<sup>46,48</sup>

Dendritičke stanice prepoznaju mikroorganizme te ih razgrađuju, a dijelove mikroorganizama prezentiraju na površini stanica u sklopu MHC I, odnosno molekula MHC II.<sup>48</sup> Na taj način

stimuliraju CD8, odnosno CD4 limfocite T. Kontakt s raznim antigenima aktivira dendritičke stanice tako da počnu izlučivati i citokine, kao što su IL-6, IL-12, IL-18 i IFN- $\gamma$ . Značajka je dendritičkih stanica da nakon stimulacije cirkuliraju prema regionalnim limfnim čvorovima te tamo stimuliraju antigen-specifične limfocite T i B. Pod djelovanjem citokina dendritičke stanice ispoljavaju veći broj kostimulacijskih molekula putem kojih se dodatno aktiviraju limfociti T. Najpoznatija kostimulacijska molekula je B7 koja se veže za CD28 na limfocitima T te omogućuje njihovu aktivaciju i proliferaciju. Postoje određene molekule koje se mogu vezati na B7 te na taj način onemogućiti vezanje CD28 i aktivaciju limfocita. Jedna od takvih molekula je CTLA-4 (CD152) koju povezujemo s funkcijom regulacijskih limfocita T.<sup>27,28</sup> Makrofazi i B-limfociti također mogu biti antigen-predočne stanice. Aktivirani limfociti T izlučuju IL-2 koji još više potiče njihovu aktivaciju i proliferaciju. U ovom početnom dijelu aktivacije stanica, ovisno o citokinima koje stvaraju dendritičke stanice, doći će do diferenciranja djevičanskih limfocita T prema Th1- odnosno Th2-limfocitima.<sup>47</sup> Još uvijek nije najjasnije kako dolazi do prevladavanja pojedinih citokina i usmjeravanja odgovora prema Th1-, odnosno Th2-stanicama. U alergijskim bolestima prevladavaju Th2-stanice. U novijim radovima, ovisno o citokinima koje izlučuju, opisani su i drugi oblici pomoćničkih limfocita T: Th9, Th17 i Th22.<sup>50</sup>

Makrofazi su stanice monocitnog podrijetla. Na površini imaju velik broj receptora koji prepoznaju molekule koje uobičajeno nalazimo na bakterijama (npr. lipopolisaharide Gram-negativnih bakterija, odnosno lipoteikoičnu kiselinu Gram-pozitivnih bakterija). Najpoznatiji su Toll-u slični receptori kojih je do sada opisano deset različitih vrsta.<sup>48</sup> Na makrofazima nalazimo molekulu CD14 koja omogućuje receptoru TLR4 prepoznavanje lipopolisaharida Gram-negativnih bakterija. IFN- $\gamma$  je izraziti stimulator makrofaga koji povećava površinsku

ekspresiju molekula CD40, MHC II i receptora za TNF. Ti aktivirani makrofazi aktiviraju dodatne CD4 stanice i pojačanim izlučivanjem IL-12 usmjeruju reakciju prema Th1-tipu imunoreakcije. U makrofazima dolazi do sinteze slobodnih kisikovih radikala i dušičnog oksida (NO) koji imaju jako antimikrobno djelovanje.<sup>48</sup>

Mastociti su stanice koje imaju važnu ulogu u obrani od parazita, ali u razvijenim zemljama u kojima su te infekcije rijetke, ta je uloga sve manje zastupljena te postaje bitna njihova uloga u alergijskim reakcijama. Konačno se diferenciraju tek u tkivu. Mastociti su ispunjeni granulama koje sadrže proteolitičke enzime, histamin, razne faktore upale i citokine. Na svojoj površini imaju visokoafinitetni receptor FcεRI za IgE te niskoafinitetni receptor FcγRII (CD16) za IgG, osobito IgG1. Postoje dvije vrste receptora za IgE: FcεRI (visokoafinitetni receptor na mastocitima, bazofilima i aktiviranim eozinofilima) i FcεRII (niskoafinitetni receptor koji se nalazi na velikom broju stanica: limfocitima B, na aktiviranim limfocitima T, eozinofilima, trombocitima, dendritičkim stanicama). FcεRII zovemo i CD23. FcεRI je visokoafinitetni receptor za Fc regiju IgE antitijela koji na sebe veže i jako male koncentracije IgE. Vezivanjem pojedinačnih molekula IgE na površini neće doći do aktivacije mastocita sve dok se jedna molekula antigena ne veže na više molekula IgE koje su vezane na mastocit svojim Fc-fragmentom (engl. *cross linking*). Aktivirani mastociti otpuštaju sadržaj granula, kao što su histamin i triptaza, a potom i novosintetizirane membranske medijatore, leukotriene (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) i prostaglandine, različite kemokine (npr. CXCL10, CCL2, CCL4, CCL5), citokine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13) koji dovode do reakcije prvog tipa preosjetljivosti.<sup>48</sup> Navedenom reakcijom u tkivo dolazi veći broj alergena-specifičnih stanica koje su odgovorne za eventualne kasnije alergijske reakcije. IgE u organizmu većinom je vezan na stanice tako da prilikom ponovne pojave stranog antigena vrlo brzo dolazi do ponovne aktivacije stanica.

Degranulirana stanica se obnavlja, ponovno sintetizira medijatore i nakon obnove opet je spremna za svoju funkciju. Aktiviranje mastocita moguće je i putem komponenata komplementa. Važnu ulogu, uz mastocite, u alergijskim reakcijama imaju eozinofili. Eozinofili su granulocitni leukociti koji nastaju u koštanoj srži te zatim migriraju u cirkulaciju. Karakterizira ih relativno kratko vrijeme života, poluživot im je osam do 18 sati. Mali broj eozinofila prisutan je u cirkulaciji dok većinu nalazimo u tkivima. Na površini eozinofila nalaze se receptori za Fc-fragmente imunoglobulina G (CD32). Nakon aktivacije eozinofila dolazi do degranulacije te se u tkivo otpuštaju slobodni radikali, citokini, enzimi i toksični proteini (IL-5, eozinofilne peroksidaze, kolagenaze) koji pojačavaju upalnu reakciju kojom mogu uništiti mikroorganizme, ali u isto vrijeme i uzrokovati oštećenje tkiva te pospješiti alergijsku reakciju.<sup>48</sup> Eozinofili su dominantne upalne stanice u alergijskim i kroničnim bolestima respiratornog sustava kao što su astma i alergijski rinitis. Tijekom alergijske reakcije mastociti, eozinofili i druge upalne stanice stvaraju prostaglandine, leukotrijene, citokine koji pojačavaju upalni odgovor tako da dodatno aktiviraju endotelne stanice, eozinofile i leukocite.<sup>47,48</sup> Citokin IL-5 povećava proizvodnju eozinofila iz koštane srži i njihov broj u cirkulaciji. Za porasta eozinofila u tkivu odgovorne su različite molekule eotaksina: CCL11, CCL24 i CCL26 koje stvaraju mastociti nakon aktivacije. Eozinofili imaju receptor CCR3 koji može vezati više različitih eotaksina.

Histamin se smatra glavnim medijatorom u ranoj fazi alergijske reakcije nakon podražaja alergenom. Većim dijelom nastaje u mastocitima. Nakon degranulacije mastocita histamin uzrokuje vazodilataciju, kontrakcije glatkih mišića bronha, povećava ekspresiju adhezivnih molekula ICAM-1 i LFA-1 na endotelu krvnih žila i povećava stvaranje IL-6 i IL-8 u endotelnim stanicama što sve dovodi do pojačavanja lokalne upalne reakcije. U takvom mikrookolišu otpuštaju se enzimi, kao što su triptaze i serinske esteraze koje dovode do razgradnje vezivnog

tkiva. Otpušta se i velika količina TNF- $\alpha$  koji dodatno povećava broj adhezijskih molekula na endotelnim stanicama čime se omogućuje ulazak upalnih stanica u tkivo. Vazodilatacija i povećana permeabilnost krvnih žila omogućuje drugim upalnim stanicama lakši dolazak do mjesta upalne reakcije. Novosintetizirane molekule prostaglandina i leukotriena povećavaju permeabilnost, citokini IL-4, IL-13 pospješuju Th2-imunoreakcije, dok IL-3, IL-5 i GM-CSF aktiviraju eozinofile. Prethodno opisanim procesima dolazi do pojačavanja lokalnog upalnog procesa te usmjerenja prema Th2-imunoreakcijama.

Tijekom imunoterapije smanjuje se broj eozinofila i mastocita u tkivu te izostaje porast broja tih stanica u sluznici tijekom alergenske sezone.<sup>19</sup>

#### **1.1.1.2. Stečena imunost**

Stečenu imunost karakterizira specifično prepoznavanje antigena i stvaranje imunološkog pamćenja. Temelji se na limfocitima T i B.

Limfociti T nastaju u koštanoj srži te migriraju u timus gdje prolaze kroz niz promjena na molekularnoj razini. Limfociti T prepoznaju strane molekule u kompleksu s molekulama MHC putem receptora (TCR od engl. T cell receptor) na svojoj površini. TCR čine dva lanca, lanac  $\alpha$  u paru s lancem  $\beta$  ili lanac  $\gamma$  u paru s lancem  $\delta$ .  $\gamma\delta$  limfociti T čine oko 1-10% limfocita i uglavnom su raspoređeni u mukoznim i epitelnim površinama. Svi limfociti T na površini imaju molekulu CD3.  $\alpha\beta$  T-limfociti na površini uz molekulu CD3 imaju kostimulacijske molekule CD4 ili CD8. Prema tim molekulama limfociti T se dijele na dvije subpopulacije: CD4 i CD8 limfocite T. CD8 limfociti prepoznavaju strane antigene u sklopu molekula MHC razreda I. Jedna je od funkcija CD8 limfocita T da sudjeluju u obrani organizma od infekcija virusima te dovode do smrti inficirane stanice litičkim procesom pa se još nazivaju citotoksički limfociti T (CTL).



CD4 (pomoćnički) limfociti T prepoznaju antigene u kompleksu s molekulama MHC II na površini antigen-predočnih stanica (aktivirane dendritičke stanice, makrofazi, Langerhansove stanice, limfociti B). Limfocite T, ovisno da li su bili u dodiru sa specifičnim antigenom, možemo podijeliti na djevičanske i memorijske. Prepoznavanje MHC-molekula tipa I i II na ciljnim stanicama i specifičnog antigena od strane TCR-a, CD8 i CD4 molekula rezultira kostimulacijskim signalom u limfocitima T. Dolazi do aktivacije i javljanja aktivacijskih biljega CD25, CD38, CD69 i HLA-DR na njihovoj površini.<sup>48</sup> Ponovno izlaganje organizma identičnom antigenu dovest će do brže imunoreakcije posredovane memorijskim stanicama koje za aktivaciju zahtijevaju manje količine antigena. Prema citokinima koje izlučuju limfociti CD4 dijelimo ih na Th1- i Th2-stanice. Odluka koji tip stanica će dominirati u započetoj imunoreakciji zbiva se u ranoj fazi imunoreakcije i rezultat je utjecaja citokina koji se stvaraju od stanica urođene imunosti. Th1-pomoćnički limfociti proizvode IFN- $\gamma$ , IL-2 i TNF- $\alpha$  putem kojih aktiviraju makrofage, a Th2-pomoćnički limfociti proizvode IL-4, IL-10 i IL-13 i aktiviraju limfocite B i stvaranje antitijela IgE. Kao što je ranije navedeno, u novije vrijeme opisane su i novije podvrste pomoćničkih limfocita T: Th17, Th9 i Th22 stanice.<sup>49</sup> Th17-stanice nazvane su prema sposobnosti stvaranja IL-17. Povezane su s obranom od izvanstaničnih antigena te imaju ulogu u autoimunskim bolestima. Th9-stanice opisane su u upalnim reakcijama, izlučuju IL-9 i IL-10, a nastaju od djevičanskih limfocita CD4 nakon stimulacije s IL-4 i TGF-beta. Th22-stanice izlučuju IL-22 i opisane su u atopijskom dermatitisu.<sup>50</sup>

Limfociti B prepoznaju antigen pomoću B-staničnog receptora na svojoj površini. Imaju sposobnost direktnog prepoznavanja topljivog antigena u nativnom obliku ili antigena vezanog na staničnu membranu za razliku od limfocita T koji prepoznaju antigen samo ako je predočen u sklopu molekula MHC-a. Limfociti B prepoznaju antigen pomoću B-staničnog receptora koji je građen od transmembranski vezane molekule imunoglobulina na koju su vezane signalne molekule Iga i Ig $\beta$ .

Uz receptor se nalaze kostimulacijske molekule CD19, CD21 i CD81. Uslijed aktivacije različitim antigenima i uz pomoć CD4<sup>+</sup> limfocita, limfociti B u germinalnim centrima prolaze procese proliferacije, diferencijacije i proizvodnje specifičnih antitijela. Aktivirani limfociti B prelaze u memorijske ili plazma-stanice te napuštaju germinalni centar. Memorijski limfociti B su dugoživuće stanice koje na svojoj površini nose imunoglobuline, uglavnom ne izlučuju antitijela, a brzo se aktiviraju prilikom drugog susreta s antigenom za koji su specifični. Plazma-stanice su terminalno diferencirane stanice koje po nastanku proizvode visoke razine specifičnih antitijela. Antitijela IgM se prva stvaraju tijekom humoralnog odgovora, niskog su afiniteta za antigen i nalaze se većinom u krvi. Antitijela IgG visokog su afiniteta za antigen, djeluju u krvi i izvanstaničnim tekućinama gdje neutraliziraju toksine, viruse i bakterije, opsoniziraju ih za fagocitozu i aktiviraju komplement. Antitijela IgA nalaze se u sluznici probavnog i respiratornog sustava gdje neutraliziraju toksine i viruse. Većina antitijela IgE vezana je na površinu mastocita, nalaze se ispod kože, mukoznog i vezivnog tkiva i imaju važnu ulogu u obrani od parazita i alergijskim reakcijama.

### **1.1.1.3. Mehanizmi alergijskih reakcija**

Početak 20. stoljeća von Pirquet je uveo pojam alergija kako bi razlikovao štetnu imunološku reakciju organizma protiv sebe od normalne imunološke reakcije na različite mikroorganizme.<sup>51</sup>

Najčešći je oblik alergije preosjetljivost posredovana putem antitijela IgE. Smatra se da više od 25% populacije modernog svijeta ima ovaj oblik preosjetljivosti.<sup>52</sup>

Alergijsku reakciju mogu uzrokovati mnogi alergeni, a sama reakcija može se očitovati na više načina: alergijski rinitis, alergijska astma, alergija na hranu, alergijska reakcija kože, očne

reakcije, anafilaksija. Alergijski odgovor može biti lokalna, npr. kao kod alergijskog rinitisa, odnosno sustavni u anafilaksiji.

Godine 1921. Prausnitz i Kustner pokazali su da se alergijska reakcija s preosjetljive osobe na osobu koja nema alergiju može prenijeti davanjem injekcije seruma.<sup>53</sup>

Tek se 1966. god. otkrilo antitijelo IgE u serumu koje je odgovorno za ovaj fenomen.<sup>54,55</sup>

Alergijske reakcije prema imunološkim mehanizmima dijelimo na četiri oblika. Prva tri oblika alergijske reakcije posredovana su antitijelima. Prvi oblik reakcije posredovan je antitijelom IgE, drugi i treći oblik posredovani su antitijelom IgG. Četvrti oblik alergijske reakcije posredovan je limfocitima T.<sup>48</sup>

U prvom tipu alergijske reakcije vezanje alergena za IgE na ciljnim stanicama (prvenstveno mastocitima), aktivira mastocite, potiče njihovu degranulaciju i oslobađanje velikog broja medijatora alergijske reakcije kao što je opisano u prethodnom poglavlju.

Drugi tip alergijske reakcije posredovan je antitijelima IgG koji djeluju na antigene na staničnoj površini pri čemu dolazi do aktivacije komplementa i fagocitoze tih stanica npr. kod alergije na lijekove.

Treći tip alergijske reakcije posredovan je antitijelima IgG koja vežu slobodne antigene čime nastaje kompleks antitijelo-antigen. Ti se kompleksi odlažu u tkiva što aktivira komplement i druge upalne stanice. Tipični primjer reakcije tipa tri je serumska bolest.

Četvrti tip alergijske reakcije može biti posredovan Th1-, Th2- ili citotoksičnim limfocitima. U Th1-imunoreakcijama aktiviraju se makrofazi i oštećuju tkiva (npr. kontaktni dermatitis). U Th2-posredovanim reakcijama prevladavaju eozinofili (npr. kronični alergijski rinitis). U trećem podtipu reakcije citotoksični limfociti izravno uzrokuju reakciju (npr. odbacivanje transplantata).

Alergijska reakcija na grinje iz kućne prašine i otrovom opnokrilaca jest IgE-posredovana alergijska reakcija. IgE u tijelu proizvode plazma-stanice u limfnim čvorovima i na mjestu alergijske reakcije. Preduvjet za pojačano stvaranje IgE u organizmu je usmjeravanje limfocita T prema Th2-stanicama koji potiču limfocite B na sekreciju antitijela IgE. Prirodna uloga antitijela IgE povezuje se s obranom od parazita. Veliki broj parazita koristi proteolitičke enzime koji omogućuju prodor parazita u tijelo. I neki alergeni imaju enzimsku aktivnost pa se time objašnjava usmjeravanje u Th2-smjeru prilikom alergijskih reakcija.<sup>6</sup> Dendritičke stanice nakon ingestije alergena migriraju u regionalne limfne čvorove gdje sudjeluju u aktivaciji limfocita CD4 i njihovoj diferencijaciji u Th2-stanice koje izlučuju citokine IL-4 i IL-13, nužne za izotipska prekapčanja u limfocitima B i stvaranje antitijela IgE. Pretvorba djevičanskih limfocita T u Th2- ili Th1-stanice ovisi o utjecaju citokina prilikom prezentacije antigena od strane dendritičkih stanica, odnosno o svojstvima samog alergena (količina alergena, način ulaska u organizam). Smatra se da stanice urođene imunosti koje se nalaze pod kožom i sluznicom usmjeravaju prema Th2-odgovoru kako bi branile organizam od parazita.

Kao što je već spomenuto, pomoćnički limfociti Th1 aktiviraju makrofage i proizvode IFN- $\gamma$ , IL-2 i TNF- $\alpha$ , a pomoćnički limfociti Th2 aktiviraju limfocite B i proizvode IL-4, IL-10 i IL-13. Th-17-stanice induciraju epitelne i vezivne stanice na izlučivanje kemokina koji privlače neutrofile na mjesto infekta. IL-12 prvenstveno proizvode stanice koje sudjeluju u reakcijama nespecifične imunosti (monociti, makrofazi i dendritičke stanice). Bakterijski produkti potiču stvaranje IL-12 i IFN- $\gamma$  u NK-stanicama, makrofazima i limfocitima B koji usmjeravaju reakciju prema Th1-stanicama i aktivaciji citotoksičnih limfocita. Druga uloga Th1-stanica je davanje kostimulacijskih signala limfocitima B za proizvodnju opsonizirajućih, prvenstveno IgG (IgG1 i IgG3) specifičnih antitijela. Th2-limfociti aktiviraju djevičanske limfocite B i

potiču sekreciju IgE, IgM i IgA. U akutnim infekcijama oba tipa stanica sudjeluju u imunoreakciji dok kod kroničnih bolesti obično je dominantan jedan tip stanica.

Više od 40% zapadne populacije ima sklonost povećanom stvaranju antitijela IgE na veliki broj alergena. Ovakvu sklonost nazivamo atopijom. Smatra se da za nastanak atopije presudnu važnost imaju okoliš i genetska predispozicija. Otkriven je veliki broj genskih lokusa koji bi mogli biti odgovorni za ovaj poremećaj.<sup>56,57</sup>

Bolesnici s atopijom imaju povišene vrijednosti IgE i eozinofila u krvi te veću sklonost za razvoj alergijskih bolesti kao što je astma. Postoji velik broj teorija zašto je broj osoba s alergijom u porastu, a najpoznatija je tzv. higijenska hipoteza prema kojoj izloženost lošijim higijenskim uvjetima i infekcije u ranom djetinjstvu štite od razvoja alergije tako da usmjerava imunološku reakciju prema Th1-smjeru. Navedena teorija pokušava objasniti da je za porast alergijskih bolesti odgovorna bolja higijena i izoliranost od raznih patogena u ranom djetinjstvu.<sup>58</sup> Velik broj istraživanja podupire tu teoriju, ali postoje i oprečna istraživanja. Tako npr. djeca koja su liječena antihelminthicima u ranoj dobi imaju veću sklonost razvoju alergijskih bolesti od djece koja nisu liječena. Još jedan primjer je infekcija respiracijskim sincicijskim virusom (RSV) u ranoj dobi koja povećava predispoziciju za alergijske bolesti.<sup>48</sup> Izloženost alergenu, kao što je prije navedeno, može biti dugotrajna, kronična ili akutna te iznenadna. Najpoznatija kronična alergijska bolest jest astma koju karakterizira kronična bolest dišnog puta praćena preosjetljivošću dišnih puteva, reverzibilnim opstrukcijama i infiltracijom eozinofila te Th2-stanica ispod sluznice dišnog puta.<sup>48</sup>

## 1.1.2. Alergeni

### 1.1.2.1. Grinje iz kućne prašine

Najčešći alergeni su grinje iz kućne prašine. Kućna prašina kao uzročnik alergijske reakcije otkrivena je ranih dvadesetih godina prošlog stoljeća, ali je tek šezdesetih godina postalo jasno da su glavni alergeni u kućnoj prašini grinje roda *Dermatophagoides*.<sup>59</sup>

Alergijska reakcija na grinju iz kućne prašine kronična je reakcija gdje cijele godine postoji izloženost manjim ili većim količinama alergena. Grinje iz kućne prašine unose se u organizam preko dišnog sustava te izazivaju alergijsku reakciju u gornjim i donjim dišnim putevima. Klinička slika alergijske reakcije gornjih dišnih puteva većinom se manifestira kao alergijski rinitis, dok kod donjih dišnih puteva izaziva astmu. Najčešće su zahvaćeni i gornji i donji dišni putevi.

Veliko istraživanje provedeno u Velikoj Britaniji pokazalo je da je više od 30% populacije senzibilizirano na grinju iz kućne prašine.<sup>60</sup>

Do sada je identificirano više od 50 000 vrsta grinja.<sup>61</sup> Kada govorimo o grinjama iz kućne prašine, obično mislimo na grinje iz porodice *Pyroglyphidae* koje su trajno nastanjene u kućnoj prašini.<sup>61</sup> Dvije vrste grinja (*Dermatophagoides pteronyssinus* i *Dermatophagoides farinae*) najčešće nalazimo u kućnoj prašini po cijelom svijetu. Do sada je identificirano 10 proteina iz grinje *Dermatophagoides pteronyssinus* koji djeluju kao alergen. Nazvani su brojevima kako su otkrivani Der p1- Der p10. Pokazalo se da postoji jako izražena križna reakcija pa tako bolesnici koji imaju reakciju na *Dermatophagoides pteronyssinus* imaju i križnu reakciju na *Dermatophagoides farinae*.<sup>62</sup>

Proteini Der p1, 3, 4 i 9 imaju enzimsku aktivnost. Der p3, 6 i 9 su serinske proteaze dok je Der p1 cistein-serinska proteaza. Upravo proteolitička aktivnost tih proteina odgovorna je za alergijsku reakciju. Alergeni grinje djeluju kao alergijski promotor tako da alergijska reakcija nije samo usmjerena na antigene grinja nego i na produkte njihove proteolitičke aktivnosti. Proteaze djeluju kao promotor Th2-odgovora tako da potiču mastocite i bazofile na sekreciju IL-4 i IL-13.<sup>63</sup>

Der p1 ima sposobnost cijepanja CD23 molekule (niskoafinitetni receptor za IgE) s površine stanica. Slobodna molekula CD23 dodatno pospešuje sintezu protutijela IgE.<sup>64</sup>

Povećanjem koncentracije kućne prašine u zraku povećava se rizik razvoja preosjetljivosti na kućnu prašinu. Količina veća od 2 µg Der p1 alergena po gramu prašine predstavlja rizik za razvoj preosjetljivosti i astme.<sup>65</sup> Međutim, postoje velike varijacije u pojedinim istraživanjima tako da je ova granica negdje oko 1 µg Der p1 alergena po gramu prašine.<sup>66</sup>

Problem u utvrđivanju koncentracije alergena je da alergen nije prisutan samo u zatvorenom prostoru nego i na otvorenom gdje ga se ne može adekvatno mjeriti. Djeca s atopijom razvit će preosjetljivost na kućnu prašinu i pri manjim koncentracijama alergena.<sup>65,66</sup>

Alergijska reakcija na grinju iz kućne prašine, dokazana kožnim testom i povišenim vrijednostima specifičnog IgE povezana je sa smanjenom funkcijom pluća i povećanom preosjetljivosti dišnog sustava.<sup>66</sup>

Alergijska reakcija na grinje iz kućne prašine važan je faktor za razvoj astme, a kod već preosjetljivih osoba izloženost kućnoj prašini izaziva astmatski napadaj.<sup>66</sup>

Preko 85% astmatičara ima pozitivan kožni test na kućnu prašinu, dok je u općoj populaciji učestalost oko 5-30%.<sup>66</sup>

### 1.1.2.2. Otrovi opnokrilaca

Opnokrilci (*Hymenoptera*) su red unutar razreda insekata koje svojim otrovom izazivaju alergijsku reakciju kod ljudi. Opnokrilce dijelimo na porodice osa (*Vespidae*), pčela (*Apidae*) i mrava (*Formicidae*).<sup>67,68</sup>

Otrov pčela sastoji se od većeg broja glikoproteina: fosfolipaza A2 (12-15% suhog otrova pčele), hijaluronidaza, kisela fosfataza, Api M6 (protein od 71 aminokiseline koji čini oko 1-2% otrova). Melitin je glavni sastojak pčelinog otrova te čini oko 50% suhog otrova. Najvažniji alergen u otrovu pčela je fosfolipaza A2 (glikoprotein od 134 aminokiseline) koja djeluje citotoksično i citolizinski.<sup>69-73</sup>

Otrov bumbara sadrži fosfolipazu A2 (*Bom p1*), proteazu (*Bom p4*), hijaluronidazu, kiselu fosfatazu te neke druge proteine koje ne nalazimo kod pčela.<sup>71</sup>

Glavni sastojak otrova osa je fosfolipaza A1 (*Ves v1*), hijaluronidaza (*Ves v2*) i antigen 5 (*Ves v5*). Unutar porodice pčela velika je podudarnost u sastavu otrova. Između pojedinih vrsta osa također postoji velika podudarnost u sastavu otrova (preko 95%). U sastavu otrova pčela i osa postoji podudarnost u građi hijaluronidaze oko 50%.<sup>72</sup>

Reakcija na otrov opnokrilaca može biti alergijska ili nealergijska. Nealergijska reakcija nastaje kao posljedica toksičnog efekta samog otrova dok je alergijska reakcija posredovana antitijelom IgE. Reakciju organizma na otrov insekata obično dijelimo na: normalnu lokalnu reakciju (crvenilo i otekline kože do 10 cm, traje do 24 h), veliku lokalnu reakciju (crvenilo i otekline kože preko 10 cm, traje duže od 24 h), sistemska anafilaktičku reakciju, sistemska toksičnu reakciju i neobične reakcije.<sup>74</sup>

Najčešće se događaju veće lokalne i sistemske reakcije.



Postoji više klasifikacija sistemske reakcije, a obično se koristi klasifikacija po Muelleru<sup>74</sup>:

- prvi stupanj: generalizirana urtikarija, svrbež, slabost, nemir
- drugi stupanj: bilo koji od prethodno navedenih simptoma te dva ili više od sljedećih: angioedem, stezanje u prsima, mučnina, povraćanje, proljev, bol u trbuhu, vrtoglavica
- treći stupanj: bilo koji od prethodno navedenih simptoma te dva ili više od sljedećih: dispneja, stridor, promuklost, slabost, konfuznost, dizartrija, osjećaj nadolazeće katastrofe
- četvrti stupanj: bilo koji od prethodno navedenih simptoma te dva ili više od sljedećih: pad tlaka, kolaps, gubitak svijesti, inkontinencija, cijanoza

Druga najčešća klasifikacija koja je u upotrebi je po Ringu i Messmeru.<sup>75</sup>

Prevalencija anafilaktičke reakcije nakon uboda opnokrilaca je između 0,3% i 7,5%.<sup>75,76</sup>

Prevalencija veće lokalne reakcije je između 2,4% i 26,4%. Mortalitet nakon uboda opnokrilaca je nizak te iznosi oko 0,4 na 1 000 000 stanovnika.<sup>76,77</sup>

Dijagnozu postavljamo na osnovi pravilno uzete anamneze koja opisuje reakciju nakon uboda opnokrilca te na osnovi kožnih i *in vitro* testova. Kožni test je najčešće korišten test za dokazivanje alergije na otrov opnokrilaca.<sup>78</sup>

Kožni test može biti ubodni (engl. prick) ili intradermalni. U prick-testu daje se otrov opnokrilaca u koncentraciji 0,01-100 µg/mL, a u intradermalnom dajemo 0,02 mL u koncentraciji 0,001-1 µg/mL. Osjetljivost ovih testova je oko 90%.

Od *in vitro* testova koristi se fluorescentni imunoesej test kojim se detektira IgE antitijelo specifično za otrov opnokrilaca.

## 1.2. Specifična imunoterapija

Specifična imunoterapija je liječenje primjenom postupno rastućih doza alergena, do konačne doze koja je učinkovita za nestanak simptoma u alergičnih osoba koji se pojavljuju nakon ekspozicije istom uzročnom alergenu.<sup>79</sup>

Specifična imunoterapija prvi je put korištena u liječenju alergije na pelud početkom dvadesetog stoljeća.<sup>80</sup> Danas se najčešće koristi u liječenju alergijskog rinitisa i astme te je zadnjih tridesetak godina standard u liječenju preosjetljivosti na otrov insekata. Pripravci alergena za imunoterapiju su od 90-tih godina prošlog stoljeća standardizirani te sigurniji za korištenje.<sup>79,80</sup> Početna istraživanja mehanizama imunoterapije bila su orijentirana na ulogu antitijela, dok se poslije pokazalo da su mehanizmi puno složeniji te da važnu ulogu imaju limfociti T, odnosno regulacijski limfociti T.<sup>81-87</sup> Tijekom provođenja imunoterapije dolazi do početnog porasta specifičnog IgE da bi nakon toga došlo do značajnog pada nakon nekoliko godina provođenja terapije.<sup>9</sup> Ukupan IgE ostaje nepromijenjen tijekom imunoterapije.<sup>9</sup> Osobita pažnja posvećivala se antitijelima IgG koja se često nazivaju blokirajuća antitijela jer se smatralo da je uspjeh imunoterapije povezan isključivo s vezanjem alergena na IgG koji tako blokira povezivanje alergena i IgE. Do porasta specifičnog IgG dolazi nakon početka terapije te ostaje povišen cijelo vrijeme. U početnom dijelu imunoterapije povišena je razina IgG1 dok tijekom dužeg provođenja imunoterapije dolazi do porasta IgG4.<sup>88,89</sup> Porast IgG4 dugo se smatralo glavnim mehanizmom djelovanja imunoterapije. Učinak IgG4 objašnjavao se inhibicijom vezanja antigena za IgE. Kasnija istraživanja pokazala su da postoje bolesnici s visokom koncentracijom antitijela IgG4 koji i dalje imaju jaku alergijsku reakciju i obratno.<sup>81,82</sup> Korištenjem brzih (engl. *rush*) protokola hiposenzibilizacije uvidjelo se da je učinak imunoterapije postignut puno prije

promjene u koncentraciji IgG ili IgE tako da uloga antitijela u mehanizmu imunoterapije ostaje nejasna. Neka istraživanja pokazala su da razinu IgG, osobito visoku razinu IgG4, možemo povezati sa slabijim uspjehom imunoterapije.<sup>79</sup>

Dendritičke stanice koje smatramo najvažnijim antigen-predocnim stanicama, pod djelovanjem specifične imunoterapije izražavaju zreli fenotip koji dovodi do tolerantne interakcije s limfocitima T u limfnim čvorovima.<sup>10</sup> Ovakav oblik dendritičkih stanica potiče stvaranje određene vrste regulacijskih stanica, tzv. Tr1-limfocita, koji izlučuju velike količine IL-10.<sup>11</sup> Porast IL-10 na više načina utječe na imunoreakciju: suprimira izlučivanje IL-5, inhibira stimulaciju mastocita i stimulira lučenje IgG4.<sup>13-18</sup> Dendritičke stanice tijekom imunoterapije, osim IL-10, potiču sekreciju i IL-12, aktiviraju i regulacijske limfocite T te tako usmjeravaju odgovor prema Th1-stanicama.<sup>91,92</sup>

Tijekom imunoterapije smanjuje se broj eozinofila i mastocita u tkivu te izostaje porast broja tih stanica u sluznici tijekom sezone alergije.<sup>19</sup> Smanjena je količina histamina i prostaglandina u nosnom lavatu nakon provokacije alergenom. Imunoterapija kod bolesnika alergičnih na kućnu prašinu smanjuje broj eozinofila i degranulaciju mastocita u nosnom lavatu nakon provokacije alergenom.<sup>19</sup> Imunoterapija na pelud breze smanjuje hiperreaktivnost bronha tijekom sezone peludi te je uočeno smanjenje broja eozinofila u bronhoalveolarnom lavatu alergičnih osoba.<sup>19</sup> Ukoliko gledamo utjecaj imunoterapije na limfocite, nalazimo smanjen broj ukupnih CD4-limfocita.<sup>7</sup> Tijekom provokacije alergenom dolazi do porasta CD4-limfocita koji izlučuju IFN- $\gamma$  dok nema promjene u sekreciji IL-4 i IL-5.<sup>7,8</sup> Prethodna istraživanja pokazuju da tijekom imunoterapije dolazi do prevladavanja Th1 nad Th2-odgovorom. Tako tijekom specifične imunoterapije na otrove insekata dolazi do pada IL-4 i porasta IFN- $\gamma$ .<sup>15</sup> *In vitro* pokusi pokazali su smanjeno stvaranje i IL-4 i IFN- $\gamma$  tijekom imunoterapije.<sup>15,16</sup> Još uvijek nije jasno da li tijekom

imunoterapije dolazi do smanjenja ukupnog odgovora imunološkog sustava (neki oblik anergije) ili do prethodno opisanog pojačavanja Th1 u odnosu na Th2-odgovor.

Imunoterapija na otrove insekata (pčele i ose) u velikom postotku osigurava dugotrajnu zaštitu od alergijske reakcije tijekom ponovnog uboda te je većina bolesnika i nakon prekida imunoterapije u periodu od tri do pet godina zaštićena od jače alergijske reakcije.<sup>89</sup> Sličan učinak postiže se imunoterapijom kod alergijske reakcije na grinje iz kućne prašine.<sup>93</sup>

Učinak imunoterapije je bolji u djece nego u odraslih.<sup>80</sup> Imunoterapija na grinje iz kućne prašine smanjuje simptome astme i potrebu za uzimanjem terapije u bolesnika s astmom.<sup>65</sup> U bolesnika s alergijskim rinitisom imunoterapija može smanjiti vjerojatnost nastanka astme. Alergen se može aplicirati supkutano ili direktno na sluznicu (najčešće sublingvalno). Sublingvalna aplikacija alergena je jednostavnija, radi se ambulantno te je manje stresna za bolesnike tako da je u posljednje vrijeme postala jako popularna. Učinkovitost sublingvalne imunoterapije dokazana je u bolesnika s alergijskom reakcijom na peludi i grinje iz kućne prašine, odnosno s alergijskim rinitisom i alergijskom astmom.<sup>94-97</sup>

Sistemske nuspojave tijekom provođenja imunoterapije jako su rijetke te su se češće događale prije standardizacije pripravaka alergena.<sup>98</sup> Najčešće se javljaju manje lokalne reakcije na mjestu davanja alergena. Kontraindikacije za primjenu imunoterapije su različite maligne bolesti, imunodeficijencije, kardiovaskularne bolesti, teško kontrolirana astma i trudnoća.

Postoji više protokola za hiposenzibilizaciju koji se razlikuju po dozi danog alergena te po vremenu davanja, a neki od protokola za hiposenzibilizaciju na otrove opnokrilaca navedeni su u tablici (Tablica 1).

Protokol		Količina otrova opnokrilaca u $\mu\text{g}$			
Dan	Sat	Ultra-brzi ( <i>Ultra-rush</i> )	Brzi ( <i>Rush</i> )	Skupni ( <i>Cluster</i> )	Klasični
1	0	0,1	0,01	0,001	0,01
	0,5	1	0,1	0,01	0,1
	1	10	1	0,1	
	1,5	20			
	2,5	30	2		
	3,5	40			
2	0		4		
	1		8		
	2		10		
	3		20		
3	0		40		
	1		60		
	2		80		
4	0		100		
8	0		100	1	1
	1			5	2
	2			10	
15	0	50	100	20	4
	1	50		30	8
22	0			50	10
	1			50	20
29			100	100	40
36				100	60
43		100	100		80
50					100
57					100
64				100	
71		100	100		100
78					
85					100
92				100	
99		100	100		
106					100

**Tablica 1.** Protokoli specifične hiposenzibilizacije na otrove insekata. U tablici su navedene količine i vrijeme supkutanog davanja alergena u raznim protokolima.

*Rush i ultra-rush* protokol omogućuju brže postizanje zaštite, koriste se najčešće kod alergija na otrove opnokrilaca, dok se sporiji protokoli lakše podnose. Doza održavanja je obično 100 µg. Smatra se da je neophodno provođenje imunoterapije u trajanju od tri godine radi postizanja trajne zaštite.<sup>88,89</sup> Kod standardnih protokola bolesnici alergični na grinju iz kućne prašine jednom tjedno kroz osam do 16 tjedana dobivaju sve veće doze alergena, a nakon toga perioda dobivaju dozu održavanja jednom mjesečno (Tablica 2).

Injekcija broj	Razrjeđenje	Biološka aktivnost, BU/mL	Volumen, mL
1-5	A (1: 10,000)	30	0,1- 0,5
6-10	B (1:5,000)	60	0,1- 0,5
11-15	C (1:1,000)	300	0,1- 0,5
16-20	D (1:500)	600	0,1- 0,5

**Tablica 2.** Protokol imunoterapije sa standardiziranim Der p1 ekstraktom. Povećavajuće doze daju se jednom tjedno, a nakon 20. doze (maksimalna doza) jednom mjesečno.

### 1.3. Regulacijski limfociti T

Pretjerana imunoreakcija može dovesti do niza bolesti (npr. alergije, autoimunosne bolesti, odbacivanja transplantiranog organa). Mehanizam nastanka i zaustavljanja pretjerane imunoreakcije nije do kraja razjašnjen.

Gershon i Kondo 1970. god. otkrili su da limfociti T osim pojačavanja mogu i suprimirati imunološku reakciju.<sup>99</sup>

Sredinom sedamdesetih godina postavljane su brojne teorije, rađeno je mnoštvo *in vivo* pokusa ne bi li se otkrile stanice odgovorne za imunosupresiju. Pokusi na miševima pokazali su da odstranjenjem timusa drugi do treći dan nakon okota dolazi do pojave autoimunosnih bolesti.<sup>100</sup>

Kod odraslih miševa nakon odstranjenja timusa i subletalnog zračenja također dolazi do autoimunosnih bolesti. S obzirom na to da dodavanjem limfocita T zdravih miševa u miševе iz prije navedenih pokusa nije došlo do autoimunosnog poremećaja, pretpostavilo se da postoji subpopulacija limfocita T odgovorna za imunosupresiju tzv. supresorski limfociti T.<sup>101,102</sup>

Međutim, usprkos *in vivo* pokusima koji su upućivali na ovakve stanice, nije se uspjela utvrditi njihova molekularna građa.<sup>103</sup>

Zbog nemogućnosti definiranja tih stanica naziv supresorski limfociti T ubrzo je napušten.

Tek razvojem tehnologija devedesetih godina prošlog stoljeća na CD4-limfocitima miša identificirana je molekula CD25 (alfa-lanac receptora za interleukin 2) kao mogući biljeg supresorskih limfocita T.<sup>104,105</sup> Nađeno je da oko 5-10% CD4 limfocita T eksprimira ovu molekulu. Davanjem suspenzije stanica slezene, iz kojih je napravljena deplecija CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> limfocita, u atimične miševе dolazilo je do razvoja autoimunosnih bolesti. Dodavanjem stanica slezene zdravog miša, gdje nije rađena deplecija CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> limfocita T, nije došlo do razvoja

autoimunskih bolesti. Kasnije se uspjelo izolirati  $CD4^+CD25^+$  limfocite T te se uvidjelo da su oni odgovorni za suprimiranje razvoja autoimunskih bolesti.<sup>106-108</sup>

Na temelju ovih istraživanja došlo se do zaključka da timus stvara mali broj  $CD4^+CD25^+$  limfocita T koji su odgovorni za kontrolu imunološke reakcije. Ove stanice su nazvane regulacijski limfociti T, međutim mehanizam imunosupresije je i dalje ostao nepoznat.<sup>109</sup>

Razvojem tehnologije postalo je moguće izolirati  $CD4^+ CD25^+$  limfocite te raditi pokuse na toj populaciji stanica.

U *in vitro* pokusima na mišjim stanicama  $CD4^+ CD25^+$  limfociti T suprimirali su proliferaciju limfocita T samo u suspenziji s normalnim limfocitima T i antigen-predočnim stanicama, što pokazuje da je za imunosupresivno djelovanje regulacijskih limfocita T neophodan neposredan kontakt s ciljnim stanicama ( $CD4$  ili  $CD8$  limfocitima) uz prisustvo antigen-predočnih stanica.<sup>110-111</sup> Otkriveno je da  $CD4^+ CD25^+$  limfociti ekspimiraju molekulu CTLA-4.<sup>112,113</sup> Točna uloga CTLA-4 u funkciji regulacijskih limfocita T nije u potpunosti razjašnjena. Najvjerojatniji mehanizam kojim CTLA-4 dovodi do imunosupresije je vezanje na molekule  $CD80$  i  $CD86$  i blokiranje kostimulacijske molekule  $CD28$ .<sup>114</sup> Na taj način onemogućuje se aktivacija limfocita T. U *in vitro* pokusima uspjelo se prekinuti imunosupresiju dodavanjem anti-CTLA-4 antitijela. Međutim, u *in vivo* modelu dodavanjem  $CD4^+CD25^+$  limfocita T tretiranih s anti-CTLA-4 antitijelima nije se uspjelo postići zaštitu od autoimunskih bolesti.<sup>113,114</sup> Osim blokadom kostimulirajućih molekula pokazalo se da CTLA-4 djeluje na aktivirane limfocite T tako da inducira stvaranje TGF-beta koji ima imunosupresivno djelovanje.<sup>115,116</sup>

Otkriven je velik broj drugih mogućih biljega regulacijskih limfocita T npr. GITR, LAG-3.<sup>116-119</sup> Godine 2001. Clare Baecher-Allan i suradnici prvi put izoliraju  $CD4^+ CD25^{\text{high}}$  limfocite T iz periferne krvi čovjeka.<sup>119</sup> Stanice su izolirane uz pomoć protočnog citometra koristeći specifična



monoklonska antitijela. U *in vitro* pokusima stanice su stimulirane s anti-CD3 antitijelima. Za razliku od mišjih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> limfocita T koji svi djeluju imunosupresivno, kod čovjeka samo CD4 limfociti T s visokom ekspresijom CD25 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) imaju imunosupresivno djelovanje. Dodavanjem IL-2 kao dodatnog stimulatora imunosupresija je poništena. Kod ljudi ove stanice čine oko 1-2% CD4 limfocita T. Oko 99% ove populacije ima CD45RO na površini za razliku od CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> stanica kod kojih je ekspresija na oko 33% stanica. Oko 20% ove populacije eksprimira molekulu MHC klase II (HLA-DR) za razliku od ostalih CD4 limfocita koji imaju ekspresiju na oko 2%. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> stanice kod čovjeka imaju visoku ekspresiju CTLA-4 molekule kao i kod mišje populacije. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> ekspimiraju na površini molekulu PD-1 (engl. *program cell death protein 1*).<sup>119</sup>

Istraživanjem rijetke autoimunosne bolesti kod miševa 2001. g. otkrivena je mutacija gena FOXP3 na kromosomu X.<sup>120</sup> Ta mutacija u miševa dovodi do imunoproliferativne bolesti te ugibanja četvrti dan nakon okota. Produkt tog gena je protein, transkripcijski faktor, skurfina. Istraživanja u ljudi otkrila su da je mutacija gena FOXP3 uzrok autoimunosne bolesti koja zahvaća endokrine organe, crijeva i dovodi do atopijskog dermatitisa, a zove se IPEX.<sup>120-123</sup>

Pokazalo se da je FOXP3 neophodan za razvoj regulacijskih limfocita T, budući da deplecijom FOXP3 limfocita dolazi do razvoja smrtonosnih imunoproliferativnih poremećaja. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> limfociti T sadrže FOXP3 dok se aktivacijom stanica CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> nije uspjelo aktivirati FOXP3. Pokusima s retrovirusnom transdukcijom gena FOXP3 uspjelo se od limfocita CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> dobiti stanice koje fenotipski i funkcijom sličje regulacijskim limfocitima. Takve stanice u *in vitro* pokusima imale su ekspresiju CD25, CTLA-4 i GITR te su pokazivale imunosupresivno djelovanje.<sup>120-123</sup> I dalje je nepoznata prava uloga transkripcijskog faktora

FOXP3. Genetske analize pokazale su da se FOXP3 veže na promotorsku regiju od 700-1100 gena od kojih su mnogi povezani s TCR receptorom.<sup>122-123</sup>

Neki radovi su pokazali da regulacijski limfociti T koji su stvoreni u *in vivo* modelu nakon dugotrajne izloženosti antigenu nisu eksprimirali FOXP3.<sup>124-125</sup>

FOXP3 je jako dobar biljeg regulacijskih limfocita T u miša, međutim u čovjeka postoji određeni broj stanica koje imaju ekspresiju FOXP3, a nemaju regulacijsku funkciju.<sup>125-133</sup> Čini se da je FOXP3 neophodan za razvoj ljudskih regulacijskih limfocita T, ali nije još posve sigurno koliko je dobar biljeg. U limfocitima T pod djelovanjem TGF-beta dolazi do indukcije FOXP3, ali te stanice nemaju regulacijsko djelovanje.<sup>134</sup>

Usprkos svim istraživanjima još uvijek nije u potpunosti jasno kako regulacijski limfociti T suprimiraju autoreaktivne limfocite T, a da ne djeluju na limfocite koji su uključeni u obranu organizma od raznih infekcija. Jedna od vjerojatnijih teorija je da autoreaktivni limfociti T manje eksprimiraju TCR-receptor dok stanice uključene u upalu imaju veću ekspresiju TCR-receptora.<sup>135</sup> Regulacijski limfociti T djeluju na stanice s nisko izraženim TCR-receptorom dok bi stanice s visoko izraženim TCR-receptorom bile otporne na njihovo djelovanje.

Druge teorije pretpostavljaju da se tijekom infekcije regulacijski limfociti T inhibiraju preko TLR na dendritičkim stanicama.<sup>136-139</sup>

Veliki broj istraživanja potvrđuje ulogu regulacijskih limfocita T u imunoterapiji.<sup>20-22</sup> Osobita pažnja se posvećuje dendritičkim stanicama koje tijekom imunoterapije aktiviraju regulacijske limfocite T te tako suprimiraju imunološki odgovor i usmjeravaju ga prema Th1-stanicama.<sup>18</sup>

Smatra se da su upravo regulacijski limfociti T odgovorni za smanjenje broja i aktivnosti eozinofila i mastocita, za smanjeno stvaranje IgE odnosno povećano stvaranje IgG.<sup>138,139</sup>

Imunosupresivni citokini IL-10 i TGF-beta također su istraživani kao jedan od mehanizama

kojim regulacijski limfociti T uspostavljaju supresiju. Početkom devedesetih godina počinju intenzivna istraživanja vezana uz IL-10.<sup>140-143</sup> U *in vitro* pokusima uspijeva se od limfocita T pod djelovanjem IL-10 stvoriti tzv. Tr1-stanice koje izlučuju IL-10, odnosno pod djelovanjem TGF-beta stvoriti tzv. Th3-stanice.<sup>31,91,92</sup> Međutim, u *in vitro* modelima dodavanjem anti-IL-10 i anti-TGF-beta antitijela nije se uspjelo poništiti imunosupresivni učinak.<sup>140,141</sup> Suprotno od toga u *in vivo* modelima IL-10 i TGF-beta imaju važnu ulogu u postizanju supresivnog učinka.<sup>142,143</sup>

IL-10 proizvodi veliki broj stanica: Th2-limfociti, limfociti B, dendritičke stanice, regulacijski limfociti i makrofazi.<sup>143-147</sup> Veže se na receptor koji se sastoji od dva dijela, IL-10R $\alpha$  i IL10-R $\beta$ . IL-10R $\alpha$  je specifičan za IL-10 dok se na IL-10R $\beta$  veže i IL-22.<sup>143</sup> Vezanjem IL-10 na receptor dolazi do aktivacije Jak1 i Tyk2 koji dovode do fosforilacije STAT3, neophodnog za inhibitorno djelovanje IL-10.<sup>145-147</sup> STAT3 sudjeluje u regulaciji stvaranja velikog broja citokina (IL-12, IL-2, IL-1, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6).<sup>147</sup> IL-10 blokira stvaranje NF- $\kappa$ B te i na taj način radi imunosupresiju, smanjuje sekreciju IL-12 i broj kostimulacijskih molekula na makrofazima te na taj način inhibira Th1-odgovor.<sup>143</sup> Istraživanje na miševima otkrilo je da IL-10 ima osobito važnu ulogu u održavanju imunološke homeostaze u području gastrointestinalnog trakta.<sup>147-150</sup> Blokodom djelovanja IL-10 dolazi do jakih upalnih procesa koji su još jače izraženi u odsustvu TGF-beta.<sup>141,142,151</sup> IL-10 se smatra važnim imunomodulatorom upalnih procesa koji bi inače mogli dovesti do većeg oštećenja tkiva.<sup>148,151</sup>

TGF-beta je citokin koji ima veliku ulogu u regulaciji i upalnim procesima. Proizvodi ga veliki broj stanica imunološkog i neimunološkog sustava, a isto tako i djeluje na veliki broj stanica.<sup>152,153</sup> TGF-beta postoji u pet oblika: beta1, beta2, beta3, beta4 i beta5. TGF-beta1 je najčešća forma tog citokina i većina imunoloških istraživanja odnosi se na taj oblik. Veže se za TGF- $\beta$ RII receptor na površini stanica što dovodi do aktivacije citoplazmatskog dijela receptora i

aktivacije TGF- $\beta$ RI receptora.<sup>154,155</sup> Aktivirani receptorski kompleks dovodi do aktivacije molekula SMAD i transkripcije gena. Njegova uloga u imunomodulaciji najbolje se vidi na primjeru miševa s izbrisanim genima za TGF- $\beta$  i TGF $\beta$ -RII u kojih se razvijaju teške autoimunosne bolesti i posljedično rano ugibanje životinja.<sup>154-156</sup> U tih miševa pokazalo se da je razvoj NK-stanica, regulacijskih stanica i limfocita CD8 u timusu ovisno o TGF-beta. Glavne uloge TGF-beta su u perifernim tkivima gdje je neophodan za opstanak djevičanskih limfocita T te za supresiju autoreaktivnih CD4 i CD8 limfocita T. U upalnim procesima uz IL-6 potiče stvaranje Th17-stanica te pogoduje upalnom procesu.<sup>157-161</sup> Uz prisustvo IL-4 potiče limfocite T na sekreciju IL-9 i IL-10 te tako pogoduje upali.<sup>162</sup> TGF-beta omogućuje preživljavanje regulacijskih limfocita T u tkivima.<sup>153,154</sup> Uz prisustvo IL-2 potiče stvaranje tzv. induciranih regulacijskih limfocita T i smanjuje aktivnost stanica urođene imunosti.<sup>163-167</sup> Kao što je opisano, veliki broj stanica stvara TGF-beta, ali i citokin djeluje na veliki broj stanica te se upravo zbog tako širokog djelovanja istražuje kao mogući lijek u velikom broju bolesti, osobito u terapiji karcinoma.<sup>168,169</sup>

Do danas je opisano više tipova regulacijskih limfocita. Najčešće govorimo o regulacijskim limfocitima T koji nastaju u timusu i imaju izražene molekule CD4, CD25 i FOXP3. Ta populacija stanica je i tema našeg istraživanja. Te stanice nazivaju se „naturally occurring“ dok druge oblike obično nazivamo induciranim regulacijskim limfocitima.<sup>21,22,163</sup> Najpoznatiji su Th3 regulacijski limfociti T nastaje na periferiji organizma (većinom sluznicama). Regulacijske Tr1 stanice nastale su u *in vitro* pokusima uz prisustvo IL-10, a i same izlučuju puno tog citokina. Opisan je još jedan oblik regulacijskih stanica koje nastaju iz limfocita CD4 tako da dolazi do indukcije molekule FOXP3 i pojačanog stvaranja TGF-beta.

Na temelju prethodnih istraživanja nekoliko je mogućih modela djelovanja regulacijskih limfocita T: supresivno djelovanje preko citokina, direktna citoliza ciljnih stanica, modulacija dendritičkih stanica, uspostavljanje metaboličkih poremećaja.

Poznato je da imunosupresivni citokina IL-10 i TGF beta imaju veliku ulogu u djelovanju regulacijskih limfocita T. Regulacijski limfociti T djeluju već na razini dendritičkih stanica tako da blokiraju kontakt dendritičkih stanica s djevičanskim limfocitima T te blokiraju njihovu stimulaciju.<sup>47</sup> Također smanjuju ekspresiju kostimulacijskih molekula CD80 i CD86 na dendritičkim stanicama, a dijelom ih blokiraju vezivanjem molekula CTLA-4. Pokazalo se da regulacijski limfociti T suprimiraju mastocite, bazofile, eozinofile i stvaranje IgE te smanjuju odgovor alergen-specifičnih limfocita T.<sup>37-40</sup> Točan mehanizam kako regulacijski limfociti uspostavljaju toleranciju na alergene ostaje nepoznat. S obzirom da kod alergijskih bolesti dolazi do prejake, nekontrolirane reakcije na inače bezazlene tvari iz prirode smatra se da je za porast ovih bolesti odgovoran poremećaj funkcije regulacijskih limfocita koji ne uspijevaju vršiti imunosupresiju.

## 2. Hipoteza

Specifična imunoterapija u djece alergične na kućnu prašinu i otrov opnokrilaca povećava broj regulacijskih limfocita T koji dovode do uspostavljanja tolerancije na alergene. Smatramo da aktivacijom regulacijskih limfocita T dolazi do suprimiranja alergijske reakcije.

## 3. Cilj istraživanja

Ciljevi ove studije su sljedeći:

- razvijanje metode za detekciju regulacijskih limfocita T i unutarstaničnu detekciju citokina IL-10 i TGF-beta1 na protočnom citometru
- utvrditi broj regulacijskih limfocita T u zdrave i alergične djece
- utvrditi broj regulacijskih limfocita T tijekom specifične hiposenzibilizacije na dva modela (standardna hiposenzibilizacija kod alergije na kućnu prašinu te *rush*-hiposenzibilizacija kod alergije na otrov opnokrilaca)
- ispitati da li specifična imunoterapija u djece alergične na kućnu prašinu i otrov insekata mijenja postotak regulacijskih limfocita T i izlučivanje imunosupresivnih citokina koji su povezani s regulacijskim limfocitima T (IL-10 i TGF beta1).

## 4. Materijal i metode

### 4.1. Ispitanici

#### 4.1.1. Djeca s alergijskom reakcijom na grinju iz kućne prašine

Regulacijski T limfociti su istraživani u 16 djece alergične na kućnu prašinu (dob pet do 12 godina, prosječno sedam godina, osam djevojčica i osam dječaka) koji su ispunjavali sljedeće kriterije:

- a) pozitivna anamneza ponavljajućih bronhospazama, otežanog disanja i stezanja u prsima,
- b) smanjen FEV1 20% ili više,
- c) pozitivan kožni test na Der p,
- d) specifični IgE za Der p  $\geq$  klase 3,
- e) povišen ukupan IgE iznad 150 IU/L, i
- f) bez prethodne imunoterapije.

Iz istraživanja su isključena sva djeca koja su bolovala od nekih drugih bolesti ili su već pod nekim oblikom terapije.

Djeca su supkutano dobivala standardizirani ekstrakt *Der p* (Imunološki zavod, Zagreb) koji se inače koristi za hiposenzibilizaciju.<sup>170</sup> *Der p*-ekstrakt davao se po standardiziranom protokolu (Tablica 2).

Iz uzoraka krvi prije, nakon tri i 12 mjeseci mjerio se postotak i biljezi aktivnosti regulacijskih T-limfocita te imunosupresivni citokini IL-10 i TGF-beta. Uspješnost specifične imunoterapije kontrolirala se ispitivanjem simptoma astme (otežano disanje i stezanje u prsima). Iz dobivenih podataka izračunat je tzv. zbroj simptoma (engl. symptom score). Postojala su četiri stupnja težine simptoma: 0 = bez simptoma, 1= blagi simptomi koji ne utječu na svakodnevne aktivnosti, 2 = umjereni simptomi koji utječu na pojedine svakodnevne aktivnosti, 3 = teški simptomi koji utječu na

veći broj svakodnevnih aktivnosti. U djece se također pratila potreba za dodatnom simptomatskom terapijom. Klinički parametri (FEV1 i PEFr) i laboratorijski nalazi (ukupni i specifični IgE, postotak eozinofila) analizirani su prije, nakon tri i dvanaest mjeseci terapije.

#### **4.1.2. Djeca s alergijskom reakcijom na otrove opnokrilaca**

U ovom istraživanju sudjelovalo je 18 djece (dob sedam do 15 godina, prosječna dob devet godina, devet djevojčica i devet dječaka) alergične na ubod insekata s prethodnom alergijskom reakcijom na ubod insekta III. ili IV. stupnja po Muelleru. Jedanaest bolesnika bilo je alergično na otrov pčela, jedan bolesnik na otrov osa i šest bolesnika na oba otrova.

Kožni ubodni test rađen je sa standardiziranim pripravkom otrova pčela i osa (Stallergenes, Antony, Francuska). Histamin dihidroklorid (10 mg/mL) i otopina glicerola korišteni su kao pozitivne i negativne kontrole. Kožni test očitao je 15 minuta nakon aplikacije otrova, a kružna reakcija kože 3 mm veća od kontrole smatrala se pozitivnom reakcijom. Intradermalni testovi su smatrani pozitivnim ukoliko se reakcija pojavila nakon 15 min pri koncentraciji otrova od 1 µg/mL ili manje.

U serumu su mjereni ukupni i specifični IgE (fluorescentni imunoesej, Pharmacia, Uppsala, Švedska). Analiza je vršena na uređaju UniCAP 100 (Phadia, Uppsala, Švedska).

Bolesnici su hospitalizirani pet do sedam dana tijekom čega je provedena *rush*-imunoterapija, bez premedikacije. Nakon aplikacije početne doze, svakih sat vremena je povećavana doza alergena sve do doze održavanja od 100 µg (1mL). Održavajuća doza od 100 µg davana je nakon sedmog, 14. i 21. dana, nakon čega su bolesnici jednom mjesečno dobivali dozu od 100 µg. Injekcije su davane potkožno u područje nadlaktice. Svi bolesnici bili su pod medicinskim nadzorom tijekom provođenja imunoterapije. Lokalne i sistemske reakcije nakon davanja



imunoterapije bilježene su nakon svake injekcije. Uzorci krvi uzeti su prije početka *rush*-imunoterapije, nakon šest tjedana i šest mjeseci.

#### **4.1.3. Kontrolna skupina zdrave djece**

Kontrolna skupina sastojala se od 20 zdrave djece (dob osam do 12 godina, prosječna dob devet godina, 10 djevojčica i 10 dječaka,) anamnestički bez alergijskih ili drugih bolesti. Napravljeni su rutinski laboratorijski testovi (CRP, sedimentacija eritrocita, kompletna krvna slika) da bi se isključile druge bolesti.

Nakon što su dobili detaljne informacije o prirodi i postupcima tijekom studije, ispitanici, odnosno roditelji svojim su potpisom potvrdili pristanak na sudjelovanje u studiji. Istraživanje je dobilo odobrenje etičkih povjerenstava Imunološkog zavoda, Dječje bolnice Srebrnjak, Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ iz Slavenskog Broda te Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## 4.2. Materijal

Uzorke periferne krvi sakupljali smo iz antekubitalne vene sterilnom štrcaljkom. Po 2 mL krvi sakupljali smo u Vacutainer-epruvete s heparinom (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, SAD) za izdvajanje mononuklearnih stanica periferne krvi (PBMC, od engl. peripheral blood mononuclear cells). Za određivanje regulacijskih limfocita T uzimali smo PBMC izolirane na gradijentu gustoće otopine Ficoll-Pacque (Pharmacia, Uppsala, Švedska), koje smo do analize pohranili u tekućem dušiku na -196 °C. Po 2 mL periferne krvi sakupljalo se u Vacutainer-epruvete bez antikoagulansa (BD Biosciences Immunocytometry Systems) kako bi se izdvojio serum.

### 4.2.1. Monoklonska antitijela

U studiji smo koristili mišja anti-humana monoklonska antitijela konjugirana fluoresceinizotiocijanatom (FITC, od engl. fluorescein isothiocyanate), fikoeritriinom Cy5 (PE-Cy5, od engl. phycoerithrin Cy5), CyChrome, fikoeritriinom (PE, od engl. phycoerithrin), alofikocijaninom (APC, od engl. allophycocyanin).

Za obilježavanje površinskih staničnih antigene na humanim limfocitima koristili smo:

APC - konjugirani anti-CD3 (Serotec, Oxford, Velika Britanija),

FITC- konjugirani anti-CD4, PE- konjugirani anti-CD69, PE- konjugirani anti-CD45RO,

PE- konjugirani anti-HLA-DR, CyChrome-konjugirani anti-CD25, PE-Cy5-konjugirani anti-

CD8 (BD Biosciences, Heidelberg, Njemačka) i PE-konjugirani anti-FOXP3 (eBioscience, San Diego, SAD).

Za unutarstanično obilježavanje antigena i citokina koristili smo sljedeća monoklonska antitijela: PE–konjugirani anti-CTLA-4, PE–konjugirani anti-IL-10 (BD Biosciences, Heidelberg, Njemačka) i PE – konjugirani anti-TGF-beta 1 (IQProducts, Groningen, Nizozemska).

Za određivanje nespecifičnog vezanja koristili smo odgovarajuće izotipske kontrole:

APC – konjugirani IgG1, FITC-konjugirani IgG1, PE-Cy5–konjugirani IgG1, CyChrome-konjugirani IgG1, PE- konjugirani IgG2a (BD Biosciences, Heidelberg, Njemačka).

#### **4.2.2. Popis ostalih korištenih kemikalija i otopina**

Kemikalije:

Brefeldin A (Sigma Chemical Company , St. Louis, SAD),

Humani AB serum (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb, R Hrvatska),

Phorbol 12-miristat 13-acetat (PMA) (Sigma Chemical Company , St. Louis, SAD),

Ionicin (Sigma Chemical Company , St. Louis, SAD).

Otopine korištene pri obilježavanju staničnih površinskih, unutarstaničnih antigena i unutarstaničnih citokina:

RPMI 1640 (Imunološki zavod, Zagreb, R Hrvatska) s gentamicinom (G) (Sigma Chemical Co.)

Otopina za permeabilizaciju stanica

Fetalni teleći serum (FCS) (Gibco, Paisley, Engleska) (1%)

saponin ( 0,1%)

NaN<sub>3</sub> ( 0,1%)

Otopina za ispiranje stanica

FCS (0,1%)

NaN<sub>3</sub> (1%)

Puferirana fiziološka otopina

Otopina za fiksiranje stanica

Formaldehid (Kemika, Zagreb, R Hrvatska) (2%)

FACS otopina (NaN<sub>3</sub> 0,01%, FCS 4%)

Otopina za kultivaciju stanica

AB serum (10%)

RPMI 1640 s gentamicinom

### **4.3. Metode**

#### **4.3.1. Izdvajanje mononuklearnih stanica iz ljudske periferne krvi**

Izdvajanje PBMC iz krvi radili smo na gradijentu gustoće otopine Ficoll-Pacue ( $\rho = 1.130 \text{ g/mL}$ , Pharmacia). Svježu krv razrijedili smo s puferiranom fiziološkom otopinom u omjeru 1:1. U plastične epruvete od 25 mL (Kartell, Milano, Italija) razrijeđenu krv nadslojili smo na otopinu Ficoll-Pacue u omjeru 1:1 te smo centrifugirali 30 minuta na 600g. Nakon centrifugiranja pažljivo smo pipetom pokupili prsten izdvojenih PBMC. PBMC smo dodatno dva puta ispirali u otopini za ispiranje centrifugiranjem na 600g po pet minuta. Stanice smo nakon odlijevanja

supernatanta razrijedili u 1 mL puferirane fiziološke otopine te smo ih prebrojili u Neubauerovoj komorici.

#### **4.3.2 Zamrzavanje mononuklearnih stanica periferne krvi**

PBMC smo u koncentraciji  $2 \times 10^6/100 \mu\text{L}$  zamrzavali u 1 mL otopine dimetil-sulfoksida (DMSO) (Sigma Chemical Co.) i fetalnog telećeg seruma u razrjeđenju 10:1. Tako pripremljene stanice u specijalnim epruvetama od 2 mL (Cryovials, Costar Corning Inc., New York, SAD) zamrznuli smo na  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  u posudi s alkoholom (Mister Frosty®, Nalgene, New York, SAD) najmanje četiri sata te potom prebacili u tekući dušik na  $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ . Smrznuti uzorci stanica analizirani su unutar šest mjeseci od smrzavanja.

Vijalice su odmah nakon vađenja iz tekućeg dušika stavljene na led. U što kraćem roku sadržaj vijalica je otopljen i to tako da se vijalice urone do pola u toplu vodu. Sadržaj vijalica se prenese pipetom u epruvetu te se polako dodaje 9 mL toplog medija (RPMI s gentamicinom). Suspenzija stanica se dva puta ispiru centrifugiranjem  $600 \times g$  po pet minuta.

#### **4.3.3. Obilježavanje površinskih i unutarstaničnih antigena**

U polistirenske epruvete od 4 mL dodano je  $50 \mu\text{L}$  suspenzije stanica (250 000 stanica). U suspenziju je dodano po  $5 \mu\text{L}$  monoklonskih antitijela konjugiranih različitim fluorokromima. Kod četverostrukog obilježavanja korištena su antitijela konjugirana sa sljedećim fluorokromima: FITC, PE, CyChrome i APC. Stanice su ostavljene 15 minuta u mračnom prostoru na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije stanice su isprane u otopini za ispiranje

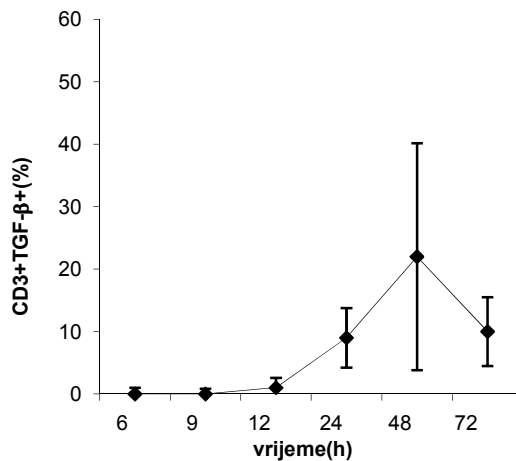
centrifugiranjem na 600g pet minuta. U slučaju bojanja samo površinskih antigena dodano je 300  $\mu$ L otopine za fiksiranje. U slučaju bojanja unutarstaničnih antigena na stanice je nakon trostrukog bojanja površinskih antigena dodano 100  $\mu$ L otopine za fiksiranje te su ostavljene na + 4 °C 20 minuta. Nakon fiksiranja stanice su isprane u permeabilizacijskom puferu. Na talog je dodano 5  $\mu$ L monoklonskog antitijela konjugiranog fluorokromom PE te inkubirano 30 minuta na + 4°C. Stanice su potom isprane u permeabilizacijskom puferu centrifugiranjem na 600g pet minuta. Na talog je dodano 300  $\mu$ L otopine za fiksiranje i uzorci su analizirani na protočnom citometru. Nespecifično vezanje monoklonskih antitijela analizirali smo korištenjem izotipski identičnih nespecifičnih antitijela konjugiranih fluorokromima (APC, CyChrome, PE i FITC).

#### **4.3.4. Stimulacija i određivanje unutarstaničnih citokina**

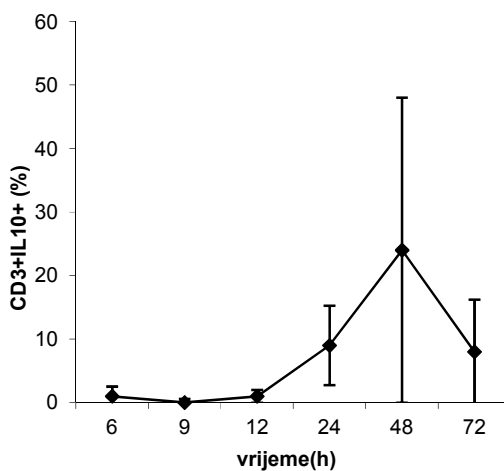
U polistirenske epruvete od 4 mL (Falcon, Becton Dickinson, Lincon Park, SAD) dodali smo 900  $\mu$ L medija (RPMI s gentamicinom i 10% AB serum) i 100  $\mu$ L suspenzije stanica (koncentracija  $10^6$  stanica/mL). Kao stimulacija dodani su mitogeni: PMA (50 ng/mL) i ionomicin (1  $\mu$ g/mL). Za svaku stimuliranu epruvetu korištena je i nestimulirana epruveta kao kontrola. Stanice su inkubirane 24 sata u termostatu s 5% CO<sub>2</sub> (Heraeus, Osterode, Njemačka) na 37 °C pod nagibom od 45°. Zadnjih 6 sati inkubacije dodan je inhibitor proteinske sekrecije brefeldin A (10  $\mu$ g/mL). Da bi se stanice lakše odlijepile od podloge, nakon kultivacije su dodatno inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku sa 100  $\mu$ L 10mM otopine EDTA. S obzirom da prije našeg istraživanja nije postojao protokol koji bi govorio o potrebnoj dužini stimulacije stanica potrebnoj za detekciju unutarstaničnih IL-10 i TGF-beta protočnom citometrijom, bilo je potrebno naći odgovarajuće vrijeme. Stanice smo stimulirali 6, 9, 12, 24, 48

i 72 sata te smo odredili da je 24h stimulacije najbolje vrijeme za detekciju ispitivanih citokina (Slika 1). Nakon bojenja površinskih antigena stanice su ostavljene na + 4 °C minimalno 20 minuta, potom su isprane u permeabilizacijskom puferu centrifugiranjem na 600g pet minuta. Na talog je dodano 5 μL monoklonskog antitijela za citokine (anti-IL-10 i anti-TGF-beta) te su ostavljene 30 minuta na + 4°C. Dodano je 300 μL fiksacijskog pufera i napravljena je analiza na protočnom citometru. Nespecifično vezanje monoklonskih antitijela analizirali smo korištenjem izotipski identičnih nespecifičnih antitijela konjugiranih fluorokromima (APC, PE i FITC). Kao dodatnu kontrolu koristili smo nestimulirane stanice koje su također kultivirane kao što je prethodno opisano.

A



B

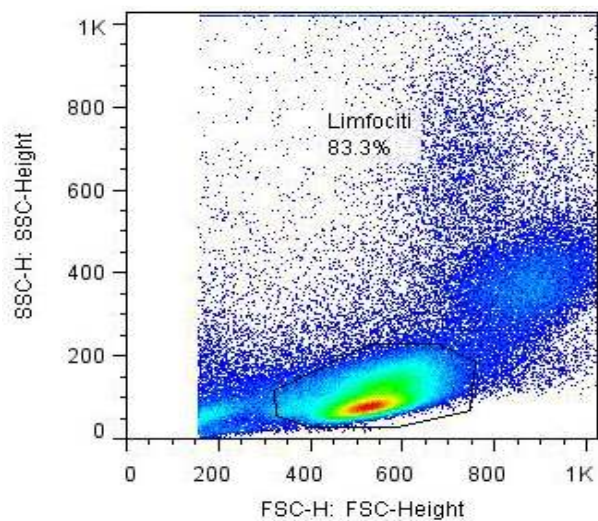


**Slika 1.** Određivanje potrebnog vremena inkubacije stanica za detekciju citokina IL-10 i TGF-beta. Prikazana je dinamika sekrecije citokina TGF beta1 (A) i IL-10 (B) tijekom stimulacije CD3<sup>+</sup> limfocita s PMA i ionomicinom kroz 72 sata. Detekcija citokina je rađena na protočnom citometru, pokusi su ponovljeni tri puta za svaki citokin.



#### 4.3.5. Analiza stanica protočnim citometrom

Stanice su nakon obilježavanja površinskih i unutarstaničnih antigena analizirane na protočnom citometru FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View, SAD) opremljenim s dva lasera: argonskim, snage 15 mW emisijom pobudne zrake valne dužine od 488 nm i s crvenim diodnim laserom, emisijom pobudne valne dužine od 635 nm. Uzorke za analizu površinskih antigena obilježavali smo s četiri monoklonska antitijela istovremeno i sakupljali 5 000 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> stanica po uzorku. Za prikupljanje, pohranu i analizu rezultata koristili smo program CellQuest Software (BD Biosciences). Na dvoparametarskom dijagramu koji prikazuje odnos stanica prema veličini (FSC, engl. forward scatter) i zrnatosti (SSC, engl. side scatter) postavili smo aktivnu ogradu oko populacije limfocita (Slika 2).

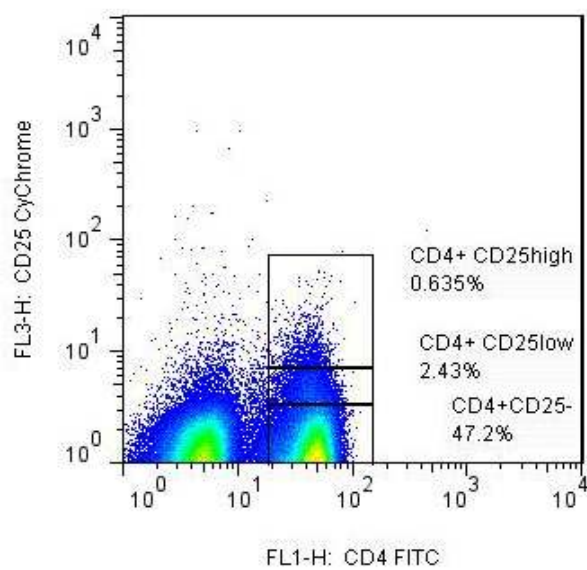


**Slika 2.** Detekcija limfocita putem protočnog citometra. Dvoparametarski dijagram prikazuje odnos stanica prema veličini (FSC, engl. forward scatter) i znatosti (SSC, engl. side scatter). Postavljena je ograda oko limfocitne populacije.

Zatim smo postavili aktivne ograde oko subpopulacije  $CD3^+CD4^+$  limfocita T te na novom dvoparametarskom dijagramu postavili dodatnu aktivnu ogradu oko  $CD3^+CD4^+CD25^{high}$  stanica (Slika 3).

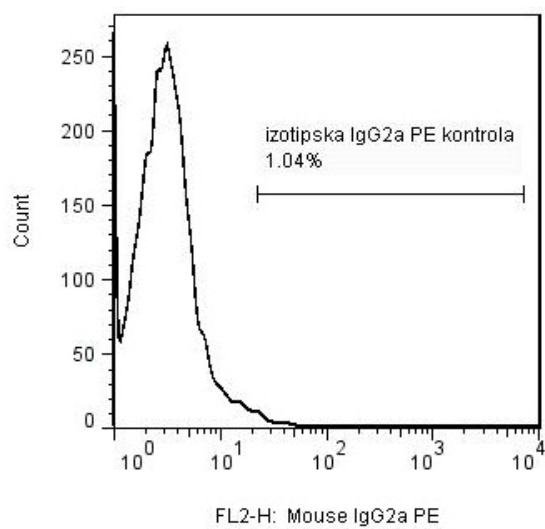
Ograde su postavljene uzimajući u obzir izotipsku kontrolu te na osnovu ranije objavljenih primjera obilježavanja.<sup>28</sup>

Naknadno smo analizirali ekspresiju pojedinih specifičnih obilježja regulacijskih limfocita T (CTLA-4, HLA-DR, CD45RO te aktivacijski biljeg CD69) na populaciji  $CD4^+CD25^{high}$  stanica (Slika 4).

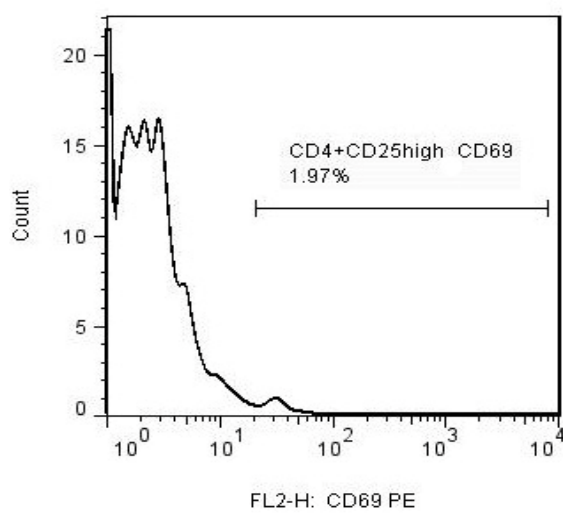


**Slika 3.** Detekcija CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> limfocita pomoću protočnog citometra. Reprezentativni primjer dijagrama protočne citometrije, postavljene su aktivne ograde oko CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> populacije limfocita. Ograde su postavljene uzimajući u obzir izotipske kontrole.

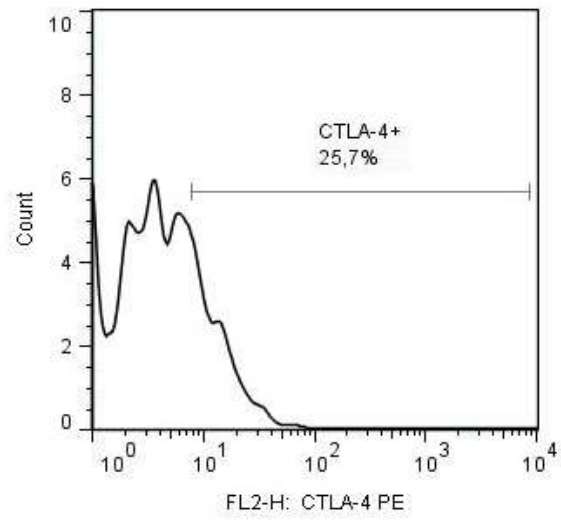
A



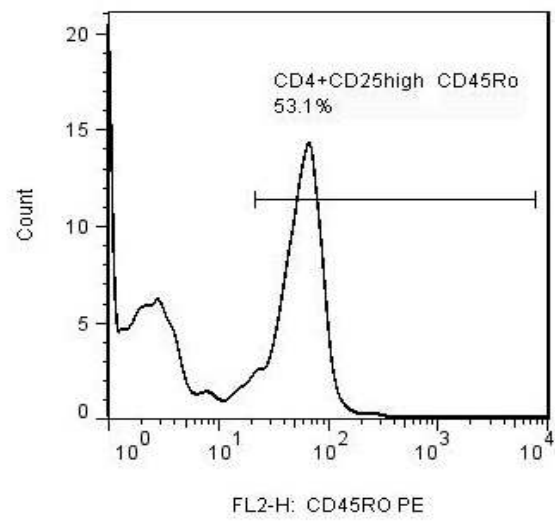
B



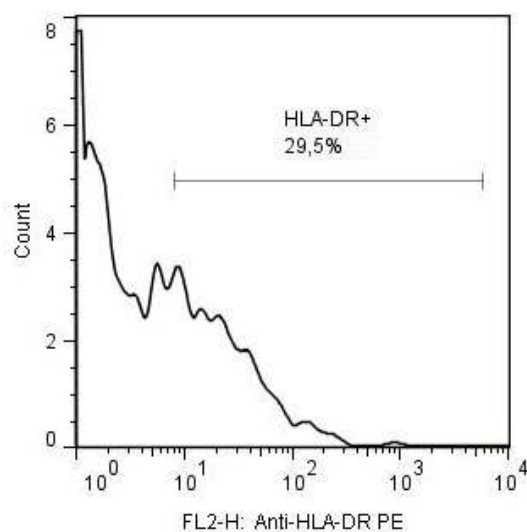
C



D



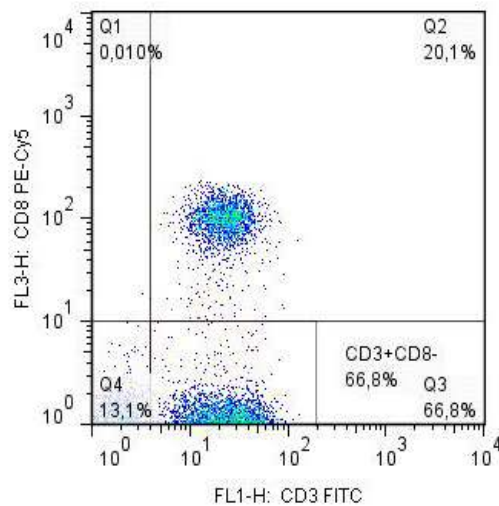
E



**Slika 4.** Reprezentativni histogrami ekspresije markera regulacijskih limfocita na populaciji CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> limfocita.

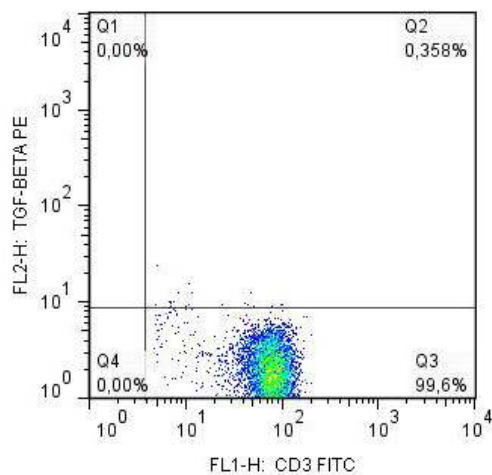
Na slici 4A) prikazana je izotipska kontrola. Slika 4B) je reprezentativni histogram koji pokazuje ekspresiju CD69 molekule koja ukazuje na aktivirane stanice. Na ostalim histogramima su reprezentativni primjerci ekspresije biljega regulacijskih limfocita na populaciji CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> stanica: CTLA-4 (4C), CD45RO (4D) i HLA-DR (4E).

Za unutarstaničnu analizu citokina IL-10 i TGF-beta sakupljali smo 20 000 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> negativnih stanica jer uslijed aktivacije stanica sa PMA i ionomicinom dolazi do internalizacije CD4 molekula tako da se stanice CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> smatraju CD4<sup>+</sup> limfocitima T (Slika 6, 7 i 8).<sup>171</sup> Kao kontrolu koristili smo izotipsku kontrolu te stanice koje nisu bile stimulirane sa PMA i ionomicinom (Slike 7 i 8).

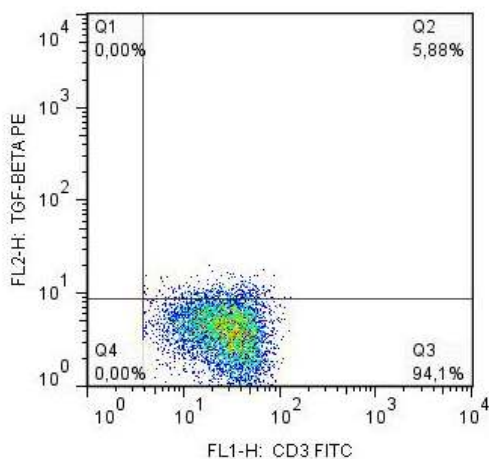


**Slika 6.** Reprezentativni dijagram CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> stanica. Detekcija citokina je rađena na CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> limfocitima (na ovaj način detektiramo CD4 stanice jer biljeg CD4 tijekom aktivacije se internalizira i postaje nepouzdan) koji se nalaze u Q3 polju na slici.

A



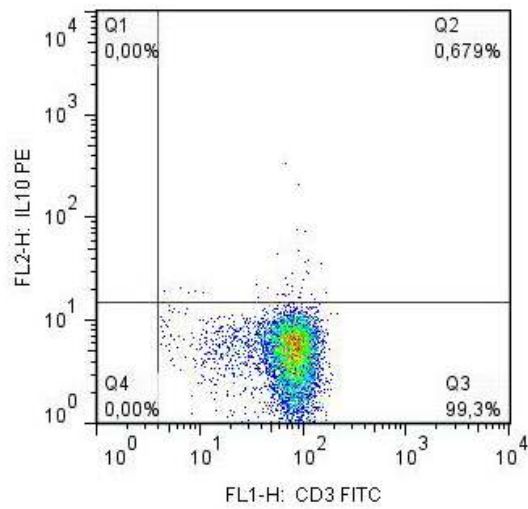
B



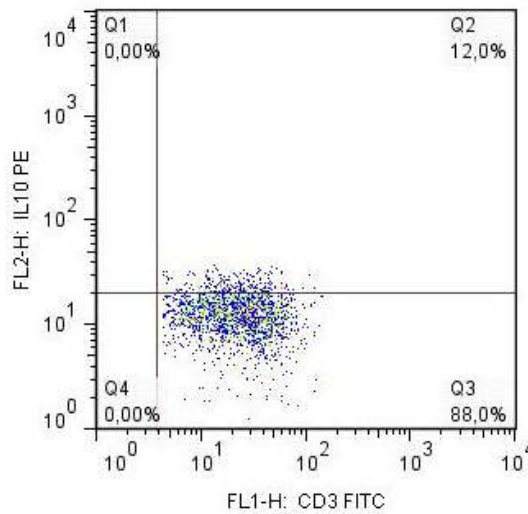
**Slika 7.** Reprezentativni dijagrami detekcije CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>TGF-beta<sup>+</sup> stanica na protočnom citometru. Slika 7A pokazuje detekciju TGF-beta u nestimuliranim CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> limfocitima T, Slika 7B prikazuje TGF-beta u stimuliranim CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> limfocitima. Nestimulirane stanice korištene su kao kontrola.



A



B



**Slika 8.** Reprezentativni dijagrami detekcije CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> IL-10<sup>+</sup> stanica na protočnom citometru.

Slika 8A pokazuje detekciju IL-10 u nestimuliranim CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> limfocitima, Slika 8B pokazuje

detekciju IL-10 u stimuliranim limfocitima. Analiza je rađena na CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> limfocitima.

Nestimulirane stanice korištene su kao kontrola.

#### 4.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka uključivala je primjenu Shapiro Wilk's  $W$  testa za testiranje normalnosti distribucije podataka. S obzirom na nepravilnu distribuciju koristili smo neparametrijske testove Friedman Anova i Wilcoxon test za testiranje značajnosti razlike u vrijednostima zavisnih obilježja ponavljanjem mjerenja u dva navrata nakon početka terapije te MannWhitney  $U$  test za usporedbu nezavisnih obilježja. Kako bismo izbjegli pogrešku višestrukih testiranja, korekciju pojedinih  $p$ -vrijednosti napravili smo Holmovim korekcijskim postupkom računajući korigirani  $p'$ :  $p'=(k-i+1)*p$ , gdje je  $k$  broj ukupnih usporedbi, odnosno broj  $p$  vrijednosti, a  $i$  ulazni rang pojedine originalne  $p$  vrijednosti. Korigirane  $p$ -vrijednosti prikazane su na grafu i značajnima smo smatrali niže od 0,05. Za statističku analizu podataka korišten je računalni program Statistica 6.0 (Statsoft, Tulsa, SAD).

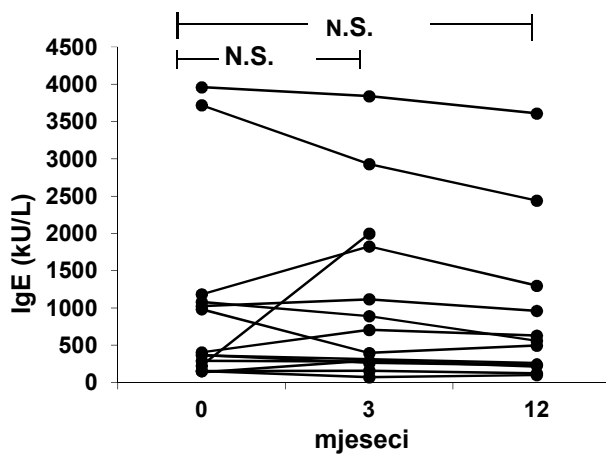
## 5. Rezultati

### 5.1. Promjene regulacijskih limfocita T i imunosupresivnih citokina tijekom specifične imunoterapije na grinju iz kućne prašine

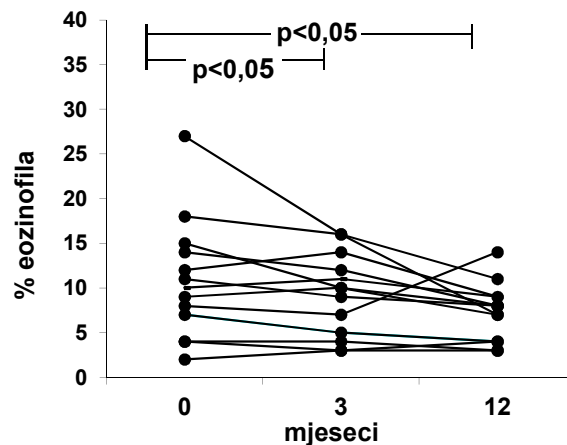
Specifična imunoterapija na grinju iz kućne prašine provedena je u 16 bolesnika. Uzorci krvi uzimani su prije terapije, nakon tri mjeseca te nakon 12 mjeseci. U tom periodu mjereni su klinički parametri funkcije pluća (FEV1, PEFr). Svi bolesnici imali su značajno poboljšanje simptoma (tzv. *symptom score*) koji je prije terapije bio 1,77, a nakon godinu dana 0,54. Kod troje djece *symptom score* bio je lošiji nakon imunoterapije. Od tih troje jedna bolesnica bila je dugoročno izložena pasivnom pušenju, a drugo dvoje bolesnika uz alergijsku reakciju na grinje imalo je alergijsku reakciju i na pelud stabala.

Uspjeh hiposenzibilizacije procijenjen je i s obzirom na promjene kliničkih parametara astme i nalaze u krvi (postotak eozinofila, IgE). Tijekom imunoterapije došlo je do značajnog pada postotka eozinofila u krvi dok nije došlo do značajnijeg pada ukupnih antitijela IgE (Slika 9A i B). Zabilježeno je značajno poboljšanje kliničkih parametara astme (FEV1, PEFr) (Slika 9B i C).

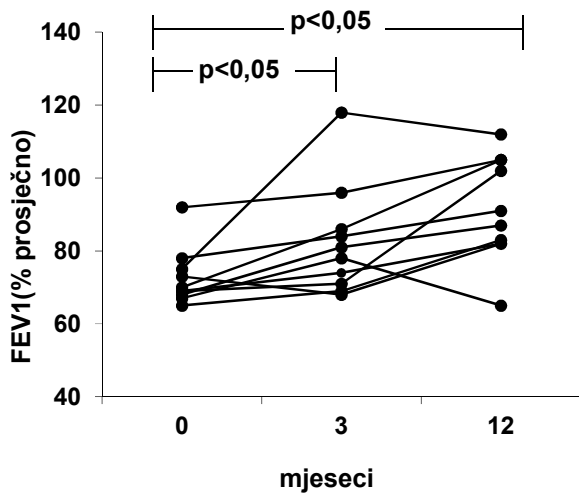
A



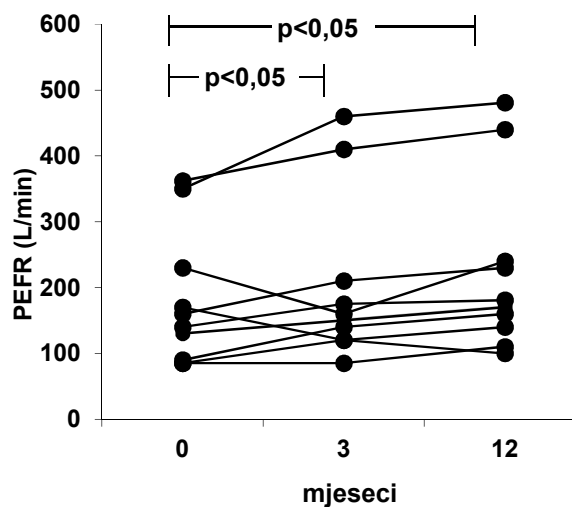
B



C



D



**Slika 9.** Utjecaj specifične imunoterapije na grinje iz kućne prašine na kliničke parametre. Tijekom godinu dana imunoterapije nije došlo do promjene ukupnog IgE (Slika 9A), zabilježen je značajan pad postotka eozinofila (Slika 9B), a parametri plućne funkcije FEV1 (Slika 9C) i PEF (Slika 9D) su se poboljšali. Svaki simbol predstavlja jednog bolesnika. N.S. nije signifikantno.

Tijekom imunoterapije dvoje djece imalo je dodatnu terapiju montelukastom mjesec dana dok je četvero djece dobivalo inhalacije flutikazon propionat zbog pogoršanja simptoma. Pogoršanje simptoma opaženo je samo kod djece koja su imala alergiju i na peludi trava i to tijekom sezone tih alergena.

Nije bilo razlike u postotku  $CD4^+CD25^{high}$  između kontrolne grupe i alergične djece prije početka imunoterapije (Slika 10). Postotak  $CD4^+CD25^{high}$  nije se mijenjao tijekom godinu dana imunoterapije niti je zamijećena promjena u izražaju drugih biljega ( $CD45RO$ ,  $HLA-DR$  i  $CD69$ ) na tim stanicama.

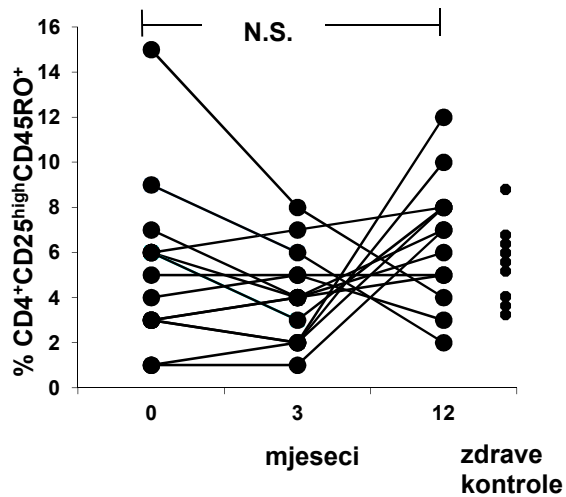
Nakon tri mjeseca imunoterapije došlo je do značajnog rasta postotka  $CTLA4^+CD4^+CD25^{high}$  stanica da bi nakon godinu dana došlo do značajnog pada postotka ovih stanica (Slika 10).

Nije zabilježena razlika u postotku  $IL-10$  i  $TGF-beta$  limfocita T između zdrave i alergične djece (Slika 11).

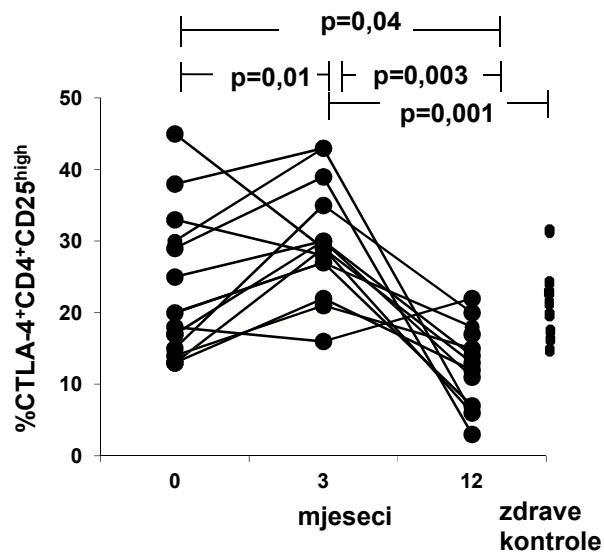
Tijekom imunoterapije došlo je do porasta postotka  $CD3^+TGF-beta^+$  stanica (Slika 11).

Nakon tri mjeseca došlo je do značajnog pada postotka  $CD3^+IL-10^+$  stanica, dok nakon 12 mjeseci više nije bilo razlike u postotku ovih stanica (Slika 11). Zbog ograničenosti broja stanica samo je u sedmoru djece izmjeren postotak  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  stanica u dvije točke (prije i nakon 12 mjeseci imunoterapije) (Slika 12). Nije nađena razlika u postotku tih stanica tijekom godinu dana imunoterapije, ali je postotak tih stanica nakon godinu dana imunoterapije bio značajno manji nego u zdrave djece (Slika 12).

A



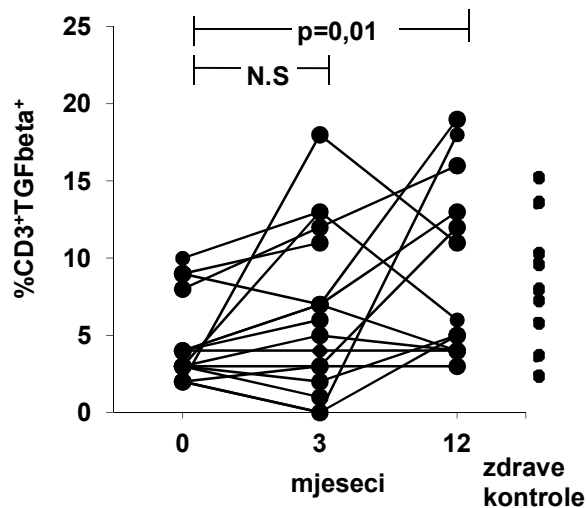
B



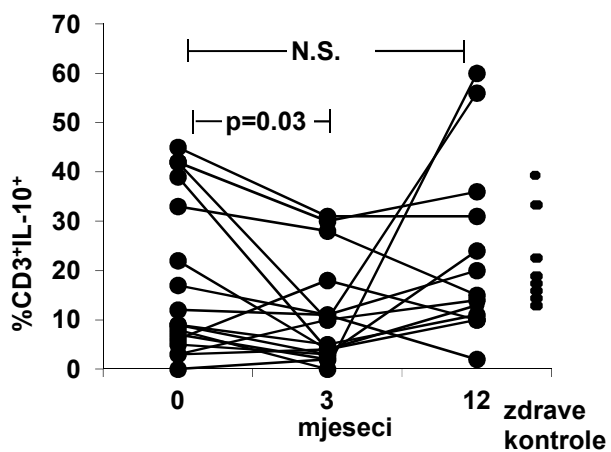
**Slika 10.** Regulacijski limfociti tijekom imunoterapije na grinju iz kućne prašine.

Slika 10A prikazuje postotak CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD45RO<sup>+</sup> stanica tijekom imunoterapije. Slika 10B pokazuje prolazno povećanje CTLA-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> stanica. Svaki simbol predstavlja jednog ispitanika.

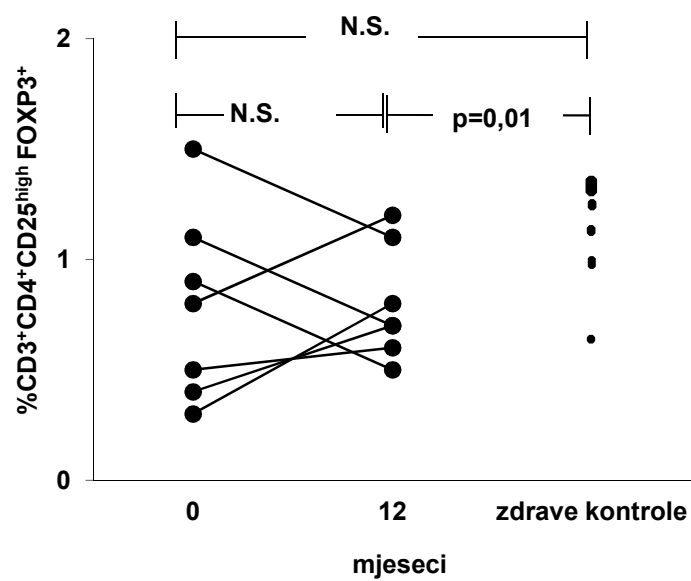
A



B



**Slika 11.** Postotak CD3<sup>+</sup>TGF-β<sup>+</sup> i CD3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> stanica tijekom godinu dana imunoterapije na grinju iz kućne prašine. Nakon 12 mjeseci došlo je do porasta CD3<sup>+</sup>TGF-β<sup>+</sup> stanica (Slika 11A). Nakon tri mjeseca došlo je do prolaznog pada CD3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> stanica (Slika 11B). Svaki simbol predstavlja jednog ispitanika.



**Slika 12.** Promjene postotka  $CD3^+CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  tijekom godine dana imunoterapije na grinje iz kućne prašine. Nije bilo značajne razlike u postotku ovih stanica tijekom godinu dana imunoterapije na grinje iz kućne prašine. Nakon godinu dana imunoterapije uočen je značajno manji postotak ovih stanica u usporedbi sa zdravim kontrolama. Svaki simbol predstavlja jednog ispitanika.

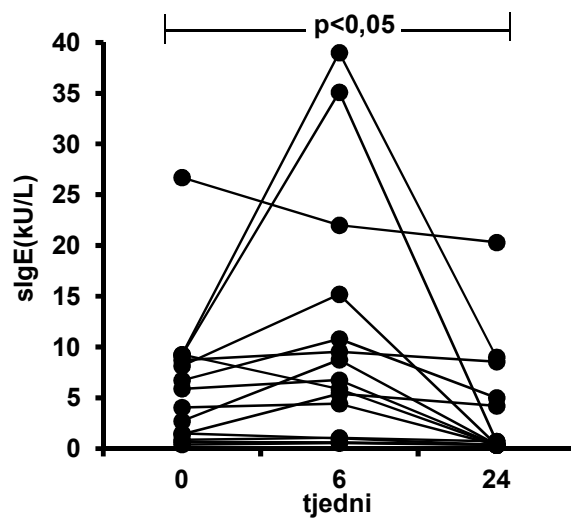


## **5.2. Promjene regulacijskih limfocita T i imunosupresivnih citokina tijekom specifične imunoterapije na otrove opnokrilaca**

*Rush*-specifična imunoterapija na otrove opnokrilaca provedena je u 18 djece alergične na ose i pčele s prethodnom alergijskom reakcijom trećeg i četvrtog stupnja po Muelleru. Istraživanje je rađeno tijekom šest mjeseci imunoterapije. Prije imunoterapije napravljen je kožni test i specifični IgE kako bi se potvrdila alergija na otrov pčela i osa. Nije bilo većih nuspojava tijekom davanja imunoterapije.

Tijekom perioda provođenja imunoterapije šestoro djece bilo je ponovno izloženo ubodu insekta pri čemu je petoro djece imalo jedva primjetnu lokalnu reakciju dok je kod jednog djeteta došlo do slabe lokalne reakcije (I. stupanj po Muelleru).

Specifični i ukupni IgE ponovljen je nakon šest tjedana i šest mjeseci. Nakon šest tjedana *rush*-imunoterapije došlo je do pada razine specifičnog IgE ( $p=0,04$ ) (Slika 13). Dalji pad je zabilježen u nastavku imunoterapije ( $p= 0,01$ ). Nije zabilježena promjena ukupnih antitijela IgE.

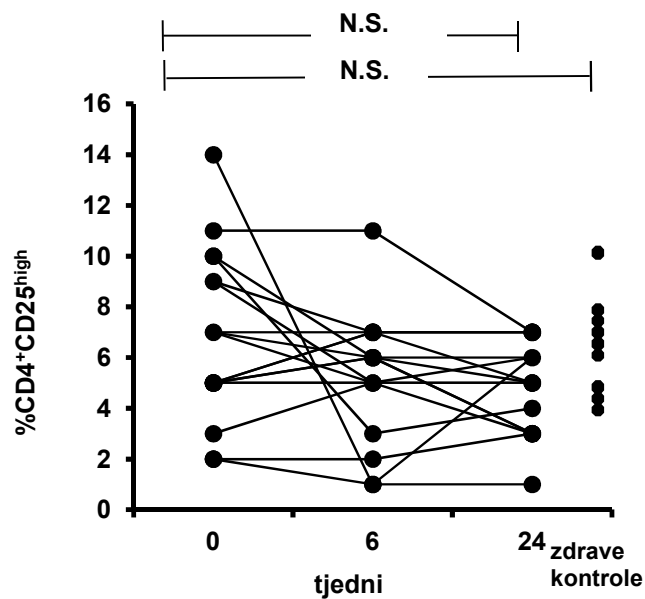


**Slika 13.** Razina specifičnog IgE antitijela (sIgE) tijekom 24 tjedna imunoterapije na otrove opnokrilaca.

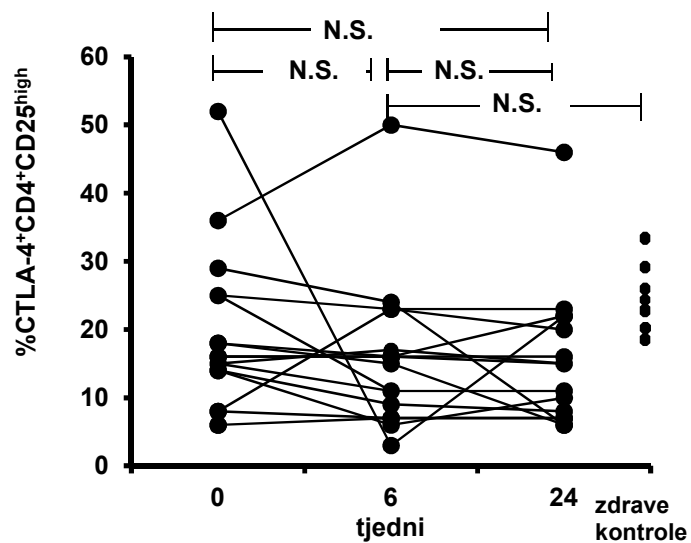
Slika pokazuje značajan pad specifičnog IgE antitijela tijekom 24 tjedna *rush*-imunoterapije na otrove opnokrilaca. Svaki simbol predstavlja jednog bolesnika.

Tijekom šest mjeseci imunoterapije nije zabilježena promjena u postotku  $CD4^+CD25^{high}CD69^-$  stanica (Slika 14A). Nije zabilježena promjena u postotku  $CTLA4^+CD4^+CD25^{high}$  stanica (Slika 14B). Blagi rast  $IL-10^+$  limfocita T zabilježen je nakon šest tjedana, ali bez statističke značajnosti (Slika 15). Nije došlo do promjene postotka  $CD3^+TGF-beta^+$  stanica stanica tijekom šest mjeseci imunoterapije. Nije bilo razlike u postotku  $CD4^+CD25^{high}$  između zdrave i alergične djece (Slika 14). Nije zabilježena statistički značajna razlika u postotku  $CD3^+IL-10^+$  i  $CD3^+TGF-beta^+$  stanica između zdrave i alergične djece (Slika 15). Nakon 24 tjedna imunoterapije u 10 djece je zabilježen porast  $CD3^+IL-10^+$  stanica, ali kao što je prethodno navedeno, nije došlo do statistički značajne razlike.

A

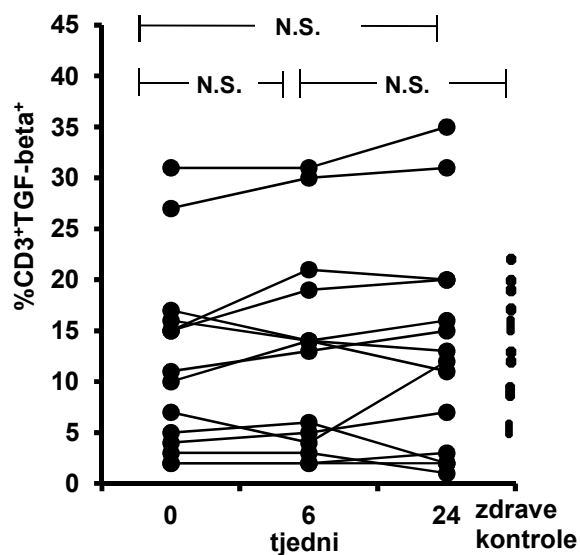


B

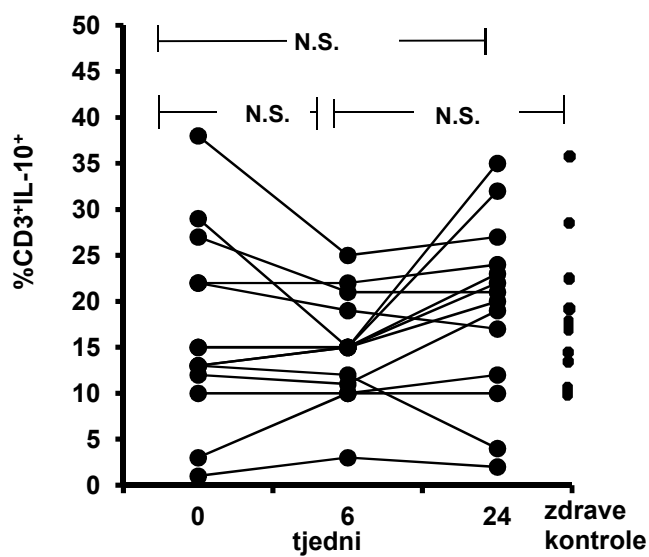


**Slika 14.** Promjene regulacijskih limfocita T tijekom *rush* imunoterapije na otrove opnokrila. Tijekom imunoterapije nije došlo do promjene postotka CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (Slika 14A) i CTLA4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> limfocita (Slika 14B). Nije bilo razlike u postotku ovih stanica između zdrave djece i ispitanika pod imunoterapijom. Svaki simbol predstavlja jednog ispitanika.

A



B



**Slika 15.** Promjene CD3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> i CD3<sup>+</sup>TGF-β<sup>+</sup> tijekom 24 tjedna *rush* imunoterapije na otrove opnokrila. Nisu nađene promjene CD3<sup>+</sup>TGF-β<sup>+</sup> (Slika 15A) i CD3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> stanica (Slika 15B) tijekom imunoterapije. Nije bilo razlike u postotku tih stanica između zdrave djece i ispitanika pod imunoterapijom. Svaki simbol predstavlja jednog ispitanika.

## 6. Rasprava

Alergijske reakcije predstavljaju ozbiljan problem modernog svijeta. Razvojem i industrijalizacijom društva u većini zemalja došlo je do izrazitog porasta alergijskih reakcija. Većinom je riječ o konstantnoj izloženosti određenom alergenu u većoj ili manjoj koncentraciji. S obzirom na porast alergijskih bolesti raste interes za regulacijske limfocite T za koje se smatra da imaju ulogu u regulaciji imunoreakcije. Pretpostavka je da postoji poremećaj funkcije odnosno manjak tih stanica u bolesnika s alergijskim reakcijama. Iz malog broja dosadašnjih istraživanja postoji veliki broj kontradiktornih informacija tako da je prethodna tvrdnja još uvijek nepotvrđena.

Pad postotka eozinofila i specifičnog IgE antitijela konstantan je nalaz kod uspješne imunoterapije što smo pokazali i u našem istraživanju. Već prvog dana nakon davanja alergena bilježi se smanjena degranulacija mastocita i eozinofila.<sup>172</sup> Smatra se da su regulacijski limfociti preko IL-10 odgovorni za promjenu u sekreciji IgE antitijela.<sup>15,16</sup> Tijekom imunoterapije dolazi do prevladavanja Th1-tipa imunoreakcije u odnosu na Th2. Navedene promjene opisane su već prvi dan imunoterapije na otrov opnokrilaca u bolesnika s anamnestički blažom alergijskom reakcijom dok u bolesnika s jakom alergijskom reakcijom ove promjene nastupaju nešto kasnije i nisu tako jako izražene.<sup>173</sup>

U osoba s kroničnom alergijskom reakcijom na grinje iz kućne prašine i astmom uspjelo se u perifernoj krvi izolirati specifične regulacijske limfocite T i pokazati njihova imunosupresivna aktivnost.<sup>174</sup> Usporedbom funkcije regulacijskih stanica u osoba s atopijom te osoba bez atopije nije se našlo razlike u imunosupresivnoj funkciji.<sup>174</sup>

Prema dosadašnjim istraživanjima postoje razlike u postotku regulacijskih limfocita između djece i odraslih.<sup>40,41,175</sup> Istraživanja su rađena na uzorcima krvi i bronhoalveolarnog lavata. Djeca s astmom imaju smanjen broj regulacijskih limfocita T dok odrasli astmatičari imaju povećan broj ovih stanica u krvi.<sup>40,41</sup> Razlike su izražene i s obzirom na težinu bolesti jer djeca s težim stupnjem astme imaju veći broj stanica, a odrasli manji broj stanica.<sup>40,41,175</sup> U bronholaveolarnom lavatu djeca s astmom imaju manje regulacijskih limfocita T od zdrave djece dok je u odraslih astmatičara povećan broj regulacijskih limfocita T u lavatu u usporedbi s kontrolom ili bolesnicima s alergijskim rinitisom i lakšim oblicima astme.<sup>40,41,176</sup> U našem istraživanju nismo našli razliku u postotku CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> stanica u krvi između alergične i zdrave djece, što je u skladu s ranijim istraživanjima u djece s astmom i kroničnim kašljom.<sup>41</sup>

Istraživanja funkcije regulacijskih stanica u djece s astmom nisu pokazala poremećaj imunosupresivne mogućnosti ovih stanica.<sup>41</sup> Djeca koja su postala tolerantna na kravlje mlijeko imaju povećan broj regulacijskih limfocita.<sup>42</sup> Postotak CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> limfocita u te djece sličan je kao u djece koja su pod imunoterapijom zbog alergije na peludi trava što bi ukazivalo da regulacijski limfociti T imaju ulogu u uspostavljanju tolerancije na alergene tijekom imunoterapije.<sup>85</sup>

Za razliku od kroničnih alergijskih reakcija koje su u velikom porastu, alergijska reakcija na otrov opnokrilaca je konstantna prijetnja i predstavlja akutnu izloženost velikoj dozi alergena s mogućnošću anafilaksije i smrtnog ishoda. Prema našim saznanjima do sada nije rađeno istraživanje regulacijskih limfocita T u djece alergične na ubod opnokrilaca tijekom imunoterapije. Kao što je prethodno opisano kod kroničnih alergijskih bolesti postoje velike razlike u postotku regulacijskih limfocita T između djece i odraslih. Za očekivati je slične razlike u djece i odraslih bolesnika s alergijskom reakcijom na otrov opnokrilaca. U našem istraživanju

nismo našli razliku u postotku  $CD4^+CD25^{high}$  stanica između alergične i zdrave djece dok istraživanja na odrasloj populaciji pokazuju smanjen broj ovih stanica u osoba s alergijskom reakcijom na otrove opnokrilaca.<sup>44</sup> Problem u istraživanju regulacijskih limfocita nastaje zbog toga što još uvijek nisu u potpunosti poznati točni biljezi ovih stanica kao ni mehanizam djelovanja pa je usporedba istraživanja otežana.

Kod istraživanja uloge regulacijskih limfocita T u imunoterapiji potrebno je razlikovati inducirane regulacijske limfocite T (Tr1) od tzv. prirodnih regulacijskih limfocita T koje nastaju u timusu i čiji fenotip smo istraživali. Inducirane regulacijske stanice prvenstveno se odlikuju povećanom sekrecijom citokina IL-10. U našem istraživanju bilježili smo promjene fenotipa regulacijskih limfocita T te promjenu citokina IL-10 i TGF-beta u limfocitima T. Na taj način smo mogli uočiti promjene i u postotku induciranih regulacijskih stanica.

Problem istraživanja regulacijskih limfocita je da  $CD4^+CD25^{high}$  limfociti T mogu biti aktivirani limfociti, a ne regulacijski limfociti T. Zato smo u našem istraživanju uveli dodatni biljeg CD69 pomoću kojeg možemo prepoznati aktivirane limfocite. Koristeći taj biljeg nismo zabilježili porast  $CD4^+CD25^{high}$  stanica na dva modela imunoterapije. Tijekom imunoterapije na peludi trava nađen je, u krvi i nosnoj sluznici, uvećan broj regulacijskih stanica.<sup>177</sup> Nedavno istraživanje na djeci s alergijskom reakcijom na grinje iz kućne prašine tijekom godine dana imunoterapije potvrđuje rezultate našeg istraživanja gdje nije došlo do promjene postotka regulacijskih limfocita T.<sup>178</sup> Navedeno istraživanje je uključilo i FOXP3 kao marker regulacijskih limfocita T. FOXP3 se smatra ključnim faktorom za razvoj regulacijskih limfocita T. Zbog ograničenosti količine krvi odnosno malog broja izoliranih stanica od djece nije bilo moguće istražiti promjene tog biljega u sve djece tijekom imunoterapije. U sedmero djece izmjeren je postotak  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  stanica prije i nakon godinu dana imunoterapije na grinje iz kućne



prašine i nije nađena razlika. U usporedbi sa zdravim ispitanicima postotak tih stanica nakon godine dana imunoterapije na grinju iz kućne prašine puno je manji nego u zdravih ispitanika. U istraživanju broja tih stanica u nosnoj sluznici odraslih pacijenata alergičnih na peludi trava nađen je povećan broj tijekom imunoterapije te taj broj korelira sa kliničkim uspjehom terapije.<sup>177</sup> Slično istraživanje na odraslim pacijentima s alergijom na peludi nije pokazalo promjene FOXP3 i postotka  $CD4^+CD25^{high}$  u krvi tijekom imunoterapije i nije bilo razlike u usporedbi s zdravim i alergičnim kontrolama.<sup>183</sup> U nedavnom istraživanju mjerene su razine FOXP3<sup>+</sup> u stanicama krvi odraslih pacijenata alergičnih na grinju iz kućne prašine nakon imunoterapije u usporedbi s zdravim kontrolama i alergičnim ispitanicima bez imunoterapije.<sup>184</sup> Nađene su smanjene razine ove molekule u zdravih ispitanika i u pacijenata nakon imunoterapije u usporedbi s alergičnim bolesnicima bez imunoterapije. Razlike u razini FOXP3 molekule u krvi objašnjene su mjerenjem u ljeto kada je izloženost grinji iz kućne prašine najmanja te prolaznom ekspresijom FOXP3 u različitim stanicama tijekom aktivacije. Za razliku od našeg istraživanja gdje smo mjerili postotak  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  stanica protočnom citometrijom u tom istraživanju mjerena je ekspresija gena FOXP3 u stanicama krvi PCR metodom. Naša kontrolna grupa su bila zdrava djeca tako da nemamo usporedbu s djecom koja imaju alergijsku bolest, a nemaju terapiju. Iz navedenih istraživanja vidi se da jedino u tkivu dolazi do porasta  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  stanica tijekom imunoterapije dok se promjene u krvi ne opažaju ili dolazi do pada postotka tih stanica. Navedene promjene možda se mogu objasniti migriranjem stanica u periferna tkiva gdje sudjeluju u imunoreakciji.

Najveći broj istraživanja orijentiran je na imunosupresivne citokine, osobito IL-10 i stanice koje ga proizvode. Zanimljiv je nalaz kod pčelara koji su zbog posla izloženi velikom broju uboda pčela te nakon nekog vremena imaju minimalnu alergijsku reakciju na ubod ili je uopće

nemaju.<sup>179</sup> Kod njih je nađen slabiji Th1- i Th2-tip imunoreakcije te uvećan broj limfocita T koji luče IL-10 (Tr1 stanice). Isto istraživanje pokazalo je da blokadom IL-10 ili CTLA-4 smanjuje se supresivna sposobnost regulacijskih limfocita T. Ovaj model oponaša specifičnu imunoterapiju pa je zbog toga i zanimljiv za istraživanje. Međutim u tom istraživanju nisu se istraživale promjene u fenotipu stanica tako da se ne može zaključiti o promjenama postotka regulacijskih limfocita T.

Kod alergijskih reakcija na ubod insekata u odraslih ispitanika opažen je porast  $CD4^+CD25^{high}$  nakon šest mjeseci klasične imunoterapije odnosno već prvi dan nakon *rush*-imunoterapije.<sup>44,172</sup> Međutim, nedavno istraživanje pokazalo je pad postotka  $CD4^+CD25^{high}$  stanica nakon mjesec dana imunoterapije.<sup>180</sup> Objašnjenje pada postotka  $CD4^+CD25^{high}$  stanica je odlazak stanica u limfne čvorove gdje vrše supresiju imunoreakcije. Ovo može biti objašnjenje zašto i mi nismo zabilježili porast ovih stanica tijekom imunoterapije. Zanimljivo je da pacijenti s različitim stupnjem alergijske reakcije tijekom imunoterapije imaju drugačije promjene regulacijskih limfocita.<sup>173</sup> Pokazalo se da pacijenti s blažim stupnjem alergijske reakcije tijekom imunoterapije imaju puno izraženije promjene u broju regulacijskih limfocita i IL-10. Kod njih se rast regulacijskih limfocita javlja već prvi dan nakon imunoterapije dok kod pacijenata s težim oblikom reakcije ovaj rast se javlja puno kasnije i u manjoj mjeri.

U odraslih bolesnika s jakom alergijskom reakcijom na ubod opnokrilaca utvrđen je smanjen broj  $CD4^+CD25^{high}$  stanica u usporedbi s kontrolnom skupinom.<sup>44</sup>

Jedan od mogućih mehanizama djelovanja regulacijskih limfocita T na imunoreakciju posredovan je i molekulama na njihovoj površini npr. CTLA-4.<sup>35,36</sup> Tijekom klasične imunoterapije na grinje iz kućne prašine zabilježili smo porast ekspresije CTLA-4 na limfocitima  $CD4^+CD25^{high}$  nakon šest mjeseci te pad nakon godine dana. Dosadašnja istraživanja na ljudima

nisu pokazala promjene u ekspresiji ovog markera dok se u miševa CTLA-4 pokazao neophodan za djelovanje regulacijskih limfocita T, budući da je dodavanjem anti-CTLA-4 antitijela došlo do supresije alergijske reakcije.<sup>36, 182</sup>

Sličan rezultat dobiven je i u pokusu *in vitro* u pčelara gdje je blokadom CTLA-4 smanjeno imunosupresivno djelovanje regulacijskih limfocita T.<sup>178</sup> Tijekom *rush*-imunoterapije na otrove opnokrilaca nije zamijećena promjena u ekspresiji te molekule.

Lučenje imunosupresivnih citokina IL-10 i TGF-beta opisani su kao mogući mehanizam imunosupresije regulacijskih limfocita T. Neki radovi opisuju porast IL-10 tijekom imunoterapije.<sup>18,38,85</sup> Uloga IL-10 nije u potpunosti poznata. Smatra se da IL-10 dovodi do supresije Th1- i Th2-tipa imunoreakcije, odnosno da u određenim uvjetima dovodi do prevladavanja Th1-tipa.<sup>18</sup> Istraživanja su pokazala da tijekom imunoterapije na otrove opnokrilaca dolazi do porasta IL-10 nakon mjesec dana te povratka na osnovne vrijednosti nakon šest mjeseci.<sup>179</sup> U našem istraživanju učinka *rush*-imunoterapije otrovom opnokrilaca nismo zamijetili promjenu u postotku IL-10<sup>+</sup> limfocita. Navedeni nalaz može ukazivati da imunosupresivni učinak regulacijskih limfocita T nije posredovan imunosupresivnim citokinima, ali ipak moramo navesti da je navedeni nalaz u suprotnosti sa većinom ranijih istraživanja gdje se opisuje porast stanica koje luče IL-10. Međutim, važno je napomenuti da u istraživanjima postoje različite metode detekcije IL-10 kao i stimulacije stanica što može dovesti do razlike u rezultatima. Moguće je da se kod djece promjene u sekreciji citokina događaju u drugačijim vremenskim periodima imunoterapije nego kod odraslih pa da u vrijeme kada je mjeren postotak ovih stanica ne dolazi do njihove promjene. Nedavno istraživanje u djece s alergijskim rinitisom i alergijom na grinje iz kućne prašine pokazalo je porast IL-10 i Tr1-stanica godinu dana nakon

imunoterapije.<sup>178</sup> Sličan rezultat dobiven je u djece s alergijskom reakcijom na grinju iz kućne prašine nakon dvije godine imunoterapije.<sup>181</sup>

TGF-beta je opisan kao mogući mehanizam preko kojeg regulacijski limfociti T vrše imunosupresiju, ali vrlo malo radova opisuje promjene ovog citokina tijekom imunoterapije.<sup>35,182,185</sup> Imunosupresijska aktivnost regulacijskih limfocita iz bronhoalveolarnog lavata djece s astmom ovisna je o TGF-beta.<sup>41</sup> U našem istraživanju tijekom klasične imunoterapije na grinju iz kućne prašine došlo je do značajnog porasta TGF-beta<sup>+</sup> stanica nakon godinu dana. Zanimljivo je da u četvoro djece koja su trebala kortikosteroidnu terapiju zbog pogoršanja simptoma nije došlo do porasta TGF-beta<sup>+</sup> stanica. Ranija istraživanja pokazala su da kortikosteroidna terapija tijekom astme dovodi do povećanja broja regulacijskih stanica u bronhoalveolarnom lavatu dok nema utjecaja na postotak tih stanica u krvi.<sup>41</sup> Dugo vremena se raspravlja o točnom mehanizmu kortikosteroida pa je tako opaženo da pod njihovim utjecajem dolazi do porasta IL-10 dok u astmatičara koji su pod kortikosteroidnom terapijom zabilježen je porast TGF-beta i regulacijskih limfocita T.<sup>186</sup> Istraživanje u djeci s astmom i alergijom na grinju iz kućne prašine pokazalo je smanjenu sekreciju TGF-beta nakon dvije godine imunoterapije.<sup>181</sup> Nedostatak navedenog istraživanja je da su kao kontrolna skupina bila djeca s astmom koja nisu pod imunoterapijom, ali su dobivala druge oblike terapije koje ipak mogu promijeniti sekreciju pojedinih citokina. Mehanizam učinka TGF-beta u regulaciji imunološkog sustava nije posve jasan, smatra se da ima ulogu u regulaciji veličine populacije regulacijskih limfocita T. U nekim kroničnim bolestima dišnog sustava poznata je uloga TGF-beta u ožiljnom remodeliranju tako da nije sigurno da li pomaže ili odmaže u rješavanju tih bolesti.

Tijekom šest mjeseci *rush*-imunoterapije na otrove insekata nismo zabilježili promjenu TGF-beta pozitivnih limfocita T.

U našem istraživanju veće promjene citokina i biljega regulacijskih limfocita nađene su u djece s kroničnom alergijskom bolesti. Navedeni rezultat je u skladu sa drugim istraživanjima koja ukazuju da su regulacijski limfociti odgovorni za uspjeh imunoterapije. Kod akutnih alergijskih bolesti imunološke reakcije su intenzivne i brzo se događaju. Prema našim istraživanjima i dostupnoj literaturi dinamika promjena u aktivnosti i funkciji regulacijskih limfocita T tijekom imunoterapije nije jednaka, a ovisi i o vrsti alergena na koji se ista provodi. Navedene razlike su mogući uzrok zašto nismo zabilježili promjene regulacijskih limfocita T tijekom imunoterapije na otrove opnokrilaca. Druga mogućnost je da postoje razlike u imunološkim zbivanjima u odraslih i djece što se moglo vidjeti kod kroničnih alergijskih bolesti. Potrebna su dodatna istraživanja da bi se utvrdio točan mehanizam djelovanja regulacijskih limfocita T tijekom imunoterapije odnosno alergijskih bolesti.

## 7. Zaključak

- Tijekom imunoterapije uzrokovane sezonskim i cjelogodišnjim alergenima u djece ne dolazi do promjene postotka CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulacijskih limfocita T.

- Specifična imunoterapija na grinju iz kućne prašine dovodi do porasta aktivnosti regulacijskih limfocita T što se očituje preko porasta ekspresije molekule CTLA-4 nakon tri mjeseca imunoterapije. CTLA-4 se smatra važnim biljekom regulacijskih limfocita T i vrlo je bitna u imunosupresivnom djelovanju regulacijskih limfocita T.

- Specifična imunoterapija na grinju iz kućne prašine dovodi do porasta sekrecije imunosupresivnog citokina TGF-beta koji se smatra odgovornim za imunosupresivni učinak regulacijskih limfocita T.

- Specifična imunoterapija na grinje iz kućne prašine i otrove opnokrilaca ne dovodi do porasta postotka stanica koje izlučuju IL-10. Ovaj nalaz u suprotnosti je s dosadašnjim istraživanjima koja su pokazivala rast IL-10 tijekom imunoterapije. U našem ispitivanju nije došlo do porasta u sekreciji tog citokina u objema skupinama bolesnika iako je postojao trend rasta IL-10- stanica nakon šest mjeseci imunoterapije na otrove opnokrilaca, dok je u bolesnika s alergijskom reakcijom na grinje iz kućne prašine došlo do prolaznog pada IL-10<sup>+</sup>-stanica.

- Ovo istraživanje pokazuje da su promjene u aktivnosti regulacijskih limfocita T značajnije u djece koja dobivaju imunoterapiju zbog kronične alergijske bolesti.

- Nismo potvrdili ulogu regulacijskih limfocita T tijekom imunoterapije uzrokovane sezonskim alergenom (otrov opnokrilaca).

U zaključku možemo reći da naši rezultati pokazuju važnost regulacijskih limfocita T u uspostavljanju tolerancije na alergene grinje iz kućne prašine tijekom imunoterapije. Tijekom akutnih i kroničnih alergijskih bolesti događaju se složeni imunološki procesi koji još uvijek nisu do kraja razjašnjeni te, s obzirom na dijelom kontradiktorne rezultate u usporedbi s onima iz dostupne literature, potrebna su dodatna ispitivanja funkcije i postotka regulacijskih limfocita T tijekom imunoterapije.

## 8. Sažetak

Cilj je ovoga rada istražiti promjene postotka regulacijskih limfocita T i imunosupresivnih citokina tijekom imunoterapije u djece s alergijskom reakcijom na grinje iz kućne prašine te u djece s alergijom na otrov opnokrilaca.

Hipoteza ovog istraživanja bila je da specifična imunoterapija u djece s alergijskom reakcijom na kućnu prašinu i otrov opnokrilaca povećava broj regulacijskih limfocita T koji dovode do uspostavljanja tolerancije na alergene.

Za potrebe ovog istraživanja razvili smo metodu za unutarstaničnu detekciju imunosupresivnih citokina IL-10 i TGF-beta protočnim citometrom. Regulacijske limfocite T detektirali smo protočnim citometrom četverostrukim obilježavanjem površinskih i unutarstaničnih biljega (CD3, CD4, CD25<sup>high</sup>, CTLA-4, CD45RO, HLA-DR, CD69).

Ispitali smo postotak CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulacijskih limfocita T u 16 djece s alergijskom reakcijom na grinje iz kućne prašine tijekom godinu dana specifične imunoterapije te u 18 djece s alergijskom reakcijom na otrove insekata tijekom šest mjeseci specifične *rush*-imunoterapije.

Tijekom šest mjeseci specifične imunoterapije na otrove insekata te godinu dana imunoterapije na grinje iz kućne prašine nije došlo do promjene postotka regulacijskih limfocita T.

Tijekom godine dana specifične imunoterapije na grinje iz kućne prašine došlo je do porasta imunosupresivnog citokina TGF-beta te promjene aktivnosti regulacijskih limfocita T što se očitovalo porastom ekspresije molekule CTLA-4 nakon tri mjeseca imunoterapije.

Nije zabilježena statistički značajna promjena imunosupresivnih citokina tijekom imunoterapije na otrove insekata iako je zabilježen blagi porast IL-10<sup>+</sup> stanica.



Istraživanje je pokazalo da tijekom imunoterapije u djece ne dolazi do promjene postotka regulacijskih limfocita, ali dolazi do promjene u funkciji ovih stanica i sekreciji imunosupresivnih citokina IL-10 i TGF-beta. Potrebna su dalja istraživanja funkcije regulacijskih limfocita T tijekom imunoterapije.

## 9. Summary

Jakov Ajduk, MD, Regulatory T cells during immunotherapy with chronic and seasonal allergens

The aim of this study was to investigate changes in percentage of regulatory T cells and cells secreting immunosuppressive cytokines IL-10 and TGF-beta during immunotherapy in children allergic to house dust mite and venom.

Hypothesis of this research is that specific immunotherapy increases percentage of regulatory T cells which are responsible for the immunosuppression during immunotherapy. We developed a method for the intracellular detection of immunosuppressive cytokines IL-10 and TGF-beta by a flow cytometer. The percentage of regulatory T cells was measured by a flow cytometer using the most commonly used markers of these cells (CD3, CD4, CD25<sup>high</sup>, CTLA-4, HLA-DR, CD45RO, CD69).

We found no change in percentage of regulatory T cells during immunotherapy. An increased percentage of CTLA4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells was noticed during immunotherapy of children allergic to house dust mite. TGF-beta increase was found during immunotherapy of children allergic to house dust mite. We found no change in cytokine secretion during venom immunotherapy although a small increase in IL-10 secreting T cells was noticed.

This study has shown that there is no change in percentage of regulatory T cells during immunotherapy. We found a difference in function of these cells as well as in percentage of TGF- beta secreting T cells during house dust mite immunotherapy. Further research is required to explain a role of regulatory T cells during immunotherapy.

## 10. Popis literature

1. Bousquet J, Hejjaoui A, Michel FB. Specific immunotherapy in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:292-305.
2. Francis JN, Larche M. Peptide-based vaccination: where do we stand? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:537-43.
3. Larché M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006;6:761-71.
4. Curtis HH. The immunizing cure for hay fever. *NY Med J* 1900;77:16-9.
5. Moingeon P, Batard T, Fadel R i sur. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy* 2006;61:151-65.
6. Hejjaoui A, Dhivert H, Michel FB, Bousquet J. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. IV. Systemic reactions according to the immunotherapy schedule. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:473-9.
7. Schmidt-Weber CB, Blaser K. New insights into the mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:525-30.
8. Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:1025-34.
9. Van Ree R, Van Leeuwen WA, Dieges PH i sur. Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p1, 2, 3 and 5) during immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1997;27:68-74.

10. Lambrecht BN, Pauwels RA, Fazekas De St Groth B. Induction of rapid T cell activation, division, and recirculation by intratracheal injection of dendritic cells in a TCR transgenic model. *J Immunol* 2000;164:2937-46.
11. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G i sur. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000;192:1213-22.
12. Ebner C, Siemann U, Bohle B i sur. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy* 1997;27:1007-15.
13. Devey ME, Wilson DV, Wheeler AW. The IgG subclasses of antibodies to grass pollen allergens produced in hay fever patients during hyposensitization. *Clin Allergy* 1976;6:227-36.
14. Nouri-Aria KT, Wachholz PA, Francis JN i sur. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol* 2004;172:3252-9.
15. Bellinghausen I, Metz G, Enk AH i sur. Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a TH2-to-TH1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol* 1997;27:1131-9.
16. Nasser, SM, Ying, S, Meng Q i sur. Interleukin-10 levels increase in cutaneous biopsies of patients undergoing wasp venom immunotherapy. *Eur J Immunol* 2001;31:3704-13.

17. Tarzi M, Klunker S, Texier C i sur. Induction of interleukin-10 and suppressor of cytokine signalling-3 gene expression following peptide immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2006;36:465–74.
18. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998;102:98-106.
19. Wilson DR, Irani AM, Walker SM i sur. Grass pollen immunotherapy inhibits seasonal increases in basophils and eosinophils in the nasal epithelium. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1705–13.
20. McHugh RS, Shevach EM. The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:693-702.
21. Jutel M, Akdis M, Blaser K, Akdis CA. Are regulatory T cells the target of venom immunotherapy? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:365-9.
22. Ahern DJ, Robinson DS. Regulatory T cells as a target for induction of immune tolerance in allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:531-6.
23. Weiner HL. Oral tolerance for the treatment of autoimmune diseases. *Annu Rev Med* 1997;48:341–51.
24. Strober S, Cheng L, Zeng D i sur. Double negative (CD4-CD8– alpha beta) T cells which promote tolerance induction and regulate autoimmunity. *Immunol Rev* 1996;149:217–30.
25. Seo N, Tokura Y, Takigawa M i sur. Depletion of IL-10- and TGF-beta producing regulatory gamma delta T cells by administering a daunomycin conjugated specific monoclonal antibody in early tumor lesions augments the activity of CTLs and NK cells. *J Immunol* 1999;163:242–9.

26. Shi HZ, Qin XJ. CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in allergy and asthma. *Allergy* 2005;60:986-95.
27. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S i sur. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+) CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001;193:1303-10.
28. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167:1245-53.
29. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M i sur. Identification and functional characterization of human CD4(+) CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001;193:1285-94.
30. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001;182:207-14.
31. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C i sur. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 2001;182:68-79.
32. Wilson SB, Delovitch TL. Janus-like role of regulatory i NKT cells in autoimmune disease and tumour immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3:211-22.
33. Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E i sur. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest* 2006;116:1713-22.
34. Lloyd CM, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in asthma. *Immunity* 2009;31:438-49.
35. Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ i sur. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 2004;34:2996-3005.

36. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000;192:295-302.
37. Jutel M, Akdis M, Budak F i sur. 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;33:1205-14.
38. Gardner LM, Thien FC, Douglass JA i sur. Induction of T 'regulatory' cells by standardized house dust mite immunotherapy: an increase in CD4+ CD25+ interleukin-10+ T cells expressing peripheral tissue trafficking markers. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1209-19.
39. Shi HZ, Li S, Xie ZF i sur. Regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes in peripheral blood from patients with atopic asthma. *Clin Immunol* 2004;113:172-8.
40. Lee JH, Yu H, Wang LC. The levels of CD4+CD25+ regulatory T cells in paediatric patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Clin Exp Immunol* 2007;148:53-63.
41. Hartl D, Koller B, Mehlhorn AT i sur. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1258-66.
42. Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med* 2004;199:1679-88.
43. Shreffler WG, Wanich N, Moloney M i sur. Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:43-52.

44. Pereira-Santos MC, Baptista AP, Melo A i sur. Expansion of circulating Foxp3+CD25bright CD4+ T cells during specific venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2008;38:291-7.
45. Wu L, Liu YJ. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* 2007;26:741–50.
46. Feili-Hariri M, Falkner DH, Morel PA. Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy. *J Leukoc Biol* 2005;78:656–64.
47. Gordon JR, Li F, Nayyar A i sur. CD8 alpha+, but not CD8 alpha–, dendritic cells tolerize Th2 responses via contact-dependent and -independent mechanisms, and reverse airway hyperresponsiveness, Th2, and eosinophil responses in a mouse model of asthma. *J Immunol* 2005;175:1516–22.
48. Murphy K, Trevers P, Walport M. Janeway’s Immunobiology, Seventh Edition, New York: Garland Science; 2008.
49. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:735–46.
50. Jutel M, Akdis CA. T-cell Subset Regulation in Atopy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011 11:139–45.
51. Von Pirquet C. Allergie. *Munch Med Wochenschr* 1906;53:1457.
52. Floistrup H. Allergy disease and sensitization in Steiner school children. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:59-66.
53. Prausnitz C, Kustner J. Studien uber die Uberempfindlichkeit. *Zentralbl Bakteriol* 1921;86:160-9.



54. Conner ER, Saini SS. The immunoglobulin E receptor: expression and regulation. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005;5:191-6.
55. Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook M. Psysiochemical properties of human reaginic antibodies. IV. Presence of unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activitiy. *J immunol* 1966;97:75-85.
56. Cookson W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nat Rev Immunol* 2004;4:978-88.
57. Shapiro SD, Owen CA. ADAM-33 surfaces asa an asthma gene. *N Engl J Med* 2002;347:936-8.
58. Strachan DP. Hay fever, hygiene and house hold size. *BMJ* 1989;299:1259-60.
59. Luczynska CM. Identification and quantification of mite allergens. *Allergy* 1998;53:4854-7.
60. Colloff MJ. Taxonomy and identification of dust mites. *Allergy* 1998;53:7-12.
61. Aalberse R. Allergens from mites: implications of crossreactivity between invertebrate allergens. *Allergy* 1998;53:47-8.
62. Hewitt CRA, Foster S, Phillips C i sur. Mite allergens: significance of enzymatic activity. *Allergy* 1998;53:60-63.
63. Custovic A, Chapman M. Risk levels for mite allergens. Are they meaningful? *Allergy* 1998;53:71-6.
64. Dreborg S. Mite allergens. Collection, determination, expression of results, and risk levels for sensitization and symptom induction. *Allergy* 1998;53:88-91.
65. Van der Heide S, Dubois AEJ, Kauffman HF, de Monchy JGR. Allergy to mites: relation to lung function and airway hyperresponsiveness. *Allergy* 1998;53:104-7.

66. Lovik M, Gaarder PI, Mehl R. The house-dust mite: its biology and role in allergy. A synopsis. *Allergy* 1998;53:121–135.
67. Owen MD, Pfaff LA, Reisman RE, Wypych J. Phospholipase A2 in venom extracts from honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *Toxicon* 1990;28:813–20.
68. Habermann E. Bee and wasp venoms. *Science* 1972;177:314–22.
69. Muller U. Recombinant venom allergens. *Allergy* 2002;57:570–76.
70. Hoffman DR, Jacobson RS. Allergens in Hymenoptera venom: XXVII. Bumblebee venom allergy and allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:812–21.
71. King TP, Lu G, Gonzales M, Qian N, Soldatova L. Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase. Sequence similarity and antigenic cross-reactivity with hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:588–600.
72. Thurnheeu R, Muller U, Stoller R, Lanner A, Hoignf. R. Venom immunotherapy in Hymenoptera sting allergy. *Allergy* 1983;38:465-75.
73. Wetterwala D, Skvarif L, Muller U, Blaser K. Isotypic and idiotypic characterization of anti-bee venom phospholipase A2 antibodies. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985;77:195-7.
74. Muller UR. Insect sting allergy. Stuttgart, Germany: Gustav Fischer, 1990.
75. Ring J, Messmer K. Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet* 1977;1:466–9.
76. Charpin D, Birnbaum J, Lanteaume A, Vervolet D. Prevalence of allergy to Hymenoptera sting in different samples of the general population. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:331–4.

77. Novembre E, Cianferoni A, Bernardini RA, Ingargiola A, Lombardi E, Vierucci A. Epidemiology of insect venom sensitivity in children and its correlation to clinical and atopic features. *Clin Exp Allergy* 1998;28:834–8.
78. Incorvaia C, Mauro M, Pastorello EA. Hymenoptera stings in conscripts. *Allergy* 1997;52:680–1.
79. Dreborg S, Frew A. Position paper: Allergen standardisation and skin tests. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1993;48:49–54.
80. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:558–62.
81. Jutel M, Akdis M, Blaser K, Akdis CA. Mechanisms of allergen specific immunotherapy T-cell tolerance and more. *Allergy* 2006;61:796–807.
82. Broide DH. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:65–71.
83. Akdis M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. *Curr Opin Immunol* 2006;18:738–44.
84. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133:775–87.
85. Francis JN, Till SJ, Durham SR. Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:1255–61.
86. Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Muller UR. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen stimulated T cell cultures. *J Immunol* 1995;154:4187–94.

87. Pilette C, Nouri-Aria KT, Jacobson MR i sur. Grass pollen immunotherapy induces an allergen-specific IgA2 antibody response associated with mucosal TGF-beta expression. *J Immunol* 2007;178:4658–66.
88. Freeman J. Vaccination against hay fever: report of results during the first three years. *Lancet* 1914;1:1178.
89. Lerch E, Müller UR. Long-term protection after stopping venom immunotherapy: Results of re-stings in 200 patients. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:606-12.
90. Graft DF, Golden DBK, Reisman RE, Valentine MD, Yunginger JW. Position statement: the discontinuation of Hymenoptera venom immunotherapy. Report from the Committee on Insects. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:573-5.
91. Mascarell L, Lombardi V, Louise A i sur. Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122; 603–9.
92. Allam JP, Wurtzen PA, Reinartz M i sur. Phl p 5 resorption in human oral mucosa leads to dose-dependent and time dependent allergen binding by oral mucosal Langerhans cells, attenuates their maturation, and enhances their migratory and TGF-β1 and IL-10-producing properties, *J Allergy Clin Immun* 2010;126:638–645.
93. Muller U, Hlebling AG, Bischof M. Predictive value of venom-specific IgE, IgG and IgG subclass antibodies in patients on immunotherapy with honeybee venom. *Allergy* 1989;44:412-18.
94. Niggemann B, Jacobsen L, Dreborg S i sur. Five-year follow-up on the PAT study: specific immunotherapy and long-term prevention of asthma in children. *Allergy* 2006;61:855-9.

95. Marogna M, Spadolini I, Massolo A i sur. Effects of sublingual immunotherapy for multiple or single allergens in polysensitized patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;98:274-80.
96. Penagos M, Passalacqua G, Compalati E, Baena-Cagnani CE, Orozco S, Pedroza A, Canonica GW. Metaanalysis of the efficacy of sublingual immunotherapy in the treatment of allergic asthma in pediatric patients, 3 to 18 years of age. *Chest* 2008;133:599-609.
97. Novembre E, Galli E, Landi F i sur. Coseasonal sublingual immunotherapy reduces the development of asthma in children with allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:851-7.
98. Winther L, Arned J, Malling HJ, Nolte H, Mosbech H. Side-effects of allergen-specific immunotherapy: a prospective multi-centre study. *Clin Exp Allergy* 2006;36:254-60.
99. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970;18:723-37.
100. Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 1969;166:753-5.
101. Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J Exp Med* 1982;156:1577-86.
102. Penhale WJ, Irvine WJ, Inglis JR, Farmer A. Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells. *Clin Exp Immunol* 1976;25:6-16.

103. Kilsha P, Brent L, Pinto M. Suppressor T cells in mice made unresponsive to skin allograft. *Nature* 1975;255:489-91.
104. O'Garra A, Murphy K. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr Opin Immunol* 1994; 6:458–66.
105. Chen Y, Kuchroo V K, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalitis. *Science* 1994;265:1237–40.
106. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737–42.
107. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of selftolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151–64.
108. 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;184:387–96.
109. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M *et al*. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;10:1969–80.
110. Thornton AM, Shevach EM. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188:287–96.

111. Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000;192:295-302.
112. Takahashi T, Yamazaki T, Uede J, Shimizu N, Sakaguchi TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD4+CD25+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000;192:303-10.
113. Chen W, Jin W, Wahl SM. Engagement of cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) production by murine CD4+ T cells. *J Exp Med* 1998;188:1849-57.
114. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor  $\beta$ . *J Exp Med* 2001;194:629-44.
115. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA i sur. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002;16:311–23.
116. Huang CT, Workman CJ, Flies D i sur. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004;21:503–13.
117. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J i sur. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006;203:1693–700.
118. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z i sur. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4 +T reg cells. *J Exp Med* 2006;203:1701–11.

119. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167:1245-53.
120. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA i sur. Disruption of a new forkhead/ winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001;27:68–73.
121. Chatila, TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, Bowcock AM. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 2000;106:75–81.
122. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J i sur. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 2001;27:18–20.
123. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F i sur. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20–21.
124. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057–61.
125. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330–6.
126. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003;4:337–42.
127. Marson A, Kretschmer K, Frampton GM i sur. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 2007;445:931–5.



128. Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 2007;445:936–40.
129. Chen TC, Cobbold SP, Fairchild PJ, Waldmann H. Generation of anergic and regulatory T cells following prolonged exposure to a harmless antigen. *J Immunol* 2004;172:5900–7.
130. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK i sur. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 2007;19:345–54.
131. Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM i sur. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 2005;66:13–20.
132. Wang J, Ioan-Facsinay A, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2007;37:129–38.
133. Gavin MA. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:6659–64.
134. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* 2007;110:2983–90.
135. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. *J Immunol* 2002;169:6210–7.
136. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003;299:1033–6.

137. Suttmuller RP, den Brok MH, Kramer M i sur. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* 2006;116:485–94.
138. Takahashi T. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;10:1969–80.
139. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188:287–96.
140. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005;5:271–83.
141. Annacker O, Asseman C, Read S, Powrie F. Interleukin-10 in the regulation of T cell-induced colitis. *J Autoimmun* 2003;20:277–9.
142. Joetham A. Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol* 2007;178:1433–42.
143. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683–765.
144. Calado DP, Paixao T, Holmberg D, Haury M. Stochastic monoallelic expression of IL-10 in T cells. *J Immunol* 2006;177:5358–64.
145. Kamanaka M, Kim ST, Wan YY i sur. Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity* 2006;25:941–52.

146. Maynard CL, Harrington LE, Janowski KM, Oliver JR, Zindl CL, Rudensky AY, Weaver CT. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3<sup>+</sup> and Foxp3<sup>-</sup> precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol* 2007;8:931–41.
147. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 2008;28:477–87.
148. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 2008;226:205–18.
149. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M *in vivo*. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 1998;66:5224–31.
150. Kang SS, Bloom SM, Norian LA, Geske MJ, Flavell RA, Stappenbeck TS, Allen PM. An antibiotic responsive mouse model of fulminant ulcerative colitis. *PLoS Med* 2008;5:e41.
151. Li MO, Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity* 2008;28:468–76.
152. Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 2008;134:392–404.
153. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006;24:99–146.
154. Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 2006;25:455–71.

155. Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* 2006;25:441–54.
156. Shull MM, Ormsby I, Kier AB i sur. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359:693–9.
157. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485-517.
158. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB i sur. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006;441:231–4.
159. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008;453:1051–57.
160. Hellings PW, Kasran A, Liu Z i sur. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28:42–50.
161. Sergejeva S, Ivanov S, Lotvall J, Linden A. Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33: 248–53.
162. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H i sur. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGFbeta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* 2008;9:1347–55.
163. Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, Shevach EM. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2007;178:4022–6.

164. Zheng SG, Wang J, Wang P, Gray JD, Horwitz DA. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells to CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol* 2007;178:2018–27.
165. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N *et al*. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3<sup>+</sup> T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007;204:1775–85.
166. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F. A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007;204:1757–64.
167. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti- and pro-inflammatory roles of TGF- $\beta$ , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:447–53.
168. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008;134:215–30.
169. Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 2007;13:5262–70.
170. Trescec A, Kolevska T, Cvoriscec B *et al*. Characterization and partial purification of the Croatian national standard Dermatophagoides pteronyssinus allergen extract. *Allergy* 1993;48:454-9.
171. DiSanto JP, Klein JS, Flomenberg N. Phosphorylation and down-regulation of CD4 and CD8 in human CTLs and mouse L cells. *Immunogenetics* 1989;30:494-501.
172. Fujita H, Soyka MB, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clin Transl Allergy* 2012;2:2-8.

173. Mamessier E, Birnbaum J, Dupuy P, Vervloet D, Magnan A. Ultra-rush venom immunotherapy induces differential T cell activation and regulatory patterns according to the severity of allergy. *Clin Exp Allergy* 2006;36:704-13.
174. Smyth LJ, Eustace A, Kolsum U, Blaikely J, Singh D. Increased airway T regulatory cells in asthmatic subjects. *Chest* 2010;138:905-12.
175. Maggi L, Santarlaschi V, Liotta F i sur. Demonstration of circulating allergen-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-regulatory cells in both nonatopic and atopic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:429-36.
176. Abdulmir AS, Kadhim HS, Hafidh RR i sur. Severity of asthma: the role of CD25<sup>+</sup>, CD30<sup>+</sup>, NF-kappaB, and apoptotic markers. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2009;19:218-24.
177. Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR, Nouri-Aria KT. Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1467-72.
178. Lou W, Wang C, Wang Y, Han D, Zhang L. Responses of CD4<sup>(+)</sup> CD25<sup>(+)</sup> Foxp3<sup>(+)</sup> and IL-10-secreting type I T regulatory cells to cluster-specific immunotherapy for allergic rhinitis in children. *Pediatr Allergy Immunol* 2012;23:140-9.
179. Meiler F, Zumkehr J, Klunker S, Rückert B, Akdis CA, Akdis M. In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J Exp Med* 2008;205:2887-98.
180. Kerstan A, Albert C, Klein D. Wasp venom immunotherapy induces activation and homing of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> forkhead box protein 3–positive regulatory T cells controlling T<sub>H</sub>1 responses. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:495-501.

181. Wei W, Liu Y, Wang Y i sur. Induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> T cells in HDM-allergic asthmatic children with or without SIT. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;153:19-26.
182. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P i sur. CTLA-4 control over FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Science* 2008;322:271–5.
183. Grindebacke H, Larsson P, Wing K, Rak S, Rudin A. Specific immunotherapy to birch allergen does not enhance suppression of Th2 cells by CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> regulatory T cells during pollen season. *J Clin Immunol* 2009;29:752-60.
184. Pevec B, Radulovic Pevec M, Stipic Markovic A i sur. House dust mite-specific immunotherapy alters the basal expression of T regulatory and FcεRI pathway genes. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;159:287-96.
185. Ling EM, Smith T, Nguyen XD i sur. 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;363:608–15.
186. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P i sur. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1425-33.

## 11. Životopis

Jakov Ajduk, dr. med., specijalist otorinolaringologije i kirurgije glave i vrata, rođen je 9. listopada 1976. godine u Imotskom. Studirao je na Medicinskom fakultetu u Zagrebu od 1994. do 2000. godine.

Od 2001. do 2003. godine bio je znanstveni novak pri Imunološkom zavodu, Odjel za celularnu imunologiju, na znanstvenom projektu „Mehanizmi imunoregulacija te imunomodulacija“ (voditelj prof. Dekaris).

Godine 2001. upisao je poslijediplomski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilište u Zagrebu, polje Biologija, smjer Fiziologija-Imunobiologija. Godine 2002. prešao je na doktorski poslijediplomski studij iz područja biomedicine pri Medicinskom fakultetu.

Godine 2003. započeo je specijalizaciju iz otorinolaringologije i kirurgije glave i vrata u Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata, KBC “Sestre milosrdnice”, Zagreb. Specijalistički ispit položio je 2008. godine.

Subspecijalizaciju iz audiologije započeo je 2009., a subspecijalistički ispit položio je 2011. godine.

Aktivno je sudjelovao u brojnim domaćim i inozemnim kongresnim skupovima iz područja imunologije, alergologije, otokirurgije i audiologije. Član je Hrvatskog liječničkog zbora, EAACI-ja (European Academy of Allergy and Clinical Immunology), ERS-a (European Rhinologic Society). Autor je i koautor devet znanstvenih radova, od kojih je osam objavljeno u časopisima indeksiranim u Current Contents. Oženjen je i otac dvoje djece.