Specifična imunoterapija

Bucić, Lovro

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:317206

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Lovro Bucić

Specifična imunoterapija

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Lovro Bucić

Specifična imunoterapija

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Odjelu za kliničku imunologiju, pulmologiju I reumatologiju Kliničke bolnice ‘Sveti Duh’ u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Asje Stipić Marković i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2014./2015.

POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA KORIŠTENIH U RADU

ADCC - antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

ASIT – allergen specific immunotherapy

aT_{reg} – activated regulatory T cell

BCR – B cell receptor

CD – cluster of differentiation

CDR - complementarity determining region

c-kit - receptor tyrosine kinaseprotein

CTLA-4 - cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

Fab - fragment antigen-binding

Fc - fragment crystallizable region

FcεRI – high affinity immunoglobulin E receptor

FoxP3 – forkhead box protein 3

GITR - glucocorticoid-induced TNFR family related gene

G-CSF - granulocyte colony-stimulating factor

GM- CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HLA – human leukocyte antigen

ICOS - Inducible T-cell costimulator

IFN-α – interferon α

IFN-γ – interferon γ

Ig- immunoglobulin

IL- interleukin

LTB4 – leukotriene B4

LTC4 - leukotriene C4

M-CSF – macrophage colony-stimulating factor

NK - natural killer T-lymphocytes

PAF – platelet activating factor

PD-1 – programmed cell death 1

PGD2 – prostaglandin D2

SCF – stem cell factor

TAPA-1 - Target of the antiproliferative antibody 1

TCR - t cell receptor

TGF-β – transforming growth factor β

Th – T helper cell

TNF-α - tumor necrosis factor α

TNF-β – tumor necrosis factor β

T_{reg} - regulatory T cell

Tr1 – type 1 regulatory T cells

VCAM-1 - vascular cell adhesion molecule 1

VLA-4 – very late antigen 4

SADRŽAJ

1. SAŽETAK
2. SUMMARY
3. UVOD……...1
3.1. ANTIGEN……...…1
3.2. HLA- FAKTOR TKIVNE PODUDARNOSTI …….2
3.3. OBRADA I PREDOČAVANJEANTIGENA ……..……...…2
3.4. ANTIGEN PREDOČNE STANICE……..2
3.5. LIMFOCITI T……4
3.6. LIMFOCITI B……5
3.6.1 ULOGA Th STANICA……..6
3.7. ANTITJELA……...7
3.8. CITOKINI……..9
4. OBLICI IMUNOLOŠKE PREOSJETLJIVOSTI…….…….13
4.1. MEHANIZAM PREOSJETLJIVOSTI TIPA I……13
4.1.1. ALERGENI……...14
4.1.2. IMUNOGLOBULIN E……..14
4.1.3. RECEPTORI ZA IMUNOGLOBULIN E…….15
4.1.4. MASTOCITI I BAZOFILI……15
4.1.5. EOZINOFILI……16
5. SPECIFIČNA IMUNOTERAPIJA……17
5.1. REGULACIJSKI LIMFOCITI T…….18
5.1.1. PRIRODNI REGULACIJSKI LIMFOCITI T……..18
5.1.2. POTAKNUTI ILI PRILAGODLJIVI REGULACIJSKI LIMFOCITIT……...19
5.2. TRANSKRIPCIJSKI ČIMBENIK FOXP3…….19
5.3. MEHANIZMI DJELOVANJA SPECIFIČNE IMUNOTERAPIJE……20
5.4. KLINIČKI ASPEKTI SPECIFIČNE IMUNOTERAPIJE……..22
5.5. ZAKLJUČAK……24
6. ZAHVALE……...25
7. LITERATURA ……...26
8. ŽIVOTOPIS……30

1. SAŽETAK

Specifična imunoterapija

Lovro Bucić

Alergen specifična imunoterapija uspješno se primjenjuje u pacijenata s alergijskim bolestima više od sto godina. Iako efikasan oblik liječenja, uz ovaj tip terapije povezan je i rizik od neželjenih reakcija posredovanih IgE antitjelima, uključujući sistemsku anafilaksiju. Postupak se temelji na činjenici da će organizam koji je redovito izložen antigenu razviti toleranciju na taj alergen. Uspješnost specifične imunoterapije počiva na modulaciji antigen specifičnih reakcija organizma. Pod modulacijom podrazumijevamo relativno smanjenje imunološkog odgovora posredovanog limfocitima Th2 te povećanje parametara pripisivih reakcijama limfocita Th1. Regulacijski limfociti (T_{reg}) prepoznati su kao ključne stanice koje vrše supresiju imunološkog odgovora. Podvrste limfociti T_{reg}, Tr1 i $FoxP3^+$ limfociti luče velike količine interleukina 10 (IL-10) čiji su glavni učinci 1) aktivacija stanica sličnih Tr1 (Tr1-like), 2) nepotpuna diferencijacija dendritičkih stanica koje posljedično tome postaju tolerogene i 3) izotipsko prekapčanje u limfocitima B koji počinju proizvoditi specifični imunoglobulin IgG4 umjesto imunoglobulina IgE. Tr1-like stanice proizvode drugi važan citokin, TGF-β, učijem pr isustvu novonastale tolerogene dendritičke stanice utječu na povećano stvaranje i akumulaciju Tr1 i Tr1-like stanica osiguravajući daljnju proizvodnju IL-10. Rezultat izotipskog prekapčanja u limfocitima B je povećan omjer IgE/IgG4. IgG4 protutijela su specifična za iste epitope na antigenu kao i IgE, te time suprimiraju alergijsku reakciju na dva načina. Blokiranjem vezanja antigena za BCR receptor na limfocitima B zaustavljaju proizvodnju IgE protutijela, a s druge strane onemogućuju vezanje antigena na FcƐR i FcƐRII receptore na efektorskim stanicama koje izlučuju medijatore (mastociti, bazofili, eozinofili). Za razliku od simptomatske terapije, specifična imunoterapija predstavlja optimalan oblik liječenja alergijskih bolesti koji djeluje na sam nastanak bolesti i uzrokuje dugotrajnu kliničku remisiju.

Ključne riječi: specifična imunoterapija, alergijske bolesti, regulacijski limfociti T, IL-10, TGF-β

2. SUMMARY

Specific immunotherapy

Lovro Bucić

Patients with allergic diseases have been successfully treated with allergen-specific immunotherapy for over a hundred years. Although it is an efficient form of treatment, this type of therapy is also associated with the risk of unwanted reactions caused by IgE antibodies, including systemic anaphylaxis. The treatment is based on the fact that the organism which is regularly exposed to the antigene will develop tolerance to that antigene. The success of specific immunotherapy rests on the modulation of antigene-specific reactions of the organism. By modulation it is meant a relative weakening of the immune response caused by Th2 lymphocytes and the increase of parameters associated with the Th1 lymphocyte reations. Regulation lympphocytes (T_{reg}) are recognized as key cells which suppress the immunological response. Subytpes T_{reg}, Tr1 lymphocytes and $FoxP3^{+}$ lymphocytes secrete large amounts of interleukin 10 (IL-10) whose main effects include 1) activation of Tr1-like cells, 2) incomplete differentiation of dendritic cells which consequentially become tolerogenic, and 3) isotype chnge in B lymphocytes which start producing specific immunoglobulin IgG4 instead of immunoglobulin IgE. Tr1-like cells produce another important cytokine, TGF-β, in whose presence the newly produced tolerogenic dendritic cells affect the increased production and accumulation of Tr1 and Tr1-like cells, thus ensuring further production IL-10. Isotypical change in B lymphocytes results in an increased ratio of IgE/IgG4. IgG4 antibodies are specific for the same epitope on the antigene as the IgE, and they suppress allergic reaction in two ways. On one hand, by blocking the attachment of antigenes to the BCR receptor on B lymphocytes they stop the production of IgE antibodies, and on the other hand they disable the attachment of antigenes to FcƐR iandFcƐRII receptors on effector cells which secrete mediators (mastocytes, basophils, eosinophils). Unlike symptomatic therapy, specific immunotherapy represents the optimal type of treatment of allergic diseases that affects the disease ethiologically and causes long-term clinical remission.

Key words: specific immunotherapy, allergic diseases, regulatory T lymphocytes, IL-10, TGF-β

3. UVOD

U predisponiranih pojedinaca kontakt organizma i antigena koji se često susreću u okolini rezultirat će alergijskom reakcijom. Posljedica je to disreguliranog imunosnog sustava s posljedičnim nastajanjem čestih alergijskih bolesti kao što su atopijski dermatitis, alergijski rinitis te astma. Za razmatranje mehanizama alergijskih bolesti nužno je osvrnuti se na vrste imunoloških odgovora. Obrana organizma protiv patogena odvija se ranim reakcijama urođene imunosti te kasnijim specifičnim odgovorima. Osnovne komponente urođene imunosti su (1) fizičke i kemijske barijere, kao što su epitel i antibakterijske tvari na površini sluznica; (2) stanice koje mogu fagocitirati (neutrofili, makrofagi) i NK (natural killer) stanice; (3) proteini u krvi, uključujući komplement; te (4) citokini koji reguliraju aktivnost stanica urođene imunosti (Abbas i suradnici, 2000). Urođena imunost nema sposobnost razlikovanja stranih čestica već pri svakom susretu reagira na jednak način. Specifična imunost dijeli se na humoralnu i staničnu. Ključnu ulogu u humoralnoj imunosti imaju limfociti B koji, nakon predočenja antigena, proizvode antitjela dok je stanična imunost posredovana limfocitima T koji uništavaju inficirane stanice ili patogene koji se nalaze u fagocitima.

3.1. ANTIGEN

Antigenima nazivamo sve tvari koje mogu prepoznati i vezati limfociti B, antitjela ili limfociti T pomoću staničnog receptora TCR (od engl. T cell receptor, T stanični receptor). Može se raditi o molekulama različite vrste i veličine te se pojavljuju kao lipidi, hormoni, šećeri, ali i kao makromolekule (složeni ugljikohidrati, fosfolipidi, nukleinske kiseline i proteini). Najvažniji dio antigena naziva se epitop i na njega se vežu antitjela. Jedan antigen može imati više ponavljajućih epitopa a njihov prostorni razmještaj utjecat će na vezanje antitjela. Bitno je razlikovati pojam imunogena od antigena. Imunogen je svaka tvar koja može izazvati specifičnu imunoreakciju, svaki imunogen je antigen, ali svaki antigen nema svojstva imunogenosti.

3.2. HLA- FAKTOR TKIVNE PODUDARNOSTI

Zadatak predočavanja antigena limfocitima T obavljaju predočne stanice koje na svojoj površini izražavaju HLA (od engl. human leukocyte antigen) molekule. HLA molekule produkt su gena na lokusu HLA. Postoje dvije vrste produkata gena HLA: HLA I i HLA II. Molekule HLA I građene su od dva lanca, α i β2 mikroglobulina. α lanac sastoji se od 3 segmenta: α1, α2 i α3; prva dva segmenta tvore mjesto za vezanje peptida duljine 8 -11 aminokiselina dok treći pripada u takozvanu IgG domenu koja služi kao vezno mjesto za $CD8^+$ limfocite. β2 mikroglobulin nije kodiran lokusom HLA te je nekovalentno vezan za α3 domenu. HLA II molekule sastoje se od α lanca i β lanca, oba lanca imaju dvije podjedinice; α1 i α2, odnosno β1 i β2. α1 i β1 podjedinice formiraju mjesto za koje se vezati antigen. HLA I prdočava antigene $CD8^+$ T stanicama dok ih HLA II predočavaju $CD4^+$ limfocitima T.

3.3 OBRADA I PREDOČAVANJE ANTIGENA

Pojavljivanje dijelova antigena na površini predočnih stanica u kompleksu s molekulama HLA podrazumijeva prethodnu obradu. Obrada se odvija unutar same predočne stanice i sastoji se od razlaganja antigena na peptide. Mjesto obrade i porijeklo antigena uvjetuju koji će se razred HLA molekule vezati pa se tako HLA I vežu za endogene antigene koji su obrađeni u citoplazmi stanice proteazama, a oni mogu biti stanični, tumorski ili proteini bakterijskog ili virusnog porijekla proizvedeni u zaraženim stanicama. HLA II vezat će peptide koji su obrađeni dijelovi egzogenih antigena koji su u predočnu stanicu ušli procesom fagocitoze ili endocitoze. Predočavanje antigena koji nisu proteini odvija se putem CD1 proteina čija je struktura slična strukturi molekula HLA I.

3.4. ANTIGEN PREDOČNE STANICE

Antigen predočne stanice (APC, od engl. Antigen presenting cells) su: limfociti B, makrofazi i dendritičke stanice. Limfociti B bit će detaljnije opisani u daljnjem tekstu. Makrofazi su dio mononuklearnog fagocitnog sustava. Makrofazi i dendritičke stanice potječu od iste preteče koja koštanu srž napušta kao promonocit te se u krvotoku diferencira u zreli monocit. Nakon izlaska iz krvotoka monociti se mogu diferencirati u tkivno specifične

makrofage ili dendritičke stanice. Postoji više vrsta makrofaga: alveolarni makrofazi u plućima, histiociti u vezivnom tkivu, Kupfferove stanice u jetri, mezangijske stanice u bubregu, a glavne su im funkcije fagocitoza, antimikrobno i citotoksično djelovanje, predočavanje antigena i lučenje brojnih faktora. Nakon što su kemotaksom privučeni na određeno područje, makrofazi pomoću membranskih izdanaka, pseudopodija oblažu strano tijelo te ga kroz membranu unose u stanicu tvoreći fagosom. Spajanjem s lizosomom tvori fagolizosom, hidrolitički enzimi probavljaju materijal te se otpadni sadržaj izbacuje procesom egzocitoze. Opsonizacija je proces ingestije antigena na koji je vezano antitjelo a omogućuju ga receptori za antitjela na površini makrofaga. Stupanj opsonizacije kompleksa antigen antitjelo je 4000 veći od same fagocitoze (Goldsby i suradnici, 2003). Antimikrobno i citotoksično djelovanje pripisuje se mehanizmima ovisnim o kisiku u kojima nastaju reaktivni kisikovi ili dušikovi spojevi te mehanizmima neovisnim o kisiku u kojima citotoksično djeluju lizozim, defenzin, hidrolitički enzimi i TNF (od eng l. tumor necrosis factor α, čimbenik nekroze tumora α) . Makrofazi luče brojne medijatore bitne za upalni i imunološki odgovor od kojih su najvažniji IL-1, IL-6, TNF-α (od eng tumor necrosis factor α,čimbenik nekroze tumora α), IFN-α (od engl. interferon α), GM-CSF (od engl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, čimbenik stimulacije granulocita i makrofaga), G-CSF (od engl. granulocyte colony-stimulating factor, čimbenik stimulacije granulocita) i M-CSF (od engl. macrophage colony-stimulating factor, čimbenik stimulacije makrofaga). Većina makrofaga izražava male količine HLA II molekula a njihov broj povećava se pod utjecajem IFN-γ (od engl. interferon γ). Dendritičke stanice slezene i limfnih čvorova su nepravilne stanice, ne fagocitiraju te se nalaze u manje od 1% u tim organima (Abbas i suradnici, 2000.). Nastaju od preteča mijeloidne i limfoidne loze te se dijele u četiti vrste: Langerhansove stanice, intersticijske dendritičke stanice, mijeloidne dendritičke stanice i limfatičke dendritičke stanice. Smatraju se najpotentnijim aktivatorima imunosti posredovane T stanicama zbog visoke ekspresije kostimulatora potrebnih za aktivaciju.

3.5. LIMFOCITI T

Limfociti T, kao i sve druge krvne stanice, nastaju od hematopoetskih matičnih stanica. Iz koštane srži matične stanice krvlju putuju do kore timusa gdje dolazi do diferencijacije. Pri dolasku u timus na sebi izlažu specifične površinske molekule; c-Kit, receptor za faktor rasta matičnih stanica, adhezijsku molekulu CD44 te CD25, dio receptora za IL-2. One se procesom sazrijevanja gube te prolazeći kroz faze $CD4^-8^-$ i $CD4^+8^+$ nastaju zreli limfociti T koji mogu biti $CD4^+$ ili $CD8^+$. Limfociti također podliježu dvama procesima, pozitivnoj i negativnoj selekciji. Procesom pozitivne selekcije apoptozi podliježu svi limfociti nesposobni vezati se za HLA molekule. Ukoliko se visokim afinitetom vežu za vlastite antigene predočene HLA molekulama limfociti umiru apoptozom i to je proces negativne selekcije kojem se organizmu omogućuje da ne pokreće imunološki odgovor na vlastite antigene. Diferencirani limfociti T tada iz kore migriraju u srž timusa te prelaze u krvotok. Limfociti cirkuliraju krvotokom i limfom te se sve do prepoznavanja kompleksa antigen-HLA nazivaju naivnim limfocitima. Vezanje za taj kompleks naziva se aktivacija a odvija se putem TCR. TCR se sasoji od dva heterodimera; α lanca i β lanca povezanih disulfidnim vezama. αβ heterodimeri udruženi su u kompleks s molekulom CD3. Za aktivaciju limfocita nužna su dva signala. Inicijalni signal nastaje vezanjem TCR-CD3 s predočenim antigenom. Sporedni, drugi signal događa se interakcijama CD28 na limfocitu i B7 molekulama na predočnim stanicama. B7 dolazi u 2 forme, vezanje B7-1 za CD28 šalje stimulirajuće signale limfocitima dok kompleks B7-2 i CTLA-4 (CD152) djeluje inhibitorno. Nakon aktivacije slijedi primarni odgovor u kojemu limfocit podliježe opetovanim mitozama uz istovremenu povećanu transkripciju gena za IL-2 i receptora za IL-2. Tim procesom generiraju se efektorske stanice, $CD8^+$ citotoksični limfociti i $CD4^+$ pomoćni limfociti koje dijelimo u dvije subpopulacije ovisno o citokinima koje luče. Proizvodi TH1 stanica su: IL-2, IFN-γ i TNF-β te posreduju procese stanične imunosti kao što su kasna preosjetljivost i aktivacija citotoksičnih limfocita. Th2 stanice luče IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10, citokine koji služe za aktivaciju limfocita B. Unutar populacije $CD4^+CD25^+$ postoje regulacijski limfociti T_{reg} koji mogu inhibirati proliferaciju limfocita. Ta ihnhibicija je antigen specifična i postojanje T_{reg} koji na taj način, specifično suprimiraju imunološki odgovor ima svoj klinički značaj i primjenu (Goldsby i suradnici, 2003). Osim opisanih efektorskih stanica akumuliraju se i memorijski limfociti T. Njihove odlike su povećana reaktivnost, dulji životni vijek i manji zahtjevi za aktivaciju (mogu ih aktivirati sve vrste predočnih stanica dok naivne većinom aktiviraju dendritičke stanice). Njihovo djelovanje nazivamo sekundarnim odgovorom. U perifernoj krvi postoji i malena

populacija γδ T stanica. U ljudskom tijelu nalazi ih se manje od 5% a nađene su i u koži te epitelu dišnog i probavnog sustava (Goldsby i suradnici, 2003). Pretpostavlja se da su dio urođenog imuniteta jer njihovo vezanje nije ograničeno na HLA molekule već se mogu vezati i na slobodan antigen.

3.6. LIMFOCITI B

Za potpuno razumijevanje humoralne imunosti potrebno je potanko opisati proizvodnju antitjela od strane limfocita B, molekularna zbivanja na stanicama i unutar njih te signale koji potiču rast i proliferaciju B stanica. Akumulaciju limfocita B nalazimo već u embrija a nakon rođenja sazrijevanje se odvija u koštanoj srži gdje prolazi kroz stadije pro-B, pre-B i nezrele B stanice. U tom procesu ključna je interakcija sa stromalnim stanicama koštane srži. Pro-B stanice ispoljavaju adhezijsku molekulu VLA-4 (od engl. very late antigen 4) koja se veže na ligand stromalne stanice VCAM-1 (od engl.vascularcelladhesionmolecule 1) a potom interakcija receptora c-Kit (od engl.receptor tyrosine kinaseprotein,CD 117) i SCF (od engl.stem cell factor) na površini stanica koštane srži uvjetuju signale za prelazak limfocita u stadij pre-B. U tom stadiju interakcije sa samim stromalnim stanicama više nisu uvjet ali limfoticit su ovisni o IL-7 kojega one proizvode. Slijedi stadij u kojemu limfocit proizvodi IgM protutijelo na svojoj površini, još nije funkcionalan te će to postići u idućoj fazi, kada bude postojala istovremena ekspresija IgD i IgM na membrani. Nakon izlaska iz koštane srži slijede aktivacija i daljnja proliferacija B stanica. Limfocite mogu aktivirati Th stanice, bilo direktnim kontaktom ili citokinima koje proizvode. Druga mogućnost je aktivacija koja nije posredovana Th stanicama već ju izaziva sam antigen kao na primjer bakterijski lipopolisaharidi. Takav odgovor bit će slabijeg intenziteta, neće doći do stvaranja memorijskih stanica i dominantni razred protutijela bit će IgM. (Goldsby i suradnici, 2003). Receptor limfocita B BCR (od engl. B cell receptor, B stanični receptor) koji na sebe veže antigen sastavljen je od membranskog imunoglobulina i heterodimera Ig-α/Ig-β. Na površini B sanice nalazi se i koreceptor koji je sastavljen od tri proteina: CD19, CR2 (od engl. complement receptor type 2)(CD 21) i TAPA-1 (od engl.target of the antiproliferative antibody 1)(CD 81). CR2 veže se na c3d komponentu komplementa koja se nalazi na antigenu uzrokujući interakcije CD19 s BCR i time pokreće niz signala koji će poboljšati proces aktivacije.

3.6.1. ULOGA Th STANICA

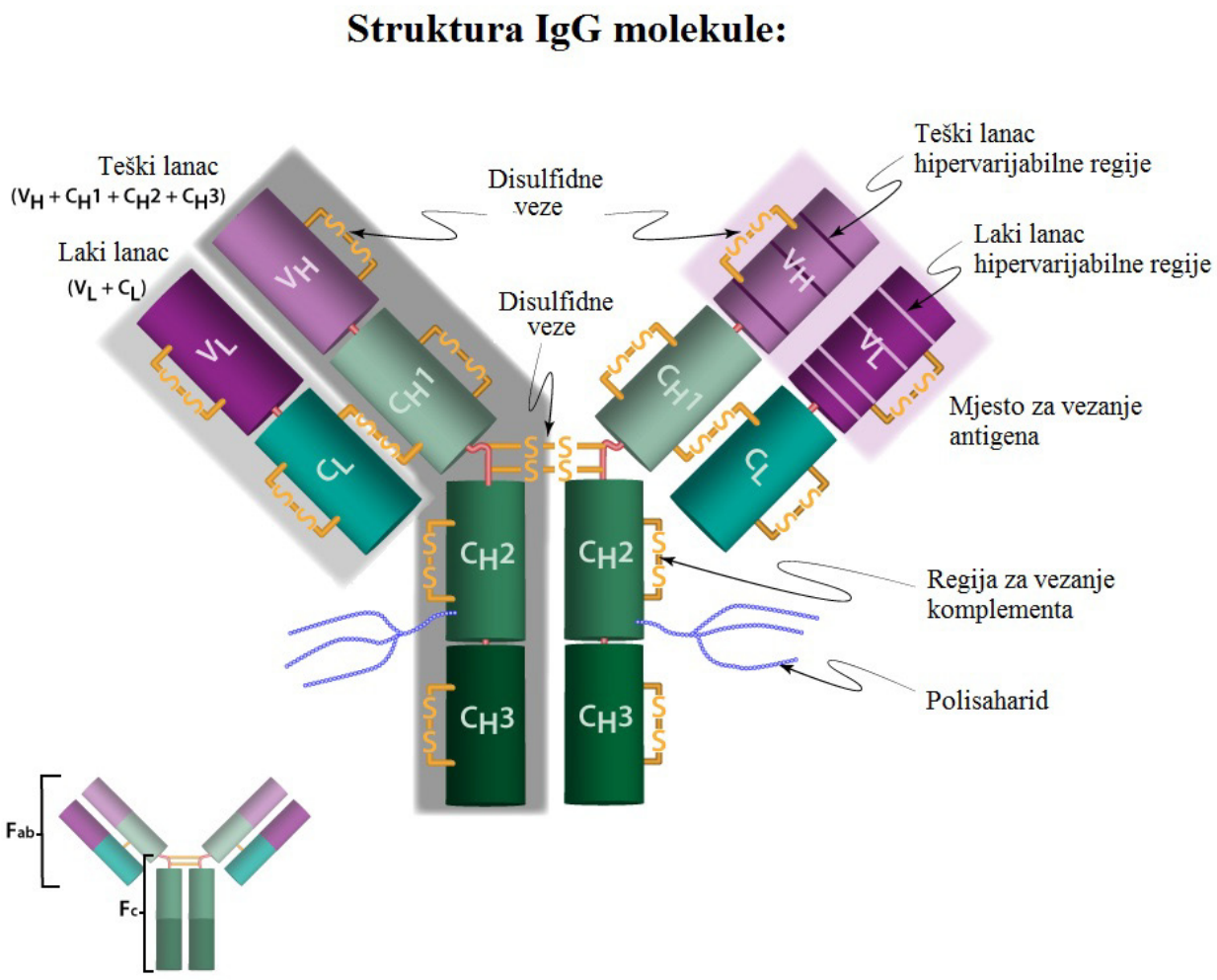
Nakon vezanja antigena na membranski imunoglobulin B stanice, ona ga unosi procesom endocitoze, preradi i predoči na molekulama HLA II. Pošto se antigen veže specifično, za membransko protutijelo, B stanica predočuje antigen Th stanicama u koncentracijama antigena koje su 100 do 10000 puta manje od koncentracija potrebnih za predočavanje putem makrofaga ili dendritičkih stanica (Goldsby i suradnici, 2003). Th stanica veže se pomoću TCR na predočeni antigen, aktivira se i na svojoj površini počinje izražavati CD40L. Veza CD40L s CD40 na površini limfocita B signal je koji će potaknuti aktivaciju limfocita B. B stanica je aktivirana, proliferira, ali za konačnu diferencijaciju nužni su citokini koje proizvodi Th stanica: IL-2, IL-4, IL-5. Nakon vezanja citokina B stanica može se diferencirati u plazma stanicu ili memorijsku B stanicu. Diferencijacija u plazma stanicu koja će lučiti antitjela podrazumijeva promjenu proizvodnje antitjela, mijenja se transkripcija RNA, prestaju se proizvoditi membranski i počinju se proizvoditi sekrecijski imunoglobulini. Izotipsko prekapčanje teških lanaca proces je u kojemu putem signala preko molekule CD40 u limfocita B dolazi do promjene razreda imunoglobulina kojeg će proizvoditi. Kao što je već napomenuto, na njihovoj površini nalaze se IgM i IgD a promijeniti se mogu u razrede gama, alfa i ε. Citokini igraju ključnu ulogu u tom procesu prekapčanja i o vrsti citokina ovisi koji razred antitjela će se proizvoditi. IL-4 posreduje prekapčanje na razred IgE dok IFN-γ, kojeg proizvode NK stanice, dovodi do proizvodnje IgG2a. Nabrojeni procesi (interakcije limfocita B i T, aktivacija i diferencijacija u plazma stanice te izotipsko prekapčanje) pripadaju ranim procesima. Kasni procesi su somatske hipermutacije i generiranje memorijskih limfocita B. Oni se zbivaju u germinativnim centrima limfnih čvorova u kojima se nalaze folikularne dendritičke stanice koje stimuliraju B stanice. Folikularne dendritičke stanice nemaju HLA II molekule već se na njihovoj površini nalaze receptori CR1, CR2, CR3, Fc receptori i CD40L. Formiranje germinativnih centara ovisno je o Th stanicama i interakcijama CD40 i CD40L. Somatske hipermutacije su događaj u kojemu somatske točkaste mutacije na genima za imunoglobuline rezultiraju proizvodnjom i akumulacijom antitjela visoke specifičnosti za antigen. Limfociti B kod kojih razultat mutacije nije proizvodnja antitjela koja se visokim afinitetom vežu za antigen podliježu programiranoj smrti. Neke od aktiviranih B stanica neće se diferencirati u plazma stanice već će steći sposobnost dugog preživljavanja bez antigene

stimulacije i nazivaju se memorijski limfociti B. Dio memorijskih B stanica ostaje u limfnom čvoru a drugi dio cirkulira krvotokom ili se nastanjuje u limfnim tkivima.

3.7. ANTITJELA

Antitjela posreduju humoralnu imunost, mogu biti vezana na membranu limfocta B ili slobodno cirkulirati u krvotoku dok ne naiđu na antigen koji će vezati i neutralizirati ili omogućiti njegovu eliminaciju drugim putem. Svi razredi antitjela dijele zajedničke osobine; sličnu strukturu, sposobnost vezanja antigena a i funkcije su im slične. Građa antitjela nerijetko je vrlo kompleksna, posjeduju više različitih antigenskih determinanti, a posljedica različitih epitopa na antigenu može biti i aktivacija više klonova B stanica koje će proizvoditi antitjela komplementarna epitopima. Proizvode svake od tih stanica nazivamo monoklonalnim antitjelima koja zajedno s poliklonalnim antitjelima čine imunološki odgovor organizma posedovan antitjelima na određeni antigen. Antitjela se sastoje od dva identična laka lanca (L), polipeptida molekularne težine oko 25000 i dva istovjetna teška lanca (H), većih peptida molekularne težine 50000 ili više (Goldsby i suradnici, 2003). Laki lanci vezani su za teške disulfidnim vezama te tvore heterodimer (H-L) a istovjetne veze nalaze se između teških lanaca, tvoreći četverolančanu strukturu $(H\text{-}L)^2$. Laki se lanci sastoje od dviju regija: varijabilne (V) regije, koja se naziva i amino-terminalni kraj, i konstantne (C) regije, karboksi-terminalnog kraja. Varijabilna regija sastoji se od oko 110 aminokiselina i pokazuje velike varijabilnosti između protutijela. Konstantna regija pojavljuje se u samo dvije različite sekvence, što dovodi do postojanja dva tipa lakih lanacaκ i λ. Teški se lanci također sastoje od varijabilne regije koja pokazuje znatne varijabilnosti dok se aminokiseline u konstantnim regijama javljaju u pet osnovnih slijedova: μ, δ, γ, ε i α) i te razlike nazivaju se izotipovi. Susljedno tome postoji pet razreda antitjela IgM, IgG, IgA, IgD i IgE. Laki lanci na određenom razredu mogu biti κ ili λ. Nadalje, postoje i manje razlike u uzorcima aminokiselina teških lanaca α i γ, α se može javljati kao α1 i α2 dok se gama javlja u četiri podrazreda: γ1, γ2, γ3 i γ4 pa tako i postoje podrazredi IgA (IgA1 i IgA2) te IgG (IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4). Varijabilne regije lakih i teških lanaca (VH i VL) zajedno nazivamo CDRs (od engl. complementarity determining regions, dio varijabilnih lanaca antitjela koji veže antigen). To je mjesto koje veže antigen a naziva se i Fab regija, za razliku od karboksi-terminalnog kraja, kojega nazivamo Fc regija. CL dio lakog lanca i CH1 regija teškog lanca nadovezuju se na varijabilne regije i osnovna uloga im je produljenje Fab regije antitjela a uz

to CL i CH1 povezane su disulfidnim vezama koje omogućuju stvaranje (H-L) heterodimera. Na nekim razredima (IgG, IgD i IgA) između CH1 i CH2 regije nalazi se 'zglob' koji protutijelu daje fleksibilnost te prilagodbu kuta Fab regija kako bi se protutijelo prilagodilo antigenu. IgM i IgE umjesto zgloba imaju dodatni slijed aminokiselina (CH2 regija). Karboksi-terminalni krajevi (CH3 za IgA, IgD i IgG, odnosno CH4 u IgE i IgM) razlikuju se ovisno vrsti imunoglobulina. Ukoliko se radi o membranskom imunoglobulinu njegov karboksidni dio osim hidrofilnog imat će i hidrofobni i citoplazmatski dio. Efektorske stanice imunološkog sustava na svojim membranama nose receptore za Fc fragmente antitjela te se interakcijom s tim receptorima događaju imunološki procesi posredovani antitjelima. Oni su: opsonizacja, aktivacija komplementa i ADCC (od engl.antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, citotoksičnost posredovana NK stanicama ovisna o antitjelima). Svaki od razreda imunoglobulina imunost posreduje na drugačiji način a postoje razlike u djelovanju i unutar jednog razreda. IgG aktiviraju komplement, IgG3 je najefikasniji, slijede ga IgG1 te IgG2, dok IgG4 nema sposobnost akivacije komplementa. Druga zadaća je sudjelovanje u opsonizaciji, IgG1 i IgG3 vežu se za Fc receptor visokim afinitetom dok IgG4 i IgG2 imaju nizak afinitet. Treće, IgG1, IgG3 i IgG4 prolaze kroz placentu i sudjeluju u zaštiti fetusa. IgM je izotip koji se prvi proizvodi pri odgovoru na antigen i ima veću sposobnost aktivacije komplementa od IgG. IgA se nalazi na sluznicama u obliku dimera povezanih J-lancima i u plazmi kao monomer. Glavna im je uloga vezanje patogena u dišnom, probavnom i genitourinarnom sustavu i sprječavanje njihovog umnažanja i infekcije. IgE ključan je imunoglobulin za temu ovog rada te će biti detaljnije opisan u sklopu reakcija preosjetljivosti tipa I. IgD nalazi se kao membranski Ig na B stanicama te nisu poznate druge uloge toga antitjela. Građa antitjela prikazana je na slici 1.



Slika 1. Građa protutijela

Prema: http://image.frompo.com/95423ded23f89033c377fc0bf89fea50

3.8. CITOKINI

Citokini su molekule niske molekularne težine, proteini ili glikoproteini, a glavna im je uloga posredovanje u komunikaciji između stanica imunološkog sustava. Vežući se na receptore ciljnih stanica utječu na njihovu funkciju mijenjajući ekspresiju gena. Citokini, ovisno o mjestu vezanja, mogu djelovati na tri načina: autokrino, vežući se na receptore stanice koja ih je izlučila, parakrino vezanjem na stanice u neposrednoj blizini ili endokrino, ukoliko se ciljne stanice nalaze na udaljenom mjestu. Njihovi učinci imaju i dva bitna

svojstva, pleotropizam, što znači da isti citokin djeluje na više vrsta stanica i ima različite učinke te reduancija, pojava da više različitih citokina djeluje na istu stanicu, djelovanja im se preklapaju. Što se samog imunološkog odgovora tiče, utječu na intenzitet trajanja reakcije stimulirajući ili inhibirajući aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju stanica. Strukturalno gledano, citokini su najvećim dijelom glikoproteini, dijelimo ih prema funkciji, a postoji i klasična podjela koja ih dijeli na interleukine, interferone, citoksine i čimbenike poticanja kolonija. Prema funkciji mogu biti imunopoticajni, imunosupresijski i čimbenici rasta hematopoetičkih stanica. Uloga citokina kao posrednika u komunikaciji između limfocita B i limfocita T ukratko je opisana u navedenim odlomcima a uloge najvažnijih citokina navedene su u tablicama 1 i 2.

Tablica 1. Citokini urođene imunosti

Prema: http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/lectures/files/immune_network.html

CITOKINI UROĐENE IMUNOSTI	Masa/ kDa	Građa	Izvor	Mjesto djelovanja
IL-1	17	monomer	makrofagi,endotel, epitel	Endotel (↑koagulacija, ↑upala) Hepatociti (↑proteini akutne faze) Hipotalamus (vrućica)
IL-18	17	monomer	makrofagi	NK limfociti (↑IFN-II y) T limfociti (↑IFN-II y)
TNF	17	homotrimer	makrofagi, limfociti T	Endotel (↑koagulacija, ↑upala) Hepatociti (↑proteini akutne faze) Neutrofili (↑aktivacija) Hipotalamus (vrućica)
IL-6	26	homodimer	makrofagi, endotel, limfociti T	Hepatociti (↑proteini akutne faze) Limfociti B (↑proliferacija)
IL-15	13	monomer	makrofagi	NK limfociti (↑proliferacija
IL-12	35/40	heterodimer	makrofagi, dendritičke stanice	Limfociti Th1 (↑diferencijacija) Limfociti Tc (↑IFN-II y)

IL-23	19/40	heterodimer	makrofagi, dendritičke stanice	Limfociti T (↑IL17)
IL-27	28/13	heterodimer	makrofagi, dendritičke stanice	Limfociti Th1 (inhibicija i/ili diferencijacija) NK limfociti (↑IFN-II y)
IL-10	18	heterodimer	makrofagi, limfociti T	Makrofqagi, dendritičke stanice (↓IL12)
INF-I (α)	21	homodimer	makrofagi	Sve stanice (↑virusna imunost, ↑MHC-I) NK limfociti (↑aktivacija)
INF-I (β)	25	homodimer	fibroblasti	Sve stanice (↑virusna imunost, ↑MHC-I) NK limfociti (↑aktivacija)
kemokini	8-12	monomer	makrofagi, endotel, fibroblasti, epitel	Fagociti (↑migracija) Limfociti B (↑migracija) Limfociti T (↑migracija)

Tablica 2. Citokini specifične imunosti

Prema: http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/lectures/files/immune_network.html

CITOKINI SPECIFIČNE IMUNOSTI	Masa/ kDa	Građa	Izvor	Mjesto djelovanja
Il-2	17	Monomer	Limfociti T	Limfociti T (↑preživljenje, ↑proliferacija, ↑citokini) Limfociti B (↑proliferacija, ↑proizvodnja antitijela) NK limfociti (↑proliferacija, ↑aktivacija)
Il-4	17	Monomer	Limfociti Th2	Limfociti B (↑promjena izotipa IgE) Th2 limfociti Makrofagi (↑proliferacija, ↑diferencijacija) Mastociti (↑proliferacija)
Il-5	26	Homodimer	Limfociti Th2	Limfociti B (↑proliferacija,↑ promjena izotipa IgA) Eozinofili (↑proliferacija, ↑aktivacija
Il-13	13	Monomer	Limfociti Th2, NK-T limfociti, mastociti	Limfociti B (↑promjena izotipa) Makrofagi (↑kolagen) Fibroblasti (↑kolagen) Epitel (↑sluz)
Il-17	35/40	Dimer	Limfociti T	Endotel (↑kemokini) Makrofagi (↑citokini/kemokini) Epitel (↑G-CSF, GM-CSF)
INF-γ	19/40	homodimer	Limfociti Th1, limfociti Tc, NK limfociti	Limfociti B (↑promjena izotipa) Limfociti Th1 (↑diferencijacija) Makrofagi (↑aktivacija) Različite stanice

4. OBLICI IMUNOLOŠKE PREOSJETLJIVOSTI

Imunološke reakcije u organizmu, osim djelovanja protiv patogena, mogu uzrokovati i štetne posljedice. Te bolesti nazivamo imunološke preosjetljivost kod kojih se patofiziološki može raditi o imunološkim odgovorima usmjerenim protiv vlastitih antigena ili nekontroliranom i pretjeranom odgovoru na strane antigene. Preosjetljivost može biti posredovana protutijelima ili stanicama te se dijeli u četiri skupine: anafilaktička preosjetljivost (I. oblik), citotoksična preosjetljivost (II. oblik), preosjetljivost uzrokovana imunokompleksima (III. oblik) te preosjetljivost ovisna o stanicama (IV. oblik). Za razumijevanje mehanizama djelovanja specifične imunoterapije potrebno je razložiti mehanizam anafilaktičke preosjetljivosti.

4.1. MEHANIZAM PREOSJETLJIVOSTI OBLIKA I.

Anafilaktička se reakcija zbiva gotovo trenutačno, u roku nekoliko minuta od kontakta s antigenom te rezultira brojnim patološkim posljedicama u organizmu. Prvi korak u nastajanju reakcije je inicijalni kontakt s antigenom, kojeg u ovom slučaju nazivamo alergen i koji dovodi do diferencijacije $CD4^+$limfocita T u aktivne Th2 stanice. Th2 stanice proizvode IL-4 koji će posredovati diferencijaciju B imfocita u plazma stanice koje će proizvoditi imunoglobuline E (IgE) specifične za taj antigen. IgE se otpuštaju u krvotok gdje cirkuliraju te se naposljetku vežu za receptore na ciljnim stanicama. Fc receptori, za koje se vežu visokim afinitetom, specifični su za teški lanac a posjeduju ih mastociti i bazofili koji mogu cirkulirati krvotokom ali se prvenstveno nalaze u određenim tkivima. Pri ponovnom kontaktu alergen se veže na IgE antitjela što uzrokuje otpuštanje medijatora iz mastocita i bazofila te uzrokuje kliničku sliku u bolesnika. Alergije su, dakle, Th2 ovisne reakcije za čiji je nastanak nužan IL-4 i proizvodnja IgE.

4.1.1. ALERGENI

Strukturalno gledano, alergeni su najčešće proteini ili kemikalije vezanie na proteine kojima su predisponirani pojedinci kronično izloženi. U svakom slučaju, alergeni ne uspijevaju potaknuti aktivaciju urođene imunosti, aktivirati makrofage, TH1 stanice i proizvodnju IL-12 i IL-18. Struktura antigena ne može sa sigurnošću ukazati na njegovu alergogenost ali postoje mnoge zajedničke karakteristike u građi alergena: niske su molekularne težine, dobro topivi u tjelesnim tekućinama i često su glikozilirani pa upravo ta svojstva im omogućuju zaštitu od denaturacije te da intaktni ulaze u organizam. Zanimljivo je da postoje i druge tvari koje mogu izazvati anafilaksiju, kao što su enzimi u slučaju preosjetljivosti na otrov pčela ili latex te lijekovi koji se u organizmu vežu na proteine, kao na primjer penicilin. Da bi došlo do alergijske reakcije mora postojati opetovana izloženost antigenu. Pri prvom susretu dolazi do izotipskog prekapčanja i vezanja proizvedenog IgE na mastocite i bazofile, a pri ponovnom susretu do otpuštanja medijatora i kliničke slike.

4.1.2. IMUNOGLOBULIN E

Imunoglobulin E u plazmi se nalazi u koncentracijama manjim od 1μg/mL, a u određenim patološkim stanjima kao što su infekcije helmintima ili ozbiljna atopija može narasti i više od 1000 μg/mL (Abbas i suradnici, 2000). Povećana proizvodnja IgE u pojedinaca rezultat je njihove prirodne sklonosti povećanoj organizaciji i inicijaciji Th2 odgovora na alergene, a ta je sklonost multifaktorska te uključuje naslijeđene gene, svojstva samog alergena i prethodna izlaganja antigenu u smislu trajanja, načina i količine. U organizmu koji ne boluje od alergijskih bolesti sintetiziraju se drugi razredi imunoglobulina kao što su IgM i IgG te samo male količine IgE. Kao što je već napisano proizvodnja i sekrecija IgE ovisi o Th2 i IL-4 koji uzrokuje gensko prekapčanje, a nagomilavanje Th2 stanica nalazi se na mjestima odvijanja alergijske reakcije kao što su koža, sluznica dišnih puteva ili gastrointestinalni sustav.

4.1.3. RECEPTORI ZA IMUNOGLOBULIN E

Fc receptori specifični za teški lanacƐ nazivaju se Fc εRI, nalaze se na mastocitima i bazofilima i IgE protutijela se za njih vežu vrlo visokim afinitetom. Osim mastocita i bazofila FcεRI nađeni su i na Langerhansovim stanicama i makrofagima u koži. Receptor se sastoji od tri podjedinice, alfa lanca, beta lanca i gama podjedinice. Alfa lanac sastoji se od dvije domene koje čine vezno mjesto za IgE te transmembranskog dijela. Beta lanac je zavijen, četiri puta prolazi kroz membranu te zajedno s dva istovjetna gama lanca povezanih disulfidnim vezama vrši ulogu signalnog prijenosnika. Uočeno je da se broj izraženih receptora na mastocitima i bazofilima povećava s brojem cirkulirajućih IgE. Osim FcεRI receptora postoje i FcεRII (CD24) receptori koji se javljaju u dva oblika: FcεRIIA, koji je specifičan za B stanice te FcεRIIB koji se kao odgovor na stimulaciju IL-4 javlja na B stanicama, monocitima i eozinofilima.

4.1.4 MASTOCITI I BAZOFILI

Mastociti i bazofili potječu od jednake prekursorske stanice i igraju istu ulogu, no unatoč tome, između njih postoje razlike. Mastociti sazrijevaju u vezivnom tkivu, ne nalazimo ih u krvotoku već su smješteni u vezivnom tkivu, najčešće u blizini krvnih žila a na njihov razvoj utječe čimbenik sazrijevanja G-CSF. S druge strane, bazofili sazrijevaju u koštanoj srži, u zrelom ih obliku nalazimo u cirkulaciji, ne nalazimo ih u vezivnom tkivu a razvijaju se pod utjecajem IL-3. Zajedničko im je to da na objema vrstama stanica nalazimo visoku ekspresiju FcεRI te približno jednak sastav tvari u njihovim staničnim odjeljcima: histamin, heparin i proteaze. Stanice se aktiviraju kada dođe do križnog povezivanja IgE na membranama u prisustvu alergena, a nakon aktivacije vrše tri funkcije: oslobađanje medijatora iz granula, sinteza i sekrecija lipidnih medijatora, i treće, proizvodnja i izlučivanje citokina. Najaktivniji medijator oslobođen iz granula je vazoaktivni amin, histamin, koji se veže na H1, H2 i H3 receptore, njegovi učinci su kratkotrajni jer se brzo uklanja iz ekstracelularnog prostora. Histamin djeluje na krvne žile uzrokujući kontrakciju endotelnih stanica i transudaciju plazme ekstravaskularno. Osim kontrakcije, endotelne stanice stimulira i na proizvodnju PGI2 (od engl. prostaglandin I2) i dušikova oksida koji imaju vazodilatacijski učinak. Uz to uzrokuje i kontrakciju glatkog mišićja u gastrointestinalnom i dišnom sustavu

koja rezultira povećanom peristaltikom i bronhospazmom. Iz granula se, osim histamina, izlučuju i proteaze (triptaze i kimaze) te proteoglikani (heparin i hondroitin sulfat). Lipidni medijatori zapravo su derivati arahidonske kiseline, PGD2 (od engl. prostanglandin D2) nastaje putem ciklooksigenaze, djeluje kao bronhokonstriktor i vazodilatator te putem kemotaksije uzrokuje nakupljanje neutrofila. Putem lipooksigenaze nastaju leukotrieni od kojih je bitno istaknuti LTC4 (od engl.leukotrieneC4, leukotrienC4) koji uzrokuje dugotrajnu bronhokonstrikciju. Treći lipidni medijator je PAF (od engl. platelet activating factor, čimbenik aktivacije trombocita), bitan za kasnije faze reakcije. Citokini proizvedeni aktivacijom su TNF-α, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 te IL-3 i GM-CSF i također su bitni za kasnije faze reakcije.

Istraživanja (Mukai i suradnici, 2005.) su otkrila do tada nepoznate uloge bazofila u alergijskim reakcijama. Rekombinantnim miševima čiji bazofili ne izražavaju FcεRI receptor supkutano su injicarani antigeni. Miševi su pokazali simptome rane i kasne faze preosjetljivosti, ali odgođena faza pojavila se tek nakon unosa bazofila s receptorom FcεRI. U novijem istraživanju (Karasuyama i suradnici, 2010.) pokazano je da bazofili, za razliku od mastocita, nisu nužni za razvoj IgE posredovane sistemne anafilaksije već da glavnu ulogu imaju u razvoju IgG posredovane anafilaksije. Vezanje kompleksa IgG protutijelo - alergen na bazofile dovodi do otpuštanja PAF koji povećava vaskularnu permeabilnost i dovodi do anafilaktičkog šoka.

4.1.5 EOZINOFILI

Eozinofili se nalaze u perifernim tkivima, gastrintestinalnom, dišnom i genitourinarnom sustavu. Potječu od prekursora mijeloidne loze a diferencijaciju im posreduju GM-CSF, IL-3 i IL-5. Na mjestu upale nakupljaju se procesom kemotaksije. Pod utjecajem IL-4 na površini endotelnih stanica pojavljuje se receptor VCAM-1 na kojega se eozinofili vežu molekulom VLA-4 (CD49dCD29). Eozinofili djeluju izravno citotoksično otpuštajući peroksidaze, hidrolaze i lizofosfolipaze. Uz te medijatore eozinofili posjeduju i specifičan protein koji je osobito toksičan za helminte, ali i okolno tkivo. Signal za otpuštanje medijatora dolazi preko receptora FcεRI a eozinofili mogu aktivirati i kemotaktične molekule: PAF, LTB4 (od engl.leukotrieneB4, leukotrien B4) i C5a komponenta komplementa. Uz otpuštanje medijatora aktivirani eozinofili proizvode i izlučuju PAF i LTC4.

5. SPECIFIČNA IMUNOTERAPIJA

Zbog porasta incidencije alergijskih bolesti u razvijenom svijetu, a tako i u Hrvatskoj, u prethodnom stoljeću značajno su se razvile metode njihovog liječenja. ASIT-a se u Hrvatskoj primjenjuje od 1957. godine te su se alergenski pripravci proizvodili u Imunološkom zavodu u Zagrebu i registrirani su 1959. godine. Proizvodnja alergena prestaje 2010. godine i trenutno su na raspolaganju alergenski pripravci „Stallergens“ iz Francuske. ASIT-a se u Hrvatskoj od 1960. do 1970-tih godina počinje provoditi u zdravstvenim ustanovama diljem Hrvatske. (Kanceljak-Macan, 2011).

Pretpostavlja se da je nastanak alergijskih bolesti multifaktorski i da su posljedica složenih interakcija genetike i okoliša, a samo neki od rizičnih čimbenika za razvoj bolesti mogu biti vlaga, plijesan, duhanski dim te alergeni iz pernatih jastuka ili tepiha (Stipić-Marković, 2004). Najčešće se javljaju kao alergije na grinje kućne prašine ili na alergene koji potječu od određene vrste životinja, biljaka ili hrane (Stipić-Marković i suradnici, 2003). Najčešći simptomi javljaju se kao alergijski rinitis i alergijska astma, a uz manifestacije na dišnom sustavu pojavljuje se i konjuktivitis, manifestacije u GI i drugim organskim sustavima (Lipozenčić i suradnici, 2011). Osim izbjegavanja alergena, što je često neizvedivo, postoje medikamentni oblici liječenja, antihistaminici i antileukotrieni, čije se mehanizam djelovanja temelji na blokadi već oslobođenih medijatora te kortikosteroidi koji inhibiraju njihovu sintezu u upalnim stanicama (Pevec i suradnici, 2012). Takav oblik terapije je isključivo simptomatski te će se pri ponovnom kontaktu s alergenom simptomi bolesti vratiti. Pod tolerancijom podrazumijevamo prevenciju napredovanja alergijskih bolesti i razvijanja komplikacija kao što je astma, dugotrajno odsustvo simptoma ali i sprječavanje pojave senzibilizacije na druge alergene. Postizanje takvog stanja organizma ima kompleksnu imunološku podlogu. Odlučujuću ulogu u imunosnom odgovoru imaju pomoćni limfociti T Th1 i Th2, kako je već opisanoi. Th9 su novootkrivena vrsta limfocita koji se diferenciraju pod istodobnim utjecajem IL-4 i TGF-β (od engl. transforming growth factor β, transformirajući faktor rasta β), a proizvode IL-9, a druga nedavno otkrivena vrsta je Th17, podvrsta bitna za upalni proces i kronične bolesti, koja izlučuje IL-17A, IL-17E, IL-6, IL-8, IL-22 i IL-26 (Pevec i suradnici, 2011). U eksperimentalnim modelima inhibicija funkcije Th17 i IL-17 smanjuje zglobna oštećenja u artritisu te smanjuje infiltraciju neutrofila u astmi

(Stipić-Marković, 2011). Navedene podvrste bitna su sastavnica jer mogu predstavljati ciljne stanice u terapiji alergijskih bolesti i aktivaciji T_{reg} (Stipić-Marković, 2014).

5.1. REGULACIJSKI LIMFOCITI T

Regulacijski limfociti T u posljednje su vrijeme prepoznati kao ključne stanice na koje se može utjecati primjenom specifične imunoterapije. Upoznate su njihove uloge, mehanizmi nastanka i patofiziološki procesi u sklopu alergijskih bolesti, ali i drugim stanjima kao što su tumorska, autoimunosna i kronična upalna stanja. Posljedično novim spoznajama javlja se i mogućnost napretka u terapiji alergijskih bolesti pa su tako u tijeku istraživanja u kojima bi se terapijom modificirao imunološki odgovor umnožavanjem i aktivacijom specifičnih podtipova regulacijskih limfocita T (Miyara i suradnici, 2009). Anergija, odnosno nereagiranje na antigen i supresivna aktivnost bitne su karakteristike T_{reg}, omogućuju im obavljanje specifičnih funkcija kojima posreduju citokini koje stvaraju ili, s druge strane, direktnim kontaktom. Glavni mehanizmi kojima T_{reg} utječu na alergijski odgovor su supresija Th1, Th2 i Th17 pomoćnih limfocita te efektorskih stanica koje otpuštaju medijatore (mastociti, bazofili, eozinofili), smanjeno stvaranje specifičnih IgE protutijela, inhibicija akumulacije limfocita T u tkivima, a s druge strane, aktiviraju dendritičke stanice koje proizvode IL-10 i uzrokuju povećanje koncentracije igG4 i IgA razreda protutijela proizvedenih od strane limfocita B (Akdis CA i Akdis M, 2009). S obzirom na funkcije koje obavljaju, mehanizmima kojima ih vrše te morfologiji, postoji više vrsta T_{reg} koje će biti zasebno opisane.

5.1.1 PRIRODNI REGULACIJSKI LIMFOCITI T

Prirodni T_{reg} fenotipa $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ obavljaju funkciju uspostave tolerancije na vlastite antigene te održavanja ravnoteže u imunom sustavu, a nalaze se u proporciji 5-10% perifernih $CD4^+$limfocita T (Pevec i suradnici, 2011). Na njihovim površinama nalaze se molekule koje su karakteristične za tu vrstu limfocita, ali ne i specifične te se mogu naći i na

drugim vrstama limfocita T. Eksprimiraju receptor za IL-2 (CD25) i FoxP3 (od engl. forkhead box protein 3). Nadalje, nalazimo i nekolicinu površinskih molekula kao što je CTLA-4 (od engl. cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4, protein 4 povezan s citotoksičnim limfocitima), GITR (od engl. glucocorticoid-induced TNF receptor, glukokortikoidom potaknut TNF receptor) i PD-1 (od engl. programmed death-1, receptor za programiranu smrt stanice) (Shevach, 2006). Unutar prirodnih T_{reg} razlikujemo i podskupine čija se razdioba temelji na eksprimiranju integrina$\alpha_E\beta_7$ (CD103). Subpopulacije na kojima se nalazi CD103 pokazuju učinkovitiju inhibitornu aktivnost te brojnije nakupljanje u područjima upale (Liu i suradnici, 2014). Također se razlikuju i po eksprimiranju molekule ICOS (od engl. inducible co-stimulator, inducibilni kostimulator) pa tako T_{reg} koji ga eksprimiraju djeluju putem IL-10 i TGF-β, s druge strane, T_{reg} $ICOS^-$ kostimulacijski signal primaju putem drugog receptora, CD28, a svoje učinke ostvaruju preko TGF-β (Ito i suradnici, 2008).

5.1.2 POTAKNUTI ILI PRILAGODLJIVI REGULACIJSKI LIMFOCITI T

Potaknuti T_{reg}limfociti nastaju iz $CD4^+CD25^-FoxP3^-$limfocita T na periferiji te ih dijelimo u tri skupine. Prva su skupina limfociti Tr1. Limfocite Tr1, specifične za antigen odnosno alergen, nalazimo pri svim vrstama infekcije organizma, gdje stvaraju i male količine TGF- β, IL-5 i IFN-gama i mnoštvo IL-10 te svoju funkciju supresije vrše preko IL-10 (Shevach, 2006). Nastanak Tr1 iz $CD4^+$ limfocita u *in vitro* modelima uvjetuje prisutnost IL-10, IFN-α i dvije kombinacije: dekstametazon i vitamin D3 ili IL-10 i IL-4 (Taylor i suradnici, 2005). Druga vrsta prilagodljivih T_{reg}limfocita su limfociti Th3. Glavna funkcija limfocita Th3 je stvaranje malih količina IL-4 i IL-10 te velikih količina TGF-β (Taylor i suradnici, 2005). Th3 pokazuju supresivno djelovanje, ali je njihov najvažniji učinak sudjelovanje u stvaranju $FoxP3^+$limfocita T, poticanjem stvaranja transkripcijskog čimbenika FoxP3 preko TGF-β kojeg izlučuj u (Carrier i suradnici, 2007). Treća vrsta potaknutih T_{reg} zove se citokinom TGF-β potaknuti $FoxP3^+$ limfociti T. Nastaju signaliziranjem putem TGF- β receptora uz istodobni signal preko T-staničnog receptora. Signali dovode do ekspresije CD25 i stanice postaju $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ te fenotipski odgovaraju prirodnim T_{reg}. U *in vitro* modelima imaju sposobnost inhibicije limfocita Th1 i Th2, što pokazuje da im je i funkcija istovjetna onoj u prirodnim T_{reg} (Chen i suradnici, 2003).

5.2. TRANSKRIPCIJSKI ČIMBENIK FOXP3

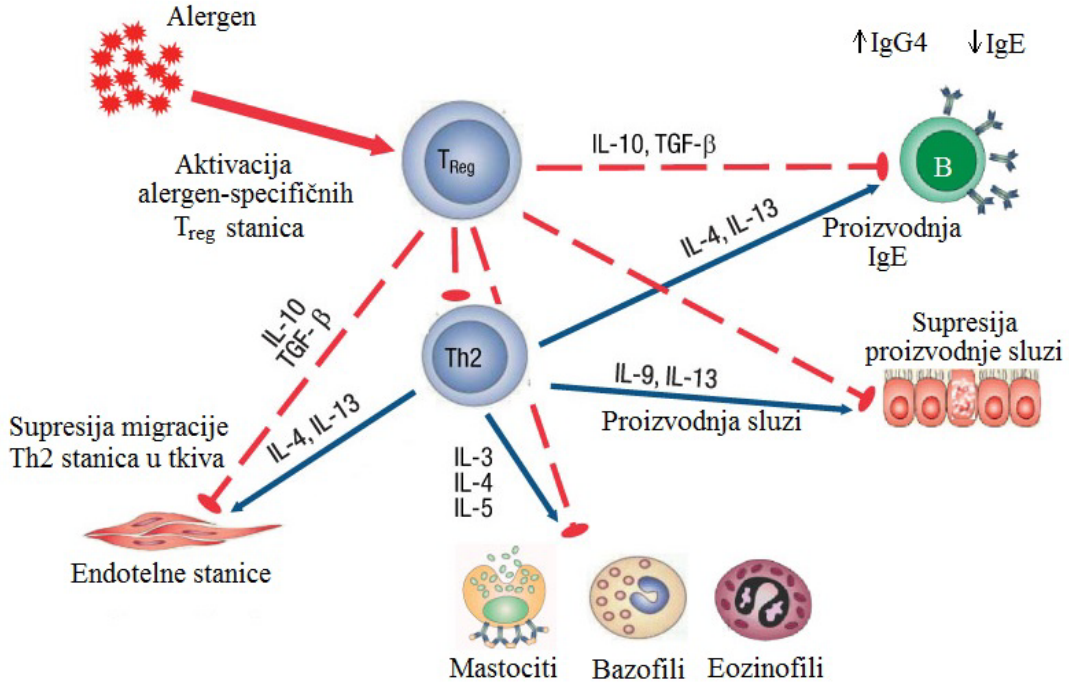
FoxP3 utječe na razvoj i funkciju T_{reg}limfocita. U interakciji sa stotinama gena utječe na njihovu transkripciju djelujući kao njihov aktivator ili supresor te na taj način kontrolira gene za enzime staničnog metabolizma, molekule za prijenos staničnog signala i molekule na staničnoj površini, transkripcijske čimbenike i mikroRNA, a jedna od ključnih uloga mu je vezanje za komplekse transkripcije te preusmjeravanje diferencijacije limfocita T iz Th1, Th2 i limfocita Th17 u T_{reg}-limfocite (Sakaguchi i suradnici, 2008). Pošto je diferencijacija navedenih vrsta limfocita suprimirana, doći će i do izostanka stvaranja efektorskih citokina, IFN-γ, IL-4 i IL-17, a s druge strane povećat će se ekspresija CD25, CTLA-4 i GITR, molekula karakterističnih za Treg limfocite. Anergija T_{reg}limfocita posljedica je inhibicije proizvodnje IL-2, pošto T_{reg} eksprimiraju CD25, receptor za IL-2, a istovremeno je inhibirana proizvodnja tog citokina, pa u prisustvu antigena u T_{reg}limfocita izostaje diferencijacija (Pevec i suradnici, 2011). S druge strane, ukoliko postoje efektorski limfociti T i proizvodnja IL-2, diferencijacija T_{reg}limfocita ostat će održana te će doći do njihove supresivne aktivnosti (Liao i suradnici, 2013).

Istraživanje (Miyara i suradnici, 2009) dovelo je do novih spoznaja koje FoxP3+ limfocite, ovisno o funkcijama i fenotipu, dijele u tri skupine. Podjela se temelji na razini ekspresije FoxP3 te na postojanju ili ne postojanju biljega naivnih limfocita T, CD45RA. Ukoliko je razina FoxP3 visoka, a CD45RA se ne nalazi radi se o aktiviranim T_{reg}limfocitima, a_{Treg} (od engl. activated T_{reg}), fenotipski $FoxP3^{hi}CD45RA^{-}$, stanicama koje su potpuno diferencirane i učinkovito obavljaju svoje supresivne funkcije. Mirujući T_{reg}limfociti imaju fenotip $FoxP3^{lo}CD45RA^{+}$, eksprimiraju CD45RA uz nisku espresiju FoxP3 i radi se o naivnim stanicama koje pod utjecajem antigena mogu proliferirati i diferencirati u aT_{reg}. Treća skupina nosi fenotip $FoxP3^{lo}CD45RA^{-}$, niska ekspresija Fox3P bez ekspresije CD45RA, nazivaju se NE-regulacijski limfociti T (od engl. non-T_{reg} cells), stvaraju citokine Il-2, IFN-γ i IL-17 što upućuje na to da je riječ o efektorskim stanicama.

5.3. MEHANIZMI DJELOVANJA SPECIFIČNE IMUNOTERAPIJE

Alergen specifična imunoterapija (ASIT) učinkovita je metoda liječenja alergijskih bolesti posredovanih IgE protutijelima a osnovna joj je zadaća postići stanje imunološke

tolerancije na određene alergene. Imunološki mehanizmi koji leže u podlozi ASIT-e kompleksni su te se isprepliću kroz sve faze i utječu na sve stanice koje posreduju nastanak preosjetljivosti tipa I. U modulaciji imunoloških reakcija na alergen ključnu ulogu imaju ranije T_{reg}limfociti koji suprimiraju efektorske stanice odgovorne za alergijske reakcije. Prema dosadašnjim spoznajama ključne su dvije skupine T_{reg}limfocita koje stvaraju IL-10: limfociti Tr1 i citokinom TGF- β potaknuti $FoxP3^{+}$limfociti T (Tr1-like)(Pevec i suradnici, 2011). T_{reg} limfociti djeluju već na prve stanice sudionike imunoloških reakcija- predočne stanice. U prisutnosti IL-10 dendritičke stanice ne diferenciraju u potpunosti te na njima nalazimo smanjenu ekspresiju adhezijskih, kostimulacijskih i HLA II molekula (Gordon i suradnici, 2014). Radi se o tolerogenim dendritičkim stanicama koje, osim što suprimiraju nastanak alergijske reakcije, posreduju i stvaranju novih T_{reg}limfocita. Za nastanak T_{reg}, osim tolerogenih dendritičkih stanica, nužno je i istodobno prisustvo TGF-β, a novonastali T_{reg} ključ su modulacije alergije jer će istovremenom proizvodnjom IL-10 i TGF-β uzrokovati daljnje stvaranje T_{reg} umjesto efektorskih Th2 stanica (Travis i Sheppard, 2014). Drugi važan učinak IL-10 je izotipsko prekapčanje u limfocitima B koje uzrokuje povećanu proizvodnju IgG4 protutijela i dovodi do smanjenja omjera IgE/IgG4 (Meiler i suradnici, 2008). Zbog osobitosti u građi i funkciji sIgG4 ne aktiviraju komplement i stanice, ali se mogu vezati za alergen te spriječiti njegovo vezanje za IgE i oslobađanje medijatora iz efektorskih stanica. Uz to spriječit će i vezanje alergena za receptore specifičnih limfocita B i time zaustaviti proizvodnju IgE protutijela. Uz to će i spriječiti vezanje alergena za FcεRi i FcεRII receptore predočnih stanica i time zaustaviti proces olakšanog predočavanja antigena Th2 stanicama (Foley i suradnici, 2007). Osim povećanja koncentracije, dugotrajna izloženost alergenu u sklopu ASIT-e dovest će do funkcionalnih promjena u sIgG4, povećat će im se specifičnost i afinitet za alergen te su zbog toga za učinkovitost terapije prikladniji testovi funkcionalne sposobnosti od mjerenja koncentracije antijela (Wachholz i Durham, 2004). Naposljetku, učinci T_{reg} manifestiraju se i na samim stanicama koje izlučuju medijatore pa tako u mastocita i bazofila uzrokuju povećanje praga podražljivosti i smanjuju oslobađanje medijatora, a uloga važna za kasne faze reakcije je smanjena hiperreaktivnost zbog manje infiltracije sluznice dišnih puteva mastocitima i eozinofilima (Foley i suradnici, 2007).



Slika 2. Uloga T_{reg} u mehanizmima SIT. Crvene iscrtkane strelice označuju inhibiciju, plave aktivaciju.

Prema:

http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3345/kjp.2013.56.12.505&vmode=PUBREADER#!po=1.38889

5.4. KLINIČKI ASPEKTI ALERGEN SPECIFIČNE IMUNOTERAPIJE

Alergen specifična imunoterapija metoda je koja nizom složenih mehanizama modulira imunološki odgovor, dovodi do tolerancije na antigen i trajnog povlačenja simptoma a temelji se na opetovanoj primjeni ekstrakta alergena. Primjenjuju se standardizirani alergenski pripravci, kako bi se smanjio rizik od nuspojava, prema različitim shemama primjene, ovisne o proizvođaču. Alergenski ekstrakt može se javiti kao vodeni *depot*, modificirani pripravak ili

mješavine alergenskih ekstrakta. SIT-a se primjenjuje na dva načina, duboko supkutano u volarnu stranu podlaktice pod kutom od 45° uz 20 minutnu opservaciju pacijenta i bilježenje nuspojava, ili sublingvalno (SLIT), kod kuće, u obliku kapi koje se 1-2 minute zadržavaju ispod jezika a zatim progutaju (Canonica i suradnici, 2014). ASIT-a se provodi u dvije faze, inicijalnoj te fazi održavanja. U inicijalnoj fazi, koja traje od 3 dana do 6 mjeseci postupno se povisuje doza alergena dok se ne dosegne doza održavanja koja se ponavlja u redovitim razmacima od 3 do 5 godina i to nazivamo faza održavanja (Canonica i suradnici, 2014). Medikamentna ili profilaktička terapija ne prekida se tijekom ASIT-e, a odluku o eventualnom prekidu ili smjanjenju terapije donosi liječnik koji je indicirao ASIT-u, nakon procijene učinka ASIT-e (Canonica i suradnici, 2014). Regresija alergijskih bolesti nakon specifične imunoterapije je dugotrajna nakon prekida liječenja, a traje između 3 do 15 godina (Cappella i Durham, 2013). Specifična imunoterapija uzima se u obzir u pacijenata s alergijskim rinitisom, alergijskom konjuktivitisom, alergijskom astmom i preosjetljivosti na ubode insekata, dok s druge strane, ne preporuča se u pacijenata s alergijom na određenu vrstu hrane, urtikarijom ili angioedemom (Canonica i suradnici, 2014). ASIT-a se samtra niskorizičnim načinom liječenja jer do sistemskih nuspojava pri primjeni standardiziranih pripravaka dolazi u 1/1000000 slučajeva (Canonica i suradnici, 2014). Kontraindikacije za primjenu ASIT-e su stanja koja smanjuju mogućnost preživljenja eventualne sistemske reakcije na primjenu ASIT-e, kao na primjer teške kardiovaskularne bolesti ili astma koja ne odgovara na farmakoterapiju (www.eaaci.org). Druge kontraindikacije su maligne bolesti, teške imunodeficijencije, teške psihičke bolesti, loša suradljivost bolesnika te započinjanje ASIT-e u trudnoći (www.eaaci.org). Svakodnevno se istražuju novi pristupi ASIT-u ukoliko bi se poboljšala učinkovitost liječenja, smanjilo trajanje terapije i došlo do manjeg broja nuspojava. Najnoviji pristupi koji se istražuju uključuju epikutanu ASIT-u, kombinaciju peptidnih alergena peludi trave s Pre S proteinom HBV virusa, imunoterapija s epitopima T stanica te intralimfatička imunoterapija (Focke-Tejkl i suradnici, 2015).

U određenim alergološkim centrima posljednjih se desetak godina koriste rekombinantni oblici alergena. Potreba za razvojem rekombinantnih alergena javila se u svrhu poboljšanja sigurnosti i učinkovitosti ASIT-e, a uz to terapija rekombinantnim alergenima učinkovitija je u liječenju alergija na hranu i atopijskog dermatitisa, čije liječenje alergenskim ekstraktima ne daje zadovoljavajuće rezultate. Rekombinantni alergeni podrazumijevaju molekule sa samanjenom alergogenskom aktivnosti ili povećanim svojstvima imunogenosti te peptidne fragmente koji odgovaraju epitopima specifičnih alergena (Jutel i suradnici, 2012).

Ubodi insekata uzrokuju više od 10% svih slučajeva anafilaksije, a najčešće se radi o ubodu pčela, osa te mrava. Reakcija nakon uboda može biti životno ugrožavajuća te zahtjeva hitno medicinsko zbrinjavanje i prevenciju ponovnog incidenta. ASIT-a provodi se u pacijenata s prethodnom alergijskom reakcijom na ubod insekata i prisustvom IgE protutijela specifičnih za otrov insekta (Pesek i Lockey, 2013). ASIT-a vrlo je učinkovita i dovodi do smanjenja rizika ponovne pojave anafilaksije na manje od 5-20%, a trajanje terapije je između 3 i 5 godina (Müller i Ring, 2015).

5.5. ZAKLJUČAK

Specifična imunoterapija u današnje vrijeme smatra se optimalnom terapijom za alergijske bolesti. Nove spoznaje o patofiziološkom mehanizmu djelovanja ASIT-e omogućuju razumijevanje učinaka terapije i poboljšanja u kliničkoj primjeni. Novi načini primjene ASIT-e te definiranje skupina bolesnika koji bi mogli biti kandidati za ASIT-u mogli bi dovesti do još raširenije primjene ove metode liječenja. Porast incidencije alergijskih bolesti uvjetuje daljnja istraživanja, studije i razvitak ASIT-e, ali ona je i u ovom trenutku efikasna, niskorizična i jedina etiološka terapija.

6. ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorici, prof.dr.sc. Asji Stipić-Marković na uloženom vremenu i trudu te smjernicama i sugestijama bez kojih izrada ovog rada ne bi bila moguća. Nadalje, zahvale upućujem kolegici Lani Jurlin, dr. med. na pomoći oko izrade vizualnog identiteta diplomskog rada.

7. LITERATURA

Abul K. Abbass, Andrew H. Lichtman, Jordan S. Pober
Cellular and molecular immunology – 4th edition, 2000
W.B. Saunders Company

Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of
allergic disease in the big picture of regulatory T cells. J Allergy
Clin Immunol 2009; 123: 35-46.

Canonica GW, Cox L, Pawankar R, Baena-Cagnani CE, Blaiss M et al. Sublingual immunotherapy: World Allergy Organization position paper 2013 update. World Allergy Organization Journal 2014; 7: 6.

Cappella A, Durham S.R. Allergen immunotherapy for allergic respiratory diseases. Hum Vaccin Immunother. 2012; 8: 1499–1512.

Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in
peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory
T cells by Th3 cells derived from TGF-β T cell-transgenic mice.
J Immunol 2007; 178: 179-185.

Chen W, Jin W, Hardegen N i sur. Conversion of peripheral
CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T
cells by TGF-β induction of transcription factor Foxp3. J Exp
Med 2003; 198: 75-86.

Cox L, Li TJ, Nelson H, Lockey R
Allergen immunotherapy: A practice parameter
second update. J allergy clin immunol 2007; 120: 26-85.

Durham SR, Walker SM, Varga EM i sur. Long-term
clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. N Engl J
Med 1999; 341: 68-75.

Focke-Tejkl M, Weber M, Niespodziana K, Neubauer A, Huber H, Henning R et al. Development and characterization of a recombinant, hypoallergenic, peptide-based vaccine for grass pollen allergy. J Allergy Clin Immunol 2015; 135: 1207–1217

Foley SC, Prefontaine D, D'Antoni M, Hamid Q. Images
in allergy and immunology: regulatory T cells in allergic disease.
J Allergy Clin Immunol 2007; 120: 2-6.

Gordon J.R, Ma Y, Churchman L, Gordon S.A, Dawicki W. Regulatory Dendritic Cells for Immunotherapy in Immunologic Diseases. Front Immunol. 2014; 5: 7.

http://www.eaaci.org/component/content/article/719-activities/task-forces/ongoing-task-forces/prevention-and-treatment/3246-contraindications-to-immunotherapy.html

Ito T, Hanabuchi S, Wang YH i sur. Two functional subsets
of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery.
Immunity 2008; 28: 70-80.

Kanceljak-Macan B. Stanje alergen-specifične imunoterapije u Hrvatskoj.
Zbornik radova znanstvenog simpozija „Specifična imunoterapija"
Zagreb, 2011: 15-16.

Liao W, Lin J.X, Leonard W.J. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. Immunity. 2013; 38: 13–25.

Lipozenčić J i suradnici.
Alergijske i imunosne bolesti, 2011.
Medicinska naklada

LiuY, Lan,Q, LuL, ChenM, XiaZ, MaJ, WangJ, FanH, ShenY, RyffelB, BrandD, QuismorioF, LiuZ, HorwitzD.A, XuA, ZhengS.G. PhenotypicandfunctionalcharacteristicofanewlyidentifiedCD8^{+}Foxp3^{-}CD103^{+}regulatoryTcells. J Mol Cell Biol. 2014; 6: 81–92.

Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. Allergy 2008; 63: 55-63.

Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A i sur. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. Immunity 2009; 30: 899-911.

Miyara M, Wing K, Sakaguchi S. Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+ regulatory T-cell activation and expansion. J Allergy Clin Immunol 2009; 123: 49-55.

Pevec B, Radulović Pevec M, Stipić Marković A, Batišta I. Patofiziološki mehanizmi u nastanku i liječenju alergijskih bolesti. Acta Med Croatica, 2011; 65: 391-403.

Pevec B, Radulović Pevec M, Stipić Marković A, Irena Batišta I. Alergija na grinje kućne prašine – kako pobijediti? Acta Med Croatica 2012; 66: 115-125.

Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, Janis Kuby Immunology – 5th edition, 2003 W.H. Freeman and company

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. Cell 2008; 133: 75-87.

Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties
of T regulatory cells. Immunity 2006; 25: 195-201.

Stipić-Marković A, Pevec B, Radulović-Pevec M, Čustović A. Prevalencija simptoma astme, alergijskog rinitisa i konjuktivitisa te atopijskog ekcema: ISAAC u populaciji školske djece u Zagrebu. Acta Med Croatica 2003; 57: 281-285.

Stipić-Marković A, Pevec B, Radulović-Pevec M, Čustović A, Predović J. Allergic diseases in relationship with environmental factors in a population od school children in Zagreb, Croatia. Arh Hig Rada Toksikol 2004; 55: 221-228.

Stipić-Marković A. Fenotipovi astme i poremećaj homeostaze imunološkog sustava. Acta Med Croatica 2011; 65: 129-135.

Stipić-Marković A. State of the art in allergen immunotherapy. Abstract book III Congres of MSACI 2014: 67.

Taylor A, Verhagen J, Akdis CA, Akdis M. T regulatory
cells and allergy. Microbes Infect 2005; 7: 1049-55.

Travis M.A, Sheppard D. TGF-β Activation and Function in Immunity. Annu Rev Immunol. 2014; 32: 51–82.

Wachholz PA, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy:
IgG revisited. Curr Opin Allergy Clin Immunol
2004; 4: 3-8.

8. ŽIVOTOPIS

Lovro Bucić, rođen sam 28.8.1990. u Požegi, Republika Hrvatska. Srednjoškolsko obrazovanje završio sam 2009. godine u Gimnaziji Požega. Medicinski fakultet sveučilišta u Zagrebu upisao sam 2009. Godine. Aktivno govorim engleski jezik.