

Zakład Immunologii Klinicznej Akademii Medycznej w Lublinie
Department of Clinical Immunology, University School of Medicine, Lublin

MAŁGORZATA BARTKOWIAK-EMERYK

*Szczepionki alergenowe — immunomodulacja
alergicznego procesu zapalnego*

Allergen vaccines — immunomodulation of allergic inflammation

Immunoterapią swoistą (SIT) określane jest podawanie osobnikowi alergicznemu szczepionki alergenowej w dawkach stopniowo wzrastających, aż do dawki, która skutecznie łagodzi objawy wywołane wcześniejszą ekspozycją na określony alergen [6].

Metoda ta zapoczątkowana w roku 1911 przez Noona i Freemana jako „przyzwyczajanie” organizmu do uczulającego alergenu [33], uznawana była już wówczas jako leczenie przyczynowe chorób alergicznych, chociaż wiedza na temat mechanizmów SIT opierała się jedynie na klinicznej ocenie skuteczności tego postępowania. Należy niestety stwierdzić, że pomimo licznych współczesnych badań, które nastąpiły dzięki rozwojowi zarówno technik pozyskiwania materiału biologicznego, jak również technik immunologicznych znakowania fenotypu komórek, określania ich aktywacji i zdolności do uwalniania mediatorów zapalnych, mechanizmy SIT nadal nie zostały dokładnie poznane [6, 25, 32]. Wiele jednak nowych danych wskazuje, że obserwowana w trakcie skutecznej SIT zmiana humoralnej odpowiedzi immunologicznej jest efektem wtórnym do wpływu immunoterapii alergenowej na komórki regulujące alergiczny proces zapalny [6].

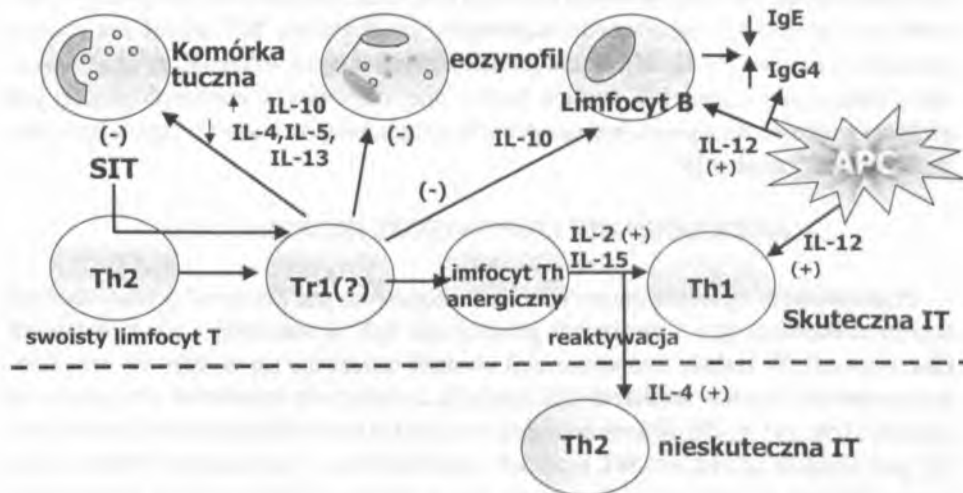
MODULOWANIE ODPOWIEDZI HUMORALNEJ

Podstawowym wyróżnikiem w chorobach atopowych jest obecność podwyższonych stężeń całkowitej IgE i swoistych przeciwciał IgE w surowicy i na komórkach efektorowych. W trakcie immunoterapii swoistej obserwuje się najczęściej przejściowy wzrost alergenowo swoistych IgE (asIgE), a następnie stopniowe obniżenie ich poziomu (ryc. 1) [16, 29]. Jednak zmniejszenie, czy też normalizacja surowicznych stężeń IgE jest późnym zjawiskiem SIT, a ponadto słabo koreluje z uzyskanym efektem klinicznym. Wydaje się więc, że zmiany te nie mogą wyjaśniać mechanizmów immunoterapii swoistej, jak również oznaczenia IgE nie powinny służyć do monitorowania SIT [6].

Początkowo wyjaśniano działanie SIT teorią „przeciwciał blokujących” [31, 32], zgodnie z którą wstrzykiwane pozaustrojowo alergeny powodują wytworzenie przeciwciał wiążących alergen przed jego rozpoznaniem na komórkach efektorowych, a więc zapobiegających połączeniu alergenu z przeciwciałami klasy IgE. Ten rodzaj przeciwciał, należących głównie do podklasy IgG₄, był do niedawna wymieniany jako jeden z głównych mechanizmów warunkujących korzystny efekt immunoterapii swoistej [18]. W wyniku SIT z alergenami wziewnymi i jadami owadów obserwuje się wprawdzie wzrost surowiczych stężeń alergenowo swoistych IgG₄ [3, 27, 34], jednak obecnie wiadomo, że zjawisko to jest wynikiem zmiany syntezy podklas z IgG₁ na IgG₄ [6]. Niektórzy autorzy sugerują nawet prognostyczne znaczenie wskaźnika asIgG₄/asIgG₁ [15], jednak trudno jednoznacznie wykazać związek przyczynowy między stężeniem IgG₄ a skutecznością SIT alergenami wziewnymi [7, 8, 35]. Obecność podwyższonych stężeń swoistych IgG₄ należałoby więc uważać jedynie za wynik przewlekłej immunizacji alergenem [26].

MODULOWANIE ODPOWIEDZI KOMÓRKOWEJ

Głównymi komórkami efektorowymi zapalnej reakcji alergicznej są komórki tuczne i bazofile krwi obwodowej oraz granulocyty kwasochłonne. Immunoterapia swoista zmniejsza aktywację komórek zapalnych i ich napływ do miejsca reakcji alergicznej. Taki efekt SIT obserwowano w stosunku do komórek tucznych — stwierdzono między innymi zmniejszenie liczby komórek tucznych w błonie śluzowej nosa u dzieci odczulanych na roztocza kurzu domowego [20], a także u dorosłych z nadwrażliwością na pyłki traw [5]. Zmiany te korelowały z obniżonym stężeniem histaminy i prostaglandyny D₂ (PGD₂) w wydzielinie nosowej po prowokacji alergenem. Z kolei w badaniach nad efektem SIT z pyłkami brzozy, u pacjentów odczulanych obserwowano za-



Ryc. 1. Mechanizmy immunoterapii swoistej (wg 1, 2 i 23 w modyfikacji własnej)

hamowanie wzrostu nadreaktywności oskrzeli w trakcie sezonu pylenia, jak również wzrostu liczby eozynofilów i eozynofilowego białka kationowego (ECP) w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych [36].

Niektóre ostatnie badania wskazują na przedłużony efekt SIT, nawet kilka lat po zaprzestaniu odczulania [9, 12]. Mechanizm działania SIT nie można więc wytłumaczyć jedynie oddziaływaniem na komórki efektorowe zapalenia alergicznego, mając na uwadze między innymi krótki okres przeżycia komórek tucznych i eozynofilów [28].

Elementami komórkowym o funkcji nadrzędnej w regulacji odpowiedzi immunologicznej są limfocyty T. W chorobach atopowych zarówno synteza przeciwciał IgE, jak i eozynofilia i aktywacja komórek tucznych pozostaje pod wpływem cytokin uwalnianych przez aktywowane limfocyty T pomocnicze typu Th_2 . Wiele danych wskazuje, że podstawowym mechanizmem SIT jest modulowanie odpowiedzi limfocytów T aktywowanych naturalnym kontaktem z alergenem [6]; a więc skuteczna SIT powoduje reorientację typu aktywności swoistych limfocytów T od dominacji Th_2 uwalniających głównie interleukinę 4 (IL-4) i IL-13, w kierunku Th_1 , wydzielających między innymi znaczne ilości interferonu γ (IFN- γ).

Zwiększenie liczby komórek CD4+ wykazujących ekspresję dla IFN- γ obserwowano w błonie śluzowej nosa u pacjentów z alergicznym nieżytem nosa odczulanych na pyłki traw [13]. Z kolei w badaniach *in vitro* wraz ze wzrostem stężenia alergenu stwierdzono zwiększenie syntezy IFN- γ i supresję IL-4 przez swoiste alergenowo klonu limfocytów T [10, 24]. Ta zmiana funkcji limfocytów T wydaje się właśnie prowadzić do przywrócenia prawidłowej odpowiedzi na alergeny u osób atopowych, gdyż różnicowanie limfocytów B i synteza IgG₄ oraz hamowanie syntezy, zależne są między innymi od oddziaływania IFN- γ [23, 25].

Badania ostatnich lat dowodzą, że zmiana funkcjonalnego fenotypu limfocytów Th nie jest zjawiskiem niejednoczasowym, lecz obejmuje początkową anergię swoistych limfocytów T_2 i następczą reaktywację tych komórek przez cytokiny mikrośrodowiska [2, 23]. Anergia swoistych limfocytów T jest ponadto procesem aktywnym i nie wynikającym z apoptozy, czy też klonalnej delecji, na co wskazuje możliwość reaktywacji tych komórek *in vitro* w obecności IL-2 i IL-15 [4].

Wyjaśnieniem obserwowanych w trakcie SIT zahamowania aktywacji i proliferacji limfocytów, może być zmiana ekspresji markera komórek jednojądrzastych CD28 — cząsteczki kostymulującej przekazanie sygnału aktywacji z receptora TCR do wnętrza limfocyta T. W mechanizmie tym, tj. indukowania anergii limfocytów T, wskazuje się na zasadniczą rolę IL-10, która poprzez bezpośrednie hamowanie fosforylacji tyrozyny i przyłączenia kinazy fosfatydyloinozytolu do cząsteczki CD28, blokuje przekazanie sygnału aktywacji przez CD28 [22].

Interleukina 10 — cytokina o silnych właściwościach przeciwzapalnych, wydzielana jest głównie przez aktywowane limfocyty T_2 , ale także przez limfocyty B, monocyty i makrofagi. Niektórzy autorzy sugerują przy podawaniu dużych dawek antygeny powstanie odrębnej populacji limfocytów Th , tj. $Tr1$ regulatorowych, wydzielających IL-10 i czynnik wzrostu β (TGF- β) [14]. IL-10 wykazuje zdolność do hamowania proliferacji limfocytów pobudzonych przez antygeny i wytwarzania cytokin zarówno przez

komórki typu Th₁, jak i Th₂, a także przez monocyty i makrofagi. W odniesieniu do tych ostatnich IL-10 zmniejsza również zdolność do prezentacji antygeny przez hamowanie ekspresji cząsteczek MHC klasy II oraz ligandów kostymulujących, tj. cząsteczek CD80 i CD86 [22].

Na podstawie badań obecności cytokin wewnątrzkomórkowych zaobserwowano, że w początkowym etapie SIT głównie swoiste limfocyty T wykazują zwiększoną produkcję IL-10, natomiast limfocyty B i monocyty produkujące IL-10 zaangażowane są na etapie podtrzymywania anergii komórek T [2]. Stwierdzono ponadto, że w obecności IL-10 występuje zahamowanie produkcji IgE i zwiększona synteza IgG₄ przez limfocyty B, a także zahamowanie dojrzewania i aktywacji eozynofiliów, komórek tłuszcznych i bazoofilów [2, 23].

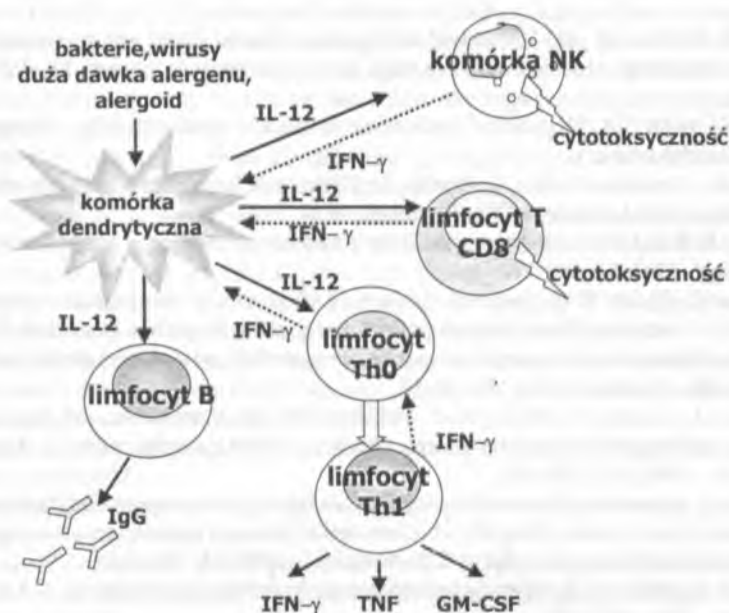
Podsumowując więc aktualne poglądy na mechanizmy działania immunoterapii swoistej: SIT prowadzi do wzrostu wytwarzania IL-10, która z kolei przez mechanizm autokryny powoduje anergię swoistych limfocytów Th₂ i współuczestniczy zarówno w regulacji zaangażowania komórek zapalnych w miejscowym procesie alergicznym, jak również w regulacji syntezy IgE i IgG₄.

MIKROŚRODOWISKO KOMÓRKOWE JAKO ELEMENT KLUCZOWY MECHANIZMÓW SIT ?

Przy analizowaniu możliwych mechanizmów immunoterapii alergenami podkreśla się znaczenie mikrośrodowiska [1, 23], a więc poprzez układ cytokin wpływu także innych komórek uczestniczących w alergicznym zapaleniu w tkankach. Wykazano bowiem, że o sukcesie SIT decyduje rodzaj cytokin oddziaływujących na areaktywne limfocyty T i reaktywujących te komórki w kierunku fenotypu funkcjonalnego Th₁. Stwierdzono, że w warunkach *in vitro* w obecności IL-2 i IL-15 komórki uzyskują fenotyp Th₁, natomiast IL-4 promuje fenotyp Th₂ [4].

Ważnym czynnikiem indukującym odpowiedź typu Th₁ jest IL-12, której miejscowa produkcja głównie przez komórki prezentujące antygen, ale także przez komórki tłuszczne i granulocyty, może tę odpowiedź podtrzymywać lub wzmacniać [6]. Głównym źródłem IL-12 są komórki dendrytyczne, stanowiące najważniejszą populację komórek prezentujących antygen w skórze i błonach śluzowych, gdzie zapoczątkowują odpowiedź limfocytów T [37, 41]. Istnieje zależność między komórkami wykazującymi zwiększoną ekspresję mRNA dla IL-12 wraz z zahamowaniem późnej odpowiedzi skórnej na alergen po skutecznej SIT [19]. Dane te mogą potwierdzać hipotezę sterowania odpowiedzi typu Th₁ przez IL-12, a tym samym wskazywać na ważną rolę komórek dendrytycznych w mechanizmach SIT.

Komórki dendrytyczne nie są populacją jednolitą i wykazują znaczną plastyczność zróżnicowania w zależności od pochodzenia (tj. szpikowej lub limfoidalnej komórki progenitorowej) [42], a w znacznym stopniu od rodzaju sygnału aktywującego [17, 38]. Równocześnie niektórzy autorzy sugerują, że rodzaj indukowanej odpowiedzi limfocytów T zależy od stopnia aktywności komórek dendrytycznych, gdyż jak wykazano znaczny wzrost uwalniania IL-12 i stymulacja naiwnych limfocytów T w kierunku



Ryc. 2. Główne właściwości oddziaływania interleukiny 12 (wg 28 w modyfikacji własnej)

komórek typu Th_1 , następuje tylko w określonym czasie po aktywacji komórek dendrytycznych [17]. Innymi proponowanymi czynnikami, które mogą wpływać na typ odpowiedzi immunologicznej są: droga przekazywania sygnału kostymulującego przez cząsteczki CD28 i ligandy CD80 i CD86 na komórkach dendrytycznych, czas kontaktu między komórką APC i limfocytom T, a także dawka alergenu i jego powinowactwo do receptora limfocytów T (TCR) i cząsteczek MHC [17]. Te ostatnie zjawiska były między innymi podstawą teoretyczną poprawy skuteczności i bezpieczeństwa SIT dzięki zastosowaniu alergoidów, tj. alergenów modyfikowanych chemicznie lub rekombinowanych alergenów. Uzyskane w tych preparatach zmiany konformacji epitopów wiążących przeciwciała spowodowały zmniejszenie reakcji z przeciwciałami IgE, przy zachowaniu zdolności do prezentacji syntetycznie przygotowanych alergenów przez komórki dendrytyczne limfocytom T i indukowania odpowiedzi typu Th_1 [19, 39, 40].

Zestawione powyżej teorie i wyniki badań naukowych wspierają celowość stosowania immunoterapii swoistej dla hamowania lub wygaszania nieprawidłowej humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej w chorobach atopowych. Równocześnie potwierdzają przyczynowy charakter stosowania szczepionek alergenowych jako jedyne postępowania, które może zmienić naturalny przebieg chorób alergicznych poprzez modulację procesu zapalnego [6].

PIŚMIENICTWO

1. Akdis C.A., Blaser K.: IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. *FASEB J.*, 1999; 13: 603.
2. Blaser K., Akdis C.A.: Regulatory mechanisms in specific immunotherapy. *Immunol. Lett.*, 2000; 73: 83 (abstract).
3. Boluda L., Fernandez-Caldas E., Berrens L.: The role of IgG in type-I allergy: an unsolved problem. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 1997; 7: 205-210.
4. Bonifazi F., Bilo M.B.: Efficacy of specific immunotherapy in allergic asthma: myth or reality. *Allergy*, 1997; 52: 698-710.
5. Bousquet J., Becker W.M., Hejaoui A. *i wsp.*: Differences in clinical and immunological reactivity of patients allergic to grass pollens and to multiple-pollen species. II. Efficacy of a double-blind, placebo-controlled, specific immunotherapy with standardized extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1991; 88: 43-53.
6. Bousquet J., Lockey R., Malling H.-J. and the WHO panel members.: Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1998; 102: 558-562.
7. Bousquet J., Maasch H., Martinat B. *i wsp.*: Double-blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. II. Comparison between parameters assessing the efficacy of immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1998; 82: 439-446.
8. Bousquet J., Michael E.B.: Specific immunotherapy in asthma: is it effective? *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1994; 94: 1-11.
9. Des Roches A., Paradis L., Knani I. *i wsp.*: Immunotherapy with a standardized dermatophagoides pteronyssinu extract. V. Duration of the efficacy after its cessation. *Allergy*, 1996; 51: 430-434.
10. Dokic A., Nethe A., Kleine-Tebbe J. *i wsp.*: Mediator release is altered in immunotherapy-treated patients: a 4-year study. *Allergy*, 1996; 51: 796-803.
11. Durham S.R., Varney V.A., Jacobson M.R. *i wsp.*: Effect of grass pollen immunotherapy on allergen-induced early and late nasal responses. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1993; 91: 290-298.
12. Durham S., Varney V., Gaga M. *i wsp.*: Grass pollen immunotherapy remains effective 3 years after discontinuation: a double-blind, placebo-controlled withdrawal study. *Clin. Exp. Allergy*, 1998;
13. Durham S., Ying S., Varney V.A. *i wsp.*: Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger mRNA for interferon-gamma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996; 97: 1356-1365.
14. Garside P., Mowat A.M., Khortus A.: Oral tolerance in disease. *Gut*, 1999; 44: 137-142.
15. Gehlhar K., Schlezak M., Becker W.: Monitoring allergen immunotherapy of pollen-patients: the ratio of allergen-specific IgG₄/IgG₁ correlates with clinical outcome. *Clin. Exp. Allergy*, 1999; 29: 497-506.
16. Gleich G.J., Zimmermann E.M., Henderson L.L. *i wsp.*: Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six-year prospective study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1982; 70: 261-271.
17. Graabbe S., Kampen E., Schuler G.: Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional. *Immunol. Today*, 2000; 21: 431-433.
18. Halpern G.M.: Recent application of IgG₄ in diagnosis and management of allergic disease. *Immunol. Allergy Prac.*, 1986; 8: 386-392.

19. *Hamid Q., Schotman A.E., Jacobson M.R. i wsp.*: Increases in IL-12 (IL-12) messenger RNA+ (mRNA+) cells accompany inhibition of allergen-induced late skin responses after successful grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997; 99: 254–260.
20. *Hedlin G., Silber G., Nacleiro i wsp.*: Comparison of the in vivo and in vitro response to ragweed immunotherapy in children and adults with ragweed-induced rhinitis. *Clin. Exp. Allergy*, 1990; 20: 491–500.
21. *Jeannin P., Lecoznet S., Delneste Y.*: IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J. Immunol.*, 1998; 160: 3555–3561.
22. *Joss A., Akdis A., Blaser K. i wsp.*: Molecular basis of T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and PI3-kinase binding. *Immunol. Lett.*, 2000; 73: 232 (abstract 643).
23. *Jutel M., Malolepszy J.*: Mechanizmy immunoterapii swoistej. W: *Immunoterapia układu oddechowego*, Phusa T (red.), Medpress, Warszawa 2000: 174–180.
24. *Jutel M., Pichler W.I., Skrbic D. i wsp.*: Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN- γ secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J. Immunol.*, 1995; 154: 4187–4197.
25. *Kowalski M., Jutel M.*: Mechanisms of specific immunotherapy of allergic diseases. *Allergy*, 1998; 53: 485–492.
26. *Kruszewski J.*: Krytyczna ocena IgG₄ w monitorowaniu immunoterapii swoistej. *Alergia Astma Immunol.*, 2000; 5 (supl 1): 8–10.
27. *Kruszewski J.*: Presence of allergen-specific IgG-4 during desensitization of patients with hay fever and those sensitized to house dust allergens. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 1991; 59 (suppl.1): 31–39.
28. *Lasek W.*: Nadwrażliwość. W: *Immunologia*, Jakubisiak M (red.), Wydawnictwo Naukowe PWN 1998: 435–473.
29. *Lichtenstein L., Ishizaka K., Norman P. i wsp.*: IgE antibody measurements in ragweed antigens. Relationship to clinical severity and the results of immunotherapy. *Clin. Invest.*, 1973; 52: 472–482.
30. *Loveless H.M.*: Humoral antibody and tissue tolerance induced in pollen sensitive individuals by specific therapy, preliminary report. *South. Med. J.*, 1940; 33: 869–872.
31. *Loveless H.M.*: Immunological studies of pollinosis I. Presence of two antibodies related to the same pollen-antigen in the serum of treated hay-fever patients. *J. Immunol.*, 1940; 38: 25–27.
32. *Malling H.-J.*: Immunotherapy as a effective tool in allergy treatment. *Allergy*, 1998; 53: 461–472.
33. *Noon L.*: Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet*, 1911; 1: 1572–1573.
34. *Oehling A.K., Sanz M.L., Resano A.*: Importance of in vitro IgG4 determination in immunotherapy follow-up of inhalant allergens. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 1998; 8: 333–339.
35. *Orotolani C., Paterello E.A., Incorvaia C. i wsp.*: A double-blind placebo controlled study of immunotherapy with an alginate-conjugated extract of *Parietaria judaica* in patients with *Parietaria* hay fever. *Allergy*, 1994; 49: 13–21.
36. *Rak S., Lowhagen O., Yenge P.*: The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen-allergic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1988; 82: 470–480.
37. *Reid S.D., Penna G., Adorini L. i wsp.*: The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.*, 2000; 12: 114–121.
38. *Rissoan M.C., Sonmelis V., Kadowaki N. i wsp.*: Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*, 1999; 1183–1186.

39. Schramm G., Kahlert H., Suck R. *i wsp.*: "Alergen engineering". Variants of the timothy grass pollen allergen Ph1 p 5b with reduced IgE-binding capacity but conserved T cell reactivity. *J. Immunol.*, 1999; 162: 2406–2414.
40. Singh M.B., deWeerd N., Bhalla P.L.: Genetically engineered plant allergens with reduced anaphylactic activity. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1999; 119: 75–85.
41. Steinnam R.M., Banchereau J.: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998; 392: 245–252.
42. Vieira P.L., de Jong E.C., Wierenga E.A. *i wsp.*: Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cell differentiation. *J. Immunol.*, 2000; 164: 4507–4512.

SUMMARY

Mechanisms of specific immunotherapy (SIT) are not clearly understood. Recent studies suggest that changes of humoral response may be secondary to the influence of immunotherapy on allergic inflammatory cell response. The influence of specific immunotherapy on effector cells was discussed as well as a shift of specific T lymphocytes activation favouring Th₁ response. The role of IL-10 in anergy induction of Th₂ lymphocytes and the role of dendritic cells and IL-12 as microenvironmental factors in upregulation of Th₁ response was underlined.