

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИЗДАНИЕ

Сублингвальная иммунотерапия мономерными аллергоидами *Dermatophagoides* понижает уровень аллерген-специфического иммуноглобулина Е и повышает продукцию γ -интерферона и интерлейкина-10.

L. Cosmi^{1*}, V. Santarlasci^{1*}, R. Angeli*, F. Liotta*, L. Maggi*, F. Frosali*, O. Rossi*, P. Falagiani[†], G. Riva[†], S. Romagnani*, F. Annunziato* and E. Maggi*

*Center of Research, Transfer, High Education 'DENOthe', University of Florence, Firenze and[†] Lofarma Allergeni, SpA, Milano, Italy

Клиническая и экспериментальная аллергология**Аннотация**

Предпосылки. Клиническая эффективность и безопасность сублингвальной иммунотерапии (СЛИТ) аэроаллергенами были продемонстрированы многими исследованиями, в то время как иммунологические изменения, вызываемые этим лечением, которые могут быть причиной клинического улучшения, по-прежнему неясны.

Цель. *in vitro* изучение влияния успешной СЛИТ на обусловленный аллергеном ответ Т-клеток и секрецию цитокинов, а также сывороточный уровень хемокинов и антител IgE, IgG1 и IgG4 (Ат).

Материалы и методы. Двадцать пять сенсibilизированных к *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) пациентов с симптомами круглогодичного ринита и/или ринита и астмы были рандомизированы на две группы (13 не получали лечение (UT) и 12 получали СЛИТ-терапию) для исследования длительностью 1,5 года. Пролиферативный ответ мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) на очищенный Der p1 аллерген, продукцию цитокинов (IFN- γ , IL-4, IL-10 и TGF- β) и сывороточные уровни хемокинов, ассоциированные с ответами Т-хелперов типа 1 (Th1) (CXCL10) или Т-хелперов типа 2 (Th2) (CCL22) и Dp-специфических IgE, IgG1 и IgG4 антител оценивались до и спустя 6 месяцев после лечения.

Результаты. СЛИТ индуцировала у пациентов значительное снижение уровня симптомов и потребности в медикаментах через 6, 12 и 18 месяцев с момента начала лечения, при сравнении с пациентами, не получавшими лечение. У пациентов, получавших СЛИТ, наблюдалось значительное снижение уровней сывороточных Dp-специфических IgE, в то время как уровень суммарного IgE, а также специфических IgG1 и IgG4 оставались неизменными. Пролиферативный ответ *in vitro* Der p1 аллерген-специфических Т-клеток через 6 месяцев лечения был снижен, при этом влияния неспецифических антигенов (стрептокиназа) на пролиферацию Т-клеток не наблюдалось. Кроме того, спустя 6 месяцев с момента начала лечения, был значительно повышен уровень индуцированных Der p1 IFN- γ и IL-10 в супернатантах культур периферических мононуклеарных клеток крови (PBMC) пациентов, по сравнению с тем, что наблюдалось в начале терапии.

¹ Эти авторы принимали участие в данной работе в равной степени

Выводы. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что вызванное аллергеном увеличение уровней IL-10 и IFN- γ , продуцируемых Т-клетками, предшествует и взаимосвязано со СЛИТ-индуцированным понижением уровня специфических IgE, и является научным обоснованием клинических преимуществ СЛИТ для пациентов-аллергиков.

Ключевые слова. Аллергический ринит и астма, цитокины, Der p 1 аллерген, IgE и IgG антитела, мономерный аллергоид, сублингвальная иммунотерапия, оценка уровня симптомов и потребности в медикаментах, пролиферация Т-клеток, субпопуляции Th1, Th2 и Treg клеток.

Подано 4 февраля 2005; пересмотрено 3 ноября 2005; принято 22 ноября 2005

Корреспонденция:

Dr E. Maggi, Centro di Ricerca,
Trasferimento e Alta Formazione
'DENOThe', Universita di Firenze,
Policlinico di Careggi, Viale Morgagni
85, 50134 Firenze, Italy.
E-mail: e.maggi@dmi.unifi.it

Введение

Аллерген-специфическая иммунотерапия признана высокоэффективным методом лечения больных с тяжелым аллергическим ринитом (АР) и / или астмой, и рекомендуется ВОЗ в качестве составной части стратегии лечения аллергии [1-3]. Ряд исследований показали, что с помощью иммунотерапии, основанной на подкожном введении возрастающих доз аллергена (СИТ), достигается гипосенсибилизация и снижение уровней раннего и позднего ответов, возникающих при естественной экспозиции самого аллергена. СИТ сопровождается увеличением титра аллерген-специфических IgG антител, в частности изотипа IgG4 [4], который блокирует IgE-зависимое высвобождение медиаторов базофилами и тучными клетками. Это приводит к снижению уровня ответа Т-клеток на специфический аллерген [5], а также долговременное понижение уровня сывороточных IgE [6]. Кроме того, было продемонстрировано, что СИТ изменяет периферический и мукозальный ответ переключая профиль аллерген-специфических цитокинов CD4⁺ Т-клеток с Т хелперов 2 типа (Th2) в пользу Т-хелперов 1 типа (Th1) [7-9]. Кроме того, повышенное содержание IL-10-продуцирующих Т-клеток в ответ на стимуляцию аллергеном после СИТ, явилось очень важным фактом, который может объяснить некоторые гуморальные и клеточные изменения, наблюдаемые у пациентов, получавших лечение [10, 11]. Важный вопрос касается того, играет ли увеличение Th1 ответов или IL-10 (или оба) какую-либо роль в индукции толерантности к аллергену, наблюдаемой при СИТ.

Сублингвальная иммунотерапия (СЛИТ) была введена в 1980 г. в качестве альтернативного метода иммунотерапии, обладающего большей безопасностью, чем СИТ. Ее эффективность по снижению величины симптомов и потребности в лекарствах, а также в уменьшении бронхиальной / назальной реактивности в отношении специфического аллергена была ясно продемонстрирована значительным числом исследований у взрослых и детей [12]. Согласно документам ВОЗ (1998 г.) и ARIA (2001), СЛИТ является действительной альтернативой инъекционной ИТ и ее применение в клинической практике у взрослых, а также у детей оправдано [9, 13]. Эффективность СЛИТ была окончательно продемонстрирована самым последним Кокрейновским мета-анализом, [14].

Из-за небольшого количества наблюдений механизмов СЛИТ, четких доказательств того, способна ли она повлиять на аллерген-специфический иммунный

ответ, представлено не было. Значимый эффект СЛИТ на сывороточные IgE или IgG изотипы описан только в небольшом числе работ [15-17], также имеется только один отчет о снижении ответа Т-клеток под воздействием аллергена [18]. Было продемонстрировано, что у человека СЛИТ уменьшает воспалительные явления (клеточная инфильтрация, экспрессия адгезивных молекул на эпителий) в органах-мишенях [16]. Только в одном отчете недавно было показано, что СЛИТ способна увеличить вызванную аллергеном продукцию IFN- γ [19], в то время как другие авторы не обнаружили гуморальных или клеточных изменений [20]. Для сравнения, некоторые исследования по моделированию астмы у животных показали, что пероральный метод иммунотерапии является толерогенным и может перенаправлять Th1/Th2 дифференцирование, в частности, с помощью дендритных клеток слизистой оболочки полости рта, продуцирующих высокие уровни IL-12 [21]. Мономерный аллергоид *Dermatophagoides*, используемый в данном 2-х летнем двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании СЛИТ, продемонстрировал клиническую эффективность и значительное снижение вызываемой аллергеном воспалительной реакции [22].

В данном исследовании специфические иммунные параметры оценивались у сенсibilизированных к *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) пациентов до и во время СЛИТ, и сравнивались с параметрами группы Dp-сенсibilизированных пациентов, не получавших лечение (UT). СЛИТ индуцировала улучшение симптомов вкупе со снижением специфических сывороточных IgE, но не IgG1 и IgG4 антител, в течение 12-18 месяцев терапии. Что более важно, после СЛИТ увеличивается продукция IL-10, IFN- γ при стимуляции аллергеном мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) до клинически оптимальных. Поскольку оба этих цитокина способны ослаблять Th2 ответы, эти данные представляют биологическую основу клинической эффективности СЛИТ.

Материалы и методы

Реагенты

Экстракт *Dermatophagoides* в глицеро-солевом растворе (глицерол 50%, натрия хлорид 3,4 мг/мл, натрия бикарбонат 1,375 мг/мл, фенол 4 мг/мл) для кожных прик-тестов (SPT), и очищенный Der p1 аллерген (полученной путем аффинной хроматографии с моноклональными антителами) для тестов *in vitro*, были приобретены у Лофарма С.п.А. (Милан, Италия).

Всем отобраным пациентам была назначена коммерческая СЛИТ терапия мономерными аллергоидами *Dermatophagoides* (50/50 смесь *D. pteronissinus* и *D. farinae*) (Лайс, Лофарма® СпА), полученными в результате реакции карбамилирования цианатом калия при щелочном pH, которая приводит к замене ϵ -амино групп остатков лизина и, как следствие, к заметному снижению способности вступать в реакцию с IgE антителами [23]. Продукт, стандартизированный методом RAST/EAST ингибирования при сравнении аллергенной активности с активностью внутреннего эталонного препарата и титрованный в аллергенных единицах (АЕ), изготовлен в виде растворимых в полости рта таблеток для сублингвального приема.

Используемая среда - RPMI 1640 (Seromed, Берлин, Германия), с добавлением 2 мкм L-глутамина, 1% незаменимых аминокислот, 1% пирувата, 2 x 10⁻⁵ м 2-меркаптоэзнатола (2-ME) (все из Gibco Laboratories, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США) и 5% аутологичной сыворотки. Неконъюгированные и конъюгированные с флуоресцеин изотиацианатом (FITC), фикоэритрином (PE), аллофикоцианином (APC) или перидин хлорофилл протеином (PerCP)-конъюгированными анти-CD3, анти-CD4, анти-CD8, анти-CD25, анти-IL-10, анти-IL-10R, анти-IFN- γ и анти-IL-4 моноклональные антитела были приобретены у Vecton Dickinson Biosciences (Маунтин Вью, СА, США).

Все неконъюгированные и конъюгированные, изотипически сходные контрольные

антитела были приобретены в Southern Biotechnology Associated Inc. (Бирмингем, Алабама, США). Антиген стрептокиназы (SK) был приобретен Behring (Беринг, Л'Аквизала, Италия). Форбол-12-миристан-13-ацетат (РМА), иономицин, брэфелдин А, фитогемагглютинин (РНА) и сапонин были приобретены в Sigma Chemical Co. (Сент-Луис, Миссури, США). IL-2 был любезно предоставлен Eurocetus (Милан, Италия).

Пациенты

В ноябре-декабре 2002 года для исследования были набраны 25 *Dermatophagoides* - сенсибилизированных пациентов (14 мужчин и 11 женщин) подходящего возраста, имеющих круглогодичный ринит и/или ринит плюс умеренную астму. Критерии включения в исследование были следующие: возраст до 45 лет; наличие круглогодичных аллергических симптомов не менее 3 лет; положительные кожные прик-тесты на *Dermatophagoides*; положительный RAST (более чем класс 3); не принимающие постоянно медикаменты, СИТ ранее не проводилась. У шести из 20 отобранных пациентов были положительные кожные прик-тесты на сезонные аллергены: у пяти на пыльцу луговых трав и у одного на пыльцу сложноцветных.

Распределение экспериментальных групп

Отобранные пациенты были рандомизированы на две группы (состоящую из 13 пациентов, оставленных без лечения, и другую - из 12 -ти, которым назначалась СЛИТ) с учетом возраста, пола, типа и важности симптомов. У шести из них также наблюдались сезонные симптомы, они были включены как в группу, оставленную без лечения [3], так и в группу СЛИТ [3]. Описания групп пациентов представлены в Таблице 1.

Программы иммунотерапии

СЛИТ проводилась путем самостоятельного приема таблеток и продолжалась с января 2003 по декабрь 2004 года. Пациенты были тщательно проинструктированы лечащим врачом о способах и схеме применения СЛИТ. Кроме того, производитель предоставил четкие письменные инструкции. Фаза набора дозы длительностью около 8 недель, заключалась в приеме через день увеличивающихся доз аллергоида (25, 50, 100, 200, 300, 600, 1000 АЕ), пока не была достигнута поддерживающая доза 1000 АЕ. Затем эта поддерживающая доза принималась один раз в неделю. Кумулятивная доза аллергенного экстракта, полученная каждым пациентом составляла приблизительно 60000 АЕ/год. Таблетки следовало принимать утром, держать во рту в течение 1 - 2 минут до растворения, а затем проглотить.

Всем пациентам была назначена соответствующая лекарственная терапия для снятия симптомов. Были запланированы регулярные посещения врача для клинической оценки и оценки безопасности. Образцы крови брали до начала лечения и на 6, 12 и 18 месяцев терапии. Исследование проводилось в соответствии с правилами Надлежащей Клинической Практики. Перед включением в исследование, пациенты давали информированное согласие.

Таблица 1. Описание пациентов

	Группа СЛИТ	Контрольная группа
Количество пациентов	12	13
Средний возраст	28	30
Возраст	16-43	20-36
Пол (М/Ж)	7/4	5/4

Единственная сенсibilизация	8/11 (72%)	6/9 (67%)
Ринит	6/11 (55%)	5/9 (56%)
Ринит + умеренная астма	5/11 (45%)	4/9 (44%)
Период наблюдения (месяцев)	18	18
Длительность заболевания (лет)	4.3 ± 3.8	4.0 ± 3.1
Выбывание	1	4

СЛИТ - сублингвальная иммунотерапия.

Клиническая оценка

Как получавшие, так и не получавшие лечение пациенты вели еженедельный дневник аллергических симптомов на протяжении периода естественной экспозиции аллергенов. Регистрировались оценки следующих специфических симптомов (SSS) - заложенность носа, зуд в носу, чихание, ринорея, раздражение глаз и слезотечение, свистящее дыхание, кашель и астма. Оценка симптомов и потребность медикаментов (SMS) рассчитывались на основании дневников пациентов, как было описано ранее [24]. Условные оценки присваивались применяемым препаратам (0,5 балла за каждую дозу назальных кортикостероидов и 2 балла за каждую дозу антигистаминов). Пациентам рекомендовалось применять только местные стероиды (если улучшения не наблюдалось, можно было добавлять антигистаминные препараты) и отмечать каждый прием или изменение лекарственной терапии в дневнике. В таблице 3 представлены средние значения ежедневных SMS за указанный период. Пациентам также были даны указания прекратить прием препаратов, по крайней мере, за 7 дней до забора крови. В каждой временной точке (0, 6, 12 и 18 месяцев) исследования проводилась самооценка пациентов: каждого из них попросили дать общую оценку лечения в соответствии с категориями тяжести симптомов (от 0 до 15).

Обнаружение иммуноглобулина E, иммуноглобулина G и хемокинов в сыворотке

Сыворотку крови у пациентов отбирали в январе, июне, декабре 2003 года и в июне 2004 года. Суммарные и анти-IgE Dp антитела определялись в сыворотках коммерческими IgE CAPSYSTEM® (Pharmacia, Упсала, Швеция). Аллерген-специфические IgG1 и IgG4 антитела определяли методом ELISA [25] с использованием моноклональных анти-IgG1 и анти-IgG4 (Unipath Limited, Бедфорд, Великобритания) в качестве первых антител, и козьих анти-мышинных-IgG, конъюгированных с пероксидазой (Sigma-Aldrich Srl, Милан, Италия), в качестве вторых антител. Оптическую плотность определяли при 492 нм, и результаты выражались как отношение OD образца к OD контрольной отрицательной сыворотки, как описано выше. CXCL10 и CCL22 в сыворотке определяли с использованием коммерческих наборов (R & D Systems, Миннеаполис, MN, США).

Проточный цитометрический анализ

Проточный цитометрический анализ мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) проводили, как описано ранее [26]. Клетки анализировали на BDLSRII цитофлуориметре, с использованием программного обеспечения Diva (BD Biosciences, Маунтин-Вью, Калифорния, США). Область положительности определяли с помощью изотипически сходных контрольных моноклональных антител. Для каждого образца было получено десять тысяч событий.

Аллерген-специфический пролиферативный ответ

Аллерген-специфический ответ Т-клеток оценивали по образцам крови, взятым в начале и на 6-й месяц терапии. Мононуклеарные клетки периферической крови (10^6 /мл), суспендированные в среде с добавлением 5% аутологичной сыворотки, культивировали в трех повторах в 96 U-образных планшетах (Nunc, Камstrup, Дания) в течение 5 дней с возрастающими дозами Дер р 1 (0,4; 2 и 10 мкг/мл) или с неродственным контрольным антигеном (СК, при 400, 2000 и 10 000 МЕ/мл). В некоторых экспериментах мононуклеарные клетки периферической крови стимулировали Дер р 1 в отсутствии или в присутствии нейтрализующих анти-IL-10 (10 мкг / мл) или анти-IL-10R (10 мкг / мл) или изотипически сходных моноклональных антител (10 мкг / мл). Культуру собирали через 16 ч с момента облучения 0,5 мКи (^3H)-тимидина/лунка (^3H -TdR; Amersham International, Бакс, Великобритания) и измеряли (^3H)-TdR [27].

Количественное определение продукции цитокинов

Для оценки продукции цитокинов, 10^6 мононуклеарных клеток периферической крови активировали различными дозами аллергена или антигена, затем 5-дневный бесклеточный супернатант замораживали при -70°C до использования. Количественное определение IL-4, IL-10, TGF- β и IFN- γ проводили с использованием коммерческого ELISA (Quantikine R & D Systems, Миннеаполис, MN, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Проточный цитометрический анализ внутриклеточных цитокинов

Аллерген-специфические первичные Т-клеточные линии были получены из мононуклеарных клеток периферической крови (1×10^6 /мл) двух получавших СЛИТ доноров с добавлением Дер р1 (10 мкг / мл). На 7 день аллерген-активированные Т-клетки стали наращиваться с помощью rIL-2, как описано [27].

Проточный цитометрический анализ внутриклеточного синтеза IL-4, IL-10 и INF- γ Т-клетками выполнялся, как описано ранее [26]. Вкратце, 1×10^6 клеток стимулировали РМА (10 нг/мл) плюс иономицин (1 мкм) в течение 6 ч, последние четыре часа в присутствии брефелдина А (5 мкг/мл). После стимуляции клетки дважды промывали фосфатно-буферным раствором (PBS) pH 7,2, фиксировали на 15 мин формальдегидом (2% в PBS, pH 7,2), дважды промывали 0,5% бычьим сывороточным альбумином (БСА) в PBS, pH 7,2, пермеабелизировали с PBS pH 7,2, содержащем 0,5% БСА и 0,5% сапонина, а затем инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре со специфическими моноклональными антителами. Затем клетки промывали и анализировали на BDLSRII цитофлуориметре, с использованием программного обеспечения Diva (BD Biosciences). Область положительности определяли с помощью изотипически сходных контрольных моноклональных антител. Для каждого образца было получено 10^4 событий.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием парного и непарного t-теста Стьюдента, в установленном порядке. Р-значение меньше чем 0,05 считалось значимым.

Результаты

Клиническая эффективность сублингвальной иммунотерапии Dermatophagoides

Двадцать из 25 набранных пациентов (80%) завершили исследование в 2004 году. "Выбыли" четыре из не получавших лечение пациентов и одна из группы СЛИТ, которая прекратила СЛИТ по причине беременности. Выбывание среди не получавших лечение пациентов происходило в связи с низким комплаенсом по предоставлению образцов крови.

Клинические результаты 1,5-летнего наблюдения были основаны на самооценках пациентов, полученных в начале и по истечении 6, 12 и 18 месяцев лечения. Оценки специфических симптомов (SSS) как в группе СЛИТ, а также и у пациентов не получавших лечения на 6, 12 и 18 месяцы были значительно снижены по сравнению с теми, которые были получены в момент времени 0 (Табл. 2). Следует отметить, что в группе СЛИТ-терапии, но не в группе оставленных без лечения пациентов, также наблюдалось значительное уменьшение симптомов и потребности в медикаментах (SMS) (Таблица 3)

Влияние сублингвальной иммунотерапии на сывороточные уровни аллерген-специфического иммуноглобулина E, иммуноглобулина G1, и иммуноглобулина G4

В образцах сыворотки получавших СЛИТ пациентов, уровень Dp-специфических IgE антител уменьшился, по сравнению с результатами, определенными до начала лечения, в то время как уровень общего IgE не изменился. Как показано на рис. 1, снижение уровня Dp-специфического IgE было существенным после 12 (у 10 из 11 пациентов) и 18 (у всех 11 пациентов) месяцев терапии ($P < 0,05$ и $P < 0,005$, соответственно). Для сравнения, в группе не получавших лечения пациентов изменений уровней общего и Dp-специфического IgE, проанализированных в 0, 6, 12 и 18 месяцев исследования, не наблюдалось. Уровни Dp-специфических IgG1 и IgG4 были низкими в обеих группах и не изменились после лечения (данные не представлены).

Таблица 2. Показатели специфических симптомов

	Группа СЛИТ	Контрольная группа
Время 0	10.0 ± 1.8	10.1 ± 1.6
6 месяцев	6.2 ± 1.2	7.1 ± 2.4*
12 месяцев	5.7 ± 1.1*	6.0 ± 1.7*
18 месяцев	5.3 ± 0,8*	5.6 ± 1.0*

Клинические показатели (\pm SE) оценивались, как описано в Материалах и методах.

* $P < 0.05$ (vs. время 0 в каждой группе)

СЛИТ, сублингвальная иммунотерапия

Таблица 3. Ежедневные значения симптомов и потребности в медикаментах

	Группа СЛИТ	Контрольная группа
6 месяцев	2.6±0.8	3.3 ±0.9
12 месяцев	1.6 ±0.5 ^a	2.4 ±0.6 ^b
18 месяцев	1.1 ± 0.4 ^c	2.7±0.8 ^d

Ежедневные значения симптомов и потребности в медикаментах [± SE) оценивались, как описано в материалах и методах., a vs. b, и c vs. d: P < 0.05

СЛИТ, сублингвальная иммунотерапия

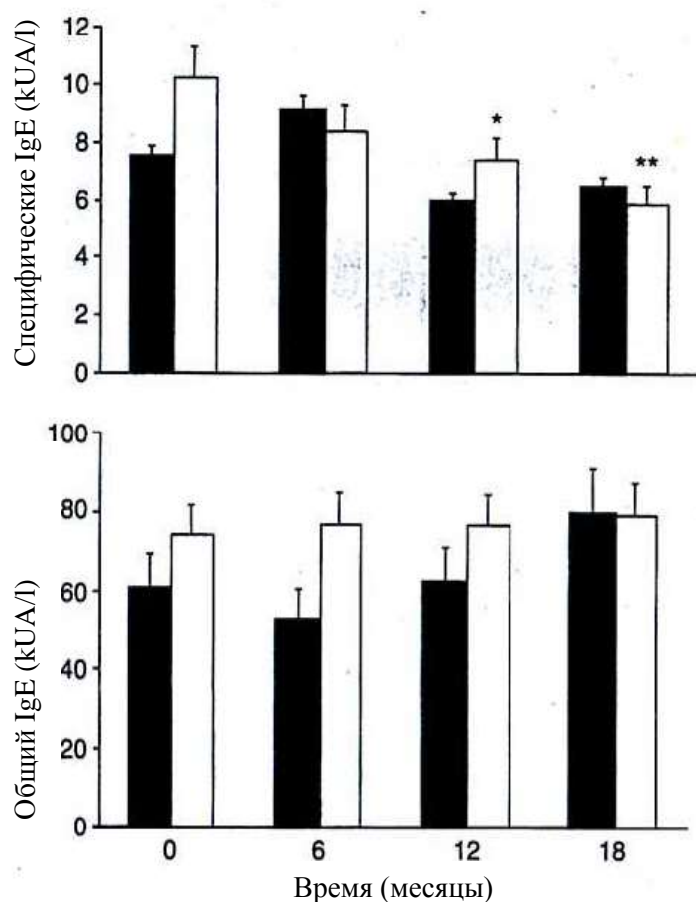


Рис 1. Уровень Der p 1-специфических и общего IgE в сыворотке не получавших лечение и получавших сублингвальную иммунотерапию (СЛИТ) пациентов. Образцы сыворотки, взятые у девяти не получавших лечение (черные столбцы) и 11 получавших СЛИТ (белые столбцы) пациентов в различные моменты времени (0, 6, 12, 18 месяцев) от начала лечения, анализировали на Der p-специфические (верхняя панель) и суммарные (нижняя панель) IgE антитела при помощи коммерческих наборов, как описано в Материалах и методах. Приведены средние значения (± SE). * P < 0,05; ** P < 0,005.

Влияние сублингвальной иммунотерапии на вызванный аллергеном пролиферативный ответ и на баланс T-хелперов типа 1 / T-хелперов типа 2

Пролиферативный ответ МКПК на увеличение дозы (0,4; 2 и 10 мкг/мл) Der p1 у пациентов через 6 месяцев лечения был ниже, чем до лечения (рис. 2). Никаких изменений пролиферативного ответа МКПК на увеличение дозы стрептокиназы не было обнаружено как у получавших, так и не получавших СЛИТ-терапию пациентов, по результатам

анализа в начале и после 6 месяцев лечения (рис. 2).

Когда мы сравнивали уровни Th1-и Th2-цитокинов, выделяемых в культуральные супернатанты мононуклеарными клетками периферической крови, оказалось, что при стимуляции большими дозами аллергена уровни IFN- γ были значительно ($P < 0,05$) выше у пациентов на 6-м месяце СЛИТ, по сравнению со значениями, определенными в начале лечения (рис. 3а и 3б). Для сравнения, количества IFN- γ в культуральных супернатантах мононуклеарных клеток периферической крови, стимулированных контрольными антигенами (стрептокиназой) у тех же пациентов в 0 или 6 месяцев терапии практически не изменились (данные не представлены), так же как и у не получавших лечения пациентов, при стимуляции обоими антигенами в тех же временных точках (рис. 3а, данные не представлены).

Следует отметить, что уровни IFN- γ в сопоставимых образцах (культуральных супернатантах от одного и того же пациента, стимулированных той же дозой аллергена в 0 и 6 месяцев) были увеличены (более чем вдвое), в 45% культуральных супернатантов от СЛИТ-пациентов, и лишь в 14% супернатантов от не получавших лечение пациентов ($P < 0,01$).

Кроме того, количества IL-4 в культуральных супернатантах Der p 1 - стимулированных или стрептокиназой-стимулированных моноклональных клеток периферической крови у не получавших и получавших СЛИТ-терапию пациентов, до и после 6 месяцев лечения не изменились (данные не представлены).

Уровни сывороточных CXCL10 (IFN- γ -обусловленный хемокин) через 12 и 18, но не через 6, месяцев лечения были значительно выше ($P < 0,05$), чем те, что были определены в образцах сыворотки крови пациентов в начале лечения (рис. 3с), подтверждая, таким образом, хоть и косвенно, *in vitro* увеличение уровней IFN- γ аллерген-специфическими Т-клетками в ходе терапии. Следует отметить, что уровни сывороточных CXCL10 остались без изменения в группе не получавших лечения в 0, 6, 12 и 18 месяцев. Более того, количество CCL22 (Th2-ассоциированный хемокин) в сыворотке получавших и не получавших лечение пациентов в одних и тех же временных точках были сходны со значениями у тех же пациентов в начале исследования (рис. 3с).

Влияние сублингвальной иммунотерапии на механизмы регуляции иммунного ответа

Влияние СЛИТ на механизмы регулирования первоначально изучались на свежееизолированных мононуклеарных клетках периферической крови путем оценки доли CD4+ Т-клеток, высоко экспрессирующих CD25, именуемых Т-регуляторными (Treg)-клетками. Уровни пропорций циркулирующих CD4+CD25 Т-клеток у СЛИТ-пациентов (в 6 месяцев) были сходны с теми, что и в начале терапии (данные не представлены).

Затем, мы рассмотрели влияние СЛИТ на продукцию цитокинов с регуляторной активностью, таких как TGF- β 1 и IL-10. Средние значения (\pm SE) TGF- β 1 в культуральном супернатанте аллерген-стимулированных мононуклеарных клеток периферической крови у не получавших и получавших СЛИТ терапию после 6 месяцев лечения существенно не различались (5900 ± 623 vs. 5117 ± 456 пг/мл; $P=0,3$) чем у тех же больных в начале лечения.

Для сравнения, средние значения IL-10 были значительно ($P < 0,05$) выше в культуральном супернатанте аллерген-стимулированных мононуклеарных клеток периферической крови пациентов после 6 месяцев СЛИТ в сравнении с теми значениями, которые были получены в начале терапии, но только при использовании низких доз аллергена (Рис. 4а и 4б). Следует отметить, что количества IL-10 не изменились в культуральных супернатантах стрептокиназой-стимулированных мононуклеарных клеток периферической крови в 0 или 6 месяцев терапии, так же как и те, которые получены от пациентов, оставленных без лечения, стимулированных обоими антигенами в те же

временные точки (рис. 4А, данные не представлены)

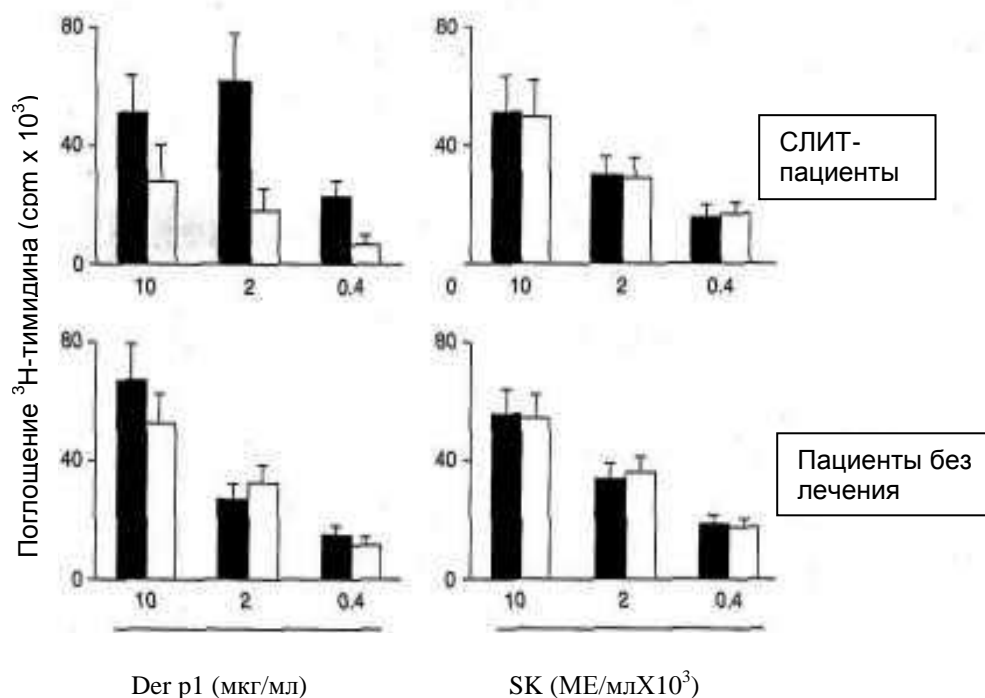


Рис. 2. Влияние сублингвальной иммунотерапии (СЛИТ) на пролиферативный ответ, стимулированный аллергеном. Der p1- и стрептокиназой (SK)-обусловленный пролиферативный ответ мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) девяти не получающих лечения и 11 СЛИТ-пациентов, обследованных до начала иммунотерапии (черные колонки) и на 6-м месяце лечения (белые колонки). 10^6 PBMC сокультивировали в трех повторностях в течение 5 дней с увеличением дозы Der p1 или SK. Пролиферативный ответ оценивали путем измерения поглощения ^3H -тимидина. Представлены средние значения срм (\pm SE).

Следует отметить, что уровни IL-10 в сопоставимых образцах (культуральных супернатантах одного и того же пациента, стимулированных одной и той же дозой аллергена в 0 и 6 месяцев) были увеличены (более чем в два раза) в 55% культуральных супернатантов СЛИТ-пациентов, и только в 11% от не получавших лечения пациентов ($P < 0,001$).

Для того чтобы оценить, может ли IL-10 повлиять на пролиферацию и продукцию IFN- γ в ответ на аллерген, мононуклеарные клетки периферической крови двух СЛИТ пациентов культивировали с Der p 1 в присутствии или при отсутствии нейтрализующих анти-IL-10 и анти-IL-10R моноклональных антител. Влияния на аллерген-обусловленную пролиферацию и IFN- γ продукцию с двумя моноклональными антителами не наблюдалось (данные не представлены).

Кроме того, мы воспользовались возможностью обследовать двух больных после 22 и 24 месяцев терапии. Аллерген-стимулированные мононуклеарные клетки периферической крови этих двух пациентов показали увеличение уровней IL-10 и IFN- γ , сравнимые с уровнями 6-месячных образцов и превышающие определенные перед началом терапии (данные не представлены), из чего можно предположить, что повышенная регуляция IFN- γ и IL-10, наблюдаемая через 6 месяцев СЛИТ сохранялась в течение всего периода лечения. Кроме того, внутриклеточные цитокины определялись в аллерген-специфических первичных Т-клеточных линиях, полученных от двух пациентов. Тогда как пропорции IL-4-продуцирующих Т-клеток остались неизменными после терапии (рис. 4с), подтверждая, таким образом, предыдущие наблюдения, пропорции

аллерген-специфических CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих IFN- γ (21,5% vs 7,9% и 20,4% vs 6,9%) или IL-10 (5,1% vs. 1,1% и 3,7% vs 1,6%) были значительно выше по сравнению с теми, которые были определены для Т-клеточных линий, генерированных до СЛИТ (рис. 4с). Кроме того, принимая во внимание, что пропорции IFN- γ - и IL-10- продуцирующих CD4⁺ Т-клеток были в основном в пользу секретирующих IFN- γ , интересно, что больше половины клеток продуцирующих IL-10 созэкспрессировали цитоплазматический IFN- γ (2,9% и 2,0% от общего количества CD4⁺ Т-клеток, соответственно, vs 0,2% и 0,4% у тех же пациентов перед началом терапии) (рис. 4с).

Когда сравнивали количества IFN- γ и IL-10, продуцируемые аллерген-стимулированными мононуклеарными клетками периферической крови получающих СЛИТ пациентов (6 месяцев), никакой корреляции ($R = -0.02$) не было обнаружено (как и среди тех, что получены от мононуклеарных клеток периферической крови тех же пациентов до терапии или пациентов не получавших лечения, данные не представлены).

Когда мы проверили, коррелируют ли иммунологические изменения с клинической пользой, в действительности, никакой связи не было обнаружено (на уровне одного пациента) между снижением специфических симптомов (SSS) и *in vitro* увеличением титров IFN- γ ($r = 0.036$, $P = NS$), или IL-10 ($r = 0.098$, $P = NS$), а также активацией растворимых CXCL10 ($r = 0.121$, $P = NS$) (данные не представлены), после 6 месяцев СЛИТ. Кроме того, наблюдалась незначительная корреляция между снижением величины специфических симптомов (SSS) или величины симптомов и потребности в медикаментах (SMS) и сокращением титров специфических IgE антител ($r = 0.511$, $P < 0,1$; $p = 0.587$, $P < 0,1$). В заключение, у получавших СЛИТ пациентов, увеличение титров IL-10 или IFN- γ не были связаны ($r = 0.026$, $P = NS$; $r = -0.081$, $P = NS$) с уменьшением титров IgE (данные не представлены).

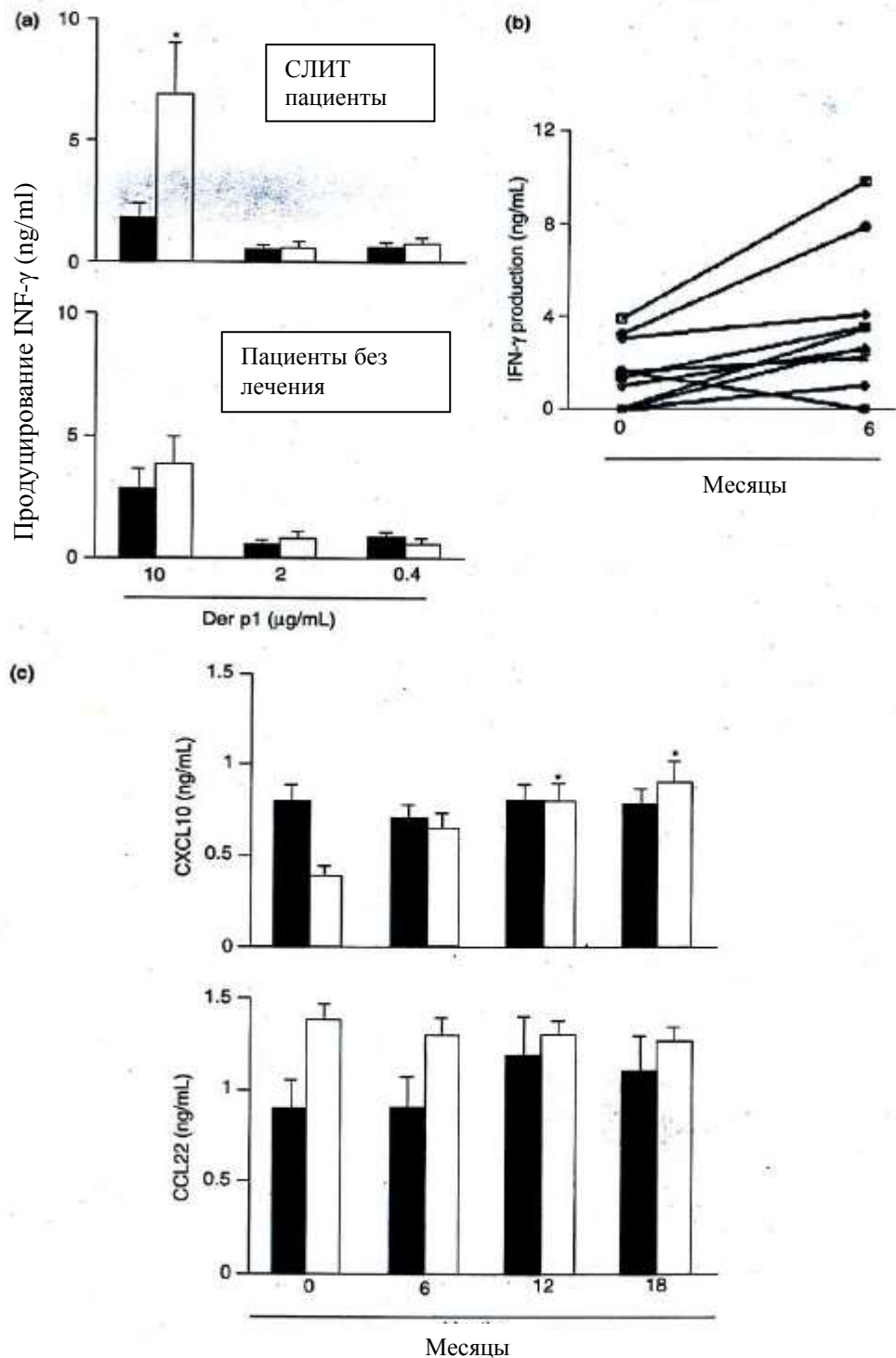


Рис. 3. Влияние сублингвальной иммунотерапии (СЛИТ) на продукцию $\text{INF-}\gamma$ аллерген-стимулированными мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC), и на уровни сывороточных CXCL10 и CCL22. (a) $\text{INF-}\gamma$ уровни оценивали в культуральных супернатантах мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) девяти не получавших лечения (UT) и 11 получавших СЛИТ пациентов, стимулированных в течение 5 дней увеличивающимися дозами Der p I, как описано в разделе "Материалы и методы". Супернатанты были получены в начале (черный столбец) и после 6-ти месяцев лечения (белый столбец). Представлены средние значения (\pm SE). (b) уровни $\text{INF-}\gamma$, определенные в культуральных супернатантах мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) каждого СЛИТ пациента, стимулированных в течение 5 дней 10 мкг/мл Der p I, в 0 и после 6 месяцев терапии. (c) Образцы сыворотки, полученные у девяти не получавших лечение (UT) (черные колонки) и 11 СЛИТ пациентов (белые колонки), в различные временные точки (0, 6, 12 и 18 месяцев) от начала лечения, были исследованы на содержание CXCL10 и CCL22 с помощью коммерческих наборов, как описано в разделе "Материалы и методы". Представлены средние значения (\pm SE). * $P < 0,05$.

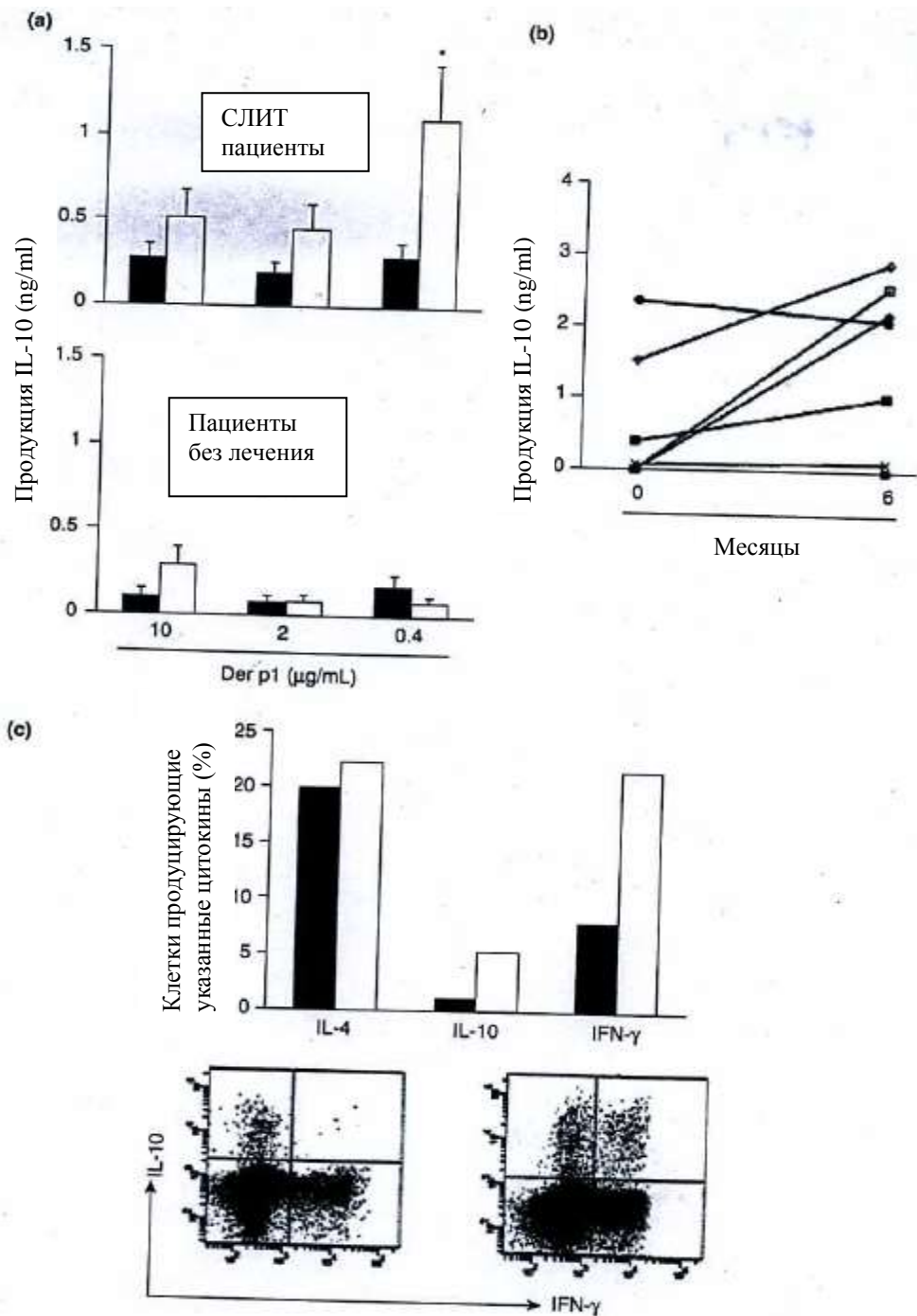


Рис. 4. Влияние сублингвальной иммунотерапии (СЛИТ) на продукцию IL-10 аллерген-стимулированными мононуклеарными клетками периферической крови (РВМС). (а) Титры IL-10 оценивались в культуральных супернатантах мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) девяти не получавших лечения (УТ) и 11 получавших СЛИТ пациентов, стимулированных в течение 5 дней увеличивающимися дозами Дер р I, как описано в разделе "Материалы и методы". Супернатанты были получены в начале (черный столбец) и после 6-ти месяцев лечения (белый столбец). Представлены средние значения (\pm SE). (б) Титры IL-10, определенные в культуральных супернатантах мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) каждого СЛИТ пациента, стимулированных в течение 5 дней 0,4 мкг/мл Дер р I, в 0 и после 6 месяцев терапии. (с) Проточный цитометрический анализ внутриклеточных уровней IL-4, IL-10 и IFN- γ стимулированных Дер р I-специфических CD4⁺ Т клеточных линий, полученных от одного и того же СЛИТ пациента в 0 (черный столбец) и после 24 месяцев терапии (белый столбец). Точки представляют собой результаты одновременного анализа на IL-10 и IFN- γ Дер р I-специфических CD4⁺ Т-клеточных линий в 0 (левая панель) и после 24 месяцев терапии (правая панель). Изображено одно экспериментальное исследование. *P < 0,05.

Обсуждение

Это исследование было выполнено с целью оценить влияние СЛИТ на иммунологический ответ при воздействии аллергена на рандомизированных Др-сенситизированных пациентов, имеющих круглогодичный ринит и/или астму. Хотя при исследовании наблюдался высокий уровень отсева (20%), это не изменило репрезентативности сохранившихся групп, так как в начале лечения средние значения Др-специфических IgE, IgG1 и IgG4, а также пролиферативный ответ на аллерген в сохранившихся группах, сопоставимы с этими значениями у выбывших пациентов.

При обследовании через 1,5 года, у пациентов, получавших лечение, наблюдалось очевидное снижение назальных и бронхиальных симптомов по сравнению с теми, которые проявлялись в начале терапии, а также явное снижение симптомов и потребности в медикаментах (SMS) в сравнении с теми, которые проявлялись у пациентов оставленных без лечения.

Совпадая с ранее опубликованными результатами неинъекционной терапии [20, 28], увеличения аллерген-специфических IgG1 и IgG4 антител у СЛИТ пациентов не наблюдалось, для сравнения, эти показатели последовательно повышались в ходе подкожной СИТ [4, 28]. Что более важно, даже если титр Др-специфических IgE антител остается неизменным у пациентов, оставленных без лечения, СЛИТ индуцирует постепенное сокращение (существенное после 12 месяцев лечения) уровней сывороточных аллерген-специфических IgE антител, давая, таким образом, биологическое обоснование улучшения симптомов [12].

Влияние СЛИТ, а также других не-инъекционных терапий, на Ig изотипы широко освещаются, но изменения уровней аллерген-специфических IgE или IgG, похоже, не являются постоянными и воспроизводимыми [15, 17, 20, 28]. Однако, более четкие данные, полученные на животных моделях, указывают на то, что многократное вдыхание антигенов овальбумина или амброзии снижало IgE ответ у крыс со слабым или неизменным IgG ответом [29]. В согласии с воздействием на гуморальные ответы, СЛИТ слегка понижала пролиферативный ответ Т-лимфоцитов периферической крови на увеличение дозы мажорного аллергена клещей домашней пыли (Der p 1) по сравнению со значениями, определенными у пациентов, оставленных без лечения. В то время как большинство исследований в области СИТ описывает снижение реактивности Т-клеток на воздействие аллергена, сообщения о результатах СЛИТ до сих пор противоречивые [16-20]. В целом, данные нашего исследования свидетельствуют о том, что СЛИТ влияет как на гуморальные, так и клеточные аллерген-специфические ответы.

Было предложено несколько гипотез для объяснения эффектов иммунорегуляции СИТ, связывающих их с индукцией толерантности Т-клеток [30], которая может отреагировать образованием аллерген-специфических супрессорных Т-клеток, клеточной толерантностью или внутимусным удалением аллерген-реактивных Т-клеток памяти [31, 32]. Еще недавно предполагалось, что девиация Th2 к Th1 [7-9, 30], активация CD4⁺CD25⁺ регуляторных Т-клеток [10], а также увеличение продукции IL-10 Т-клетками памяти были связаны с СИТ [10, 11]. В другом исследовании сообщалось, что Т-клетки, генерируемые СИТ, были CD4⁺CD25⁺ Т-клетки, продуцирующие и IL-10 и TGF-β [33]. Следует отметить, некоторые авторы предполагают, что IL-10, продуцируемые адаптивными Treg-клетками, действуют, в основном, за счет сдвига продукции аллерген-специфических антител, от опасных IgE к протективным IgG4 изотипам, нежели индуцируя подавление Th2 иммунного ответа [34].

В настоящее время имеется мало данных о Т-клеточных механизмах действующих при неинъекционной терапии. Сообщалось, что при местной назальной иммунотерапии снижение уровня цитокинов отражает в большей степени снижение пролиферативного ответа Т-клеток, чем переключение Th2-Th1 [28]. Кроме того, в некоторых публикациях сообщалось об отсутствии изменений цитокинов типа 1 или 2 у получавших СЛИТ

пациентов [18, 20], а в других было обнаружено значительное увеличение обусловленного аллергеном (Dp) продуцирования IFN- γ [19]. Пропорции IL-10-продуцирующих Т-клеток, проанализированные в двух этих исследованиях, остались неизменными [20].

Наши результаты указывают на то, что доля циркулирующих CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток остается неизменной после 6 месяцев СЛИТ, что согласуется с недавним исследованием, проведенным при участии пациентов, получавших СИТ [35]. Так как нет четких доказательств того, что CD4⁺CD25⁺ Treg-клетки локализируются на слизистом или лимфатическом уровне, представляется маловероятным, что они могут играть какую-то роль в толерантности Т-клеток в ходе СЛИТ. С другой стороны, наши предыдущие результаты позволяют предположить, что CD4⁺CD25⁺ Treg-клетки менее активны при Th2, чем при Th1 ответах, и что периферические Treg-клетки, отсортированные по экспрессии CD25, также контаминированы большим и непостоянным числом активированных аллерген-специфических эффекторных Т-клеток [36].

Кроме того, не обнаружено никаких изменений аллерген-обусловленной TGF- β продукции до и после 6 месяцев терапии в культуральных супернатантах не получавших и получавших СЛИТ пациентов, тем самым подтверждая предположение о том, что TGF- β или TGF- β -продуцирующие клетки не участвуют в толерантности Т-клеток получавших СЛИТ пациентов, что также наблюдалось и у СИТ пациентов [37].

Когда были проанализированы производимые Т-клетками цитокины, никаких изменений аллерген-индуцированных IL-4 не была обнаружено в культуральных супернатантах после 6 месяцев терапии. Что более важно, мононуклеарные клетки периферической крови получавших СЛИТ пациентов (6 месяцев терапии) продуцировали значительно большее количество IL-10 и IFN- γ , при сравнении с результатами, которые наблюдались в начале терапии, при этом не было обнаружено никаких изменений в соответствующих супернатантах от не получавших лечения пациентов, продолжительность этого увеличения наблюдалась, по крайней мере, в течение всего периода лечения. Примечательно, было продемонстрировано, что аллерген-специфические Т-клетки, число которых увеличивается в ходе СЛИТ, продуцируют более высокие титры IFN- γ , или IL-10, или обоих, и, в действительности, потенциально способны подавлять IgE ответ. Увеличиваются ли эти подмножества Т-клеток у всех получавших СЛИТ пациентов, а также последствия увеличения IFN- γ /IL-10 двойных положительных Т-клеток, в настоящее время неизвестно. Регуляторные IFN- γ /IL-10 двойные положительные Т-клетки (так называемые Th1-подобные T1 клетки) были описаны в исследованиях на мышах, перенесших хроническую стимуляцию антигенами [38] или защиту от некоторых патогенных микроорганизмов, таких как лейшмании, боррелии и микобактерии [39]. Хотя об одновременном наличии IL-10 и IFN- γ у мононуклеарных клеток периферической крови получавших СИТ пациентов уже сообщалось [37, 40, 41], это первый случай, когда со-экспрессия обоих цитокинов аллерген-специфическими CD4⁺ Т-клетками была описана у пациентов, проходящих иммунотерапию. Тем не менее, также стоит констатировать, что ответ аллерген-специфических Т-клеток в течение СЛИТ характеризуется высокой вариабельностью продукции цитокинов, предполагая различные механизмы, действующие в разное время терапии и/или взаимодействующих друг с другом по-разному.

Эти результаты показывают, что, хотя анализ ограничивался циркулирующими, а не тканевыми или лимфатическими Т-клетками памяти (где изменения, вероятно, будут более очевидны), механизмы иммунодевиации и механизмы иммунорегуляции вызывает СЛИТ. Действительно, IL-10 и IFN- γ способны уменьшать *in vitro* аллерген-специфические Th2 ответы, а также подавлять IgE-продуцирующие клетки (IFN- γ), непосредственно, или переход к IgG4 подклассу (IL-10), давая, таким образом, биологическое обоснование описанных в литературе улучшений симптомов при СЛИТ [14]. Некоторые данные указывают на то, что иммунодевиация может играть решающую роль у получающих СЛИТ пациентов, более, чем иммунорегуляция. Во-первых, мы

сообщали о повышении уровней CXCL10 в сыворотке крови получавших СЛИТ пациентов после 12-18 месяцев терапии. Было показано, что CXCL10 - это IFN- γ -индуцированный хемокин, который стимулирует IFN- γ продукцию в аутокринной петле [42], и что *in vivo*, повышенные уровни IP-10/CXCL10 были обнаружены при некоторых воспалительных Th1-ориентированных заболеваниях [43]. Кроме того, увеличение продукции IL-10, предположительно играет сомнительную роль, так как у получавших СЛИТ пациентов были неопределяемые *in vivo* уровни аллерген-специфических IgG4 антител, подкласса, чьим переключющим фактором является IL-10 [34], также не наблюдалось никакого влияния на пролиферативный ответ и продукцию IFN- γ при IL-10 нейтрализующих условиях *in vitro*. В заключение, отсутствие обратной корреляции между двумя цитокинами в супернатантах аллерген-стимулированных мононуклеарных клеток периферической крови получавших СЛИТ пациентов, исключает, что IL-10, по крайней мере, *in vitro*, ингибирует IFN- γ продукцию аллерген-специфических Т-клеток. Это согласуется с представлением о том, что продукция INF- γ стимулированных травяной пылью мононуклеарных клеток периферической крови получавших СИТ пациентов, ингибируется *in vitro* с помощью высоких доз IL-10, как правило, превышающих те, что обычно определяют в культуральных супернатантах [37].

Объяснение отсутствия какой-либо обратной корреляции между продукцией двух цитокинов при всех дозах аллергенов, используемых в настоящее время, остается только теоретическим. Одно предположение заключается в том, что это происходит из-за увеличения аллерген-специфических Т-клеток, продуцирующих и IL-10, и IFN- γ . Преобладающее увеличение IFN- γ ⁺IL-10⁻ Т-клеток, при использовании самой высокой дозы аллергена, согласуется с предыдущими исследованиями, сообщающими, что высокие дозы аллергенов селективно индуцируют CD4⁺-опосредованный типа 1 цитокиновый ответ у пациентов, проходящих СИТ [44, 45], также как контрольные антигены и их пептиды [32, 46, 47]. Следует отметить, явно было показано, что избирательный IL-10 или IFN- γ ответ на аллергены строго зависит от типа стимулирующих эпитопов независимо от аллергического статуса донора [48], и не исключено, что некоторые эпитопы по природе расположены к стимуляции подмножества Т-клеток, продуцирующих оба цитокина.

Следующий значимый вопрос касается того, почему у СИТ и СЛИТ некоторые иммунологические механизмы одинаковы. Действительно, СЛИТ - это не просто местная иммунотерапия, приводящая к местным модификациям, но также и системная терапия, как показано в исследовании фармакокинетики с радиоактивно-меченным Рагj 1 аллергеном, местно применяемым у здоровых добровольцев, который появляется в плазме через 15~20 минут, пики через 2-3ч [49].

Центральным вопросом остается возможная корреляция между клиническим улучшением и некоторыми *in vitro* или *ex vivo* изменениями. Маловероятно, что клиническая эффективность СЛИТ, которая в силу ряда известных и неизвестных местных и системных механизмов, может быть жестко привязана к одному-единственному параметру. Действительно, не было найдено никакой связи (на уровне одного пациента) между клинической пользой и изменениями продуцирования IFN- γ , IL-10, или уровней сывороточных CXCL10 или IgE, что совпадает с данными обширной библиографии по СИТ и СЛИТ [1, 2, 9, 12]. Однако, примечательно, что у всех получающих СЛИТ пациентов с клинической пользой, наблюдалось значительное увеличение IFN- γ , или IL-10, или обоих цитокинов, в то время как только у двоих из девяти не получавших лечения пациентов наблюдалась эта тенденция.

В заключение, основываясь на информации, доступной в настоящий момент, мы не знаем, играет ли важную роль преобладающее Th1-отклонение или иммунорегуляторный механизм в модификации аллерген-специфического Th2-ответа, приводящего к снижению IgE и клинических симптомов. Наличие Т-клеток, продуцирующих и IFN- γ и IL-10 у получающих СЛИТ пациентов, может быть значимо, но требует более углубленных

исследований их происхождения и функций. Не исключено, что оба механизма одновременно функционируют при СЛИТ, и при некоторых обстоятельствах они могут синергизироваться [50], преобладание одного или другого зависит от нескольких факторов: уровень чувствительности и атопический статус субъекта, тип аллергена и его основных эпитопов, скорость всасывания, местная доза, достигнутая на тканевом уровне, сопровождающая активации DC другими патогенными микроорганизмами и др. Эти двойные потенциальные механизмы могут дать убедительное биологическое объяснение клинической эффективности СЛИТ и могут устранить разногласия противоречивых результатов, описанных в литературе по этому вопросу.

Благодарность

Исследования, описанные в данной статье, были проведены при финансовой поддержке Министерства Образования и Научных Исследований Италии и Европейского Сообщества (ALLDNAVAS, проект №. QLK3-CT-2002-02026).

Литература:

1. Creticos PS. Immunotherapy with allergens. *JAMA* 1992; 268:2B34-9.
2. Mailing H-J, Weeke BE. *AACI* position paper: immunotherapy. *Allergy* 1993;48:9-35.
3. Bousquet J, Lockey R, Mailing HJ World Health Organization position paper: allergen immunotherapy - therapeutical vaccines for allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102 (4 Part 1):558-62.
4. Aalberse RL, Van der Gaag R, Van Leeuwen J. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4 restricted response. *J Immunol* 1983; 130:722-6.
5. Chapman MD, Platts-mills TAE, Gabriel M *et al.* Antibody response following prolonged hyposensitization with *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1960; 61:431-40.
6. Gleich GJ, Jacob GL, Yunginger JW, Henderson LL Measurement of the absolute levels of IgE antibodies in patients with ragweed hay fever. Effect of immunotherapy on seasonal changes and relationship to IgG antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 1977; 60:186-98.
7. Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, Marshall JD, Umetsu DT. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 1993; 178:2123-30.
8. 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- γ secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* 1995; 154:4187-94.
9. Norman PS. Immunotherapy: 1999-2004. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:1013-23.
10. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998; 102:98-106.
11. Akdis M, Verhagen J, Taylor A *et al.* Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004; 199:1567-77.
12. Canonica GW, Passalacqua G. Noninjection routes for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111 :437-4B.
13. Bousquet J, Van Cauwenberge P. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108 [Suppl. 5];S240-5.
14. Wilson DR, Lima MT, Durham SR. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2005; 60:4-12.
15. Bousquet J, Scheinmann P, Guinneeain MT *et al.* Sublingual- swallow

- immunotherapy (SLIT) in patients with asthma due to house-dust mites: a double-blind, placebo-controlled study. *Allergy* 1999; 54:249-60.
16. Passalacqua G, Albano M, Riccio AM et al. Clinical and immunological effects of a rush sublingual immunotherapy to *Parietaria* species: a double blind placebo controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:964-8.
 17. Lima MT, Wilson D, Pitkin L et al. Grass pollen sublingual immunotherapy for seasonal rhinoconjunctivitis: a randomized controlled trial. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:507-14.
 18. Fanta C, Bohle B, Hirt W et al. Systemic immunological changes induced by administration of grass pollen allergens via the oral mucosa during sublingual immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120:21B-24.
 19. Arikan C, Bahceciler NN, Deniz G et al. Bacillus Calmette-Guérin-induced interleukin-12 did not additionally improve clinical and immunological parameters in asthmatic children treated with sublingual immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:398-405.
 20. Rolinck-Werninghaus C, Kopp M, Liebke C, Lange J, Wahn U, Niggemann B. Lack of detectable alterations in immune responses during sublingual immunotherapy in children with seasonal allergic rhinoconjunctivitis to grass pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136:134-41.
 21. Macatonia SE, Hosken NA. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1994; 154:5071-9.
 22. Passalacqua G, Albano M, Fregonese L et al. Randomised controlled trial of local allergoid immunotherapy on allergic inflammation in mite-induced rhinoconjunctivitis. *Lancet* 1998; 351:629-32.
 23. Mistrello G, Brenna O, Roncarolo D, Zanoni D, Gentili M, Falagiani P. Monomeric chemically modified allergens: immunological and physicochemical characterization. *Allergy* 1996; 51:8-15.
 24. La Rosa M, Ranno C, Andre C, Carat F, Tosca MA, Canonica GW. Double-blind placebo-controlled evaluation of sublingual-swallow immunotherapy with standardized *Parietaria Judaica* extract in children with allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:425-32.
 25. Ariano R, Panzani RC, Chiappella M, Augeri G, Falagiani P. Local immunotherapy of seasonal allergic rhinitis in children due to *Parietaria officinalis* pollen: a preliminary report. *Pediatr Asthma Allergy Immunol* 1993; 7:227-37.
 26. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F et al. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med* 2002; 196:379-87.
 27. Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP et al. Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4538-42.
 28. Giannarini L, Maggi E. Decrease of allergen-specific T cell response induced by local nasal immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:404-12.
 29. Hoyne GF, O'Hehir RE, Wraith DC, Thomas WR, Lamb JR. Inhibition of T cell and antibody response to house dust mite allergen by inhalation of the dominant T cell epitope in naive and sensitized mice. *J Exp Med* 1993; 177:1783-8.
 30. Van Neerven RJJ, Ebner C, Yssel H, Kapsenberg ML, Lamb JR. T-cell responses to allergens: epitope-specificity and clinical relevance. *Immunol Today* 1996; 17:526-32.
 31. Fasler S, Aversa G, Terr A, Thestrup-Pedersen K, de Vries JE, Yssel H. Peptide-induced anergy in allergen-specific human Th2 cells results in lack of cytokine production and B cell help for IgE synthesis. Reversal by IL-2, not IL-4 or IL-13. *J Immunol* 1995; 155:4199-206.
 32. Secrist H, Dekruyff RH, Umetsu DT. Interleukin 4 production by CD4+ T cells from allergic individuals is modulated by antigen concentration and antigen-presenting cell

- type. *JExpMed* 1995; 181:1081-9.
33. Jutel M, Akdis M, Budak F *et al.* 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.
 34. Nouri-Aria KT, Wackholz PA, Francis JM *et al.* Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol* 2004; 172: 3252-9.
 35. Smith TR, Alexander C, Kay AB, Larche M, Robinson DS. Cat allergen peptide immunotherapy reduces CD4(+) T cell responses to cat allergen but does not alter suppression by CD4(+) CD25(+) T cells: a double-blind placebo-control led study. *Allergy* 2004; 59:1097-101.
 36. Cosmi L, Liotta F, Angeli R *et al.* Th2 cells are less susceptible than Th1 cells to the suppressive activity of CD25⁺ regulatory thymocytes because of their responsiveness to different cytokines. *Blood* 2004; 103:3117-21.
 37. 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.
 38. Stock P, Akbari O, Berry G, Freeman GJ, Dekruyff RH, Umetsu DT. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol* 2004;5:1149-5S.
 39. Trinchieri G. Regulatory role of T cells producing both interferon gamma and interleukin 10 in persistent infection. *J Exp Med* 2001;194:F53-7.
 40. Gardner LM, Thien FC, Douglass JA, Rolland JM, O'Hehir RE. 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.
 41. Verhoef A, Alexander C, Kay AB, Larche M. T cell epitope immunotherapy induces a CD4⁺ T cell population with regulatory activity. *PLoS Med* 2005; 2:253-61.
 42. Gangur V, Simons ER, Hyglass K. Human IP-10 selectively promotes dominance of polyclonally activated and environmental antigen-driven IFN-g over IL-4 responses. *FASEB J* 1998; 12:705-13.
 43. Luster AD. IP-10. In: Oppenheim JJ, Feldman M., eds. *Cytokine reference, a compendium of cytokines and other mediators of host defense*. London: Academic Press, 2000; 1103-9.
 44. Gardner LM, Spyroglou L, O'Hehir RE, Rolland JM. Increased allergen concentration enhances IFN-γ production by allergic donor T cells expressing a peripheral tissue trafficking phenotype. *Allergy* 2004; 59:1308-17.
 45. Gardner LM, O'Hehir RE, Rolland JM. High dose allergen stimulation of T cells from house dust mite-allergic subjects induces expansion of IFN-γ⁺ T Cells, apoptosis of CD4⁺IL-4⁺ T cells and T cell anergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 133:1-13.
 46. Constant S, Pfeiffer C, Woodard A, Pasqualini T, Bonomy K. Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1995; 182:1591-6.
 47. Rogers PR, Croft M. Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance- *J Immunol* 1999; 163:1205-13.
 48. Reefer AJ, Carneiro RM, Custis NJ *et al.* A role for IL-10-mediated HLA-DR7-restricted T cell-dependent events in development of the modified Th2 response to cat allergen. *J Immunol* 2004; 172:2763-72.
 49. Bagnasco M, Mariani G, Passalacqua G *et al.* Absorption and distribution kinetics of the major Parietaria allergen administered by noninjectable routes to healthy human beings. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100:121-9.
 50. 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.