

Reaktif hava yolu hastalığı olan çocuklarda CD4+ CD25^(high) Treg hücre seviyeleri

Gökhan AYDEMİR (*), Ferhat ÇEKMEZ (*), Abdullah Barış AKCAN (**), Cihan MERAL (*), Serkan KEMER (*), Seçil AYDİNÖZ (*), Ferhan KARADEMİR (*), Mustafa KUL (*), Selami SÜLEYMANOĞLU (*), Özkan SAYAN (***)

ÖZET

Alerjik hastalıkların patogenezi ve supresyonunda rol alan CD4+ CD25+ (high) regülatuar T hücreleri (Treg) düzeyleri, reaktif hava yolu hastalığı olan çocuklar ve sağlıklı çocuklarda karşılaştırıldı: hastalık esnasında azalmış seviyeleri ve hastalığın tekrarda önemleri araştırıldı. Reaktif havayolu hastalığı veya tekrarlayan hışıltı nedeniyle takip edilen 20 hasta ve daha önce alt solunum yolu hastalığı veya hışıltı, alerjik hastalık tanısı almamış, aile öyküsünde alerjik hastalığı bulunmayan 20 sağlıklı çocuk dahil edildi. Hasta ve kontrol grubundan kan örnekleri akım sitometri (flow cytometry) tekniği ile analiz edilerek CD4+ ve CD4+CD25+(high) Treg hücre oranları belirlendi. Hasta grubunda ortalama atak sayısı $5,6 \pm 4,1$, ortalama atak hızı (atak sayısı/ay olarak yaş) $0,21 \pm 0,12$ idi. CD4+CD25+(high) T hücre seviyesi hasta grubunda ortalama $6,34 \pm 2,38$ (4,3-11,5), kontrol grubunda ise $7,67 \pm 3,26$ (4,5-15) idi. Hasta ve kontrol grubunda CD4+CD25+(high) T hücre seviyesini karşılaştırdık ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulamadık. CD4+CD25+(high) T hücre seviyeleri atak hızı ve ağır atak sayısı ile ilişkilendirildiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı ters bir ilişki olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). Hasta grubunda CD4+CD25+(high) T hücre seviyeleri düştükçe atak hızı ve ağır atak sayısı artmaktaydı. Reaktif hava yolu hastalığı "astım" in anlamlı belirleyicisidir. CD4+CD25+(high) Treg hücrelerinin daha geniş serilerle irdelenmesini önermekteyiz. Çünkü reaktif havayolu hastalığının etyopatogenezinde ve rekürrensinde önemli bir rol oynuyorlar gibi görünmektedirler.

Anahtar Kelimeler: Treg hücresi, CD4+CD25+(high) T hücre seviyesi, reaktif hava yolu, astım, alerji

SUMMARY

CD4+ CD25^(high) Treg cell levels in children with reactive airway disease

CD4+ CD25+ (high) Treg cell levels which play a role in the pathogenesis and suppression of allergic diseases were analyzed in children with reactive airway disease and compared with healthy children; reduced levels at the time of the disease and the importance in recurrency were investigated. 20 children with reactive airway disease or recurrent wheezing and 20 healthy children without previous lower respiratory disease, wheezing, allergic disease, family history of allergic diseases were included. Blood samples from healthy and patient group were analyzed by flow cytometry and CD4+ CD25+ (high) T regulatory cell levels were determined. Mean number of attacks in the patient group was 5.6 ± 4.1 , mean attack rate was 0.21 ± 0.12 . Mean values of CD4+ CD25+ (high) T regulatory cell percentages in patients group was 6.34 ± 2.38 (4.3 to 11.5) and $7.67 \pm 3.26\%$ in the control group (4.5 to 15). We compared the levels of CD4+ CD25+ (high) T cells in the patient group and control group, didn't make any sense statistically. When CD4+ CD25+ (high) T regulatory cell percentages correlated with both attack rate and severe attacks, there was a statistically significant inverse relationship between them ($p < 0.05$). In patient group levels of CD4+ CD25+ (high) T cells were decreasing gradually as attack rate and the number of severe attacks increased.

Reactive airway disease as a significant predictor of "asthma", we suggest that it would be better to re-investigate CD4+ CD25+ (high) T cells in large series because it seems to play an essential role in the pathogenesis and recurrence of reactive airway disease.

Anahtar Kelimeler: Treg cell, CD4+ CD25+ (high) T cell, reactive airway, asthma, allergy

* GATA, Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, İstanbul, Türkiye, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD

** Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Aydın, Türkiye, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Neonatoloji BD

*** GATA, Ankara, Türkiye, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD

Ayrı basım isteği: Abdullah Barış AKCAN, MD.
Adnan Menderes University, School of Medicine
Department of Pediatrics, Division of Neonatology
Aydın – TURKEY 09100
e-mail : barisakc@hotmail.com

Makalenin Geliş Tarihi: 17.12.2014 • Kabul Tarihi: 03.08.2015 • Çevrim İçi Basım Tarihi: 25.10.2015

Giriş

Tekrarlayan hışıltı veya daha sık kullanılan genel bir tabirle reaktif hava yolu hastalığı (RHYH) endüstrilemiş toplumlarda erken çocukluk ve süt çocukluğu dönemini etkileyen önemli bir sağlık problemidir. Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarına göre ilk bir yaşta çocukların yaklaşık %25'ini ve beş yaş altı çocukların %40'ını etkilemektedir. (1,2) Her ne kadar bu çocukların önemli bir kısmında şikayetler zamanla kaybolursa da önemli bir kısmında daha sonra astım gelişebilmektedir. (3,4) Ülkemizde de erken çocukluk döneminde hışıltı, öksürük ve nefes darlığı öyküsü ile başvuran ve astım tanı testlerinin uygulanmasındaki güçlükten dolayı "reaktif havayolu hastalığı" tanısı alan geniş bir hasta grubu bulunmaktadır. Bunların bir bölümünde atopi veya alerjik astım mevcuttur. Castro-Rodriguez ve arkadaşlarının hazırladığı klinik bir sınıflandırmada, üç yaşın altında tekrarlayan hışıltı atağı geçiren çocukların kendilerinde egzama öyküsü, ailelerinde astım öyküsü mevcutsa veya alerjik rinit, soğuk algınlığı olmaksızın hışıltı öyküsü olması ve/veya periferik kanda %4'ten fazla eozinofili bulunması durumlarından ikisi mevcut ise astım gelişme riski artmaktadır. (5)

Bağışıklık sistemi bir yandan konağı çeşitli patojenlerden korumaya çalışırken diğer yandan da kendinden olsun yada olmasın zararsız antijenlere karşı belli bir seviyede tolerans sağlama kapasitesine sahip kompleks interaktif bir ağ oluşturmaktadır. Alerji, otoimmünite, tümör toleransı ve organ reddi gibi immün tolerans ile ilişkili hastalıklar bozulmuş immün cevabın sonuçları olarak giderek artmaktadır. Alerji ile oluşan majör klinik tablolar alerjik rinit, alerjik astım, besin alerjisi, atopik dermatit ve anafilaksidir. Güncel çalışmalar göstermektedir ki, aşırı hijyenik bir ortamda yaşamak ve düşük mikrobiyal temas Treg aktivitesini bozmakta ve Th1 ve Th2 yanıtları aşırıya kaçmakta sonuç olarakta hem otoimmün hastalıklar hem de alerjik hastalıklar artmaktadır. (6) 'Hijyen hipotezi' son yirmi yılda yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. Batı ülkelerindeki alerjik hastalıklarda görülen patlamanın, mikroorganizmalarla daha az karşılaşma sonucunda gelişen Th2 den Th1'e immün yanıtta azalma ile oluştuğu düşünülmektedir. Azalmış mikrobiyal uyarı sonucunda Th1 üzerine etki eden sitokinlerin üretimi azalır ve böylece hem Th1 yolağı baskılanır hem de Th2 yanıtı artar. (7,8)

Alerjik astım Th2 immün yanıtın oluştuğu ve IL 4, 5, 10 ve 13 gibi sitokinlerin rol oynadığı kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Son on-yirmi yılda alerjik hastalıkların prevalansı dramatik olarak artmış, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde popülasyonun %30 kadarını etkiler hale gelmiştir. Gerek Th2 ile ilişkili alerjik hastalıklarda gerekse Th1 ile ilişkili otoimmün bozuk-

luklardaki artış Th1 ve Th2 yanıtını düzenleyen regülatuar T hücrelerinde (Treg) sayısal veya nitelik olarak oluşabilecek bir bozukluğu düşündürmektedir. Çeşitli hayvan deneyleri alerji ve astım modellerinde Treg hücrelerinin alerjenlere karşı immün toleransın sağlanması ve devam ettirilmesinde esas rol oynadığını ortaya koymaktadır. (9-11) CD4+CD25+ Treg hücreleri, CD4+ T hücrelerinin yaklaşık %5-10'unu oluşturur. Sitokin üretimini ve efektör T hücrelerinin proliferasyonunu durdurabilme yetenekleri vardır. CD4+ CD25+(high) Treg hücreleri bütün CD4+ hücrelerin yaklaşık %2'sini oluşturur ve immün cevabi düzenleyen ve Foxp3 transkripsiyon faktörünü eksprese eden ana regülatuar hücre grubunu oluşturur. Foxp3, Treg hücrelerinin gelişiminde ve fonksiyonunda görevli esas transkripsiyon faktörüdür. (12,13) Foxp3'ün tek nükleotid polimorfizmi çocuklarda alerji gelişimi ile ilişkilidir.(14)

Sonuç olarak CD4+CD25+FOXP3+ Treg ve uyarılabilir tip 1 Treg hücreleri; Th1, Th2, Th17 gibi diğer efektör T hücrelerinin süpresyonu, eozinofil, mast hücreleri ve bazofil süpresyonu, IgE'den IgG4'e antikor izotip değişikliği, inflamatuvar dendritik hücrelerin süpresyonu ve dokulara inflamatuvar hücre göçünün baskılanması gibi pek çok farklı mekanizma ile alerji gelişimini baskılamaktadır.

Bu çalışmada, erken çocukluk döneminde reaktif havayolu hastalığı nedeniyle takip edilen hastaların Treg hücre seviyelerinin belirlenmesi ve sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılarak daha önceki atopi ve alerjik hastalıklarla ilgili yayınlarda belirtildiği gibi hastalığın azalmış CD4+CD25+(high) Treg hücreleri ile ilişkisinin tespiti amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları polikliniğine 2010 yılı içerisinde müracaat eden, reaktif havayolu hastalığı veya tekrarlayan hışıltı (3 veya daha fazla kez tıbbi olarak hışıltı teşhisi konan) nedeniyle takip edilen 20 hasta ve kontrol grubunu oluşturmak üzere aynı yaş grubundan daha önce alt solunum yolu hastalığı veya hışıltı tanısı almamış, anne-babasinda astım öyküsü olmayan ve alerjik hastalığı (alerjik rinit, besin alerjisi ve atopik dermatit gibi) bulunmayan 20 sağlıklı çocuk dahil edildi. Kardiyak, metabolik, nörolojik, ve diğer sistemlere ait herhangi bir kronik hastalığı bulunanlar ile inhale kortikosteroid veya anti-lökotrien kullananlar çalışma dışında tutuldu. Hasta grubundaki çocukların ebeveynlerinden geçirilen atak sayısı ve atak ağırlığı (acil medikal tedavi, oksijen ihtiyacı) ile ilgili bilgiler toplanarak çalışma ile ilgili ayrıntılı bilgi verildi ve "bilgilendirilmiş gönüllü olur formu" alındı. Olguların ataklarının ağırlığı, retrospektif olarak uygulanan tedavinin düzeyine göre sınıflandırıldı. Araştırma için etik onay GATA Etik Kurul Başkanlığından alındı.

Hasta ve kontrol grubundan poliklinik şartlarında toplanan kan örnekleri akım sitometri (flow cytometry) tekniği ile analiz edilerek CD4+ ve CD4+CD25+(high) T hücre oranları belirlendi. T hücrelerinin CD4+CD25+(high) alt gruplarının tespiti için anti-CD4FITC, anti-CD25PE florokrom boyalı antikolar ve izotop kontrolleri için ise anti IgG2aFITC/anti-IgG1PE kullanıldı (BD Pharmingen). Akım sitometri için FACSCalibur (Beckton Dickinson) cihazı kullanıldı. Elde edilen istatistiki veriler SPSS 13.0 programı kullanılarak değerlendirildi. Verilerin analizi yapılırken tanımlayıcı istatistiklerden aritmetik ortalama () ve standart sapma (SS) kullanıldı. Araştırma verilerinin normal dağılıma uygunluğuna Kolmogorov-Smirnov testi ve grafik-

sel gösterimlerle bakıldı. Normal dağılıma uygunluk göstermediği için araştırmanın sonucunda elde edilen veriler Mann Whitney-U test ve ki kare test kullanılarak karşılaştırıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık p<0,05 düzeyinde değerlendirildi.

Bulgular

Çalışmaya dahil edilen katılımcıların karakteristik özellikleri incelendiğinde kontrol ve hasta gruplarının her ikisinde de 12 erkek(%60), 8 kız(%40) mevcuttu. Ortalama yaş, hasta grubunda 30,7±14,94 ay, kontrol grubunda ise 30,6±16,28 ay idi. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet özellikleri açısından anlamlı fark yoktu. İmmunolojik örnekler için kan örneği alımı esnasında katılımcılar son bir ay içerisinde hışıltılı veya hışıltısız herhangi bir solunum yolu hastalığı geçirmemişti. Hasta grubu incelendiğinde hastalardan biri dört kez(%5), biri üç kez(%5), beşi iki kez (%25)ve yedisi bir kez(%35) ağır atak geçirmişti. Altı hastada (%30) hiç ağır atak gelişmemişti. Yine hasta grubunda ortalama atak sayısı 5,6 ±4,1, ortalama atak hızı (atak sayısı/ay olarak yaş) 0,21±0,12 idi.

Akım sitometri incelemesinde CD4+CD25+(high) T regülatuar hücresi seviyeleri belirlenerek her iki grup arasında karşılaştırıldı.(Tablo-1) Hasta grubunda CD4+ hücre yüzdesi ortalama olarak %38,78±7,34 (22,6-51), kontrol grubunda ise %37,75±7,39 (26-53) Her iki grup birlikte değerlendirildiğinde ortalama %38,26±7,29 idi. CD4+CD25+(high) T hücre seviyesi hasta grubunda ortalama %6,34±2,38 (4,3-11,5), kontrol grubunda ise %7,67±3,26 (4,5-15) idi. Her iki grup birlikte değerlendirildiğinde ortalama %7±2,9 idi.

Tablo I. CD4+, CD25+ ve CD4+CD25+ T hücreleri için akım sitometrisi sonuçları

	Hasta (n=20)	Kontrol (n=20)	P-değeri
CD4+ T hücreleri% ort.(SD)	38,78(7,34)	37,75(7,4)	0,55
CD4+CD25 ^(high) Thücreleri% ort. (SD)	6,34(2,38)	7,67(3,26)	0,28

Hasta ve kontrol grupları arasında yapılan karşılaştırmada CD4+ T hücre seviyesi kontrol grubunda çok az bir farkla daha düşük bulunurken istatistiksel olarak anlamlı değildi. Çalışmada esas olarak incelenen CD4+CD25+(high) T hücre seviyeleri karşılaştırıldığında hasta grubunda beklendiği şekilde kontrol grubundan daha düşük bulunurken istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz daha önemli olabilecek bir diğer sonuç ise; CD4+CD25+(high) T hücre seviyeleri ağır atak sayısı ile ilişkilendirildiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı ters bir ilişki olduğu tespit edildi (Tablo 2) (p<0,05) .Yani hasta grupta CD4+CD25+(high) T hücre seviyeleri düştükçe ağır atak sayısı artmaktadır.

Tablo II. Hasta grubunda CD4+ CD25+ (high) T hücre seviyeleri ile ağır atak sayısı ilişkisi

Hasta grubunda CD4+ CD25 ^(high) T hücre seviyesi	Ağır atak geçiren (n:14)	Ağır atak geçirmeyen (n: 6)
P < 0.05	% 6.45 ± 3.5	% 6.07 ± 1.2

Tartışma

Bu çalışmanın temel amacı, erken çocukluk döneminde reaktif havayolu hastalığı nedeniyle takip edilen hastaların Treg hücre seviyelerinin belirlenmesi ve sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılarak daha önceki atopi ve alerjik hastalıklarla ilgili yayınlarda belirtildiği gibi hastalığın azalmış CD4+CD25+(high) Treg hücreleri ile ilişkisinin ortaya konulmasıydı. Çalışmaya katılan çocukların yaş ve cinsiyet gibi demografik karakteristikleri arasında belirgin bir fark yoktu ve sonuçlar bu değişkenlerden etkilenmemektedir.

Daha önceki çeşitli çalışmalarda CD4+CD25+(high) T hücre seviyeleri araştırılmış ve bağışıklık yanıtındaki düzenleyici rolü ayrıntılı olarak açıklanmaya çalışılmıştır. Treg hücreleri CTLA-4 ve TGF-beta1 gibi moleküllerin yardımı ile sitokin üretimi üzerine olan süpresör etkileri vasıtası ile düzenleyici etkilerini gösterirler. (15-16) Borrego ve ark.'nın tekrarlayan hışıltısı olan çocuklarda yaptıkları çalışmada hem CD4+CD25+ T hücre düzeyleri hem de CD4+CD25+CTLA-4+ T hücre düzeyleri sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur. Çalışmacılar hasta grubunu düşük risk ve yüksek risk olarak ayırmış, değerleri yüksek riskli grupta daha da düşük tespit etmişlerdir.(17) Bu sonuçlar Haddeland ve ark.'nın tekrarlayan hışıltısı olan çocuklarda yapmış olduğu çalışmadakilerle uyumlu olarak bulunmuştur. Aynı araştırmacı yenidoğanlardaki bozulmuş Treg hücre üretiminin artmış herediter alerji riski ile ilişkili olduğunu tespit etmiştir.(18)

Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmasa da bizim çalışmamızda da CD4+CD25+(high) T hücre düzeyleri benzer olarak reaktif hava yolu hastalığı olan çocuklarda sağlıklılarla karşılaştırıldığında daha düşük seviyelerde tespit edilmiştir. Bunun reaktif havayolu hastalığı tanısı almış olan hastaların bir kısmının alerjik etyopatogeneze sahip olmamasından kaynaklandığı düşünülebilir. Yine astımlı çocuklarda yapılan farklı çalışmalarda ise CD4+CD25+(high) T hücre düzeyleri ile istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir.(19-21)

Literatürdeki araştırmalardan yola çıkılarak CD4+CD25+(high) T hücrelerinin pek çoğunun indüklendikten sonra fonksiyonunda görevli esas transkripsiyon faktörü Foxp3 ekspresyonu ettiğini düşünürsek hasta ve kontrol grupları arasında Foxp3 açısından da anlamlı farklılıklar olabileceği düşünülebilir.(22-23) (Borrego ve ark.'nın yaptığı çalışmada bu farklılık izlenmemiştir.)

Yine güncel çalışmalarda azalmış IFN- γ ekspresyonu ve atopik hastalıklar arasında bir ilişki olduğundan bahsedilmektedir. (24-25) Tucson çalışmasında doğumda ve üçüncü ayda tespit edilen düşük IFN- γ üretiminin yaşamın ilk yılındaki tekrarlayan hışıltı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ancak bu konuda da henüz kesin bir görüş birliği oluşmamış, farklı araştırmacılar ailesel atopi riskinin hışıltının tekrarlanmasında birlikte bulunan karıştırıcı olarak rol aldığını iddia etmektedirler. (26)

Çalışmamızda elde ettiğimiz daha önemli bir diğer ayrıntı ise CD4+CD25+(high) T hücre düzeylerinin atak hızı ve ağır atak sayısı ile ters ilişkili olmasıdır. Reaktif hava yolu hastalığı nedeniyle takip edilen hastalarda CD4+CD25+(high) T hücre seviyeleri azaldıkça atak hızı (bir diğer deyişle atak sayısı) ve ağır atak sayısı giderek artmaktadır. Buradan yola çıkılarak

Treg hücre düzeylerindeki immünolojik değişikliklerin hışıltının tekrarlanmasında rol oynayan çok önemli bir faktör olduğu düşünülebilir. Güncel literatürde bu konuda yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Sonuç olarak immünolojik belirteçler halen ayrıntılı olarak araştırılmakta ve alerjik hastalıklarda ki önemini korumaktadır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere dayanarak çocukluk çağının en önemli kronik hastalığı olan astım olarak süregidebilen reaktif havayolu hastalığının etyopatogenezinde ve rekürrensinde önemli bir yere sahip olduğunu düşündüğümüz CD4+CD25+(high) Treg hücrelerinin ve IFN- γ gibi sitokinlerin daha geniş serilerde yeni çalışmalarla irdelenmesinde fayda olduğunu düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Dela Bianca AC, Wandalsen GF, Mallol J, Solé D. Prevalence and severity of wheezing in the first year of life. J Bras Pneumol. 2010;36:402-409.
2. Mallol J, Andrade R, Auger F, Rodriguez J, Alvarado R, Figueroa L. Wheezing during the first year of life in infants from low-income population. Allergol Immunopathol. 2005;33:257-263.
3. Taussig LM, Wright AL, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, Martinez FD. Tucson children's respiratory study: 1980 to present. J Allergy Clin Immunol. 2003; 111:661-675.
4. De Sario M, Di Domenicantonio R, Corbo G, Forastiere F, Pistelli R, Rusconi F, et al. Characteristics of early transient, persistent and late onset wheezers at 9 to 11 years of age. J Asthma. 2006;43:633-638.
5. Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD. A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing. Am J Respir Crit Care Med. 2000;162:1403-1406.
6. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. N. Engl J Med. 2002;347:911-920.
7. Linehan MF, Frank TL, Hazell ML, Francis HC, Morris JA, Baxter DN, et al. Is the prevalence of wheeze in children altered by neonatal BCG vaccination? J Allergy Clin Immunol. 2007;119:1079-1085.
8. Romagnani S. Coming back to a missing immune deviation as the main explanatory mechanism for the hygiene hypothesis. J Allergy Clin Immunol. 2007;119:1511-1513.
9. Scheikh A, Smeeth L, Hubbard R. There is no evidence of an inverse relationship between Th2 mediated atopy and Th1 mediated autoimmune disorders: lack of support for the hygiene hypothesis. J Allergy Clin Immunol. 2003;111:131-135.
10. Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. Nat Rev Immunol. 2001;1:169-175.
11. Curroto de Lafaille MAC, Lafaille JJ. CD4 regulatory T cells in autoimmunity and allergy. Curr Opin Immunol. 2002; 14:771-778.
12. Jartti T, Burmeister KA, Serogy CM, Jennens-Clough

- ML, Tisler CJ, Salazar LP, et al. Association between CD4+CD25High T cells and atopy in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120:177-183.
13. Roncador J, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martinez-Torrecuadrada JL, Ling KL, et al. Analysis of Foxp3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol.* 2005; 35:1681-1691.
 14. Bottema RW, Kerkhof M, Reijmerink NE, Koppelman GH, Thijs C, Stelma FF, et al. X-chromosome Forkhead box P3 polymorphisms associate with atopy in girls in three Dutch birth cohorts. *Allergy.* 2010;65:865-874.
 15. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med.* 2000;192:295-302.
 16. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakauchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 2000;192:303-310.
 17. Borrego LM, Arroz MJ, Videria P, Martins C, Guimaraes H, Nunes G, et al. Regulatory cells, cytokine pattern and clinical risk factors for asthma in infants and young children with recurrent wheeze. *Clin Exp Allergy.* 2009;39:1160-1169.
 18. Haddeland U, Karstensen AB, Farkas L, Bo Ko, Pirhonen J, Karlsson M, et al. Putative regulatory T cells are impaired in cord blood from neonates with hereditary allergy risk. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005;16:104-112.
 19. Shi HZ, Li S, Xie ZF, Qin XJ, Qin X, Zhong XN. Regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes in peripheral blood from patients with atopic asthma. *Clin Immunol.* 2004;113:172-178.
 20. Hartl D, Koller B, Mehlhorn AT, Reinhardt D, Nicolai T, Schendel DJ, et al. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119:1258-1266.
 21. Lin YL, Shieh CC, Wang JY. The functional insufficiency of human CD4+CD25 high T-regulatory cells in allergic asthma is subjected to TNF-alpha modulation. *Allergy.* 2008;63:67-74.
 22. Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, Crellin N, Dai M, Urban PC, et al. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J Clin Invest.* 2005;115:3276-3284.
 23. Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:209-226.
 24. Kjellman NI, Croner S. Cord blood IgE determination for allergy prediction--a follow-up to seven years of age in 1,651 children. *Ann Allergy.* 1984;53:167-171.
 25. Kondo N, Kobayashi Y, Shinoda S, Takenaka R, Teramoto T, Kaneko H, et al. Reduced interferon gamma production by antigen-stimulated cord blood mononuclear cells is a risk factor of allergic disorders--6-year follow-up study. *Clin Exp Allergy.* 1998;28:1340-1344.
 26. Van der Velden VH, Laan MP, Baert MR, de Waal Malefyt R, Neijens HJ, Savelkoul HF. Selective development of a strong Th2 cytokine profile in high-risk children who develop atopy: risk factors and regulatory role of IFN-gamma, IL-4 and IL-10. *Clin Exp Allergy.* 2001;31:997-1006.