

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMISOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
Departamentul III – Științe Funcționale

ZBÎRCEA LAURIANA-EUNICE



TEZĂ DE DOCTORAT

**ROLUL PROTEINELOR DIN POLENUL DE AMBROZIA CARE
LEAGĂ CALCIUL ÎN COMPARAȚIE CU ALTE ALERGENE ÎN
MANAGEMENTUL ALERGIEI LA AMBROZIA**

R E Z U M A T

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. PANAITESCU CARMEN

Timișoara

2024

REZUMAT

PARTEA GENERALĂ

Alergia este o reacție de hipersensibilitate de tip I mediată de imunoglobulinele E (IgE) și reprezintă cea mai frecventă tulburare imunitară care afectează aproape 30% din populația lumii. Organizația Mondială pentru Alergie (WAO) estimează că aproximativ 400 de milioane de persoane din întreaga lume suferă de rinită alergică și 300 de milioane suferă de astm. Polenul și ciupercile sunt considerați cele mai importante aeroalergene.

Polenul de ambrozie este o sursă majoră de alergene distribuită în întreaga lume. Ambrozia (*Ambrosia artemisiifolia*) este o buruiănă erbacee, originară din America de Nord. Transporturile contaminate cu semințe de ambrozie din America de Nord au dus la o expansiune majoră a plantei în Europa la începutul secolului al XX-lea, invadând puternic Câmpia Panonică. Țări din această regiune precum Ungaria și România sunt cele mai afectate de dispersia ambroziei. Polenul de ambrozie este foarte alergen și are poate induce rinită alergică și simptome mai severe, cum ar fi astmul. Schimbările climatice, urbanizarea și poluarea au contribuit și mai mult la alergenitatea crescută a polenului de ambrozie.

În prezent, în polenul de ambrozie au fost identificate unsprezece alergene. Două dintre aceste alergene sunt considerate majore, Amb a 1 și Amb a 11. Mai mult de 90% dintre pacienții alergici sunt sensibilizați la Amb a 1, în timp ce două treimi pot fi reactivi la Amb a 11. Restul alergenelor sunt minore cu rata de sensibilizare la IgE mai mică de 50%. Unele dintre aceste alergene sunt importante datorită capacității lor de a reacționa încrucișat la alte alergene din aceeași familie de proteine. Amb a 6, Amb a 8, Amb a 9 și Amb a 10 sunt pan-alergene cunoscute din polenul de ambrozia. Amb a 9 și Amb a 10 aparțin familiei de proteine care leagă calciul și s-a sugerat că acestea pot reacționa încrucișat cu Art v 5 din polenul de pelinăriță, cu Phl p 7 din polenul de timoftică și cu Bet v 4 din polenul de mesteacăn. Până acum, diagnosticul alergiei la ambrozia se bazează pe extract din polen de ambrozia și Amb a 1. Amb a 4 poate fi testat în sistem multiplex cu Amb a 1. Cu toate acestea, markerii de reactivitate încrucișată, cum ar fi pan-alergenele Amb a 9 și Amb a 10 sunt nu sunt incluse în diagnostic.

Tratamentul alergiei la ambrozia include evitarea expunerii la polen, tratamentul simptomatic și imunoterapia alergenică (AIT). Evitarea expunerii nu este fezabilă în timpul sezonului de polen și medicamentele tratează doar simptomele, nu și boala. AIT este singurul tratament curativ capabil să modifice cursul bolii cu efecte pe termen lung. SCIT (imunoterapia

subcutanată), cunoscută și sub numele de vaccinare terapeutică, este cea mai veche și cea mai comună formă de AIT. Cu toate acestea, AIT-urile actuale se bazează pe extracte de polen de ambrozia. Dezavantajele actualelor AIT pe bază de extract sunt heterogenitatea extractului și faptul că conținutul alergenice nu este standardizat. Prin urmare, utilizarea extractelor ar putea reprezenta o problemă din cauza pan-alergenelor care ar putea duce la rezultate fals pozitive din cauza reactivității încrucișate. Mai mult decât atât, unele alergene ar putea lipsi din aceste extracte sau ar putea fi subreprezentate. Pe lângă problema conținutului de alergene nestandardizate, extractele de alergen utilizate pentru AIT sunt obținute în mod diferit de către producători și, prin urmare, metoda de extracție, procesare și denaturare le poate afecta și mai mult imunogenitatea. Unele extracte sunt modificate pentru a reduce alergenitatea și pentru a menține imunogenitatea alergenului, variantă cunoscut sub numele de alergoizi. Această variabilitate indusă de procesul de producție a conținutului de alergene constituie o problemă pentru succesul imunoterapiei. Aceste problemele legate de diagnosticul și tratamentul alergiei la ambrozia evidențiază necesitatea unor studii suplimentare pe aceste subiecte.

PARTEA SPECIALĂ

Prezentul studiu și-a propus să îmbunătățească managementul alergiei la ambrozia, incluzând diagnosticul molecular actual și tratamentul imunoterapeutic. Principalele obiective ale studiului actual au fost următoarele:

- Primul obiectiv major a fost acela de a determina rolul allergenelor Amb a 9 și Amb a 10 prin identificarea ratei de sensibilizare IgE la o populație din zona de vest a României (județul Timiș) și posibila reactivitate încrucișată a acestor alergene cu alte alergene similare.
- Al doilea obiectiv major a fost identificarea tiparelor de sensibilizare la alergenele majore și la pan-alergenele din polenul de ambrozia, pelinariță, mesteacăn și timoftică, într-o populație din aceeași zonă, prin determinarea sursei autentice de sensibilizare de reactivitate încrucișată.
- Al treilea obiectiv major a fost evaluarea unor vaccinuri AIT disponibile comercial în ceea ce privește inducerea de IgG specifici alergene și eficacitatea acestor anticorpi IgG de a bloca legarea IgE-ului pacienților de alergene.

În vederea atingerii scopurilor prezentei teze, a fost selectată o populație alergică la ambrozia, bine caracterizată clinic, formată din 237 de pacienți din vestul României.

Alergenele Amb a 9 și Amb a 10 au fost obținute recombinant în *E. coli* și caracterizate pentru a fi utilizate în continuare pentru a evalua reactivitatea IgE, relevanța clinică și reactivitatea încrucișată a acestora. Sensibilizare IgE la alte surse alergenice au fost determinate folosind instrumente disponibile de diagnostic molecular. Vaccinurile AIT disponibile comercial au fost utilizate pentru a evalua imunogenitatea alergenelor din polenul de ambrozia prin imunizarea la iepuri și capacitatea de blocare a respectivilor anticorpi IgG a fost testată *in vitro*.

Selecția subiecților alergici la ambrozia din vestul României a fost realizată la două clinici care dețin un compartiment de alergii din Timișoara, România. 150 de pacienți au fost caracterizați clinic pentru un studiu și 87 de pacienți pentru cel de-al doilea studiu. Partea experimentală a acestui studiu a fost realizată la Centrul OncoGen din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență „Pius Brînzeu”, Timișoara, România. Studiul pe animale care a implicat imunizarea iepurilor cu alergene recombinante a fost realizat la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului „Regele Mihai I al României” din Timișoara, România, în timp ce imunizarea iepurilor cu AIT-uri pe bază de extract de ambrozia a fost efectuată de Davids Biotechnologie GmbH, Germania.

EXPRESIA ȘI CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A PROTEINELOR CARE LEAGĂ CALCIUL, AMB A 9 ȘI AMB A 10, DIN POLENUL DE AMBROZIA

Pentru a caracteriza o populație în ceea ce privește sensibilizarea IgE față de proteinele care leagă calciul (CBP) din polenului de ambrozia, Amb a 9 și Amb a 10 au fost produse ca alergene recombinante în sistem bacterian (*Escherichia coli*) prin inginerie genetică. Primul pas în producerea alergenelor recombinante a fost selectarea secvenței alergenului de interes (Amb a 9.0101 și Amb a 10.0101). Constructul utilizat - plasmida pET27b - a fost modificată de ATG Biosyntetics pentru a codifica secvența Amb a 9 sau, respectiv, Amb a 10. Administrarea șocului termic a transformat constructul în celulele *E. coli* BL-21-Gold. Expresia proteinelor a fost indusă prin adăugarea de IPTG în cultura celulară. Purificările alergenelor recombinante au fost efectuate cu ajutorul cromatografiei de afinitate pe bază de nichel utilizând marcarea cu șase histidine (His-Tag) care au fost atașate la capătul C-terminal în pasul de design al plasmidului. După purificare, proteinele au fost dializate și concentrația de proteine a fost măsurată.

Proteinele au fost apoi caracterizate fizico-chimic. Puritya proteinelor a fost observată pe SDS-PAGE (electroforeza cu gel de poliacrilamida cu dodecil sulfat de sodiu) în condiții reducătoare și nereducătoare. De asemenea, au fost efectuate analize de dicroism circular (CD) și spectometrie de masă MALDI-TOF pentru a obține informații privind structura

secundară a proteinelor și greutatea moleculară. Omologia CBP-urilor din ambrozia cu alte structuri a fost, de asemenea, evaluată folosind instrumentul online CLUSTAL Omega pentru a prezice posibile alergene cu care acestea pot da reactivitate încrucișată.

rAmb a 9 obținut în prezentul studiu a migrat la aproximativ 10 kDa (kilodaltoni) pe SDS-PAGE, în timp ce rAmb a 10 a migrat la aproximativ 18 kDa și greutatea moleculară calculată pentru Amb a 9 și Amb a 10 au fost confirmate prin analiză în spectrometrie de masă (10 și 18 kDa). Rezultatele au arătat că Amb a 10 a format dimeri și trimeri pe gel în condiții nereducătoare, dar nu Amb a și 9, sugerând că Amb a 10 are potențialul de a fi mai alergen. Dicroismul circular a fost efectuat în absența calciului și a relevat faptul că proteinele conțin o cantitate bună de alfa-helix în structurile lor, iar cele două proteine au prezentat asemănări în structura lor secundară. Studiul de omologie a relevat o similaritate crescută de secvență a alergenului Amb a 9 cu alte CBP-uri 2 cu 2 EF-hand din surse cunoscute de alergene, cum ar fi Art v 5, Syr v 3, Bet v 4, Ole e 3, Bra n 2, Che a 3, Phl p 7 și Cyn d 7 (între 60-80%). Amb a 10, pe de altă parte, împărtășește o similaritate limitată (50-60%) cu proteinele 4-EF hand Ole e 8 și alte proteine 2 EF-hand, cum ar fi Bet v 4, Cyn d 7, Che a 3, Phl p 7, Syr v 3, Aln g 4.

ROLUL PROTEINELOR CARE LEAGĂ CALCIUL DIN POLENUL DE AMBROZIA ÎN ALERGIA LA AMBROZIA

Principalele obiective ale acestui studiu au fost identificarea sensibilizării IgE la Amb a 9 și Amb a 10 la o populație cu alergii la polenul de ambrozii din vestul României pentru a determina dacă aceste proteine au relevanță clinică pentru pacienți și pentru a determina capacitatea acestora de a reacționa încrucișat. De asemenea, pentru a obține seruri specifice alergenilor, doi iepuri de rasă New Zealand White (NZW), femele, au fost injectate cu trei doze de alergene (rAmb a 9 sau rAmb a 10), fiecare de 200 μg folosind adjuvantul complet Freund (o dată) și adjuvantul incomplet Freud (de două ori), iar serurile imune au fost colectate după a doua și a treia imunizare.

În primul rând, reactivitatea IgE față de rAmb a 9 și rAmb a 10 la pacienții alergici la ambrozia din Vestul României (n=87) a fost testată prin tehnica ELISA (test imunosorbant legat de enzime). Rezultatele au indicat că un sfert dintre pacienți (25%) au reacționat la rAmb a 9 și aproximativ o treime (35%) au reacționat la Amb a 10. Niciunul dintre pacienți nu a prezentat monosensibilizare la CBP-urile din ambrozia în lipsa sensibilizării la Amb a 1, ceea ce a indicat o alergie reală la ambrozia. Reactivitatea IgE la CBP de ambrozia raportată la

această populație a fost mai mare decât cea raportată anterior, dar valorile IgE nu au fost ridicate.

Potențialul alergenice al rAmb a 9 și al rAmb a 10 de a induce degranularea bazofilelor cu eliberarea ulterioară a mediatorilor chimici a fost determinat în testul de eliberare a mediatorului. Testul de eliberare a mediatorului se bazează pe bazofile leucemice de șobolan (RBL) transfectate cu receptorul de IgE uman de mare afinitate (FcεRI). Celulele RBL încărcate cu ser de la șase pacienți sensibilizați la CBP de ambrozia și stimulați cu șase concentrații diferite de alergen au arătat că rAmb a 10 a indus degranulare la aproape toți pacienții pozitivi la rAmb a 10 cu cea mai mare degranulare (35%) la concentrația maximă (1000 ng/ml). Amb a 9 pare să inducă o degranulare mai mică datorită reactivității IgE scăzute. Prin urmare, Amb a 10 este un alergen potent, dar degranularea indusă nu este mare, în timp ce Amb a 9 a arătat o alergenitate scăzută.

Mai mult, a fost investigată asocierea dintre diferitele fenotipuri de alergie la ambrozie și sensibilizarea la CBP din ambrozia. S-a constatat că pacienții nesensibilizați la CBP din ambrozia au raportat semnificativ mai multe manifestări ale pielii în comparație cu pacienții sensibilizați la CBP din ambrozia. Aceste descoperiri sugerează că simptomele pielii nu sunt asociate cu sensibilizarea CBP și ar putea fi asociate cu alte alergene din ambrozia. De asemenea, mai mulți pacienți sensibilizați la CBP din ambrozia suferă cel mai adesea de simptome nazale, oculare și de astm.

Prezența epitopilor care dau reactivitate încrucișată între CBP de ambrozia și pelinariță a fost evaluată în continuare utilizând ser de iepure specific rAmb a 9 și rAmb 10 prin tehnica ELISA. Plăcile ELISA au fost acoperite cu alergene și extracte de polen de ambrozia și pelinariță și incubate cu serul de iepure specific CBP, iar reacția a fost detectată cu un anticorp anti-IgG de iepure marcat cu o enzimă în prezența unui substrat. Rezultatele au arătat o tendință similară de reactivitate ridicată la rAmb a 9 și rArt v 5 folosind serul specific rAmb a 9 și reactivitate mai mică, dar considerabilă, la rAmb a 10. Serul de iepure specific rAmb a 10 a legat rAmb a 10 mai bine și a arătat o reactivitate mai scăzută cu rAmb a 9 și rArt v5 cu rezultate similare între cele două. Aceste descoperiri sugerează un comportament puternic de reactivitate încrucișată între aceste CBP, în special între rAmb a 9 și rArt v 5. În plus, testarea ambelor seruri de iepure specifice alergelor față de extractele din polen de ambrozie și de pelinariță a dezvăluit o reactivitate IgG scăzută probabil datorită cantității reduse de CBP din extracte.

Deși sunt necesare mai multe studii pentru a confirma importanța clinică a alergenelor Amb a 9 și Amb a 10, acest studiu a arătat că proteinele care leagă calciul recombinante din

polenul de ambrozie s-au dovedit a fi utile în detectarea sensibilizării IgE specifice la pacienții alergici la ambrozie și pot fi luate în considerare pentru detectarea sensibilizării la CBP în diagnosticul molecular al alergiei la ambrozie pe lângă Amb a 1 și alte alergene.

ALERGENE MAJORE VERSUS PAN-ALERGENE IN DIAGNOSTICUL ALERGIEI LA AMBROZIA

Acest studiu de prevalență a fost realizat în vestul României cu scopul de a investiga reactivitatea IgE la diferite polenuri la pacienții alergici la ambrozia, cu scopul de a detecta sensibilizarea primară, pentru a asigura un management mai bun al bolii alergice și pentru a facilita prescrierea de AIT. Acest studiu a examinat profilurile de sensibilizare la alergene majore și pan-alergene (profiline și CBP) din polenul de ambrozia, pelinariță, mesteacăn și timoftică.

În primul rând, reactivitatea IgE a pacienților (n=150) la extractul de ambrozia și la alergene a fost testată în platforma Phadia ImmunoCAP. Pe lângă extractul de polen de ambrozie, au fost testate următoarele alergene: alergenul major din ambrozia (nAmb a 1) și alergenele majore din pelinariță (nArt v 1), mesteacăn (rBet v 1), timoftica (rPhl p 1/5b), precum și în ceea ce privește profilinele din polenul de ambrozie (Amb a 8), pelinariță (Art v 4), mesteacăn (rBet v 2) și timoftica (rPhl p 12) și determinanții carbohidrați cu reactivitate încrucișată (CCD). Rezultatele cantitative sunt exprimate în kUA/L iar valorile de peste 0,35 au fost considerate pozitive. Reactivitatea IgE la CBP din ambrozia (Amb a 9 și Amb a 10), pelinariță (Art v 5), mesteacăn (Bet v 4) și timoftica (Phl p 7) a fost testată în ELISA și parțial în ImmunoCAP. CAP-urile disponibile comercial au fost obținute de la Thermo Fischer Scientific și testate conform protocolului producătorului, în timp ce alergenele Amb a 8, Amb a 9, Amb a 10, Art v 4 și Art v 5 au fost cuplate manual la CAP-uri cu Streptavidină și IgE-ul specific din serul pacienților a fost testat conform protocolului producătorului.

Rezultatele au arătat că 97% dintre pacienții pozitivi la testul prick cutanat (SPT) cu extract de ambrozia au fost confirmați ca fiind cu adevărat sensibilizați la ambrozia prin analiza ImmunoCAP atât la extractul de polen, cât și la Amb a 1. Reactivitatea IgE la Amb a 1 de peste 90% a fost în concordanță cu cea raportată în literatură. Rezultatele au arătat că 19% dintre pacienți au avut reactivitate IgE mai mare la Amb a 1 în comparație cu extractul de polen de ambrozia. În plus, pentru majoritatea pacienților, se pare că Amb a 1 joacă un rol foarte important în sensibilizarea la polenul de ambrozie. Pe de altă parte, faptul că în cazul unor pacienți Amb a 1 este responsabil pentru mai puțin de 50% din răspunsul la întregul extract, indică că și alte alergene contribuie la profilul de sensibilizare IgE.

Investigarea profilurilor de sensibilizare la alte alergene markeri din surse relevante cum ar fi Phl p 1/5, Art v 1 și Bet v 1, a arătat că cel mai frecvent recunoscut alergen major din celelalte surse de polen testate a fost rPhl p 1/5b cu o reactivitate IgE de 29%, urmată de Art v 1 cu 18,7% și Bet v 1 cu 4%. Un procent important dintre pacienții alergici la ambrozia (41,3%) incluși în acest studiu au prezentat sensibilizări multiple. În plus față de sensibilizarea la ambrozia, 30% dintre pacienți au reacționat la un alt alergen major și 10% au reacționat la alte două alergene majore.

Sensibilizarea la sursele menționate anterior pare să nu fie deosebit de mare atunci când luăm în considerare alergenele majore, dar sensibilizarea la profiline arată diferit. Pacienții alergici la ambrozia au fost testați mai întâi la rAmb a 8 și au evidențiat o reactivitate IgE de 21%. Pacienții sensibilizați la Amb a 8 au fost testați apoi la celelalte profiline și toți pacienții au prezentat sensibilizare IgE la Art v 4 și Phl p 12, în timp ce 91% au prezentat reactivitate IgE la Bet v 4. Niciunul dintre pacienții sensibilizați la profiline nu apare sensibilizat la toate alergenele majore testate, ceea ce indică o reactivitate încrucișată extensivă în cadrul proteinelor testate. Studiile anterioare au indicat că sursa de alergen care oferă cea mai mare expunere la profiline ar putea fi responsabilă pentru sensibilizarea la profiline. În 56% dintre pacienții reactivi la profiline, Amb a 8 este alergenul vinovat de inducerea sensibilizării la profiline la pacienții reactivi la Amb a 1 și în lipsa sensibilizării la alte alergene majore din celelalte surse.

Sensibilizarea la CBP din polenul de ambrozia a fost, de asemenea, evaluată în acest studiu de cohortă prin metodele ELISA și ImmunoCAP. Reactivitatea IgE la CPB recombinat Amb a 9, Amb a 10 și Art v 5 a fost determinată anterior prin ELISA, urmată de o măsurare cantitativă a nivelurilor de IgE la CPB efectuată în ImmunoCAP pentru pacienții care au prezentat reactivitate la Amb a 9 și Amb a 10 în ELISA. Pacienții testați în ImmunoCAP au prezentat legare IgE scăzută sau chiar deloc la CBP din ambrozia și la Art v 5, precum și la Bet v 4 și Phl p 7 disponibile comercial. Aceste rezultate se pot datora nivelurilor scăzute de IgE ale pacienților reactivi la CPB, care nu au fost detectate în ImmunoCAP sau faptului că ELISA este o metodă cu sensibilitate mai ridicată. După cum s-a menționat anterior, sensibilizarea la CBP poate să difere în rândul pacienților alergici la ambrozia. Studiile indică că Phl p 7 și Bet v 4 sunt buni markeri pentru detectarea sensibilizării la CBP, dar în acest caz, reactivitatea încrucișată cu CPB de ambrozie nu a putut fi stabilită din cauza reactivității slabe la CPB de ambrozia.

Investigarea relației dintre simptomele alergiei și sensibilizarea la IgE, a arătat că pacienții au avut o reactivitate IgE mai mare la extractul de polen în comparație cu Amb a 1,

indiferent de numărul sau combinația de simptome raportate de pacienți în timpul sezonului de polen de ambrozie, indicând faptul că și alte alergene din ambrozia joacă un rol în inducerea simptomelor alergice. Cu toate acestea, reactivitatea la pan-alergenele Amb a 8, Amb a 9 și Amb a 10 nu a putut fi asociată cu niciun simptom.

Pentru toți pacienții cu rezultat CCD pozitiv, a fost identificată sursa responsabilă pentru sensibilizare. În general, pe baza modelelor de sensibilizare la alergenele majore și pan-alergene, o sursă primară de sensibilizare a putut fi identificată la 57% dintre pacienții din această cohortă de studiu: la toți, cu excepția unuia, ambrozia a fost sursa primară de sensibilizare. Un pacient pare să fie sensibilizat la polen de pelinariță și nu la polenul de ambrozie.

În concluzie, marea majoritate a pacienților care prezintă simptome de alergie sezonieră și un SPT pozitiv la extractul de polen de ambrozia au fost cu adevărat sensibilizați la ambrozia. Prevalența sensibilizării la alte alergene majore din polenuri în cadrul acestei cohorte de pacienți alergici la ambrozie nu a fost mare, dar a fost demonstrat că pacienții pot apărea pozitivi în SPT la extracte de pelinariță, timoftică sau mesteacăn din cauza reactivității încrucișate date de profiline. Astfel, pan-alergenele din polenul de ambrozia ar trebui incluse în diagnosticul bazat pe componente moleculare (CRD) ca markeri de reactivitate încrucișată alături de celelalte pan-alergene și de alergenele markeri din alte surse comune, pentru a facilita identificarea corectă a alergenului responsabil de reacția alergică și pentru a distinge co-sensibilizarea față de reactivitatea încrucișată. Aceste constatări reprezintă o contribuție valoroasă la îmbunătățirea CRD și, de asemenea, la prescrierea AIT.

EVALUAREA VACCINURILOR AIT BAZATE PE EXTRACTE ÎN TRATAMENTUL ALERGIEI LA AMBROZIA

Prin acest studiu s-a propus evaluarea vaccinurilor AIT subcutanate disponibile pe piață pentru tratamentul alergiei la ambrozia prin detectarea titrului IgG-specific împotriva diferitelor alergene din polenul de ambrozia și evaluarea capacității anticorpilor IgG induși de a bloca legarea IgE-ului pacienților de alergen.

În acest sens, doi iepuri NZW, femele, au fost imunizate cu unul dintre cele patru AIT-uri de la diferiți producători. CLUSTOID (ROXALL Medizin, Viena, Austria) este un alergoid care conține hidroxid de aluminiu ca adjuvant. TYRO-SIT și POLLINEX (Bencard Allergie GmbH, Munchen, Germania) sunt alergoizi pe bază de L-tirozină, cu adăugarea de monofosforil lipid A (MPL) în POLLINEX. Diater (DIATER, Madrid, Spania) este un extract natural de polen nemodificat pe bază de hidroxid de aluminiu. Iepurii au fost imunizați de către

Davids Biotechnologie GmbH (Regensburg, Germania) conform protocolului de imunizare al producătorului pentru utilizare la pacienții alergici. Probele de sânge au fost recoltate de la iepurii imunizați înainte de prima imunizare (seruri preimune, PIS) la fiecare 4 săptămâni în timpul imunizării (seruri imune, IS) și probele finale de sânge au fost recoltate la 4 săptămâni după ultima injecție (IS final).

Titrul IgG de iepure împotriva tuturor alergenelor din polenul de ambrozia, cum ar fi Amb a 1 (rAmb a 1.01, nAmb a 1.01, rAmb a 1.03), rAmb a 3, rAmb a 4, rAmb a 5, rAmb a 6, rAmb a 8, rAmb a 9, rAmb a 10, rAmb a 11 și rAmb a 12, au fost detectate prin tehnica ELISA folosind serurile colectate de la iepurii imunizați în șase diluții (1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10,000 și 1:50,000). Inhibiția legării IgE-ului din serul pacienților a fost efectuată prin tehnica ELISA de competiție cu Amb a 1, Amb a 4, Amb a 6, Amb a 8 și Amb a 11, considerate alergene majore și/sau relevante. Alergenele imobilizate pe plăcile ELISA au fost incubate cu ser imun de iepure, urmat de adăugarea de ser provenit de la pacienții alergici la ambrozia sensibilizați la alergenele respective. Inhibiția activității alergenică a fost evaluată și în testul RBL. Serurile de iepure dializate au fost incubate cu trei concentrații diferite de alergen (1, 10 și 100 ng/mL) și adăugate la celulele RBL încărcate anterior cu ser de pacient.

Studiul de față a arătat că aceste patru AIT-uri testate au indus profiluri IgG diferite față de alergene în ceea ce privește intensitatea și specificitatea. Diater a reușit să inducă cel mai ridicat răspuns IgG față de extractul de polen de ambrozie la iepuri, dar Diater prezintă și cel mai lung protocol de imunizare constând din 14 injecții administrate cu o concentrație crescătoare pe parcursul a 4 luni. Reactivitatea ridicată la extractul din polen de ambrozia în serul de iepure se datorează, cel mai probabil, alergenului Amb a 1 care a arătat o similaritate cu extractul în ceea ce privește cinetica titrului IgG, sugerând că Amb a 1 este principalul vinovat de titrul IgG ridicat după imunizarea cu Diater. În ceea ce privește alte alergene relevante, cum ar fi rAmb a 4, rAmb a 8, rAmb a 6 și rAmb a 11, precum și alergenul minor rAmb a 5, administrarea Diater a arătat diferite profiluri IgG și o cinetică specifică pentru fiecare dintre alergene.

CLUSTOID a reușit, de asemenea, să inducă un răspuns IgG considerabil față de Amb a 1, precum și față de rAmb a 6 și rAmb a 10. Cu toate acestea, imunizarea cu CLUSTOID a indus un titru IgG specific Amb a 1 rapid, dar titrul a scăzut la o lună după încetarea administrării injecțiilor, probabil datorită protocolului scurt de inițiere. Atât TYRO-SIT, cât și POLLINEX au indus anticorpi IgG specifici Amb a 8 și Amb a 5, dar un răspuns IgG slab față de Amb a 1.

Experimentele de inhibiție au arătat că capacitatea de blocare a IgE-ului a fost asociată cu niveluri ridicate de anticorpi IgG-specifici alergenului în antiserurile de iepure. Anticorpul IgG induși de Diater au fost cei mai eficienți în blocarea legării IgE-ului pacienților de rAmb a 1, rAmb a 4, rAmb a 8 și rAmb a 11. Serul de iepure imun specific CLUSTOID în săptămâna 4 a fost, de asemenea, capabil să inhibe legarea IgE de rAmb a 1.01 și rAmb a 6, dar la un nivel mai scăzut în serul imun final. Mai mult, un efect similar a fost observat utilizând serurile menționate anterior în testul de eliberare a mediatorului. Serul de iepure imun specific Diater cu titru ridicat de IgG-alergen specific a inhibat eliberarea mediatorului la stimularea cu Amb a 1, Amb a 4 și Amb a 8 la toți pacienții testați, iar serul de iepure imun specific CLUSTOID a inhibat legarea IgE de Amb a 1 și Amb a 6. Serul specific POLLINEX a avut o capacitate scăzută de blocare a IgE, în timp ce cu TYRO-SIT nu a putut fi fost observată deloc.

Răspunsul iepurilor la diferite alergene cu aceste imunoterapii a permis compararea datorită serurilor care au fost colectate la același punct final, la o lună după ultima injecție a protocolului de inițiere. Cu toate acestea, un număr redus de iepuri a fost utilizat pentru fiecare imunizare și au fost găsite variații între răspunsurile iepurilor. În plus, atunci când se vor evalua alte loturi de la aceiași producători, rezultatele pot să difere din cauza deficiențelor extractelor de alergene. În plus, protocoalele de inițiere pentru vaccinarea AIT au fost foarte variabile în ceea ce privește numărul de injecții, cronologia imunizărilor și doza administrată. Mai mult, cantitatea și concentrația alergenelor din extractul în sine, precum și imunogenitatea alergenelor individuale au contribuit, de asemenea, la variația titrurilor IgG induse. Aceste constatări subliniază dezavantajele utilizării imunoterapiei cu alergene bazate pe extracte comerciale nestandardizate. Acestea evidențiază necesitatea dezvoltării de imunoterapii de nouă generație pentru tratamentul alergiei la ambrozie, care să reducă efectele secundare, conținând în același timp cele mai relevante alergene capabile să inducă blocarea anticorpilor IgG specifici alergenelor care pot concura cu anticorpii IgE ai pacienților și pot reduce apariția simptomelor în proces.

CONCLUZII

Pe baza rezultatelor obținute s-au tras următoarele concluzii:

- Amb a 1 este într-adevăr cel mai important alergen din polenul de ambrozia care induce sensibilizare IgE la 97% sau mai mult din populația din vestul României.
- Aproximativ un sfert dintre pacienții sensibilizați la polenul de ambrozie sunt reactivi la proteinele care leagă calciul, Amb a 9 și Amb a 10.

- Pacienții sensibilizați la pan-alergenele din polenul de ambrozia (Amb a 8, Amb a 9, Amb a 10) pot prezenta sensibilizare la alte surse din cauza reactivității încrucișate.
- Amb a 9 și Amb a 10 au arătat un tipar puternic de recunoaștere față de Art v 5 indicând o reactivitate încrucișată între aceste proteine.
- Pacienții alergici la ambrozia sensibilizați la Amb a 9 și Amb a 10 tind să raporteze mai des simptome de rinită, conjunctivită și astm, dar nu și simptome cutanate.
- Alergenele majore și pan-alergenele sunt instrumente utile pentru a distinge sensibilizarea autentică, prin urmare Amb a 9 și Amb a 10 ar trebui incluse în CRD.
- Imunizarea iepurilor cu patru vaccinuri diferite pe bază de extract din polen de ambrozia a indus niveluri diferite de IgG specifice alergenelor din ambrozia
- Cele 4 vaccinuri AIT evaluate diferă în ceea ce privește conținutul de alergene, imunogenitatea, doza și durata protocolului de inițiere, ceea ce poate afecta inducerea de IgG.
- Vaccinul Diater pe bază de extract natural de polen nemodificat a indus cel mai bun răspuns IgG la iepuri în comparație cu alergenii CLUSTOID, TYRO-SIT și POLLINEX
- Niveluri crescute de IgG specifice alergen induse la imunizarea iepurilor cu vaccinurile AIT au fost asociate cu o bună inhibare a legării IgE a pacienților
- Aceste constatări reprezintă baza selecției personalizate de AIT care să conțină alergenul responsabil capabil să inducă anticorpi IgG blocați la pacienții alergici.
- Variația conținutului alergen în vaccinurile AIT, precum și protocolul greoi de imunizare evidențiază necesitatea dezvoltării de vaccinuri AIT de generație următoare.

CONTRIBUȚII PERSONALE

S-au realizat următoarele contribuții proprii:

- Exprimarea și producerea cu succes a alergenelor recombinante Amb a 9 și Amb a 10 în sistemul *Escherichia coli*.
- Caracterizarea complexă a Amb a 9 și Amb a 10, atât fizico-chimică, cât și imunologică.
- Caracterizare meticuloasă a simptomelor clinice a populației de 237 de pacienți alergici la ambrozie din vestul României.
- Cuplarea și testarea cu succes a IgE-ului specific Amb a 8, Amb a 9 și Amb a 10, Art v 4 și Art v 5 pentru prima dată prin metoda ImmunoCAP.
- Identificarea sursei veritabile de sensibilizare la ambrozie, pelinariță, mesteacăn și timoctică pentru 150 de pacienți.

- Evaluarea și compararea diferitelor vaccinuri AIT pe bază de extract de ambrozie pe modele animale pentru prima dată în literatură.
- Inhibarea eliberării mediatorului din bazofile față de alergenele din ambrozie realizată în testul RBL cu antiseruri de la iepuri imunizați cu vaccinuri AIT de ambrozie.