

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL III ȘTIINȚE FUNCȚIONALE**

TAMAȘ TUDOR PAUL



TEZĂ DE DOCTORAT

**CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ ȘI IMUNOLOGICĂ A
ALERGENULUI MAJOR AMB A 11 DIN AMBROSIA
ARTEMISIIFOLIA, CU CORELAȚII CLINICE**

R E Z U M A T

Conducător științific

PROF. UNIV. DR. PANAITESCU CARMEN

**Timișoara
2023**

CUPRINSUL TEZEI

Lista lucrărilor științifice publicate	VII
Lista cu abrevieri și simboluri	VIII
Lista figurilor	XII
Lista tabelelor	XV
Mulțumiri	XVI
INTRODUCERE	XVII
PARTEA GENERALĂ	1
1. ALERGIE VERSUS IMUNOTOLERANȚĂ	1
1.1. ANAFILAXIE, ALERGIE, ATOPIE: TREI FAȚETE ALE UNUI DEZECHILIBRU IMUN....	1
1.2. MECANISME FIZIOPATOLOGICE IMPLICATE ÎN HIPERSENSIBILITATEA DE TIP I	5
1.2.1. SENSIBILIZAREA ALERGICĂ	6
1.2.2. RĂSPUNSUL ALERGIC IMEDIAT ȘI TARDIV	10
1.2.3. INFLAMAȚIA CRONICĂ ALERGICĂ	12
1.3. IMUNOTOLERANȚA	14
1.3.1. MEDIATORII IMUNOTOLERANȚEI	15
1.3.2. ROLUL Treg ÎN INDUCEREA ȘI MENȚINEREA TOLERANȚEI	15
1.3.3. IgG ȘI IMUNOTOLERANȚA	17
2. AMBROZIA ȘI ALERGENELE DIN POLEN	19
2.1. SEZONUL POLINIC AL AMBROZIEI	19
2.2. POLENUL DE AMBROZIA: COMPONENTE ALERGENICE	21
2.2.1. ALERGENELE MAJORE	23
2.2.2. ALERGENELE MINORE	25
3. ALERGENELE RECOMBINATE ÎN DIAGNOSTICUL ȘI TERAPIA BOLII ALERGICE	27
3.1. ALERGENELE RECOMBINATE	30
3.2. DIAGNOSTICUL ALERGIEI	32
3.2.1. DIAGNOSTICUL MOLECULAR	32
3.3. IMUNOTERAPIA ALERGEN-SPECIFICĂ (AIT)	37

3.3.1. ALERGENE RECOMBinate ÎN AIT	39
PARTEA SPECIALĂ	41
4. PARTEA EXPERIMENTALĂ	41
4.1. MATERIALE	41
4.2. METODE	43
4.2.1. EVALUAREA SEZONULUI POLINIC	43
4.2.2. EXPRESIA, PURIFICAREA ȘI DETECȚIA ALERGENELOR RECOMBinate	44
4.2.3. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A ALERGENELOR RECOMBinate	46
4.2.4. WESTERN BLOT: DETECȚIA MARKERULUI HEXAHISTIDINIC ȘI A LEGĂRII IgE DIN SERUL PACIENȚILOR ALERGICI, DE CĂTRE ALERGENELE RECOMBinate	47
4.2.5. ELISA: MĂSURAREA FRECVENȚEI DE LEGARE IgE A ALERGENELOR RECOMBinate PENTRU GRUPUL DE PACIENȚI	48
4.2.6. TESTUL DE DEGRANULARE A BAZOFILOR hRBL	49
4.2.7. TESTAREA IMMUNOCAP CU ALERGENE RECOMBinate	50
4.2.8. STUDIU EXPERIMENTAL PE ANIMALE	50
4.2.9. METODE STATISTICE	51
5. REZULTATELE CERCETĂRII	53
5.1. SEZONUL POLINIC ÎN CÂMPIA PANONICĂ	53
5.2. EXPRESIA, PURIFICAREA ȘI DETECȚIA ALERGENELOR RECOMBinate	56
5.3. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A ALERGENELOR RECOMBinate	60
5.3.1. TABELA DE OMOLOGIE	61
5.3.2. MODELE MOLECULARE	61
5.3.3. SPECTRE DE DICROISM CIRCULAR	64
5.3.4. SPECTRE DE MASĂ MALDI-TOF	65
5.4. SENSIBILIZAREA FAȚĂ DE ALERGENUL MAJOR Amb a 11 ÎN GRUPUL STUDIAT (n=279)	66
5.5. INCIDENȚA SENSIBILIZĂRII IgE MEDIATE FAȚĂ DE ALERGENUL MAJOR Amb a 11 ÎN GRUPUL STUDIAT	67
5.6. IMUNOBLOT	67
5.7. EVALUAREA ALERGENICITĂȚII rAmb a 11	69
5.8. TESTAREA IMMUNOCAP	72

5.9. EVALUAREA IMUNOGENITĂȚII ALERGENELOR RECOMBINATE PRIN TESTARE ELISA A SERULUI DE IEPURE.....	73
5.10. ANALIZA STATISTICĂ.....	75
5.10.1. ANALIZA STATISTICĂ A GRUPULUI STUDIAT	75
5.10.2. ANALIZA STATISTICĂ A UNOR SUBGRUPURI DEFINITE DE IMUNOREACTIVITATEA IgE FAȚĂ DE Amb a 11	83
5.10.3. ANALIZA DE REGRESIE LOGISTICĂ.....	85
6. DISCUȚII	87
6.1. SEZONUL POLINIC AL AMBROZIEI	87
6.2. CARACTERIZAREA ALERGENELOR rAmb a 11	90
6.3. STUDIUL DE INCIDENȚĂ.....	94
6.4. SEROPREVALENȚA IgE ALERGEN-SPECIFIC ȘI ALTE ASPECTE DE IMUNOREACTIVITATE ALE rAmb a 11	96
6.5. ANALIZA ALERGENICITĂȚII rAmb a 11	99
6.6. ANALIZA IMMUNOCAP	101
6.7. IMUNOGENITATEA rAmb a 11	102
6.8. CARACTERISTICI ALE PACIENȚILOR ALERGICI LA POLENUL DE AMBROZIA (n=279)	103
6.9. ANALIZA RISCULUI PRIN REGRESIE LOGISTICĂ	111
6.10. ANALIZA POTENȚIALELOR LIMITĂRI ALE CERCETĂRII	114
CONCLUZII	117
CONTRIBUȚII ORIGINALE	119
BIBLIOGRAFIE	121
ANEXA I. REZULTATELE ANALIZEI DE REGRESIE	I
ARTICOLELE PUBLICATE IN EXTENSO	III

INTRODUCERE

Importanța temei de cercetare alese rezidă din răspândirea ambroziei în Europa și România, asociată cu încărcătura crescută de polen atmosferic în sezonul polinic și manifestările de severitate ale bolii alergice în populația expusă.

Ambrozia (*Ambrosia artemisiifolia*) este o plantă originară din SUA, unde la 1930 se estima deja un număr de peste 3 milioane de bolnavi de febra fânului indusă de ambrozia. La începutul secolului XX au fost inițiate primele programe de control ale plantei, peste câteva decade fiind recunoscut și rolul important al acesteia în dezvoltarea alergiilor respiratorii (febra fânului și astmul). Mai recent, în urma studiului NHANES 2005-2006, s-a concluzionat că până la 15% din americani erau testați pozitiv pentru IgE specific la polenul de ambrozia.

În Europa cele mai vechi mențiuni ale ambroziei au fost găsite în ierbare ale grădinilor botanice (Lyon 1763, Paris 1775), dar ipoteza răspândirii plantei din grădini botanice a fost infirmată. Planta a colonizat cu succes Valea Loarei, unde se regăsește și la ora actuală, alături de Valea Ronului, un focar important de infestare. Doar în Franța s-a estimat în 2020 că există între 1 și 3,5 milioane de persoane alergice la polenul de ambrozia. În Italia, la ora actuală în regiunea Lombardia și Piemont alergiile la polenul de ambrozia este proeminentă între alergiile respiratorii.

Primele raportări ale sensibilizării alergice la ambrozia în Europa au fost publicate din anii 1980. Ratele sensibilizării la polenul de ambrozia sunt foarte diferite în funcție de țară (cele mai mari fiind raportate în Ungaria, Nordul Italiei și Franța). Astăzi este recunoscut că alergiile la polenul de ambrozia este o problemă de sănătate publică, corelată cu nivelul înalt de încărcătură polinică din sezonul ambroziei, alergenicitatea polenului și sensibilizarea alergică tot mai frecventă în populațiile expuse. În Europa de Est, inclusiv în România, Ambrozia este o sursă alergică importantă, cu potențial impact asupra sănătății. Prin studii de aerobiologie de la începutul anilor 2000 s-a evaluat problema infestării masive cu Ambrozia a statelor din Câmpia Panonică și vecine acestei zone, prezența plantei fiind asociată cu încărcătură polinică mare în timpul sezonului de înflorire.

În 2013, printr-un studiu adresat medicilor alergologi din România, s-a documentat că sunt recunoscute atât valorile mari de morbiditate asociate expunerii la polenul de ambrozia cât și severitatea simptomelor respiratorii specifice bolii alergice induse de acest alergen de exterior. Un total de aproximativ 6 milioane de români sunt expuși la polenul de ambrozia, în zona de Vest, dar și în Sud, restul regiunilor fiind mai puțin afectate. Prevalența alergiei la ambrozia a fost estimată la 5,35% din populația activă a României, din date europene. Comisia Europeană estimează că în România, din populația activă (de 9.000.000 persoane), 482.000 persoane sunt alergice la polenul de ambrozia (Bullock J et al, Ragweed Final Report, European Commission, 2012). Aceste date indică o prevalență a alergiei la ambrozia de 5,35% în populația activă din România, corespunzând unei morbidități crescute (comparabilă cu cea pentru diabetul zaharat). De asemenea, studii recente au arătat că pacienții cu un istoric al bolii de peste 10 ani dezvoltă astm sever în timpul sezonului polinic al ambroziei, cu puternic impact negativ asupra calității vieții (Panaitescu et al, EAACI Online Repository 2015).

În Timișoara, între anii 2007-2010, s-a desfășurat proiectul PREVALERG/PN II 41-011 (<http://prevalerg.umft.ro>), coordonat de Prof. Dr. Carmen Panaitescu (Bunu). Proiectul a reprezentat prima cercetare pe scară largă din România privind evaluarea impactului aeroalergenilor asupra sănătății. Scopul proiectului a fost evaluarea corelației dintre statusul alergic al pacienților cu astm și/sau rinită și tipul respectiv gradul de încărcare atmosferică de

aeroalergene. A fost evaluat impactul expunerii la alergene respiratorii asupra pacienților astmatici, subliniind importanța expunerilor la polenuri și la acarienii din praful de casă pentru persistența bolilor alergice. În cazul polenului de ambrozia, s-a demonstrat că sensibilizarea alergică este prezentă la peste 60% din populația alergică, inclusiv la copii. De asemenea s-a evidențiat că polenul de ambrozia este cel mai important alergen de exterior.

Prin proiectul INSPIRED (Strategii inovative pentru prevenția, diagnosticul și terapia afecțiunilor respiratorii induse de polenul de ambrozia), din cadrul căruia face parte și cercetarea descrisă în lucrarea de față, s-a propus continuarea liniei deschise de studii anterioare în domeniu din Timișoara. Proiectul a fost implementat în perioada 2016-2019 la Centrul Oncogen, din structura Spitalului Clinic Județean de Urgență Timișoara, în cadrul căruia s-a desfășurat partea experimentală. Obiectivul principal al proiectului îl reprezintă determinarea patternurilor de sensibilizare ale pacienților alergici la polenul de ambrozia, pentru a susține dezvoltarea ulterioară de strategii inovatoare pentru prevenția, diagnosticul și terapia alergiei la ambrozia. Prin caracterizarea în detaliu a alergenelor din ambrozia și a răspunsului imun al pacienților alergici, se poate dezvolta un kit diagnostic bazat pe alergene recombinante. Acest kit, bazat pe tehnologie multiplex, permite diagnosticul molecular al alergiei și orientarea mai bună a terapiei bolii. În kit poate fi inclus alergenul major Amb a 11, recent descoperit și dificil de produs în formă recombinată, în condițiile în care sunt dovedite un grad semnificativ de sensibilizare IgE, precum și relevanța clinică a acestei sensibilizări. De asemenea, prin model animal de imunoterapie cu alergenele recombinante, se poate evalua răspunsul imun la acestea, cu generare de anticorpi tip IgG. Aceștia la rândul lor pot fi folosiți pentru detecția în mediu a alergenelor provenite din polenul de ambrozia.

În decursul unei colaborări cu o companie privată (Biomay AG, Viena, Austria), inițiate în 2013, s-a evidențiat că nu toți pacienții cu simptome severe și test cutanat prick pozitiv la extractul de ambrozia prezintă și niveluri serice crescute de IgE specific la Amb a 1, 10% fiind Amb a 1-negativi în pofida simptomatologiei caracteristice și a testelor cutanate pozitive la extractul din polen de ambrozia. Astfel se justifică necesitatea de a identifica întregul panel de fragmente cu potențial alergen din polenul de ambrozia (Panaitescu et al, Allergy 2014), de aici rezultând și nota de originalitate a tezei de doctorat și utilitatea ei în cercetarea de tip fundamental, precum și posibilitățile de aplicare ulterioare. Rezultatele preconizate pentru studiul doctoral au inclus producerea alergenului Amb a 11 sub forma recombinată, ca proteină stabilă în soluție apoasă, și care prezintă un caracter imunogen. Acest studiu ar putea avea impact pozitiv în diagnosticul alergiei la ambrozia prin caracterizarea imunologică a alergenului major Amb a 11 din polenul de ambrozia și a determinării relevanței clinice a acestuia, mai ales din perspectiva asocierii cu astmul. În urma acestui studiu se va determina și prevalența sensibilizării IgE-mediate față de Amb a 11, în populația studiată. Datele obținute pot avea un rol pe viitor în terapia personalizată a alergiei la ambrozia, prin imunoterapie alergen-specifică utilizând produse hipoalergenice.

PARTEA GENERALĂ

Partea generală include trei capitole care aprofundează problematica alergiilor ca patologie hiperimună cu mecanismele fiziopatologice implicate, polenul de ambrozia ca sursă de alergene cu descrierea succintă a alergenelor majore și minore, precum și utilitatea alergenelor recombinante în diagnosticul și terapia bolii alergice.

Primul capitol situează alergia în contextul mai larg al afecțiunilor IgE mediate, precum și în cadrul clinic creionat de asocierea bolii alergice cu anafilaxia, sindroamele hiperIgE și statusul atopic. Urmează o descriere a mecanismelor fiziopatologice ale hipersensibilității de tip I sau imediate, cu elementul său caracteristic - prezența anticorpilor IgE alergen-specfici fixați pe suprafața celulelor efectoare - mastocite și bazofile. Sunt descrise etapele sensibilizării alergice, cu traversarea alergenului prin bariera cutaneo-mucoasă, agresarea epitelului, captarea alergenului și prezentarea antigenică de către celulele prezentatoare de antigen, dezvoltarea memoriei imune. Răspunsul alergic imediat și tardiv sunt ulterior dezvoltate, fiind descrise mecanismele acestora. Inflamația cronică de tip alergic cu modificările asociate sunt de asemenea prezentate. Imunotoleranța este descrisă atât ca un mecanism fiziologic prin care se limitează uneori cu succes dezvoltarea unui răspuns imun de tip alergic, cât și ca imunotoleranță indusă prin imunoterapie, cu geneza unui mediu tolerogen, cu IgG alergen-specifice și proliferarea unor clone de limfocite B și T reglatoare.

Al doilea capitol adresează problematica ambroziei și alergenelor din polenul de ambrozia. În sezonul polinic, polenul de ambrozia este bine reprezentat între particulele aeropurtate, poluanți biologici. Modelele de dispersie a polenului ajută la predicția distribuției acestuia în atmosferă, dar pentru a fi cât mai precise, necesită introducerea de date cu măsurători ale nivelului de polen în cât mai multe stații, însă stațiile de monitorizare a polenului sunt aproape absente în România. Este descrisă apoi pe scurt structura grăunciorului de polen, cu componentele alergene, de natură proteică. Acestea au fost identificate începând cu anii 1960, prin tehnici de proteomică. Alergenele majore sunt reprezentate de Amb a 1, cel mai bine caracterizat, respectiv Amb a 11, descoperit în anul 2013 și caracterizat începând cu 2015. Printre alergenii minore se numără membri ai unor familii de proteine numite panalergene, care includ proteine cu un grad înalt de omologie a secvenței de AA, având astfel structură și funcții similare. Astfel, unele alergene minore din polenul de ambrozia fac parte din familia profilinelor (Amb a 8), polcalcinelor (Amb a 9 și Amb a 10) respectiv a proteinelor de transfer (transport) nespecific al lipidelor nsLTP (Amb a 6). Celelalte alergene au fost mai puțin studiate și caracterizate, cu excepția Amb a 4 - defensină, cu structura omoloagă cu Art v 1.

În capitolul al treilea este tratată abordarea diagnostică și terapeutică a bolii alergice din perspectiva utilizării alergenelor recombinante. Utilitatea extractelor alergene în diagnostic și terapie este limitată de factori care țin de sursa din care sunt prelucrate, de metodele de extracție și compoziția incertă în molecule cu potențial alergic. „Extractele moleculare”, compuse din alergene recombinante, ar oferi avantaje care combină avantajele utilizării extractelor din surse naturale (diversitate de molecule alergene, aplicabilitate ușoară, posibilitatea utilizării duale – în diagnostic dar și ca produs imunoterapic) cu cele ale utilizării alergenelor moleculare (caracterizare precisă a alergenelor, stabilitate, identificarea consecințelor clinice ale sensibilizării la molecule individuale). Este descrisă apoi obținerea alergenelor recombinante pe etape, în sisteme de expresie procariote sau eucariote, și posibilitățile de utilizare a acestor alergene. Diagnosticul molecular al alergiei beneficiază mult în urma utilizării alergenelor recombinante, prin detecția IgE alergen-specific din serul pacienților. Testarea ImmunoCAP™ singleplex este Gold standardul pentru diagnosticul in vitro, având la dispoziție teste pentru mai mult de 100 de componente moleculare, respectiv peste 400 de surse alergene. În cazul diagnosticului multiplex gold-standardul este tehnica ISAC. În varianta actuală aceasta dispune de 112 alergene moleculare măsurate în triplicat pe un cip, dintre care 45 de alergene naturale și 67 recombinante. Imunoterapia alergen-specifică este singurul tratament etiologic în boala alergică, prin mecanisme asociate cu inducerea imunotoleranței: producție de IgG1/IgG4 alergen-specifice, inducerea și

stimularea limfocitelor T și B reglatoare, promovarea unui mediu tolerogen în detrimentul citokinelor de tip 2. Preparatul imunoterapic propriu-zis trebuie să fie imunogen dar să lege cât mai slab IgE preformate la pacientul alergic, dar și să inducă o sinteză cât mai redusă de IgE de novo. De asemenea trebuie evitată apariția reacțiilor celulare tardive, o potențială complicație a stimulării limfocitelor T. Pentru a evita legarea IgE s-au propus: utilizarea de proteine de fuziune, modificarea secvenței de aminoacizi cu crearea de proteine hipoalergenice (cu modificarea situsurilor recunoscute de IgE), utilizarea de fragmente din moleculele alergene care nu leagă IgE (nu sunt parte a epitopilor recunoscuți prin IgE), utilizarea de alergene native sau recombinante în forma “desfășurată” cu structura terțiară perturbată, polimerizarea moleculelor alergene sau utilizarea de peptide scurte – epitopi pentru limfocite T. Toate aceste proteine hipoalergenice pot fi produse ca alergene recombinante, cu structură modificată.

PARTEA SPECIALĂ

Grupul de studiu a fost reprezentat de 279 de pacienți, recrutați prospectiv în perioada 2017-2020. Criterii de includere: vârsta adultă (peste 18 ani), alergie la polen de ambrozia certificată prin testare cutanată (SPT) pozitivă și/sau IgE seric specific ambrozia pozitiv, fără AIT în antecedente sau corticoterapie orală în ultima lună. Procedurile medicale (SPT, recoltarea de sânge venos periferic) au fost efectuate după obținerea consimțământului informat. Anterior demarării studiului s-a obținut avizul nr. 24/2017 al Comisiei de Etică a Cercetării Științifice, Universitatea de Medicină și Farmacie Victor Babeș din Timișoara (UMFVBT), avizul nr. 102/2017 al Comisiei Locale de Etică pentru Cercetare Științifică a Spitalului Clinic Județean de Urgență Timișoara. Pentru studiul experimental pe animale au fost utilizați câte 2 iepuri rasa Neozelandez Alb pentru imunizare cu fiecare alergen recombinat. Animalele au fost găzduite pe durata studiului experimental (2018/2019) în Complexul de Laboratoare de Cercetare “Horia Cernescu” al Universității de Științe Agricole a Banatului Regele Mihai I Al României, Timișoara și ulterior au fost date în adopție. Anterior demarării studiului s-a obținut avizul nr. 24/2017 al Comisiei de Etică a Cercetării Științifice, UMFVBT, Autorizație de Proiect nr. 001/2017 a Direcției Sanitar-Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor Timiș.

Metodele utilizate au fost:

- studii bibliografice: studiul referințelor privind sezonul polinic în țări învecinate Câmpiei Panonice, hărți ale distribuției polenului
- metode in silico: predicția parametrilor fizico-chimici, analiza omologiei Amb a 11, modelarea structurii proteice
- metode statistice pentru prelucrarea datelor (statistică primară, comparație statistică, analiza riscului, incidență și prevalență)
- metode experimentale in vitro: expresia alergenelor recombinante în sistem de expresie procariot (E. coli) respectiv eucariot (linie celulară Sf9 de Spodoptera frugiperda), purificarea alergenelor prin cromatografie de afinitate, detecția prin electroforeză în gel de poliacrilamidă (SDS-PAGE), caracterizarea fizico-chimică prin spectrometrie de masă MALDI-TOF și analiză de dicroism circular, Western blot pentru detecția markerului hexahistidinic și detecția legării IgE din serul pacienților alergici de către alergenele recombinante, metoda imunoenzimatică (ELISA) pentru măsurarea frecvenței de legare IgE a alergenelor recombinante,

testul de degranulare a bazofilelor de șobolan umanizate (hRBL), testarea ImmunoCAP personalizată cu alergene recombinante

- metode experimentale in vivo: imunizarea animalelor experimentale (iepuri) cu alergenele recombinante urmată de evaluarea imunogenității acestor alergene

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Modelarea distribuției polenului în Europa a indicat o expunere semnificativă și continuă a locuitorilor Câmpiei Panonice la polen de ambrozia. Începând cu a doua jumătate a lunii iulie și până spre sfârșitul lunii octombrie, polenul a fost detectabil în aer, cu încărcătura de polen înaltă spre foarte înaltă pe o mare parte a sezonului. Se observă din modelarea distribuției spațiale a polenului în atmosferă o suprapunere remarcabilă cu conturul Câmpiei Panonice, pe tot intervalul de timp corespunzător sezonului polinic.

Polenul de ambrozia a fost recunoscut de la începutul anilor 2000 ca un poluant biologic major al atmosferei în Câmpia de Vest. Studii românești din perioada respectivă descriu deja polenul de ambrozia ca fiind o componentă importantă a tipurilor de polen atmosferic, acesta fiind prezent în cantitatea absolută cea mai mare (3600 de grăuncioare/m³, valoare cumulată pentru anul 2003), cu sezonul polinic descris pentru lunile iulie-septembrie (după septembrie nu s-au mai prezentat date). În 2004 polenul a fost din nou identificat, sporadic chiar în câteva zile de la sfârșitul lunii iunie, apoi relativ frecvent în iulie și în cantități maxime la sfârșitul lunii august-începutul lui septembrie.

Pe baza datelor disponibile din modelarea încărcăturii de polen pentru Câmpia Panonică, coroborat cu datele de incidență a cazurilor pentru grupul de studiu, se propune că pentru anumite zone ale Câmpiei Panonice, inclusiv ZMT, sezonul polinic al ambroziei se extinde pe cel puțin 3 luni, începând de la mijlocul lunii iulie până spre sfârșitul lunii octombrie.

Studiul de omologie, prin care se evidențiază un grad redus de omologie între Amb a 11 și alte alergene din familia cistein-proteazelor, a indicat valoarea maximă a omologiei structurale de 40,49% față de poligalacturonaza din palmierul de ulei. Doar la un grad de omologie peste 70% sunt create premisele pentru reactivitate încrucișată, astfel că nu este de așteptat ca Amb a 11 să prezinte reactivitate încrucișată cu alte alergene din familia cistein-proteazelor.

În prezentul studiu imunoreactivitatea IgE a celor două forme de alergene recombinante (eAmb a 11 obținută în *E. coli*, iAmb a 11 obținută în celule de insecte) este de 50% respectiv 60%, iar valorile descrise în literatură sunt comparabile. Prin tehnica ELISA s-a determinat o imunoreactivitate IgE globală de 63,44%, față de cel puțin unul din alergenele recombinante (rAmb a 11). S-a calculat un grad foarte înalt de corelație statistică dintre valorile OD obținute prin tehnica ELISA ($r=0,9$, $p<0,05$), folosind cele două alergene eAmb a 11 și iAmb a 11 imobilizate pe plăci, și aceeași serie de seruri. Acesta este un indiciu că și epitopii IgE specifici sunt similari în cazul celor două molecule, sau cel puțin cei imunodominanți, deoarece probabilitatea ca 279 de pacienți să aibă un pattern policlonal similar al răspunsului imun IgE este infimă, dacă epitopii IgE specifici nu corespund între cele două molecule alergenice. În plus, prin modelare moleculară s-a evidențiat dispunerea excentrică a markerului hexahistidinic față de zona centrală a proteinei, cu o minimă influență sterică asupra accesului anticorpilor la aceasta, atât în situația monomerului, cât și în cazul homodimerului modelat.

Proteina recombinată a fost de asemenea caracterizată prin măsurarea spectrului de dicroism circular. Valorile obținute în studiul de față au indicat un procentaj mai redus de alfa-helix - 14% conform modelului utilizat pentru deconvoluție - în situația eAmb a 11 (atribuibilă

împăturirii mai dificile a proteinei, cu 3 punți disulfurice, în celula procariotă). În situația iAmb a 11 a fost determinat un conținut al structurii secundare cu peste 50% alfa helix, posibil datorat producției în celule de insecte cu un echipament celular mai adecvat pentru împăturirea proteinelor complexe, dar și statusului de glicozilare care ar putea avea un efect de stabilizare a structurii secundare a proteinei.

Prin SDS-PAGE au fost identificate și benzi slabe care indică prezența unor proteine cu greutate moleculară mică. Acestea pot apărea ca rezultat al proteolizei parțiale, autocatalizate, a alergenui (care în forma sa matură a fost identificat ca și cistein-protează). Corelând aspectul benzilor din SDS-PAGE cu detecția markerului hexahistidinic, se observă că în aceasta din urmă lipsea banda imediat deasupra 10 kDa, ceea ce sugerează că această proteină este din capătul N-terminal, în timp ce proteinele aflate la aproximativ 28 și 17 kDa sunt cele care conțin markerul C-terminal hexahistidinic al alergenui recombinat. Totuși, acești produși de degradare proteolitică nu apăreau IgE-reactivi pe imunoblot ceea ce indică o pierdere a structurii secundare comparativ cu alergenul original, cu lipsa epitopilor care ar putea fi recunoscuți de IgE specific. Pe imunoblot au fost detectate benzi la aproximativ 36 și 72 kDa ceea ce indică imunoreactivitatea serului pacienților față de alergenul recombinat intact, cât și față de dimerii săi. În plus, produșii de proteoliză apar mai frecvent, în SDS PAGE și detecția markerului hexahistidinic, în cazul eAmb a 11, cantitatea și numărul lor fiind mai reduse în cazul iAmb a 11. Acest fenomen poate fi explicat prin faptul că glicozilarea reduce gradul de proteoliză în cazul iAmb a 11 precum a fost raportat în cazul altor alergene cu activitate proteazică.

Efectul biologic exercitat de rAmb a 11 asupra bazofilelor umanizate de șobolan se traduce prin eliberarea mediatorului inflamator β -hexozaminidază, corelată cu degranularea celulelor. Eliberarea mediatorului descrisă în prezentul studiu a fost în general mai slabă decât cea indusă de nAmb a 1, măsurată pe un domeniu larg de concentrații ale alergenelor utilizate (de la 10 μ g/mL la 1 pg/mL, respectiv 0 control negativ). Totuși alergenele au indus degranulare, în unele cazuri (pacienții A, C), de aproape aceeași magnitudine ca și alergenul natural Amb a 1 folosit drept comparator. În consecință Amb a 11 prezintă alergenicitate, tradusă in vivo prin degranulare (urmată de apariția simptomelor), cel puțin pentru o parte din pacienții alergici la polenul de ambrozia. Degranularea celulelor efectoare este responsabilă de o importantă componentă a simptomatologiei bolii alergice. Fenomenul poate fi și una din cauzele alterării indicatorilor de calitate a vieții la pacienții din subgrupul Amb a 11 pozitiv, chiar dacă diferențele între aceștia și cei din grupul Amb a 11 negativ nu au atins pragul de semnificație statistică.

Prin modelul animal utilizat în prezentul studiu, care poate fi descris ca model de imunoterapie, alergenele rAmb a 11 au fost inoculate pentru a obține anticorpi policlonali de iepure de tip IgG. Utilitatea imediată este demonstrarea imunogenității alergenui recombinat. Ulterior, anticorpii pot fi caracterizați și utilizați într-un panel pentru determinarea alergenelor din mediu. De asemenea pot fi concepute variante hipoalergenice ale proteinei recombinat, care sunt utilizate în dezvoltarea imunoterapiei alergen-specifice, pe baze moleculare. Toți patru iepurii, câte doi pentru fiecare din formele recombinat de Amb a 11, au produs IgG în titru detectabil prin ELISA chiar la diluție de 1:10000 a serului. Titrul anticorpilor, echivalat cu OD în detecția prin ELISA, a fost mai mare în cazul iAmb a 11, ceea ce poate indica o imunogenitate mai mare a formei glicozilate de alergen recombinat. Dacă în cazul curbelor pentru anticorpii induși de eAmb a 11, acestea au fost similare, în cazul celor pentru iAmb a 11 se remarcă un răspuns diferit pentru fiecare din cei doi iepuri.

Privind datele clinice, marea majoritate a pacienților (peste 70%), atât bărbați, cât și femei, au fost adulți tineri, cu vârsta sub 40 de ani. Bărbații au fost suprareprezențați în grupa

de vârstă 18-39 de ani ($p < 0,05$). Durata medie a bolii alergice, recunoscută de pacienți ($n=279$), a fost de 5,17 ani, cu o mare heterogenitate (inclusiv 22 de cazuri nou diagnosticate, 7,9% din total). Vârsta medie a pacienților alergici la polenul de ambrozia a fost de 35 de ani. Este recunoscut cvasiunanim că boala alergică este apanajul persoanelor tinere, cu atât mai mult atunci când se suprapune cu atopia, iar marșul atopic începe din copilăria mică. În SUA, studiul NHANES III (The Third National Health and Nutrition Examination Survey) a fost desfășurat în perioada 1988-1994. Acesta este un studiu pe o cohortă de 12585 persoane, la care s-a evaluat și statusul alergic prin SPT. Rezultatele indică prevalență diferită a alergiilor în funcție de vârstă, sexul, rasa/etnia precum și zona geografică de unde provin subiecții. Studiul NHANES 2005-2006 a fost realizat cu 10.348 de participanți. S-a raportat că seroprevalența IgE față de aeroalergene a fost mai mare la bărbați ($p < 0,05$).

Scorul mediu al simptomelor nazale, în valoare de 7,83 (mediana 8) pe o scară de la 0 la 12, indică faptul că majoritatea pacienților au avut simptome severe. Acestea au fost: obstrucția nazală, rinoreea, strănutul și pruritul nazal, recunoscute ca simptome cardinale ale rinitei alergice și prezente în numeroase scoruri de evaluare a pacienților ca TNSS, RQLQ. Sistemul de scor adoptat în prezentul studiu este similar cu TNSS, fiecare simptom fiind cuantificat pe o scară de la 0 la 3. În studiul românesc (Bocșan și colab.) s-a determinat TNSS mediu de 5,76 respectiv 9,21 pentru pacienții alergici la polen de ambrozia din cele două centre. Scorul mediu al simptomelor conjunctivale are valoarea de 4,7 (mediana 5), pe o scară de la 0 la 9, indicând că majoritatea pacienților au avut simptome moderat-severe. Acest scor adoptat în prezentul studiu este asemănător scorului TOSS, cu simptome cuantificate pe o scară de la 0 la 3: lăcrimare, prurit ocular, inflamație conjunctivală (total 0-9 puncte). Într-un studiu publicat în 2021 s-a investigat expunerea în camera de polen a pacienților prezumat alergici, la polen de mesteacăn, respectiv provocarea conjunctivală cu acest polen. S-a luat în considerare ca prag pentru răspunsul pozitiv valoarea TOSS ≥ 5 . La a doua expunere au răspuns pozitiv 75% dintre pacienți, un procentaj remarcabil de similar cu prevalența conjunctivitei alergice în studiile românești.

În studiul prezent, majoritatea pacienților au fost polisensibilizați alergic (198 de cazuri, 70,96%). Cele mai frecvente asocieri descrise: sensibilizarea alergică la polen de cereale/graminee (51%), apoi la acarienii din praful de casă (47%) și la polenul de artemisia - pelinăriță (37%). Prevalența rezultatelor pozitive la SPT în studiul populațional NHANES III a fost evaluată la 54,3% pentru cel puțin un test pozitiv, fiind identificată o prevalență aproape egală (26-27%) pentru testarea pozitivă la acarienii din praful de casă, polen de secară, ambrozia și gândac de bucătărie (Blatella), apoi 17% pentru pisică, 12,9% pentru Alternaria dintre fungi. Ca factori de risc pentru un test pozitiv au fost identificați: vârsta între 20 și 29 de ani, sexul masculin, rasa minoritară, locuitor al regiunii de Vest a SUA, traiul în locuință veche și nivelul seric redus al cotininei.

Parametrii de calitate a vieții urmăriți în cercetarea de față sunt tulburările somnului, prezența spitalizărilor (inclusiv urgențe) datorate alergiei și scorul global de afectare a activităților. Aproape jumătate din femei au raportat tulburări ale somnului de intensitate medie, în timp ce mai mult de o treime din bărbați nu acuză tulburări de somn. De asemenea spitalizările datorate alergiei sunt de două ori mai frecvente în cazul femeilor, iar scorul global mediu de afectare a activității este cu o unitate mai mare. Toate aceste diferențe privind afectarea calității vieții la femei față de bărbați sunt semnificative statistic ($p < 0,05$ S). Un studiu din 2022 a explorat datele obținute în NHANES 2005-2006 din perspectiva afectării calității vieții în alergii, prin modele de regresie logistică. Au fost selectați 2648 de pacienți bine caracterizați din perspectiva alergiilor, tulburărilor de somn și covariatelor incluse în modelele de regresie (obezitate, diabet zaharat, boală cardiovasculară, consum de alcool, fumat etc).

S-a demonstrat o asociere puternică a tulburărilor de somn cu bolile alergice: durata redusă a somnului, apneea obstructivă în somn, somnolență diurnă. Durata insuficientă a somnului a fost asociată cu apariția sensibilizării alergice. De asemenea, pentru femei s-au raportat mai frecvent și semnificativ statistic tulburări de somn, apnee obstructivă în somn și somnolență diurnă.

Modelul de regresie logistică din prezentul studiu a fost realizat pentru a explora discriminarea, pe baza unor variabile covariate, între simptome severe astm-like (scor de simptome ≥ 3) și simptome mai puțin severe. Având în vedere posibila subdiagnosticare a astmului în populație, precum și accesibilitatea redusă la servicii de spirometrie, diagnosticul formal de astm nu a fost un criteriu strict. În urma rulării modelului, au fost identificate câteva variabile care discriminează cu succes între simptomatologia respiratorie mai severă și cea mai puțin severă : sensibilitatea IgE față de Amb a 11 (OR = 4,82, 95% CI = 1,81-12,81), rezultat SPT pozitiv la scuame de câine, expunerea domestică la pisică. Diferența dintre cele două surse alergice - animale de companie pare să indice că expunerea la câine nu ar fi factor de risc cu simptome severe respiratorii decât dacă imunoreactivitatea IgE este manifestă (asociere demonstrată prin OR = 7.48, 95% CI = 2.29 - 24.46 pentru rezultat SPT pozitiv la scuame de câine), adică imunotoleranța naturală a fost depășită. În contrast, expunerea la pisică (cel puțin în ultimele 12 luni) ar fi suficientă pentru a fi asociată cu riscul de simptome respiratorii mai severe (OR = 3,3427, 95% CI = 1,29 - 8,65, pentru expunerea la pisică în mediul interior).

Asocierea dintre expunerea la pisică și simptome astm-like a fost descrisă de asemenea într-un studiu anterior, cu copii alergici la pisică, expunerea fiind suficientă pentru a exista riscul de simptome alergice ca wheezing sau simptome nazale. Într-un alt studiu pediatric (n=300) a fost investigată influența concentrației Der p 1 în mediu (cistein-proteaza specifică acarienilor din praful de casă), asupra severității simptomelor astmatice. Alte variabile (încărcătura de mediu a Der f 1, Fel d 1, Can f 1 și Bla g 1) au fost de asemenea incluse în modelul de regresie. A fost utilizat un scor de severitate a astmului cu 5 nivele, bazat pe ghidul GINA 2002 (gradat de la 0, 1 - intermitent, până la 4 - sever persistent). S-a demonstrat un risc de nivel de severitate mai mare a astmului pentru copiii expuși la concentrații ale Der p 1 peste 2 $\mu\text{g/g}$ de praf de casă. De asemenea, combinația dintre sensibilizare (prezența IgE seric alergen-specific) cu expunerea la nivel detectabil în mediu a Can f 1 și Fel d 1 a fost asociată cu un grad de severitate mai mare a astmului (OR = 2,06, 95% CI 1,01, 4,22 pentru primul alergen, respectiv OR = 2,41 95%CI 1,19, 4,89 pentru al doilea).

Toate celelalte variabile incluse în modelul de regresie logistică din prezentul studiu au fost eliminate de algoritmul de regresie când atingeau pragul predeterminat al $p > 0,25$. Valoarea obținută pentru AUC=0,743 este considerată de nivel acceptabil (0,7-0,8) pentru capacitatea testului (utilizând variabilele identificate) de a discrimina între rezultatele pozitive (scorul simptomelor astm-like mai mare sau egal cu 3) și cele negative.

CONCLUZII

Studiul descris în lucrarea doctorală este primul prin care s-a realizat producția și caracterizarea alergenului major Amb a 11 ca proteină matură, pe plan mondial. Am obținut alergenul în formă recombinată, în două sisteme de expresie diferite și în paralel. Scopul pe care l-am urmărit a fost din punct de vedere experimental - caracterizarea alergenului în formă recombinată cu determinarea activității sale alergice și imunogenice, epidemiologic - evaluarea prevalenței sensibilizării față de acest alergen într-o populație definită și analiza riscului, precum și clinic - investigarea semnificației clinice a imunoreactivității IgE față de Amb a 11, caracterizarea pacienților alergici. Astfel, cercetarea are o componentă experimentală (realizată prin metode de alergologie moleculară, experiment pe model animal) și o componentă clinică (realizată prin studiu cu pacienți recrutați prospectiv și parametri clinici analizați transversal). În lumina datelor prezentate, pot fi exprimate următoarele concluzii:

1) În condiții climatice favorabile, sezonul polinic pentru ambrozia în Câmpia de Vest se poate extinde peste 3 luni, de la mijlocul lunii iulie până spre sfârșitul lunii octombrie.

2) Incidența cazurilor recutate de pacienți alergici la polenul de ambrozia a crescut în timpul sezonului polinic, cu vârf de incidență la sfârșitul lunii august - începutul lunii septembrie (6/100.000 în eșantionul studiat, respectiv de 6 ori incidența bazală).

3) Prevalența sensibilizării alergice față de rAmb a 11, determinată prin tehnica ELISA, în rândul pacienților alergici la polenul de ambrozia a fost de 63,44%, confirmând definirea Amb a 11 ca alergen major în populația studiată.

4) Atât alergenul recombinat, cât și dimerii săi, au fost IgE reactivi față de serul pacienților alergici la polenul de ambrozia, ceea ce atestă alergenicitatea rAmb a 11 obținut în ambele sisteme de expresie (eAmb a 11 în *Escherichia coli*, respectiv iAmb a 11 în celule de insecte). Mai mult, la unii pacienți alergenicitatea Amb a 11 a fost echivalentă cu cea a Amb a 1 natural

5) Diferențele structurale dintre cele două forme recombinante ale Amb a 11 produse în sisteme de expresie diferite pot fi responsabile de diferențe în alergenicitatea și imunogenitatea celor două alergene.

6) Alergenele rAmb a 11 au fost imunogene, ambele forme inducând producție de IgG seric alergen-specific la iepurii imunizați. Titrul IgG a fost semnificativ, detectat prin ELISA până la diluția 1:100.000 a serului în cazul iAmb a 11, respectiv 1:10.000 în cazul eAmb a 11. Alergenul recombinat iAmb a 11 a demonstrat un caracter imunogen mai puternic decât eAmb a 11.

7) În grupul studiat (n=279) a existat o prezență disproporționată a pacienților de sex masculin, tineri (în grupa de vârstă 18-39 de ani), raportat la ponderea femeilor ($p < 0,05$ S).

8) Majoritatea pacienților (70,96%) au fost polisensibilizați alergici ($p < 0,05$ S), în cazul acestora asocierile frecvente fiind sensibilizarea la polen de cereale/graminee - alergen de mediu exterior (51,52%), respectiv la acarienii din praful de casă - alergen de mediu interior (47,98%).

9) Scorul median al simptomelor nazale a fost 8 (din 12 puncte posibile) indicând că majoritatea pacienților alergici la polen de ambrozia prezentau simptome nazale severe, atribuite rinitei alergice.

10) Femeile alergice la polen de ambrozia au acuzat afectarea mai severă a calității vieții ($p < 0,05$ S), din perspectiva tulburărilor de somn, a spitalizărilor datorate alergiei și a scorului global de afectare a activităților.

11) Într-un subgrup (n=150) bine caracterizat din punct de vedere molecular, pacienții clasificați pozitiv prin ELISA pentru sensibilizare IgE la Amb a 11 au asociat risc de simptome mai severe astm-like (scor 3+), comparativ cu pacienții nonreactivi față de Amb a 11 (OR = 4,82, 95%CI: 1,81-12,82).

12) Alte asocieri de risc pentru simptome astm-like severe au fost testarea cutanată pozitivă la scuame de câine (OR = 7,49, 95%CI: 2,29-24,46), respectiv expunerea domestică la pisică (OR = 3,34, 95%CI: 1,29-8,65).

CONTRIBUȚII ORIGINALE

Contribuțiile originale din componența cercetării doctorale prezentate se înscriu pe trei linii:

- studiul de alergologie moleculară aplicată pentru obținerea și caracterizarea formelor recombinante de Amb a 11 (rAmb a 11)
 - modelul experimental de imunoterapie realizat pe iepuri
 - studiul transversal de prevalență și caracterizare a pacienților alergici
- 1) În prima componentă a cercetării am realizat:
 - producția alergenului Amb a 11 matur în formă recombinată prin ambele sisteme de expresie, în cantități adecvate pentru aplicații ulterioare de alergologie moleculară (criteriul cantitativ pentru utilizarea alergenelor recombinante)
 - evidențierea imunoreactivității rAmb a 11 față de serul pacienților alergici la ambrozia (criteriul calitativ)
 - caracterizarea alergenelor recombinante prin modelare moleculară și analize de laborator, necesară pentru optimizarea tehnicilor de alergologie moleculară
 - evaluarea alergenicității rAmb a 11 prin testul de degranulare a bazofilelor RBL, gradul de alergenicitate fiind un predictor al fezabilității aplicațiilor centrate pe pacient
 - 2) Prin studiul pe animale de laborator am demonstrat imunogenitatea rAmb a 11, atestată de prezența IgG în serul iepurilor imunizați cu alergenele recombinante, în titru suficient pentru aplicații ulterioare de alergologie moleculară.

Rezultatele studiului de alergie moleculară și a modelului experimental de imunoterapie arată că rAmb a 11 pot fi utilizate într-un panel de alergene din polenul de ambrozia cu aplicabilitate în diagnosticul molecular al alergiei, dar și ca punct de pornire pentru dezvoltarea de molecule noi (peptide, hipoalergene) pentru inducerea toleranței prin imunoterapie. De asemenea, anticorpilor IgG obținuți prin imunizarea iepurilor pot sta la baza unor biosenzori pentru detectarea alergenelor din mediu. Astfel aceste contribuții au caracter aplicativ.

- 3) Prin componenta clinică a cercetării am obținut următoarele contribuții teoretice:
 - Confirmarea rolului Amb a 11 ca alergen major, cu seroprevalență peste 50% a anticorpilor IgE alergen-specfici în rândul pacienților alergici la polen de ambrozia
 - Caracterizarea grupului de pacienți alergici, cu particularitățile următoare: predominanța pacienților tineri de sex masculin, afectarea mai severă a calității vieții în cazul femeilor alergice la polen de ambrozia, asocierea sensibilizării alergice la Amb a 11 cu riscul de simptome mai severe astm-like

Coautor brevet de invenție: Panaitescu Carmen, Chen Kuan-Wei, Buzan Maria Roxana, Grijincu Manuela, Zbîrcea Lauriana Eunice, Tamaș Tudor-Paul, Cotarcă Monica, Haidar Laura, Tănăsie Gabriela, Huțu Ioan, Anghel Simona-Sanda. Kit de testare cu anticorpi alergen-specifici pentru detecția și cuantificarea alergenelor din polenul de Ambrozie din mediu și din extracte alergenice diagnostice/terapeutice, Nr. A/00759/2020, RO135067 (A0) — 2021-06-30, cerere înregistrată la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci (OSIM), Direcția de brevete de invenție și informații tehnologice.

Probleme de cercetare fundamentală rămase nerezolvate în domeniu, care pot constitui direcții pentru cercetări ulterioare: determinarea stabilității pe termen lung și în condiții de mediu diverse a alergenelor recombinante, identificarea epitopilor IgE-specifici și IgG-specifici, design de peptide bazate pe alergenele recombinante - pentru diagnostic și terapie, design de molecule hipoalergenice pentru imunoterapie alergen-specifică.