

OD REDAKCJI

Szanowni Państwo!

W kolejnym numerze Alergologii Współczesnej poruszamy kilka, niezwykle istotnych problemów. W trzech artykułach autorstwa prof. Płusa, prof. Pałczyńskiego i dr Nizio - Mąsior zostały przedstawione różne oblicza alergii krzyżowych - zespołu o złożonej, nie do końca rozpoznanej patogenecie. Objawy tego zespołu bywają bardzo dokuczliwe i w znaczny sposób pogarszają jakość życia chorych, a leczenie, także metodą swoistej immunoterapii, nie zawsze okazuje się skuteczne. Interesujące jest stanowisko Niemieckiego Towarzystwa Alergologicznego wraz z komentarzem prof. Jutela w kwestii immunoterapii podjęzykowej, zwłaszcza że rola tej terapii odczulającej nie została określona. Poruszamy też wyjątkowo aktualny temat sposobów uzyskiwania alergenów rekombinowanych ze wskazaniem na ich wartość diagnostyczną i terapeutyczną. Nowości alergologiczne w rubryce „Czy wiesz, że...” przygotowała dr Nizio - Mąsior.

W rubryce prawnej umieszczono uwagi do założeń kierunków zmian w systemie refundacji leków.

Życzę Państwu przyjemnej lektury

Prof. Karina Jahnz-Różyk
Redaktor Naczelna

Spis treści

prof. dr hab. med. K. Jahnz-Różyk Od redakcji.....	str. 1
prof. dr hab. med. T. Płusa Reakcje krzyżowe w chorobach alergicznych.....	str. 2
dr W. Dudek, dr med. T. Wittczak, dr hab. med. C. Pałczyński Uczulenie na lateks gumy naturalnej a alergia krzyżowa.....	str. 8
dr med. J. Nizio-Mąsior Czy immunoterapia swoista pyłkowicy wpływa na tolerancję pokarmów reagujących krzyżowo?.....	str. 13
Stanowisko ekspertów Niemieckiego Towarzystwa Alergologii i Immunologii Aktualne znaczenie immunoterapii podjęzykowej w leczeniu chorób alergicznych.....	str. 19
prof. dr hab. med. M. Jutel Komentarz do artykułu: Aktualne znaczenie immunoterapii podjęzykowej w leczeniu chorób alergicznych.....	str. 23
dr A. Kucharczyk, dr med. M. Faber, prof. dr hab. med. K. Jahnz - Różyk Alergeny rekombinowane – nowe spojrzenie na diagnostykę i leczenie chorób alergicznych.....	str. 25
dr med. J. Nizio-Mąsior Czy wiecie, że.....	str. 41
adw. A. Różyk Uwagi do założeń kierunków zmian w systemie refundacji leków w Polsce.....	str. 43

Wydawca:



NEXTER Sp. z o. o.
ul Jordana 7b
40-056 Katowice
tel. (0-32) 251-43-19
257-13-01
251-54-19
fax (0-32) 251-41-13
<http://www.nexter.pl>
e-mail: nexter@nexter.pl

NEXTER Sp. z o. o.
jest autoryzowanym
dystrybutorem firmy
Allergopharma



Skład, redakcja techniczna, korekta:
ARTIS, tel. 0502 404 765
e-mail:



artis@poczta.onet.pl
Druk:
Drukarnia TriadaPress
K-ce, ul. Wandy 14
tel. (032) 254 17 90



ISSN 1507 – 6898

Tadeusz Płusa
 Wojskowy Instytut
 Medyczny, Klinika
 Chorób Wewnętrznych,
 Pneumonologii
 i Alergologii CSK MON
 w Warszawie

Reakcje krzyżowe w chorobach alergicznych

Alergenami nazywa się antygeny, które posiadają zdolność do wywoływania reakcji alergicznej z udziałem przeciwciał klasy IgE, niekiedy IgG, co prowadzi do wywołania objawów alergicznych. Alergenami są głównie substancje białkowe, niekiedy powiązane z węglowodanami lub bardzo rzadko same węglowodany.

Zjawisko reakcji krzyżowej alergenów rozpoznaje się wówczas, gdy można stwierdzić, że wytwarzane przeciwciała klasy IgE przeciwko jednemu alergenowi wiążą się lub rozpoznają podob-

pują. Najczęściej zaobserwować można reakcje po zjedzeniu owoców, jarzyn i orzeszków u chorych z objawami pyłkowicy. Wiele zespołów chorobowych zostało opisanych właśnie u tych chorych, co łącznie nazwano „zespołem pyłkowo - pokarmowym” (PFS – pollen - food syndrome) (12).

Czynniki wpływające na występowanie reakcji krzyżowych

Na występowanie reakcji krzyżowych ma wpływ wiele czynników (6).

Przebieg reakcji immunologicznej w organizmie skierowanej przeciwko



nie białko innego pochodzenia (1, 2, 13). Wykazano, że również reakcje alergenów z receptorem limfocytu T prowadzą do zapalenia alergicznego (2).

Najwięcej danych obrazujących poruszony problem dostarczają badania epidemiologiczne prowadzone na dużych populacjach oraz obserwacje kliniczne (12). Pewne nadzieje wiąże się z klonowaniem i sekwencjonowaniem genów alergenowych, co może stworzyć nowe podstawy dla poznania mechanizmów alergenowych reakcji krzyżowych.

W codziennej praktyce alergologicznej spotyka się mnóstwo dowodów na to, że takie reakcje krzyżowe wystę-

alergenom, a zwłaszcza wytwarzanie wysokich stężeń swoistych przeciwciał klasy IgE i stopień ich wiązania z receptorem mają istotny wpływ na kształtowanie podatności do reakcji krzyżowych (6).

Czas trwania ekspozycji na alergen, a także jej stopień i częstość powtarzania, odgrywać mogą znamienne rolę w wywoływaniu reakcji na podobne determinanty alergenowe (2).

Zasadnicze znaczenie w rozwoju reakcji krzyżowych zdaje się mieć także **budowa alergenów**. Epitopy alergenowe charakteryzować się powinny zdolnością do wywoływania reakcji, czyli tzw. alergogennością (1). Zależne to jest od ich budowy,

a wystąpienie reakcji determinuje obecność objawów chorobowych (ryc. 1).

- **Wspólne cechy pierwszo i trzeciorzędowe białek**, a zwłaszcza podo-

(13). Uczestniczy ono w reakcjach obronnych roślin (ryc. 3) i stwierdzane jest w wielu alergenach pokarmowych (ryc. 4).



bieństwo ich strukturalnej sekwencji decyduje o wystąpieniu reakcji. Wykazano, że gdy zgodność sekwencyjna białek osiąga 70%, wystąpienie reakcji krzyżowej jest bardzo realne. Przy zgodności poniżej 50% zjawisko jest obserwowane rzadko (1).

- **Podobieństwo w sekwencji alergenów do ludzkich homologów** jest równie istotną kwestią, ponieważ może prowadzić do autoreaktywnego wytwarzania przeciwciał klasy IgE, czego przykładem bywa obecność tych przeciwciał skierowanych przeciwko ludzkiej profilinie i dysmutazie nadtlenku manganowego u chorych z objawami pyłkowicy (15) i alergii na grzyby (5). Podobieństwo białek może dotyczyć roślin zbliżonych gatunkowo, jak też tych bez znamiennej bliskości gatunkowej (ryc. 2).
- **Panalergeny** to alergeny najbardziej rozpowszechnione w świecie roślin i zwierząt. Profiliny, chitinazy czy tzw. lipidowe białko transferowe (LTP) najlepiej dokumentują problem „wszędobylskich” alergenów (ryc. 2).
- **LTP** zostało dokładnie poznane

- **Obecność determinant krzyżowo reagujących węglowodanów** (CCD – cross - reactive carbohydrate determinants) stwierdza się w alergenach roślinnych i pochodzących od insektów. Glikany fukozy i ksylony są odpowiedzialne za występowanie reakcji krzyżowych (16).

Aktualnie Podkomitet ds. Nazewnictwa Alergenowego Międzynarodowej Unii Towarzystw Immunologicznych (Allergen Nomenclature Sub - Committee of the International Union of Immunological Societies), przedstawił listę ponad 400 alergenów i prawie 200 izoalergenów. Większości tych alergenowych białek określono sekwencje cDNA, a w niektórych przypadkach także ich strukturę trójwymiarową (wg 6). Na tej podstawie zestawiono alergeny w 28 grupach białek reagujących krzyżowo niezależnie od ich pochodzenia. Wyróżniono 14 rodzin tzw. białek zależnych od patogenezy (PR – pathogenesis - related proteins). Uczestniczą one w reakcji na zakażenia wywołane przez różne patogeny (bakterie, wirusy i grzyby). Jednakże obecność tych białek w uprawianych roślinach zwiększa ich alergogenność (wg 6).

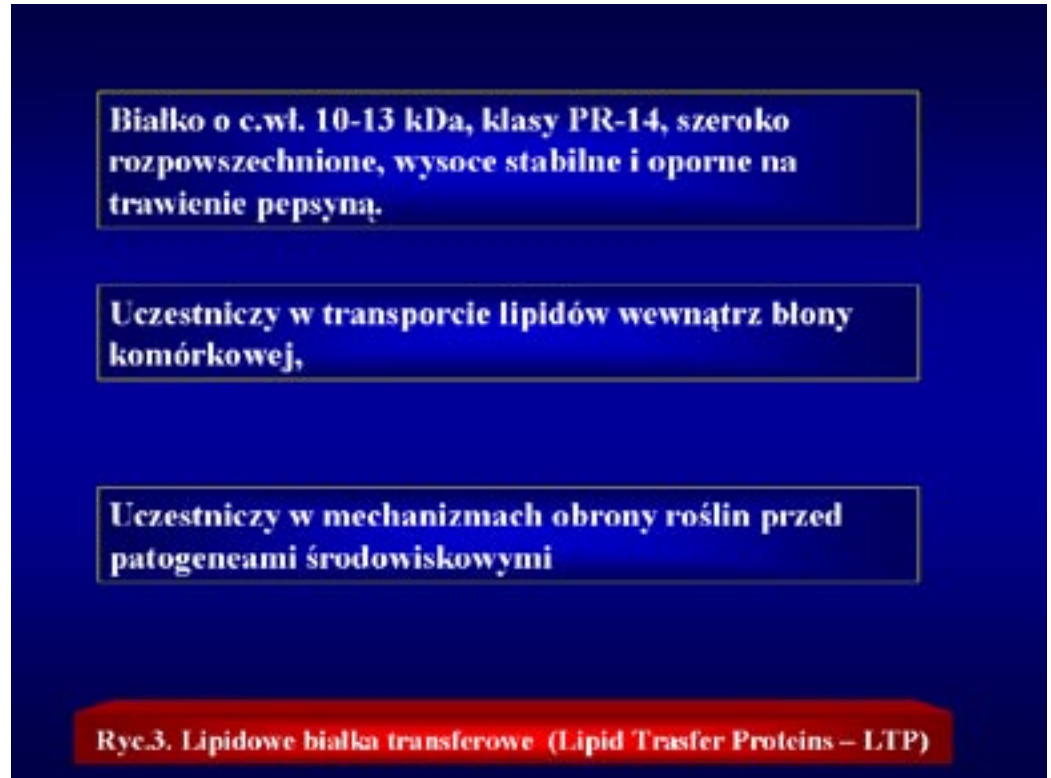
Główne grupy alergenów w reakcjach krzyżowych

Najczęściej spotykane alergeny odpowiedzialne za występowanie reakcji krzyżowych zestawiono poniżej.

Bet v 1 - Major birch pollen antigen (PR - 10) istnieje w ponad 20 izoformach, które różnią się zdolnością wią-

stanowiące główny alergen owoców związany z zespołem „lateks - owoce”. Heweina jest główną częścią epitopu odpowiadającego za reakcje krzyżowe z lateksem (wg 6).

- Klasa II to białko zbliżone budową w 60% do chitinazy klasy I, ale nie zawiera domeny dla heweiny. Nie



zania IgE. Swoiste przeciwciała dla tego alergenu obecne są u 90% chorych z objawami alergii na brzozę w Europie centralnej i północnej. Jest odpowiedzialny za reakcje krzyżowe między pyłkami brzozy a owocami, jarzynami i orzeszkami. Alergen stwierdzany jest m. in. w jabłkach, marchwi, morelach, selerze, maku, mango, gruszkach, wiśniach (wg 6).

Profiliny - wszędobylska rodzina białek o c. wł 15 - 18 kDa, kontrolująca wiązanie aktywny w komórkach eukariotycznych. Uczulenie na profilinę stwierdzane jest u 20 - 43% chorych z alergią pyłkową i pokarmową. Powoduje ona u niektórych chorych reakcje typu I na alergeny pyłków i pokarmów odległych gatunkowo. Występują m. in. w jabłku, pieprzu, brzozie, marchwi, selerze, owocach kiwi, brzoskwinia, gruszkach, maku, wiśniach (15).

Chitinaza (PR - 3) - występuje jako dwie grupy białek.

- Klasa I to białko o c. wł. 30 - 45 kDa,

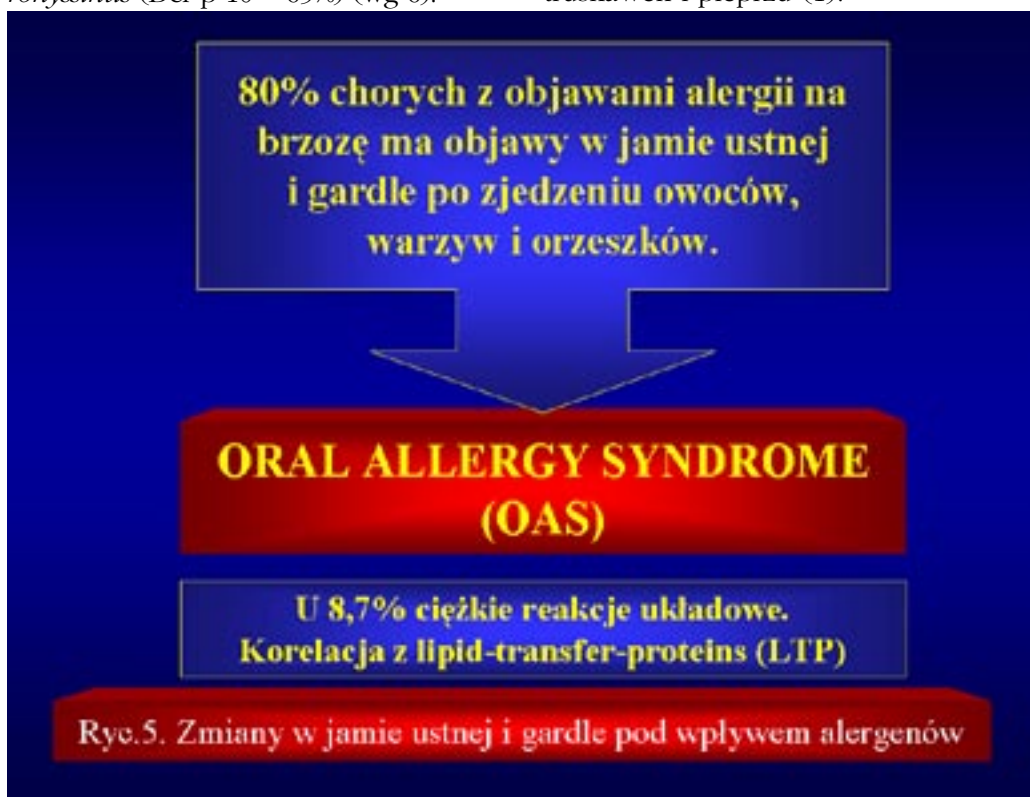
wszystkie przeciwciała IgE skierowane przeciwko profilinie wywołują reakcje krzyżowe. Hev b8 jest podobny do profiliny brzozy, co powoduje ryzyko wystąpienia uczulenia na lateks u uczulonych na pyłek brzozy. Białko obecne w pyłku brzozy, owocach awokado, bananach, groszku, lateksie, mango, pomidorach, pszenicy, kiwi i papai (13).

Lipidowe białka transferowe (Lipid Transfer Proteins – LTP) to białka o c. wł. 10 - 13 kDa, klasy PR - 14, szeroko rozpowszechnione, wysoce stabilne i odporne na trawienie pepsyną (Ryc. 3). Uczestniczą w transporcie lipidów wewnątrz błony komórkowej i mechanizmach obrony roślin przed patogenami środowiskowymi. Obecne w migdałach, jabłkach, morelach, jęczmieniu, grochu, kapuście, marchwi, selerze, orzeszkach, sliwkach, soi, brzoskwinii, pszenicy, brokułach, kukurydzy, pietruszce, koperze, soczewicy, bylicy, piwie, słoneczniku, wiśniach, pomidorach, musztardzie (1)(Ryc. 4).



Tropomiozyna jest głównym białkiem mięśni krewetek, krabów i ostryg. Wykazuje duże podobieństwo do alergenów *D. pteronyssinus* (Der p 10 > 65%) (wg 6).

kim smaku, c. wł. 23 - 31 kDa, należące do PR - 5, zostały wyizolowane z pokarmów, między innymi z jabłka, wiśni, truskawek i pieprzu (1).



Cyklofiliny to białka o c. wł. 18 kDa, wyizolowane z pyłku brzozy (Bet v 7) i *Malassezia furfur* (Mal f 6) u chorych z AZS (wg 6).

Białka taumatynowe (TLP – thau-matin - like proteins) to białka o słod-

Reduktaza izoflawonowa (IFR – isoflavone reductase) jest białkiem o c. wł. 33 - 35kDa, wyizolowanym z pyłku brzozy (Bet v 5), jabłka, bananów, marchwi, kukurydzy, mango, pomarańczy, gruszki, tytoniu (6).

Lipokaina jest białkiem o słodkim smaku, c. wł. 23 - 31 kDa, należy do PR - 5, które wyizolowano z jabłka, wiśni, truskawek, pieprzu (6).

2S albuminy zostały zidentyfikowane na podstawie sedymentacji jako 2S, 7S i 11S. Stwierdzono ich obecność w orzeszkach brazylijskich, fasoli, słoneczniku, gorzycy (6).

Enolaza jest enzymem o c. wł. 48 kDa, który katalizuje wewnętrzną konwersję substratów w procesie glikolizy. Stwierdzono

- obecność licznych IgE przeciwko różnym epitopom
- zahamowanie wiązania IgE między alergenami

Reakcje krzyżowe między pyłkami a pokarmami (Pollen - associated food allergy)

Większość chorych z objawami pyłkowicy reaguje krzyżowo na dwa lub więcej alergenów pokarmowych (6). Wyrazem tych reakcji jest tzw. oral allergy syndrome (OAS) (ryc. 5).



jej obecność w ścianie komórek grzybów, a w tym w *Cladosporium herbarum* (Cl h6) i *Alternaria alternata* (Alt a5), lateksie (Hev b9) i wśród białek szoku termicznego. Wywołują reakcję I typu i są najsilniejszymi alergenami. Opisano reakcje między *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* a lateksem (10).

Wykrywanie reakcji krzyżowych

Udokumentowanie reakcji krzyżowej w dalszym ciągu stanowi istotny problem u chorych z objawami alergii. Obserwacja kliniczna i badania z wykorzystaniem technik immunologicznych umożliwiają obiektywizację obserwowanych zmian. Za obecnością reakcji krzyżowej mogą przemawiać n.w. (wg 6):

- obecność IgE przeciwko licznym pospolitym epitopom

- 80% chorych z objawami alergii na brzozę po zjedzeniu owoców, warzyw i orzeszków ma zmiany w jamie ustnej i gardle. U 8,7% chorych na pyłkowicę opisywano ciężkie reakcje układowe. Wskazuje się u nich na korelację zmian klinicznych z obecnością *lipid - transfer - proteins* (LTP).
- 30 – 80% chorych z alergią na lateks ujawnia reakcje krzyżowe na alergeny pokarmowe (ryc. 6).
- U 50% atopowych chorych z alergią na orzeszki ziemne występują reakcje krzyżowe z innymi alergenami tej grupy (10). Reakcja ta odpowiedzialna jest za ok. 50% zgonów spowodowanych przez alergeny pokarmowe. Ponieważ problem jest dość istotny, podjęto próby leczenia zespołu m. in.

- podawaniem anty - IgE (8) oraz szczepionkami rekombinowanymi (9).
- Kozie mleko wywołuje 92% reakcji krzyżowych (3), a mleko wielbłąda i kłaczy nie wywołuje żadnych reakcji krzyżowych (4).
 - Alergia na wołowinę stwierdzana jest u 10% dzieci z alergią na mleko (14). Gotowanie mięsa wołowego zmniejsza jego alergogenność (7).
 - Alergia na mięso ptaków i jaja (*bird - egg syndrome*) spowodowana jest występowaniem α -liwetyny w sierści, mięsie i jajach ptaków (11).

Występowanie alergii na sierść, mięso i jaja ptaków obserwowane jest w zmiennej kolejności.

Dokonujący się postęp w naukach podstawowych znajduje swoje szybkie aplikacje w immunologii klinicznej. Ponieważ immunoterapia stała się w pełni akceptowaną metodą leczniczą, która przyczynowo ingeruje w proces zapalenia alergicznego, wiedza o mechanizmach reakcji krzyżowych w konfrontacji z obrazem klinicznym staje się koniecznością nie tylko dla alergologów.

Piśmiennictwo

1. Aalberse R. C.: Structural biology of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2000; 106, 228 - 238.
2. Aalberse R. C., Akkerdaas J., van Ree R.: Cross - reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy*, 2001; 56, 478 - 490.
3. Bellioni - Businco B., Paganelli R., et al. : Allergenicity of goat's milk in children with cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Invest.*, 1999; 103, 1191 - 4.
4. Businco L., Giampietro P. G., Lucenti P. et al.: Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Invest.*, 2000; 105, 1031 - 4.
5. Cramer R., Faith A., Hemmann S. et al.: Humoral and cell - mediated immunity in allergy to *Aspergillus fumigatus*. *J. Exp. Med.*, 1996; 184, 265 - 270.
6. Ferreira F., Hawranek T., Gruber P.: Allergic cross - reactivity: from gene to the clinic. *Allergy*, 2004; 59, 243 - 267.
7. Fiocchi A., Restani P., Riva E. et al. : Heat treatment modifies the allergenicity of beef and bovine serum albumin. *Allergy*, 1998; 53, 798 - 802.
8. Leung D. Y., Sampson H. A., Yunginger J. W. et al.: Effect of anti - IgE therapy in patients with peanut allergy. *N. Engl. J. Med.*, 2003; 348, 986 - 93.
9. Li X. M., Srivastava K., Grishin A. et al.: Persistent protective effect of heat - killed *E. coli* producing "engineered" recombinant peanut proteins in a murine model of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003; 112, 159 - 67.
10. Maleki S., Viquez O., Jacks T. et al.: The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003; 112, 190 - 5.
11. Mandallaz M. M., de Weck A. L., Dahinden C. A.: Cross - reactivity between bird antigens and egg - yolk livetins in IgE - mediated hypersensitivity. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1988; 87, 143 - 150.
12. Sicherer S. H.: Clinical implications of cross - reactive food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001; 108, 881 - 890.
13. Weber R. W.: Patterns of pollen cross - allergenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003; 112, 229 - 239.
14. Werfel S. J., Cooke S. K., Sampson H. A.: Clinical reactivity to beef in children allergic to cow's milk. *J. Allergy Clin. Invest.*, 1997; 99, 293 - 300.
15. Valenta R., Duchene M., Pettenburger K. et al.: Identification of profilin as a novel pollen allergen: IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science*, 1991; 253, 557 - 560.
16. van Ree R., Cabanes - Macheteau M., Akkerdaas J. et al.: $\beta(1, 2)$ - xylose and $\alpha(1, 3)$ - fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275, 11 451 - 11 458.

**Wojciech Dudek¹,
Tomasz Wittczak²,
Cezary Pałczyński^{1, 2}.**

¹ Ośrodek Alergii Zawodowej i Środowiskowej Instytutu Medycyny Pracy im. J. Nofera w Łodzi.
² Klinika Chorób Zawodowych Instytutu Medycyny Pracy im. J. Nofera w Łodzi.

Uczulenie na lateks gumy naturalnej a alergologia krzyżowa

Wstęp

Od połowy lat 80. XX wieku zaobserwowano gwałtowny wzrost częstości występowania alergii na lateks gumy naturalnej (LGN). U podstawy tego zjawiska leżał najprawdopodobniej następujący łańcuch zdarzeń. Pierwsze z nich to wzrost stopnia ekspozycji na alergeny lateksu gumy naturalnej (LGN) spowodowany pandemią HIV. Po opublikowaniu rekomendacji CDC (ang. *Center for Disease Control and Prevention*) dotyczących profilaktyki zakażeń wirusowych (HIV i WZW) blisko 100-krotnie



zwiększyło się zużycie rękawiczek lateksowych w ochronie zdrowia w USA. Wzrost popytu na rękawiczki lateksowe sprawił, że okres magazynowania surowego substratu do produkcji wyrobów lateksowych (mleczko kauczukowe) celem zintensyfikowania produkcji uległ skróceniu z 3 miesięcy do około 14 - 30 dni. Środki chemiczne używane do zapobiegania rozwojowi drobnoustrojów w mleczku kauczukowym powodują także denaturację, a tym samym zmniejszenie potencjału alergizującego białek LGN. Skrócenie czasu przechowywania substratu z tymi środkami zredukowało ten efekt, przez co potencjał alergizujący wyrobu finalnego stał się znacznie większy (1).

Wyniki badań epidemiologicznych, dotyczących oceny występowania uczulenia na LGN oraz czynników ryzyka wy-

stąpienia tej alergii, pozostawiają nadal wiele wątpliwości. Brak zunifikowanych kryteriów rozpoznania alergii na LGN uniemożliwia poprawną metaanalizę danych epidemiologicznych z poszczególnych badań dotyczących występowania tego typu alergii w różnych populacjach. Przyjmuje się, że w grupach zawodowo narażonych na LGN częstość alergii tego typu waha się od 0 do 30% (2); w populacji generalnej wynosi prawdopodobnie mniej niż 1% (3, 4), a u osób z atopią szacowana jest na 2, 6% do 9, 44% (5, 6). W badaniu krwiodawców w Polsce stwierdzono występowanie klinicznie jawnej alergii na LGN potwierdzonej obecnością swoistych przeciwciał IgE u 0, 2% populacji (7).

Patomechanizm alergii krzyżowej

W procesie patogenetycznym reakcji nadwrażliwości typu natychmiastowego dochodzi do wiązania się przeciwciał klasy IgE, opłaszczonych na komórkach efektorowych, ze swoistym antygenem (alergenem). Do wystąpienia reakcji swoistej pod postacią degranulacji komórek efektorowych konieczne jest połączenie co najmniej dwóch opłaszczonych, sąsiadujących przeciwciał IgE z antygenem (zasada mostkowania IgE). Przeciwciała rozpoznają odpowiednie epitopy w strukturze antygeny i łączą się z nim na zasadzie dopasowania. Poszczególne przeciwciała wykazują swoistość w stosunku do konkretnych epitopów. Jeśli różne antygeny posiadają będą identyczne lub bardzo podobne epitopy, przeciwciała będą się z nimi łączyć nie rozpoznając różnic w budowie całego antygeny. Ta właściwość przeciwciał IgE leży u podstawy występowania zjawiska reakcji krzyżowych.

Narażenie na alergeny pochodzenia roślinnego jest powszechne i obejmuje różne drogi, począwszy od wziewnej (jak w przypadku pyłków roślin wiatropylnych), poprzez kontaktowe aż do pokarmowej. Ze względu na możliwość występowania reakcji krzyżowych pomiędzy różnymi alergenami pochodzenia roślinnego, uczulenie na jeden aler-

gen często predysponuje do rozwoju uczulenia na inny, posiadający epitopy o zbliżonej budowie. Nadwrażliwość na alergen wziewny może na przykład spowodować wystąpienie objawów w kontakcie z reagującym krzyżowo alergenem pokarmowym. Zjawisko to leży u podstaw tzw. zespołu alergicznego jamy ustnej (ang. *OAS – oral allergy syndrom*, Zespół Amlot - Lessofa). W przebiegu tego schorzenia u pacjentów uczulonych uprzednio na pyłki roślin podczas kontaktu z alergenem pokarmowym (surowe owoce i warzywa) pojawiają się objawy miejscowej anafilaksji jamy ustnej i gardła (niekiedy może dojść nawet do zagrażającego życiu obrzęku krtani). W naszej strefie klimatycznej zespół OAS jest poprzedzony najczęściej uczuleniem na pyłek brzozy (8). Objawy pyłkowicy mogą poprzedzać wystąpienie alergii pokarmowej na kilka tygodni do kilku lat.

Związek opisywanego poniżej zespołu lateksowo - owocowego z zespołem OAS jest przedmiotem kontrowersji. Aktualnie brakuje jeszcze danych umożliwiających jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, czy alergia na lateks poprzedza wystąpienie alergii na owoce tropikalne, czy też kolejność rozwijania się nadwrażliwości jest odwrotna. Uznanie tego zespołu za formę OAS nie znajduje zatem uzasadnienia. Niepublikowane dane Ośrodka Alergii Zawodowej i Środowiskowej IMP w Łodzi wskazują, iż alergia na LGN może zarówno poprzedzać uczulenie na owoce południowe, jak i być jego następstwem.

Zespół lateksowo - owocowy

Możliwość współistnienia nadwrażliwości na lateks gumy naturalnej z alergią pokarmową znana jest od wczesnych lat 90. (9). Już w pierwszych doniesieniach sugerowano współwystępowanie alergii na LGN z alergią na owoce południowe (przede wszystkim banany, awokado, kiwi i papaję). Zespół ten nazwano wówczas zespołem lateksowo - owocowym (ang. *latex - fruit syndrom*). Jego badacze stwierdzali w surowicy osób uczulonych na LGN obecność swoistych przeciwciał również dla alergenów innych owoców (ananasa, melona i mango) (10). Z biegiem czasu udowodniono, że nadwrażliwość na LGN

może także współistnieć z nadwrażliwością na inne alergeny pokarmowe, takie jak: seler, ziemniaki, orzechy, pomidory, marchew (11; 12; 13).



Badania przeprowadzone w populacji osób z alergią pokarmową ujawniły częstsze niż u osób bez takiej alergii występowanie alergii na lateks gumy naturalnej (10, 4% vs. 5, 6%) (14).

Niektórzy autorzy sugerują, iż nadwrażliwość na LGN może wiązać się nie tylko z alergią pokarmową, ale również z alergią wziewną na inne alergeny roślinne. W swojej pracy dotyczącej występowania przeciwciał swoistych dla lateksu gumy naturalnej w surowicy krwiodawców z Wielkiej Brytanii, Merret i jego współpracownicy stwierdzili znaczący wzrost częstości dodatnich wyników w okresie występowania narażenia na pyłki. Obserwacje te sugerują, że wzrost częstości występowania dodatnich wyników testów spowodowany był wzrostem stężenia w organizmie osób poddanych badaniu przeciwciał swoistych dla pyłków, co wywoływało reakcje krzyżowe (15).

Objawy kliniczne zespołu lateksowo - owocowego

Levy i współpracownicy stwierdzili, że ponad 50% pacjentów z alergią na lateks gumy naturalnej wykazuje jednocześnie objawy uczulenia na owoce egzotyczne (banany, papaję, awokado), od 30 do 50% na kasztany jadalne, kiwi, mango, brzoskwinie i pomidory a poniżej 30% na seler, jabłka, ananasy i melony. Udowodnili oni również, iż współistnienie alergii na

pyłki roślinne z alergią na LGN powoduje wzrost częstości występowania objawów alergii pokarmowej (16). W Polsce częstość współistnienia zespołu lateksowo-owocowego u osób uczulonych na LGN jest znacznie niższa. Stwierdzono iż zaledwie 7, 9% pielęgniarek uczulonych na LGN wykazywała także objawy uczulenia na owoce południowe (17). U chorych z zespołem lateksowo-owocowym naj-



częściej obserwuje się pokrzywkę (kontaktową lub uogólnioną), kaszel, duszności, bóle brzucha i biegunki. W niektórych przypadkach po spożyciu uczulającego pokarmu dochodzić może do wystąpienia reakcji anafilaktycznych o ciężkim przebiegu (18).

Alergeny lateksu uczestniczące w reakcjach krzyżowych

W skład LGN wchodzi wiele różnych białek i peptydów, dlatego też za występowanie reakcji krzyżowych odpowiadać mogą różne alergeny. Do tej pory zidentyfikowano 13 antygenów obecnych w lateksie gumy naturalnej - oznaczono je symbolami od Hev b1 do Hev b13. Niektóre z nich uważa się za tzw. panalergeny, tj. substancje białkowe o podobnej budowie, występujące w wielu gatunkach roślin. Spośród alergenów lateksu charakter taki mają np. profilina (Hev b8) i chitynaza klasy I (Hev b11).

Zdolność wywoływania reakcji krzyżowych przez alergeny lateksu została dobrze udokumentowana. Wiadomo na przykład, że antygen Hev b2 (β - 1, 3 - glukanaza) może reagować krzyżowo z antygenami zawartymi w papry-

ce (19). Hev b6. 02 (heweina) wywołuje reakcje krzyżowe z przeciwciałami wykrywanymi u osób uczulonych na *Ficus benjamina*, roślinę ozdobną hodowaną często w mieszkaniach (20). Hev b7 (homolog patatyny) jest odpowiedzialny za reakcje krzyżowe z alergenami roślin psiankowatych: ziemniaka i pomidora (11, 12). Antygen Hev b8 (profilina), szeroko rozpowszechniony w królestwie roślin, wywołuje reakcje krzyżowe z antygenami pokarmowymi takimi jak: banan, ananas, seler, papryka oraz z innymi antygenami roślinnymi (pyłki). Stwierdzono krzyżowe reakcje Hev b8 z przeciwciałami swoistymi dla antygenów pyłku brzozy Bet v2 (21). Hev b9 (enolaza), kluczowy enzym odpowiedzialny za procesy glikolizy i glukoneogenezy, wykazuje reakcje krzyżowe z alergenami pleśni. Alergen ten wykazuje podobieństwo w zakresie sekwencji aminokwasów (w około 60%)



do enolaz wyizolowanych z kilku gatunków pleśni. Wagner i wsp. stwierdzili reakcje krzyżowe przeciwciał swoistych dla Hev b9 z antygenami Alt a5 pleśni z rodzaju *Alternaria alternaria* i Cla h6 pleśni z rodzaju *Cladosporium herbarium* (22). Budowa antygeny Hev b10 (manganowa dysmutaza ponadtlenkowa – MnSOD) jest identyczna w ponad 48% z MnSOD wyizolowaną z pleśni *Aspergillus fumigatus* i daje reakcje krzyżowe z antygenem Asp f6. Stwierdzono, że antygen Hev b10 hamuje łączenie swoistych IgE z Asp f6 w około 32% przypadków. Jest to więc kolejny antygen, który w przypadku współistnie-

nia alergii na pleśnie może powodować reakcje krzyżowe (23). Także antygen Hev b11 (chitynaza klasy I) związany jest z alergią krzyżową na wiele produktów roślinnych. Endochitynazy, obok profilin, są szeroko rozpowszechnionymi panalergenami roślinnymi. Fakt ten tłumaczy reakcje krzyżowe alergenów lateksu gumy naturalnej z antygenami wielu roślin: banana, kiwi, awokado, kasztana jadalnego, papai, passiflory, mango, pomidora, a nawet pszenicy (23). Za wywoływanie reakcji krzyżowych związanych z chitynazą odpowiedzialna jest N-końcowa część tego białka o budowie bardzo zbliżonej do heweinu (Hev b6. 01). Zwana jest ona domeną N - końcową podobną do heweinu HLD (ang. *hewein - like domain*). Reakcje krzyżowe są związane prawdopodobnie z wiązaniem przeciwciał swoistych dla heweinu z tą właśnie częścią chitynazy. Chitynaza jest bardzo wrażliwa na wysoką temperaturę. Podgrzanie dezaktywuje jej właściwości alergenne i pozbawia możliwości zainicjowania reakcji krzyżowych z przeciwciałami swoistymi dla lateksu gumy naturalnej. Z tego powodu produkty, które posiadają chitynazę o właściwościach alergenowych zdolnych do wytworzenia reakcji z przeciwciałami swoistymi dla LGN, do ich spożycia zaś wymagane jest przygotowanie ich w wysokiej temperaturze, nie dają reakcji krzyżowych z LGN. Sánchez-Monge i wsp. zaobserwowali, iż wyodrębniona chitynaza klasy I z owoców papai oraz z białej fasoli po podgrzaniu w temperaturze 100°C przez 15 min, traciła zdolność do wywołania dodatnich testów skórnych u osób uczulonych na LGN (24).

Podsumowanie

Niektóre z białek wchodzących w skład lateksu gumy naturalnej mają właściwości panalergenów. Są one szeroko rozpowszechnione w królestwie roślin i dlatego możliwe jest występowanie alergii krzyżowych pomiędzy LGN i wieloma produktami spożywczymi. Z uwagi na fakt, że znacząca część pacjentów uczulonych na LGN może wykazywać objawy alergii po spożyciu niektórych pokarmów, a związane z tym reakcje kliniczne mogą być bardzo ciężkie, konieczne jest informo-

wanie pacjentów, u których uprzednio stwierdzono uczulenie na LGN, o możliwości ich wystąpienia. Podobnie osoby ze stwierdzonym uczuleniem na alergeny roślinne powinny być ocenione pod kątem uczulenia na lateks, zwłaszcza jeśli należą do grup ryzyka (pracow-



nicy ochrony zdrowia, pacjenci z rozszereżeniem kręgosłupa). Zalecenie to jest szczególnie istotne, ponieważ w przypadku konieczności wykonania u takiej osoby zabiegów medycznych kontakt z przedmiotami lateksowymi może spowodować wystąpienie bezpośrednio zagrażającej życiu reakcji anafilaktycznej.

Bardzo istotną konsekwencją zjawiska nadwrażliwości krzyżowej jest fakt, że uczulenie na alergeny roślinne może spowodować uzyskanie fałszywie dodatnich wyników immunologicznych badań serologicznych i punktowych testów skórnych w kierunku uczulenia na lateks gumy naturalnej, co może skutkować ustaleniem błędnego rozpoznania. W przypadku wątpliwości diagnostycznych, zwłaszcza przy niejednoznacznym wywiadzie chorobowym, konieczne jest niekiedy przeprowadzenie swoistej próby ekspozycyjnej z LGN celem postawienia ostatecznej diagnozy. Oczywiście u chorych zgłaszających objawy kliniczne w kontakcie z przedmiotami lateksowymi sugerujące anafilaksję istnieją istotne przeciwwskazania do wykonywania prób ekspozycyjnych (w tym także testów skórnych), a podstawową metodą diagnostyki powinny być standaryzowane metody serologiczne o uznanej wartości.

Piśmiennictwo

1. Ownby R.: A history of latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: S27 - 32.
2. Garabrant D. H., Schweitzer S.: Epidemiology of latex sensitization and allergies in health care workers. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110, 82 - 95.
3. Senna G. E., Crocco C., Roata P., Agostini M., Crivellaro P., Bonadonna M., Caputo M. R.: Prevalence of latex-specific IgE in blood donors: an Italian survey. *Allergy* 1999; 54, 80 - 81.
4. Turjanmaa K., Mäkinen - Kiljunen S.: Latex allergy: prevalence, risk factors and cross - reactivity. *Methods* 2002; 27: 10 - 14.
5. Meglio P., Arabito E., Plantamura M., Businco L.: Prevalence of latex allergy and evaluation of some risk factors in a population of atopic children. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2002; 12: 250 - 6.
6. Moneret - Vautrin D. A., Beaudouin E., Widmer S., Mouton C., Kanny G., Prestat F., Kohler C., Feldmann L.: Prospective study of risk factors in natural rubber latex hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 668 - 77.
7. Dudek W., Walusiak J., Wittczak T., Krakowiak A., Marciniak - Bielak D., Raulf - Heimesoth M., Pałczyński C.: Natural rubber latex allergy: antigen specific IgE in Polish blood donors, prevalence and risk factors – preliminary data. *Int J Occup Environ Health* 2005; 18: 35 - 42.
8. Rudzki E.: Zespół alergii jamy ustnej (OAS): obraz kliniczny, alergenów wziewnych i pokarmowych oraz profilaktyka i leczenie. *Przegl Dermatol* 1998, 86, 205 - 214
9. Fisher AA: Association of latex and food allergy. *Cutis* 1993; 52, 70 - 1.
10. Brehler R., Theissen U., Mohr C., Luger T.: „Latex - fruit syndrome”: frequency of cross - reacting IgE antibodies. *Allergy* 1997; 52: 404 - 10.
11. Reche M, Pascual C., Vicente J., Caballero T., Muñoz F., M., Sanchez S., Esteban MM.: Tomato allergy in children and young adults: cross - reactivity with latex and potato. *Allergy* 2001; 56: 1197.
12. Schmidt MH., Raulf - Heimesoth M., Posch A: Evaluation of patatin as a major cross - reactive allergen in latex - induced potato allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89, 613 - 8.
13. Kim KT., Hussain H.: Prevalence of food allergy in 137 latex - allergic patients. *Allergy Asthma Proc* 1999; 20, 95 - 7.
14. Kanny G., Moneret - Vautrin D. A., Flabbee J., Baedouin E., Morisset M., Thevenin F.: Population study of food allergy in France. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 133 - 40.
15. Merrett TG., Merrett J., Kekwick R.: The prevalence of immunoglobulin E antibodies to the proteins of rubber (*Hevea brasiliensis*) latex and grass (*Phleum pratense*) pollen in sera of British blood donors. *Clin Exp Allergy* 1999; 29, 1572 - 78.
16. Levy D. A., Mounedji N., Noirot C., Leynadier F.: Allergic sensitization and clinical reactions to latex, food and pollen in adult patients. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 270 - 75.
17. Pałczyński C., Walusiak J., Hanke W., Górski P.: Latex allergy in Polish nurses. *Am J. Industr. Med.* 1999, 35, 413 - 419.
18. Beezhold D. H., Sussman G. L., Liss G. M., Chang N. S.: Latex allergy can induce clinical reactions to specific foods. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 416 - 22.
19. Wagner S., Radauer C., Hafner C., Fuchs H., Jensen - Jarolim E., Wuthrich B., Scheiner O., Breiteneder H.: Characterization of cross - reactive bell pepper allergens involved in the latex - fruit syndrome. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1739–1746.
20. Erdmann S. M., Hipler U. C., Merk H. F., Raulf - Heimesoth M.: Sensitization to fig with cross - sensitization to weeping fig and natural rubber latex. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 133: 316.
21. Ganglberger E., Radauer C., Wagner S., Riordan G., Beezhold DH., Brehler R., Niggemann B., Scheiner O., Jensen - Jarolim E., Breiteneder H.: Hev b 8, the *Hevea brasiliensis* latex profilin, is a cross - reactive allergen of latex, plant foods and pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125: 216–227.
22. Wagner S., Breiteneder H., Simon - Nobbe B., Susani M., Krebitz M., Niggemann B., Brehler R., Scheiner O., Hoffmann - Sommergruber K.: Hev b 9, an enolase and a new cross - reactive allergen from *hevea* latex and molds. Purification, characterization, cloning and expression. *Eur J Biochem* 2000; 267, 7006 - 14.
23. Wagner S., Sowka S., Mayer C., Cramer R., Focke M., Kurup V., Scheiner O., Breiteneder H.: Identification of a *Hevea brasiliensis* latex manganese superoxide dismutase (Hev b10) as a cross - reactive allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125: 120 - 27.
24. Sánchez - Monge R., Blanco C., Perales A. D., Collada C., Carrillo T., Aragoncillo C., Salcedo G.: Class I chitinases, the panallergens responsible for the latex - fruit syndrome, are induced by ethylene treatment and inactivated by heating. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 90 - 5.

Czy immunoterapia swoista pyłkowicy wpływa na tolerancję pokarmów reagujących krzyżowo?

Joanna Nizio - Mąsior
Nexter/Allergopharma

Współistnienie krzyżowej alergii pokarmowej z objawami pyłkowicy jest częstym problemem klinicznym. W badaniu kwestionariuszowym Bircher i wsp. oceniono, że 39% pacjentów z objawami alergii na pyłki roślin zgłasza dolegliwości alergiczne po spożyciu 1 lub więcej owocu/warzywa reagującego krzyżowo [1]. W najnowszej pracy Osterballe prawdopodobieństwo krzyżowej alergii pokarmowej w poszczególnych grupach chorych z pyłkowicą oceniano następująco: 24% - uczuleni na pyłek brzozy, 4% - trawy, 10% - bylica, 35% - brzoza + trawy, 52% - brzoza + trawy + bylica. Średnie prawdopodobieństwo dla całej badanej grupy wyniosło 30% [2]. Przebieg omawianej alergii pokarmowej jest na ogół łagodny i ogranicza się do tzw. zespołu alergii jamy ustnej (*oral allergy syndrome* – OAS). Jedyną uznaną metodą leczenia OAS jest unikanie wywołującego pokarmu, co w przypadku alergii poliwalentnej jest dość uciążliwe dla pacjenta. Przy kwalifikacji do immunoterapii swoistej alergenami wziewnymi nieuniknione jest więc pytanie, jakie są szanse na złagodzenie objawów alergii pokarmowej. Niestety, odpowiedź nie jest jednoznaczna i, jak przekonuje zamieszczony poniżej przegląd opublikowanych badań klinicznych, słabo udokumentowana.

Zdecydowana większość publikacji dowodzi korzystnego wpływu immunoterapii na przebieg zespołu OAS. W poszczególnych badaniach obserwuje się jednak duże różnice odsetka pacjentów, u których odnotowano złagodzenie objawów alergii pokarmowej (od 53% do 93% odczulanych, przeważnie poniżej 60%). Efekt ten jest z pewnością słabszy niż wpływ immunoterapii na objawy pyłkowicy (poprawa u ponad 80% odczulanych). Jakże mogą być przyczyny tak dużej heterogenności wyników?

Istnieją duże różnice w metodologii poszczególnych badań, które mogą obejmować zróżnicowane grupy pacjentów

(np. alergia mono - lub poliwalentna), ocenę OAS w próbie prowokacyjnej lub tylko na podstawie wywiadu i subiektywnych odczuć pacjenta. Brakuje badań z podwójnie ślepą próbą i kontrolą placebo.

Złagodzenie objawów alergii jamy ustnej miało być dodatkowym efektem immunoterapii alergii wziewnej. Nie prowadzono więc diagnostyki i kwalifikacji pod kątem OAS. Alergeny główne wywołujące objawy ze strony dróg oddechowych (np. Bet v1 i homologi, Phl p5) są dobrze scharakteryzowane, dostępne w wyciągach do testów punktowych i dobrej jakości szczepionkach alergenowych, gdzie dawkę podtrzymującą określają standardy WHO.

Objawy OAS wywołują najczęściej homologi Bet v1 zawarte w jabłku (Mal d1), orzechach (Cor a1) lub innych pokarmach. Istnieje jednak grupa pacjentów, u których przyczyną krzyżowej alergii pokarmowej jest profilina (Bet v2), podejrzewa się też udział innych alergenów minor pyłku brzozy (Bet v5,6,8). Ustalenie alergenu wywołującego objawy nadwrażliwości pokarmowej jest bardzo trudne w codziennej praktyce klinicznej. Istnieją co prawda zestawy ELISA do oznaczeń swoistych alergenowo IgE dla Bet v 1 i 2 w surowicy, ale obecność przeciwciał, zwłaszcza dla profiliny, nie jest jednoznaczna z tym, że wywołuje ona objawy. Próbowano więc określić, jakie cechy kliniczne ma grupa pacjentów z objawami OAS wywołanymi przez homologi Bet v 1 (objawy głównie po spożyciu jabłek i orzechów) i przez profilinę (objawy występujące często po spożyciu banana, cytrusów, pomidorów lub melona). [14] Można przypuszczać, że efekty SIT w pierwszej grupie będą lepsze, ponieważ są dostępne szczepionki o standaryzowanej, wysokiej zawartości Bet v 1 w dawce podtrzymującej. Zawartość profiliny nie jest natomiast oznaczana i – jako alergenu minor – może być zbyt niska do złagodzenia ob-

Przegląd opublikowanych badań klinicznych, w których analizowano wpływ immunoterapii swoistej na objawy zespołu alergii jamy ustnej (OAS) (1)

Grupa badana	Rodzaj badania, metoda oceny alergii pokarmowej	Szczepionka alergenowa*	Czas trwania SIT	Wyniki	Pierwszy autor, rok publikacji
1	2	3	4	5	6
72 dzieci w wieku 6-16 lat (śr. 11,8) z objawami <i>rhinoconjunctivitis</i> wywołanymi alergią na pyłek brzozy, u 93% obj. OAS wywoł. głównie jabłkiem i/lub orzechami	Próba podwójnie ślepa, częściowo z placebo Ocena OAS - wywiad	Grupa A (20) – wyciąg pyłku brzozy s.c. Grupa B (22) – brzoza/olcha/leszczyna s.c. Grupa C (14) – wyciąg pyłku brzozy p.os. Grupa D (16) – placebo p.os.	SIT s.c. – 3 lata (ocena objawów OAS po 1 roku) SIT p.os. – 10 miesięcy	Istotne zmniejszenie obj. pyłkowicy w grupach A, B. ↓ obj. OAS u 46% odczulanych s.c., 21% p.os. i 14% w grupie placebo, ale wg autorów różnica nieistotna statyst.	Möller C., 1989 [3]
40 pacjentów uczulonych na pyłek drzew, u 78% obj. OAS wywoł. głównie jabłkiem i/lub orzechami	Obserwacyjne. Ocena OAS – otwarta próba prowokacyjna	Grupa I – wyciąg pyłku brzozy Grupa II – wyciąg pyłku olchy/leszczyny/grabu/dębu	3 lata przedsezonowo	Istotne zmniejszenie obj. pyłkowicy. ↓ lub ustąpienie obj. OAS u 53% uczulonych na pokarmy. U 4 osób rozwój OAS w trakcie SIT.	Henzgen M., 1991 [4]
20 dorosłych uczulonych na pyłek drzew, u 60% alergią na jabłko, orzechy i/lub inne owoce	1. rok DBPC, potem obie grupy aktywny preparat Ocena OAS - wywiad	Novo-Helisen Depot Brzoza/Olcha/Leszczyna	3 lata	Istotne zmniejszenie obj. pyłkowicy. ↓ obj. OAS u 9/12 pacjentów (75%). U 4 osób z pyłkowicą rozwój OAS w trakcie SIT.	Henzgen M., 1994 [5]
20 dorosłych uczulonych na pyłek drzew, w tym 16 z obj. OAS wywoł. gł. przez jabłko	Obserwacyjne. Ocena OAS - wywiad	Novo-Helisen Depot Brzoza/Olcha/Leszczyna	2 lub 3 lata przedsezonowo	Istotne zmniejszenie obj. pyłkowicy. ↓ obj. OAS u 56%. U 3 osób rozwój alergii pokarmowej w trakcie SIT.	Herrmann D., 1995 [6]

Przegląd opublikowanych badań klinicznych, w których analizowano wpływ immunoterapii swoistej na objawy zespołu alergii jamy ustnej (OAS) (2)

1	2	3	4	5	6
49 dorosłych uczulonych na pyłek brzozy i jabłko.	Grupa kontrolna – 26 osób bez SIT. Ocena OAS – otwarta próba prowokacyjna	Novo-Helisen Depot lub Alhydrox (Bayer) Brzoza 100%	1, 2 lub 3 lata całorocznie	Znaczna redukcja lub ustąpienie obj. OAS u 84% pacj. już po roku SIT. Ø poprawy w gr. kontrolnej.	Asero R., 1998 [7]
15 dorosłych uczulonych na pyłek brzozy i jabłko.	Obserwacyjne. Ocena OAS – otwarta próba prowokacyjna	Allergovit Brzoza 100%	2 lata przedsezonowo	Redukcja obj. pyłkowicy u 87% pacjentów. ↓ obj. OAS u 60% odczulanych.	Henzgen M., 1999 [8]
27 pacjentów w wieku 11-41 lat uczulonych na pyłek brzozy ± olchy i/ lub leszczyny z obj. OAS po jabłku	Grupa kontrolna – 8 osób bez SIT. Ocena OAS – otwarta próba prowokacyjna	21 pacjentów: Novo-Helisen Depot Brzoza 100% lub Brzoza/Oлча/Leschczyna 6 pacjentów: Phostal Brzoza/Oлча/Leschczyna/Grab	2 lub 3 lata całorocznie	Redukcja obj. nosowych pyłkowicy u 89%, obj. spojówkowych u 74% pacjentów. ↓ obj. OAS u 59% odczulanych.	Modrzyński M., 2002 [9]
72 pacjentów z pyłkowicą, przeważnie poliwalentną, w wieku 14-59 lat (śr. 32,5), obj. OAS najczęściej po spożyciu jabłek, orzechów, brzoźskwiń, moreli i migdałów	Grupa kontrolna – 40 osób bez SIT. Ocena OAS – wywiad	Novo-Helisen Depot lub Alutard SQ o składach: 68 – Brzoza 100% lub Brzoza/Oлча/Leschczyna, 57 – Trawy 100%, 14 – Bylica 100%. Tylko 17 pacjentów otrzymało 1 szczepionkę.	Średnio 2 lata całorocznie	Objawy OAS w grupie SIT: 53% - poprawa, 32% - bez zmian, 15% - pogorszenie. Grupa kontrolna: 8% - poprawa, 50% bez zmian, 42% - pogorszenie. Poprawie sprzyjały: wiek > 20 lat, alergia na brzoźkę, duże nasilenie OAS. Niepowodzenia częściej przy odczulaniu na brzoźę i trawę.	Baumann K., 2002 [10]

Przegląd opublikowanych badań klinicznych, w których analizowano wpływ immunoterapii swoistej na objawy zespołu alergii jamy ustnej (OAS) (3)

1	2	3	4	5	6
13 dorosłych uczulonych na pyłek brzozy i jabłko.	Grupa kontrolna – 12 osób bez SIT. Ocena OAS – DBPCFC	Alutard SQ Brzoza 100%	1 rok metodą klasterową	Grupa SIT: poprawa – 70%, ustąpienie obj. OAS – 23%, grupa kontrolna: 90% - bez zmian lub pogorszenie, 1 pacjent nie zgodził się na prowokację.	Bolhaar S., 2004 [11]
15 dorosłych uczulonych m.in. na pyłek brzozy oraz jabłko lub orzechy laskowe	Grupa kontrolna – 12 osób bez SIT. Ocena OAS – otwarta próba prowokacyjna	Alutard SQ o składach: 9 – Brzoza/Olcha/Leszczyna, 3 – Brzoza/Olcha/Leszczyna/Je- sion, 2 – Brzoza/Trawy/Żyto, 1 – Brzoza 100%	Średnio 18 m-cy całorocznie	Redukcja obj. pyłkowicy. W grupie SIT 87% tolerowało istotnie większą ilość jabłka (32,6g w por. do 12,6g) lub orzechów. W gr. kontrolnej istotny spadek tolerowanej ilości z 9,8g do 8,5g jabłka, tylko u 1 osoby poprawa.	Bucher X., 2004 [12]
40 dorosłych pacjentów uczulonych na pyłek brzozy, u ok. 70% alergii na orzechy i/lub jabłko	Badanie podwójnie zaślepienie i podwójnie maskowane. Ocena OAS – otwarta próba prowokacyjna z jabłkiem	Phostal (SCIT) / Staloral (SLIT) Brzoza 100% vs placebo	2 lata całorocznie	Redukcja obj. pyłkowicy w grupach aktywnie leczonych. Dodania próba prowokacyjna z jabłkiem przed SIT u 10 (SCIT), 4 (SLIT), 10 (placebo) pacjentów, po SIT u 9, 6, 8. Spadek score objawów w trakcie próby we wszystkich grupach, istotny tylko po placebo.	Hansen KS., 2004 [13]

*W niektórych publikacjach nie podano nazwy szczepionki lub stosowano ekstrakt przygotowany wyłącznie na potrzeby badania.

jawów wywoływanych swoiście przez ten alergen. Współistniejące uczulenie na pokarmy, które mają być markerami alergii na profilinę odnotowało dwóch autorów omawianych prac [3, 10].

Według Baumann niepowodzenia w redukcji objawów OAS obserwowano częściej u pacjentów z alergią poliwalentną (na pyłek brzozy i traw), u których jest też większe prawdopodobieństwo współistnienia istotnej klinicznie alergii na profilinę [10].

Według Asero największe szanse na złagodzenie zespołu OAS mają pacjenci z alergią monowalentną na pyłek brzozy, nadwrażliwością pokarmową głównie na jabłko, odczulani szczepionką o wysokiej zawartości Bet v 1 w dawce podtrzymującej, którą należy podawać całorocznie [15]. Dla porównania dawka podtrzymująca szczepionki Alutard SQ (Brzoza 100%) zawiera 12,3 µg, Novo - Helisen Depot 20 µg, a Phostal 3,28 µg Bet v1 [15, 16].

Efektym ubocznym stosowania immunoterapii pełnym wyciągiem pyłku brzozy może być indukcja nowego uczulenia na alergeny zawarte w szczepionce, na które chory nie był dotychczas uczulony. Szczegółową analizę tego zagadnienia przeprowadził Moverare.

W opublikowanym przez niego badaniu obserwowano surowicze miana sIgE dla rBet v2 i rBet v4 w grupie 39 pacjentów z objawami alergii dróg oddechowych wywołanymi przez pyłek brzozy. 24 osoby poddano immunoterapii swoistej szczepionką Alutard SQ (Brzoza 100%), pozostałych 15 stanowiło grupę kontrolną. Przed rozpoczęciem SIT u wszystkich badanych stwierdzono w surowicy obecność sIgE dla rBet v1, u 3 osób dla rBet v2 i/lub rBet v4. Po 3 latach obserwacji wykryto sIgE dla 1 lub 2 alergenów minor pyłku brzozy u 29% odczulanych pacjentów. We wszystkich przypadkach miana przeciwciał były niskie (< 1, 0 IU/ml) i nie pociągały za sobą rozwoju nowych objawów klinicznych [17].

W analogicznej obserwacji Modrzyński stwierdził już po 6 miesiącach podawania wyciągu pyłku brzozy lub drzew brzozowatych indukcję sIgE dla Bet v2 u 3 z 12 odczulanych pacjentów, z których jeden zaczął zgłaszać kliniczne objawy OAS [18].

Rozwój nowych przypadków alergii jamy ustnej w trakcie immunoterapii pyłkowicy odnotowali też autorzy wcześniejszych doniesień [4, 5, 6]. Niemniej jednak brak szczegółowej diagnostyki w kierunku uczulenia na alergeny pyłku brzozy nie pozwalał na jednoznaczną kwalifikację tych przypadków jako uczuleń indukowanych przez szczepionkę, a nie wynikających z naturalnego przebiegu choroby.



Całkowitą eliminację ryzyka rozwoju nowych uczuleń po podaniu szczepionki alergenowej może przynieść dopiero prowadzenie indywidualizowanej terapii opartej na komponentach ekstraktów (*component resolved immunotherapy* – CRIT), poprzedzonej adekwatnym postępowaniem diagnostycznym. Umożliwią ją rekombinowane alergeny, które w najbliższych latach zapewne wejdą do codziennej praktyki klinicznej [19].

Do tego czasu pozostają do dyspozycji tradycyjne szczepionki, których niewątpliwą zaletą jest udokumentowana zdolność prewencji uczuleń na nowe, nieobecne w szczepionce, grupy alergenów.

Odrębny problem stanowi trwałość korzystnego wpływu immunoterapii na objawy OAS. Trwały efekt odczulania alergenami wziewnymi jest potwierdzony w wielu wypadkach nawet w okresie 6 lat po odstawieniu szczepionki [20]. W jedynej opublikowanej dotychczas na ten temat pracy dotyczącej OAS obserwowano grupę 30 dorosłych uczulonych na pyłek brzozy i jabłko, u któ-

rych odnotowano całkowite ustąpienie objawów alergii jamy ustnej po 3 latach całorocznej immunoterapii szczepionką Novo-Helisen Depot Brzoza 100%. Pacjenci włączyli jabłko do codziennej diety. Nawrót objawów alergii jamy ustnej wystąpił u 3 osób już po 6 miesiącach obserwacji, u 4 po 18 miesiącach. Niestety, nie wszyscy pacjenci zgłaszali się na badania kontrolne, niemniej jednak po 42 miesiącach obserwacji częstość OAS (48%) zbliżyła się do obserwowanej w grupie kontrolnej 57 osób uczulonych na pyłek brzozy. W grupie tej 44% pacjentów zgłosiło alergię jamy ustnej średnio po 12 miesiącach obserwacji [21].

Podsumowanie

1. Immunoterapia swoista alergenami wziewnymi, szczególnie wyciągiem

pyłku brzozy, może mieć korzystny wpływ na współistniejące objawy alergii jamy ustnej.

2. Redukcja objawów OAS jest na ogół słabsza i prawdopodobnie mniej trwała niż korzystny wpływ immunoterapii na nasilenie *rhinoconjunctivitis*.
3. Dalszych badań wymaga ocena, na ile SIT tradycyjnymi szczepionkami zapobiega nowym przypadkom OAS u pacjentów z pyłkowicą oraz progresji już rozwiniętej alergii jamy ustnej, a na ile może przyczynić się do rozwoju nowych uczuleń.
4. Należy spodziewać się znaczącego postępu w diagnostyce i immunoterapii alergii krzyżowych po wprowadzeniu do praktyki klinicznej alergenów rekombinowanych.

Literatura

1. Bircher A. J., Van Melle G., Haller E. i wsp. IgE to food allergens are highly prevalent in patients allergic to pollens, with and without symptoms of food allergy. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 367 - 374.
2. Osterballe M., Hansen T. K., Mortz C. G. i wsp.: The clinical relevance of sensitization to pollen - related fruits and vegetables in unselected pollen - sensitized adults. *Allergy* 2005; 60: 218 - 225.
3. Möller C.: Effect of pollen immunotherapy on food hypersensitivity in children with birch pollinosis. *Ann Allergy* 1989; 62: 343 - 345.
4. Henzgen M., Schlenvoigt G., Diener C. i wsp.: Nahrungsmittelallergie bei Frühblüherpollinosis und deren Beeinflussung mittels Hyposensibilisierung. *Allergologie* 1991; 14: 90 - 94.
5. Henzgen M., Frank E., Herrmann D.: Der Einfluß der Hyposensibilisierung bei Baumpollenallergie auf assoziierte Nahrungsmittelunverträglichkeiten. – Teil I *Allergologie* 1994; 17: 50 - 54.
6. Herrmann D., Henzgen M., Frank E., i wsp.: Effect of hyposensitization for tree pollinosis on associated apple allergy. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1995; 5(5): 259 - 267.
7. Asero R.: Effects of birch pollen - specific immunotherapy on apple allergy in birch pollen - hypersensitive patients. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 1368 - 1373.
8. Henzgen M., Rudeschko O., Schlenvoigt G. i wsp.: Immunparameter der Apfelallergie unter Hyposensibilisierung mit Birkenpollen. *Allergologie* 1999; 22: 655 - 664.
9. Modrzyński M., Zawisza E., Rapiejko P. i wsp.: Immunoterapia swoista w leczeniu zespołu alergii jamy ustnej u chorych uczulonych na pyłki drzew. *Przegl Lek* 2002; 59: 1007 - 1010.
10. Baumann K., Roessier F., Müllner G. i wsp.: Einfluß der spezifischen, subkutanen Immuntherapie mit Pollenextrakten auf die assoziierte Nahrungsmittelallergie. *Allergologie* 2002; 25: 326 - 332.
11. Bolhaar S. T. H. P., Tiemessen M. M., Zuidmeer L. i wsp.: Efficacy of birch - pollen immunotherapy on cross - reactive food allergy confirmed by skin tests and double - blind food challenges. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 761 - 769.
12. Bucher X., Pichler W. J., Dahinden C. A. i wsp.: Effect of tree pollen specific, subcutaneous immunotherapy on the oral allergy syndrome to apple and hazelnut. *Allergy* 2004; 59: 1272 - 1276.
13. Hansen K. S., Khinchi M. S., Skov P. S. i wsp. Food allergy to apple and specific immunotherapy with birch pollen. *Mol Nutr Food Res* 2004; 48(6): 441 - 8.
14. Asero R., Mistrello G., Roncarolo D. i wsp. Detection of clinical markers of sensitization to profilin in patients allergic to plant - derived foods. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 427 - 32.
15. Asero R.: Effects of birch pollen SIT on apple allergy: a matter of dosage? *Allergy* 2004; 59: 1269 - 1271.
16. Khinchi M. S., Poulsen L. K., Carat F. i wsp. Die klinische Wirksamkeit der sublingualen und subkutanen birkenpollenallergenspezifischen Immuntherapie. *Allergologie* 2004; 27: 355 - 366.
17. Movérare R., Elfman L., Vesterinen E., i wsp.: Development of new IgE specificities to allergenic components in birch pollen extract during specific immunotherapy studied with immunoblotting and Pharmacia CAP System™. *Allergy* 2002; 57: 423 - 430.
18. Modrzyński M., Zawisza E. Rozwój nowych uczuleń na składniki alergenowe pyłku brzozy w trakcie immunoterapii swoistej. *Przegl Lek* 2003; 60: 130 - 132.
19. Jutel M. Alergeny rekombinowane – przełom w diagnostyce i terapii chorób alergicznych. *Alergologia Współczesna* 2004; 14: 2 - 8.
20. Eng P. A., Reinhold M., Gnehm H. P. E. Long - term efficacy of preseasonal grass pollen immunotherapy in children. *Allergy* 2002; 57: 306 - 312.
21. Asero R.: How long does the effect of birch pollen injection SIT on apple allergy last? *Allergy* 2003; 58: 435 - 438.

Aktualne znaczenie immunoterapii podjęzykowej w leczeniu chorób alergicznych*

Wstęp

Przyczyną sformułowania niniejszego stanowiska na temat immunoterapii podjęzykowej (SLIT) [4, 10, 14] jest jej rosnący udział w terapii schorzeń alergicznych dróg oddechowych, przy braku dostępnych zaleceń z niemieckiego obszaru językowego. Stanowisko opiera się na kontrolowanych badaniach i metaanalizach, opublikowanych do kwietnia 2004 r. [10, 14]. Wnioski są często sprzeczne ze standardami europejskimi i międzynarodowymi [2], ponieważ grupa ekspertów po starannym sprawdzeniu i przedyskutowaniu dostępnych prac oryginalnych nie we wszystkich przypadkach zgadzała się z opublikowanymi na ich temat ocenami. Argumenty, ich uzasadnienie i krytyczne wnioski na temat SLIT powinny pomóc alergologom praktykom lepiej ocenić możliwości i ograniczenia tej metody w leczeniu chorób alergicznych dróg oddechowych. Autorzy chcą zainicjować konstruktywną dyskusję na temat SLIT.

Mechanizmy działania i skuteczność

Dane na temat wpływu SLIT na układ immunologiczny są sprzeczne. Nie wykazano jednolitych lub powtarzalnych zmian, toteż mechanizm immunologiczny działania SLIT nie jest wyjaśniony. Niewykluczone, że parametry miejscowej odpowiedzi immunologicznej są w tym przypadku bardziej przydatne do badań nad mechanizmami.

Skuteczność kliniczną SLIT ocenia się w licznych badaniach klinicznych. Oprócz wyników pozytywnych opublikowano też badania negatywne, tak więc dostępne dane są heterogenne [10, 14]. Na brak jednolitych wyników badań na temat SLIT wpływa szereg czynników metodycznych:

- w wielu badaniach, szczególnie dotyczących alergenów sezonowych, brak jest fazy wstępnej obserwacji (*run-in*),
- krótki czas trwania wielu badań

(tylko kilka miesięcy lub tylko jeden sezon pylenia),

- niewystarczająca charakterystyka pacjentów (*rhinitis* i/lub astma),
- niewystarczająca stratyfikacja w fazie randomizacji,
- niedostateczne zdefiniowanie planowanych celów leczenia (kryteria główne i pomocnicze),
- brak pomiarów ekspozycji alergicznej (np. narażenia na roztocza kurzu domowego),
- różnice dawki alergenu pomiędzy badanymi roztworami, nawet rzędu 10^3 (np. w pomiarze zawartości alergenu głównego) [8] vs. [12].

SLIT w alergicznym zapaleniu błony śluzowej nosa

W metaanalizie Cochrane obejmującej 22 kontrolowane badania kliniczne stwierdzono słaby lub umiarkowany wpływ na *score* objawów alergicznego zapalenia błony śluzowej nosa (SMD – 0, 34; wyjaśnienia patrz (Tab.1) oraz *score* zużycia leków (SMD – 0, 43) [14]. Obserwowano duży rozrzut wyników (istotną heterogenność). Szczegółowa analiza ujawniła, że w grupie dorosłych SLIT alergenami pyłku traw lub parietarii stosowana przez 6 miesięcy lub krócej okazała się skuteczniejsza niż podawanie placebo (Tab. 1). Z powodu braku odpowiednich informacji nie udało się skorelować podawanej dawki alergenu (np. określonej na podstawie zawartości alergenu głównego) z wynikami klinicznymi poszczególnych badań.

Ze względu na umiarkowaną skuteczność i niejednolite wyniki badań zaleca się różnicowanie wskazań do włączenia SLIT w rutynowym leczeniu alergicznego zapalenia błony śluzowej nosa.

SLIT w alergicznej astmie oskrzelowej

W porównaniu do liczby badań na temat alergicznego zapalenia błony śluzowej nosa, dane dotyczące SLIT w leczeniu astmy oskrzelowej są skąpe [14], przeważnie dotyczą pacjentów, którzy oprócz objawów *rhinitis* uskarżali się

J. Kleine - Tebbe,
K. - C. Bergmann,
A. Bufe,
F. Friedrich s,
Th. Fuchs,
Th. Hirsch,
L. Klimek,
U. Lepp,
B. Przybilla,
J. Rakoski,
W. Rebien,
J. Saloga,
G. Schultze -
Werninghaus,
J. - C. Virchow

* Zapis dyskusji ekspertów, która odbyła się 3 maja 2004r. w Instytucie Paula Ehrlicha w Langen (Niemcy). Opublikowano równocześnie w *Allergologie* 2004; 27: 381-384 oraz *Pediatric Allergy in Clinic and Practice* 2004; 7: 18 - 21.

na astmę. Celowane badania skuteczności SLIT w astmie prowadzono sporadycznie. Ich wyniki nie są jednoznaczne, wobec czego SLIT w przypadku astmy należy stosować bardzo powściągliwie. Obraz działań niepożądanych u pacjentów z alergiczną astmą oskrzelową nie różni się od grupy z alergicznym zapaleniem błony śluzowej nosa (patrz poniżej).

Tab. 1

Metaanaliza badań nt. SLIT w alergicznym zapaleniu błony śluzowej nosa [14]

Liczba ocenianych pacjentów [n]							
SLIT (n)			Placebo (n)		Efekt kliniczny		
Objawy		Leki	Objawy	Leki	Score objawów	Score leków	
Sezon	sezonowe	346		344		- 0. 30	- 0. 36
	całoroczne	138	(59)	131	(5)	n. s.	n. s.
Wiek	dorośli	373	(34)	368	(338)	- 0. 40	- 0. 51
	dzieci	111	(62)	107	(60)	n. s.	n. s.
Czas	< 6 miesięcy	183	(163)	175	(154)	- 0. 36	- 0. 63
	6 - 12 mies.	193	(178)	195	(180)	n. s.	n. s.
	> 12 mies.	108	(64)	105	(64)	n. s.	n. s.
Alergeny	trawy	144		143		- 0. 37	- 0. 41
	parietaria	79		83		n. s.	- 0. 39
	HDM	118	(59)	110	(54)	n. s.	n. s.

Efekt kliniczny mierzono jako „standaryzowaną średnią różnicę” (SMD): - 0. 2, słaby efekt; - 0. 5, średni efekt; - 0. 8, silny efekt (w każdym przypadku porównanie verum do placebo). - - n. s.: brak istotnej różnicy pomiędzy verum i placebo. HDM: roztocza kurzu domowego (*D. pteronyssinus* i *D. farinae*)

Odrębności SLIT u dzieci

Oprócz badań uwzględnionych w cytowanych powyżej pracach poglądowych [10, 14], od roku 2003 dostępne są 4 dalsze badania na temat SLIT u dzieci; wykazują one mniej braków metodycznych w porównaniu z wcześniejszymi doniesieniami (takich jak brak wstępnej obserwacji w przypadku alergenów sezonowych) i obejmują istotnie większe grupy dzieci [3, 6, 12, 13].

Jest więc dostępna baza danych, która pozwala na formułowanie zaleceń terapeutycznych. Znajduje się w niej wiele badań ze słabymi efektami cząstkowymi w podgrupach, w wybranych punktach czasowych lub w odniesieniu do ocenianych wybiórczo kryteriów klinicznych, nie ma natomiast ani jednego badania, które przekonująco dokumentuje istotną klinicznie skuteczność SLIT u dzieci [13].

W opinii autorów stosowanie SLIT u dzieci, poza kontrolowanymi badaniami, nie jest obecnie zalecane.

Ocena SLIT w porównaniu do podskórnej immunoterapii swoistej (SIT)

Dotychczas opublikowano tylko jedno wiarygodne randomizowane, kontrolowane placebo, podwójnie maskowane (*double-dummy*) badanie porównujące SLIT i immunoterapię podskórną (SIT) [7].

W badanych grupach pacjentów uczulonych na pyłek brzozy wykazano po roku leczenia obiema metodami immunoterapii istotne zmniejszenie nasilenia objawów i zużycia leków w porównaniu do grupy otrzymującej placebo. Nie stwierdzono istotnej różnicy pomiędzy SLIT i SIT pod względem *score* objawów i zużycia leków w sezonie pylenia brzozy. Z przedstawionych w pracy wyników wynika, że oba wskaźniki były niższe w grupie leczonej SIT. Drugi rok obserwacji, w którym zapotrzebowanie na leki było wyższe u pacjentów odczulanych SLIT, nie został oceniony z powodu niskiego stężenia pyłku brzozy. Autorzy publikacji podkreślają, że brak istotnej statystycznie różnicy wyników SLIT i SIT nie przesądza o identycznej skuteczności, ponieważ dla udokumentowania różnicy należy przebadać większe grupy pacjentów [7].

W przeciwieństwie do SIT [5], długotrwały efekt SLIT nie znajduje wystarczającego potwierdzenia w przeprowadzonych badaniach.

Tab. 2 Problemy SLIT wymagające wyjaśnienia. Według [14] – zmodyfikowane

1. Optymalna dawka podtrzymująca i kumulacyjna, częstość podawania i czas trwania leczenia.
2. Identyczny schemat dla wszystkich alergenów? Sezonowo czy całorocznie?
3. Poprawa kliniczna w bezpośrednim porównaniu do SIT podskórnej.
4. Modyfikacja odpowiedzi immunologicznej przez SLIT? Długotrwały efekt terapeutyczny. Przebieg choroby po zakończeniu leczenia.
5. Compliance w badaniach kontrolowanych w porównaniu do rutynowego stosowania w domu przez 2 lub 3 lata.
6. Przyczyny braku dotychczas udokumentowanej skuteczności u dzieci.
7. Ze względu na atrakcyjny sposób podania u dzieci, pożądane dalsze badania w tej grupie wiekowej.

Bezpieczeństwo SLIT

Udokumentowaną tolerancję szczepionek podjęzykowych można określić jako dobrą; obserwowano jedynie zależne od dawki, przeważnie łagodne, reakcje śluzówkowe. Dotychczasowe doświadczenia wskazują na wyraźnie mniejsze ryzyko ciężkich działań niepożądanych w trakcie SLIT [9] w porównaniu do SIT.

Dostępne wyciągi alergenowe do odczulania podjęzykowego nie mają rejestracji w Niemczech*, są to preparaty indywidualne, podobnie jak część ekstraktów do immunoterapii podskórnej. Istnieją jednak również zarejestrowane szczepionki do SIT. W myśl zaleceń Komisji Leków Niemieckiego Towarzystwa Lekarskiego, prowadzenie immunoterapii wyciągami alergenów należy do zadań lekarza. Z formalnego punktu widzenia SLIT obciąża lekarza zlecającego większym ryzykiem odpowiedzialności prawnej, ponieważ szczepionka przyjmowana jest przez pacjenta w domu, bez nadzoru lekarskiego.

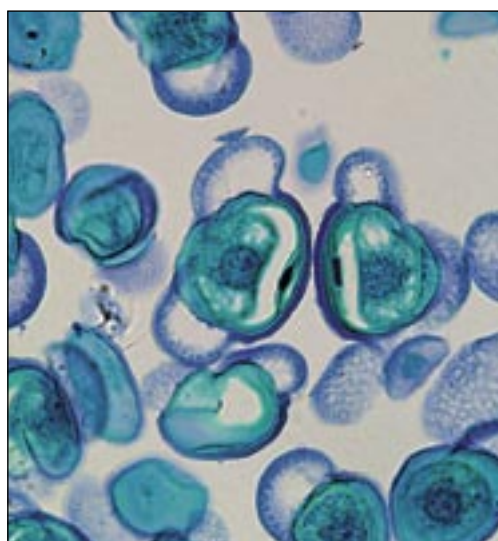
Wnioski końcowe i perspektywy

Opublikowane dotychczas badania kliniczne na temat SLIT różnią się co do metodyki i uzyskanych wyników. Ta heterogenność wyników z jednej strony, a z drugiej brak zgodności udokumentowanych parametrów skuteczności utrudniają ocenę znaczenia SLIT w leczeniu schorzeń alergicznych dróg oddechowych. Metaanaliza wykazuje istotny, ale tylko słaby do umiarkowanego efekt kliniczny SLIT w po-

równaniu do placebo w leczeniu alergicznego (wyłącznie pyłkowego) zapalenia błony śluzowej nosa u dorosłych.

Natomiast w astmie oskrzelowej u doro-

ślących i w chorobach alergicznych dróg oddechowych wieku dziecięcego nie udokumentowano na razie wystarczającej skuteczności. Tak więc potencjalnymi kandydatami do SLIT są dorośli pacjenci z alergicznym, pyłkowym zapaleniem błony śluzowej nosa i spojówek, którzy nie decydują się na immunoter-



pię podskórną lub mają działania niepożądane po iniekcjach. U dzieci, z powodu braku dowodów skuteczności, nie należy włączać SLIT, by nie tracić czasu i jak najwcześniej rozpocząć skuteczne leczenie szczepionką podskórną.

Z punktu widzenia grupy ekspertów bez odpowiedzi pozostają istotne pytania dotyczące skuteczności, bezpieczeństwa i przydatności w praktyce klinicznej (Tab. 2). Dopóki nie rozwieje się wszelkich wątpliwości, nie można traktować SLIT jako równorzędnego od-

*Po opublikowaniu artykułu zarejestrowano w Niemczech 2 preparaty do SLIT.

powiednika SIT. Wytwórcom szczepionek do SLIT zaleca się w przyszłości zasięganie opinii Instytutu Paula Ehrlicha w kwestii optymalnego sformułowania protokołu badania [11].

Niniejsza ocena SLIT różni się od stanowiska innych europejskich alergologów [2, 4] i powinna stanowić podstawę do dalszej dyskusji tego bardzo aktualnego tematu. Niewielkie działania

niepożądane SLIT i przyjazny dla pacjenta sposób podania w porównaniu do SIT stanowią dobre argumenty do dalszych badań nad indukcją tolerancji przez podawanie alergenów podjęzykowo. Przyszły rozwój SLIT z pewnością dostarczy wielu obiecujących możliwości leczenia schorzeń alergicznych, co znacząco wzbogaci arsenał terapeutyczny współczesnej alergologii.

Literatura

1. Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft. Hyposensibilisierung - Indikationen, Kontraindikationen, unerwünschte Wirkungen. Dtsch Ärztebl 1997; 94: A330 - 1.
2. Bousquet J., Van Cauwenberge P., Khaltaev N.: Allergic rhinitis and its impact on asthma. J Allergy Clin Immunol 2001; 108: S147 - 334.
3. Bufe A., Ziegler - Kirbach E., Stoeckmann E., Heidemann P., Gehlhar K., Holland - Letz T., Braun W. Efficacy of sublingual swallow immunotherapy in children with severe grass pollen allergic symptoms: a double - blind placebo - controlled study. Allergy 2004; 59: 498 - 504.
4. Canonica G.W., Passalacqua G.. Noninjection routes for immunotherapy. J. Allergy Clin Immunol 2003; 111: 437 - 48; quiz 449.
5. Durham S.R., Walker S.M., Varga E.M., Jacobson M.R., O'Brien F., Noble W., Till S.J., Hamid Q.A., Nouri - Aria K.T., Long - term clinical efficacy of grass - pollen immunotherapy. N Engl J. Med 1999; 341: 468 - 75.
6. Ippoliti F., De Santis W., Volterrani A., Lenti L., Canitano N., Lucarelli S., Frediani T., Immuno - modulation during sublingual therapy in allergic children. Pediatr Allergy Immunol 2003; 14: 216 - 21.
7. Khinchi M.S., Poulsen L.K., Carat F., Andre C., Hansen A.B., Mallng H.J., Clinical efficacy of sublingual and subcutaneous birch pollen allergen - specific immunotherapy: a randomized, placebo - controlled, double - blind, double - dummy study. Allergy 2004; 59: 45 - 53.
8. La Rosa M., Ranno C., Andre C., Carat F., Tosca M.A., Canonica G.W., Double - blind placebo - controlled evaluation of sublingual - swallow immunotherapy with standardized Parietaria judaica extract in children with allergic rhinoconjunctivitis. J. Allergy Clin Immunol 1999; 104: 425 - 32.
9. Lüderitz - Püchel U., Keller - Stanislawski B., Haustein D., Neubewertung des Risikos von Test - und Therapieallergenen. Eine Analyse der UAW - Meldungen von 1991 bis 2000. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 2001; 44: 709 - 18.
10. Mallng H.J., Is sublingual immunotherapy clinically effective? Curr Opin Allergy Clin Immunol 2002; 2: 523 - 31.
11. Mallng H.J., Criteria for clinical efficacy - readout and monitoring of clinical studies. Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M 2003; 119 - 23; discussion 123 - 5.
12. Pajno GB., Vita D., Parmiani S., Caminiti L., La Grutta S., Barberio G., Impact of sublingual immunotherapy on seasonal asthma and skin reactivity in children allergic to Parietaria pollen treated with inhaled fluticasone propionate. Clin Exp Allergy 2003; 33: 1641 - 7.
13. Rolinck - Werninghaus C., Wolf H., Liebke C., Baars J.C., Lange J., Kopp M.V., Hammermann J., Leupold W., Bartels P., Gruebl A., Bauer C.P., Schnitker J., Wahn U., Niggemann B., A prospective, randomised, double - blind, placebo - controlled multicentre study on the efficacy and safety of sublingual immunotherapy (SLIT) in children with seasonal allergic rhinoconjunctivitis to grass pollen. Allergy 2004; 59: 1285-93.
14. Wilson D.R., Torres L.I., Durham S.R., Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis. Cochrane Database Syst Rev 2003: CD002893.

**Numery archiwalne
Alergologii Współczesnej
dostępne są na stronie:
<http://www.nexter.pl>**



Komentarz

Przedstawione stanowisko grupy ekspertów niemieckich wpisuje się w prowadzoną ostatnio w środowisku międzynarodowym bardzo poważną dyskusję nt. miejsca immunoterapii podjęzykowej (SLIT) w leczeniu chorób alergicznych. Ponad stuletnia historia immunoterapii wskazuje na konieczność oceny jej skuteczności na podstawie kontrolowanych badań klinicznych z podwójnie ślepą próbą i placebo. Należy pamiętać, że efekt placebo podczas SIT jest bardzo duży i wynosi przeciętnie ok. 30%. Z tego względu w początkowym okresie SIT w pierwszej połowie ub. wieku stosowano „z powodzeniem” głównie immunoterapię doustną, która obecnie jest uznawana za całkowicie nieskuteczną. Obecnie na podstawie licznych kontrolowanych badań klinicznych (zainicjowanych dopiero w latach 60 - tych XX wieku) uznaje się, że prawidłowo prowadzona immunoterapia iniekcyjna (SCIT) jest bardzo skuteczna w leczeniu alergicznego nieżyty nosa i astmy u pacjentów uczulonych na pyłki roślin, roztocze kurzu domowego, sierść i naskórek zwierząt. Metaanaliza wielu badań wskazuje na średnią skuteczność iniekcyjnej SIT mierzoną zmniejszeniem SMS (uśrednionego skoringu objawów i zużycia leków) w porównaniu z grupą placebo o ok. 50% dla alergicznego nieżyty nosa (1) i 40% dla astmy (2). Natomiast zastosowanie SLIT jakkolwiek jest dość powszechne w wielu krajach europejskich (głównie śródziemnomorskich) budzi nadal kontrowersje. Niemal zupełnie nie jest ona stosowana w USA. Eksperti amerykańscy (3) w opublikowanym niedawno stanowisku nie zalecają prowadzenia SLIT. Nieco inaczej przedstawia się stanowisko ekspertów europejskich. W dokumencie WHO z 1998 roku (4), który był pisany z ich decydującym udziałem, uznano na podstawie analizy 7 dostępnych w literaturze kontrolowanych badań, że SLIT może stanowić alternatywę dla SCIT w leczeniu uczulenia na alergeny inhalacyjne. Jednak nie zalecono jej prowadzenia u dzieci ze względu na nie udowodnioną skuteczność kliniczną. Dyskusja, która rozgorzała po wy-

daniu tego dokumentu, spowodowała konieczność napisania dodatkowego wyjaśnienia. W komentarzu z 1999 roku autorzy dokumentu (R. Lockey, J. Bousquet, H.J. Malling) uznali, że nie potwierdzono skuteczności SLIT i wskazywali na konieczność prowadzenia dalszych badań. Podobne stanowisko zawarto w dokumencie ARIA z 2001 roku (5). W przygotowanym do publikacji stanowisku Sekcji Immunoterapii EAACI stwierdzono, że obecnie dysponujemy dobrze udokumentowanymi badaniami potwierdzającymi skuteczność SLIT w leczeniu alergicznego nieżyty nosa u dorosłych. Nadal brak badań u dzieci poza jednym z badań porównujących skuteczność SCIT i SLIT. Ponadto stwierdzono, że mechanizm immunologiczny działania prewencyjnego SLIT oraz jej odległa skuteczność nie zostały dostatecznie udokumentowane. W konsekwencji nie zalecono rutynowego stosowania SLIT u dzieci. Także lokalne środowiska alergologiczne czują się zobowiązane do zajęcia stanowiska nt. celowości zastosowania SLIT. Obok przedstawionego czytelnikom dokumentu niemieckiego bardzo interesujące jest stanowisko ekspertów szwajcarskich opublikowane w 2004 roku w Swiss Medical Forum (6), które bardzo negatywnie ocenia celowość stosowania SLIT.

Jak widać, SLIT nadal wzbudza poważne kontrowersje. Eksperti niemieccy bardzo dokładnie analizują dostępne obecnie informacje na temat SLIT. Z przedstawionych argumentów wyłania się następujący obraz. Jeśli uznać, że SLIT jest nową alternatywą dla SCIT, to jaki jest sens zastosowania tej terapii? Nowa forma leczenia powinna być skuteczniejsza, bezpieczniejsza i łatwiejsza w stosowaniu. Odpowiedź na te pytania nie jest jednoznaczna. Jednakże dostępne dane z badań klinicznych wskazują, że SLIT jest mniej skuteczna od SCIT. W zamian za to jest ona bezpieczniejsza, ponieważ nie opisano ciężkich reakcji systemowych podczas SLIT. Jednak nie jest ona całkowicie wolna od działań ubocznych. Wydaje się, że SLIT jest łatwiejsza w stosowaniu, jednak paradok-

Marek Jutel

Przewodniczący
Grupy Zainteresowań
Swoistą Immunoterapią
Alergenową
Polskiego Towarzystwa
Alergologicznego

salnie niemal wszystkie prace pokazują niski *compliance* (50%), który może wynikać z konieczności samodzielnego podawania leku. W podsumowaniu można obecnie przyjąć, że SLIT stanowi alternatywę dla SCIT w przypadkach, kiedy nie można stosować SCIT np. w związku z lękiem przed iniekcjami lub w razie poważnych działań ubocznych SCIT. Należy jednak pamiętać, że znacznie lepiej udokumentowano sku-

teczność SCIT, a działanie prewencyjne SLIT nie zostało potwierdzone. U dzieci nie ma dostatecznych dowodów skuteczności SLIT. Ponadto obecnie nie ma powszechnie zaakceptowanych standardów SLIT. Dopiero po opracowaniu takich standardów dotyczących m. in. optymalnej kwalifikacji pacjentów, dawki szczepionki, czasu prowadzenia terapii SLIT może stać się wartościową formą leczenia schorzeń alergicznych.

Piśmiennictwo:

1. Malling H.J., Immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis. Clin Allergy Immunol 2004; 18: 495 - 509.
2. Abramson M.J, Puy RM, Weiner JM. Allergen immunotherapy for asthma. The Cochrane Database of Systematic Reviews 2003, Issue 4. Art. No.: CD001186. DOI: 10. 1002/14651858. CD001186.
3. Allergen immunotherapy: a practice parameter. Ann Allergy Asthma Immunol 2003; 90 (suppl. 1): 1 - 40.
4. Bousquet J., Lockey R., Malling H.J., Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. J Allergy Clin Immunol 1998 102, 558 - 62.
5. Bousquet J., van Cauwenberge P., Khaltaev N., Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma. J Allergy Clin Immunol 2001, 108, 147 - 334.
6. Eng P. wsp. Spezifische Immuntherapie in der Schweiz - sublingual oder subkutan? Schweiz Med Forum 2004; 4; 1269-1276.

Zestaw odczynników firmy Allergopharma do ilościowych oznaczeń swoistej IgE metodą ELISA

Dostępne są krążki zawierające oczyszczone **alergeny główne**

- **Brzozy: Bet v 1, Bet v 2**
- **Tymotki: Phl p 1, Phl p 5**
- Babki: Pla I 1
- Parietarii: Par j 1
- **Dermatophagoïdes pteronyssinus: Der p 1, Der p 2**
- **Alternaria tenuis: Alt a 1**
- Mleka: alfa-laktalbumina, beta-laktoglobulina, kazeina
- Jajka: owoalbumina, owomukoïd oraz ok. 650 innych wyciągów alergenowych.



Oznaczenia półilościowe swoistej IgE testem paskowym Allergodip® - zestawy alergenów

Alergeny wziewne	Alergeny całoroczne	Alergeny pokarmowe I	Alergeny pokarmowe II	Alergeny reagujące krzyżowo
D. pteronyssinus Alternaria tenuis naskórek kota naskórek psa babka lancetowata bylica pospolita brzoza żyto 6 traw - mieszanka	D. pteronyssinus D. farinae D. microceras E. maynei L. destructor A. siro T. putrescentiae G. domesticus B. germanica	dorsz jajko kurze mleko krowie orzeczki ziemne kukurydza soja mąka żytnia pomarańcza pomidor	dorsz krab soja seler orzeczki ziemne mleko krowie jajko kurze	seler bylica pospolita brzoskwinia marchew orzeczki ziemne jabłko leszczyna olcha brzoza

Alergeny rekombinowane: Nowe spojrzenie na rozpoznawanie i leczenie chorób alergicznych

Antygeny, które zapoczątkowują i odpowiadają za ujawnienie się reakcji IgE - zależnej typu I nazywają się alergenami. Pod względem immunochemicznym termin ten odnosi się do „czystego” składnika; w klinice często jest używany do określenia źródła cząsteczek alergenowych, takich jak pyłek roślin, białka zwierząt i roztocze. Wodny wyciąg tego materiału, składający się z mieszaniny cząsteczek, określany jest mianem ekstraktu alergenowego. Wszystkie alergeny są białkami lub glikoproteinami o masie cząsteczkowej 5 - 50 kDa. Najniższa wartość masy cząsteczkowej ma znaczenie dla immunogenności, najwyższa warunkuje zdolność przenikania przez błonę śluzową. Warto podkreślić jest brak różnic fizykochemicznych między alergenami a innymi antygenami, mogący tłumaczyć zdolność tych pierwszych do wywoływania odpowiedzi typu IgE. Co więcej – nie ma żadnej wspólnej cechy w sekwencji aminokwasów różnych alergenów. Alergeny są więc antygenami o określonej funkcji (24). W ekstraktach alergenowych wykrywa się dużą liczbę cząsteczek antygenowych (około 20 różnych antygenów zwierzęcych, 40 pyłku roślin i roztoczy i 60 antygenów pleśni). Część spośród tych antygenów nie jest alergogenna, inne uczulają tylko nielicznych chorych (alergeny mniejsze), a jeszcze inne – alergeny główne - wywołują odpowiedź IgE - zależną u większości chorych. Różnice w odpowiedzi immunologicznej u poszczególnych chorych warunkują nie tylko różne alergeny, ale również różne epitopy (fragmenty łańcuchów polipeptydowych o charakterystycznej sekwencji aminokwasów) tej samej cząsteczki alergenów. Współczesne techniki badawcze klonowania molekularnego umożliwiają nie tylko określenie sekwencji białek i aminokwasów, ale także mapowanie epitopów rozpoznawanych przez komórki T i B oraz analizę budowy przestrzennej molekuł. Mimo tych osiągnięć wciąż pozostaje pytanie, dlaczego jedne antygeny uczu-

lają, a inne nie, dlaczego odpowiedź immunologiczna na dany alergen jest różna u różnych chorych i dlaczego trudno przewidzieć reakcję poszczególnych chorych na immunoterapię. Wydaje się jednak, że badania nad alergenami rekombinowanymi – dokładne poznanie struktury alergenów, udoskonalona diagnostyka alergologiczna umożliwiająca analizę uczulenia na poszczególne składniki ekstraktu (*component resolved diagnosis* – CRD) oraz coraz jaśniej zarysowująca się wizja indywidualnej immunoterapii (*patient tailored immunotherapy*) z zastosowaniem indywidualizowanych szczepionek opartych na poszczególnych składnikach ekstraktów alergenowych (*component resolved immunotherapy* – CRIT), pozwolą na postawienie kroku milowego w teorii i praktyce alergologii. Być może już w niedalekiej przyszłości leczenie chorego opierać się będzie na CRD, która umożliwi dokładne określenie, jaki alergen jest odpowiedzialny za wystąpienie odpowiedzi typu I u danego chorego. Alergen ten zostanie następnie wyprodukowany przy użyciu metod genetycznych i będzie służył za matrycę do otrzymania syntetycznych alergoidów ze zmniejszoną antygenowością, które z kolei zostaną użyte w terapii ukierunkowanej na pacjenta (CRIT).

Ekstrakty alergenowe uzyskiwane są z naturalnych źródeł alergenowych, takich jak pyłki roślin, roztocze kurzu domowego, czy też sierść i naskórek zwierząt. Wyprodukowane w ten sposób precypitaty muszą zostać poddane precyzyjnej standaryzacji, która jest metodą drogą, kłopotliwą i niedoskonałą. Poza tym, dokładny skład i zawartość alergenów w takich wyciągach są niemożliwe do przewidzenia i zależą od wielu różnych czynników (np. degradacji białek, heterogenności źródeł alergenów). Mimo największych starań dotyczących standaryzacji, w wielu przeprowadzonych badaniach (35) wykazano olbrzymią heterogenność wyciągów (tab. 1). Nawet zawartość głównych alergenów

**Aleksandra Kucharczyk,
Małgorzata Faber,
Karina Jahnz - Różyk**
Wojskowy Instytut
Medyczny,
Zakład Immunologii
i Alergologii Klinicznej
CSK MON

może znacząco się różnić między poszczególnymi seriami. Kolejnym problemem jest możliwość zanieczyszczenia ekstraktów alergenami pochodzącymi z innych źródeł, co w konsekwencji może prowadzić do fałszywie dodatnich wyników punktowych testów skórnych. Szczepionki wyprodukowane na bazie ekstraktów posiadają także inne wady, np. brak odpowiednio wysokiego stężenia alergenów, niestabilność, czy też zawartość wysokiego stężenia endotoksyn, które mogą wywierać niemożliwy do przewidzenia wpływ na odpowiedź immunologiczną. W badaniu przeprowadzonym z użyciem rekombinowanych alergenów tymotki, w którym badano odpowiedź przeciwciał klasy IgE i IgG u chorych w trakcie immunoterapii na pyłki traw, wykazano znaczną zmienność odpowiedzi IgG na poszczególne alergeny, co może być związane albo z ich zbyt małym stężeniem w wyciągu alergenowym, albo też z obniżoną immunogennością (21). Dodatkowym problemem jest możliwość wywołania nowych uczuleń na białka alergenowe zanieczyszczające ekstrakt (22).

Tab. 1. Wady wyciągów alergenowych:

- | |
|---|
| <p>I. W diagnostyce</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Fałszywie dodatnie punktowe testy skórne, jeżeli dojdzie do zanieczyszczenia wyciągu alergenami pochodzącymi z innych źródeł b. Fałszywie ujemne wyniki punktowych testów skórnych, jeżeli chory uczulony jest na rzadziej występujący alergen, który w wyciągu może znajdować się w zbyt niskim stężeniu c. Brak możliwości zróżnicowania pomiędzy reakcją krzyżową a prawdziwą podwójną sensytyzacją |
| <p>II. W immunoterapii alergenowo swoistej:</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Endotoksyny: możliwość wywołania trudnej do przewidzenia odpowiedzi immunologicznej b. Brak odpowiedzi na leczenie wynikający ze zbyt małego stężenia podstawowego alergenu z mniejszej grupy, na który dany chory jest uczulony c. Możliwość wywołania nowych uczuleń na białka alergenowe zanieczyszczające ekstrakt d. Niestabilność alergenów |

Poznanie struktury molekularnej większości istotnych klinicznie alergenów umożliwiło wytwarzanie ich w dużej ilości jako białek rekombinowanych. Opracowano systemy bardzo szybkiej i wydajnej produkcji alergenów na skalę przemysłową, w których wykorzystuje się na przykład plantacje tytoniu celem wytworzenia alergenów pyłkowych (6,

41), czy fermentację drożdży *Pichia pastoris* dla uzyskania wielu innych alergenów. *Pichia pastoris* (42) może produkować alergeny w stężeniu 1 - 200mg/litr, a więc – dla przykładu - wytworzenie alergenów w ilości wystarczającej na 500 - microgramowy kurs odczulania dla 1% populacji Stanów Zjednoczonych wymagałoby fermentacji 10 - 20000 litrów *Pichia pastoris*, co stanowi względnie małe przedsięwzięcie biotechnologiczne. Koszt wytworzenia szczepionki rekombinowanej jest porównywalny z kosztem wytworzenia szczepionki przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B; do niedawna wynosił on około 30 dolarów za 20 - mikrogramową dawkę, obecnie mieści się w granicach 1 dolara (2).

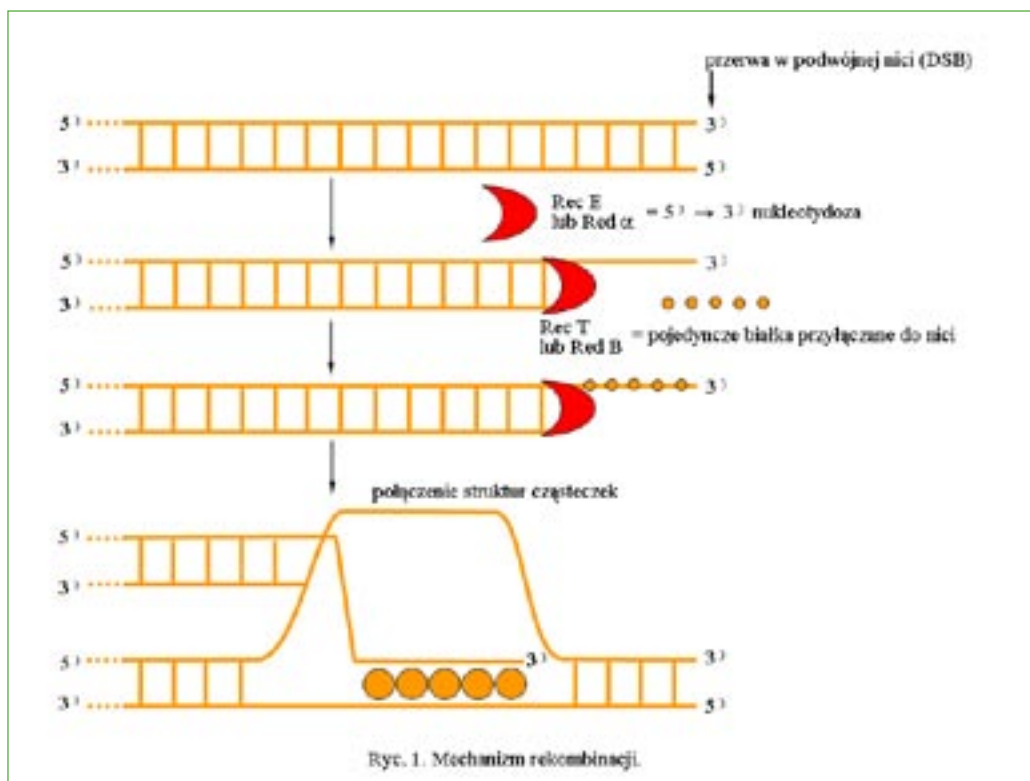
Obecnie istnieje wiele metod otrzymywania alergenów rekombinowanych, jednak nie wszystkie procedury gwarantują powtarzalność jakościową i ilościową uzyskiwanego produktu. W powszechnym użyciu są dwie metody, trzecia znajduje się jeszcze w fazie badań, ale stanowi bardzo ważną alternatywę dla metod starszych ze względu

na następujące cenne właściwości: brak mutacji *in vitro*, możliwość „budowania” cząsteczek o nieograniczonej długości i złożoności, brak konieczności oczyszczania, a także ogólny niższy koszt.

METODA 1: powstała pod koniec lat 60 - tych. Polega na oczyszczeniu alergenów pochodzących z naturalnych źródeł, a następnie określeniu ich struktury (se-

kwencji aminokwasów) i kodujących je nukleotydów DNA. W kolejnym etapie wektor DNA, którym mogą być bakterie lub drożdże i wstawka są przecinane przez enzymy restrykcyjne, a następnie łączone razem przy użyciu ligazy DNA, co prowadzi do ekspresji genów wyrażającej się produkcją cząsteczek alerge-

szą następnie dołączane do wektorów, po czym – podobnie jak w metodzie 1 – dochodzi do ekspresji genów wyrażającej się produkcją cząsteczek alergenu rekombinowanego. Technika ta jest niezwykle precyzyjna i pozwala na identyfikację alergenów trudnych do wyizolowania przy użyciu poprzedniej me-



Ryc. 1: Mechanizm ET rekombinacji DNA:

Naprawa złamania podwójnej nici zapoczątkowana jest przez RecE/RecT lub Red α /Red β . Dla przejrzystości została pokazana tylko jedna liniarna nić. W pierwszym etapie RecE lub Red α degradowuje DNA w kierunku 5' \rightarrow 3', rozpoczynając od przerwy w podwójnej nici; w ten sposób powstaje zwieszająca się pojedyncza nić 3' ssDNA. Następnie RecT lub Red β przyłączają się do ssDNA tworząc rekombinogeny białkowonukleotydowy filament, który jest używany w procesie rekombinacji przez wyżarcie pojedynczej nici lub inwazję nici.

nu rekombinowanego. Tą drogą produkowane są obecnie wysoko oczyszczone alergeny rekombinowane pyłków roślin. Metoda ta niesie za sobą ryzyko zmiany struktury alergenu w trakcie procesu rozdzielania i oczyszczania. Szczególnie wrażliwe na procesy denaturacji i separacji na żelu poliakrylamidowym są pyłki traw należące do 4 grupy, dlatego praktycznie niemożliwe jest wytworzenie ich w zachowanej formie.

METODA 2: polega na wstępnym powieleniu wstawek mRNA dla określonej grupy alergenów (np. pyłków traw) przy użyciu metody PCR. Wstawki te

tody. Wadą metody jest jednak możliwość uszkodzenia naturalnej konfiguracji przestrzennej alergenu i modyfikacji jego właściwości fizykochemicznych, czego następstwem może być nierozpoznanie alergenu przez przeciwciała IgE obecne w surowicy chorego. Problem stanowi także brak możliwości powielania cząsteczek kodowanych przez DNA o zawartości informacji powyżej 20 kb.

METODA 3: rekombinacja ET (nazwa pochodzi od enzymów białkowych Rec T i Rec E) znana także pod nazwą rekombinacji lambda, czy też rekombinacji homologicznej, to metoda otwie-

rająca nową erę genetyki molekularnej. W metodzie tej docelowe fragmenty DNA są precyzyjnie przerabiane w procesie homologicznej rekombinacji w szczepach *E. coli* w których doszło do ekspresji pochodzących od bakteriofagów par białkowych: RecE/RecT od probakteriofaga RAC albo Red α /Red β od bakteriofaga lambda. Do rekombinacji dochodzi w regionach homologicznych, które są obszarami DNA występującymi w obu cząsteczkach poddawanych rekombinacji. Ponieważ sekwencja regionów homologicznych może być wybierana dowolnie, jakkolwiek pozycja na cząsteczce docelowej może być swoiście zmieniona. Homologiczna rekombinacja pozwala na wymianę informacji genetycznej w sposób bardzo precyzyjny niezależnie od wielkości cząsteczek; w trakcie tego procesu przeprowadzić możemy każdą modyfikację, włączając w to delecję, insercję czy substytucję. Metoda ta jest bardzo wydajna (23). Dodatkową jej zaletą jest to, że procesy amplifikacji i klonowania zachodzą na tym samym etapie rekombinacji ET oraz to, że otrzymane klony są korygowane *in vivo*.

Rekombinacja ET ma zalety podobne do PCR, ponieważ umożliwia wyselekcjonowanie regionu, który ma być sklonowany do poziomu pojedynczych nukleotydów. Jednak, inaczej niż w metodzie PCR, region który ma być sklonowany ma nieograniczoną wielkość, nie jest poddawany mutagenzie *in vitro* i nie wymaga dodatkowych działań przyłączających fragment do wektora. Kolejną zaletą rekombinacji ET jest to, że sklonowany fragment DNA nie musi być poddawany oczyszczaniu, będącym w przypadku innych metod przyczyną wielu zmian wywołujących w efekcie modyfikacje zarówno antygenowości, jak i immunogenności alergenów. Nawet cząsteczki o wielkości 80 kb mogą być klonowane skutecznie, bez potrzeby dalszego oczyszczania. Niezwykle ważną cechą otrzymywanych w rekombinacji ET DNA jest to, że nie zawierają żadnych niezaplanowanych przez nas mutacji.

Strategie skierowane na komórki B i komórki T: Różnice w odpowiedzi immunologicznej u poszczególnych chorych warunkują nie tylko różne alerdeny

i ich budowa, ale również epitopy (determinanty antygenowe) tej samej cząsteczki alergenu. To zróżnicowanie odpowiedzi jest uwarunkowane genetycznie. Indywidualna wrażliwość chorego na działanie alergenu zależy od głównego układu zgodności tkankowej MHC klasy II, który kontroluje proces przetwarzania i prezentacji antygeny oraz od rodzaju komórek rozpoznających epitopy (24). Rozróżnia się epitopy rozpoznawane przez komórki B i przez komórki T. Limfocyt T nie jest zdolny do rozpoznania i wiązania całego alergenu. Dzieje się tak dlatego, że w wyniku rozkładu proteolitycznego antygeny na fragmenty linearne podczas procesu jego prezentacji przez APC, epitopy dla limfocytu T przybierają postać krótkich (8 - 15 aminokwasów) fragmentów białkowych o prostej pierwszorzędowej strukturze (epitop liniowy). Jest to przyczyną nieprzewidywalności końcowego efektu aktywacji komórek efektorowych; stwarza również trudności w doborze odpowiedniej dawki i drogi podania alergenu w celu uzyskania optymalnego efektu terapeutycznego np. w immunoterapii swoistej. W przeciwieństwie do epitopów dla komórek T, epitopy B - komórkowe charakteryzują się niskim zróżnicowaniem i rozpoznają całą cząsteczkę antygeny, który często wiąże się tylko z jednym specyficznym rodzajem przeciwciał IgE. Swoistość epitopu dla komórki B warunkuje trójwymiarowa konfiguracja cząsteczki białka.

Zagadnienia dotyczące rozpoznawania epitopów są niezwykle istotne przy produkcji alergenów rekombinowanych, gdzie wykorzystuje się epitopy rozpoznawane przez komórki B i T (27). Wydaje się, że z powodu niezwykle dużej heterogenności epitopów dla limfocytów T wykorzystywanie epitopów rozpoznawanych przez limfocyty B przynosi większe korzyści i ma przewagę nad epitopami limfocytów T. Mimo to istnieją już prace dotyczące wytwarzania stanu tolerancji immunologicznej poprzez zastosowanie białek będących pochodnymi epitopu T - komórkowego.

Próby podejścia do wybiórczego oddziaływania na limfocyty B opierają się na identyfikacji białek będących pochodnymi komórek B lub powierzch-

ni alergenów, które indukują powstawanie przeciwciał blokujących klasy IgG. Przeciwciała te hamują przyłączanie się obecnych u chorego na alergię pacjenta przeciwciał IgE do cząsteczki alergenu oraz zapobiegają indukowanej alergeniem aktywacji komórek efektorowych. Białka takie wytworzono na podstawie zmapowanych epitopów IgE oraz przeprowadzonych badań strukturalnych wielu ważnych alergenów. Są już pierwsze doniesienia na temat prób uzyskania takich hipoalergizujących białek indukujących powstawanie przeciwciał blokujących klasy IgG (40). W swoim badaniu Hocke i Linhart wykazali nie tylko istotną rolę przeciwciał blokujących IgG, które hamowały natychmiastową IgE - zależną odpowiedź zapalną w szczepionkach przeciwalergicznym, ale także przedstawili cel, jaki stanowią epitopy komórek B dla racjonalnego tworzenia bezpiecznych – pozbawionych antygenowości - białkowych szczepionek alergenowych w tych przypadkach, w których znana jest struktura alergenu wywołującego chorobę.

Przy użyciu opisanych powyżej metod biologii molekularnej możemy wytworzyć tzw. „dzikie” alergeny rekombinowane, dokładnie naśladujące alergeny naturalne. Możemy jednak użyć ich jako matrycy i wytworzyć pochodne, które znacząco się od nich różnią zarówno pod względem własności fizykochemicznych, jak i immunologicznych. Modyfikowane genetycznie pochodne alergenów rekombinowanych posiadają wiele zalet: cząsteczki te zachowują alergenowo - specyficzne epitopy limfocytów T, dlatego mogą być użyte z ukierunkowaniem na te komórki. Ponadto uzyskane metodą inżynierii genetycznej hipoalergizujące pochodne alergenów indukują powstawanie przeciwciał blokujących, które hamują przyłączanie się przeciwciał IgE do alergenów u osób uczulonych, prezentując w ten sposób ukierunkowanie na komórki B. Kolejną zaletą jest to, że cząsteczki te mogą być wytworzone w sposób umożliwiający zredukowanie ich aktywności alergizującej, a nawet zmianę immunogenności - wytworzone metodą inżynierii genetycznej alergeny potrafiły wzmocnić typ odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1 – komórkowym (40).

Dzikie alergeny rekombinowane: mogą być stosowane zamiast wyciągów alergenowych. Zaletą wynikającą z ich stosowania jest to, że chory otrzymuje dokładnie zdefiniowane cząsteczki w ściśle określonej dawce. Dzikie formy alergenów stosowane były w badaniach na modelach zwierzęcych w celu wyindukowania przeciwciał blokujących lub wytworzenia stanu tolerancji. Połączenie kilku głównych alergenów w formę hybrydową zwiększało immunogenność poszczególnych składników, przez co wpływało na wytworzenie się wyższych stężeń przeciwciał blokujących u zwierząt od tych ewokowanych przez szczepionki, w skład których wchodziło kilka zmieszanych alergenów (koktajl alergenowy) lub pojedynczy alergen. W badaniu przedstawionym na XXIII Europejskim Kongresie Alergologii i Immunologii Klinicznej w immunoterapii zastosowano koktajl rekombinowanych alergenów tymotki. Podczas terapii osiągnięto znaczącą poprawę, jeśli chodzi o objawy kliniczne. Zaobserwowano także wzrost w surowicy specyficznych dla alergenów IgG1 i IgG4 oraz zmniejszenie wzrostu IgE w trakcie sezonu pylenia (15). Mimo, że terapia ta nie stanowi jeszcze leczenia ukierunkowanego na pacjenta (*patient tailored*), ma istotne zalety, takie jak odpowiednia standaryzacja i jakość farmaceutyku, a także dokładne dawkowanie szczepionki.

Cząsteczki modyfikowane chemicznie: Kolejny krok to połączenie alergenów ze związkami immunomodulującymi, co ma powodować zmianę odpowiedzi immunologicznej lub zmniejszenie antygenowości alergenów, czyli tworzenie hipoalergicznym wariantów szczepionek.

Adjuwanty z fragmentami DNA: Układ immunologiczny kręgowców odpowiada na stymulację pewnymi sekwencjami DNA silnym wrodzonym typem odpowiedzi indukującym Th1. Sekwencje te nazywane immunostymulującym DNA występują rzadko u kręgowców, ale względnie częściej w organizmach niższych, w tym w komórkach bakterii i wirusów. Prawdopodobnie sekwencje te stanowią sygnał o zagrożeniu, który indukuje układ immunologiczny do silnej odpowiedzi Th1 skie-

rowanej przeciwko obcemu antygenowi. Zjawisko to można wykorzystać, żeby zmodyfikować odpowiedź alergiczną z dominującą patogenną odpowiedzią Th2 w kierunku fizjologicznej Th1 (38). W przeprowadzanych badaniach stosowano 4 podstawowe odmiany immunoterapeutyków powstałych na bazie DNA (13): szczepionki genowe, alergeny zmieszane z immunostymulującym oligodeoksynukleotydem (ISS ODN), fizyczne koniugaty alergen – ISS ODN czyli tzw. AIC oraz czyste formy ISS ODN. W przeprowadzonym przez Hornera i wsp. (12) badaniu stwierdzono, że koniugaty AICs są zdecydowanie bardziej immunogeniczne niż alergeny natywne. Odpowiedź indukowana przez AIC była silniejsza od tej po czystym alergenie, a także po mieszanicy alergenu z ISS ODN. Wykazano, że AICs sto razy słabiej wpływały na degranulację komórki tucznej niż natywny alergen. Podobne wyniki uzyskał Tighe (32) w badaniu koniugatu sekwencji immunostymulujących DNA i alergenu głównego pyłku ambrozji, a także Marshal i wsp. (20), którzy w badaniu z koniugatem CpG (immunostymulująca sekwencja DNA składająca się z centralnie położonego oligonukleotydu i zmiennych grup pobocznych) oraz głównym alergenem pyłku ambrozji Amb a1, wykazali wzrost specyficznych dla alergenu przeciwciał klasy IgG2a (wskaźnik odpowiedzi Th1 - zależnej); obserwowano także zmniejszoną alergogenność koniugatu. Szczepionka wydaje się indukować alergenowo swoistą odpowiedź IgG, podczas gdy nie zaobserwowano żadnych różnic w stężeniu IL-10 w monocytach krwi obwodowej, świadczących o wytworzeniu się stanu tolerancji.

Adjuwanty z białkami immunostymulującymi: to np. fuzja alergenu rekombinowanego z białkiem powierzchniowym komórki bakteryjnej (*S - layer*) z MPL (monofosforanowy lipid A) (3) lub z białkiem immunomodulacyjnym grzybów. Zasada działania takiego koniugatu jest podobna do opisanej powyżej, z tą różnicą, że w tym przypadku rolę cząsteczki, która nasila efekt kierowania odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1 jest białko. W jednym

z badań (4) połączono sekwencję genów kodujących główny alergen pyłku brzozy Bet v1 z genem kodującym białko powierzchniowe (*S - layer*) bakterii *Geobacillus stearothermophilus* i wytworzono białko rekombinowane: rSbsc - Bet v1. Zawierało ono wszystkie znaczące epitopy komórek T i B; cechowało się znacznie mniejszą zdolnością uwalniania histaminy. W komórkach osób uczulonych na pyłek brzozy rSbsc - Bet v1 indukowało wytwarzanie IFN gamma i IL - 10. W innym badaniu Liu i wsp. (18) połączyli białka alergenu kurzu domowego, Der p 2 z białkiem immunomodulującym grzybów. Wykazano, że wytworzona szczepionka skutecznie łagodziła zapalenie dróg oddechowych u myszy.

Białkowe epitopy komórek B: są to białka stanowiące najczęściej krótkie fragmenty alergenów. Ze względu na brak struktury drugorzędowej i trzeciorzędowej nie wykazują one alergogenności. W jednym z badań (8) na podstawie trójwymiarowej budowy alergenu brzozy Bet v1 zsyntetyzowano 6 białek składających się z 25 - 32 kwasów nukleinowych; szczepienia z użyciem tych cząsteczek indukowały u myszy wytwarzanie swoistych IgG; zapobiegały także medianemu przez IgE uczuleniu na Bet v1. W kolejnym badaniu na podstawie eksperymentalnego oznaczenia epitopów komórek B głównego alergenu tymotki Phl p1 zsyntetyzowano 5 białek składających się z 28 - 32 aminokwasów i eksperymentując na myszach udowodniono brak aktywności alergogennej tych białek z zachowaną immunogennością (9).

Białkowe epitopy komórek T: Są to syntetyczne cząsteczki zawierające epitopy T - komórkowe charakteryzujące się brakiem zdolności reagowania z IgE, czyli niewykazujące alergogenności. Badania *in vitro* wykazały, że komórki T mogą być hamowane, a także mogą wykazywać tolerancję w stosunku do peptydów będących epitopami dla limfocytów T, rozpoznawanymi bez dodatkowego stymulującego sygnału z komórek prezentujących antygen. Rozpoczęto badania na ludziach z użyciem epitopów dla limfocytów T głównego alergenu kota Fel d1 (28). Doskonałość tej terapii pole-

ga na tym, że może ona wywołać tolerancję limfocytów T, a następnie zahamowanie syntezy IgE, aktywacji komórek tucznych i akumulacji eozynofili bez jednoczesnej reakcji z limfocytami B oraz z IgE opłaszczającymi komórki tuczne. Problemy, które napotyka się przy tworzeniu tych białek to trudność, jaką stwarza identyfikacja epitopów dla komórek T na cząsteczkach alergenów oraz obserwowane w przeprowadzonych badaniach systemowe reakcje późne związane najprawdopodobniej z aktywacją limfocytów T. Dlatego też konieczne przed ostateczną oceną jest przeprowadzenie dalszych badań. (28)

Mutacje punktowe w cząsteczkach alergenów rekombinowanych: Sztucznie wywołane powodują takie zmiany konformacyjne, które mają wpływ na zmniejszenie się alergogenności chemioterapeutyku bez istotnego wpływu na jego immunogenność. W jednym z badań (7) wykazano, że wielopunktowe mutanty Bet v1 charakteryzują się znacząco mniejszą reaktywnością z IgE osocza chorych uczulonych na pyłek brzozy. Badania *in vivo* (punktowe testy skórne) potwierdziły znacznie mniejszy potencjał wywoływania odpowiedzi typu I mutantów w porównaniu z dzikim szczepem. Ta 6 - punktowa wymiana sekwencji Bet v1 nie wpłynęła natomiast na rozpoznawanie przez komórki T, dlatego zachowała się zdolność do aktywacji komórek T, która jest konieczna dla immunomodulacji i oznacza skuteczność leczenia.

Izoformy: Badania prowadzone nad rekombinowanymi alergenami pozwoliły na odkrycie, że wiele białek alergenowych składa się z mieszanek różnych izoform. Niektóre z nich wykazują mniejszą zdolność wiązania IgE mimo niezmięnionej immunogenności. Można to porównać do opisanych powyżej mutacji punktowych, z tą różnicą, że wytworzone są naturalnie. W badaniu ekstraktu pyłku brzozy (1) zidentyfikowano obecność ponad 11 izoform Bet v1. Przebadano dokładniej reaktywność dwóch z nich: Bet v1a i Bet v1d. Izoformy te różnią się tylko siedmioma kwasami nukleinowymi, ale są całkowicie odmienne pod względem reaktywności z IgE: oceniono, że – w zależno-

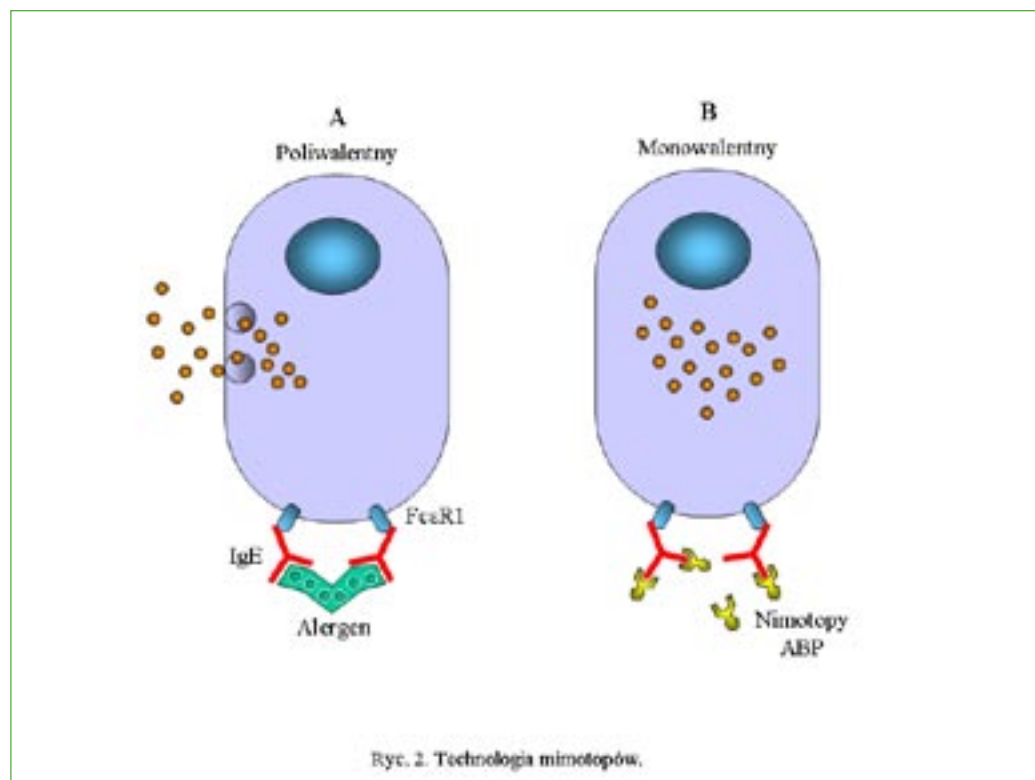
ści od stężenia – reaktywność rBet v1d jest około 100 razy słabsza od Bet v1a. Odpowiedź T - komórkowa na te izoformy jest natomiast podobna.

Fragmenty alergenów oraz polimery: Pierwsze badania oceniające genetycznie modyfikowane pochodne alergenowe w immunoterapii były przeprowadzone z trimerelem Bet v1 i fragmentami rBet v1 (25, 31). Podawanie tych cząsteczek wywołało znaczącą odpowiedź IgG przeciwko alergenom Bet v1 typu dzikiego. Wyindukowane w trakcie terapii przeciwciała IgG reagowały krzyżowo z homologicznymi alergenami pochodzącymi z pyłków drzew i niektórych alergenów pokarmowych, a także hamowały zależną od przeciwciał degranulację komórek tucznych. U chorych, którym podano aktywny lek (badania przeprowadzane były z zastosowaniem podwójnie ślepej próby) obserwowano spadek reaktywności skóry, a także poprawę dotyczącą klinicznych objawów uczulenia. Dodatkowo obserwowano redukcję wytwarzania IgE w sezonie pylenia u chorych oczulanych, co sugeruje, że opisywana terapia blokuje też komórki pamięci. Wcześniej hipoalergizujące pochodne Bet v1, głównego alergenu pyłku brzozy, takie jak dwa fragmenty rekombinowanego Bet v1, Bet v1 trimer i warianty rBet v1 poddane były badaniom oceniającym bezpieczeństwo ich stosowania, w tym przede wszystkim próbom prowokacyjnym, dzięki którym potwierdzono ich znacznie zredukowaną aktywność alergizującą (36). W testach na zwierzętach fragmenty rBet v1 i trimery indukowały powstawanie przeciwciał blokujących (19).

Hybrydy: Kolejną możliwą modyfikacją jest tworzenie hybryd. W jednym z badań (17) wykazano, że hybrydy alergenowe pyłków traw: rP2 - P6 (Phl p2 + Phl p6), r P6 - P2, rP5 - P2 zawierają większość epitopów znajdujących się w naturalnym ekstrakcie i indukują silniejszą odpowiedź limfoproliferacyjną niż ekwimolarne mieszanki poszczególnych alergenów. W przypadku hybryd obserwowano także większy wzrost miana przeciwciał ochronnych klasy IgG hamujących wiązanie IgE z alergenami. W cząsteczce hybrydy każdy

z alergenów może stawać się cząsteczką nośnikową, a przez to może nasilać zarówno odpowiedź humoralną, jak i komórkową na dołączony składnik. Efekty

z alergenem na komórkach noszących FcεRI, należałoby więc zastosować monowalentne nośniki mimotopów IgE zapobiegające temu połączeniu (ryc. 2).



te obserwuje się zarówno w przypadku łączenia dwóch cząsteczek, z których jedna charakteryzuje się niską, a druga wysoką immunogennością (Phl p1, Phl p2), jak również w przypadku hybryd dwóch cząsteczek o niskiej immunogenności (Phl p2, Phl p6). Dokładny mechanizm tego zjawiska pozostaje niewyjaśniony.

Technologia mimotopów: Inną strategią wytwarzania szczepionek alergenowo swoistych jest zastosowanie technologii mimotopów, czyli białek naśladujących naturalne epitopy IgE. Stanowi ona nową koncepcję leczenia alergii (11). Przy użyciu alergenowo swoistych przeciwciał, z biblioteki bakteriofagów wyodrębniane są klony przejawiające ekspresję przypadkowych białek (czyli mimotopów) (10). Mimotopy naśladujące miejsca wiązania alergenu mogą być wykorzystane jako szczepionka, która kieruje przeciwciała blokujące przeciwko epitopom IgE. Natywne i sztuczne epitopy IgE mają zdolność do krzyżowego wiązania cząsteczek IgE związanych z receptorami FcεRI, co powoduje uwolnienie histaminy i innych mediatorów stanu zapalnego. Żeby uniknąć wiązania IgE

W jednym z przeprowadzonych badań w wyniku screeningu biblioteki przypadkowych białek prezentowanych na bakteriofagach z pochodzącą od uczulonych na pyłek brzozy pacjentów oczyszczoną IgE, określono strukturę białek naśladujące naturalne epitopy IgE (mimotopy) głównego alergenu pyłku brzozy Bet v1. Wykazano, że fagi prezentujące mimotopy IgE są doskonałymi wektorami immunogennymi precyzyjnie indukującymi powstawanie przeciwciał blokujących klasy IgG. Jednakże, ze względu na wysoką gęstość tych białek na powierzchni faga, mogłyby one mieć zdolność krzyżowego wiązania IgE u uczulonych chorych. Celem omawianego badania było wytworzenie monowalentnego nośnika dla mimotopów IgE: stworzono białko fuzyjne mimotopu z białkiem przenoszącym albuminy (ABP), a następnie zbadano jego zdolność do indukowania odpowiedzi IgG i uwalniania histaminy. Na podstawie wyników obserwacji wyciągnięto wniosek, że cząsteczki monowalentne, w których skład wchodzi sztuczne hapteny IgE, epitopy, czy też mimotopy, pozwalają na zredukowanie

ryzyka wystąpienia reakcji anafilaktycznych w trakcie epitopowo - swoistej immunoterapii.

Szczepionki DNA: Funkcję antygeny pełnić ma w nich rekombinowany DNA patogenu wprowadzony do organizmu za pomocą wektora wirusowego lub bakteryjnego, bądź też wbudowany do plazmidu. Mechanizm działania szczepionki DNA jest uzależniony od transkrypcji DNA na mRNA. W dalszym etapie następuje translacja sekwencji kodonów mRNA na sekwencje aminokwasów białka, które staje się w ten sposób antygenem szczepionki. Po rozpoznaniu nowego antygeny przez mechanizmy wewnątrzkomórkowe następuje jego pre-

zentacja za pośrednictwem kompleksu MHC klasy I i II, a także pobudzenie cytotoksycznych limfocytów lub uruchomienie odpowiedzi humoralnej, co prowadzi do niszczenia komórek prezentujących białkowy antygen danego patogenu. W wyniku takich przemian rozwijają się mechanizmy odporności w stosunku do tego patogenu (16). Szczepionka DNA pozwala na uniknięcie stałego podawania białek alergenowych. Określenie bezpieczeństwa jej stosowania wymaga jednak dalszych badań.

Zastosowania alergenów rekombinowanych

W badaniach naukowych alergeny rekombinowane wykorzystano na przykład

Tab. 2 Zastosowania alergenów rekombinowanych (34):

1) Badania naukowe a) Definiowanie cząsteczek i epitopów dla podstawowych badań <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>
2) Standaryzacja a) Czyste alergeny o zdefiniowanym składzie i masie w testach do standaryzacji ekstraktów przeznaczonych do diagnostyki i leczenia
3) Profilaktyka a) Nowe testy do oceny ekspozycji na alergeny b) Hipoalergiczna żywność i rośliny c) Szczepienia profilaktyczne
4) Diagnostyka a) CRD – diagnostyka oparta o analizę uczulenia na poszczególne składniki ekstraktu – czipowe testy mikrooznaczeń b) Ocena markerów alergenowych – prospektywna ocena ryzyka rozwoju alergii
5) Leczenie: immunoterapia klasyczna lub dobrana indywidualnie, oparta o analizę uczulenia na poszczególne składniki ekstraktu (CRIT) a) Alergeny rekombinowane b) Epitopy limfocytów T c) Epitopy limfocytów B d) Szczepionki DNA e) Adjuwanty f) Hybrydy g) Fragmenty alergenów i polimery h) Mimotopy i) Izoformy j) Mutacje punktowe

w ważnej pracy Niederbergera i wsp. (26), w której stwierdzono, iż zależna od IgE alergenowo swoista nadwrażliwość na alergeny wziewne jest wywoływana lub przynajmniej nasilana przez ekspozycję na alergeny pyłkowe już w pierwszych latach życia. Z kolei w badaniach immunologicznych przeprowadzanych z rekombinowanymi pyłkami oraz alergenami pokarmowymi potwierdzono, że w większości przypadków alergii pokarmowej alergeny wziewne są pierwszymi czynnikami wywołującymi alergizację chorego, a towarzysząca alergii pokarmowa jest wynikiem reakcji krzyżowej z alergenami pyłkowymi, a nie alergizacją przez przewód pokarmowy.

Alergeny rekombinowane są także uznanym narzędziem umożliwiającym standaryzację wyciągów alergenowych. Mogą być też wykorzystane w celu identyfikacji cząsteczek hipoalergicznych i rozwoju środków profilaktycznych pozwalających na uniknięcie alergenu. W oryginalnych pracach wykazano możliwość uspienia genów kodujących dla głównych alergenów roślinnych; uzyskano na przykład redukcję wytwarzania alergizującego białka o masie 14 - 16 kDa w plantacjach transgenicznego ryżu (30).

Najważniejszym zastosowaniem alergenów rekombinowanych jest jednak diagnostyka i leczenie alergii.

Alergeny rekombinowane w diagnostyce chorób alergicznych:

Obecna diagnostyka chorób alergicznych opiera się głównie na wywiadzie chorobowym. W standardach alergologicznych rola badań dodatkowych ograniczana jest do potwierdzenia alergii rozpoznawanej na podstawie wywiadu oraz ewentualnie określenia stopnia nadwrażliwości. Ta drugorzędna wartość badań dodatkowych wynika z niedoskonałości ekstraktów alergenowych. W diagnostyce (testy skórne, próby prowokacyjne, wykrywanie przeciwciał alergenowo swoistych) chorób alergicznych od wielu lat wykorzystuje się wodne roztwory alergenów otrzymywane głównie w wyniku ekstrakcji z naturalnego źródła alergenowego. Jednak w trakcie tego procesu do wyciągu przedostawać się mogą również inne składniki, które otrzymywane eks-

trakt zanieczyszczają i wpływają na jego homogenność. Duże trudności wiążą się też ze standaryzacją takiego materiału.

Istotny problem stanowi również fakt, iż wykorzystując w diagnostyce ekstrakty określone jest jedynie źródło alergenów, które uczulają pacjenta, a nie pojedynczą cząsteczkę, która wywołuje objawy choroby. Nie można więc zastosować leczenia ukierunkowanego na czynnik uczulający, bo nie jest on znany. Uważa się, że stężenie alergenu, które w stały sposób wywoływałoby dodatni odczyn w punktowych testach skórnych, wynosi 20 µg/ml. W takim stężeniu w wyciągu znajdują się tylko alergeny główne. Problem wiąże się więc z dużą grupą osób z nadwrażliwością na alergeny poboczne znajdujące się tylko w niewielkich stężeniach w wyciągu. Na przykład 20 - 30% osób uczulonych na roztocza nie reaguje z grupą 1 i 2 alergenów kurzu domowego; zjawisko to obserwowane jest w większym stopniu u osób, u których alergii rozwinęła się w późniejszym wieku. Przy zastosowaniu w ich przypadku rutynowo dostępnych testów diagnostycznych można dojść do fałszywego wniosku, że chorzy ci nie są uczuleni. Możliwe, że część chorych na astmę endogenną jest w rzeczywistości uczulona na grupy alergenów w zbyt małym stopniu prezentowanych w wyciągach.

Innym problemem jest alergii krzyżowa. Diagnostyka przeprowadzana z użyciem wyciągów nie pozwala na różnicowanie czy mamy do czynienia z reakcją krzyżową, czy też uczuleniem wielowalnym. Przykładowo chorzy uczuleni na pyłki traw mogą mieć dodatnie wyniki punktowych testów skórnych z ekstraktem brzozy. Wynika to z reakcji krzyżowej z profiliną, obecną zarówno w wyciągu pyłków traw, jak i brzozy. Różnicowanie między reakcją krzyżową a wielokierunkową sensytyzacją ma istotne implikacje kliniczne, ponieważ w przypadku reakcji krzyżowych leczeniem z wyboru jest immunoterapia, w przypadku alergii wielowalnej postępowaniem zalecanym jest leczenie objawowe.

Analiza różnych populacji europejskich i afrykańskich przeprowadzona przy pomocy alergenów rekombinowanych wykazała znaczne różnicowanie profili

odpowiedzi IgE. Przyczyną jest zapewne charakterystyka miejscowej ekspozycji na alergen. I w tym przypadku dokładniejsza diagnostyka, umożliwiająca ściśle określenie dominujących alergenów, pozwoliłaby na skuteczniejsze leczenie.

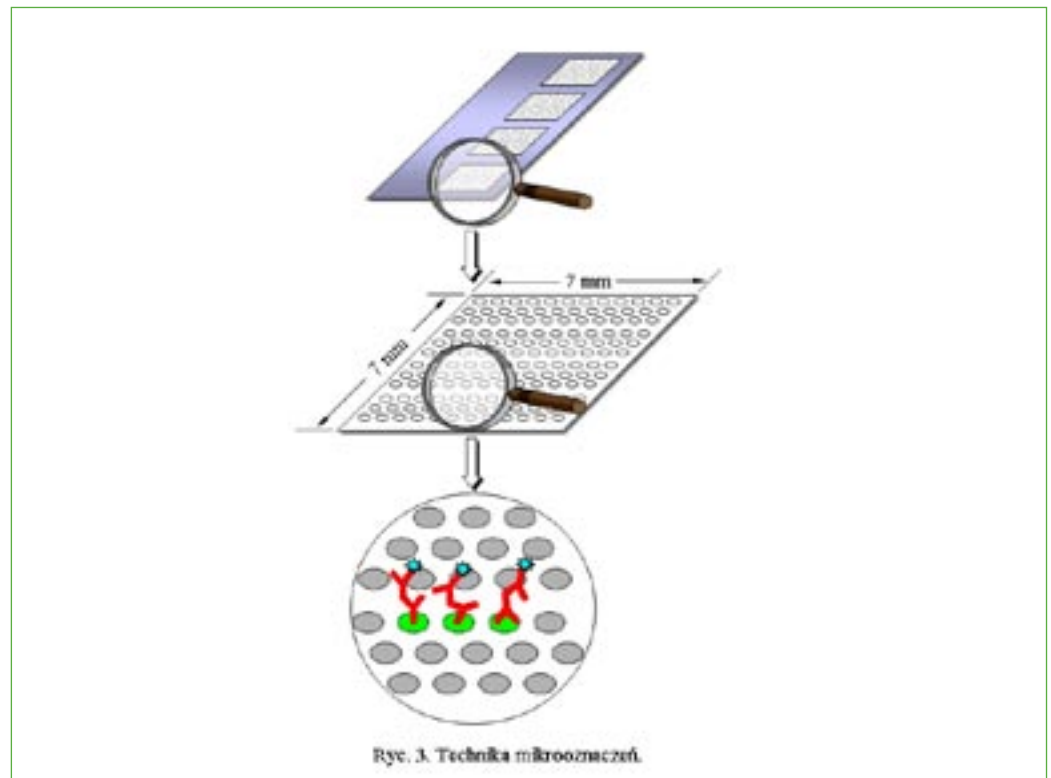
Poważnym zagadnieniem jest również alergia pokarmowa – jedna z ważniejszych manifestacji atopii. Pierwotna alergia pokarmowa (klasa I) dotyczy dzieci, podczas gdy u dorosłych rozwija się alergia będąca konsekwencją nadwrażliwości na alergeny wziewne (klasa II). Obecnie stosowana diagnostyka oparta na wyciągach jest niezadowolająca: ani testy skórne, ani badania serologiczne nie są wystarczająco czułe i swoiste, dostępne wyciągi zaś są jeszcze bardziej niedoskonałe niż w przypadku alergenów wziewnych. Stosowane w niektórych przypadkach testy *prick by prick* także mają swoje ograniczenia, podobnie zresztą jak próby prowokacyjne z zastosowaniem próby podwójnie ślepej, które – choć cechują się większą czułością – obciążone są możliwością wystąpienia poważnych działań niepożądanych. Pierwsze badania dotyczące zastosowania w powyższym przypadku w diagnostyce alergenów rekombinowanych wyglądają obiecująco (5). Dodatkowym problemem związanym z alergią pokarmową jest to, że ekstrakty alergenowe z tych źródeł zawierają wiele glikoprotein z glikanami w pozycji N nazywanych reagującymi krzyżowo determinantami alergenowymi (*cross - reactive carbohydrate determinants*; CCD) (39). W pewnej podgrupie chorych uczulonych na pyłki i alergeny pokarmowe CCD wiążą IgE. Niektórzy autorzy uważają, że u chorych z tej podgrupy częścię mogą wystąpić poważne reakcje niepożądane po ekspozycji na alergen pokarmowy. Istniejące obecnie metody wykrywania przeciwciał anty - CCD umożliwiają stwierdzenie, czy odpowiedź IgE na ekstrakt alergenowy wywołana jest przez alergen białkowy czy przez fragmenty węglowodanowe. Rekombinowane alergeny pokarmowe wytwarzane przez bakterie nie są poddawane glikozylacji. Z tego powodu stosowane w diagnostyce nie rozpoznają przeciwciał IgE skierowanych przeciwko CCD. Badania porównawcze umożliwiają w ten sposób rozpoznanie typu uczulenia danego chorego.

Podsumowując: Podczas gdy diagnostyka oparta na wyciągach alergenowych umożliwia co najwyżej określenie źródła alergenów, diagnostyka z użyciem alergenów rekombinowanych pozwala na dokładne określenie cząsteczki alergenu, na który dana osoba jest uczulona. Taka unowocześniona diagnostyka umożliwiająca analizę uczulenia na poszczególne składniki ekstraktu (CRD) sprawia, iż u osób do tej pory uznawane za „nieme” immunologicznie można rozpoznać alergię. Umożliwia różnicowanie między reakcją krzyżową a podwójną sensytyzacją, a ponadto stanowi narzędzie indywidualnego dobierania terapii do pacjenta (CRIT) w taki sposób, by mógł on odnieść jak najwięcej korzyści z prowadzonego leczenia.

Przełom w diagnostyce alergii stanowi umożliwiająca ocenę pełnego profilu nadwrażliwości, oparta na alergenach rekombinowanych tzw. technika mikrooznaczeń (*microarray*).

Po raz pierwszy została ona zastosowana w diagnostyce DNA. Umożliwiła monitorowanie poziomu ekspresji licznych genów w zminiaturyzowanym formacie. Technologia mikrooznaczeń białek pod względem technicznym stanowi większe wyzwanie ze względu na heterogenność materiału, a także konieczność zachowania struktury trzeciorzędowej po przyłączeniu do czipu. Postęp dokonujący się zarówno w alergologii molekularnej, jak i w technologii bioczipów umożliwił jednak powstanie zminiaturyzowanego testu alergologicznego (14), dzięki któremu wykonując jedno badanie przy użyciu minimalnych objętości surowicy chorego, możemy zbadać reaktywność surowicy badanej w stosunku do stu lub więcej cząsteczek alergenowych. Technika badania opiera się na odwróconym teście immunologicznym, w którym unieruchomione na płytce alergeny reagują z surowicą chorego. Przyłączone do alergenów swoiste przeciwciała są następnie inkubowane ze znakowanymi fluorescencyjnie monoklonalnymi przeciwciałami anty IgE. Ostatecznego pomiaru dokonuje się laserowo poprzez pomiar dwóch fal świecenia.

W badaniach oceniających czułość i swoistość testu mikrooznaczeń udowodniono, że jest to metoda z wyboru



Ryc. 3 (14)

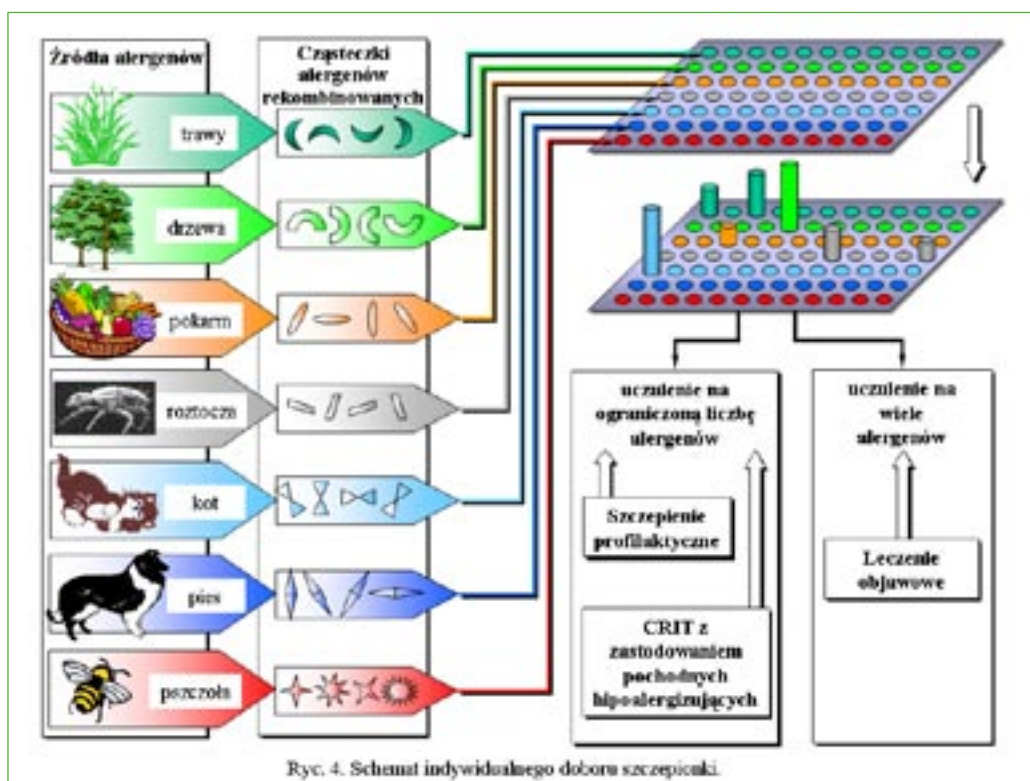
Na szklanej płytce znajdują się okienka odgraniczone od siebie teflonowymi ramkami. W każdym z takich okienek o wymiarach 7×7 mm znajdować się może do 800 rozmieszczonych trójkami alergenów (w nanogramowych ilościach) unieruchomionych na płytkach. Ze względu na hydrofobowy charakter teflonu każde okienko stanowi studzienkę reakcyjną zawierającą identyczne szeregi białek. W ten sposób dodając do poszczególnych studzienek osocze różnych chorych na jednym szkiełku można wykonać kilka badań, u każdego chorego oznaczając pełen panel białek alergenowych – do ponad stu w pojedynczym oznaczeniu. Płytki są następnie inkubowane z przeciwciałami anty IgE znakowanymi fluoresceiną, które umożliwiają w kolejnym etapie określenie obecności świecenia.

CRD alergii typu I, która powinna stanowić podstawę ustalenia, a następnie monitorowania terapii alergii ukierunkowanej na pacjenta (14).

Do tej pory zbadano wiele różnych alergenów rekombinowanych pod kątem ich zastosowania w testach skórnych u chorych z alergią oraz u osób zdrowych (37, 29). Zarówno w punktowych testach skórnych, jak i w testach śródskórnych dowiedziono ich wysokiej specyficzności i bezpieczeństwa. Diagnostyczna czułość pojedynczego alergenu jest generalnie mniejsza niż w przypadku ekstraktów alergenowych, ale można ją zwiększyć stosując mieszanki alergenowe. Testy skórne z pojedynczymi alergenami pozwalają ponadto na interesujący wgląd w korelacje pomiędzy sensytyzacją *in vivo* i *in vitro* na dany alergen.

Alergeny rekombinowane w terapii chorób alergicznych:

Immunoterapia alergenowa swoista stanowi jedyne przyczynowe leczenie alergii IgE-zależnej. W formie konwencjonalnej opiera się ona na wykorzystaniu odpowiednio standaryzowanych wyciągów alergenowych, co ma prowadzić do przekierowania odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1. W wielu badaniach dowiedziono skuteczności tego postępowania, niemniej jednak wiąże się ono z wieloma niedogodnościami, takimi jak na przykład działania niepożądane wynikające z jednej strony z wysokiej antygenowości preparatów, a z drugiej ze zmiennymi stężeniami w ekstrakcie alergenów głównych. Inną wadą klasycznej immunoterapii jest jej nieskuteczność w pewnej grupie chorych. Częściowo wynika ona z niedoskonałości obecnie sto-



Ryc. 4. Schemat indywidualnego doboru szczepionki.

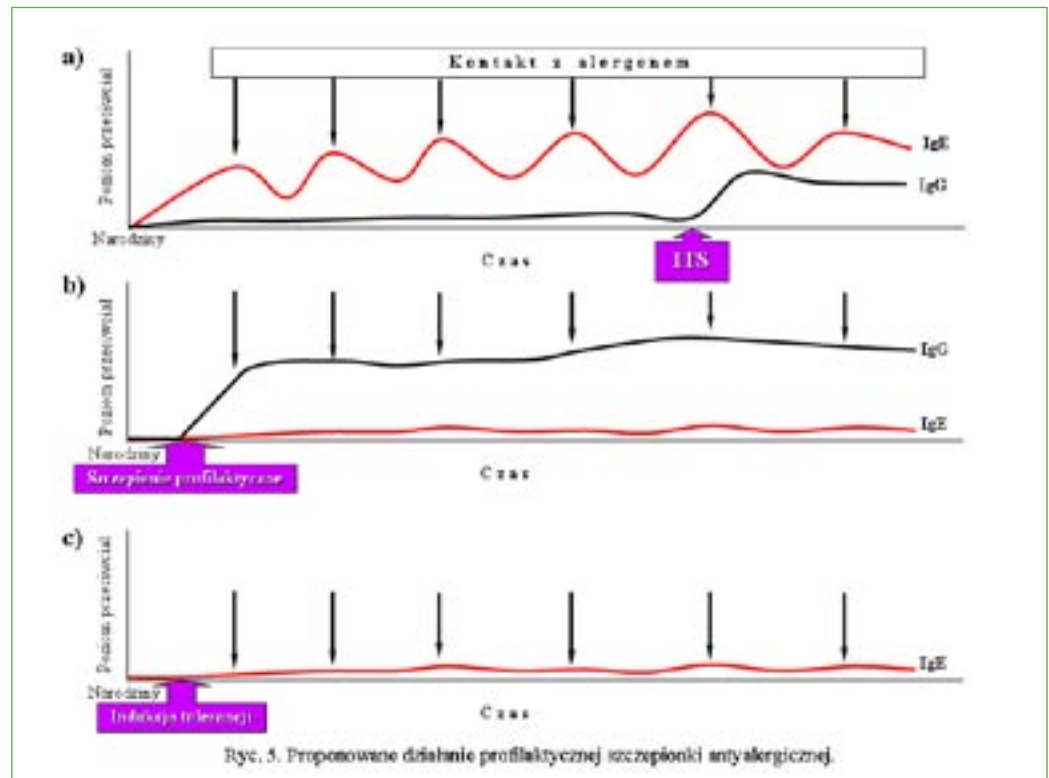
Ryc. 4 (33)

Metodą klonowania zostały wytworzone alergeny rekombinowane zawierające większość mających znaczenie i obecnych w różnych źródłach alergenowych epitopów. Cząsteczki alergenów rekombinowanych mogą być wykorzystane w diagnostyce – np. w teście mikrooznaczeń, który umożliwia określenie profilu reaktywności chorego. Na podstawie uzyskanych z badań informacji można rozróżnić chorych, którzy są uczuleni na ograniczoną liczbę alergenów od pacjentów, którzy reagują na wiele różnych alergenów. U chorych z alergią monoważną może być prowadzona immunoterapia dobrana na podstawie profilu reaktywności celowana na konkretne alergeny. Chorzy z alergią wieloważną większe korzyści uzyskują z leczenia objawowego. Obecnie dla większości alergenów stworzone są ich hipoalergizujące pochodne. Mogą one znaleźć zastosowanie w CRIT ze zmniejszonym ryzykiem wyindukowania anafilaktycznych działań niepożądanych. Odkrycie pochodnych hipoalergizujących, które objęłyby większość znaczących źródeł alergenowych umożliwiłoby stworzenie profilaktycznych szczepionek przeciwalergiczych.

sowanej diagnostyki, która nie pozwala na wytworzenie indywidualnej szczepionki. Duże znaczenie ma jednak również sam wyciąg, który składa się z mieszaniny różnych, często nie do końca określonych składników alergenowych występujących w różniących się nawet między poszczególnymi seriami tych samych preparatów stężeniach. Uważa się, że aby immunoterapia była skuteczna dawka alergenu w leczeniu podtrzymującym powinna wynosić 10 - 20 µg/ml. O ile możliwe jest osiągnięcie takiego stężenia w głównych grupach, o tyle alergeny z grup pobocznych uczulające 20 - 30% chorych znajdują się w szczepionkach w znacznie niższym stężeniu. Stanowi to kolejną przy-

czynę nieskuteczności leczenia. Innym problemem związanym z immunoterapią opartą na wyciągach alergenowych jest powstawanie nowych uczuleń. Zjawisko to spowodowane jest częstym zanieczyszczeniem wyciągów alergenowych białkami pochodzącymi z innych źródeł.

Ponieważ większość problemów związanych z dotychczasowym leczeniem wynika z niedoskonałości wyciągów alergenowych, wydaje się, iż zastąpienie ich preparatami alergenów rekombinowanych może stanowić istotny krok ku uzyskaniu większej skuteczności i bezpieczeństwa terapii. Opisana wyżej diagnostyka, umożliwiająca dokładną analizę uczulenia na poszcze-



Ryc. 5 (33)

Proponowane działanie profilaktycznej szczepionki antyalergiczej.

a) U chorych z alergią nadwrażliwość pojawia się krótko po urodzeniu ze względu na kontakt z alergenem. Powtarzająca się stymulacja alergenowa w sposób ciągły pobudza wytwarzanie alergenowo swoistych przeciwciał klasy IgE przyczyniając się w ten sposób do nasilania i rozszerzania objawów alergii. U chorych uczulonych poziom swoistych IgG jest niski. Immunoterapia, która przeciwdziała powstałemu już uczuleniu, związana jest głównie z silnym indukowaniem alergenowo swoistych przeciwciał IgG i modulacją komórek T.

b) Szczepienie profilaktyczne hipoalergizującymi pochodnymi alergenów tuż po urodzeniu mogłoby indukować wzrost alergenowo swoistych przeciwciał IgG, które poprzez tworzenie kompleksów z alergenami zapobiegałyby sensytyzacji lub nasilaniu wytwarzania alergenowo swoistych IgE w związku z utrzymującą się ekspozycją na naturalne alergeny. W efekcie odpowiedź IgE nie rozwinęłaby się lub pozostałaby na niskim poziomie.

c) Indukcja tolerancji wywołana hipoalergizującymi pochodnymi alergenów we wczesnym okresie życia mogłaby zapobiegać rozwojowi odpowiedzi IgE zaistniałej po kontakcie z alergenem

gólne składniki ekstraktu toruje drogę immunoterapii ukierunkowanej na pacjenta, w której stosuje się szczepionki oparte dokładnie na tych komponentach ekstraktów alergenowych, na które dany chory jest uczulony. Umożliwi to być może w nieodległym czasie prowadzenie rzeczywistej swoistej immunoterapii u wybranych pacjentów. CRIT może być też terapią znacznie lepiej dobraną do lokalnej populacji. Ze względu na stały skład alergenowy szczepionki, a także brak zanieczyszczeń, nie powinna wywoływać nowych uczuleń. Na ryc. 5 przedstawiono zasadę indywidualnego doboru szczepionki dla chorego.

Zastosowanie wariantów hipoalergicznym preparatów alergenów rekombinowanych znakomicie poprawia bezpieczeństwo terapii, a stworzenie nowych cząsteczek (koniugaty z immunostymulatorami) może w znaczący sposób wpłynąć na jej skuteczność. Obecnie trwa wiele badań klinicznych z wykorzystaniem alergenów rekombinowanych w praktyce klinicznej. Jedno z nich z zastosowaniem mieszanki dzikich szczepów alergenów tymotki prowadzone jest w naszym ośrodku (badanie III fazy).

Konwencjonalna immunoterapia swoista związana jest z nieodłączną trudnością przeciwdziałania już istniejącej pa-

tologicznej odpowiedzi immunologicznej. Jeśli jednak myśli się o terapii alergii, należałoby rozważyć także możliwość profilaktyki, czyli szczepień przed sensytyzacją i pojawieniem się nasilonej odpowiedzi IgE z przekierkowaniem limfocytów T. U nieleczonych chorych kontakt z alergenami może prowadzić do stałego nasilania się odpowiedzi T - komórkowej i powstawania przeciwciał IgE. W cięższych przypadkach jest to przyczyną rozwoju alergii rozumianej jako pojawienie się klinicznie cięższych objawów (np. astmy). Jeśli jednak we wczesnym okresie życia potrafilibyśmy zastosować profilaktykę, możliwe mogłoby stać się zapobieganie rozwojowi alergii. Cel ten można by osiągnąć przez zastosowanie profilaktycznych szczepień. Szczepionki miałyby indukować fizjologiczną, niezależną od IgE, specyficzną dla alergenu odpowiedź immunologiczną związaną z wytworzeniem przeciwciał IgG – podawane w ten sposób jak szczepionki przeciwko czynnikom infekcyjnym. Rekombinowane hipoalergiczne pochodne alergenów mogłyby zostać wykorzystane celem indukcji tolerancji T - komórkowej i zapobiegania rozwojowi alergii.

Podsumowanie:

Odkrycie trzeciorzędowej struktury większości alergenów, a także otrzymanie ich w formie alergenów rekombinowanych spowodowało lawinowy wzrost ilości badań poświęconych możliwościom praktycznego ich wykorzystania. W pracy przedstawiono nową metodę otrzymywania białek rekombinowanych - ET rekombinację, która z pewnością spowoduje, że możliwe będzie wytwarzanie nawet bardzo złożonych cząsteczek białkowych w dużej ilości, a w dodatku stosunkowo tanio. Znajduje zasto-

sowanie w różnych wskazaniach, w tym w diagnostyce i w terapii chorób alergicznych. Wydaje się, że dzięki prowadzonym badaniom bliżsi stajemy się zrozumienia, dlaczego stosowana do tej pory diagnostyka jest tak niedoskonała, a także dlaczego chorzy tak różnie odpowiadają na podstawowe leczenie stosowane w alergii – immunoterapię swoistą. W aspekcie praktycznym dzięki alergenom rekombinowanym bardzo ważne zdaje się zrozumienie mechanizmu powstawania alergii krzyżowej oraz możliwość rozstrzygnięcia już na etapie diagnostyki, czy u danego chorego mamy do czynienia z alergią krzyżową, czy też podwójną sensytyzacją. Ma to ważne implikacje terapeutyczne. Prawdziwy przełom w diagnostyce chorób alergicznych stanowi test mikrooznaczeń wykrywający uczulenia na ponad 100 cząstek alergenowych w prosty sposób, przy użyciu małych ilości surowicy. Nowe możliwości diagnostyki przyczyniają się z kolei do wprowadzenia skuteczniejszej immunoterapii opartej o ocenę pełnego profilu nadwrażliwości pacjenta. Terapia ta lepsze rezultaty z powodu możliwości tworzenia hipoalergicznych wariantów alergenów rekombinowanych, a ponadto ma szansę stać się leczeniem bezpieczniejszym. Pojawiają się także doniesienia o innych formach terapii, takich jak na przykład szczepionki DNA. Coraz częściej myśli się też o wprowadzeniu szczepień profilaktycznych. Miałyby one już na etapie wczesnego dzieciństwa zapobiegać rozwojowi choroby alergicznej.

W najbliższym czasie należy oczekiwać pojawienia się na rynku farmaceutycznym pierwszych szczepionek opartych na alergenach rekombinowanych.

Piśmiennictwo:

1. Arquint O, Helbling A., Cramer R. et al.: Reduced in vivo allergenicity of Bet v1d isoform, a natural component of birch pollen. *J. Allergy Clin Immunol.* 1999. 104: 1239 - 1243.
2. Arruda L. K. P., Thomas W. R.: "Recombinant Allergens: new diagnostic and Therapeutic Products, 57th AAAAI annual meeting 18 march, 2001
3. Baldrick P., Richardson D., Wheeler A.W. et al.: Safety evaluation of a new allergy vaccine containing the adjuvant monophosphoryl lipid A (MPL) for the treatment of grass pollen allergy. *J. Appl Toxicol.* 2004 Jul - Aug; 24(4): 261 - 8.
4. Bohle B., Breitwiese A., Zwolfer B. et al.: A novel approach to specific allergy treatment: the recombinant fusion protein of a bacterial cell surface (S - layer) protein and the major birch pollen allergen Bet v 1 (rSbsC - Bet v 1) combines reduced allergenicity with immunomodulating capacity. *J. Immunol.* 2004 Jun 1; 172(11): 6642 - 8.
5. Bohle B., Vieths S.: Improving diagnostic tests for food allergy with recombinant allergens. *Methods.* 2004 Mar; 32(3): 292 - 9.
6. Breiteneder H., Kreibitz M., Wiedemann U., Wagner B et al.: Rapid production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana* and their impact on diagnosis and therapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2001 Jan - Mar; 124 (1 - 3): 48 - 50.
7. Ferreira F., Ebner C., Kramer B. et al.: Modulation of IgE reactivity of allergens by site - directed mutagenesis: potential use of hypoallergenic variants for immunotherapy. *FASEB* 1998 Feb; 12: 231 - 242.

8. Focke M, Linhart B., Hartl A. et al.: Non anaphylactic surface - exposed peptides of the major birch pollen allergen, Bet v1, for preventive vaccination. *Clin. Exp. Allergy*. 2004 Oct; 34(10): 1525 - 33.
9. Focke M., Mahler V., Ball T.: Nonanaphylactic synthetic peptides derived from B cell epitopes of the major grass pollen allergen, Phl p 1, for allergy vaccination. *FASEB J*. Published online July 24, 2001.
10. Gangleberger E., Sponer B., Scholl I., et al.: Allergen mimotopes for 3 - dimensional epitope search and induction of antibodies inhibiting human IgE. *FASEB J* 2000, 14: 2177 - 2184.
11. Ganglberger E., Sponer B., Scholl I, et al.: Monovalent fusion proteins of IgE mimotopes are safe for therapy of type I allergy. *FASEB J* 2001 Sep 15: 2524 - 2526
12. Horner A.A., Takabayashi K., Beck L., et al.: Optimised conjugation ratios lead to allergen immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugates with retained immunogenicity and minimal anaphylactogenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002 Sep; 110(3): 413 - 20.
13. Horner A.A., Van Uden J.H., Zubeldia J.M. et al.: DNA - based immunotherapeutics for the treatment of allergic disease. *Imunol Rev.* 2001 Feb; 179: 102 - 18.
14. Jahn - Schmid B., Harwenegg C., Hiller R. et al.: Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen - specific serum immunoglobulin E. *Clin. Exp. Allergy* 2003; 33: 1442 - 1449.
15. Jutel M., Jager L., Meyer H., et al.: Specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens is clinically efficacious [abstract]. *Proceedings of the XXIII European Congress of Allergology and Clinical Immunology*; 12 - 16 June 2004; Amsterdam. Hannover: Pharmaservice; 2004. p. 142.
16. Kurowski M., Kuna P.: Szczepionki DNA – nowy aspekt swoistej immunoterapii chorób alergicznych. *Alergia Astma Immunologia*. 1999 4(1): 13 - 17.
17. Linhart B., Jahn - Schmid B., Verdino P. et al.: Combination vaccines for the treatment of grass pollen allergy consisting of genetically engineered hybrid molecules with increased immunogenicity. *FASEB J* 2002; 16: 1301 - 1303.
18. Liu Y.H., Kao M.C., Lai Y.L. et al.: Efficacy of local nasal immunotherapy for Dp2 - induced airway inflammation in mice: Using Dp2 peptide and fungal immunomodulatory peptide. *J. Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 301 - 310.
19. Mahler V., Vrtala S., Kuss O., et al.: Vaccines for birch pollen allergy based on genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen, Bet v1. *Clin. Exp. Allergy* 2004; 34: 115 - 122.
20. Marshall J.D., Abtahl S., Eiden J.J., et al.: Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen Amb a 1 allergen promotes Th - 1 cytokine expression while downregulating Th - 2 cytokine expression in PBMCs from human patients with ragweed allergy. *J. Allergy Clin. Immunology* 2001, 108: 191 - 197.
21. Mothes N., Hoinskill M., Drachonberg K.J., et al.: Allergen - specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A adjuvant vaccine: reduced seasonally boosted IgE production and inhibition of basophil histamine release by blocking antibodies. *Clin Exp. Allergy* 2003; 33: 1198 - 1208.
22. Moverare R., Elfman L., Vesterinen E., Metso T., Haahtela T.: Development of new IgE reactivities to allergenic components in pollen extracts during specific immunotherapy studied with immunoblotting and the Pharmacia CAP system. *Allergy* 2002, 57: 423 - 430
23. Muylers P.P.J., Zhang Y., Benes V., et al.: ET recombination: DNA engineering using Homologous Recombination in *E. Coli*. *Bacterial Artificial Chromosomes, Volume 2: Functional Studies*. March 2004: 107 - 122.
24. Mygind N., Dahl R., Pedersen S., *Alergologia pod redakcją J. Kruszewskiego i W. Silnego*, 1998, 81 - 83, 400.
25. Niederberger V., Horak F., Vrtala S. et al.: Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004 Oct 5; 101 Suppl 2: 14677 - 82. Epub 2004 Aug.
26. Niederberger V., Niggemann B., Kraft D. et al.: Evolution of IgM, IgE and IgG(1 - 4) antibody responses in early childhood monitored with recombinant allergens components: implications for class switch mechanisms. *Eur. J. Immunol.* 2002 Feb; 32(2): 576 - 84.
27. Niederberger V., Valenta R.: Recombinant allergens for immunotherapy. Where do we stand? *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 4: 549 - 554.
28. Oldfield W.L.G., Larche M., Key A.B.: Effect of T - cell peptides derived from Fel d 1 on allergic reactions and cytokine production in patients sensitive to cats: a randomised control trial. *Lancet* 2002; 15: 2042 - 2044.
29. Schmid - Grendelmeier P., Cramer R.: Recombinant allergens for skin testing. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2001 Jun; 125(2): 96 - 111.
30. Tada Y., Nakase M., Adachi T. et al.: Reduction of 14 - 16 kDa allergenic proteins in transgenic rice plants by antisense gene. *FEBS Lett.* 1996 Aug 12; 391(3): 341 - 5.
31. Thunborg S., Gafvehn G.. Et al.: A novel allergy vaccine based on genetically modified allergens induce immunological alterations in birch pollens allergic patients (abstract), *Proceedings of the XXIII European Congress of Allergology and Clinical Immunology*; 12 - 16 June 2004; Amsterdam, Hannover; Pharmaservice; 2004. p. 144.
32. Tighe H., Takabayashi K., Schwartz D., et al., : Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen amb a1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000 Jul; 106(1 Pt 1): 124 - 34.
33. Valenta R.: The future of antigen - specific immunotherapy of allergy. *Nature Reviews Immunology*. 2002; 2: 446 - 453.
34. Valenta R., Kraft D.: From allergen structure to new forms of allergen - specific immunotherapy. *Curr. Opinion Immunology* 2002, 14: 718 - 727.
35. Van der Veen M.J., Mulder M., Wittematn A.M., et al.: False positive skin prick test responses to commercially available dog dander extracts caused by contamination with house dust mite. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996; 98: 1028 - 1034.
36. Van Hage Hamsten M., Johansson B., Roquet A., et al.: Nasal challenges with recombinant derivatives of the major birch pollen allergen Bet v1 induce fewer symptoms and lower mediator release than rBet v1 wild type in patients with allergen rhinitis. *Clin. Exp. Allergy* 2002; 32: 1446 - 1453.
37. Van Hage - Hamsten M., Pauli G.: Provocation testing with recombinant allergens. *Methods*. 2004 Mar; 32(3): 281 - 91.
38. Van Uden J., Raz E.: Immunostimulatory DNA and applications to allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999 Nov; 104(5): 902 - 10.
39. Vieths S., Scheurer S., Reindl J. et al.: Optimized allergen extracts and recombinant in diagnostic applications. *Allergy* 2001: 56 (Suppl. 67) 78 - 82.
40. Vrtala S., Akdia C., Budak F., et al.: T cell epitope - containing hypoallergenic recombinant fragments of the major birch pollen allergen, Bet v1, induce blocking antibodies. *J. Immunol.* 1000; 165: 6653 - 6659.
41. Wagner B., Fuchs H., Adhami F., et al.: Plants virus expression systems for transient production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana*. *Methods*. 2004. Mar; 32(3): 227 - 34.
42. Wallner M., Gruber P., Radauer C., Maderegger B., Susani M., et al.: Lab scale and medium scale production of recombinant allergens in *Escherichia coli*. *Methods*. 2004 Mar; 32(3): 219 - 26.

Czy wiesz, że...

... zakończył się projekt Unii Europejskiej SAFE (*Plant food allergies: field to tables strategies for reducing their incidence in Europe*), realizowany przez konsorcjum ośrodków naukowo-badawczych z 7 krajów Unii. Celem projektu była ocena skali problemów związanych z alergią pokarmową oraz wypracowanie rozwiązań redukujących jej występowanie w Europie.

Modelowym pokarmem wybrano jabłko z racji dużej częstości alergii na owoce oraz znaczenia jabłka w europejskim rolnictwie.

Scharakteryzowano szczegółowo wszystkie 4 alergeny jabłka (*Malus domestica*):

Alergen	Właściwości biochemiczne	Charakterystyka
Mal d1	Rodzina białek PR 10 (<i>pathogenesis - related proteins</i>), nośnik steroidów roślinnych.	Jest alergenem głównym, homologicznym z Bet v1. Wywołuje łagodne, miejscowe objawy – zespół OAS. Przeciwciała obecne głównie w surowicy pacjentów z Europy Środkowej i Północnej.
Mal d2	Rodzina białek PR 5, białko podobne do taumatyny (TLP).	Cząsteczki TLP zawierają 16 reszt cysteinowych, połączonych 8 mostkami dwusiarczkowymi. Duża oporność na proteolizę – może indukować ciężkie reakcje systemowe. Inne TLP stwierdzono w wyciągu kiwi, wiśni, winogron (możliwa reaktywność krzyżowa).
Mal d3	Rodzina białek PR 14, białko transferowe lipidów (LTP).	Z uwagi na obecność mostków dwusiarczkowych, cząsteczka oporna na proteolizę. Może wywoływać reakcje anafilaktyczne. Gromadzi się w skórce jabłka. Znaczna reaktywność krzyżowa z innymi LTP. Przeciwciała obecne głównie w surowicy pacjentów z Hiszpanii i Włoch.
Mal d4	Profilina	Homolog alergenu minor pyłku brzozy Bet v2. Znaczenie kliniczne dyskusyjne.

Tradycyjne wyciągi jabłka do diagnostyki *in vivo* z powodu degradacji alergenów w czasie przygotowywania ekstraktu często dają wyniki fałszywie ujemne. Metody *prick - to - prick* nie da się wystandaryzować.

Wyciągi do testów *in vitro* mogą być chronione przed utratą aktywności dodatkiem inhibitorów, ale na swoistość oznaczeń negatywnie wpływają przeciwciała dla determinant węglowodanowych i profiliny. Autorzy projektu zalecają stosowanie w diagnostyce oczyszczonych alergenów major i minor jabłka.

Metoda interferencji RNA pozwala na ograniczenie ekspresji alergenu Mal d1 i stwarza nadzieję na wyhodowanie hypoalergenowej odmiany jabłka.

... opisano pierwszy w Europie przypadek atopowego zapalenia rdzenia kręgowego (*AM - atopic myelitis*). Występowanie tego rzadkiego zespołu chorobowego było dotychczas ograniczone do Japonii, w której opisano 79 przypadków AM.

Choroba dotyka pacjentów z atopowym zapaleniem skóry, *rhinitis* i astmą oskrzelową, w młodym lub średnim wieku. Pierwszymi i dominującymi

Joanna Nizio - Mąsior
Nexter/Allergopharma

objawami są parestezje/dyzestezje, często obserwuje się progresję objawów i zmienność ich nasilenia. U większości pacjentów występuje hyperrefleksja, do rzadkości natomiast należy znaczne osłabienie siły mięśniowej.

Odchylenia w obrazie płynu mózgowo - rdzeniowego są rzadkie i niewielkie.

W większości przypadków odnotowano bardzo wysokie stężenie całkowitej i swoistej dla roztoczy kurzu domowego IgE w surowicy.

Badanie wywołanych potencjałów ujawnia nieprawidłowości w zakresie kończyn górnych i dolnych.

W obrazowaniu metodą magnetycznego rezonansu jądrowego stwierdza się zmiany o wysokiej intensywności sygnału w szyjnym i piersiowym odcinku rdzenia kręgowego. W biopsjach zmian opisywano nacieki komórek jednojądrzastych i eozynofików wokół naczyń włosowatych, małych żył i w tkance nerwowej, mielina i aksony były uszkodzone w jednakowym stopniu. Dominowała subpopulacja limfocytów T CD8+.

Cytometria przepływowa komórek jednojądrzastych krwi obwodowej wykazała wzrost odsetka subpopulacji limfocytów T CD3+CD8+ oraz CD4+CD45RO+CD30+. Oceniony śródkomórkowo wskaźnik IFN γ /IL - 4 w limfocytach T CD4+ krwi obwodowej był istotnie niższy w porównaniu do grupy kontrolnej.

... objawy alergii mogą ustąpić po przeszczepie szpiku kostnego. Dotychczas opisywano przeniesienie alergii na orzeszki ziemne od dawcy szpiku kostnego lub wątroby do uprzednio nieuczulonego biorcy. Autorzy doniesienia opisują 12 - letniego chłopca z wywiadem wyprysku atopowego od 6 tygodnia życia. Od 1 r.ż. pojawiały się pokrzywka i obrzęk naczynioruchowy po spożyciu grochu i soczewicy, od 2 r.ż. również po zjedzeniu orzeszków ziemnych. W wieku 2 lat stężenie całkowitej IgE w surowicy wynosiło 5820 IU/ml, a sIgE dla mleka krowiego i orzeszków mieściło się odpowiednio w 3 i 4 klasie RAST. W 7 r.ż. stężenie cIgE wynosiło 2533 IU/ml, sIgE dla orzeszków 23, 1 IU/ml (klasa 4). Objawy wyprysku ustąpiły w 5 r.ż., dolegliwości astmatyczne o niewielkim nasileniu utrzymywały się.

W 10 r.ż. wykonano przeszczep szpiku kostnego od dawcy niespokrewnionego o nieustalonym wywiadzie co do atopii. Wskazaniem do przeszczepu był pierwotny złożony niedobór odporności.

Stężenie całkowitej IgE w drugim miesiącu po przeszczepie obniżyło się do 100 IU/ml, po 17 miesiącach do 40 IU/ml, nie wykryto zaś wcale sIgE dla orzeszków ziemnych. Test punktowy z orzeszkami jest ujemny, podobnie próba prowokacyjna z 8 gramami orzeszków. Chłopiec regularnie spożywa orzeszki i masło orzechowe bez żadnych dolegliwości.

Wydolność jego układu immunologicznego po przeszczepie jest zadowalająca, z prawidłową produkcją IgG i IgM, nieco obniżonym stężeniem IgA (0, 38g/l, norma: 0, 8 - 2, 8g/l).

... pacjenci uczuleni na bylicę mogą nie tolerować musztardy. W literaturze dobrze udokumentowano zespół seler - bylica - brzoza - przyprawy, którego objawy wiąże się z profilinami oraz homologami alergenu głównego bylicy Art v1. Te same alergeny mogą wywoływać nietolerancję musztardy, rośliny należącej do rodziny *Brassicaceae*, z której nasion uzyskuje się popularny składnik sosów. Autorzy hiszpańscy scharakteryzowali grupę 38 pacjentów nadwrażliwych na musztardę. Alergia manifestowała się głównie objawami zespołu OAS (47, 4% pacjentów), pokrzywką i obrzękiem naczynioruchowym (42, 1%), anafilaksją (10, 5%), w jednym przypadku indukowaną wysiłkiem. U wszystkich pacjentów współistniała alergia na jeden lub więcej pokarmów z rodziny *Brassicaceae*, głównie kapustę, kalafior, brokuły. Większość była też uczulona na orzechy (97, 4%), orzeszki (94, 7%), kukurydzę (78, 9%), owoce z rodziny *Rosaceae*, np. morelę, brzoskwinie (89, 5%). Objawy pyłkowicy prowokowała najczęściej bylica (97, 4% pacjentów), co skłania do szczególnie starannego wywiadu i testów pokarmowych w kierunku alergii na musztardę w grupie chorych uczulonych na bylicę.

Opracowano na podstawie:

1. Hoffmann - Sommergruber K.: The SAFE project: plant food allergies: field to table strategies for reducing their incidence in Europe an EC - funded study *Allergy* 2005; 60: 436 - 442.
2. Zoli A., Mariano M., Fusari A. i wsp.: Atopic myelitis: first case report outside Japan? *Allergy* 2005; 60: 410 - 411.
3. O'B Hourihane J., Rhodes H. L., Jones A. M. i wsp.: Resolution of peanut allergy following bone marrow transplantation for primary immunodeficiency *Allergy* 2005; 60: 536 - 537.
4. Figueroa J., Blanco C., Dumpierrez A. G. i wsp.: Mustard allergy confirmed by double - blind placebo - controlled food challenges: clinical features and cross - reactivity with mugwort pollen and plant - derived foods *Allergy* 2005; 60: 48 - 55.

Uwagi do założeń kierunków zmian w systemie refundacji leków w Polsce

Z inicjatywy kierownictwa departamentu polityki lekowej Ministerstwa Zdrowia opracowano tezy do dyskusji, dotyczące założeń kierunków zmian w systemie refundacji leków. Tezy do dyskusji opracował zespół składający się w większości z lekarzy klinicystów, zaś wyniki dyskusji zostały opracowane przez zastępcę dyrektora ds. polityki lekowej ministerstwa.

Obszerny dokument składa się z dwóch zasadniczych części:

1. zawierającej analizę istniejącej sytuacji w zakresie refundacji leków,
2. propozycje zmian.

Ad. 1. Istniejący sposób refundowania leków upoważnia do ocen niezwykle krytycznych. Autorzy opracowania dostrzegają bałagan kompetencyjny, brak jasnych kryteriów refundacji leków, zwracają uwagę na konieczność silniejszego oparcia praktyki na dowodach naukowych, widzą potrzebę częstsze- go wykorzystania analiz farmakoekonomicznych. W dokumencie stwierdza się też brak powszechnej informacji o lekach refundowanych, zaniechanie monitorowania i kontroli ordynacji lekarskiej, mało precyzyjne informowanie wnioskodawców o przyczynach nie uwzględnienia wniosków o refundację. Wysoce niewłaściwy stan rzeczy jest - jak się wydaje - uwarunkowany wielością ośrodków decyzyjnych: ministra zdrowia, ministra finansów i resortu gospodarki.

Ad. 2. Jako rzecz pozytywną potraktować należy podjętą przez Ministerstwo Zdrowia inicjatywę zmierzającą do dia-

gnozji istniejącego stanu rzeczy oraz poszukiwania rozwiązań, których celem ma być zasadnicza poprawa mechanizmu refundacji leków.

W krótkim szkicu nie sposób odnieść się szczegółowo do przedstawionych propozycji. Proponowane kierunki zmian budzą jednak wiele zastrzeżeń:

- zastąpienie międzyresortowego zespołu do spraw gospodarki lekami komisją refundacyjną nie prowadzi samo przez się do pozytywnych zmian.

Mamy tutaj do czynienia z zastąpieniem jednego organu biurokratycznego innym. Zarówno międzyresortowy zespół do spraw gospodarki lekami, jak i komisja refundacyjna, są ciałami tworzonymi według tzw. klucza. Proponowana zmiana nie może zatem mieć pozytywnego wpływu na system refundacji leków,

- decyzje refundacyjne powinny być oparte wyłącznie na rzetelnych badaniach naukowych i analizach farmakoekonomicznych. Niedopuszczalnym zdaje się jakiegokolwiek odstępstwo od tej zasady (*evidence based medicine* – medycyny opartej na dowodach naukowych), a wprowadzenie właśnie takiego rozwiązania tezy te przewidują. Prowadzi to bowiem do decyzji refundacyjnych na podstawie kryteriów uznaniowych,
- nie wydaje się także uzasadnione ponowne weryfikowanie opublikowanych już badań,
- negatywnie należy ocenić zawartą w tezach propozycję powierzenia

- ocen, docelowo ostatecznych, Agencji Oceny Technologii Medycznych. W intencji Autorów też agencja ta miałaby w gruncie rzeczy dokonywać ponownej, wiążącej oceny badań naukowych oraz analiz farmakoekonomicznych, co prowadziło do naruszenia wcześniej wyrażonej zasady. Wiara Autorów projektu w nieomylność „grupy bardzo dobrze wyszkolonych, obiektywnych profesjonalistów” nie wytrzymuje krytyki,
- proponowana wysoce zbiurokratyzowana struktura podejmowania decyzji o refundacji leków prowadzić musi do wydłużenia procesów decyzyjnych. Liczba koniecznych decyzji, uniemożliwi w krótkim czasie sprawne funkcjonowanie organu opiniującego,
 - można mieć zastrzeżenia co do precyzji sformułowań, jak i rozwiązań merytorycznych. Wydaje się również uzasadnione podjęcie starań mających na celu uproszczenie tworzonych aktów normatywnych. Pamiętajcie bowiem trzeba, że mają z nich korzystać osoby nieposiadające przygotowania prawniczego. Nie do zaakceptowania jest również propozycja objęcia omawianej problematyki jednym tylko aktem normatywnym.

KOMUNIKAT

Uprzejmie informujemy, że

alergeny do testów prowokacyjnych

produkcji Allergopharma Joachim Ganzer KG można zamawiać w firmie Nexter Sp z o. o.

Cena brutto jednego alergenu wraz z roztworem kontrolnym ujemnym wynosi 135 PLN. Czas oczekiwania na realizację zamówienia - ok. 2 tygodni. Lista dostępnych alergenów jest zbliżona do oferty testów skórnych i można ją znaleźć w Katalogu Produktów Alergenowych oraz na stronie www.nexter.pl

