



Komponenty pyłku traw na przykładzie tymotki

Grass pollen components on the example of Timothy

S U M M A R Y

Grasses belong to major sources of inhaled allergens. The major timothy (*Phleum pratense*-Phl p1) pollen allergen resembles the epitopes of natural group I grass allergens and is recognized by more than 95% of grass-pollen-allergic patients. IgE against rPhl p 1 is a Poaceae family-specific biomarker for genuine sensitization to grass pollen. Phl p 4 is a major pollen allergen but exhibits lower allergenicity than others. Almost 75% of patients allergic to grass pollen display IgE reactivity to group 4 allergens. Phl p 5 allergen are small protein, that consist of two domains, recognized by more than 90%. They belong to the most potent respiratory allergens, but prolonged allergen exposure is evidently necessary to induce sensitization. Phl p 6 a group 6 acidic, non-glycosylated protein, for which N-terminal sequencing reveals homology to an internal region of group 5 allergens, but without similar cross-reactivity. Phl p 7 belongs to a family of highly cross-reactive calcium-binding pollen allergens, contains the majority of relevant IgE epitopes occurring in pollen species of different plants. Phl p 12 belong to wide known panallergen profilin. sIgE against Phl p 2, Phl p 3, Phl p 11, Phl p 13 and others components were described too. Little or no correlation between Phl p-specific IgE levels and T cell responses was found. The repertoire of antigens recognized by T cells is much broader than IgE-binding allergens.

Trawy należą do ważnych źródeł alergenów wziewnych. Główny rekombinowany alergen pyłku tymotki (*Phleum pratense*)- rPhl p1 odtwarza naturalne epitopy grupy I alergenów i jest rozpoznawany przez ponad 95% chorych z pyłkowicą traw. sIgE przeciw rPhl p 1 stanowi swoisty znacznik rzeczywistego uczulenia na trawy z rodziny Poaceae. Phl p 4 jest również alergenem głównym, lecz wykazuje mniejszą niż inne siłę uczulającą. Niemal 75% pacjentów uczulonych na trawy reaguje wobec 4 grupy alergenów. Alergen Phl p 5 to małe białka, złożone z dwóch domen, rozpoznawane przez ponad 90%. Należy do najsilniejszych aeroalergenów. Jednak do wyzwolenia uczulenia na grupę V niezbędna jest wydłużona ekspozycja. Phl p 6 to kwaśne, nie glikozylowane białko, którego N-końcowa sekwencja wykazuje podobieństwo do wewnętrznego regionu grupy V, lecz bez reaktywności krzyżowej. Phl p 7 należy do wysoce reaktywnych krzyżowo białek wiążących wapń, które zawierają najwięcej istotnych epitopów w porównaniu do homologów w pyłku innych roślin. Phl p 12- profilina, to szeroko znany panalergen. Opisano także sIgE wobec Phl p 2, Phl p 3, Phl p 11, Phl p 13 i innych komponent. Korelacja pomiędzy poziomem sIgE wobec Phl p, a odpowiedzią komórek T jest niewielka lub żadna. Repertuar antygenów rozpoznawanych przez komórki T jest znacznie szerszy, niż alergenów wiążących IgE.

Buczylko K.: Komponenty pyłku traw na przykładzie tymotki. *Alergia*, 2018, 3; 17-23

Motto:

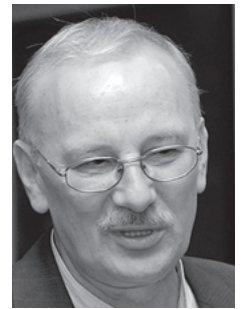
„ Kim bylibyśmy bez ciekawości?”

Maria Skłodowska –Curie, najbardziej wpływowa kobieta w historii świata.

Alergologiczne znaczenie pyłku traw

Pyłek traw stanowi najczęściej uczulający i wywołujący objawy wziewny alergen roślinny [1]. Rodzina traw (Poaceae) składa się z ponad 12 000 gatunków wiatropylnych, uwalniających znaczne ilości uczulających białek do atmosfery [2]. Mimo, że naturalny ekstrakt pyłku traw był pierwszym wyciągiem użytym do immunoterapii [3], znaczący postęp zaczął się dopiero w latach 1960-tych, po identyfikacji komponent alergenów, poszerzających dotychczasowe nieprecyzyjne pojęcie „g6- pyłek traw”, czyli ekstraktu wielu ich gatun-

ków. W oparciu o strukturę oraz właściwości biologiczne i immunologiczne, udało się dotychczas opisać 13 odrębnych grup alergenów pyłku traw, przy czym kluczowe należą do grupy 1 oraz 5-tej [4]. W alergologii za kluczową trawę uważa się *Phleum pratense* (Phl p), przy czym lekarz zapewne nie umiałby odróżnić odmiany Kaba od Obra tej rośliny. Nie wiemy też, czy odróżnia je nos alergika. Wiadomo jednak, że największym udziałem w pokryciu runi w miastach charakteryzują się inne trawy, w kolejności: *Poa pratensis*, *Lolium perenne*, *Festuca rubra*, *Agrostis capillaris*, *Dactylis glomerata*, *Agrostis stolonifera* i *Poa annua*. Gatunkiem, który szczególnie mocno zaznacza swój udział w runi trawników przyulicznych jest kostrzewa czerwona oraz, ostatnio, *Puccinellia distans*. W przeciwieństwie do wyżej wymienionych gatunków jest to roślina trwała, wymagająca dla swego rozwoju gleb lekko zasolonych [2].



Prof. dr hab. n. med.
Krzysztof Buczyłko

Kierownik NZO
Centrum Alergologii
Łódź

Słowa kluczowe:

Alergia, astma, cząsteczki Phl p 1-7, Phl p 11-13, Phl p CP, Phl p OXY, Phl p Fe/Mn-SOD, rPhl p P1-P2-P3-P4, reakcje krzyżowe

Key words:

Allergy, asthma, Phl p 1-7, Phl p 11-13, rPhl p P1-P2-P5-P6 molecules, cross-reactivity

Powyższa lista sugeruje możliwą przyczynę częściowych niepowodzeń swoistej immunoterapii alergenem (SITA) przy użyciu pyłku traw, nawet standaryzowanego wg zawartości Phl p 1 i Phl p 5, w kontakcie z miejskim skwerem o zupełnie innym profilu gatunków, niż w obrębie „dzikiej” lub uprawnej łąki, a także łąków kwitnących zbóż.

Epidemiologia

Prawdopodobnie dwa pierwsze przypadki „febry siennej” na terenie ziem polskich opisał już w roku 1885 doktor K. Koehler. Fakt ten wydłuża pisaną historię polskiej alergologii do 133 lat. Wnet potem opisy kataru siennego i astmy zamieścił w swoim podręczniku z roku 1897 prof. Jan Sędziak. W latach 20-tych ubiegłego wieku w Polsce, alergia na pyłek traw nie była praktycznie zauważana, choć cytowano dane amerykańskie szacujące problem na 1-2 % populacji [3]. Obecnie występowanie alergicznego nieżytu nosa (ANN) ocenia się u dzieci do 7 lat na 8,5 % w Anglii, wśród młodzieży do 14 lat na 14,6% na Grenlandii; około 42% w Portugalii [5]; 52, 8% w okolicach Madrytu [6]. U dorosłych średnio w Europie alergia na pyłek traw na tle innych aeroalergenów wynosiła 37,8%, w tym w Polsce -38%; w Szwajcarii niemal 79%; w Danii ok 70%; w Londynie 54%; w Portugalii 51,3%, zaś w Genui tylko 19,5% [1]. Inne współczesne dane kliniczne uzyskane w roku 2009, wśród niemal 20 tysięcy chorych z Hiszpanii wykazały, że pyłek traw stanowił główne źródło objawów u 32,3 % astmatyków [7].

Mechanizmy immunologiczne pyłkowicy traw

Otoczka pyłkowa jest pierwszą strukturą, wnikającą podczas oddychania w błonę śluzową, która uruchamia system odpornościowy. Tymczasem dotychczasowa charakterystyka alergenów pyłkowych była zawężona do rozpuszczalnych w wodzie białek cytoplazmatycznych i pomijała większość protein okrywy pyłkowej na zewnątrz cytoplazmy. Na skutek wymywania przez rozpuszczalniki organiczne podczas preparowania, wspomnianych białek okrywowych zazwyczaj brakowało w komercyjnych wyciągach alergenowych (tzw. odtłuszczonych). A zatem nie był badany ich wpływ na alergię. Te nowe wiążące swoiste IgE (slgE) białka obejmują w otoczkę pyłku tymotki proteazę cysteinową Phl p CP oraz endoksylianazę Phl p EXY [8]. Ziarna pyłku zawieszane w atmosferze mogą też pod wpływem wody uwalniać pyłkowe granule cytoplazmatyczne (PCGs). Alergeny związane z ich wewnętrznymi subfrakcjami mogą wyzwać u zwierząt doświadczalnych, jak również u chorych z astmą, odpowiedź alergiczno-zapalną. Szereg takich alergenów obejmuje oficjalne nazewnictwo IUIS z informacją, że komponenty Phl p 1, 4, 5, 6, 11 oraz 12 znajdują się zarówno w pyłku, jak też w PCGs, natomiast Phl p 11 tylko w PCGs, zaś Phl p 2 i Phl p 13 tylko w wyciągu z pyłku [9]. Metodą ELISPOT zbadano determinanty molekularne epitopów alergenów pozyskanych z komórek T ludzi stosujących alergeny tymotki (Phl p). Rozpoznano łącznie 43 odrębne regiony antygenowe, co obrazuje szeroki wachlarz specyficznych dla Phl p epitopów komórek T. Dominowały cytokiny Th2 (reprezentowane przez IL-5), podczas gdy IFN- γ , IL-10 oraz IL-17 były stwierdzane rzadziej. Uzyskano 52% odpowiedzi na Phl p 5, 19% dla Phl

p 1 oraz 14% dla Phl p 3. Co ciekawe, niemal nie było korelacji pomiędzy poziomem slgE, a odpowiedzią komórek T, choć prawdopodobnie epitopy komórek T wywodzą się od tych samych alergenów, co wiążące IgE [10]. W kolejnej analizie wykryto białka pyłkowe tymotki niezależne od IgE, które wyzwały wzmożoną odpowiedź Th2, co sugeruje równoległy udział odpowiedzi komórek T w swoistej reakcji na pyłek.

Wynika z powyższego, że repertuar antygenów rozpoznawanych przez komórki T jest znacznie szerszy niż ten wiążący IgE [11].

Innymi słowy, pewne wewnętrzne właściwości białek uczulających mogą przejawiać wpływ immunogeny na poziomie reaktywności komórek T. Zgodnie z tym spostrzeżeniem, odmienne antygeny Phl p są związane z określonymi typami wytwarzania IL-5, IFN- γ , IL-10 czy IL-17 [10]. Swoistość alergenowa wobec slgE zależy głównie od łańcuchów ciężkich. Zróżnicowane połączenie łańcuchów ciężkich i lekkich wpływa na wiązanie z epitopami, a przez to może zmieniać reakcję kliniczną [12].

Alergeny molekularne (komponenty) pyłku traw

Wiedza o poszczególnych molekułach odpowiedzialnych za nadwrażliwość ma kluczowe znaczenie dla lepszego zrozumienia indywidualnych różnic pomiędzy poszczególnymi pacjentami alergicznymi, jak również populacjami alergików żyjącymi w odmiennych obszarach świata [13]. Molekularne (komponentowe) profile uczulenia na Phleum pratense są wysoce zróżnicowane [15]. Według większości badaczy pierwotne uczulenie na tymotkę łąkową obejmuje komponenty Phl p 1, Phl p 5, Phl p 6 [14]. Do weryfikacji wyciągów alergenowych mieszaniny traw stosuje się zazwyczaj Phl p 1 jako wzorzec dla grupy I oraz Phl p 5 – dla grupy V alergenów traw. Szersze opracowania 3 wymienionych i pozostałych komponent są nieliczne, a niekiedy sprzeczne. Poniższe opisy i analizy mają na celu uświadomienie alergologom molekularnej złożoności tzw. „alergenu pyłku traw” na przykładzie tymotki.

Phl p 1 Beta-ekspansyna (g205, EXP)

Phl p 1 Beta-ekspansyna (g205, EXP) warianty Phl p 1.0101, Phl p 1.0102. Główny alergen pyłku tymotki, należący do ekspansyn (grupa 1, R7) [16]. Masa cząsteczkowa wynosi około 25-30 kDa. Posiada epitopy alergiczne naturalnej grupy I pyłku traw [17] Swoiste IgE (slgE) przeciw rekombinowanej formie Phl p 1 (rPhl p 1) jest uznawane za specyficzny biomarker rzeczywistej alergii na pyłek traw. Białko to należy do wysoce reaktywnych krzyżowo alergenów pyłkowych traw. Z antygenem Phl p 1 o wysokiej gęstości mogą się wiązać liczne IgE, co tłumaczy wspomnianą wysoką aktywność alergiczną i zdolności uczulające tego alergen [18]. Jednak według innych prac tych samych znanych badaczy, komponent Phl p 1 uważa się za nie reagujący krzyżowo, a specyficzność ta wynika z budowy łańcuchów ciężkich [12]. Należy mieć nadzieję, że dalsze badania wyjaśnią podobne sprzeczności, w tym przypadku autor opracowania (KB) skłania się do przekonania o silnej reaktywności krzyżowej Phl p 1, głównie w odniesieniu do beta-ekspansyn pyłku traw czy zbóż Pooidae. Problem jest ważny klinicznie, bowiem grupa I alergenów traw jest



rozpoznawana przez ponad 95% pacjentów z katarzem sieniowym [17,18] W grupie 130 chorych z alergią na pyłek tymotki sIgE wykryto u większości dzieci i dorosłych, przy czym u dzieci miana ocenione w klasach RAST były znacznie częściej wysokie [13]. Ekspansyna w pyłku pszenicy nosi kod Tri a 1. Najczęściej opisywanym objawem alergii na Tri a 1 jest ustny zespół uczuleniowy (Oral allergy syndrome- OAS) [19]. Podczas odczulania naturalnym wyciągiem pyłku tymotki odnotowano m.in. znamienny wzrost blokujących przeciwciał IgG4 dla Phl p 1 [20].

Phl p 2 Ekspansyna

Phl p 2 Ekspansyna (grupa 2, g206, kwaśna proteina- Acidic protein). Mniejszy alergen pyłku tymotki. Surowiczę poziom IgE wobec rekombinowanej ekspansyny rPhl p 2 o masie 13 kDa jest traktowany, jako specyficzny znacznik uczulenia na pyłek traw podrodziny Pooidae. Alergeny grupy drugiej nie występują bowiem w ziarnach pyłku traw innych niż Pooideae [21]. Komponent Phl p 2 Gadermaier [12] uważa również za nie reagujący krzyżowo, a specyficzność ta ma wynikać z budowy łańcuchów ciężkich. Jednak w literaturze, jako potencjalnie reagująca krzyżowo wymieniana jest kwaśna proteina Hev b 5 lateksu. Podczas odczulania naturalnym wyciągiem pyłku tymotki odnotowano m.in. znamienny wzrost blokujących przeciwciał IgG4 dla Phl p 2 [20].

Phl p 3 białko podobne do ekspansyny

Phl p 3 białko podobne do ekspansyny (Expansin-like, cellulose-binding domain -CBD) podobne w 50% do alergenu pyłkowego Dac g 3 trawy *Dactylis glomerata*, reaguje też krzyżowo z Lol p 1 pyłku trawy *Lolium perennis*. Wysoce aktywne alergeny główne pyłku traw z grupy 2 oraz 3 wykazują reakcje krzyżowe z powodu konformacyjnych epitopów IgE. Nie stwierdzono natomiast reaktywności krzyżowej z grupą 1, co oznacza konieczność oznaczania w diagnostyce i monitorowaniu odczulania, także alergenów innych niż Phl p 1, mimo strukturalnego podobieństwa ich części C- terminalnej [22].

Phl p 4, liaza pektatowa (PGL)

Czynność biologiczna: liazy pektatowe rozszczepiają wewnętrzne wiązania glikozydowe w kwasie poligalakturonowym. Phl p 4 to inaczej enzym mostkowy berberyny (berbarine bridge enzyme- BBE), należący do silnych oksydaz, które zapewniają istotne korzyści dla organizmów we wszystkich królestwach życia. Jego obecność odnotowano w analizach dotyczących uzyskiwania opium z maku [16]. Grupa 4-ta alergenów pyłku traw obejmuje glikoproteiny o masie cząsteczkowej od 50 do 60 kD, obecne w pyłku wielu gatunków traw. Znane są warianty Phl p 4.0101, Phl p 4.0201. Niemal 70% alergików uczulonych na pyłek traw reaguje właśnie z Phl p 4 [23]. Phl p 4, choć należy do głównych alergenów pyłku, wykazuje niższą siłę uczulającą w porównaniu do innych alergenów głównych [24] Phl p 4 stanowi oporny na trawienie trypsyną alergen pyłku tymotki homologiczny do alergenu głównego ambrozji Amb a 1 oraz babki lancetowatej Pla l 1, co wyjaśnia reakcje krzyżowe traw i chwastów [23]. Naturalna proteina Phl p 4 jest glikozowana i wykazuje reakcje krzyżowe z alergenami zależnymi oraz niezależnymi

strukturalnie [24]. Podczas odczulania naturalnym wyciągiem pyłku tymotki odnotowano m.in. znamienny wzrost blokujących przeciwciał IgG4 dla Phl p 4 [20]. Phl p 4 oraz Phl p 13 zostały zidentyfikowane, jako główne alergeny pyłku traw, na podstawie częstości wiązania sIgE (Phl p 4: 85%; Phl p 13: 56%) Wykazują one jednak od 5 do 9 razy słabszą reakcję w testach skórnych niż Phl p 1, Phl p 2 czy Phl p 5. Nie są zatem kluczowymi komponentami do szczepionki odczulającej. Podkreśla to wagę diagnostyki in vivo w tworzeniu formuły nowej szczepionki leczniczej, opartej na oczyszczonych alergenach [25].

Phl p 5, rybonukleaza

Phl p 5, rybonukleaza. (Trawa grupa 5/6, g215) Grupa 5 alergenów obejmuje małe białka, które składają się z 2 domen i stanowią jedno z najsilniejszych alergenów oddechowych [26], choć wymagają zdecydowanie dłuższej ekspozycji dla wywołania uczulenia, w tym wobec Phl p 5 [13]. Niezależnie od małych rozmiarów (masa cz. 29 kD) rozpoznano 4 niezależne zgrupowania epitopów w izoalergenie Phl p 5.0101 oraz po dwa w każdej domenie w izoalergenie Phl p 5.0201. Posiada liczne warianty Phl p 5.0101, Phl p 5.0102, Phl p 5.0103, Phl p 5.0104, Phl p 5.0105, Phl p 5.0106, Phl p 5.0107, Phl p 5.0108, Phl p 5.0201, Phl p 5.0202. Duża liczba wspomnianych, niezależnych epitopów może też powodować wyzwalanie silnych objawów alergicznych, a z powodu znacznej reaktywności krzyżowej grupy 5 dotyczy to wielu różnych traw [26]. Według innych autorów komponent Phl p 5 uważa się za nie reagujący krzyżowo, lecz główny, specyficzny dla pyłku traw, a specyficzność ta wynika z budowy łańcuchów ciężkich [12]. Być może jest to tylko pozorna sprzeczność, gdy traktujemy to samo białko grupy 5 jako marker alergii na tymotkę, a zarazem na wszystkie inne trawy zawierające grupę 5. IgE przeciw Phl p 5 stwierdzano częściej u dorosłych niż u dzieci [13]. Podczas odczulania naturalnym wyciągiem pyłku tymotki odnotowano m.in. znamienny wzrost blokujących przeciwciał IgG4 dla Phl p 5 [20].

Grupa 6 pyłku traw

Phl p 6 Trawa grupa 5/6, g209. Grupa 6, o nieznannej funkcji biologicznej, obejmuje kwaśne, nieglikozylowane proteiny. Masa 15 kDa, sekwencja N- terminalna wykazuje podobieństwo do wewnętrznego regionu alergenów grupy 5, lecz w odróżnieniu od Phl p 5 nie powoduje znaczącej serologicznej reaktywności krzyżowej wobec pyłku traw innych niż podrodzina Pooideae. Rekombinowana Phl p 6 (rPhl p 6) posiada identyczną reaktywność jak natywna cząsteczka i może być stosowana w diagnostyce in vitro pyłkowicy traw [21]. Podczas odczulania naturalnym wyciągiem pyłku tymotki odnotowano m.in. wysoce znamienny wzrost blokujących przeciwciał IgG4 dla Phl p 6 [20] Posiada dwie znane izoformy Phl p 6.0101, Phl p 6.0102.

Phl p 7 Białko wiążące wapń, polkalcyna

Phl p 7 Białko wiążące wapń, polkalcyna (g210). Komponent Phl p 7 (calcium-binding protein, CBP) należy do panalergenów z rodziny wysoce reaktywnych krzyżowo białek wiążących wapń (CBP). Alergen Phl p 7 czyli „motywy

ręki EF2 " CBP stanowi marker uczulenia na liczne silnie uczulające rośliny w Europie [27]. Warto wyjaśnić że tzw. motyw ręki EF zawiera układ przestrzenny helisy- pętli helisy, podobnie jak kciuk i palec wskazujący rozpostartej ludzkiej dłoni. Ponieważ alergen Phl p 7 zawiera większość wywołujących chorobę epitopów CBP, opracowano jego warianty hypoalergiczne do wykorzystania w odczulaniu w postaci krystalicznej [28]. Odnotowano wzrost przypadków wykazujących sIgE dla Phl p 7 u dzieci w stosunku do osób dorosłych [13]. Komponent alergenu Phl p 7 oraz jego homologi wykryto za pomocą mikroskopii elektronowej w cytoplazmie, mitochondriach, jądrze oraz w ścianie pyłku (egzyna) tymotki. Identycznie reagujące białka wykryto także w pyłkach żyta, brzozy, jesionu, oliwki, bylicy, babki lancetowatej, ambrozji [20, 27]. Część chorych uczulonych na tymotkę i reagujących na polkalcynę badanych wobec Phl p 7 pyłku traw oraz Bet v 4 pyłku brzozy odpowiadało tylko na jedną z tych komponent, co nakazuje ostrożność w tworzeniu oraz zalecaniu listy reakcji krzyżowych opartych o obecność CBP, z uwagi na możliwość różnic w epitopach z różnych źródeł [13]. Przykładowe białka wiążące wapń to oprócz Phl p 7 tymotki m. in. Bet v 4 pyłku brzozy [14]. Białka wiążące wapń to marker reakcji krzyżowych występujących pomiędzy pyłkami roślin. Białka te nie występują natomiast w pokarmach pochodzenia roślinnego. Podczas odczulania naturalnym wyciągiem pyłku tymotki odnotowano m.in. znamieny wzrost blokujących przeciwciał IgG4 dla Phl p 7.

Phl p 11 Inhibitor trypsyny

Phl p 11 Inhibitor trypsyny (Trypsin Inhibitor, g211, Ole e 1-like). Białka podobne do głównego alergenu pyłku drzewa oliwnego Ole e 1. Inhibitory trypsyny i alfa-amylazy pełnią funkcję ochronną przed atakiem mikrobiologicznym. Białka tej grupy należą do alergenów zarówno pokarmowych, jak i wziewnych. Do najlepiej poznanych alergenów z tej grupy zalicza się inhibitory α -amylazy/trypsyny ze zbóż oraz sojowy inhibitor trypsyny Kunitza [13]. Podczas odczulania naturalnym wyciągiem pyłku tymotki odnotowano m.in. znamieny wzrost blokujących przeciwciał IgG4 dla Phl p 11 [20]. Phl p 11 występuje wśród komponent reakcji krzyżowych pyłku traw takich jak Phl p 4, Phl p 7, Phl p 12 [14].

Phl p 12 Profilina

Profiliny (Białka wiążące aktyne, actin binding protein-ABP, panalergen, dawniej g212) są to małe białka o masie cząsteczkowej ok. 14 kDa, związane z przekazywaniem sygnału do wnętrza komórki i regulujące polimeryzację aktyny w komórkach niemięśniowych. Epitopy zaklasyfikowane do tej rodziny białek wykazują dużą homologię w budowie cząsteczki. Reakcje krzyżowe nawet pomiędzy luźno spokrewnionymi gatunkami roślin występują we wszystkich pyłkach roślin i pokarmach pochodzenia roślinnego. Uczulenie na profiliny najłatwiej rozpoznać oznaczając Bet v 2 pyłku brzozy. Opisano zwiększenie liczby dzieci uczulonych na Phl p 12 w porównaniu do dorosłych [13]. Jako alergen pokarmowy profilina zazwyczaj wywołuje łagodne reakcje kliniczne, takie jak ustny zespół uczuleniowy (OAS), lecz nie jest modyfikowana przez ogrzewanie, a dotyczy głównie pewnych owoców jak melon, arbuz, banan, pomi-

dor, cytryna, persymona [29]. Część chorych reagujących na profilinę badanych wobec Phl p 12 oraz Bet v 2 odpowiadało tylko na jedną z tych komponent, co nakazuje ostrożność w tworzeniu oraz zalecaniu listy reakcji krzyżowych opartych o obecność profiliny, z uwagi na możliwość różnic w epitopach Phl p 12 z różnych źródeł [13]. Rozróżniając uczulonych wyłącznie na pyłek traw (19%), uczulonych na pyłek traw i drzew (29%) oraz traw, drzew i chwastów (48%), sporadycznie spotyka się wśród nich alergię na profilinę Phl p 12/Bet v 2 [20] Tri a 12, profilina pszenicy, znajduje się w pyłku i ziarnie [19]. Według Nilsson i wsp., do 60 % chorych uczulonych na mąkę pszenną reaguje z alergenami tymotki- głównie profiliną Phl p 12 oraz CCD [30]. Inne ważne dla alergologa źródła profiliny to Pru p 4 brzoskwini, Mal d 4 jabłka, Api g 4 selera, Hev b 8 lateksu, Ara h 5 arachidów, Gly m 3 soi, Pyr c 4 gruszki i Pru av 4 wiśni [1].

Phl p 13 - poligalakturonaza

Phl p 13 (grupa 13- poligalakturonaza- PGA, pektyna-za, depolimeraza pektyny)[16]. Enzym ten jest normalnie odpowiedzialny za rozkład ściany komórkowej podczas dojrzewania, starzenia i w końcu psucia się owocu. Grupa 13 alergenów PGA występuje we wszystkich spośród 12 zbadanych dzikich czy uprawowych traw podrodziny Poaceae [1]. W badaniu ultrastrukturalnym alergen ten zlokalizowano w ścianie oraz cytoplazmie ziaren pyłku tymotki, gdzie towarzyszą mu cząsteczki polisacharydów oraz struktury podobne do mikrotubuli. Po zamoczeniu w wodzie deszczowej, już po pół minuty, można wykryć partycyły (drobiny) cytoplazmatyczne o rozmiarach umożliwiających ich wdychanie (expel cytoplasmic particles of respirable size) zawierające Phl p 13 w supernatancie. Grupa 13 jest uważana za środowiskowy marker ekspozycji na pyłek traw, a przeciwciała E dla Phl p 13 za immunologiczny znacznik rzeczywistego uczulenia na pyłek [31]. PGA mąki pszennej Tri a 13, reaguje krzyżowo z pomidorem Lyc e oraz Phl p 13 pyłku tymotki oraz Cry j pyłku 2 cedru japońskiego [16]. U 48 % alergików na pyłek Phl p z nieżytem nosa lub astmą, opisano reakcje krzyżowe z alergenem podzwrotnikowej trawy bahia Pas n 13 (*Paspalum notatum*), oraz wysoką zgodność wielu aminokwasów z Zea m 13 kukurydzy [32].

Phl p CP (proteaza cysteinowa otoczki pyłku tymotki)

Białka otoczki ziaren pyłkowych stanowią nową klasę o podwójnej funkcji –wiązania IgE oraz aktywności proteolitycznej, która uszkadza powierzchnię bariery nabłonkowej dróg oddechowych. Identyfikacja białek otoczki może wyjaśnić ujemne wyniki badania sIgE u niektórych osób z wyraźnymi objawami, o czym wspomniano wcześniej [8].

Phl p EXY (endoksyłanaza)

Phl p EXY (endoksyłanaza) Komponenta otoczki ziarna pyłkowego Kod bazy Allergome [16] 10794. Czynność biologiczna –hydrolaza glikozyłowa (ksylanowa). Ksyłan jest jednym z najważniejszych składników kompleksu ligno- celulozowego w ścianach komórkowych roślin. Dodatek endoksyłanazy powodował drastyczną, ok. 94% redukcję lepkości ekstraktu pieczywa [8].



Phl p Fe/Mn-SOD, Dysmutaza nadtlenkowa Fe/Mn

Phl p Fe/Mn-SOD, Dysmutaza nadtlenkowa Fe/Mn, kod wg bazy Allergome 11763 [16], czynność biologiczna (superoxide dismutase) [33].

Hybrydy komponent pyłku tymotki obejmują kilka opcji, stworzonych w laboratoriach bio-inżynierów w celu uzyskania idealnej szczepionki odczulającej- bezpiecznej i skutecznej.

Phl p P5-P1 kod bazy Allergome 721 [16]. Nie odnaleziono szerszych danych na jej temat.

Phl p P6-P2 kod bazy Allergome 720 [16]. Hybryda stworzona w laboratorium, obejmuje hypoalergiczną mozaikę Phl p 2, powstałą przez fragmentację sekwencji Phl p 2 i połączenie uzyskanych peptydów w zaburzoną porządku wraz z kadlubowym alergenem Phl p 6. Hybryda Phl p P6-P2 posiada zwiększoną immunogenność, przy zredukowanej aktywności dla IgE,

1 Tab. Reakcje krzyżowe pyłku tymotki

| Krzyżowe pyłki wg 1, 20,21,22 | Komponenta wg Allergome[16] | Krzyżowe pokarmy [1,20,29] |
|--|-----------------------------------|--|
| Tri a pyłku pszenicy | Phl p 1 beta-ekspansyna | Beta ekspansyna (EXP) ryżu |
| „Pylek traw” [wg21] podrodziny Pooidae | Phl p 2 | Hev b 5 lateksu |
| Lol p 1 L. perennis, Dac g 3 D. glomerata [wg 22] | Phl p 3 | Bd |
| Amb a 1 ambrozji, Pla l 1 babki lancet. | Phl p 4 | Ziarna maku? |
| „ Pylek wielu traw” | Phl p 5 | Bd |
| Bd | Phl p 6 | Bd |
| Bet v 4 brzozy, Ory s CBP ryżu, CRD żyta, oliwki, bylicy, babki lancetowatej , jesionu | Phl p 7 polkalcyna PANALERGEN | Nie występują[20] |
| Różne trawy, Ole e 1 oliwki, | Phl p 11 inhibitor trypsyny (TRI) | KRD -homolog TRI- w soi, zbożach, |
| Bet v 2 brzozy, Ory s PRF ryżu(niemal wcale), Tri a 12 pyłku pszenicy, | Phl p 12 profilina PANALERGEN | Arbuz, Api g 4 selera, Ara h 5 arachidów, banan, Cap a papryki, Cor s 2 kolendry, Cum c 2 kminu, cytryna, Foe v 2 koperku, Gly m 3 soi, Hev b 8 lateksu, Mal d 4 jabłka, Pef c 2 pietruszki, persymona, pomidor, Pru av wiśni, Pru p 4 brzoskwini, Pim a 2 anyżu, Pyr c 4 gruszki, Tri a 12 ziarna pszenicy [wg 1,20,29] |
| Cry j 2 cedru, Pas n 13 trawy bahia, Tri a 13 pszenicy, | Phl p 13 poligalaturonaza | Lyc e PG pomidora, Zea m 13 kukurydzy, |

Phl p P1-P2-P5-P6 hybryda molekularna

Phl p P1-P2-P5-P6 hybryda molekularna (HM) 4 głównych alergenów pyłku traw, kod bazy Allergome 2670, czynność biologiczna nieznana [16]. Naturalne wyciągi zawierają wielce zróżnicowany profil alergenów, o różnym wpływie immunologicznym. W celu stworzenia nowej szczepionki połączono dobrze zdefiniowane składniki głównych alergenów w jedną hybrydową cząsteczkę, metodą PCR plus ekspresji cDNA. Hybryda ta zawierała większość epitopów komórek B dla pyłku traw. W diagnostyce okazała się zgodna z naturalnymi wyciągami pyłku traw w 98%. W doświadczeniach na myszach i królikach wywoływała silniejszą i wcześniejszą odpowiedź IgG [34]. Rekombinowana HM (rHM) pozwalała trafnie i specyficznie diagnozować alergię pyłkową traw in vitro u wszystkich badanych chorych. Być może zastąpi ona wkrótce tradycyjne wyciągi alergenowe do diagnostyki PTS, a nawet immunoterapii [35].

Phl p P2-P6 Hybryda 2 naturalnych komponent Phl p 2 i Phl p 6, kod bazy Allergome 696. Czynność biologiczna nieznana. Posiada epitopy IgE zredukowane za pomocą inżynierii genetycznej tak, aby zachowały zdolność bezpiecznego wzbudzania odpowiedzi ochronnej. Ma to prowadzić do szerszego zastosowania SITA w przyszłości [36].

jednocześnie blokuje wiązanie IgE pacjenta przez naturalne alergeny [34].

Reakcje krzyżowe

Komponenty pomagają odróżnić pozytywne wyniki związane z uczuleniem na specyficzne pyłki traw od reakcji krzyżowych na pokarmy, pyłki chwastów lub drzew [13].Szereg istotnych klinicznie reakcji krzyżowych omówiono wcześniej w akapitach poświęconych poszczególnym komponentom pyłku traw, zwłaszcza silnie reagującym krzyżowo homologom Phl p 7 i Phl p 12, wyjaśniając szczegółowo ich mechanizmy. Zdaniem części badaczy, mąka pszenna oraz pyłki zbóż wykazują bardzo niską częstość występowania reakcji krzyżowych. Chorzy z alergią na mąkę pszenną po jej spożyciu oraz/ lub pacjenci z astmą piekarzy nie wykazują nadwrażliwości na pylek pszenicy, pomimo tego, że posiadają one wspólne alergeny [7]. Problem ten dodatkowo ilustruje badanie Sander i wsp. [37], którzy użyli 19 rekombinowanych protein maki pszennej oraz 2 krzyżowo reagujących determinant węglowodanowych w teście CAP-FEIA wobec surowic 101 piekarzy z alergią na mąkę pszenną. Grupę porównawczą stanowiło 24 badanych uczulonych na pyłki, u których wykryto sIgE dla mąki pszennej, ale nie stwierdzano żadnych objawów chorobowych. Wiązanie IgE wobec

pojedynczych komponent ulegało zahamowaniu po użyciu mąki pszennej, ryżowej oraz pyłku traw [37]. Nilsson i wsp., [30] odnotowali, że alergia na mąkę pszenną zależna od reakcji krzyżowych, a także wywołana uczuleniem na specyficzne alergeny ziarna pszenicy, jest częsta u dzieci z pyłkowicą traw oraz wiąże się z alergią na inne podstawowe pokarmy. Ich wyniki wskazują na istnienie podgrupy chorych z pyłkowicą równolegle uczulonych na pszenicę oraz cierpiących na alergię pokarmową, zależną nie tylko od reakcji krzyżowych [30]. Podobne spostrzeżenia poczynił autor (KB) w swojej praktyce. Przykładowo osobom z pyłkowicą traw częściej szkodziło spożycie zupy z zasmażką lub żurku czy białego barszczu (na bazie mąki żytniej lub pszennej) w odróżnieniu od dobrej tolerancji chleba, chyba że był posypany mąką. Podobnie picie piwa (słód jęczmienny) oraz wódek na bazie zbóż, w odróżnieniu od wina czy wódki wyprodukowanej z ziemniaków, było źle tolerowane przez osoby z katarciem siennym. Ustalone na podstawie dostępnej literatury reakcje krzyżowe zebrano w tabeli 1

Alergiczny krzyżowy potencjał pyłku ryżu (*Oryza sativa*), który należy do tej samej co trawy rodziny *Poaceae*, był do niedawna mało zbadany, poza opisami kazuistycznymi. Ostatnio wykazano w nim obecność beta-ekspansyny (EXP), polkalcyny (CBP), ekstensyny (EXT), profiliny (PRF) oraz poligalakturonazy (PGA). Białka te obecnie posiadają już formy rekombinowane. Potwierdzono, z ich użyciem, wyraźne reakcje krzyżowe z niektórymi analogicznymi białkami pyłku tymotki (EXP oraz EXT) lecz słabo z PGA i niemal wcale z PRF u 60% chorych [38].

Diagnostyka

Kliniczne kryteria diagnostyczne obejmują ocenę szankową z wywiadu, lub punktację sumaryczną objawów oraz zużycia leków, w szczycie sezonu pylenia. Dla ich weryfikacji niezbędne jest określenie zagrożenia palinologicznego w danym czasie i miejscu. Obecnie ułatwiają zdobycie takich danych liczne portale internetowe na przykład Apsik, Nie kichaj lub Claritine Allergy. Inne, rzadziej stosowane przesłanki diagnostyczne to spojówkowy test prowokacyjny oraz ocena jakości życia związana z pyłkowicą [39]. Praktycznym, choć niestałym objawem jest pokrzywka kontaktowa na powierzchniach ciała, które zetknęły się z trawą lub sianem. Drugim podstawowym obszarem diagnostyki alergii na trawy są punktowe testy skórne (PTS). Należy jednak pamiętać, że pochodzące od różnych producentów wyciągi z pyłku trawy tymotki wykazują znaczące różnice zawartości białka (24.1-197.7 mcg/mL) oraz poszczególnych alergenów głównych (Phl p 1: 32-384 ng/mL; Phl p 2: 1128-6530 ng/mL, Phl p 5: 40-793 ng/mL) co rzutuje na wyniki PTS i innych testów diagnostycznych oraz odczulania [40]. W dostępnych klasycznych systemach diagnostycznych do oznaczeń z surowicy krwi, przykładowo panel atopowy (30 alergenów- metoda Polycheck) zawiera następujące wyciągi traw i zbóż: mąka (mąka ze zbóż, które zawierają gluten- pszenica, żyto, jęczmień, owies), pyłek 6 traw (tymotka łąkowa, kłosówka, kupkówka pospolita, rajgras angielski, wiechlina łąkowa, kostrzewa łąkowa), żyto. Niekiedy klasyczne panele z mieszaninami alergenów są wzbogacane o pojedyncze komponenty jak Phl p 1 i Phl p 5, co poprawia trafność diagnozy przez immunoterapię. Wielokomponentowy test Immuno CAP

ISAC pozwala na rozróżnienie w surowicach osób uczulonych 8 komponent pyłku tymotki: Phl p 1,2,4,5,6,7,11,12. Multi-alerogenowy panel z zestawu FABER wśród 244 alergenów pozwala oznaczyć pyłek tymotki Phl p oraz jego najważniejsze komponenty Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 7, a jednocześnie 5 molekuł ziarna pszenicy i innych zbóż oraz pojedyncze alergeny pyłku trawy życicy czy ziaren kukurydzy. W ostatnio wprowadzonym do Polski panelu ALEX, obejmującym niemal 300 alergenów i ich komponent, poza klasyczną mieszaniną Phl p (E g6), możemy oznaczyć także Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5.0101, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 12. Diagnostyka molekularna pomaga także w rozróżnieniu pomiędzy uczuleniem zawodowym na mąkę, a dodatnim surowiczym wynikiem sIgE wynikającym z reakcji krzyżowej wobec pyłku traw. Jednak w rutynowym rozpoznawaniu astmy piekarzy klasyczne wyniki sIgE z ekstraktami mąki pszennej czy ryżowej pozostają obowiązkowe [37]. Ostatnio w południowych Chinach zbadano 258 chorych metodą ImmunoCAP 100, u 60 % znajdując alergeny tymotki. Wśród nich 100% miało uczulenie na Phl p 4, 17,1 % na Phl p 1 oraz 8,6 % wyników dodatnich sIgE uzyskano dla komponent Phl p 5/6/7/11/12. Uczulenie na Phl p 4 znacząco korelowało z CCD [41].

Objawy kliniczne alergii na pyłek traw

Katar sienny (sezonowy alergiczny nieżyt nosa- SANN, Hay fever, pollenosis, Rhinitis allergica), podobnie jak astma sezonowa pyłkowa, są powszechnie znane nie tylko alergologom. Istnieje na ich temat bogata literatura naukowa i popularnonaukowa, stąd w niniejszym opracowaniu skupiono się na mniej oczywistych postaciach związanych z pyłkowicą traw. Alergiczne zapalenie spojówek oczu towarzyszy SANN tak często, że jest przez niektórych badaczy traktowane jako tzw., „pozasosowy” objaw kataru. Jednocześnie w literaturze okulistycznej wyróżnia się mniej znane alergologom pojęcia wiosennego zapalenia spojówek „vernal conjunctivitis –VC” czy atopowego zapalenia spojówek (*atopic conjunctivitis*), jako odrębne od sezonowego zapalenia spojówek (SAS) oraz oczywście SANN, jednostki nozologiczne, różniące się nawet patogenezą. Dopiero ostatnio w piśmiennictwie alergologicznym pojawiają się wzmianki o roli mechanizmu komórkowego w SAS, które od dawna opisywano w podręcznikach w chorobach oka. We wszystkich przypadkach, oprócz objawowej farmakoterapii, zalecane jest odczulanie oraz w miarę możliwości eliminacja pyłków. Z innych nietypowych postaci SANN, a właściwie zespołów pyłkowo-pokarmowych należy przypomnieć ustny zespół uczuleniowy (Oral Allergy Syndrome – OAS). Dotyczył on niemal 30% wśród mieszkańców Litwy uczulonych w ponad 90% na pyłek traw z towarzyszącą w ¼ przypadkach alergią wziewną na drzewa i chwasty [42]. Niektórzy autorzy wiążą nadal zaostrzenia w przebiegu przewlekłego wysiękowego zapalenia ucha środkowego (secretory otitis media- SOM) z sezonową ekspozycją na pyłek traw [43].

Najmniej znanym obrazem alergii, w tym pyłkowicy traw, jest zapewne śródmiąższowe zapalenie pęcherza (*interstitial cystitis*).

W opisanych przypadkach stwierdzono obecność komórek kwasochłonnych oraz mastocytów w biopsji pęcherza, a także dodatnią endoskopową próbę prowo-



kacji do-pęcherzowej z antygenem uprzednio dodatnim w oznaczeniu IgE RAST oraz w 80% dodatnim PTS z pyłkami lub pokarmami uczulającymi, tylko w 6% z obecnością objawów ogólnoustrojowych. Najczęściej była to pokrzywka lub obrzęk naczynioruchowy [44]. Najgroźniejszym przejawem klinicznym pyłkowicy może być wstrząs anafilaktyczny

12. Natomiast uchwycono znamienne wzrost poziomu IgG4 wobec rPhl p 1 ($p < 0.05$), 2 ($p < 0.01$), 5 ($p < 0.0001$), 6 ($p < 0.0001$), 7 ($p < 0.05$), 11 ($p < 0.05$) oraz nPhl p 4 ($p < 0.01$) [20]. Szerzej obrazuje to tabela 2.

Rozbicie trójwymiarowej struktury alergenu przedstawia główną strategię wytwarzania szczepionek hypoalergic-

2
Tab.

Rola komponent pyłku tymotki w immunoterapii

| Rola w diagnostyce-slgE (+) [w %] | Kod molekuly alergenu tymotki, rola biologiczna[14,15] | Różnice zawartości białka [wg 40, w ng/ml] | Rola w immunoterapii [wg 1, 4, 21,26,] | Wzrost slgG4 po SITA[wg20] |
|---|--|--|--|----------------------------|
| 17,1[wg41] | Phl p 1 Beta-ekspansyna | 32-384 | Kluczowa, duża skuteczność | $p < 0,05$ |
| Bd | Phl p 2 Kwaśna proteina | 1128-6530 | Umiarkowana skuteczność | $p < 0,01$ |
| Bd | Phl p 3 Ekspansyno-podobne białko | Bd | Mało zbadana | Bd |
| 70% [wg23], 85% [wg15], 100 [wg 41] | Phl p 4 Liza pektatowa (PGL) | Bd | Niejasna, bardzo znacząca korelacja z CCD | $p < 0.01$ |
| 8,6[wg41] | Phl p 5 Rybonukleaza | 40-793 | Kluczowa, duża skuteczność, | $p < 0,0001$ |
| 8,6[wg41] | Phl p 6 | Bd | Potwierdzona skuteczność | $p < 0,0001$ |
| 8,6[wg41] do 20[wg 15] | Phl p 7 Polkalcylna (CBP) | Bd | Mała skuteczność, jeśli alergia tylko na CBP | $p < 0,05$ |
| 8,6[wg41] | Phl p 11 Inhibitor tripsyny (TRI) | Bd | Umiarkowana skuteczność | $p < 0.05$ |
| 8,6 [wg 41] do 20[wg 15] | Phl p 12 Profilina (PRF) | Bd | Mała skuteczność, jeśli alergia tylko na PRF | nieznamienna |
| 56[wg41] | Phl p 13 Poligalaturonaza (PG) | Bd | Mało zbadana | Bd |

wywołany spożyciem pyłku kwiatowego. U pacjentów stwierdzano wysoce dodatnie miana slgE wobec mieszaniny pyłku traw, brzozy i roślin złożonych [45]. Podobnie nieoczekiwany może być ciężki napad astmy wywołany na przykład porannym intensywnym bieganiem u nieświadomego ryzyka silnego pylenia traw, dotychczas dobrze kontrolowanego astmatyka, lub osoby bez wcześniejszego rozpoznania lekarskiego, zatem bez leków.

Perspektywy immunoterapii na pyłek traw

Precyzyjna diagnoza na poziomie molekularnym zwiększa prawdopodobieństwo skuteczności terapii SITA (SCIT i SLIT). Pacjenci z głównym uczuleniem na komponenty specyficzne uzyskują lepsze rezultaty odczulania w porównaniu do chorych uczulonych jedynie na komponenty reagujące krzyżowo.

Obecność przeciwciał jedynie przeciw Phl p 7 i 12 wskazuje na niskie prawdopodobieństwo skuteczności immunoterapii [15].

SCIT, jeśli procedura jest zgodna z zasadami (3-5 lat), wywołuje powstanie swoistych IgG i zahamowanie produkcji slgE, czego nigdy nie obserwowano w wyniku leczenia przeciwwzapalnego [46]. Podczas odczulania 33 chorych z alergią na pyłek traw użyto adsorbowanego na aluminium naturalnego wyciągu *Phleum pratense*. Następnie zbadano liczne komponenty IgE i IgG. Nie pojawiły się nowe przeciwciała. Nie odnotowano wzrostu IgG4 wobec profiliny Phl p

nych i podkreśla znaczenie swoistych przeciwciał IgG dla hamowania natychmiastowych objawów alergicznych. Już po 5 miesiącach odczulania stwierdzano obniżenie poziomu swoistych IgE dla Phl p 1 oraz Phl p 5 przy jednoczesnym wysoce znamienym zmniejszeniu objawów i zużycia leków tylko w grupie SCIT w przeciwieństwie do leczenia przeciwwzapalnego [28]. Wykryto, że epitopy dla komórek T tylko minimalnie reagujące z epitopami Phl p 1 oraz Phl p 5a obejmują proteiny: Poa p 1 97-116, Lol p 1 221-240, Lol p 5a 199-218 czy Poa p 5a 199-218. Niereagujące krzyżowo komórki T różnych traw, o fenotypie podobnym do komórek T swoistych dla Phl p sugerują, że do immunoterapii należy rozważyć raczej szczepionki wieloalergenowe pyłku traw niż monowalentne [47]. W grupie 78 osób w wieku 60 do 70 lat z pyłkowicą potwierdzoną PTS, prowokacją donosową, pomiarem slgE, podawano SLIT mieszkanką 5 traw przez 3 lata. Obniżenie punktacji objawów uzyskano w tej grupie u 64% badanych, podczas gdy w grupie placebo u 7%. Nikt nie miał układowych reakcji ubocznych [48]. Kliniczna skuteczność SLIT tabletką z pyłkiem traw była znacząca, niezależnie od wyjściowego uczulenia na jeden czy wiele alergenów traw. Surowiczy wzrost IgG wobec Phl p 1-12 towarzyszył poprawie klinicznej tylko u 17 % leczonych, co oznacza udział także innych mechanizmów immunologicznych. Oznaczanie slgG nie może stanowić markeru skuteczności SLIT. SLIT nie indukował żadnych nowych uczuleń IgE zależnych [49].

Prace nadesłano
15.08.2018
Zaakceptowano do
druku 05.09.2018

Konflikt interesów nie występuje. Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.