

Alt a 1. Новый подход к диагностике и лечению аллергии на *Alternaria alternata*

Фернандо Пинеда, PhD

Отдел R&D, DIATER, Мадрид, Испания

Более 3 миллиардов человек по всему миру заражены паразитическими червями, называемыми гельминтами, или страдают аллергическими заболеваниями, такими как астма, аллергический ринит, пищевая аллергия и экзема. Общим признаком этих инфекционных или воспалительных заболеваний является так называемый аллергический или иммунный ответ "Второго Типа". Иммунные реакции II типа индуцируются гельминтами и обеспечивают защиту против гельминтов, но также могут играть роль патологическую роль, способствуя развитию острых и хронических и воспалительных реакций против миллиарда аллергенов¹.

Аллергены, полученные из грибов, особенно *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus* spp., и *Penicillium* spp., хорошо известны как причина аллергических реакций типа I и зависят от географических и климатических условий². Недавнее исследование показало, что 19% населения, страдающего аллергией, реагировало, по крайней мере, на один экстракт плесневых грибов, что было определено по результатам кожных тестов, и более 66% из этих сенсibilизированных к грибам пациентов реагировали на экстракт *A. alternata*³.

Alternaria считается одним из самых распространенных аэроаллергенов в Европе. Кроме того, сенсibilизация к *Alternaria* признана независимым фактором риска, связанным с развитием одышки и астмы у детей и подростков, а кожный тест на чувствительность к *Alternaria* в значительной степени зависит от повышенной бронхиальной восприимчивости². Одним из основных препятствий для аллерген-специфической диагностики и иммунотерапии (СИТ) грибковыми экстрактами является разнообразие и изменчивость используемых штаммов, разнообразные условия культивирования и процессы экстракции, приводящие к различиям по составу и аллергенности коммерчески доступных экстрактов⁴.

До недавнего времени доступные экстракты аллергенных плесневых грибов не были надежными средствами для целей диагностики из-за трудности определения родственных видов в соответствии с морфологическими критериями, генетическими вариациями и вариабельностью штаммов, отсутствия консенсуса в производстве и процедурах контроля качества, а также феномена, связанного с изменениями показателей у различных партий⁵⁻⁸. Внутривидовая вариабельность аллергенных экстрактов *A. alternata* признавалась в течение нескольких лет, вариабельность штамма также была подробно описана для данного вида с учетом аллергологических или иммунологических и биохимических данных⁹⁻¹⁴, в дополнение к производственным процессам. Однако по внутривидовой изменчивости отдельных аллергенов *A. alternata*^{15,16} имеется меньше данных.

Розенталь предположил, что вариабельность состава аллергенов является результатом посттрансляционных событий. Alt a 1 непрерывно выделяется в среду культивирования *A. alternata*, где он накапливается, а культуральный фильтрат является оптимальным источником сырья для производства аллергенных экстрактов¹⁶.

Целью стандартизации является обеспечение одних и тех же характеристик аллергенных продуктов от серии к серии. Строгое соблюдение установленного процесса производства и процедур контроля качества для контроля стабильности может уменьшить вариабельность продукта. Создание эталонного препарата с хорошими

характеристиками, подтвержденными анализами активности, могло бы способствовать попыткам стандартизации аллергенов¹⁷.

В настоящее время качество коммерческих грибковых экстрактов в Европе является непостоянным. Таким образом, очищенные аллергены плесневых грибов могут представлять большой интерес, так как очищенные аллергены могут быть произведены в соответствующих условиях чистоты и стабильности для каждой партии и, следовательно, являются полностью стандартизированным диагностическим материалом. Были проведены исследования молекул аллергенов на основе диагностических кожных проб. Использование очищенных белков для *in vitro* исследований нашло более широкое применение, поскольку некоторые пыльцевые аллергены доступны как коммерческие реагенты, позволяющие применить компонент-разделяющий подход к определению некоторых из них или оценку иммунотерапии путем определения специфических антител по отношению к очищенным аллергенам. На настоящий момент имеется описание 11 аллергенов экстракта *A. alternata*, хотя только 1 из них является наиболее распространенным.

Alt a 1 является мажорным аллергеном, реагирующим с IgE сывороткой более чем 90% *A. alternata*-сенситизированных пациентов. Alt a 1 является термостабильным димером 28 кДа, который диссоциирует на субъединицы массой 14,5 кДа и 16 кДа при определенных условиях. Alt 2 распознается IgE антителами у 16 (61%) из 26 людей, страдающих аллергией к *A. alternata*. Также сообщалось о наличии минорных аллергенов *A. alternata*, таких как Alt a 11, Alt a 3, Alt a 4, Alt a 6 (высоко-консервативные грибковые аллергены энлазы), Alt a 7, Alt a 10, Alt a 12, и фактор 2 ядерного переноса³.

Таким образом, одной диагностики и иммунотерапии с аллергеном Alt a 1 достаточно для обнаружения предполагаемой сенситизации и улучшения проявлений сенситизации ко всему комплексу аллергенов *A. alternata*.

Механизм действия СИТ окончательно не установлен, но возможно он является следствием индуцированных лечением изменений иммунологического механизма (рис.1). Наша группа определила безопасность СИТ очищенным природным аллергеном Alt a 1 и оценила его влияние на иммунологический ответ.

Для этого⁴, из аллергической службы больницы доктора Песет в Валенсии, Испания, были отобраны пациенты: мужчины и небеременные женщины в возрасте 9-60 лет, страдающие аллергическим ринитом, с или без легкой/умеренной астмой, сенситизацией кожи к *A. alternata* и Alt a 1 (10 мкг/мл) и уровнем специфических IgE до 2.

Все астматические пациенты находились под строгим наблюдением на протяжении не менее 3 месяцев и в случае необходимости получали лечение ингаляционными β_2 агонистами или же ежедневно принимали суточной дозой ≤ 1000 мкг беклометазон дипропионат или его эквивалент с суточной дозой ≤ 1000 мкг. Все пациенты были некурящими, и ни один не имел в анамнезе хронических бронхитов, эмфиземы или инфекции дыхательных путей в течение 4 недель до начала исследования.

Исследование было одноцентровое, рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое, в параллельных группах. Пациенты были рандомизированы для получения активного лечения, состоящего из возрастающих доз вводимого подкожно очищенного природного Alt a 1, либо плацебо.

Уровень специфических IgG4 к rAlt a 1 оценивали в соответствии с инструкцией ImmunoCAP для специфических IgG4 (Фадия, Унсала, Швеция)

Экстракты *Alternaria alternata* были произведены из сырья, содержащего споры и мицелий специфического штамма. Alt a 1 был выделен из экстракта *A. alternata* путем проведения трехступенчатой хроматографии и для подтверждения наличия очищенного Alt a 1 был проведен анализ ВЭЖХ МС/МС.

СИТ проводили в соответствии с кластерным графиком, что позволило достичь поддерживающей дозы через 4 недели. Инъекции поддерживающей дозы вводили каждые 4 недели в течение года.

Всего было отобрано сорок два пациента, из них 40 были рандомизированы на терапевтические группы и включены в оценку безопасности, но, только 35 закончили исследование (17 в группе, получавшей активное лечение, и 18 в группе плацебо). Исходные характеристики были сопоставимы для двух групп лечения. Активное лечение вызывало сильный IgG4 ответ против аллергена Alt a 1. Концентрация IgG4 увеличилась примерно в 17 раз через 6 месяцев после лечения и 23-кратно после 12 месяцев лечения. Сравнение между группами показало статистически значимые различия в установленных временных точках после начала лечения.

СИТ с Alt a 1 хорошо переносилась, с неопасными для жизни проявлениями. Общая частота побочных эффектов была сопоставима в группах лечения. Всего было зафиксировано 33 местных побочных эффекта, 17 и 16 в активной и плацебо группах, соответственно. Тридцать один побочный эффект был классифицирован как общий, 15 и 16 в активной и плацебо группах, соответственно. Большинство из них были случаи риноконъюнктивита, обострения астмы или простуды. Все эти общие побочные эффекты были рассмотрены клиническим исследователем и расценены как не связанные с исследуемым лечением.

Была выдвинута гипотеза, что результатом СИТ является изменение ответов Т-лимфоцитов и изменение ответов Th2. При этом процессе происходит увеличение Т-регуляторных клеток, а производимые ими IL-10 и TGF- β способствуют подавлению синтеза IgE и увеличению числа IgG4 антител. Кроме того, было высказано предположение, что аллерген-специфические IgG4 антитела обладают способностью снижения ранних ответов на аллерген, блокируя активацию Fc ϵ -зависимых тучных клеток и высвобождая переносчиков перфоринов. Результаты нашего исследования ясно показывают, что СИТ с очищенным Alt a 1 связана с весьма значительным увеличением уровня аллерген-специфических IgG4 антител.

Это первое клиническое исследование иммунотерапии с использованием очищенного природного Alt a 1 для лечения аллергического ринита с или без астмы продемонстрировало хорошую переносимость, с индукцией значительного увеличения уровня аллерген-специфических IgG4 антител⁴.

Другими проблемами, с которыми мы столкнулись, являются ортологические особенности Alt a 1.

Существует общее мнение в отношении редкой перекрестной реактивности, наблюдающейся между *Alternaria alternata* и другими аллергенными плесневыми грибами, такими как *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium notatum*, *Cladosporium notatum*. Однако *Alternaria alternata* показала очень значительный уровень аллергенной перекрестной реактивности с другими грибами, принадлежащими к семейству Pleosporaceae. На сегодняшний день мы изучаем влияние мажорного аллергена Alt a 1 на перекрестную реактивность, продемонстрированную на этих грибах, особенно *Ulocladium Botrytis*, *Stemphylium botryosum*, *Curvularia Lunata* и *Epicoccum nigrum*.

Большинство наших последних исследований было выполнено с *Ulocladium botrytis* для того, чтобы охарактеризовать его реактивность у сенситизированного населения, ориентируясь в основном на ортологическую особенность мажорного аллергена Ulo b 1, перекрестно реагирующего с Alt a 1.

Использованная литература:

1. New paradigms in Type 2 immunity. Bali Pulendran, David Artis. *Sciences*, vol 337. *Science* 27 July 2012; Vol. 337 no. 6093 pp. 431-435. DOI: 10.1126/science.1221064
2. Standardization of *Alternaria alternata*: Extraction and quantification of Alt a 1 by using an mAb-based 2-site binding assay. Elke Aden, Bernhard Weber, Jochen Bossert, Manfred Teppke, Edda Frank, Rüdiger Wahl, Helmut Fiebig, and Oliver, Cromwell. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:128-35.
3. Diagnosis of *Alternaria alternata* sensitization with natural and recombinant Alt a 1 allergens Juan A. Asturias, Ignacio Ibarrola, Angel Ferrer, MD, Carmen Andreu, Esperanza Lopez-Pascual, Joaquín Quiralte, Fernando Florido, and Alberto Martínez. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1210-7
4. Effect of allergen-specific immunotherapy with purified Alt a1 on AMP responsiveness, exhaled nitric oxide and exhaled breath condensate pH: a randomized double blind study. Luis Prieto, Ricardo Palacios, Dulce Aldana, Anna Ferrer, Carmen Perez-Frances, Victoria Lopez, Rocio Rojas. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* September 2010, 6:27.
5. Breitenbach M, Simon-Nobbe B. The allergens of *Cladosporium herbarum* and *Alternaria alternata*. In: Breitenbach M, Crameri R, Lehrer SB, editors. *Fungal Allergy and Pathogenicity*. Chem Immunol. Basel: Karger; 2002. 81:48-72.
6. Unger A, Soger P, Simon-Nobbe B, Susani M, Crameri R, Ebner C, Hintner H, Breitenbach M. Clinical testing of recombinant allergens of the mold *Alternaria alternata*. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;118: 220-1.
7. Martínez J. Antígenos de *Aspergillus fumigatus*: Caracterización y propuestas de estandarización. *Revista Ibérica de Micología*. 1989; 6: 41-6.
8. Day JH. Allergic respiratory responses to fungi. In: Esser H, Lemke PA, editors. *The Mycota*. Vol. VI: *Human and Animal Relationships*. Berlin: Springer-Verlag; 1996. p. 173-91.
9. Schumacher MJ, Jeffrey SE. Variability of *A. alternata*: biochemical and immunological characteristics of culture filtrates from seven isolates. *J Allergy Clin Immunol*. 1976;58: 263-77.
10. . Vijay HM, Huang H, Young NM, Bernstein IL. Studies on *Alternaria* allergens. IV. Comparative biochemical and immunological studies of commercial *A. tenuis* batches. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1984; 74: 256-61.

11. Vijay HM, Young NM, Jackson GE, White GP, Bernstein IL. Studies on *Alternaria* allergens. IV. Comparative biochemical and immunological studies of three isolates *A. tenuis* cultured on synthetic media. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1985; 78: 37-42.
12. Steringer I, Aukrust L, Einarsson R. Variability of antigenicity/allergenicity in different strains of *Alternaria alternata*. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1987; 84:190-7.
13. Martínez J, Martínez A, Gutiérrez G, Llamazares A, Palacios, R, Sáenz de Santamaría M. Influencia del proceso de obtencion en la actividad alergenica y rendimiento de extractos de *Alternaria alternata*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 1994;11: 10-13.
14. Portnoy J, Pacheco F, Barnes C, Upadrashta B, Crenshaw,R, Esch R. Selection of representative *Alternaria* straingroups on the basis of morphology, enzyme profile and allergen content. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 773-82.
15. Sáenz-de-Santamaría M, Guisantes JA, Martínez J. Enzymatic activities of *A. alternata*. Allergenic extracts and its major allergen (alt a 1). *Mycoses*. 2006;49:288-92.
16. Rosenthal D, Hu F, Pacheco F, Landuyt J, Barnes C, Portnoy, J. Northern blot identification of mRNA containing sequence for protein allergen, Alt a 1, in eight strains of *Alternaria alternata*. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1998; 80: 471-5.
17. Manufacturing and standardizing fungal allergen products. Robert E. Esch. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:210-5.)