**„*Ocena parametrów immunologicznych u osób uczulonych na naskórek kota poddanych dolimfatycznej immunoterapii swoistej z użyciem szczepionki MAT-Fel d 1”.***

**STRESZCZENIE**

**Merytoryczne uzasadnienie podjęcia badań:** Immunoterapia swoista (AIT), przywracając równowagę w układzie Th2/Treg jest obecnie jedynym przyczynowym sposobem leczenia schorzeń alergicznych IgE-zależnych. Pomimo udowodnionej skuteczności AIT, niedoskonałości związane m.in. z długim czasem leczenia, ryzykiem rozwoju reakcji anafilaktycznych oraz alergizacji na dodatkowe alergeny poprzez stosowanie w terapii ekstraktów oraz dużych dawek całkowitych ograniczają jej użycie i rozpowszechnienie.

**Cel i założenia pracy:** Badania ostatnich lat wykazały, że sukces AIT jest w dużej mierze podyktowany odpowiednim składem szczepionki, dawką, rodzajem użytego adiuwantu, drogą aplikacji i efektywną biodystrybucją leku. W projekcie założono, że aplikacja szczepionki zawierającej cząstkę MAT i rekombinowany alergen bezpośrednio do węzłów chłonnych poprawi prezenację antygenu w układzie MHC klasy II i zwiększy immunogenność, skuteczność i bezpieczeństwo immunoterapii, a w konsekwencji umożliwi skrócenie całkowitego czasu leczenia. W tym celu główny alergen kota (rekombinant Fel d 1) został połączony z domeną białka transportowego TAT i ze skróconym łańcuchem niezmiennym
i tak powstała cząsteczka adsorbowana na wodorotlenku aluminium była aplikowana bezpośrednio do węzłów chłonnych pod kontrolą ultrasonografii w 3 wzrastających dawkach (1 mcg, 3 mcg, 10 mcg) w odstępach 4 tygodniowych. Cały okres immunoterapii
nie przekroczył 2 miesięcy. Celem pracy była analiza odpowiedzi immunologicznej indukowanej alergenowo swoistą immunoterapią dolimfatyczną (ILIT) oraz próba wyjaśnienia mechanizmów tolerancji immunologicznej w oparciu o dane immunologiczne.

**Materiał i metody:** Badaniom poddano próbki krwi pobrane od chorych w wieku 20-54 lat, cierpiących na alergiczny nieżyt nosa, uczulonych na alergen naskórka kota, którzy w okresie
2008-2009 przeszli dolimfatyczną immunoterapię swoistą (ILIT) z użyciem szczepionki
MAT-Fel d 1 lub placebo. Z krwi żylnej pobranej przed i po immunoterapii izolowano jednojądrowe komórki krwi obwodowej (PBMC), stymulowano rekombinowanym alergenem kota (rFel d 1), a następnie oceniano ich reaktywność metodą włączania promieniotwórczej 3H-tymidyny do DNA komórek. Do oceny ilościowej produkowanych cytokin wykorzystano technologię *Luminex xMAP*. Ponadto dokonano ilościowej analizy Fel d 1-swoistych p/ciał IgE i IgG4 w próbkach osocza za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA oraz określono ekspresję mRNA swoistych limfocytów T dla wybranych czynników transkrypcyjnych
i receptorów histaminowych. Celem identyfikacji i oceny populacji Fel d 1-swoistych limfocytów T CD4+ zastosowano nowoczesną metodę wiązania znakowanych tetramerów MHC klasy II przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej.

**Wyniki:** Trzy iniekcjedolimfatyczneszczepionki MAT-Fel d 1 aktywowały zarówno wczesne (tydzień po zakończeniu ILIT) jak i późne (10 miesięcy po zakończeniu ILIT) komórkowe
i humoralne zmiany immunologiczne, które w konsekwencji doprowadziły do rozwoju tolerancji immunologicznej. Obniżona reaktywność względem alergenu stwierdzana
10 miesięcy po zakończeniu immunoterapii w teście stymulacji PBMC rekombinowanym głównym alergenem kota (Fel d 1) była wypadkową kilku procesów, z których najważniejsze to: zmiana liczebności komórek CD4+CD25- i CD4+CD25+FOXP3+ na korzyść komórek
o właściwościach supresyjnych wraz ze wzrostem aktywności czynnika transkrypcyjnego limfocytów Treg - FOXP3, indukcją alergenowo-swoistych p/ciał IgG4 w korelacji pozytywnej z IL-10 i wzrostem ekspresji receptora H2R na alergenowo-swoistych limfocytach T. Obserwowane zmiany stwierdzano przy 100-krotnie mniejszej dawce kumulacyjnej Fel d 1
w porównianiu z immunoterapią klasyczną i alergenem niezmodyfikowanym, a ponieważ spadek proliferacji aktywowanych PBMC obserwowano 10 miesięcy po ostatniej dawce szczepionki, należy uznać ją za późny efekt AIT, a tolerancję za długofalową.

**Wnioski:** Dane te demonstrują indukcjętolerancji pod wpływem 3 iniekcji dolimatycznych szczepionki MAT-Fel d 1 w następstwie istotnej poprawy immunogenności i dystrybucji. Uzyskane wyniki przyczynią się do lepszego poznania mechanizmów tolerancji immunolgicznej i pozwolą na opracowanie skuteczniejszych metod immunoterapii swoistej.

***“Immunological evaluation of cat dander allergic patients treated with specific intralymphatic immunotherapy with MAT-Fel d 1 vaccine”.***

**ABSTRACT**

**Background:** Allergen specific immunotherapy (AIT) is the only causative treatment
of IgE-dependent allergic diseases that restores the balance in the Th2/Treg ratio.
Despite confirmed effectiveness, current allergen AIT has several disadvantages i.a.:
long treatment time, risk of anaphylaxis and development of new allergies related to the use of allergenic extracts and high cumulative doses. These all together restrict the usage
and popularization of AIT.

**Aim and hypothesis**: The latest studies have demonstrated the success of AIT as a therapy based on the proper vaccine content, dose, type of adjuvant, application route and effective biodistribiution. In the present study, direct vaccine administration into lymph nodes
and targeting at MHC class II antigen presentation pathway has been hypothesized
to increase the immunogenecity, efficacy and safety of immunotherapy finally enabling
the reduction of AIT duration. For that purpose, the major cat allergen (recombinant Fel d 1) was fused to a TAT-derived protein translocation domain and to the truncated invariant chain. This fusion protein (MAT-Fel d 1) adsorbed to alum was administered directly into
the inguinal lymph node uder control of ultrasonography by 3 injections of increasing dose
(1 mcg, 3 mcg, 10 mcg) within 2 months with 4 week intervals. Allergen specific immunological changes and mechanisms of immune regulation in the response
to MAT-Fel d 1 vaccine were investigated.

**Methods:** Blood samples were taken from cat dander allergic patients from the ages
of 20-54, suffering from rhinitis, that between 2008-2009 underwent intralymphatic specific immunotehrapy with MAT-Fel d 1 or placebo. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from venous blood before and after completing the therapy and stimulated with rFel d 1. Allergen specific proliferative responses were measured by 3H-thymidine incorporation together with the assessment of cytokines profile and amount in supernatants using Luminex xMAP technology. Plasma samples were put through a quantitative analysis
in Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA) in terms of allergen-specific IgE and IgG4 immunoglobulin presence. The mRNA expression of allergen-specific T lymphocytes
for selected transcription factors and histamine receptors were determined. To identify
and evaluate the population of Fel d 1-specific CD4+ T cells, MHC class II peptide tetramers and FACS analysis were used.

**Results:** Three intralymphatic injections of MAT-Fel d 1 vaccine activated early and late (one week and ten months after finishing the treatment) cellular and humoral immune changes that finally resulted in immune tolerance. The reduced allergen reactivity of PBMC stimulated with rFel d 1 that was seen ten months after finishing immunotherapy was
the outcome of several events. The most important were: the change in frequency
of CD4+CD25- and CD4+CD25+FOXP3+ cells in favour of suppressive cells together with the rise of FOXP3 mRNA expression, the increase of allergen-specific IgG4 antibody titer that positively correlated with IL-10, and the enhancement of H2R expression on antigen-specific T cells. Changes were observed at 100 times lower total dose of Fel d 1 compared
with conventional AIT and unmodified allergen. The decrease in T-cell proliferation
10 months from the last dose of MAT-Fel d 1 vaccine is considered as a late effect of AIT
and suggests the establishment of long-lasting T-cell tolerance.

**Conclusion:** The present study demonstrates induction of allergen-specific peripheral tolerance in the response to 3 intralymphatic injections of MAT-Fel d 1 vaccine as a result
of improved immunogenicity and distribution. The achieved results will contribute to better understanding the mechanisms of immune tolerance and the development of much more effective methods of allergen AIT.