

UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej

Anna Kosowska

Mechanizmy rozwoju tolerancji immunologicznej w przebiegu alergenowej immunoterapii swoistej u pacjentów uczulonych na alergeny roztoczy kurzu domowego

Rozprawa doktorska

Promotor pracy:

Prof. dr hab. Marek Jutel

Wrocław 2020

Streszczenie

Wstęp

Obecnie alergia jest określana mianem pandemii. Stanowi bardzo istotny problem zdrowia publicznego, w samej Europie występując u ponad 150 milionów osób. Europejska Akademia Alergologii i Immunologii Klinicznej (European Academy of Allergy and Clinical Immunology, EAACI) przewiduje po uwzględnieniu trendów epidemiologicznych, że za niecałe 15 lat ponad połowa populacji europejskiej będzie dotknięta chorobą alergiczną.

Jedyną przyczynową terapią alergii jest immunoterapia swoista (AIT), która skutecznie łagodzi objawy a jej korzystny wpływ utrzymuje się przez wiele lat po zakończeniu stosowania.

Pomimo intensywnych badań mechanizm powstawania tolerancji immunologicznej pozostaje jednak niejasny, co przekłada się na ograniczone możliwości dalszego wykorzystania, poprawy skuteczności i bezpieczeństwa immunoterapii swoistej.

Cel pracy

Głównym celem pracy jest badanie mechanizmów rozwoju tolerancji immunologicznej w przebiegu alergenowej immunoterapii swoistej u pacjentów uczulonych na alergeny roztoczy kurzu domowego oraz ocena możliwości ich dalszego wykorzystania dla poprawy skuteczności i bezpieczeństwa AIT.

Rozprawa doktorska obejmie obszar wiedzy z zakresu immunologii klinicznej, ze szczególnym uwzględnieniem charakterystyki mechanizmów tolerancji immunologicznej w przebiegu swoistej immunoterapii alergenowej.

Materiał i metody

Do badania zostało włączonych 50 pacjentów prezentujących objawy alergicznego nieżytu nosa. Alergię na roztocze kurzu domowego potwierdzano za pomocą punktowych testów skórnych i oznaczenia swoistych przeciwciał IgE. Dodatkowo pacjenci zostali poddani ekspozycji w Kabinie Ekspozycji Środowiskowej przy użyciu alergenów *D. pteronyssinus*. Wybrani pacjenci zostali poddani leczeniu za pomocą immunoterapii swoistej przeciwko alergenom roztoczy kurzu domowego.

W pracy oceniono za pomocą cytometrii przepływowej zmienność odpowiedzi swoistych dla alergenów roztoczy limfocytów CD4+ pod wpływem AIT, w kolejnych punktach czasowych terapii oceniono odsetek i aktywność wybranych subpopulacji limfocytów CD4+: Th1 i Th2, Th9, Th17 i Th22, a także limfocytów T regulatorowych (Treg). Ponadto wykonano genotypowanie HLA oraz oceniono związek między HLA (MHC II), a profilem odpowiedzi na alergeny roztoczy kurzu domowego.

Wyniki

1. Większość pacjentów zakwalifikowanych do udziału w badaniu miała potwierdzoną alergię na roztocze kurzu domowego za pomocą punktowych testów skórnych oraz oznaczenia stężenia swoistych przeciwciał IgE, zarówno przeciwko *Dermatophagoides farinae* jak i *Dermatophagoides pteronyssinus*. Wielkość punktowych testów skórnych oraz stężenie sIgE w zakresie alergenów roztoczy kurzu domowego nie wykazała związku z płcią ani wiekiem pacjentów. Wykazano bardzo wysoką korelację dodatnią pomiędzy wynikami punktowych testów skórnych na alergeny roztoczy kurzu domowego *Dermatophagoides pteronyssinus* i *Dermatophagoides farinae* ($p < 0,0014$, $r = 0,76$).
2. W zakresie oznaczenia stężenia swoistych przeciwciał IgE najczęściej obserwowano stężenie sIgE przeciwko *Dermatophagoides pteronyssinus* w klasie 2 i 3, natomiast w przypadku *Dermatophagoides farinae* stężenia sIgE występowały najczęściej w zakresie klasy 3. Wykrywano więc wyraźne miano przeciwciał, w tym przypadku objawy kliniczne są zwykle obecne.
3. Wykazano bardzo wysoką korelację dodatnią pomiędzy wynikami punktowych testów skórnych na alergeny *Dermatophagoides farinae* a oznaczeniem stężenia swoistych przeciwciał IgE przeciwko *Dermatophagoides pteronyssinus* ($p < 0,0014$, $r = 0,68$). Pomiedzy odpowiedzią na poszczególne alergeny roztoczy kurzu domowego oznaczaną za pomocą powyższych dwóch metod wykazano istotne statystycznie korelacje ($p < 0,005$) dla *Dermatophagoides farinae* ($r = 0,55$) i *Dermatophagoides pteronyssinus* ($r = 0,53$). Potwierdzono również korelację pomiędzy sIgE *Dermatophagoides pteronyssinus* i sIgE *Dermatophagoides farinae* ($r = 0,81$).
4. Stężenie swoistych przeciwciał IgE przeciwko *Dermatophagoides farinae* i *Dermatophagoides pteronyssinus* nie odzwierciedlało nasilenia objawów nosowych ani ilości zużytych leków przez pacjentów z alergicznym nieżytem spojówek i nosa. Z kolei im większe stężenie sIgE, tym mniejsze nasilenie objawów ocznych (świąd oczu, łzawienie, zaczerwienienie oczu) i pozanosowych (kaszel, świsty, duszność). W zakresie sIgE przeciwko *Dermatophagoides pteronyssinus* wzrost stężenia przeciwciał nie wpływał jednoznacznie na pogorszenie jakości życia u pacjentów. Wielkość stężenia swoistych przeciwciał IgE przeciwko alergenom roztoczy kurzu domowego nie odzwierciedla

nasilenia objawów ocenianych w skali VAS przez pacjentów z alergicznym nieżytem spojówek i nosa.

5. Spośród wszystkich grup objawów ocenianych za pomocą skali RQLQ pacjenci z najbardziej nasilonymi objawami nosowymi najczęściej wskazywali na wpływ problemów praktycznych na samopoczucie oraz wpływ objawów ze strony nosa/oczu na ogólne samopoczucie. W zakresie poszczególnych objawów ocenianych w skali RQLQ objawy nosowe najczęściej korelowały z męczliwością, bólem głowy, kichaniem, irytacją. Co ciekawe wszystkie korelacje objawów nosowych miały ujemne wartości współczynnika r dla upośledzonej koncentracji, bólu oczu i obrzęku oczu ocenianych w skali RQLQ.
6. Spośród wszystkich grup objawów ocenianych za pomocą skali VAS pacjenci z objawami nosowymi najczęściej wskazywali na swędzenie nosa, jednak w zakresie podziału na grupy objawów najwięcej korelacji występowało pomiędzy objawami ocznymi ocenianymi w skali VAS a objawami nosowymi (dSS).
7. Skala Total Nasal Symptom Score (TNSS) jest stabilnym i powtarzalnym narzędziem do oceny objawów ze strony nosa podczas próby w Kabinie Ekspozycji Środowiskowej. Skala TOSS jest odpowiednim narzędziem do oceny objawów ze strony oczu podczas próby w Kabinie Ekspozycji Środowiskowej. Objawy ze strony oczu punktowane przez pacjentów w skali TOSS nie są dobrym wskaźnikiem do oceny nasilenia objawów alergicznych podczas próby ekspozycji w KEŚ. Ocena objawów ze strony układu oddechowego w skali TNSS nie jest dobrym wskaźnikiem monitorowania reakcji alergicznej podczas ekspozycji na alergeny roztoczy kurzu domowego w KEŚ.
8. Znaczna zmienność w czasie objawów uśrednionych w skali Total Symptom Score (TSS) u poszczególnych pacjentów wskazuje na konieczność dalszej analizy użyteczności skali do oceny objawów ze strony nosa, oczu i układu oddechowego podczas kolejnych prób ekspozycji w KEŚ. Skala TSS dobrze obrazuje nasilenie objawów alergicznych podczas próby ekspozycji w KEŚ. Nasilenie objawów ze strony nosa oraz oczu wykazuje podobny przebieg podczas trwania ekspozycji w KEŚ.
9. Odpowiedź ze strony limfocytów Th1 zmniejszała się w trakcie trwania immunoterapii swoistej po trzech miesiącach trwania leczenia pacjentów uczulonych na roztocze kurzu domowego. Odpowiedź ze strony limfocytów Th2 GATA3+ zmniejszała się w trakcie trwania immunoterapii swoistej już od pierwszych dni rozpoczęcia leczenia. Odpowiedź ze strony limfocytów Th2 CCR4+ zmniejszała się w trakcie trwania immunoterapii swoistej osiągając po 6 miesiącach terapii niższy poziom niż przed rozpoczęciem leczenia. Jednak ponowny wzrost liczby limfocytów o fenotypie Th2 CCR4+ wymaga dalszych badań w kolejnych latach trwania immunoterapii swoistej u pacjentów uczulonych na roztocze kurzu domowego.
10. Liczba limfocytów o fenotypie Th17 charakteryzuje się dużą zmiennością w trakcie trwania immunoterapii swoistej u pacjentów uczulonych na roztocze kurzu domowego. Ocena subpopulacji limfocytów Th17 wymaga dalszych badań na szerszej grupie pacjentów w kolejnych latach trwania AIT. W związku z dużą zmiennością oraz tendencją wzrostową po roku od rozpoczęcia immunoterapii swoistej liczba limfocytów o fenotypie Th22

wymaga dalszej oceny u większej liczby pacjentów i w trakcie kolejnych lat trwania leczenia.

11. Wykazano niemal sześciokrotny wzrost liczby limfocytów regulatorowych Treg w pierwszym miesiącu immunoterapii swoistej oraz stopniowy spadek w kolejnych pięciu miesiącach leczenia, osiągając poziom porównywalny z początkowym u pacjentów z alergicznym nieżytem spojówek i nosa uczulonych na roztocze kurzu domowego biorących udział w badaniu. Równowaga immunologiczna została przywrócona po 360 dniach immunoterapii swoistej AIT.
12. Największa zmienność w zakresie limfocytów B dotyczyła pacjentów po 6 miesiącach od rozpoczęcia immunoterapii swoistej.
13. Większa średnica bąbla dla punktowych testów skórnych oraz wyższe stężenie sIgE przy użyciu alergenów *D. pteronyssinus* warunkuje wyższą liczbę limfocytów T regulatorowych po miesiącu stosowania immunoterapii swoistej, natomiast im wyższe stężenie swoistych przeciwciał IgE przeciwko *D. farinae* tym większa liczba limfocytów Treg po 3 miesiącach od rozpoczęcia immunoterapii swoistej.
14. W zakresie populacji Th1 i Th2 ważnym wskaźnikiem do oceny odpowiedzi komórkowej u pacjentów z alergicznym nieżytem spojówek i nosa uczulonych na roztocze kurzu domowego będzie ocena subpopulacji limfocytów Th1 i Th2 GATA3+ w trakcie pierwszych trzech miesięcy stosowania immunoterapii swoistej.
15. Subpopulacje limfocytów T takie jak Th17 i Th22 oraz limfocytów B jako pojedyncze parametry nie są dobrym wskaźnikiem oceny regulacji odpowiedzi immunologicznej podczas stosowania immunoterapii swoistej u pacjentów uczulonych na roztocze kurzu domowego.
16. U pacjentów biorących udział w badaniu najczęściej wykryto allele HLA DRB3*01:14. Z kolei pacjenci z allelem HLA DRB1 11*01 mieli najwyższe wyniki punktowych testów skórnych i swoistych przeciwciał IgE przeciwko alergenom roztoczy kurzu domowego i najwięcej współistniejących alergii, potwierdzonych zarówno w SPT jak i sIgE.

Wnioski

1. Punktowe testy skórne i oznaczenie stężenia swoistych przeciwciał IgE nie powinno być jedynym narzędziem oceny objawów u pacjentów z alergicznym nieżytem spojówek i nosa. Do oceny nasilenia objawów powinno się dodatkowo stosować walidowane skale oceny objawów.
2. Skale do oceny objawów alergii znajdują duże zastosowanie w ocenie nasilenia objawów czy skuteczności terapii. Jednak w przypadku alergicznego nieżyty nosa kwestionariusze kontrolne nadal wymagają walidacji i dalszych badań.

3. Zastosowanie Kabiny Ekspozycji Środowiskowej może zwiększyć wiarygodność i porównywalność danych z badań klinicznych poprzez kontrolowanie wielu zmiennych zakłócających tradycyjne ekspozycje u pacjentów z alergicznym nieżytem spojówek i nosa. Określenie cech każdej Kabiny Ekspozycji Środowiskowej w znormalizowany sposób oraz ujednoczenie protokołów dla tych badań w nich prowadzonych poprawi jakość danych uzyskanych we wszystkich urządzeniach i może pozwolić na ich lepsze zastosowanie w celu dokładniejszego poznania patomechanizmu chorób alergicznych oraz udowodnienia bezpieczeństwa i skuteczności nowych leków.
4. Zastosowanie oceny liczby limfocytów T regulatorowych również w zakresie ich podstawowych subpopulacji jako wskaźnika skuteczności immunoterapii swoistej wymaga dalszych badań oraz oceny na większej grupie pacjentów z alergicznym nieżytem spojówek i nosa uczulonych na roztocze kurzu domowego.
5. Objawy alergicznego zapalenia błony śluzowej spojówek i nosa wywołane podczas ekspozycji w KEŚ stanowią wiarygodne narzędzie do lepszego doboru pacjentów do immunoterapii swoistej, co oceniono na podstawie odpowiedzi ze strony poszczególnych subpopulacji limfocytów T podczas AIT u pacjentów z alergią na HDM.
6. Dalsza identyfikacja i charakterystyka szczegółowych mechanizmów rozwoju nadwrażliwości i tolerancji alergenowej w przebiegu AIT pozwoli udoskonalić i rozwijać szczepionki o zmniejszonym ryzyku działań niepożądanych, o zwiększonej skuteczności klinicznej, a także istotnie wpłynie na zrozumienie podstawowych mechanizmów funkcjonowania układu immunologicznego człowieka.
7. Zrozumienie mechanizmów tolerancji immunologicznej będzie kolejnym krokiem do udoskonalenia terapii chorób alergicznych, w których immunoterapia swoista odgrywa kluczową rolę.

Abstract

Introduction

Currently, allergy is regarded as a pandemic disease. It is a very important public health problem, affecting over 150 million people in Europe. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) predicts, taking into account epidemiological trends, that in less than 15 years, more than half of the European population will be affected by allergic diseases.

The only cause of allergy therapy is specific immunotherapy (AIT), which effectively alleviates the symptoms and its beneficial effect persists for many years after the end of use.

Despite intensive research, the mechanism of immune tolerance formation remains unclear, which translates into limited possibilities of further use, improvement of the effectiveness and safety of specific immunotherapy.

Aim

The main aim of the study was to analyse the mechanisms of development of immune tolerance during the course of allergen-specific immunotherapy in patients with allergic rhinoconjunctivitis due to sensitisation to house dust mite and to assess the possibility of their further use to improve the effectiveness and safety of AIT.

The study is within the field of clinical immunology, with particular emphasis on the mechanisms of immune tolerance in the course of allergen immunotherapy.

Material and methods

50 patients with allergic rhinitis were included in the study. Sensitisation to house dust mite was confirmed by skin prick tests and specific IgE antibodies measurement. In addition, patients were exposed in the Allergen Exposure Chamber using *Dermatophagoides pteronyssinus* allergens. Selected patients were treated with specific immunotherapy against house dust mite allergens.

In this study, allergen-specific CD4+ lymphocytes were assessed by flow cytometry, at subsequent therapy time points the percentage and activity of selected subpopulations of CD4+ lymphocytes: Th1 and Th2, Th9, Th17 and Th22, as well as regulatory T lymphocytes (Treg). In addition, HLA genotyping was performed and the relationship between HLA (MHC II) and the response profile to house dust mite allergens was assessed.

Results

1. The patients enrolled in the study were sensitized to house dust mite as confirmed by skin prick test and specific IgE, both against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. The size of the skin prick tests and the concentration of sIgE in the range of house dust mite allergens did not show any difference with regard to gender or age of patients. A very high positive correlation between the results of skin prick tests for *D. pteronyssinus* and *D. farinae* ($p < 0.0014$, $r = 0.76$) was demonstrated.

2. For specific IgE antibody, the majority of the patients showed concentration of sIgE against *D. pteronyssinus* in classes 2 and 3, while for *D. farinae*, the concentration of sIgE was most common in the class 3. Therefore, a clear titer of antibodies was detected, in this case clinical symptoms are usually present.

3. There was a very high positive correlation between the results of skin prick tests for *D. farinae* and the determination of specific IgE against *D. pteronyssinus* ($p < 0.0014$, $r = 0.68$). Statistically significant correlations ($p < 0.005$) for *D. farinae* ($r = 0.55$) and *D. pteronyssinus* ($r = 0.53$) were found between the response to individual house dust mite allergens determined using the above two methods. The correlation between sIgE *D. pteronyssinus* and sIgE *D. farinae* ($r = 0.81$) was also confirmed.

4. The concentration of specific IgE antibodies to *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* did not reflect the severity of nasal symptoms or the amount of drugs consumed by patients with allergic rhinoconjunctivitis. The higher the concentration of sIgE, the lower the severity of ocular (itchy eyes, tearing, redness of the eyes) and non-nasal (coughing, wheezing, shortness of breath) symptoms. In the area of sIgE against *Dermatophagoides pteronyssinus*, the increase in antibody concentration did not clearly affect

the quality of life. The concentration of specific IgE antibodies against house dust mite allergens does not reflect the severity of the symptoms assessed on the VAS scale by patients with allergic rhinoconjunctivitis.

5. In all the groups of symptoms assessed using the RQLQ scale, patients with the most severe nasal symptoms most often pointed to the impact of practical problems on mood and the effect of nose / eye symptoms on general well-being. In the range of individual symptoms assessed on the RQLQ scale, nasal symptoms most often correlated with fatigue, headache, sneezing, and irritation. Interestingly, all correlations of nasal symptoms had negative r-values for impaired concentration, eye pain and eye swelling assessed on the RQLQ scale.

6. In all the groups of symptoms assessed using the VAS scale, patients with nasal symptoms most often pointed to nasal itching, however, in the division into groups of symptoms, the most correlations were between ocular symptoms assessed on the VAS scale and nasal symptoms (dSS).

7. The Total Nasal Symptom Score (TNSS) scale is a stable and reproducible tool for assessing nasal symptoms during testing in the Allergen Exposure Chamber (AEC). The TOSS scale is a suitable tool for assessing eye symptoms during testing in the Allergen Exposure Chamber. Eye symptoms scored by patients on the TOSS scale are not a good indicator for assessing the severity of allergic symptoms when attempting exposure at AEC. Assessment of respiratory symptoms on the TNSS scale is not a good indicator for monitoring the allergic reaction during exposure to house dust mite allergens in AEC.

8. Significant variation in the time of symptoms averaged on the Total Symptom Score (TSS) scale in individual patients indicates the need for further analysis of the usefulness of the scale to assess nose, eye and respiratory symptoms during subsequent exposure tests at AEC. The TSS scale is a good illustration of the severity of allergic symptoms when attempting exposure at AEC. The severity of nose and eye symptoms is similar during exposure at AEC.

9. Th1 lymphocyte response decreased during the course of specific immunotherapy after three months of treatment of patients allergic to house dust mite. Response from Th2 GATA3+ lymphocytes decreased during the course of specific immunotherapy from the first days of starting treatment. The response from Th2 CCR4 + lymphocytes decreased during the course of specific immunotherapy, reaching a lower level after 6 months of therapy than before the start of treatment. However, a renewed increase in the number of lymphocytes with the Th2 CCR4 + phenotype requires further research in the subsequent years of specific immunotherapy in patients allergic to house dust mites.

10. The number of Th17 lymphocytes is characterized by high variability during the course of specific immunotherapy in patients allergic to house dust mite. Assessment of Th17 lymphocyte subpopulation requires further research on a wider group of patients in subsequent years of AIT. Due to high variability and an upward trend one year after the start of specific immunotherapy, the number of Th22 phenotype lymphocytes requires further evaluation in a larger number of patients and during subsequent years of treatment.

11. An almost six-fold increase in the number of Treg lymphocytes in the first month of specific immunotherapy and a gradual decrease in the next five months of treatment was demonstrated, reaching a level comparable to the initial level in patients with allergic conjunctivitis and rhinitis

allergic to house dust mites participating in the study. Immune balance was restored after 360 days of specific immunotherapy.

12. The largest variation in B-lymphocytes concerned patients 6 months after the start of specific immunotherapy.

13. Larger bubble diameter for skin prick tests and higher sIgE concentration using *D. pteronyssinus* allergens determines the higher number of regulatory T cells after one month of specific immunotherapy, while the higher the concentration of specific IgE antibodies against *D. farinae* the higher the number of Treg lymphocytes 3 months after the start of specific immunotherapy.

14. In the Th1 and Th2 populations, an important indicator for assessing cellular response in patients with allergic rhinoconjunctivitis to house dust mite will be the assessment of Th1 and Th2 GATA3+ lymphocyte subpopulations during the first three months of specific immunotherapy.

15. T lymphocyte subpopulations such as Th17 and Th22 and B lymphocytes as single parameters are not a good indicator for assessing the regulation of immune response when using specific immunotherapy in patients allergic to house dust mite.

16. HLA DRB3*01:14 alleles were most commonly detected in the patients in the study. In turn, patients with the HLA DRB1 11*01 had the highest results of skin prick tests and specific IgE antibodies against house dust mite allergens and the most concomitant allergies confirmed in both SPT and sIgE.

Conclusions

1. The size of the skin prick tests and assessment of sIgE against house dust mite allergens did not reflect the severity of allergic rhinoconjunctivitis symptoms. Therefore, skin prick tests or sIgE should not be the only tool to assess symptoms in patients with allergic rhinoconjunctivitis. In addition, validated symptom score scales should be used to assess symptom severity.
2. Scales measuring allergy symptoms are widely used in assessing the severity of symptoms or the effectiveness of therapy. However, for allergic rhinitis, follow-up questionnaires still need validation and further testing.
3. The use of an Allergen Exposure Chamber can increase the reliability and comparability of clinical trial data by controlling many variables that interfere with traditional exposures in patients with allergic rhinoconjunctivitis. Determining the features and each AEC in a standardized manner and standardizing the protocols for these tests will improve the quality of data obtained in all devices and may allow for their better use to better understand the pathomechanism of allergic diseases and to prove the safety and efficacy of new drugs.
4. The use of regulatory T lymphocyte assessment also in their basic subpopulations as an indicator of the effectiveness of specific immunotherapy requires further research and assessment on a larger group of patients with allergic conjunctivitis and rhinitis allergic to house dust mite.

5. Rhinoconjunctivitis symptoms induced during exposure in AEC provide a plausible tool for a better patient stratification for AIT as assessed by strong specific Treg cell responses during AIT in HDM allergic subjects.
6. Further identification and characterization of specific mechanisms for the development of hypersensitivity and allergen tolerance in the course of AIT will allow to improve and develop vaccines with reduced risk of side effects, with increased clinical effectiveness, and also significantly affect the understanding of the basic mechanisms of the functioning of the human immune system.
7. Understanding the mechanisms of immune tolerance will be the next step to improving the therapy of allergic diseases in which specific immunotherapy plays a key role.