

## **REZUMAT**

### **IMUNOGLOBULINA Y – VALENȚE BIOLOGICE ȘI UTILIZĂRI TERAPEUTICE**

**Doctorand: CHIURCIU Constantin**  
**Conducător științific: Prof. univ. dr. DANEȘ Doina**

**CUVINTE CHEIE: antigene, imunoglobulina Y, IMUNOINSTANT, tratament personalizat, psoriasis, parodontită, infecții cu MRSA, mastite subclinice**

Gălbenușul oului de găină este considerat a fi o sursă ideală de imunoglobuline, iar dintre acestea, IgY este anticorpul predominant. Literatura de specialitate oferă multe informații cu privire la avantajele folosirii imunoglobulinelor Y față de IgG de mamifer.

În primul rând, obținerea de IgY este neinvazivă, ceea ce o face potrivită pentru fabricația la scară largă. Astfel, anticorpii IgY pot fi ușor obținuți prin acțiunea simplă de colectare a ouălor, separare a gălbenușurilor, izolare și purificare, în locul metodei stresante, de sângerare a animalelor, în vederea obținerii serului. Cantitatea disponibilă dintr-un anumit anticorp este considerabil crescută, prin obținerea repetată de ouă de la aceeași găină. Producția de anticorpi din oul de găină este mai mare în comparație cu cea de anticorpi de la un mamifer de dimensiuni similare. Într-un an, de la o găină, se poate obține o mare cantitate de anticorpi, aproximativ 40 g, din care 1-10% pot fi anticorpi specifici. Tehnologia IgY oferă de asemenea avantaje economice remarcabile deoarece costurile pentru păstrarea și întreținerea găinilor sunt mai mici decât cele pentru iepuri.

În al doilea rând, datorită distanței filogenetice dintre găini și mamifere, IgY nu interacționează cu factorii reumatoizi, cu receptorii pentru fragmentul cristalizabil (Fc) și nu activează sistemul complement al mamiferelor.

De asemenea, anticorpii IgY pot recunoaște mai mulți epitopi ai proteinelor mamifere înalt conservate decât sunt capabile imunoglobulinele G de mamifer, astfel încât IgY poate induce un răspuns imun eficient. În cazul în care se imunizează găini și iepuri cu același antigen, păsările răpund cu anticorpi specifici, lucru care rareori poate

fi atins la iepuri. Imunizarea la găină necesită cantități mici de antigen, pentru a obține un titru ridicat și durabil de IgY în ou.

Anticorpii IgY sunt stabili în timp: au fost stocați peste 10 ani, la 4 °C, fără nici o pierdere semnificativă a activității lor și și-au păstrat activitatea după 6 luni la temperatura camerei sau o lună la 37 °C.

Anticorpii IgY joacă un rol din ce în mai mare în cercetare, diagnostic și terapie. Datorită cantității mari de anticorpi IgY care se poate obține, aceștia pot fi utilizați în imunoterapia și imunoprofilaxia multor infecții virale și bacteriene, atât în medicina umană cât și în cea veterinară, precum și ca alternativă în antibioterapia clasică. În plus, imunoglobulinele Y pot fi folosite ca supliment imunitar natural, în formulele produselor alimentare pentru sugari sau pentru alte produse alimentare noi.

Pornind de la aceste avantaje ale tehnologiei IgY și a aplicațiilor în diverse domenii, în cadrul programului de cercetare al Romvac Company S.A., s-au efectuat studii privind obținerea imunoglobulinelor Y în fază de laborator și industrial, purificarea și caracterizarea lor imunochimică și demonstrarea specificității lor față de antigenele care au fost folosite pentru imunizarea găinilor. Imunoglobulinele Y obținute au fost specifice contra tulpinilor bacteriene, majoritatea dintre ele rezistente la antibiotice, izolate de la pacienți cu infecții acute și cronice din spitale din România, precum și de la vaci cu mastite subclinice. Imunoglobulinele Y obținute, s-au condiționat sub diverse forme ca brand IMUNOINSTANT: soluție, gel, pulbere, spray.

Pe baza rezultatelor experimentelor efectuate *in vitro*-care au dovedit că imunoglobulinele Y specifice, inhibă multiplicarea bacteriilor rezistente la antibiotice - în prezenta teză, am avut ca obiectiv general, aplicarea unor programe/scheme de tratament, pentru a demonstra valențele biologice și importanța utilizării terapeutice a imunoglobulinei Y. Astfel, au fost administrate produse din gama IMUNOINSTANT, cu IgY monovalent/bivalent/polivalent, pentru tratarea unor boli, precum psoriazisul, parodontopatiile, infecțiile cu *Staphylococcus aureus* metilino-rezistent și mastitele subclinice.

**PRIMA PARTE A TEZEI**, prezintă **STUDIUL BIBLIOGRAFIC**, care este exprimat în peste 50 pagini și cuprinde elemente privind sistemul imun la păsări (**Capitolul I**), imunoglobulinele - structură, funcții, imunoglobuline din ou (**Capitolul II**) și acțiunea specifică a imunoglobulinelor aviare (**Capitolul III**).

Organele limfoide primare ale sistemului imun la păsări, sunt reprezentate de timus (cu rol în producerea și maturarea limfocitelor T) și bursa lui Fabricius (cu rol important în maturarea limfocitelor B). Organele limfoide secundare ale sistemului imun la păsări sunt reprezentate de splină, ganglioni limfatici și țesut limfoid necapsulat-amplasat la nivelul epiteliului digestiv, respirator, urogenital și cutanat.

Limfocitele B care asigură imunitatea de tip umoral, părăsesc bursa prin vasele sangvine care aprovizionează foliculii bursali, ajungând în țesuturile limfoide, cu rol important în producerea de anticorpi (imunoglobuline). Imunoglobulinele G și M la păsări au fost identificate în sânge ca principali anticorpi serici, iar IgA în secreții (bilă).

Datele din literatură sugerează o analogie între modul de transfer pasiv al imunoglobulinelor la păsări și cel de la mamifere.

În 1962, imunoglobulina Y a fost identificată de Williams J., ca fiind gamaglobulină într-o fracție de  $\gamma$ -livetină, din gălbenușul de ou, iar în 1969, datorită diferențelor majore dintre IgG de la păsări și mamifere, Leslie G. A. și Clem L. W. au propus termenul de IgY pentru anticorpii IgG din gălbenușul de ou. În ciuda omologiei funcționale dintre IgY aviar și IgG de la mamifere, există diferențe în greutatea moleculară, structura și funcțiile biochimice. Adevărata imunoglobulină din gălbenușul de ou, IgY ( $\gamma$ -livetină), a fost cercetată extensiv pentru a evalua potențialul său ca agent profilactic și terapeutic în bolile infecțioase, în special pentru tratamentul agenților patogeni rezistenți la antibiotice. Poate fi utilizată ca alternativă în antibioterapia clasică, atât din medicina umană cât și veterinară. În domeniul veterinar, administrarea imunoglobulinei Y s-a dovedit a fi de succes pentru tratamentul unei varietăți de infecții gastro-intestinale cu rotavirusul bovin, coronavirusul bovin, *Yersinia ruckeri*, *Escherichia coli* enterotoxigenă, *Salmonella* spp., *Edwardsiella tarda*, *Staphylococcus* și *Pseudomonas*. În ceea ce privește utilizarea profilactică a IgY, aceasta este o alternativă la anticorpii de mamifere pentru imunizarea pasivă orală împotriva diversilor patogeni enterici. În medicina umană, administrarea terapeutică de IgY ar putea reduce utilizarea clinică a antibioticelor și ar reduce la minimum riscul ca bacteriile să dezvolte rezistență la antibiotice. Imunoterapia poate fi folosită împotriva agenților patogeni care sunt dificil de tratat cu antibioticele tradiționale. IgY a fost utilizată în tratamentul: infecțiilor intestinale la copii, colitei și bolii celiace, fibrozei chistice, ulcerului gastric și cariilor dentare. A fost de asemenea utilizată în prevenirea pandemiei de gripă aviară/porcină, a obezității, în combaterea enterotoxinei stafilococice B (SEB)-o potențială armă biologică-și în studiul proteinelor (proteomica). Anticorpii IgY sunt folosiți și în alte aplicații, printre care: diagnosticul de cancer gastric, detectarea markerilor de cancer ovarian și sân, detectarea virusului AHS (pesta africană a calului), determinarea factorului de creștere a hepatocitelor (HGF) în ser și urină, diagnosticarea infecțiilor cu bacteria *Campylobacter fetus*, detectarea TGF (Tumor Growth Factor) în fluidele biologice, determinarea reactanților inflamațiilor, detectarea bacteriei *Bordetella bronchiseptica*, cât și pentru detectarea antigenelor din serul uman, folosind rezonanța plasmonică de suprafață (SPR). De asemenea, s-au obținut anticorpii IgY anti-E7 HPV16, făcând posibilă utilizarea lor în screening-ul probelor clinice, precum și anticorpii IgY anti-venin.

**PARTEA A DOUA "Cercetări proprii"**, începe cu scopul și obiectivele generale ale cercetării, continuă cu prezentarea proceselor de obținere și formulare farmaceutică a imunoglobulinei Y din ouăle hiperimune, apoi cu prezentarea mai multor studii de caz care descriu aplicațiile terapeutice ale acestor produse la om și animale și se încheie cu concluziile generale și recomandări, precum și cu o amplă selecție bibliografică. Această parte a tezei, care reprezintă aproximativ 67 % din volumul total, conține 32 tabele și 79 figuri.

**Capitolul IV** se referă la *obținerea, controlul și condiționarea imunoglobulinelor Y din ou*, operații efectuate în cadrul Laboratorului de Cercetare-Producție IMUNOINSTANT.

În cadrul subcapitolului de obținere a imunoglobulinelor Y specifice, sunt descrise: 1) metodele de izolare și identificare a unor tulpini bacteriene și fungice prelevate de la pacienții care au fost tratați cu antibiotice, dar fără succes, 2) modul de preparare a antigenului (inoculului) personalizat, monovalent și polivalent și 3) modul/schema de imunizare a găinilor convenționale sau libere de germeni specifici (SPF) de la care se colectează ouăle hiperimune.

În subcapitolul care se referă la controlul imunoglobulinelor Y specifice, sunt prezentate testele prin care se evaluează activitatea/specificitatea anticorpilor IgY din gălbenuş și anume: 1) testul ELISA indirect, 2) testul ELISA direct, 3) testul de imunodifuzie în gel de agar (IDGA), 4) testul de imunodifuzie radială (IDR) și 5) reacția de aglutinare rapidă pe lamă (RAR).

Următoarea secțiune descrie etapele de fabricare și tehnologia pentru obținerea formelor de dozare pentru imunoglobulină Y (soluție, pulbere, spray, suspensie, unguent și gel), precum și o prezentare sistematizată a compoziției și a modului de utilizare a mai multor produse finite care conțin IgY..

Ultimul subcapitol prezintă utilizarea IgY obținută din ouă hiperimune pentru producerea reactivilor pe bază de IgY proiectați pentru teste in vitro cum ar fi ELISA sau imunofluorescența.

**Capitolul V** *"Utilizarea imunoglobulinelor specifice din ou în tratamentul unor entități morbide specifice omului, care dispun exclusiv de terapie paleativă"*, este format din două subcapitole (5.1. Psoriazisul și 5.2. Parodontopatia), care cuprind: 1) prezentarea generală a afecțiunii (definiție, cauze, tratament, prognostic), 2) tratamentul aplicat, 3) rezultate/discuții și 4) concluzii. Studiile s-au realizat pe pacienți cu psoriazis și parodontopatie, în cadrul Cabinetului de Medicină Complementară IMUNOINSTANT și a unui cabinet stomatologic

**Psoriazisul** este o boală a cărei etiologie este neclară, care reduce calitatea vieții și provoacă multe probleme psihologice și psihosociale la individul afectat. Cu toate acestea, s-a stabilit că predispoziția genetică și stimulii de mediu contribuie la anomalii imunologice, biochimice și vasculare, ducând la proliferarea și diferențierea epidermică anormală. În vederea îmbunătățirii calității vieții pacienților cu psoriazis, schemele terapeutice aplicate s-au perfecționat, dar fără a obține vindecarea bolii.

Anticorpii reprezintă o nouă speranță pentru gestionarea psoriazisului, oferind avantaje precum: lipsa toxicității asupra organelor interne, excelența tolerabilitate, inducerea unei remisiuni susținute. Produsele din gama IMUNOINSTANT, ce conțin anticorpi policlonali IgY din gălbenuş de ou, pot reprezenta o șansă pentru pacienți cu leziuni psoriazice infectate cu germeni patogeni specifici, sensibili sau rezistenți la antibiotice. Produsele cu IgY nu au indus reacții adverse și nici apariția răspunsului imun idiopatic în corpul pacientului, ele putându-se administra indiferent de vârstă, singurul criteriu de excludere din tratament fiind alergia/sensibilitatea la proteinele

din ou. Pacienți incluși în studiile realizate au fost diagnosticați clinic cu psoriazis vulgaris, cu diferite localizări și în diferite stadii. Inițierea tratamentului s-a realizat în urma evaluării fizice și clinice. Aprecierea efectelor terapeutice ale produselor cu IgY la pacienții cu psoriazis s-a făcut prin: verificarea ameliorării/ remisiei simptomatologiei psoriazisului, examen histologic, examen microbiologic privind prezența/ absența agenților patogeni identificați inițial și analize biopsice. În toate cele 5 studii efectuate, s-a constatat că terapia generală și personalizată, orală și topică cu produse conținând imunoglobulină Y polivalentă/ bivalentă/ monovalentă, a fost eficientă pe termen lung, lucru dovedit de rezultatele bune, promițătoare, în cazul majorității pacienților cu psoriazis. Din punct de vedere structural, atât pielea cât și unghiile pacienților și-au revenit la normal.

**Parodontopatia marginală** sau parodontoza, este o afecțiune dentară care definește îmbolnăvirea parodontiului marginal inițiată și perpetuată de diverse bacterii (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus mittis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*)

Aceasta, apare datorită modificării echilibrului dintre capacitatea de apărare și rezistența locală/generală a organismului, pe de o parte, și acțiunea nocivă a factorilor extrinseci și intrinseci ai parodontiului, pe de altă parte. O abordare mai sigură pentru controlul bolilor dentare decât imunizarea activă, este imunizarea pasivă locală, bazată anticorpi monoclonali murini, anticorpi transgenici de plante, anticorpi IgY din gălbenuș de ou și anticorpi din lapte bovin față de antigene bacteriene specifice. Imunoterapia orală cu IgY este o nouă strategie de tratament promițătoare pentru infecțiile din cavitatea bucală. O soluție IgY 0,1%, poate reduce cu 21,1% greutatea plăcii de pe suprafețele dintelui față de momentul inițial, iar administrarea orală a IgY anti-*Candida albicans* a redus semnificativ numărul de levuri numărul leziunilor limbii, colonizarea levurii în alte organe, deci a redus diseminarea prin blocarea legării microorganismului la celulele gazdă.

În toate studiile noastre de caz, aplicarea orală și topică a produselor IMUNOINSTANT cu anticorpi IgY personalizați a condus la rezultate promițătoare. Analizele microbiologice efectuate post-terapie, au indicat un rezultat negativ pentru agenții patogeni identificați înainte de terapie: *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Streptococcus spp.*  $\alpha$ -hemolitic, *Streptococcus* grup B, *Streptococcus* grup D și *Staphylococcus spp.*  $\alpha$ -hemolitic. Rezultatele obținute, cu produsele noastre (IMUNOINSTANT et IMUNODENT) susțin datele din literatură privind eficacitatea tratamentelor cu IgY monovalent/bivalent/polivalent, pentru reducerea infecțiilor bacteriene din cavitatea bucală.

**Capitolul VI** "Utilizarea imunoglobulinelor specifice din ou în tratamentul unor entități morbide specifice omului/animalelor care dispun de terapie curativă", cuprinde două subcapitole [6.1. Infecția cu *Staphylococcus aureus* meticilino-rezistent (MRSA) și

6.2. Mastita subclinică], structurate ca: 1) prezentare generală (definiție, cauze, tratament, prognostic), 2) tratament aplicat, 3) rezultate/discuții și 4) concluzii.

**Infecțiile cu MRSA** sunt în mod obișnuit contractate în mediul spitalicesc sau în colectivității și cauzează frecvent boli la persoanele cu un sistem imunitar compromis. MRSA este o bacterie rezistentă la numeroase antibiotice, făcând astfel dificilă tratarea acestora. În cadrul studiilor efectuate cu privire la infecțiile cutanate prezente în plăgile psoriazice, s-a demonstrat că 36,6% sunt infecții cu *Staphylococcus aureus*, iar 21,9% dintre acestea, sunt cu MRSA. Utilizarea antibioticelor pe scară largă în industria hranei pentru animale pentru tratamentul preventiv/curativ al bolilor și promovarea creșterii, a dus la dezvoltarea bacteriilor antibioretistente și la riscul ca antibioticele să devină ineficiente. Imunoterapia cu anticorpi specifici este o alternativă la tratamentul cu antibiotice, iar imunoglobulinele Y specifice sunt buni candidați pentru înlocuirea antibioticelor din furaje sau din apa de băut a animalelor. Experimentele au arătat o inhibiție a creșterii culturii de *Staphylococcus aureus* de către IgY specifică, la concentrații de 1–5 μg/ml, probabil ca urmare a interacțiunii imunoglobulinei Y cu componentele de suprafață ale bacteriei.

Studiile realizate în cadrul Cabinetului de Medicină Complementară IMUNOINSTANT, s-au efectuat pe pacienți de vârste diferite (7–72 ani), cu infecții urinare, fistule cu diferite localizări, plăgi postoperatorii/diabetice, afecțiuni dermatologice (acnee, epidermoliză), în diverse stadii, cu vechimi și localizări diferite, majoritatea cauzate de MRSA. În cazurile prezentate, administrarea orală și locală a produselor care conțin IgY (ouă hiperimune PC2, IMUNOINSTANT MULTIPLU – soluție, spray, gel - IMUNOINSTANT G, UNGUENT PV) a condus la rezultate favorabile după câteva luni de tratamente generale și personalizate (1 - 10 luni)

**Mastitele** sunt considerate procese inflamatorii ale glandei mamare, care produc modificări fizico-chimice și patologice ale țesutului glandular și ale laptelui. Mastita constituie o problemă gravă pentru industria laptelui, pierderile putând ajunge până la 10-15% din producția anuală de lapte de vacă. În România, pierderile provocate de mamite sunt evaluate la aproximativ 11% din producția de lapte. În mastitele subclinice, laptele nu suferă schimbări evidente, are aspect aparent normal, dar se pot depista celule somatice peste limita maximă admisă, se observă prezența agenților patogeni, scade producția de lapte și acesta coagulează la fierbere. Pe lângă problemele serioase care afectează producția de lapte, mamitele afectează bunăstarea animalelor și sănătatea populației. Mastitele vacilor sunt provocate de agenți patogeni precum: *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escheria coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia rubidaea*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma agalactiae*, *Nocardia nova*, *Nocardia farcinica*, stafilococi oportuniști, coagulazo-negativi (SCN) etc.

Tratamentul acestei afecțiuni este o problemă majoră din cauza costurilor și a antibioretistenței cauzate de tratamentele nejudicioase aplicate. În prezent, pentru vi

tratamentul mastitelorsunt utilizate în principal antibioticele , dar acestea devin de multe ori ineficiente în fața agenților patogeni, față de care imunoterapia/ imunoprofilaxia reprezintă o soluție alternativă de tratament. Există vaccinuri disponibile în comerț împotriva diferiților agenți infecțioși care provoacă mastite, dar acestea nu sunt destul de eficiente pentru terapie și sunt utilizate în principal pentru imunoprofilaxie. O alternativă atractivă este tratamentul cu anticorpi IgY, care a demonstrat că reduce numărul de celule somatice, inhibă creșterea bacteriilor și crește fagocitoza agenților patogeni de către macrofagele de lapte. Noi am dezvoltat un produs (IMUNOINSTANT-VOC) conținând IgY obținut consecutiv hiperimunizării găinilor cu germeni izolați dintr-o fermă cu vaci atât cu mastită clinică, simptomatică, cât și cu mastită asimptomatică, care s-a confruntat de mai mulți ani cu această afecțiune (determinată de agenți patogeni care nu mai răspundeau la antibioterapie). Testarea produsului cu IgY specific s-a făcut pentru a-i evalua efectul preventiv și terapeutic asupra mastitelorclinice și subclinice, diagnosticate pe baza simptomatologiei, analizei laptelui și a examenului microbiologic. Testările microbiologice ale probelor recoltate post-terapie au fost negative pentru toți agenții patogeni identificați inițial. Examenele de laborator au indicat o scădere semnificativă a numărului de celule somatice față de numărul anterior începerii tratamentului.

Pe lângă restabilirea calității necesare, laptele provenind de la vacile tratate este sigur pentru consum uman, fără a fi necesară o perioadă de așteptare obligatorie (ca în cazul antibioticelor).

**Capitolul VII**, prezintă *concluziile generale și recomandările* care se desprind consecutiv testării imunoglobulinelor Y specifice pentru ameliorarea și controlul anumitor boli la oameni și animale, în special în contextul exploziei fenomenului de rezistență la antibiotice la nivel planetar. Datorită rezultatelor excepționale obținute cu produsele pe bază de anticorpi IgY, se recomandă informarea medicilor, dar și a pacienților, cu privire la potențialul imens al imunoglobulinei Y în terapia și prevenția diverselor afecțiuni acute/cronice.