

Metody badań aerobiologicznych – postępy naukowe i technologiczne

Aerobiology methods – scientific and technological progress

BARBARA MAJKOWSKA-WOJCIECHOWSKA

Klinika Immunologii i Alergii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

Aerobiologia jako nauka pojawiła się dziewięćdziesiąt lat temu i ciągle się rozwija. Z biegiem lat opracowano wiele technik stosowanych do badania różnorodności zarodników grzybów i pyłku w powietrzu atmosferycznym. Obecnie najbardziej popularne są urządzenia typu Hirst. Powoli, ale zdecydowanie wkracza nowa era urządzeń automatycznych, z możliwością uzyskiwania wyników w czasie rzeczywistym. W obecnym czasie są one szczególnie ważne, gdyż jedna trzecia mieszkańców miast populacji świata cierpi na alergie, po ekspozycji na pyłek i alergeny. Przegląd ten przedstawia obecną wiedzę, na temat znaczenia monitorowania pyłku i zarodników grzybów w odniesieniu do postępu i ograniczeń starych i nowych technik pobierania próbek, oraz aktualną wiedzę na temat molekularnych aspektów badań alergenów. Monitorowanie zarodników pyłku i grzybów wydaje się również potencjalnym narzędziem do badań wielodyscyplinarnych, stosowanych w celu zrozumienia bioróżnorodności przyrody, poczynając od fizyki aerozoli pyłku - do molekularnych i omocnych aspektów charakterystyki alergenów i ich interakcji z naszym układem odpornościowym zarówno w zdrowiu jak i chorobie. Dzięki badaniom aerobiologicznym, wykorzystującym analizy chemiczne, biochemiczne, mikrobiologiczne w odniesieniu do danych meteorologicznych i satelitarnych, dostarczono dowodów na istnienie dalekiego transportu pyłku i zarodników, a także ich wpływu na rozprzestrzenianie się wirusów i bakterii oraz innych zjawisk.

Słowa kluczowe: aerobiologia, alergia pyłkowa, badania stężeń pyłku, alergeny

Summary

As a science, aerobiology emerged ninety years ago. Over the years many techniques have been developed to explore the diversity of fungal spores and pollen grains in atmospheric air. Currently, the most common are the Hirst type samplers. Slowly but surely a new era of automatic devices with the possibility of obtaining real-time results begins. They are particularly important in our time, when one-third of the world urban population suffers from allergies to pollen. This review explores the current understanding of the significance of the pollen and fungal spores monitoring, in relation to advances and limitations of the old and the new sampling techniques as well as the present sampling techniques and present knowledge of the molecular aspects of pollen allergens. Pollen and fungal spores monitoring promises to be a valuable tool for examination of the interface between multidisciplinary approaches, allowing us to understand the heterogeneity of nature from the pollen aerosol physics to the molecular and omical aspects of the pollen allergens characteristics and their interaction with our immune system both in health and disease. Thanks to the aerobiological research, using chemical, biochemical and microbiological analysis with meteorological and satellite data, we provide the evidence of the long distance transport of the pollen and spore, their impact on the spread of viruses and bacteria and connections to other phenomena.

Keywords: aerobiology, pollen allergy, pollen monitoring, allergens

© *Alergia Astma Immunologia* 2020, 25 (3): 141-153
www.alergia-astma-immunologia.pl



Adres do korespondencji / Address for correspondence

Dr n. med. Barbara Majkowska-Wojciechowska
Klinika i Alergii UM w Łodzi
ul. Pomorska 251
92-213 Łódź
tel.: 42 675 73 09

Alergia pyłkowa jest poważnym problemem zdrowia publicznego i ma istotny wpływ na zdrowie milionów ludzi. Rodzaj objawów i stopień ich nasilenia jest cechą indywidualną osób uczulonych. Może przebiegać bezobjawowo, lub wahać się od niewielkiego nieżyty nosa do anafilaksji. Wzrastający poziom zanieczyszczeń powietrza, styl życia określane jako Zachodni istotnie korelują ze wzrostem częstości alergii pyłkowych, szczególnie na obszarach miejskich w porównaniu do wiejskich. Alergia, w miastach należy do najczęstszych przewlekłych chorób dzieciństwa [1], [2].

W Niemczech prawie co trzecia osoba jest dotknięta chorobą alergiczną, a uczulenie stwierdzono u 50% populacji [3]. W Austrii milion na osiem milionów mieszkań-

ców cierpi na alergię pyłkową [4]. Z badań Wise [5] wynika, że tylko w Wielkiej Brytanii na przestrzeni dwudziestu lat (1992-2012), częstość reakcji anafilaktycznych wzrosła o 615%! w odniesieniu do 2015 roku. Poza tym, aż siedem razy więcej chorych hospitalizowano z powodu poważnych reakcji alergicznych w porównaniu do roku 2004. Kliniczne objawy alergii mogą różnić się ze względu na indywidualne fenotypy i endotypy, rodzaje lokalnej flory, diety, stanu środowiska, składu mikrobiomu, strefy geograficznej, czy stopnia narażenia na alergen.

W celu ograniczenia rozwoju ryzyka chorób alergicznymi badane są różnorodne rodzaje interwencji [6, 7, 8]. Prowadzone są też badania nad przyczynami wzrostu alergogenności pyłku roślin w kontekście czynników środowi-

skowych, bo np. dowiedziono, że ziarna pyłku roślin rosnących w pobliżu arterii komunikacyjnych wykazują wyższe stężenia alergenów, a u dzieci raportowane są nasilone objawy alergii układu oddechowego [9,10].

Symulacje epidemiologiczne, dotyczące częstości alergii pyłkowej wobec postępujących zmian środowiskowych i klimatycznych w Europie zapowiadają rychłe podwojenie się liczby osób uczulonych. Oszacowano, że częstość uczuleń np. na alergeny pyłku ambrozji w latach 2041–60 może ulec zwiększeniu ponad dwukrotnie, czyli może nastąpić wzrost liczby osób uczulonych z obecnych 33 do 77 milionów [11].

Uzupełnieniem podstawowej diagnostyki alergii pyłkowej, rozszerzonej przez precyzyjną analizę uczuleń opartej na komponentach, powinna być dostępność do wyników badań na temat lokalnych stężeń pyłku roślin. Może to ułatwić działania lecznicze i zalecenia profilaktyczne, a także przewidywania nasilenia reakcji po ekspozycji na alergeny [12].

Berger i wsp. [13] opracowali precyzyjne i rygorystyczne kryteria dla ośrodków monitoringu oraz procedury ich certyfikacji. Zwrócili też uwagę na aspekty kompetencji i konieczności współpracy kadry w zakresie aerobiologii, botaniki, nauk medycznych. Bardzo istotne jest też aby wyniki badań mogły być odnoszone do ekspertyz alergologicznych, opartych na obserwacjach klinicznych, czyli dziennikach objawów (lub aplikacjach mobilnych) [14]. Natomiast rozpowszechnianiem wyników badań powinny zajmować się tylko instytucje, które nie generują konfliktu interesów.

W związku z tym istnieje pilna potrzeba prowadzenia badań środowiskowych, a więc pomiarów stopnia ekspozycji na pyłek i alergeny, na obecność czynników kodymujących i ich wpływu na mechanizmy immunologiczne, promujące rozwój alergii. Celem pracy jest przegląd metod stosowanych w aerobiologii i interdyscyplinarnego znaczenia tych badań.

Aerobiologia w praktyce

Aerobiologia (z greckiego *αἴρ*, *aēr*, „air”; *βίος*, *bios*, „life”; oraz *-λογία*, *-logia*) zajmuje się badaniem aeroplanktonu, czyli pomiarami cząstek biologicznych rozprzestrzeniających się przez cyrkulację powietrza atmosferycznego. Jest stosunkowo młodą dziedziną nauki i diagnostyki o zasięgu wielodyscyplinarnym. Integruje wiele dziedzin nauk podstawowych i medycznych, np. botanikę, mykologię, ekologię, agronomię bioklimatologię, bioinformatykę, alergologię, immunologię, pulmonologię. Wspiera też badania z zakresu wielu dziedzin pokrewnych, np. pomaga w rekonstrukcji roślinności minionych wieków, w śledzeniu zmian klimatycznych. Pomaga między innymi w obserwacjach zmian antropogenicznych, zmian różnorodności biologicznej, weryfikacji jakości miodu, który jest uważany za bioindykator stanu środowiska w okolicy ula, jest także ważnym narzędziem stosowanym w ekologii, i kryminalistyce [15, 16].

Początki pomiarów, początki sieci aerobiologicznych w Polsce i na świecie

Z uwagi na postępujący wzrost częstości zachorowań na alergię, podstawowe badania aerobiologów wiążą się z potrzebami chorych i koncentrują się na analizie aktual-

nych stężeń pyłku roślin i zarodników grzybów mikroskopowych oraz ich alergenów w powietrzu.

Termin „aerobiologia” został wprowadzony w latach trzydziestych XX wieku przez Amerykanina, patologa roślin Freda Campbella Meier’a (1893–1938). Początkowo swoje badania koncentrował na zarodnikach grzybów, potem pyłku. W trosce o chorych udało mu się przeforsować finansowanie badań pyłku przez *National Research Council* w USA, który, jak wynikało z jego obserwacji, przyczyniał się do problemów z oddychaniem u osób wrażliwych [17].

Oren Durham (1889–1967), jest uważany za pioniera badań dotyczących oceny stężeń pyłku na poziomie krajowym i międzynarodowym. Był autorem znormalizowanej techniki do pobierania próbek metodą grawitacyjną, co umożliwiło uzyskiwanie dokładnych i porównywalnych danych dotyczących liczby ziaren i wskaźników pylenia dla poszczególnych regionów geograficznych w Stanach Zjednoczonych. Zasłynął też z pierwszych prób korelowania stężeń pyłku ambrozji z objawami uczulonych pacjentów. Ten amerykański botanik i fizjoterapeuta zorganizował pierwszą sieć monitoringu pyłkowego w USA. Dzięki temu, zwiększył świadomość społeczeństwa na temat zasadności profilaktyki i leczenia alergii pyłkowej. Sieć amerykańskiego monitoringu, już za jego czasów, powiększyła się do kilkudziesięciu stacji w USA, a następnie w Kanadzie i innych krajach kontynentu [18].

Aerobiologia stała się jednak uznaną dyscypliną naukową dopiero w latach siedemdziesiątych XX w., kiedy zostało założone Międzynarodowe Stowarzyszenie Aerobiologiczne (IAA).

Lekarz *William Frankland* (1912–2020), zmarły 2 kwietnia 2020 r. w wieku 108 lat z powodu choroby *COVID 19*, był członkiem założycielem (1970 r.) i prezydentem Międzynarodowego Stowarzyszenia Aerobiologii. Dzięki jego staraniom, wyniki badań aerobiologicznych dotyczących stężeń pyłku, początkowo tylko z Londynu, były regularnie publikowane łącznie z prognozami pogody, od roku 1963, za pośrednictwem *The Times* i *The Daily Telegraph* [19].

11 września 1974 roku w Hadze w Holandii zostało założone Międzynarodowe Stowarzyszenie Aerobiologii (*International Association for Aerobiology*), które skupia naukowców z kręgu aerobiologii, organizuje kursy, sympozja i kongresy, publikuje Międzynarodowy Biuletyn Aerobiologiczny (<https://sites.google.com/site/aerobiologyinternational/>). Godny podkreślenia jest fakt, że zaszczytne stanowisko Prezydenta IAA kadencji 2018-2022, powierzono Dr hab. n. biol. Dorocie Myszkowskiej z Zakładu Alergologii Klinicznej i Środowiskowej UJ CM.

W Polsce, odpowiedzią na potrzeby pacjentów i lekarzy, były systematyczne badania stężeń pyłku i zarodników grzybów mikroskopowych, zainicjowane, przez prof. Krystynę Obtulowicz w Krakowie, a prowadzone metodą grawimetryczną przez prof. Kazimierza Szczepankę w latach 1982-84, a od 1985 do dziś, metodą objętościową [20]. W roku 2008 zostało założone „Europejskie Towarzystwo Aerobiologiczne”. W Polsce wprowadzono metodologię badań zgodnie z zaleceniami *International Association for Aerobiology*. Utworzono też sieć punktów aerobiologicznych [21], które obecnie obejmują coraz więcej ośrodków pomiarowych, opartych w większości o metodę wolumetryczną, z wykorzystaniem urządzeń typu Hirst (Lanzoni lub Burkard). Badania koncentrują się na prowadzeniu prac naukowych, dokonywaniu i raportowaniu codziennych

pomiarów stężeń, tworzenia kalendarzy pyłkowych i opracowywania trendów stężeń w oparciu o dane wieloletnie [22, 23, 24].

Obecnie, w większości krajów świata utrzymywane są sieci pomiarowe. W Polsce istnieją dwie sieci. Ich koordynatorami są dr Piotr Rapiejko, który prowadzi Ośrodek Badania Alergenów Środowiskowych OBAS, oraz Dr hab. n. biol. Dorota Myszkowska z Collegium Medicum Uniwer-

sytetu Jagiellońskiego. Prężnie funkcjonuje też Europejskie Towarzystwo Aerobiologiczne (EAS) [25] Obecnie, w jego zarządzie jest trzech polskich aerobiologów: dr Łukasz Grewling z Uniwersytetu AM w Poznaniu, prof. Agnieszka Griń-Gofryń z Uniwersytetu Szczecińskiego i prof. Idalia Kasprzyk z Uniwersytetu Rzeszowskiego. Przegląd głównych ośrodków monitoringu w Polsce i na świecie podano w tabeli I.

Tabela I. Komunikaty pyłkowe prezentowane są na lokalnych i zbiorczych stronach internetowych w wielu miastach Polski, Europy i świata (aktualizacja z czerwca 2020).

| Dane aerobiologiczne w różnych krajach świata | |
|---|---|
| Europa (EPI) | https://www.polleninfo.org/country-choose.html |
| Litwa | https://www.facebook.com/PollenLatvia |
| Austria | https://www.polleninfo.org/AT/de/prognose/vorhersage.html |
| Czechy | www.pylovasluzba.cz i www.polleninfo.org |
| Słowacja | https://www.polleninfo.org/SK/sk/prognose/zamg-taegliche-prognose.html |
| Finlandia | www.norkko.fi/ |
| Francja | /www.pollens.fr |
| Niemcy | http://www.pollenstiftung.de |
| Włochy | www.ilpolline.it |
| Portugalia | www.rpaerobiologia.com/?iml=EN |
| Serbia | www.nspolen.com |
| Węgry | data.uniphe.eu/indicator/pollenseason. |
| Hiszpania | www.aea.aerobiologia.org |
| Szwajcaria | www.meteoswiss.ch |
| Ukraina | allergy.org.ua/alergoprognoz |
| Wielka Brytania (NPARU) | https://www.worcester.ac.uk |
| USA (NAB) | https://www.aaaai.org/global/nab-pollen-counts?ipb=1&desktop=1 |

Polskie ośrodki aerobiologiczne i dostęp do lokalnych komunikatów

| 1 | Punkty pomiarowe Ośrodek Badania Alergenów Środowiskowych OBAS | www.alergen.info.pl | |
|-----|--|--|--------------------------|
| 2 | Polska Sieć Aerobiologiczna | www.aero.cm-uj.krakow.pl/index.php/komunikaty-pylkowe/ | |
| Lp. | Miasto | Adresy internetowe | Typ urządzeń pomiarowych |
| 1. | Białystok | www.alergen.info.pl | Hirst |
| 2. | Bydgoszcz | www.alergen.info.pl | Hirst |

| | | | |
|-----|--|---|-------------------------|
| 3. | Drawsko Pomorskie | www.alergen.info.pl | Hirst |
| 4. | | | |
| 5. | Izabelin k/Warszawy | www.alergen.info.pl | Hirst |
| 6. | Kraków | www.aero.cm-uj.krakow.pl/index.php/komunikaty-pylkowe/ krakow.pios.gov.pl/stan-srodowiska/komunikat-pylkowy/ | Hirst |
| 7. | Kiekrz k/Poznania | www.alergen.info.pl | Hirst |
| 8. | Łódź 1 | immunologia.umed.pl/p/monitor-pylkowy stowarzyszenie-alergia.pl/ | Hirst |
| 9. | Łódź 2 | www.centrum-alergologii.lodz.pl/komunikaty-pylkowe-dla-alergikow | Hirst |
| 10. | Olsztyn | www.alergen.info.pl | Hirst |
| 11. | Opole | www.alergen.info.pl | Hirst |
| 12. | Piotrków Tryb. | www.alergen.info.pl | Hirst |
| 13. | Poznań | www.paero.home.amu.edu.pl/kalendarz-pylkowy/ | Hirst |
| 14. | Sosnowiec | www.alergen.info.pl | Hirst |
| 15. | Szczecin | www.alergen.info.pl | Hirst |
| 16. | Rzeszów | wb.ur.edu.pl/wydzial/struktura-instytutu/zaklad-monitoringu-srodowiska/komunikaty-dla-alergikow | Hirst |
| 17. | Warszawa 1 Warszawa 2 Warszawa 3 | www.alergen.info.pl | Hirst |
| 18. | Wrocław (wspólnie z UWr) | www.alergen.info.pl | Hirst |
| 19. | Zielona Góra | www.alergen.info.pl | Hirst |
| 20. | Elbląg | www.alergen.info.pl | (inne metody pomiarowe) |
| 21. | Koszalin | www.alergen.info.pl | (inne metody pomiarowe) |
| 22. | Zamość | www.alergen.info.pl | (inne metody pomiarowe) |

Metody monitorowania stężeń pyłku roślin i zarodników grzybów mikroskopowych

Do prowadzenia badań bioaerolu wykorzystuje się różnorodne metody, począwszy od analizy wymazów zbieranych z parapetów, czy płytek, poprzez urządzenia wolumetryczne, następnie automatyczne, a nawet kolektory instalowane na zewnątrz samolotów, które aktywowane są podczas operacji lotniczych. Badania tego typu, (np. *Bioaerol Aircraft NASA*) stosowano w celu pobierania próbek z tzw. „autostrad” aerobiologicznych, zgodnych z mapami komunikacji lotniczej [26].

Metoda gravimetryczna Polega na analizie mikroskopowej pyłku, który po ekspozycji na powietrze atmosferyczne osiadał na lepkiej powierzchni pokrytej żelem np. na szalce *Petriego*. Metoda ta obecnie przechodzi już do historii.

Metoda wolumetryczna. Wolumetryczne pułapki pyłkowe, oparte na prototypie Hirsta z 1952 roku, do dziś nie uległy przedawnieniu. Są obecnie najczęściej stosowane i nadal zalecane przez konsens towarzystwa aerobiologicznego [27]. Umożliwiają pomiar liczby ziaren w m³ powietrza. Mimo, że badania te są prowadzone od około siedemdziesięciu lat, wciąż uważane są za najbardziej wiarygodne i określane mianem złotego standardu w aerobiologii. Zapewniają dobrą jakość i powtarzalność wyników. Badania prowadzone są w systemie ciągłym, sezonowym lub całorocznym.

Urządzenia typu Hirst są zazwyczaj umieszczane na dachach budynków, na wysokości około 15 m. Działają one z charakterystycznym ruchomym wiatrowskazem, który zawsze ustawia się prostopadle do kierunku wiatru, co

umożliwia sprawne zasysanie pyłku transportowanego prądem powietrza atmosferycznego. Schemat głównych etapów badań przedstawiony jest na ryc. 1.

Taśma mocowana na bębnie, pokryta silikonowym żelem, zazwyczaj ekspozycja jest przez siedem dni w tygodniu. Obroty bębna, kontrolowane przez zegar szwajcarski, umożliwiają równomierne jego obracanie, z prędkością 2 mm/h. Wlot aparatu kieruje strumień powietrza na lepką powierzchnię taśmy, co umożliwia przywieranie do niej wszelkich drobin, w tym ziaren pyłku i zarodników. Po upływie siedmiu dni taśma jest cięta na odcinki odpowiadające 24 h odcinkom dobowym, a preparaty są barwione i poddawane analizie mikroskopowej [28], zazwyczaj prowadzonej przy powiększeniu co najmniej $\times 400$, tak aby można było zidentyfikować cechy ziaren badanych taksonów. Stężenia ziaren pyłku wyrażane są jako liczba ziaren /m³ powietrza. Są one obliczane z uwzględnieniem szybkości zasysania powietrza (przy wartości referencyjnej 10 l/min). Na podstawie uzyskanych wyników, z uwzględnieniem prognoz meteorologicznych, obserwacji fenologicznych oraz skali objawów, sporządzane są codzienne komunikaty i prognozy krótko- i średnio-terminowe. Natomiast do oceny początku i końca sezonu pylenia danego taksonu zazwyczaj stosuje się metodę 98 lub 99% (czasem 95%). Czyli początek przypada w dniu, gdy kumulatywna suma ziaren pyłku osiąga 1- 2% (lub 5%) sezonowej sumy rocznej, a koniec – w dniu, w którym zarejestrowano 98 lub 99% (95%) ziaren określonego taksonu.

Pomimo znacznego postępu związanego z konstruowaniem różnorodnych próbników automatycznych, wciąż podkreślane są zalety korzystania z urządzeń Hirst'a, a przede wszystkim personalne odczyty, dokonywane metodą mikroskopową przez wyspecjalizowanych botaników i palinologów. Wysoka wydajność i dokładność oznaczeń, (szczególnie w przypadku małych ziaren, ziaren uszkodzonych, czy nałożonych na siebie) jest ciągle niedościgną

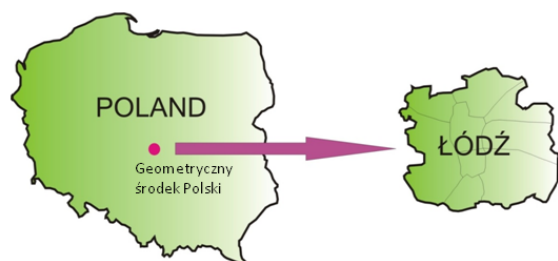
przez nowoczesne automaty. Dzięki dyskryminacji czasowej możliwa jest też analiza rytmów dobowych pylenia i stężeń pyłku, a wykonywanie i przechowywanie stałych preparatów zapewnia możliwość ponownej ich analizy czy powtórnej weryfikacji.

Poza tym niesie ona za sobą stosunkowo wysokie koszty, duży nakład pracy i czasu przy obsłudze urządzeń montowanych na wysokości ok. 15 m oraz konieczność wykonywania stałych preparatów. Szczególnie obciążająca jest analiza mikroskopowa, prowadzona na zasadzie „szkiełka i oka”. Od badaczy wymaga się dużej wiedzy, doświadczenia, staranności, cierpliwości, gdyż identyfikacja ziaren jest żmudna, a często nastęrcza wielu trudności. Np. wymaga porównywania badanego materiału z obrazami z atlasów i kluczy palinologicznych, czy mikroskopowych preparatów referencyjnych. Dodatkowo, przy analizie trendów wieloletnich, zalecane jest aby badania prowadzone były przez tę samą osobę. Na stronie internetowej Kliniki Immunologii i Alergii, przedstawione są kalendarze stężeń pyłku drzew, roślin zielnych i grzybów mikroskopowych, opracowanych dla centrum Łodzi, na podstawie wieloletnich danych. Zazwyczaj jako standard, w różnych ośrodkach, przyjmuje się ocenę stężeń pyłku dwudziestu, do czterdziestu alergogennych taksonów pyłku i często tylko dwóch taksonów grzybów mikroskopowych: *Alternaria* i *Cladosporium*. Wg. Stillman'a i wsp. tą metodą powinna być prowadzona ocena co najmniej 40 lokalnie rejestrowanych taksonów pyłku [29].

W naszym ośrodku, w latach 2003-05, prowadzono oznaczenia wszystkich taksonów pyłku obecnych w preparatach, zarówno w preparatach uzyskanych z Łodzi jak i Mierzyc (wsi w województwie łódzkim) [30]. Badania te wskazały na niezwykle bogactwo składu powietrza, którym oddychamy. Wykryto pyłek około dziewięćdziesięciu różnych taksonów. Oprócz tego w preparatach były obecne różnorodne zarodniki grzybów i inne formy życia.

Monitor pyłkowy w Łodzi 2003-2020

Urządzenie typu Hirst'a znajduje się
w centrum Łodzi, w dzielnicy Śrómieście
(51 ° 46'17,5 "N, 19 ° 28'29" E)
15 m nad poziomem gruntu.



Oznaczane jest
■ 20 taksonów pyłku roślin
■ zarodniki
Cladosporium, Alternaria



Chorzy, z alergią pyłkową mogą
Śledzić aktualne komunikaty



komunikaty pyłkowe:

- <http://immunologia.umed.pl/p/monitor-pylkowy>
- <http://stowarzyszenie-alergia.pl/monitor-pylkowy/>

Zalety i wady metody wolumetrycznej. Mikroskopowa analiza preparatów, prowadzona przez aerobiologów, pozwala stwierdzić rzeczywisty skład aeroplanktonu, obecność pyłku zgodnego z fenologią danej strefy klimatycznej, ale i udział nietypowych ziaren pyłku (z dalekiego transportu, uszkodzonych, złamanych po burzy np. zarodników *Alternaria*), wszelkich mikroorganizmów i zanieczyszczeń, które umykają „oczom” automatycznych analizatorów. Natomiast poważną wadą tej metody jest brak informacji o stężeniach ziaren w czasie rzeczywistym.

Analizy składu chemicznego i biochemicznego pyłku.

Badania Kendel i wsp. [31], prowadzone metodami spektroskopii FT-Ramana i FTIR, które dotyczyły około 300 taksonów roślin nasiennych z 42 rodzin roślin, wykazały podobieństwa składu chemicznego, ale tylko w obrębie taksonów.

Główne różnice odnotowano między pyłkiem roślin wiatropylanych i tych, które są zapylane przez owady. Np. stwierdzono, że pyłek roślin wiatropylanych cechuje się wysoką zawartością węglowodanów, a niską karotenoidów i białek, w przeciwieństwie do taksonów entomofilnych. Z badań tych można wnioskować, że pyłek wdychany z powietrza ma inny potencjał uczulający niż zawarty w produktach pszczelarskich, a droga ekspozycji i czynniki kostymulujące mogą modulować relacje immunologiczne. Raportowano też zmienność składu chemicznego pyłku w czasie. Np. stwierdzono, że w ziarnach pyłku, tak jak w powietrzu, z roku na rok zmieniają się stężenia pierwiastków zanieczyszczających miasto, takich jak nikiel, siarka, aluminium, ołów i miedź [32].

Badania analityczne przyniosły też bardzo niepokojące wyniki. Stwierdzono, że pyłek i nektar jest powodem masowego uśmiercania owadów zapyłających. Powodem jest obecność i synergia różnych kombinacji pestycydów stwierdzanych w pyłku (z około tysiąca tego typu toksyn dostępnych w handlu). Tego typu „koktajle pestycydowe” zwykle nie są wykrywalne w rutynowych pomiarach toksykologicznych, gdyż rutynowo badane są stężenia pojedynczych substancji chemicznych, tak aby nie zwiększać kosztów produktów pszczelarskich [33].

Stwierdzono też, że pyłek i zarodniki grzybów absorbują pierwiastki radioaktywne. Po awarii elektrowni w Czarnobylu (26.04.1986 r.) radioaktywna chmura rozprzestrzeniła się z Ukrainy po całej Europie. Badania pyłku i miodu przeprowadzone w Monachium, w Niemczech, wykazały wysokie zanieczyszczenia prób przez badane pierwiastki radioaktywne (^{137}Cs , ^{134}Cs , ^{131}I , ^{103}Ru) [34].

W badaniach bioarozolu, prowadzonych w latach 2012-16, w regionie elektrowni jądrowej Fukushima (która uległa awarii w marcu 2011 r.), odnotowano wysokie stężenia radioaktywnego cezu (^{137}Cs) w zarodnikach grzybów mikroskopowych i pyłku cedru, który utrzymywał się przez lata, i był włączany do cząsteczek tych komórek jako analog potasu [35].

Pyłek obfituje też substancje biologicznie czynne [36]. W ziarnach pyłku różnych gatunków roślin znaleziono ponad 200 różnorodnych związków organicznych. W grupie podstawowych substancji chemicznych znajdują się białka (około 30%), aminokwasy, węglowodany, lipidy i kwasy tłuszczowe, związki fenolowe, enzymy i koenzymy, metabolity a także witaminy i minerały.

Metody badań alergenów i ich klasyfikacji

Do celów pomiaru alergenów w powietrzu opracowano impaktory kaskadowe. Strumień powietrza jest zasysany do wnętrza próbnika od góry i przepływa przez kolejne filtry. Umożliwia to segregację alergenów w zależności od średnicy cząstek np. filtr PM10 służy do gromadzenia cząstek o średnicy $> 10 \mu\text{m}$. Odpowiednio segregowane są cząstki PM (2,5–10; 2,5; 0,1–2,5; $<0,1$) i w zależności od średnicy osadzane są na kolejnych filtrach. W celu oceny stężeń alergenów, ekstrakty filtrów poddawane są badaniom immunoenzymatycznym (*Elisa lub Maria*).

Badania tego typu, prowadzone przez Grewlinga i wsp. [37], w Poznaniu, zmieniły nasze poglądy związane z ryzykiem ekspozycji na alergeny. Do niedawna uważano, że dla osoby z alergią odbycie spaceru po deszczu jest bezpieczne i zalecane. Natomiast w badaniach pyłku i alergenów bylicy stwierdzono, że deszcz wypłukuje większość ziaren, ale najwyższe stężenia alergenów stwierdzano w powietrzu najbardziej wilgotnych dni sezonu, natomiast najniższe w najbardziej suchych.

Metody molekularne stosowane do wykrywania alergenów i uczuleń wymagają ścisłej współpracy specjalistów z wielu dziedzin: alergologów, aerobiologów, biologów molekularnych, bioinformatyków itd. Stwierdzono, że źródło alergenów jakim jest ziarno pyłku, zawiera bardzo wiele białek. Ale tylko około 2% jest zdolnych do reagowania z przeciwciałami IgE. Dane o rosnącej liczbie alergenów, gromadzone w bazie danych *Allergome* oraz w bazie białek *PFam*, zostały połączone w zbiory rodzin alergenów *AllFam*. [38, 39] Ułatwia to nawigację w wielkiej „dżungli” alergenów i pomaga wyjaśnić czynniki odpowiedzialne za alergię. Baza danych *AllFam* zawiera ogółem 1042 alergeny włączone do 151 rodzin. W tym 959 alergenów przypisano do konkretnej rodziny, pozostałe wymagają dalszych badań. Poznane dotąd alergeny roślinne włączono do 67 rodzin. Czternaście najliczniejszych rodzin alergenów pokazano w tabeli II.

Badania alergenów pyłku w kontekście mikrobiomu. Badania mikrobiologiczne wykazały, że profile mikrobiomu pyłkowego są różne dla pyłku brzoź zebranych w środowiskach miejskich i wiejskich, głównie zależnie od lokalnych stężeń NO_2 i ogólnych wskaźników urbanizacji. Stwierdzono też, że wahaniom zanieczyszczeń powietrza towarzyszą zmiany składu bakteryjnego i poziomu ekspresji alergogennych białek takich jak Bet v 1 (białka stresu PR10), oraz fitoprotein PALM o właściwościach immunomodulujących i mogących stymulować silne reakcje, nawet reakcję anafilaktyczną na alergen białkowy [40, 41].

Badania dalekiego transportu pyłku i zarodników w kontekście wirusologii, epidemiologii, alergologii.

Obserwacje braku spójności wyników z lokalnego monitoringu pyłkowego z danymi fenologicznymi, a także wynikami testów skórnych, zwróciły uwagę na konieczność prowadzenia badań dalekiego transportu pyłku i poszukiwania reakcji krzyżowych.

Np. w badaniach Ga2len [42], częstość dodatnich wyników testów skórnych wobec ekstraktów ambrozji wśród pacjentów z alergią w Łodzi wyniosła 10.8% (przy średniej w Europie: 14%), natomiast obecność pyłku ambrozji w powietrzu naszego miasta jest niska i pochodzi głównie z dalekiego transportu [43].

Tabela II. Lista rodzin alergenów roślinnych według bazy danych rodzin alergenów ALLFam (dane z czerwca 2020) www.meduniwien.ac.at/allfam/browse.php.

| Nazwa rodziny | Liczba alergenów/stabilność | Charakterystyka, przykładowe alergeny |
|---------------|--|--|
| 1. | Nadrodzina prolamin (91 alergenów) Zachowują stabilność pod wpływem temperatury i trawienia w przewodzie pokarmowym. | Nadrodzina zawiera rodziny białek bogatych w siarkę o niskiej masie cząst. Prolaminy zbóż. Np. białka zapasowe albuminy 2S; nsLTP i indoliny - białka obronne przed patogenami; nsLTP-2, inhibitory α -amylazy/proteazy, białko sojowe; globuliny pszenicy (gliadyny i gluteniny). |
| 2. | Profiliny (50 alergenów) | Regulują dynamikę polimeryzacji aktyny podczas ruchu komórek, cytokinezy i sygnalizacji, reaktywne krzyżowo, np. białka selera (Api g 4), pyłku brzozy (Bet v 2), pyłku bylicy (Art v 4), kukurydzy (Zea m 12), |
| 3. | Kupiny (37 alergenów) Wykazują różnice w przetwarzaniu proteolitycznym; Fragmenty białek alergenów np. Ara h 1 stabilne na temperaturę. | Źródła pokarmowe białek roślinnych, tworzą formy β -baryłek, epitopy obecne są w 4-rzędowej strukturze białka. <ul style="list-style-type: none"> ▪ wicyliny 7 / 8S np. białka orzeszków ziemnych Ara h 1, Jug r 2, Ses i 3 11S; ▪ leguminy np. białka orzeszków ziemnych (Ara h 3) soi (Gly m 6). |
| 4. | Białka podobne do Bet v 1 (29 alergenów) | Rodzina białek stresu indukowana przez atak patogenów stres abiotyczny lub regulowana rozwojowo. Np. PR-10 w tkankach rozrodczych: pyłek, nasiona i owoce. Funkcje enzymatyczne rybonukleazy, enzymów oksydacyjnych dla biosyntezy metabolitów. PR-10 wiążącą ligandy, np. flawonoidy, sterydy roślinne, fitohormony. |
| 5. | Ekspansyny i podobne (24 alergeny) | glikoproteiny, istotne dla wzrostu i innych procesów rozwojowych. β -expansyny pyłku traw należą do grupy 1. |
| 6. | Białka wiążące wapń z motywem EF hand 19 | Białka sygnalizacyjne i wiążące wapń Polkalcyny – panalergeny pyłku, reakcje krzyżowe. |
| 7. | Taumatyny i podobne TLP (17 alergenów). TLP są stabilne przy niskim pH i odporne na obróbkę cieplną i degradację proteolityczną. Wiążą IgE po podgrzaniu i trawieniu. | Rodzina białek stresu PR-5 związanych z patogenezą, w owocach podczas dojrzewania. TLP stwierdzone też u grzybów, pasożytów (<i>C.elegans</i>), roztoczy, owadów. |
| 8. | Oleozyny (8 alergenów) | Są białkowymi składnikami stabilizującymi cząsteczki lipidowe roślin. Alergogenne oleozyny zidentyfikowano w roślinach strączkowych, orzechach i nasionach, np. w orzeszkach ziemnych (Ara h 10-15), orzechach laskowych (Cor a 12-13), w ziarnach sezamu (Ses i 4-5). |
| 9. | Ole e 1 i podobne | Glikoproteiny, funkcja nieznana. Główny alergen pyłku drzewa oliwnego, wiąże IgE z 90% surowic osób z alergią. Alergeny homologiczne pyłku drzew <i>Oleaceae</i> (np. jesion), traw (grupa 11), chwastów (np. babki). |
| 10. | Proteazy cysteinowe, podobne do papainy (6 alergenów) | Gly m B k30K (P34), główny alergen soi, wykazuje podobieństwo sekwencji do proteaz kiwi (Act d 1), ananasa (Ana c 2), ambrozji (Amb a 11), a także roztoczy (np. Der p 1, Der f 1, Der m 1). |

- | | |
|--|---|
| 11. Defensyny roślinne (11 alergenów) | Tworzą małe (15-20 reszt aminokwasowych), bogatych w cysteinę białek kationowych wykazują aktywność przeciw bakteriom, grzybom i wirusom osłonkowym. Są stabilne dzięki wielu mostkom dwusiarczkowym, niektóre są analogiczne do toksyn skorpionów i defensyn owadów, toksyczne dla komórek zwierzęcych i hamują syntezę białek, Inhibitory alfa-amylaz owadów. Np. alergen pyłku bylicy (Art v 1), pyłku ambrozji (Amb a 4), orzeszków ziemnych (Ara h 12, Ara h 13) itd. |
| 12. Polygalacturonazy (10 alergenów) | Hydrolazy glikozydowe (np. pektynazy) to enzymy, które działają w maceracji, gniciu tkanek roślinnych. Stanowią główne alergeny pyłku drzew Cupressaceae (gr. 2), pyłku traw (gr. 13), pyłku platana (Pla a 2), które biorą udział w wiązaniu IgE. |
| 13. Reduktazy izoflawonów | Oksydoreduktazy zależne od NADP, biorą udział we wtórnym metabolizmie roślin. Należą tu alergeny z pyłku brzozy Bet v 6, białka homologiczne np. pyłku cedru (Cry j IFR), białka pokarmów np. marchwi (Dau c 5) itd. |
| 14. Chitynazy i heweiny I / II (9 alergenów) | <p>Wiele białek roślinnych, np. lektyny pomidora i ziemniaka, heweiny - białka indukowane ranami, atakiem owadów, domena podobna do hewy jest zaangażowana w rozpoznawanie lub wiązanie podjednostek chityny owadów. Np. proheveina alergenu lateksowego (Hev b 6.01) Po wywołanej przez ranę koagulacji lateksu białko rozszczepia się na jego domeny składowe. Domena N-końcowa, o nazwie hevein, wiąże IgE homologi chitynaz klasy 1 z owoców awokado, banana i kasztana są reaktywne krzyżowo i odpowiedzialne za reakcje zwane zespołem lateksowo-owocowym</p> <p>Alergen rzepaku (Bra r 2) ma skład podobny do proheveiny. Cry j 4, chitynaza klasy IV z japońskiego cedru wiąże IgE i reaguje krzyżowo z lateksem.</p> |
| 15. Oraz pozostałe 56 rodziny + 83 alergeny nigdzie niezaklasyfikowane | |

Badania Mohanty i wsp. [44] prowadzone przy pomocy modeli matematycznych, uwzględniających wyniki stężeń pyłku, dane satelitarne, czynniki meteorologiczne i badania molekularne (z wykorzystaniem techniki PCR), wykazały, że obserwowany przez badaczy pyłek cedru wykryty w Kanadzie miał swoje źródło w Teksasie lub Oklahomie, a ta daleka podróż trwała jedynie trzy dni. Wyniki tych badań, specyficznych dla gatunku i uwzględniających trajektorie lotu, dostarczają mocnych dowodów na transport pyłku na bardzo duże odległości. Badania Bohn i wsp. [45] wykazały też, że przemieszczanie się pyłku roślin GMO pośredniczy w nie planowanym i niechcianym przepływie genów, co prowadzi do intensywnej hybrydyzacji krzyżowej wielu naturalnych gatunków roślin uprawnych i zmian ich profilu białkowego, nawet alergogennego, w ten sposób gospodarka materiałem siewnym staje się utrudniona.

Pyłek roślin jest znakomicie przystosowany nie tylko do podróżowania ale i transportowania wielu cząstek i mikroorganizmów. Małe rozmiary ziaren pyłku (19–22 μm) i niska waga (niekiedy obecność worków powietrznych), sprzyja przemieszczaniu się na dalekie odległości (zwykle wraz z pasażerami). Wraz a aeroplanktonem są transportowane różnorodne populacje drobnoustrojów, a możliwości tego „eksportu” są przeogromne.

W obliczu obecnej pandemii wirusa SARS-CoV-2, zwrócono też uwagę na możliwość przenoszenia wirusów przez ziarna pyłku. Badania prowadzone na owadach błonkoskrzydłych pokazały, że za pośrednictwem pyłku wirusy (typu RNA) lokalnie łatwo rozprzestrzeniają się wśród różnych rodzajów owadów [46]. Badania te zwróciły uwagę na temat roli pyłku i zarodników grzybów w epidemiologii chorób wirusowych.

Wykazano, że zarodniki *Alternaria* w ciągu 10 dni przebieśli drogą powietrzną nad Pacyfikiem. To zaskakujące, że mogą zmieniać miejsce pobytu nie tylko o zasięgu międzypaństwowym, ale i międzykontynentalnym. Tego typu transfer aeroplanktonu zaobserwowano na trasie: Azja Wschodnia (Chiny/Japonia) – kraje Ameryki Północnej. Związana z tym ewentualna transmisja patogenów wymaga dalszych badań[47].

Co ciekawe, w niedawnych badaniach Hoogeveen'a [48] stwierdzono odwrotną zależność między stężeniami pyłku w powietrzu, a cyklami czasu trwania epidemii grypy (2016–2019). W pracy podano, że obecność stężeń pyłku, przy wartościach progowych od 70 ziaren/ m^3 powietrza miała pozytywny, hamujący wpływ na częstość zachorowań na gripę. Te obserwacje, według autora, można wyjaśnić tym, że układ odpornościowy aktywowany przez

sezonowe alergeny pyłku wykazuje większą mobilizację, zapewnia lepszą odporność przeciwwirusową, co też utrudnia wirusom zakażenie nowych organizmów. Oczywiście te obserwacje będą wymagały weryfikacji i dalszych badań. Ale można sądzić, że badania aerobiologiczne mogą posłużyć do opracowania nowych modeli predykcyjnych, związanych z problemami epidemiologii i szacowania ryzyka rozprzestrzeniania się chorób.

Obserwacje aeroplanktonu przynoszą też dobre wieści. Otóż kuliste, bardzo chropowate zewnętrzne struktury egzyny ziaren pyłku, opłaszczone przez ujemne ładunki elektrostatyczne, łatwo adsorbują struktury o ładunkach dodatnich, co stanowi swoistą „zaporę pyłkową” która oczyszcza atmosferę ze wszelkich zanieczyszczeń, w tym wirusów, które są dipolami [49]. Takiemu oczyszczaniu atmosfery sprzyjają też współistniejące czynniki pogodowe, np. deszcz, UV, które z kolei oczyszczają powietrze z pyłku. Sam pyłek może działać też jak jądra kondensacji cząsteczek wody, sprzyjąc powstawaniu chmur, następnie opadów i burz, co sprzyja wyłukiwaniu wszelkich cząstek powietrza, w tym zanieczyszczeń mineralnych i mikrobiologicznych.

Nowe kierunki badań pyłku wykorzystujące zaawansowane techniki molekularne

Badania pokazują, że w zależności od czynników środowiskowych, potencjał alergogenności białek pyłku danego taksonu roślin może ulec zmianie np. z powodu zmian wzorów ekspresji genów, mutacji, modyfikacji epigenetycznych i potranslacyjnych (np. powodowanych ekspozycją na zanieczyszczenia, stresory biotyczne i abiotyczne, czy zmienność sezonową).

Alergenomika uważana jest jako potężne narzędzie do kompleksowej analizy pyłku jak i alergenów (ryc 2).

Alergomika, określana też jako immuno-proteomika typu IgE, przyczyniła się do wzrostu wiedzy z zakresu

identyfikacji alergenów i ich homologii na poziomach sekwencji struktur, cech biochemicznych i właściwości immunologicznych. Ważną metodą wykrywania alergenów, w „morzu” wielu białek, jest metoda immunochemiczna stosowana do wykrywania reakcji pomiędzy IgE z surowic chorych, a konkretnymi białkami o potencjale alergogenym [50].

Proteomika Analizy proteomiczne służą do identyfikacji wszystkich białek, z których część może mieć status hipotetycznie alergogeny. Badania tego typu prowadzone są poprzez rozdział elektroforetyczny całego ekstraktu na żelu poliakrylamidowym metodą jedno lub dwuwymiarową. Rozdzielone białka są konfrontowane z surowicami osób z alergią oddechową, u których objawy występują podczas obecności pyłku badanego taksonu. Umożliwia to wgląd w rolę poszczególnych białek w procesach chorobowych. Służy też do badań reakcji biochemicznych jakie zachodzą w pyłku roślin po ekspozycji na bodźce środowiskowe. Proteomika bardzo przyspieszyła identyfikację wielu alergenów w roślinach, w porównaniu do konwencjonalnych metod obejmujących procesy izolacji białek. Oprócz konwencjonalnych metod alergenomiki (wykrywania alergenów), opracowano nowe techniki, które uwzględniają ocenę ich struktur, cech i interakcji białek. Umożliwia też wielowymiarową ocenę właściwości alergenów, łącznie z wzorami ekspresji genów, interakcji, czy modyfikacji potranslacyjnych.

Np. stosunkowo niedawno zauważono nowy rodzaj ziaren pyłku w preparatach mikroskopowych i zweryfikowano jeden z jego alergenów. Podczas badań proteomicznych pyłku tego taksonu wykryto aż 13 białek (i wiele izoform) z kilku rodzin białek alergennych (enolaz, liaz, kalretikulin), wiążących swoiste przeciwciała IgE [51]. Okazało się, że jego źródłem były kwiatostany chińskiego drzewa *Ailanthus altissima* (tzw. drzewa nieba lub bożodrzewa). Roślina ta na całym świecie, także w Polsce stosowana jest do obsadzania dróg i parków miejskich. Jest rośliną pionierską.

WIELOWYMIAROWE ANALIZY PYŁKU ROŚLIN I ALERGENÓW



Rośnie nawet na zdegradowanych i zasolonych obszarach. Jednak ostatnio stwierdzono, że roślina syntetyzuje silne związki chemiczne, w tym inhibitory wzrostu, które hamują rozwój innych roślin na danym terenie, a nawet pasożytów człowieka [52]. Do tej pory zbadano alergogenność białka Ali a [53]. Odkryto też plejadę kilkunastu innych, które są w trakcie badań. W związku z tym oficjalnie odwołano wcześniejsze zalecenie (2012) dotyczące możliwości sadzenia tego drzewa w miejscach publicznych. Na mocy dyrektywy UE, z 2019 r., dodano tę roślinę do „listy inwazyjnych gatunków obcych w UE”, i oficjalnie zabroniono jej sadzenia [54]. Mimo to sadzonki są dostępne w sprzedaży, a uprawa tych roślin staje się coraz bardziej popularna także w Polsce (informacja ustna botanika UŁ).

Ostatnio, po wnikliwej weryfikacji objawów klinicznych, pyłek tej rośliny został uznany za nową (nie znaną wcześniej) przyczynę alergii w wielu krajach, np. w USA, Hiszpanii, Włoszech, Niemczech [55, 56].

Transkryptomika Badania pokazują, że badania proteomiczne białek alergogennych powinny być uzupełnione o wyniki transkryptomiki, czyli analizy genów, które uległy ekspresji.

Metabolomika Niedawne badania pyłku z zastosowaniem chromatografii masowej wykazały jeszcze wyższe poziomy złożoności molekularnej pyłku, mianowicie jego zdolność do generowania ponad 100 metabolitów, głównie cukrów, kwasów organicznych, alkoholi, a także blisko 50 znanych i 550 nieznanymi miRNA, zaangażowanych w procesy metabolizmu, niezbędnych do sygnalizacji hormonalnej i aktywacji odpowiedzi obronnej [57].

Metody metabarkowania stosowane do molekularnej identyfikacji taksonów pyłku roślin

Metabarkowanie środowiskowego DNA jest metodą molekularną polegającą na identyfikacji pyłku lub innych organizmów na podstawie ekspertyz DNA. W celu izolacji DNA z ziaren pyłku ustanowiono specjalistyczne protokoły ekstrakcji w zależności od tego czy badane ziarna są w „stanie wolnym”, czy w roztworze, czy są unieruchomione na taśmie urządzenia wolumetrycznego [58]. Programy komputerowe i narzędzia bioinformatyczne pomagają wyodrębnić sekwencje DNA specyficzne dla taksonów i ustanowić odpowiednie pary starterów i sondy, potrzebne do amplifikacji przy użyciu metody PCR, co umożliwia dokładną identyfikację ziaren. Wciąż ulepszone technologie sekwencjonowania oraz narzędzia bioinformatyczne sprawiają, że metabarkowanie jest coraz częściej wykorzystywane w różnych układach badawczych, głównie w archeologii, palinologii, klimatologii, czy kryminalistyce. Specjaliści ostrzegają też, że świeży pyłek może uwalniać duże ilości inhibitorów polimerazy DNA, co często zakłóca wyniki PCR [59].

Kliniczne metody badań ekspozycji na alergeny

Postępy w medycynie precyzyjnej pozwoliły na identyfikację uczuleń na poszczególne alergeny. Wiele rodzajów alergenów środowiskowych, szczególnie tych o swoistości enzymatycznej, wybiórczo wywołuje procesy immunizacji, stymuluje też rozwój zapalenia alergicznego. Ich rola w szczegółowej diagnostyce, precyzyjnych ocenach mechanizmów patofizjologicznych, ustalaniu kryteriów dla fenotypów/endotypów alergii wymaga ściśle kontrolowanych warunków ekspozycji na ściśle określone dawki alergenów.

Do tego celu stosowane są specjalne komory ekspozycyjne [60]. Umożliwiają one ustalanie zaleceń profilaktyki, przez zdefiniowanie osobniczych progów wrażliwości, a także monitorowanie skuteczności leczenia, w tym immunoterapii, czy testowania nowych leków. Takie podejście stanowi „modelowe” prowadzenie prac badawczych i diagnostycznych, w warunkach równomiernego i powtarzalnego narażenia, poza okresami naturalnego pylenia roślin. Ważny jest też jednoczesny brak innych czynników towarzyszących naturalnej ekspozycji, np. synergii objawów z powodu ekspozycji na różnorodne alergeny obecne jednocześnie, reakcji krzyżowych, zanieczyszczeń powietrza, warunków pogodowych, licznych kontekstów osobistych osób badanych lub zwierząt laboratoryjnych (np. stylu życia, wieku, obecności chorób współistniejących).

Metody oceny skuteczności obniżania ekspozycji na pyłek w pomieszczeniach mieszkalnych

Do niedawna zalecano, aby pacjenci z alergią pyłkową pozostawali w pomieszczeniach, gdy stężenia pyłku na zewnątrz są wysokie. Jednak okazało się, że cyrkulacje powietrza atmosferycznego sprzyjają wdmuchiowaniu pyłku do pomieszczeń mieszkalnych, poprzez okna, drzwi, ciągi wentylacyjne. Tego typu transferowi sprzyja też silne przyleganie ziaren do powierzchni wszelkich materiałów tekstylnych np. odzieży i obuwia. Wyniki badań wskazują, jak ważna jest kontrola stężeń pyłku i ich alergenów w środowisku domowym. Może ona istotnie pomóc w leczeniu astmy, alergicznego nieżytu nosa, atopowego zapalenia skóry. Np. niedawne badania Chen i wsp., [61] (z zastosowaniem protokołu z podwójnie ślepą próbą, kontrolowaną placebo) pokazały, że oczyszczanie powietrza środowiska domowego jest istotną opcją ograniczenia ekspozycji na alergeny i przyczynia się do realnej poprawy wyników klinicznych. Badania wykazały istotne zmniejszenie objawów nieżytu nosa i to u większości chorych, bez przyjmowania żadnych leków (przeciwhistaminowych, kortykosteroidów, leków zmniejszających przekrwienie i antagonistów receptora leukotrienowego). Jedyną interwencją było całonocowe filtrowanie powietrza (dwukierunkowymi oczyszczaczami *Atmosphere*® HEPA), stosowane przez cztery tygodnie badań, gdzie chorzy z alergią na pyłek byli pozostawiali w swoich sypialniach podczas wypoczynku nocnego (> 8 godzin), pomimo, że nadal byli narażeni na alergeny w ciągu dnia. Z kolei badania Choi i wsp. [62] wykazały skuteczność stosowania domowej suszarki mechanicznej do ubrań (*Samsung Electronics*) zastosowanej do oczyszczania ich zarówno z pyłku jak i alergenów (brzozy, cedru japońskiego, ambrozji i tymotki). Stwierdzono, że suszenie mechaniczne, nawet bez konieczności prania, jest bardzo skutecznie, bo w około 95%, oczyszczało zarówno suche jak i mokre tkaniny z naniesionego na nie pyłku i alergenów.

Automatyczne analizatory do identyfikacji ziaren pyłku

Liderami w dziedzinie automatycznego monitorowania pyłku są obecnie takie kraje jak Japonia, Szwajcaria, Austria i Niemcy. Np. w Bawarii funkcjonuje aż osiem ośrodków pomiarowych z użyciem automatów, które są konfigurowane poprzez badania wolumetryczne, aparatami Hirsta. Te automatyczne analizatory zazwyczaj sprzężone są z siecią, która służy do transmisji informacji w czasie zbliżonym

do rzeczywistego. Bawarski system zaprogramowano do analizy ośmiu taksonów pyłku: leszczyny, olszy, brzozy, jesionu, trawy, żyta, bylicy i ambrozji. Zapewnia on też uzyskanie komunikatów pyłkowych w trybie retrospektywnym. Urządzenia identyfikują około 90% ziaren pyłku w porównaniu do analizy mikroskopowej, dokonywanej przez człowieka. Jest on finansowany przez sektor państwowy. Dane z tych automatycznych monitorów są dostępne w sieci o nazwie ePIN. Natomiast „epin-scientific.eu” działa jako sieć naukowa. Dzięki specjalnej aplikacji pomiary stężeń pyłku mogą być na bieżąco odnoszone do spektrum objawów alergii u odbiorców komunikatów, którzy zachęceni są do przekazywania informacji zwrotnych [63].

Do nowych urządzeń kandydujących do osiągnięcia zakładanych poziomów operacyjnych, można zaliczyć urządzenia oparte na modelach, które porównują badane próbki pyłku z uwzględnieniem informacji o wielowymiarowych cechach ziaren, uzyskanych za pomocą różnych metod:

- mikroskopii fluorescencyjnej,
- cytometrii przepływowej,
- mikroskopii fotoakustycznej,
- spektroskopii fluorescencyjnej,
- spektrometrii laserowej,
- oceny widma pyłku za pomocą spektroskopii w podczerwieni,
- analiz dyskryminacyjnych, opartych o zasady sztucznej inteligencji i uczenia sieci neuronowych
- holografii cyfrowej.

Zaprogramowanie tego typu zautomatyzowanych systemów analizy pyłku okazało się bardzo trudnym przedsięwzięciem. Np. jeden z najnowszych modeli, zaprogramowanych do automatycznej analizy 46 taksonów o nazwie *Clasyfinder*, osiąga 70–97% prawidłowych wskaźników klasyfikacji ziaren w porównaniu do wyników tradycyjnej analizy mikroskopowej. Oparty jest na najnowszych osiągnięciach z zakresu sztucznej inteligencji i możliwościach uczenia sieci neuronowych. Wymaga on wysokiej jakości oprogramowania z bardzo obszerną biblioteką danych, która obejmuje wielką liczbę obrazów zarówno statycznych jak i dynamicznych dla każdego badanego taksonu (**średnio 40-1700**) [64]. Inny tego typu aparat oparty jest o system analizy obrazu *RetinaNet*. Też wykrywa on ziarna pyłku w oparciu o system sztucznych inteligencji, analizy obrazów i uczenie sieci neuronowej. Do szkolenia tego systemu wykorzystano obrazy ziaren pyłku w formatach 2D i 3D i ponad 250 filmów przedstawiających ziarna z wielu płaszczyzn. Oddzielny zestaw filmów służy do weryfikacji wyników i oceny wydajności wykrywania ziaren [65].

Kolejne, nowe automatyczne urządzenie tego typu: *Swisens Poleno*, opracowane w Szwajcarii, identyfikuje

holograficzne obrazy pyłku i na tej podstawie umożliwia rejestrowanie sześciu spośród ośmiu taksonów pyłku z dokładnością ponad 90% [66].

Kryteria oceny automatycznego urządzenia do monitorowania pyłku Obecnie wielu badaczy nie ukrywa obaw i zastrzeżeń wobec wyżej przedstawionych automatycznych analizatorów. Zazwyczaj nie osiągają one wymaganego minimalnego wskaźnika dokładności 95%, (a tylko 60% - 90%). Poza tym umożliwiają one analizę stosunkowo małej i jedynie z góry zaprogramowanej liczby taksonów. Bardzo wysokie ceny tych urządzeń i brak możliwości ich finansowania ze środków publicznych stanowi też poważną przeszkodę ich stosowania dla zdecydowanej większości ośrodków aerobiologicznych na świecie.

Podsumowanie Aerobiologia jest stosunkowo młodą, ale niezwykle interdyscyplinarną dziedziną nauki, która wielowymiarowo rozszerza zasięg prowadzonych badań i oddziaływać. Rozwój metod z zakresu biologii molekularnej, bioinformatyki, immunologii, alergologii i innych dziedzin otwiera dalsze możliwości poznawcze i praktyczne dla prowadzenia spersonalizowanej diagnostyki, immunoterapii, profilaktyki chorób.

Jak widać z zamieszczonego przeglądu aerobiologia może poszczycić się dużym bogactwem metod, plejadą nowych planów i pomysłów, jednak na razie są one realizowane w stosunkowo nielicznych laboratoriach. W zdecydowanej większości ośrodków wiąż korzysta się z bezcennych, ale żmudnych, czasochłonnych i kosztownych metod badań opartych na analizach preparatów mikroskopowych przez wyspecjalizowanych palinologów i aerobiologów. Z uwagi na rosnącą częstość alergii konieczne jest zwiększenie wysiłków, aby zagwarantować dalszy rozwój sieci monitorujących i automatyzacji badań, które powinny być finansowane ze środków publicznych. Brak łatwego dostępu do lokalnych wyników badań jakości powietrza atmosferycznego dla chorych, lekarzy i ogółu mieszkańców, można postrzegać wręcz jako bagatelizowanie zagrożeń związanych z ekspozycją środowiskową, tak istotną w działaniach profilaktycznych i realizacji planów leczenia. Wydaje się też zasadna konieczność zwiększenia repertuaru badanych taksonów o charakterze alergogennym (szczególnie zarodników grzybów mikroskopowych). A obecnie..., wciąż jeszcze marzeniem wielu naukowców, lekarzy, pacjentów i jest możliwość korzystania z niezawodnych automatów, które mogłyby podawać komplety informacji na temat jakości powietrza, zarówno z uwzględnieniem stężeń pyłku, jak i zarodników, poziomów zanieczyszczeń organicznych i nieorganicznych, obecności mikroorganizmów saprofitycznych i patogennych, które w każdej chwili naszego życia wchodzą w skomplikowane interakcje z układem odpornościowym.

Piśmiennictwo

1. Majkowska-Wojciechowska B, Pełka J, Korzon L, i wsp. Prevalence of Allergy, Patterns of Allergic Sensitization and Allergy Risk Factors in Rural and Urban Children. *Allergy*; 2007;62:1044-50.
2. Weinmayr G, Jaensch A, Ruelius AK, i wsp. Can environment or allergy explain international variation in prevalence of wheeze in childhood? ISAAC Phase Two Study Group. *Eur J Epidemiol*. 019;34:509-520.
3. w Niemczech: Bergmann KC, Heinrich J, Niemann H. *Allergo J Int*. Current status of allergy prevalence in Germany. 2016; 25: 6–10.
4. Dorner T, Lawrence K, Rieder A, i wsp. Epidemiology of allergies in Austria. Results of the first Austrian Allergy Report Epidemiologie von Allergien in Österreich. *Ergebnisse des ersten Österreichischen Allergieberichts*. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2007;157, 235–242.
5. Warner JO, Kaliner MA, Crisci CD, Del Giacco S, Frew AJ, Liu GH, i wsp.. *Allergy Practice Worldwide: A Report by the World Allergy Organization Specialty and Training Council*. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;139:166–74.

6. Castner J, Barnett R, Moskos LH, i wsp. Home environment allergen exposure scale in older adult cohort with asthma. *Canadian Journal of Public Health* 2020. doi.org/10.17269/s41997-020-00335-0.
7. Müller-Rompa SEK, Markevych I, A J Hose AJ i wsp. An Approach to the Asthma-Protective Farm Effect by Geocoding: Good Farms and Better Farms. *Pediatr Allergy Immunol*. 2018; 29: 275-282.
8. Krämer U, Schmitz R, Ring J, Behrendt H. What can reunification of East and West Germany tell us about the cause of the allergy epidemic?. *Clin Exp Allergy*. 2015;45:94-107.
9. Whitme S, Haines A, Beyrer C, I wsp. Safeguarding human health in the Anthropocene epoch: report of The Rockefeller Foundation-Lancet Commission on planetary health. *Lancet*. 2015; 386:1973-2028.
10. Thien F, Beggs PJ, Csutoros D, i wsp. The Melbourne epidemic thunderstorm asthma event 2016: an investigation of environmental triggers, effect on health services, and patient risk factors. *Lancet Planet Health*. 2018;2:e255-63.
11. Lake IR, Jones NR, Maureen Agnew M, i wsp. Climate Change and Future Pollen Allergy in Europe. *Environ Health Perspect*. 2017;125:385-391.
12. Akiko Yagami, Motohiro Ebisawa. New Findings, Pathophysiology, and Antigen Analysis in Pollen-Food Allergy Syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2019 Jun;19:218-223.
13. Berger M, Karl-Christian Bergmann KCh, Kmenta M. The medical and scientific responsibility of pollen information services. *Wien Klin Wochenschr*. 2017; 129:70-74.
14. Bédard A, Sofiev M, Arnavielhe S, i wsp. Interactions Between Air Pollution and Pollen Season for Rhinitis Using Mobile Technology: A MASK-POLLAR Study. *J of Allergy and Clin. Immunol: In Practice*, 2020-03-01, 8; 1063-1073.e4.
15. *Aerobiologia – kierunki badań i wyzwania XXI wieku*. Majkowska-Wojciechowska B, Wojciechowska A. *Alergia Astma Immunologia* 2008, 13: 142-146.
16. Kostić AŽ, Danijel D Milinčić DD, Barać MB i wsp. The Application of Pollen as a Functional Food and Feed Ingredient-The Present and Perspectives. *Biomolecules*.
17. Agashe SN. *Pollen and Spores: Applications with Special Emphasis on Aerobiology and Allergy*. 2019. CRC Press; 1 edition: B00SC8J6YS.
18. Milman G. Oren C. Durham - *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004.01.1229-1230.
19. www.bbc.com/news/uk-52150361?fbclid=IwAR0DwGMS-50sMo6JVzajqP5M-oe0ec59dG-zk03GFZw15k4bGYnhFidvle0k
20. Obtulowicz K, Szczepanek K, Szczeklik A. The value of pollen count for diagnosis and therapy of pollen allergy in Poland. *Grana*, 1990;29: 318-320.
21. <https://sites.google.com/site/aerobiologyinternational/>
22. Majkowska-Wojciechowska B, Balwierz Z, Kowalski ML. Wyniki pomiarów stężeń pyłku roślin w powietrzu atmosferycznym Łodzi. *Alergia Astma Immunologia* 2011, 16: 37-43.
23. Majkowska-Wojciechowska B, Balwierz Z, Kowalski ML. Charakterystyka stężeń pyłku w powietrzu atmosferycznym Łodzi w sezonie 2008. *Alergia Astma Immunologia* 2008, 13: 250-263.
24. Majkowska-Wojciechowska B, Balwierz Z, Kowalski ML. Changes in the concentration of pollen over an 11-year period in a Polish urban environment. *Acta Agrobot*. 2016;69:1682.
25. <http://www.eas-aerobiology.eu/>
26. Smith DJ. Microbes in the Upper Atmosphere and Unique Opportunities for Astrobiology Research *Astrobiology*.
27. Buters JT, Antunes C, Galveias A i wsp. Pollen and spore monitoring in the world. – NCBJ. *Clin Transl Allergy*. 2018;4:8:9.
28. Majkowska-Wojciechowska B, Balwierz Z, Kowalski ML Charakterystyka stężeń pyłku w powietrzu atmosferycznym Łodzi w sezonie 2008. *Alergia Astma Immunologia* 2008, 13: 250-263.
29. Stillman EC, Flenley JR. The needs and prospects for automation in palynology. *Quat Sci Rev*. 1996;15:1-5.
30. Majkowska-Wojciechowska B, Balwierz Z, Pelka J, i wsp. Porównanie dynamiki opadu pyłkowego w środowisku miejskim i wiejskim centralnej Polski. *Alergia Astma Immunologia* 2005,10:139-47.
31. Kendel A, Zimmermann B. Chemical Analysis of Pollen by FT-Raman and FTIR Spectroscopies. *Front Plant Sci*. 2020;31;11:352. *Alergia Astma Immunologia* 2016, 21: 5-15.
32. Mousavi F, Shahali Y, Pourpak Z, i wsp. Year-to-year variation of the elemental and allergenic contents of *Ailanthus altissima* pollen grains: an allergomic study. *Majd A, Ghahremaninejad F. Environ Monit Assess*. 2019;12;191:362.
33. Toselli G, Golastra F. Seek and you shall find: An assessment of the influence of the analytical methodologies on pesticide occurrences in honey bee-collected pollen with a systematic review. *Chemosphere*. 2020; 258:127358.
34. Bunzl K, Kracke W, Vorwohl G, i wsp. Transfer of Chernobyl-derived ¹³⁴Cs, ¹³⁷Cs, ¹³¹I and ¹⁰³Ru from flowers to honey and pollen. *Journal of Environmental Radioactivity*.1988; 6:261-269.
35. Igarashi Y, Kita K, Teruya, Maki T, i wsp. Fungal spore involvement in the resuspension of radiocaesium in summer. *Scientific Reports*. 2019;9:20452322.
36. Majkowska-Wojciechowska B. Pyłek roślin i alergeny sezonowe w Polsce. *Alergia Astma Immunologia* 2016; 21: 5-15.
37. Grewling Ł, i wsp. Total Environ. Atmospheric exposure to the major *Artemisia* pollen allergen (Art v 1): Seasonality, impact of weather, clinical implications. *Science of The Total Environment*. 2020, 136611.
38. www.meduniwien.ac.at/allergens/allfam/
39. <http://www.meduniwien.ac.at/allfam/browse.php>
40. Obersteiner A, Gilles S, Frank U, i wsp. Pollen-Associated Microbiome Correlates with Pollution Parameters and the Allergenicity of Pollen. *PLoS One*. 2016; 11(2): e0149545.
41. Gilles S., Mariani V., Bryce M., Mueller M. J., Ring J., Behrendt H., Jakob T., Traidl-Hoffmann C. Pollen allergens do not come alone: pollen associated lipid mediators (PALMS) shift the human immune systems towards a T(H)2-dominated response. *Allergy Asthma Clin. Immunol*. 2009. 5, 3.
42. Heinzerling LM, Burbach GJ, Bruno A, i wsp. GA2LEN skin test study I: GA2LEN harmonization of skin prick testing: novel sensitization patterns or inhalant allergens in Europe. *Allergy (Copenhagen)*. 2009; 64:1498-1506.
43. Smith M, C.A. Skjøth CA, Myszkowska D, i wsp. Long-range transport of *Ambrosia* pollen to Poland doi:10.1016/j.agrformet.2008.04.005
44. Mohanty RP, Buchheim AM, Anderson J, i wsp. Molecular analysis confirms the long-distance transport of *Juniperus ashei* pollen. *PLoS One*. 2017; 12: e0173465.
45. Bohn T, Aheto DW, Mwangala FS, i wsp. Pollen-mediated gene flow and seed exchange in small-scale Zambian maize farming, implications for biosafety assessment. *Sci Rep*. 2016; 6: 34483. doi: 10.1038/srep34483.
46. Singh R, Levitt AL, Rajotte EG, i wsp. RNA viruses in hymenopteran pollinators: evidence of inter-taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. *Plos one*, 2010. 2010doi.org/10.1371/journal.pone.0014357.
47. Smith DJ, Jaffe DA, Birmele MN, Free tropospheric transport of microorganisms from Asia to North America. *Microb. Ecol*.2012;64 : 973-985.
48. Hoogeveen MJ. Pollen likely seasonal factor in inhibiting flu-like epidemics. A Dutch study into the inverse relation between pollen counts, hay fever and flu-like incidence 2016-2019. *Science of The Total Environment*. 2020, 138543. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138543.
49. Ahmad MA, Mustafa F, Lizna M. i wsp. Virus detection and quantification using electrical parameters. *Sci Rep*. 2014; 4: 6831.
50. Nakamura R, Teshima R. Proteomics-based allergen analysis in plants. *Journal of Proteomics*. 2013 13:981-90.

51. Mousavi F, Shahali Y, Pourpak Z. Year-to-year Variation of the Elemental and Allergenic Contents of *Ailanthus Altissima* Pollen Grains: An Allergomic Study *Environ Monit Assess* 2019;12;191: 362.
52. Lehmann S, Herrmann F, Kleemann K, i wsp. Extract and the quassinoid ailanthone from *Ailanthus altissima* inhibit nematode reproduction by damaging germ cells and rachis in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Fitoterapia* 2020;146,104651. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104651>.
53. http://www.allergome.org/script/search_step2.php
54. Dokument Znaczenie organizmów szkodliwych i inwazyjnych gatunków roślin obcych w UE 94.52013SC0169. Załącznik VII.
55. Martí-Garrido J, Corominas M, Castillo-Fernández M, i wsp. Allergy to *Ailanthus Altissima* Pollen: A Local Allergen to Consider. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2020; doi: 10.18176/jiaci.0577.
56. Bergmann KCh, Werchan M, Werchan B. Allergy to tree-of-heaven pollen in Germany: detection by positive nasal provocation. *Allergo Journal International*. 2020;126-28.
57. Lu Z, Jiang B, Zhao B, i wsp. Liquid Profiling in Plants: Identification and Analysis of Extracellular Metabolites and miRNAs in Pollination Drops of *Ginkgo Biloba*. *Tree Physiol*. 2020. doi: 10.1093/.
59. Bell KL, Kevin S, Burgess, i wsp. Quantitative and qualitative assessment of pollen DNA metabarcoding using constructed species mixtures. *Mol. Ecol*. 2019; 28: 431–455.
60. Hossenbaccus L, Steacy LM, Walker T, Ellis AK. Utility of Environmental Exposure Unit Challenge Protocols for the Study of Allergic Rhinitis Therapies. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2020. 6;20:34. doi: 10.1007/s11882-020-00922-8.
61. Chen QY, Li L, Zhang L, i wsp. Efficacy of indoor air purification in the treatment of *Artemisia* pollen-allergic rhinitis: A randomised, double-blind, clinical controlled trial. *Clin Otolaryngology*. 2020;3: 394-401.
62. Choia YJ, Parkb J, Seongc S i wsp. Effects of Mechanical Drying on the Removal of Pollen Allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2020. DOI: 10.1159/000508694.
63. Buters J, Oteros J, Gebauer R, i wsp. Automatisches Pollenmonitoring in Deutschland. Eine Arbeit der Sektion Umwelt- und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI). *Allergo J*. 2020; 29: 14–16.
64. Sevillano V, Holt K, Aznarte JL. Precise automatic classification of 46 different pollen types with convolutional neural networks. *Plos one*. 2020 doi.org/10.1371/journal.pone.0229751.
65. R. Gallardo-Caballero, García-Orellana CJ, García-Manso A, i wsp. Precise Pollen Grain Detection in Bright Field Microscopy Using Deep Learning Techniques. *Sensors* 2019. doi: 10.3390/s19163583.
66. Sauvageat E, Zeder Y, Auderset, K, i wsp. Real-time pollen monitoring using digital holography. *Atmospheric Measurement Techniques*. 2020,13:1539-1550.