



Aleksandra Górską

**Ocena ekspresji wybranych genów za pomocą techniki RT-PCR u  
chorych na mastocytozę.**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. Marek Niedożytko

**Klinika Alergologii**

**Katedry Pneumonologii i Alergologii**

**Gdański Uniwersytet Medyczny**

Gdańsk 2014

## Podziękowania

- Prof. dr hab. n. med. Wojciech Biernat, Zakład Patomorfologii GUMed
- Dr n. med. Jolanta Gleń, Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii GUMed
- Prof. dr hab. n. med. Andrzej Hellmann, Klinika Hematologii i Transplantologii GUMed
- Prof. dr hab. n. med. Ewa Jassem, Klinika Alergologii GUMed
- Dr hab. n. med. Magdalena Lange, Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii
- Dr n. med. Krzysztof Lewandowski, Klinika Hematologii i Transplantologii GUMed
- Prof. dr hab. n. med. Janusz Limon, Zakład Biologii i Genetyki GUMed
- Dr n. med. Agnieszka Maciejewska, Katedra Medycyny Sądowej GUMed
- Prof. dr hab. n. med. Roman Nowicki, Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii GUMed
- Prof. dr hab. n. med. Ryszard Pawłowski, Katedra Medycyny Sądowej GUMed
- Prof. dr hab. n. med. Jadwiga Roszkiewicz, Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii
- Dr n. med. Marcin Skrzypski, Klinika Onkologii i Radioterapii GUMed
- Dr hab. n. med. Bartosz Wasąg, Zakład Biologii i Genetyki GUMed
- Prof. Cisca Wijmenga UMCG Groningen

## SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
1. WSTĘP	7
1.1. Epidemiologia mastocytozy	7
1.2. Rola komórek tucznych	8
1.3. Patogeneza mastocytozy	11
1.4. Rozpoznanie mastocytozy układowej (SM)	13
1.5. Zespół aktywacji mastocytów	18
1.6. Anafilaksja u chorych na mastocytozę	20
1.7. Leczenie mastocytozy	25
1.8. Rokowanie	28
1.9. Nerozwiazane problemy w mastocytozie	29
2. CELE PRACY	31
3. MATERIAŁ I METODY	32
3.1. Opis grupy badanej	32
3.2. Kryteria włączenia i wyłączenia	32
3.3. Opis grupy kontrolnej	33
3.4. Opis procedur wykonanych u chorych	33
3.4.1. Pobranie materiału oraz przeprowadzenie badań genetycznych	35
3.4.2. Analiza ekspresji genomu	38
3.4.3. Wybór genów do badania	38
3.4.4. Krótka charakterystyka wybranych genów	39
3.5. Analiza ekspresji genów	44

3.6. Analiza ekspresji genomu	44
4. WYNIKI	45
4.1. Wyniki części klinicznej	45
4.1.1. Ryzyko wystąpienia objawów aktywacji mastocytów w zależności od postaci choroby	45
4.1.2. Mechanizm reakcji	49
4.1.3. Identyfikacja czynników ryzyka wystąpienia reakcji anafilaktycznej	50
4.1.4. Zapobieganie wystąpieniu objawów MCAS i anafilaksji	50
4.2. Wyniki badania ekspresji genów z zastosowaniem techniki RT-PCR	52
4.2.1. Wyniki badania ekspresji wybranych 16 genów u chorych na mastocytozę w porównaniu do osób zdrowych	52
4.2.2. Wyniki badania ekspresji genów u chorych na mastocytozę z współistniejącą alergią na jady owadów w porównaniu do chorych na mastocytozę bez reakcji anafilaktycznych w wywiadzie	53
4.3. Wyniki badania ekspresji genów z zastosowaniem techniki whole genome expression analysis	55
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW	59
5.1. Anafilaksja	59
5.2. Ocena ekspresji genów za pomocą techniki RT-PCR	68
5.3. Ocena ekspresji profili genetycznych za pomocą techniki whole genome expression analysis	80
5.4. Rola badań ekspresji genów we współczesnej alergologii	83
6. WNIOSKI	88
7. STRESZCZENIE	89
8. ABSTRACT	92
9. PIŚMIENNICTWO	94

## Wykaz skrótów

MC - *mast cells* / komórki tuczne

SM - *systemic mastocytosis* / mastocytoza układowa

CM - *cutaneous mastocytosis* / mastocytoza skóry

MIS - *mastocytosis in the skin* / mastocytoza w skórze

ISM – *indolent systemic mastocytosis* / mastocytoza układowa o powolnym przebiegu

ASM - *aggressive systemic mastocytosis* / agresywna mastocytoza układowa

SSM - *smouldering systemic mastocytosis* / mastocytoza układowa o podstępny przebiegu

SM-AHNMD - mastocytoza układowa z klonalnym rozrostem linii komórkowych niemastocytarnych

MCL - *mast cell leukaemia* / białaczka mastocytarna

MCA - *mast cell activation* / zespół aktywacji mastocytów

MCAS - *monoclonal mast cell activation syndrome* / zespół aktywacji monoklonalnych mastocytów

MCAD - *mast cell activation disorder*

c-MCAD - *clonal mast cell activation disorder*

nc-MCAD - *nonclonal mast cell activation disorder*

SBT - *serum basal tryptase level* / stężenie tryptazy mastocytarnej

IVA – *insect venom allergy* / alergia na jady owadów

VIT – *venom immunotherapy* / immunoterapia swoista alergen jądów owadów

slgE – *specific immunoglobuline E* / swoista immunoglobulina E

SPT - *skin prick test* / punktowe testy skórne

RT-PCR - *reverse transcription polymerase chain reaction* / reakcja łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją

KEGG – *Kyoto encyclopedia of genes and genomes* / baza danych genów i

genomów *Kyoto*

NGR - *ang. number of annotated genes in the reference list*/ liczba odnotowanych genów na liście referencyjnej

TNGR - *ang. total number of genes in the reference list*/ całkowita liczba genów na liście referencyjnej

NG - *ang. number of annotated genes in the input list*/ liczba odnotowanych genów w liście wejściowej

TNG - *ang. total number of genes in the input list*/ całkowita liczba genów na liście wejściowej

Hyp - *ang. hypergeometric pValue*/ hipergeometryczna wartość p

Hyp\* - *ang. corrected hypergeometric pValue*/ skorygowana hipergeometryczna wartość p

EAACI - *the European Academy of Allergology and clinical Immunology* / Europejska Akademia Alergologii i Immunologii Klinicznej

ECNM - *the European Competence Network on Mastocytosis* / Europejska Sieć Mastocytozy

UMCG – *Univeristy Medical Center Groningen* / Centrum Medyczne Uniwersytetu w Groningen

## 1. Wstęp

Mastocytoza jest grupą chorób charakteryzującą się patologicznym rozrostem oraz nagromadzeniem atypowych mastocytów (komórek tucznych, *mast cells* – MC) w miejscach naturalnej ich lokalizacji, przede wszystkim w szpiku kostnym, a także w skórze, wątrobie, śledzionie, węzłach chłonnych i innych miejscach [138]. Wielonarządowa lokalizacja procesu chorobowego, naciekanie i upośledzenie funkcji zajętych narządów oraz występowanie objawów zależnych od uwalniania mediatorów komórek tucznych powoduje, że przebieg choroby jest zróżnicowany - od postaci bezobjawowej nie wpływającej na przeżycie do agresywnej, z niekorzystnym rokowaniem.

### 1.1 Epidemiologia mastocytozy

Mastocytoza jest chorobą występującą rzadko i trudną do rozpoznania. Z powodu braku wielośrodkowych badań pozwalających ocenić częstość jej występowania epidemiologia oparta jest na danych szacunkowych. Chorobowość szacowana jest na 0,01% populacji ogólnej [140]. Mastocytoza skóry występuje u 1 na 1000 do 8000 chorych leczonych dermatologicznie, natomiast agresywna postać mastocytozy układowej u 10% chorych na mastocytozę [47,60]. W jednej z nielicznych prac poświęconych epidemiologii mastocytozy stwierdzono, że w regionie Groningen w Holandii częstość występowania mastocytozy układowej u osób powyżej 15 roku życia wynosi 13 przypadków na 100000 osób [147]. Na podstawie danych z ośrodków mających największe doświadczenie w opiece nad chorymi na mastocytozę: Kliniki Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Groningen (UMCG, Holandia) i Kliniki Chorób Wewnętrznych i Hematologii Uniwersytetu Medycznego we Wiedniu (Austria) oraz biorąc pod uwagę różnice w liczbie ludności przypuszcza się, że w Polsce choruje od 400 do 800 osób. Liczbę nowych zachorowań można oszacować na 100 przypadków na milion mieszkańców rocznie [140]. U 2/3 chorych na mastocytozę choroba rozpoczyna się wystąpieniem zmian skórnych. U 80% chorych zmiany skórne występują już w okresie niemowlęcym, jednakże w wielu przypadkach dochodzi do remisji w okresie dorastania [114]. Drugim szczytem zachorowania jest 3-4 dekada życia. W tym okresie ponad 90% chorych rozwija postać układową mastocytozy, głównie o

łagodnym przebiegu [103]. Postaci agresywne mastocytozy występują u mniej niż 10% chorych, a u 1/3 z nich współistnieją choroby hematologiczne szpiku niezwiązane z komórkami tucznymi (AHNMD). Najcięższą postacią agresywnej mastocytozy, bardzo źle rokującą, z krótkim 2 - 4 miesięcznym okresem przeżycia, bez leczenia, jest białaczka mastocytarna [114].

## *1.2. Rola komórek tucznych*

Komórki tuczne zajmują wyjątkową pozycję wśród komórek układu immunologicznego. Charakteryzują się szerokim zakresem działania, począwszy od udziału w odporności immunologicznej wrodzonej i nabytej, po angiogenezę i przebudowę tkanek [87].

W normalnych warunkach występują w stadium dojrzałym jedynie w tkankach unaczynionych. Szczególnie licznie występują w skórze, w nabłonku dróg oddechowych, moczowych, przewodu pokarmowego i w przestrzeni okołonaczyniowej [87]. Co więcej w zależności od zawartości obojętnych proteaz w ziarnistościach występują w jednym z dwóch fenotypów: MCTC zawierającym chymazę oraz tryptazę, dawniej zwanym fenotypem tkanki łącznej oraz MCT zawierającym tylko tryptazę, dawniej zwanym fenotypem śluzówkowym [87]. Mimo że komórki tuczne znane są od wielu lat, po raz pierwszy opisane przez Paula Ehrlicha w 1878 roku [36], ich rola w patomechanizmie chorób oraz mechanizmach obronnych gospodarza pozostaje niejasna, oparta na badaniach *in vitro* lub modelach zwierzęcych. Jedynie ich udział w reakcji IgE zależnej oraz w mastocytozie wydaje się być dobrze poznany [86]. Uważa się, że komórkami prekursorowymi mastocytów są powstające w szpiku jednojądrowe agranulocytarne komórki CD34+. W wyniku interakcji z komórkami adhezyjnymi śródbłonna przenikają z naczyń krwionośnych do zrębu, gdzie następuje ich różnicowanie oraz dojrzewanie pod wpływem czynników mikrośrodowiska [73]. Komórki prekursorowe mastocytów wykazują ekspresję antygenu kit będącego receptorem dla czynnika wzrostu komórek pnia SCF (stem cell factor), zwanego też ligandem kit (KL). Receptor dla SCF jest związany z kinazą tyrozynową i został sklasyfikowany jako CD117. Poprzez aktywację CD117 SCF hamuje apoptozę, promuje chemotaksję komórek tucznych i ich prekursorów, pobudza proliferację niedojrzałych



komórek tucznych oraz uwrażliwia komórki tuczne na inne mediatory [73]. Mimo że SCF jest kluczową cytokiną niezbędną do różnicowania komórek tucznych, nie mniej istotnymi cytokinami niezbędnymi w rozwoju ludzkich mastocytów są interleukiny IL-3 oraz IL-6. I tak IL-6 wykazuje działanie pobudzające rozrost oraz działanie anty-apoptotyczne na komórki CD34+, hamuje wzrost komórek tucznych oraz obniża ekspresję kit, zwiększa rozmiar komórek oraz zawartość histaminy oraz pobudza powstawanie komórek chymazododatnich [2]. Czynniki wpływające na rozwój komórki tucznej przedstawiono w tabeli 1 [73].

Tabela 1. Czynniki wpływające na rozwój komórek tucznych [73].

Cytokina	Receptor	Wpływ na ludzkie komórki tuczne
SCF	Kit	Bezpośrednio pobudza proliferację komórek prekursorowych; indukuje powstawanie ziarnistości
IL-3	IL-3R	Bezpośrednio pobudza proliferację komórek prekursorowych
IL-4	IL-4R	Zależy od podtypu komórek i innych cytokin w środowisku
IL-5	IL-5R	Kofaktor czynników proliferacyjnych
IL-6	IL-6R	Kofaktor czynników proliferacyjnych lub hamowanie proliferacji
IL-9	IL-9R	Kofaktor czynników proliferacyjnych
INF- $\gamma$	INF- $\gamma$ R	Hamuje proliferację
NGF	NGFR	Hamuje apoptozę przy współudziale SCF
TGF- $\beta$	TGF- $\beta$	Hamuje proliferację
GM-CSF	GM-CSF	Hamuje proliferację
Trombopoetyna	TPOR	Pobudza rozwój

Dojrzałą komórkę tuczną charakteryzuje jednopłatowe jądro, metachromatyczne ziarnistości cytoplazmatyczne oraz brak złogów glikogenu w cytoplazmie. Ziarnistości cytoplazmatyczne zawierają mediatory zapalenia, proteazy oraz proteoglikany uwalniane w trakcie aktywacji komórki tucznej do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [73]. Najbardziej typowym mediatorem zapalnym komórki tucznej jest histamina odpowiedzialna za większość etapów reakcji wczesnej fazy. Efekt jej działania jest natychmiastowy, ale krótkotrwały, ponieważ metabolizowana jest w ciągu 1-2 minut [73]. Kolejnym ważnym mediatorem komórki tucznej jest heparyna będąca protoglikanem zapewniającym stabilizację innych mediatorów komórki tucznej oraz działającym przeciwkrzepliwie. Główną proteazą komórki tucznej przechowywaną w ziarnistościach w formie aktywnej jest tryptaza. Istnieją trzy

podjednostki tryptazy:  $\alpha$ -tryptaza, pro- $\beta$ -tryptaza oraz  $\beta$ -tryptaza.  $\alpha$ -tryptaza jest postacią nieaktywną wydzielaną konstytutywnie [97]. Na podstawie jej stężenia oszacowuje się liczbę mastocytów w organizmie. Nieaktywną formą enzymu jest także pro- $\beta$ -tryptaza, która ulega aktywacji pod wpływem m.in. heparyny [22]. Aktywną formą zymogenu jest  $\beta$ -tryptaza magazynowana w ziarnistościach w postaci tetrameru stabilizowanego przez heparynę. Uwalniana jest podczas degranulacji komórek tucznych a jej stężenie określa poziom aktywacji mastocytów [128]. Jej działanie w organizmie nie jest do końca poznane. Wiadomo, że bierze udział w degradacji niektórych substancji: neuropeptydu VIP, fibrynogenu, urokinazy czy fibronektyny. Ponadto uważa się, że skutkiem jej działania jest zwiększenie przepuszczalności naczyń włosowatych oraz rekrutacja komórek zapalnych w rozwoju zapalenia [97]. Jest enzymem stabilnym i niemal nie ulega ekspresji w krążących komórkach krwi. Jest swoista dla mastocytów, a jej obecność można stwierdzić jedynie w śladowych ilościach w bazofilach [97]. Kolejną proteazą komórki tucznej jest monomeryczna chymaza, również przechowywana w ziarnistościach w postaci aktywnej. Jej obecność jest charakterystyczna dla fenotypu MCTC [73]. Chymaza rozkłada neuropeptyd neurotensynę, angiotensynę I do angiotensyny II, degradowuje kolagen IV i rozdziela połączenia między skórą a naskórkiem, a także pobudza gruczoły podśluzowe [73]. Kolejnymi proteinazami występującymi w podtypie MCTC komórek tucznych są karboksypeptydaza metabolizująca angiotensynę, leukefalinę i neurotensynę (poprzez usuwanie reszt karboksylowych) oraz niemal identyczna jak w neutrofilach katepsyna G [9]. Warto wspomnieć, że tylko komórki tuczne mają zdolność syntetyzowania obu enzymów. Podczas aktywacji komórek tucznych dochodzi do uwolnienia w formie kompleksu powyższych proteoglikanów i chymazy, a jego następstwa wynikają z ich współdziałania [73].

Poza mediatorami występującymi konstytutywnie w komórce tucznej podczas jej aktywacji dochodzi do syntezy *de novo* mediatorów będących efektem uwolnienia i odpowiedniej przemiany kwasu arachidonowego pod wpływem cyklooksygenazy do prostaglandyn lub lipooksygenazy do leukotrienów [73]. Wiadomo, że komórki tuczne ujawniają ekspresję obu typów cyklooksygenazy: konstytutywnej COX1 oraz COX2 syntetyzującej prostaglandyny w czasie

reakcji zapalnej [73]. Jedną z ważniejszych prostaglandyn biorących udział w stanie zapalnym jest PGD2 wywołująca silny skurcz mięśniówki gładkiej oskrzeli, ma działanie chemotaktyczne dla neutrofilów oraz silne działanie antyagregacyjne na płytki krwi. PGD2 gwałtownie ulega rozpadowi do PGF2. Głównymi produktami lipooksygenazy mastocytów są leukotrien C4 (LTC4) oraz jego metabolity D4 (LTD4) i E4 (LTE4), określane jako SRS-A (*slow reacting substance of anaphylaxis*) [86]. SRS-A powodują silny skurcz oskrzeli, zwiększają przepuszczalność śródbłonnków oraz pobudzają napływ eozynofików. Wiadomo, że komórki tuczne uwalniają w czasie aktywacji zarówno LTC4 jak i PGD2, natomiast bazofile uwalniają tylko LTC4. W czasie aktywacji komórki tucznej wytwarzane są także niewielkie ilości PGE2, LTB4, tromboksanu B2 oraz czynnika aktywującego płytki (PAF) [73]. Kolejnymi substancjami uwalnianymi przez aktywowane komórki tuczne są cytokiny: TNF- $\alpha$ , VPF/VEGF, GM-CSF, SCF,  $\beta$ -FGF, MIP-1 $\alpha$  oraz interleukiny IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16 [73]. Biorą udział w każdym etapie toczącego się zapalenia oraz wpływają na komórki biorące w nim udział: fagocyty, neutrofile, eozynofile, a także limfocyty. Pobudzają wytwarzanie przeciwciał klasy IgE, regulują odpowiedź humoralną, rozwój komórek B i T oraz tworzenie przeciwciał przez plazmocyty [73,86]. Do aktywowania i degranulacji komórek tucznych oraz uwolnienia powyższych mediatorów może dojść podczas IgE- oraz IgG-zależnej aktywacji mastocytów, a także poprzez wpływ produktów bakterii na receptor TLR [86].

### 1.3. Patogeneza mastocytozy

Charakterystyczną cechą mastocytozy są ogniskowe skupiska atypowych komórek tucznych w różnych narządach, które mogą wykazywać zwiększoną aktywność proliferacyjną [73]. Obecnie wiadomo, że kluczowe znaczenie w rozwoju choroby ma mutacja aktywująca w kit, w obrębie kodonu 816 genu KIT [138]. Zidentyfikowana mutacja jest mutacją somatyczną Asp816Val w KIT. Prowadzi ona do nieprawidłowego różnicowania i dojrzewania oraz rozmieszczenia komórek tucznych w organizmie [81]. Wykrywana jest u większości dorosłych chorych oraz u dzieci z cięższymi postaciami mastocytozy. Kolejne badania doprowadziły do zidentyfikowania kolejnych mutacji somatycznych w KIT w obrębie kodonu 816: Asp816Phe oraz

Asp816Tyr [81]. Dzięki potwierdzeniu obecności mutacji Asp816Val w limfocytach B i T oraz mielomonocytach stwierdzono, że mastocytoza jest chorobą monoklonalną wynikającą z zaburzeń hemopoetycznej komórki progenitorowej [3]. W zależności od etapu różnicowania komórek szpiku, na którym dojdzie do mutacji, dotyczy jednej lub kilku linii komórkowych [87,139]. Sugeruje się, że poza mutacją D816V, inne mutacje kit mogą prowadzić do rozwoju mastocytozy. Szczególnie u chorych z mastocytozą zidentyfikowano wiele mutacji kit przedstawionych w tabeli 2 [87,139]. Uważa się, że poznane mutacje dodatkowe kit mogą odgrywać rolę w rozwoju mastocytozy. Na uwagę zasługują: V560G, D816Y, D816F, D816H, E839K inaktywująca mutacja występująca u dzieci z mastocytozą, a także rzadko występująca F522C [87]. Obecnie uważa się, że u większości chorych na mastocytozę występuje mutacja genetyczna kit D816V w komórkach szpiku kostnego, a wraz z upływem czasu oraz ciężkością choroby u części tych chorych komórki klonalne stają się wykrywalne we krwi krążącej [86]. Sądzi się, że u części z tych osób rozwinię się postać podstępnie przebiegającą mastocytozy. Obserwacje te potwierdzają pogląd, że rozwój mastocytozy spowodowany jest obecnością nadaktywnej KIT. Co ważne, dotychczas nie potwierdzono dziedziczności mutacji D816V [86]. Celem dalszego poznania patogenezy mastocytozy obecnie prowadzi się badania nad znaczeniem zaburzeń w chromosomach, defektów genetycznych oraz polimorfizmów genów. Uważa się, że poznany polimorfizm genu dla receptora IL-4 $\alpha$  (Q576R) związany jest z mniejszym zaawansowaniem choroby, z lokalizacją choroby ograniczona tylko do skóry [86].

Tabela 2. Defekty genetyczne związane z mastocytozą oraz częstość ich występowania [87].

Defekty genetyczne	Wariant mastocytozy	Częstość występowania (%)
c-kit D816V	SM	>80%
c-kit D816Y	CM, SM, SM-AHNMD	<5%
c-kit D816F	CM	<5%
c-kit D816H	SM-AHNMD	<5%
c-kit D820G	ASM	<5%
c-kit V560G	SM	<5%

c-kit F522C	SM	<5%
c-kit E839K	CM	<5%
c-kit V530I	SM-AML	<5%
c-kit K509I	SM (postać rodzinna)	<5%
FIP1/PDGFRA	SM-HES, SM z eozynofilią	<5%
polimorfizm genu IL-4R $\alpha$ Q576R	CM, ISM	
Nieprawidłowości kariotypu		
del 20(q12)	SM, SM-AHNMD	<5%
t(8;21)	SM-AML M2	<5%

Poza mutacjami genetycznymi kit w rozwoju mastocytozy charakterystyczna jest nieprawidłowa ekspresja cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek tucznych [87]. Nowotworowe komórki tuczne wykazują ekspresję CD2. Ponieważ naturalnym ligandem dla tej cząsteczki jest CD58 występujący na powierzchni prawidłowych mastocytów, obecnie istnieje założenie, że poprzez połączenie CD2 z CD58 dochodzi do gromadzenia się oraz tworzenia skupisk mastocytów [87]. Komórki tuczne wykazują ekspresję także szeregu innych molekuł adhezyjnych, ale tylko CD2 jest typowa wyłącznie dla komórek nowotworowych [87].

W zależności od wieku zachorowania wyróżnia się dwie główne kategorie mastocytozy [7,74,139]. Typowa postać dziecięca, z początkiem zachorowania w pierwszym roku życia, w większości przypadków ograniczona jest do skóry (CM), wiąże się z dobrym rokowaniem i u wielu dzieci ulega znacznej poprawie bądź całkowitej remisji w wieku dojrzałym [7,74]. Natomiast postać z początkiem zachorowania w wieku dojrzałym wiąże się z przewlekłością procesu oraz zajęciem narządów wewnętrznych, głównie szpiku kostnego, częstym zajęciem skóry i niepewnym rokowaniem [7]. W tej postaci często wykrywa się mutację somatyczną w kodonie 816 genu kinazy tyrozynowej [139].

#### 1.4. Rozpoznanie mastocytozy układowej (SM)

Rozpoznanie mastocytozy często jest utrudnione z powodu jej zmiennego przebiegu i nietypowego obrazu klinicznego [103]. Podejrzenie mastocytozy należy potwierdzić badaniem histopatologicznym oraz określić postać choroby

na podstawie oceny szpiku i narządów wewnętrznych [138]. Niestety obecnie nie istnieje badanie dodatkowe mniej obciążające chorych, in vitro, mogące stanowić alternatywę dla badania histopatologicznego [138]. Jeżeli występują typowe zmiany skórne konieczne jest ustalenie czy choroba ograniczona jest tylko do skóry czy ma charakter uogólniony [138]. Z uwagi na niewielkie ryzyko rozwoju mastocytozy układowej u dzieci zaleca się postępowanie odmienne niż u dorosłych [138]. W tej grupie wiekowej można postawić rozpoznanie mastocytozy skóry, bez wykonania biopsji szpiku, jeśli poziom tryptazy nie przekracza 20 ng/ml i nie ma objawów choroby układowej czy podejrzenia zespołu mielodysplastycznego lub mieloproliferacyjnego [74,138]. Jeżeli poziom tryptazy przekracza lub wynosi około 20 ng/ml to przy braku objawów układowych zaleca się ocenę jej poziomu raz na 1-3 lata aż do okresu pokwitania [138]. Przy utrzymywaniu się zmian skórnych powyżej 18 roku życia zaleca się wykonanie biopsji szpiku [74,138]. U chorych z utrzymującym się wysokim stężeniem tryptazy powinno się rozważyć biopsję szpiku niezależnie od wieku. U osób dorosłych mastocytoza rozpoznawana jest zwykle na podstawie badania szpiku kostnego z uwagi na najczęstsze zajęcie tego narządu, a także w celu wykluczenia choroby mieloproliferacyjnej [138]. Badanie cytologiczne szpiku jest niewystarczające z powodu małej liczby mastocytów w krwi szpikowej u większości chorych, a krew obwodowa nie może stanowić alternatywy dla biopsji szpiku w poszukiwaniu mutacji D816V genu KIT [138]. Stąd badaniem referencyjnym potwierdzającym obecność nacieków mastocytów w narządach jest badanie histopatologiczne. Materiał uzyskuje się na drodze trepanobiopsji szpiku kostnego [138,141]. Badaniami uzupełniającymi są badania krwi szpikowej: immunofenotypizacja – określenie występowania antygenów CD2 oraz CD25, cytologia, ocena w kierunku mutacji kit, a także określenie stężenia tryptazy mastocytarnej w surowicy [138,141].

Kryterium większe dla rozpoznania mastocytozy układowej to wielogniskowe, zbite, dość dobrze odgraniczone nacieki z >15 komórek tucznych w szpiku kostnym lub innym narządzie poza skórą [39,58,138,139,141].

Kryteria mniejsze to (1) obecność w szpiku kostnym 25% mastocytów o kształcie wrzecionowatym, albo wykazujących atypię, (2) wykrycie mutacji D816V genu KIT we krwi, szpiku kostnym lub w tkankach, (3) mastocyty

wykazujące atypową immunofenotypizację z ekspresją antygenów CD2 i/lub CD25 oraz (4) podwyższone stężenie tryptazy mastocytarnej w surowicy ponad 20 ng/ml [39,58,138,139,141]. SM rozpoznaje się, gdy spełnione jest 1 większe oraz 1 mniejsze bądź 3 mniejsze kryteria rozpoznania [39,58,138,139,141]. Jeżeli kryterium większe nie jest spełnione, a w szpiku kostnym obecne są mastocyty wykazujące mutację D816V genu KIT i/lub atypową immunofenotypizację CD2+ i/lub CD25+, to przy obecności objawów wynikających z uwolnienia mediatorów komórek tucznych rozpoznaje się *monoclonal mast cell activation syndrome (MCAS)* [132].

Rzadko zdarza się, że pierwotne rozpoznanie mastocytozy następuje na podstawie badania błony śluzowej przewodu pokarmowego lub śledziony, a dopiero w drugiej kolejności szpiku kostnego [49]. Należy przy tym pamiętać, że nacieki mastocytów mogą występować w przewlekłych chorobach zapalnych przewodu pokarmowego bez związku z mastocytozą [49].

Klasyfikacja Światowej Organizacji Zdrowia wyróżnia 7 podtypów choroby [138]:

- mastocytoza skóry (CM),
- mastocytoza układowa o łagodnym przebiegu (ISM):
  - izolowana mastocytoza szpiku kostnego
  - mastocytoza układowa o podstępny przebiegu,
- mastocytoza układowa z klonalnym rozrostem linii komórkowych niemastocytarnych (SM-AHNMD),
- agresywna układowa mastocytoza (ASM):
  - mastocytoza układowa z limfadenopatią oraz eozynofilią,
- białaczka mastocytarna (MCL),
- mięsak mastocytarny
- mastocytoma w narządach poza skórą

W celu różnicowania podtypów mastocytozy układowej (*ang. systemic mastocytosis, SM*) należy ocenić występowanie objawów układowych spowodowanych naciekiem organów lub tkanek przez mastocyty [138]. Podzielono je na objawy typu B, z pogranicza (*ang. borderline*), w których obecne są nacieki mastocytów w narządach, nie upośledzają one jednak funkcji narządów oraz objawy typu C związane z istotnym upośledzeniem funkcji

organów, kwalifikujące do leczenia cytoredukcyjnego [138]. Objawy typu B wynikające z naciekania szpiku kostnego i/lub narządów wewnętrznych przez mastocyty to: zajęcie wielu linii komórkowych, masywne nacieki mastocytów stanowiące >30% komórek szpiku wybarwionych dodatnio w kierunku tryptazy, znacznie podwyższone stężenie tryptazy mastocytarnej (>200 ng/ml), powiększenie wątroby, śledziony lub węzłów chłonnych [38,150]. Spełnienie 2 lub 3 z powyższych kryteriów upoważnia do rozpoznania SSM (*ang. smoldering systemic mastocytosis*) podtypu SM, związanej z wyższym ryzykiem rozwoju zespołu mielodysplastycznego, mieloproliferacyjnego bądź transformacji białaczkowej [138]. Objawy typu C spowodowane upośledzeniem funkcji narządów, takie jak: cytopenia, patologiczne złamania, hepatosplenomegalia z upośledzeniem czynności wątroby, wodobrzusze, zespół złego wchłaniania, spadek masy ciała, powiększenie węzłów chłonnych czy eozynofilia występują w ASM, MCL oraz chłoniaku mastocytarnym. Występowanie objawów typu C kwalifikuje do intensywnego leczenia cytoredukcyjnego [58]. Nasilenie zmian skórnych często wykazuje odwrotną korelację z zajęciem szpiku. Chorzy na ASM lub MCL często nie mają pokrzywki barwnikowej [141]. Nie oznacza to jednak, że wszyscy chorzy na SM bez zmian skórnych mają ASM. Możliwa jest izolowana mastocytoza szpiku kostnego, która cechuje się brakiem zmian skórnych oraz niskim sBT w odróżnieniu od ASM, w której stężenie tego markera jest znacznie podwyższone [141,142]. Dodatkowo znacznie podwyższone stężenie sBT w surowicy uważa się za potencjalny wskaźnik agresywności choroby u tych chorych na SM, którzy nie mają zmian skórnych [142]. Należy zaznaczyć, że u osób z SM częściej mogą występować powikłania ogólne jak osteoporoza bądź osteopenia, miażdżyca, a u chorych z rozległym zaawansowaniem choroby także hepatomegalia, splenomegalia, limfadenopatia, niedokrwistość, trombocytopenia czy eozynofilia [17].

Najczęściej występującą postacią choroby jest mastocytoza skóry (*ang. cutaneous mastocytosis, CM*), której charakterystyczną cechą jest rozplam i nagromadzenie mastocytów w skórze [74,138,141]. Większość przypadków tej postaci choroby występuje u dzieci, u których jedynie skóra jest zajęta procesem chorobowym oraz u których zwykle nie występuje mutacja D816V [74]. Natomiast u dorosłych zmiany skórne najczęściej są pierwszym objawem



choroby układowej. Wobec tego ustalono, że na wstępnym etapie diagnostyki u dorosłych pacjentów należy stosować określenie mastocytoza w skórze (*mastocytosis in the skin, MIS*) zamiast mastocytoza skóry przed ustaleniem ostatecznego rozpoznania [138,141]. MIS rozpoznawany jest na podstawie typowego obrazu morfologicznego zmian skórnych, obecności objawu Darier's oraz badania histopatologicznego wycinka skóry [74]. Zatem w celu rozpoznania CM konieczne jest wykluczenie postaci układowej (SM) oraz innych chorób przebiegających z odczynowym nagromadzeniem komórek tucznych w skórze [138]. CM u dzieci w większości przypadków może ulec spontanicznej regresji, a do pełnego wyleczenia najczęściej dochodzi w drugiej dekadzie życia [39]. Najczęstszą postacią CM jest postać plamisto-grudkowa, nazywana pokrzywką barwnikową, charakteryzująca się drobnymi (2-4mm) nieostro odgraniczonymi od otoczenia wykwitami plamistymi i grudkowymi, owalnymi lub okrągłymi, barwy brunatnej lub żółtobrunatnej [155]. Występują w postaci rozszanych licznych zmian zlokalizowanych symetrycznie na skórze całego ciała, z największym nasileniem w okolicach tułowia oraz bioder [74,155]. W niektórych przypadkach zmiany skórne występują w niewielkiej ilości stwarzając problem z diagnostyką i rozpoznaniem [155]. U dzieci zmiany skórne są nieco większe (zwykle 5 mm średnicy) i wyraźniejsze niż u dorosłych, głównie zlokalizowane w okolicy tułowia [74]. Do innych mniej typowych postaci CM należą postać teleangiektatyczna, guzkowa oraz liczne guzy mastocytarne [74]. Warto wspomnieć, że pojedynczy guz mastocytarny często występuje u dzieci już w chwili narodzin bądź rozwija się w okresie niemowlęctwa [74]. Zmiana znacznych rozmiarów (typowo 2-5 cm średnicy) jest płaska lub delikatnie uniesiona, dobrze odgraniczona, występuje w postaci samotnej żółtawo-brązowej lub czerwonej płytki lub guzka [17,74]. Postać uogólniona CM jest najrzadziej występującą i charakteryzuje się uogólnionym zajęciem skóry występującym typowo u niemowląt. Zmiany mają charakter zlewny, skóra jest ciastowato nacieczona i zgrubiała. Z powodu obrzęku oraz stwardnienia skóry dochodzi do pseudo-lichenifikacji oraz obrazu skóry przypominającym "skórkę pomarańczową" [17,138]. Charakteryzuje się uporczywym świądem, żywym objawem Darier'a oraz skłonnością do tworzenia zmian pęcherzowych i pęcherzowo-krwotocznych pod wpływem bodźców mechanicznych. W postaci tej mogą występować powikłania ogólne jak nagła hipotensja, napadowa

duszość, występowanie czerwienienia się (*flushing*), wymioty, biegunki oraz krwawienia z przewodu pokarmowego a nawet wstrząs anafilaktyczny [17,138]. U większość dorosłych z CM rozwija się mastocytoza układowa o łagodnym przebiegu (ISM). Mimo coraz większego zajęcia skóry przebieg choroby pozostaje stabilny przez lata, a rozwój w kierunku bardziej agresywnych postaci nie występuje często [17,138]. Należy zaznaczyć, że u większości dorosłych z CM występują już ogniska lub rozsiane skupiska mastocytów w szpiku kostnym [17,138].

### 1.5. Zespół aktywacji mastocytów

Atypowa aktywacja oraz uwolnienie mediatorów mastocytów pod wpływem znanych lub nieznanymi czynników są charakterystyczne dla *mast cell activation disorder (MCAD)*. Jak już wspomniano powyżej, obecność kryteriów: mutacji kit oraz immunofenotypu CD 25+ na komórkach tucznych szpiku kostnego definiowana jest jako klonalność, występuje w *clonal mast cell activation disorder (c-MCAD)*; natomiast ich nieobecność stwierdza się w *nonclonal mast cell activation disorder (nc-MCAD)* [1]. Alvarez-Twose i wsp. [1] przedstawili kliniczną, biologiczną oraz molekularną charakterystykę dorosłych chorych z c-MCAD oraz nc-MCAD. W badanej przez nich populacji chorych najczęstszymi czynnikami wyzwalającymi aktywację mastocytów i uwolnienie ich mediatorów były: (1) użądlenia przez owady błonkoskrzydłe, gzy końskie a także niezidentyfikowane owady, (2) nadwrażliwość na leki: antybiotyki, NLPZ, kodeinę, mepiwakainę, rokuronium, (3) pokarmy: ryby, jaja, olej słonecznikowy, alkohol oraz (4) manipulacje na jelicie w trakcie operacji w jamie brzusznej. Alergie na jady owadów były najczęstszym czynnikiem wywołującym anafilaksję u chorych na ISMs- (mastocytoza układowa o łagodnym przebiegu bez zajęcia skóry), a leki - u chorych z nc-MCAD. U 80% badanych wystąpiły ciężkie zagrażające życiu reakcje z udziałem zaburzeń ze strony układu sercowo-naczyniowego i/lub układu oddechowego. U chorych na nc-MCAD znacznie częściej występowały objawy ze strony skóry i układu oddechowego, podczas gdy w ISMs- znacznie częściej występowały objawy sercowo-naczyniowe. W grupach ISMs- i ISMs+ występowanie i nasilenie reakcji anafilaktycznych było podobne. Co ważne, u 14% chorych na ISMs+ z anafilaksją w wywiadzie epizody uwolnienia mediatorów komórek tucznych występowały od 12 do 32

miesiące przed pojawieniem się zmian skórnych i rozpoznaniem ISM. Dane te sugerują konieczność długoterminowej obserwacji chorych z c-MCAD w kierunku rozwoju SM [1].

Wśród chorych z podwyższonym stężeniem sBT > 20ug/l częściej rozpoznano ISMs-, a u chorych z sBT <20ug/l - nc-MCAD. U chorych na c-MCAD średnie stężenie sBT wynosiło 14,3 µg/l. W grupie ISMs- autorzy stwierdzili przewagę mężczyzn, co jest zgodne z doniesieniami o przewadze płci męskiej wśród chorych z ISM i IgE zależnymi reakcjami anafilaktycznymi w porównaniu do osób bez SM. Ponadto dane te sugerują zależność między płcią męską a ciężkością reakcji związanej z uwolnieniem mediatorów komórek tucznych w mastocytozie, szczególnie w łagodnej postaci (ISMs) [1].

Wyniki wskazują na wysoką czułość i specyficzność badania sBT >25 ug/l lub sBT<15 ug/l dla rozpoznania klonalności mastocytów. Nie stwierdzono natomiast zależności pomiędzy sBT a ciężkością objawów w ISMs-, c-MCAD i nc-MCAD. Mutacje kit najczęściej wykryto w komórkach tucznych szpiku kostnego chorych na ISMs- [1].

Na podstawie danych klinicznych i laboratoryjnych autorzy zaproponowali test przesiewowy - model punktacji oceniający prawdopodobieństwo obecności klonalnych mastocytów u chorych z anafilaksją w wywiadzie bez zmian skórnych (tabela 3) [1].

Tabela 3. Model punktacji oceniający prawdopodobieństwo obecności klonalnych mastocytów [1].

Zmienne		Punkty
Płeć	Mężczyzna	+1
	Kobieta	-1
Objawy kliniczne	Brak pokrzywki i obrzęku	+1
	Pokrzywka i/lub obrzęk	-2
	Zasłabnięcie i/lub omdlenie	+3
Tryptaza w surowicy sBT	<15 ng/ml	-1
	> 25 ng/ml	+2

Ilość Liczba punktów < 2: niskie prawdopodobieństwo c-MCAD

Liczba punktów > 2: wysokie prawdopodobieństwo c-MCAD

Czułość 0,92, specyficzność 0,81

Autorzy tego badania uważają, że znaczny odsetek chorych na c-MCAD odzwierciedla wczesne stadium ISM, a chorzy spełniający 1 lub 2 kryteria SM powinni być obserwowani w kierunku rozwoju SM. Ponadto chorzy z mutacjami KIT powinni być diagnozowani w kierunku progresji choroby [1].

W porównaniu do chorych na idiopatyczną anafilaksję, chorzy na MCAD mają częściej epizody hipotensji. Powód tego zróżnicowania klinicznego jest niejasny. Wykluczenie zajęcia szpiku kostnego przez patologiczny proces jest istotne, gdyż pozwala rozpoznać MCAD jako przyczynę anafilaksji [7].

Sugeruje się, że obecność mutacji w genie KIT kinazy tyrozynowej określających aktywność mastocytów jest niezbędną dla rozwoju objawowej choroby z udziałem mastocytów – MCAS (*monoclonal mast cell activation syndrome*). Molderings i wsp. [91] podtrzymali tezę, że MCAS jest chorobą z klonalnym rozrostem mastocytów zwykle związanym z obecnością różnych mutacji w genie kit kinazy tyrozynowej. W komórkach tucznych 13 z 20 chorych na MCAS wykryli wiele przeważnie nowych mutacji punktowych lub złożonych zmian w sekwencjach mRNA kodujących kinazę tyrozynową kit. Co ciekawe wśród wszystkich, z wyjątkiem jednej, zdrowych osób w grupie kontrolnej (u 19/20 osób) wykryto nieistotnie funkcjonalnie zmiany, co potwierdza wcześniejsze doniesienia [43]. Prawdopodobnie u tego chorego z wielorakimi zmianami w transkryptach kit choroba jeszcze klinicznie nie rozwinęła się. Poza mutacją D816V genu kit, która występuje u ponad 90% chorych z SM, oceniano konsekwencje funkcjonalne mutacji D419H oraz M541L [158]. Jednakże wykryto je w zbyt małej grupie chorych, aby przeprowadzić znaczącą analizę.

#### 1.6. Anafilaksja u chorych na mastocytozę

Chorzy na mastocytozę przeważnie mają objawy kliniczne wynikające z aktywacji oraz uwolnienia mediatorów komórek tucznych, takie jak: uogólniony świąd, zaczerwienienie, bóle głowy, kurczowe bóle brzucha, biegunka, bóle kości czy stawów, po hipotensję i wstrząs [11]. Reakcje anafilaktyczne występują u 30% wszystkich chorych na mastocytozę, natomiast u chorych na

mastocytozę układową stwierdza się je w 50% przypadków [7,16,124]. Do aktywacji mastocytów może dojść w wyniku reakcji immunologicznej (np. alergia na pokarm, jadów owadów, leki, lateks), bądź mechanizmów nadwrażliwości niealergicznego po zadziałaniu nieswoistych bodźców takich jak: ciepło, gorąco, wysiłek fizyczny, a także stres. Pomimo, że częstość występowania chorób alergicznych IgE-zależnych nie jest wyższa niż w populacji ogólnej uważa się, że mastocyty u chorych mogą mieć defekt wewnętrzny obniżający ich próg aktywacji i/lub zwiększający jego wrażliwość do aktywacji [7].

Jednym z najważniejszych czynników aktywujących komórki tuczne jest jad owadów błonkoskrzydłych. Szacuje się, że 30% chorych na mastocytozę ma poużądleniowe reakcje anafilaktyczne [16], które są często cięższe niż w populacji ogólnej osób z alergią na jady owadów (1-3% populacji ogólnej) [83]. U chorych na mastocytozę reakcje anafilaktyczne powodowane użądleniami owadów błonkoskrzydłych w mechanizmie nie-IgE-zależnym występują rzadko [52], jednakże częściej niż w populacji ogólnej nie stwierdza się sIgE oraz dodatnich wyników punktowych testów skórnych. Sugeruje się, że przyczyną tego zjawiska jest adsorpcja krążących sIgE na powierzchni licznych mastocytów zgromadzonych w różnych tkankach [93]. Postępowaniem z wyboru u osób z alergią na jady owadów błonkoskrzydłych (IVA) jest swoista immunoterapia (VIT) z jadem odpowiedniego owada. Metaanaliza badań nad skutecznością, bezpieczeństwem i efektywnością leczenia wykazała zdecydowaną korzyść leczenia chorych i zmniejszenia ryzyka zagrażającej życiu anafilaksji, które w przeciwieństwie do chorych bez rozpoznanej mastocytozy, nie uległy zmniejszeniu z czasem [48,101]. Mechanizm zwiększenia ryzyka IVA w SM, w porównaniu z populacją ogólną nie jest całkowicie poznany. Wprowadzenie testu aktywacji bazofilów oraz testu uwolnienia histaminy z bazofilów do procedur diagnostycznych alergii na jady owadów u chorych na SM pozwala wykryć sIgE w większości przypadków [93]. Nieimmunologiczne IVA stanowią rzadkość [52], chociaż sIgE oraz testy skórne są częściej ujemne niż w ogólnej populacji z IVA. Sugerowanym wyjaśnieniem tego zjawiska jest adsorpcja krążących sIgE na licznych komórkach tucznych skupionych w narządach [93]. Do anafilaksji dochodzić może także w wyniku

aktywacji komórek tucznych poprzez wewnątrzkomórkową kaskadę aktywacji kinaz tyrozynowych: Kit, Lyn, Syk oraz Fyn. Obecność mutacji genu KIT, szczególnie D816V wykrywanej u ponad 90% chorych z SM, powodującej wzmożoną aktywację mastocytów, nie koreluje z ciężkością ani rozpowszechnieniem anafilaksji [115]. Z ciężkością reakcji anafilaktycznej koreluje natomiast podwyższone stężenie tryptazy mastocytarnej (sBT), które jest wyznacznikiem zwiększonej liczby oraz aktywności komórek tucznych. Ponieważ IVA występuje u 30% chorych na SM, a wśród osób z IVA SM występuje od 1% do 2,6%, podwyższone sBT wskazuje na pośredni związek pomiędzy SM oraz IVA [11,123]. Około 10% do 15% chorych z IVA ma podwyższone sBT, niektórzy mają subtelne zmiany skórne o charakterze pokrzywki barwnikowej [7]. Mueller [94] zaleca ocenę sBT u wszystkich chorych z poużądleniowymi reakcjami uogólnionymi w wywiadzie, a także diagnostykę w kierunku SM u chorych z podwyższonym sBT powyżej 20 ng/ml. Z powodu opisanych przypadków zgonów chorych na mastocytozę po zakończeniu VIT, w tej grupie chorych zaleca się prowadzenie VIT przez całe życie [94,111]. Rutynowe oznaczenia sBT powinno być stosowane u wszystkich chorych leczonych z powodu alergii na jady owadów. Stwierdzenie podwyższonego stężenia tryptazy znacząco modyfikuje dalsze leczenie chorego (wydłużenie okresu leczenia, stosowanie dodatkowych środków zapobiegających działaniom niepożądanym). Diagnostykę w kierunku SM zwykle przeprowadza się wśród chorych z IVA z towarzyszącą pokrzywką barwnikową, mimo że istnieją doniesienia wskazujące na nieobecność zmian skórnych u 76% przypadków ze współistnieniem IVA oraz SM [32]. Chorzy z poużądleniową anafilaksją w wywiadzie oraz negatywnymi wynikami badań w kierunku alergii na jady owadów mogą chorować na mastocytozę lub zespół monoklonalnej aktywacji komórek tucznych [71]. U tych osób wskazana jest diagnostyka w kierunku mastocytozy niezależnie od sBT czy obecności zmian skórnych. W badaniu Bonadonny i wsp. [11] u wszystkich chorych z poużądleniową anafilaksją nie-IgE zależną sBT było podwyższone i ostatecznie rozpoznano u nich MCAD. Badanie to potwierdza istnienie związku pomiędzy mastocytozą oraz poużądleniowymi reakcjami uogólnionymi u chorych pomimo negatywnych wyników badań w kierunku alergii na jady owadów. Ograniczeniem powyższego badania było to, iż diagnostykę w kierunku SM podejmowano tylko wówczas,

gdy stwierdzano podwyższone stężenie sBT (>11,4 ng/ml). Wyniki kolejnego badania porównującego częstość występowania poużądleniowych reakcji anafilaktycznych w odniesieniu do sBT oraz wyniki badań diagnostycznych w kierunku mastocytozy wśród chorych z podwyższonym sBT przedstawili Potier i wsp. [118]. Badanie przeprowadzono wśród 140 chorych z poużądleniowymi reakcjami anafilaktycznymi w wywiadzie. Podwyższone stężenie sBT stwierdzono u 23/140 (16,4%) osób, u których w trakcie anafilaksji skóra była mniej zajęta, częściej występowało zaczerwienienie się a przebieg samych reakcji był cięższy w porównaniu z grupą osób z prawidłowym stężeniem sBT. Mastocytozę rozpoznano u 7 osób. Wśród nich 5 osób w przeszłości było diagnozowanych w kierunku SM, ale nie ustalono ostatecznego rozpoznania. Wyniki te ukazują szczególny obraz kliniczny poużądleniowej reakcji anafilaktycznej u osób z podwyższonym stężeniem sBT, charakteryzujący się większą ciężkością, częstszymi epizodami zaczerwienienia oraz rzadziej występującą pokrzywką. W badaniu tym autorzy przedstawiają potrzebę wyodrębnienia grupy chorych z podwyższonym sBT, u których istnieje ryzyko mastocytozy. Pomiar sBT jest wskazany u wszystkich osób z poużądleniową reakcją anafilaktyczną, a obserwacja w kierunku mastocytozy - u chorych z ciężką reakcją anafilaktyczną, z zaczerwienieniem, bez pokrzywki barwnikowej [118].

W mastocytozie układowej zwykle reakcje anafilaktyczne po użądleniach przez owady błonkoskrzydłe są ciężkie, przeważnie przebiegają z zajęciem układu sercowo-naczyniowego. Choroby układu krążenia oraz terapia  $\beta$ -adrenolitykami są czynnikami rokowniczo niekorzystnymi. Mastocyty obecne są w sercu i naczyniach wieńcowych, a ich liczba/gęstość wzrasta w chorobie wieńcowej [84]. Ich mediatory wykazują efekt kardi toksyczny działając wazokonstrykcyjnie, inotropowo ujemnie oraz proarytmogennie. U chorych z anafilaksją istniejące choroby układu sercowo-naczyniowego, mastocytoza oraz podwyższone stężenie sBT są czynnikami ryzyka ciężkich, nawet śmiertelnych reakcji anafilaktycznych lub następstw zawału mięśnia sercowego lub udaru mózgu. Leki  $\beta$ -adrenolityczne czy inhibitory ACE mogą pogarszać przebieg reakcji anafilaktycznej oraz zmniejszać efekty postępowania terapeutycznego we wstrząsie anafilaktycznym. Jednakże z powodu ich wartości w terapii chorób

sercowo-naczyniowych, które występują znacznie częściej niż anafilaksja, ich odstawienie powinno być poprzedzone rzetelną oceną względnego ryzyka następstw każdej z chorób [94].

Warto wspomnieć, że problem kliniczny stanowi anafilaksja idiopatyczna. Jej przyczyn nie udaje się wyjaśnić nawet u dwóch trzecich chorych z reakcją anafilaktyczną w wywiadzie, a terapia profilaktyczna jest zwykle nieskuteczna. Ponieważ idiopatyczna hipotensja typowa jest dla mastocytozy, Akin i wsp. [5] u osób z nawracającymi reakcjami anafilaktycznymi w wywiadzie oraz u osób podejrzewanych o mastocytozę poszerzyli diagnostykę o badania dodatkowe w kierunku klonalnego rozrostu mastocytów. Określali w tej grupie chorych występowanie markerów klonalnego rozrostu mastocytów oraz wskazali osoby mogące odnieść korzyść z leczenia celowanego inhibitorami KIT. Wśród chorych włączonych do badania u części potwierdzili mastocytozę skórną lub układową (36/72 osoby) mimo, że chorzy ci nie mieli epizodów hipotensji w przeszłości. Badanie w kierunku mutacji D816 genu KIT wykonano u 2/3 z tych osób, potwierdzając jej obecność u 82% badanych. Opisano 12 chorych na anafilaksję idiopatyczną, którzy nie mieli zmian skórnych typu pokrzywki barwnikowej ani charakterystycznych wieloogniskowych nacieków mastocytów w trepanobiopsie szpiku kostnego. U 5 z nich potwierdzono co najmniej 1 kryterium mniejsze dla mastocytozy. Mutacja D816V genu KIT została stwierdzona u 3 osób z potwierdzonym immunofenotypem CD25+ w szpiku kostnym. Powyższe wyniki potwierdzają obecność populacji atypowych mastocytów z markerami klonalności w podgrupie chorych z niewyjaśnionymi epizodami anafilaksji. Tacy chorzy mogą odnieść korzyść z leczenia celowanego inhibitorami KIT [5].

Chociaż częstość reakcji anafilaktycznych (IgE zależnych oraz IgE niezależnych) u chorych na mastocytozę jest znacząco wyższa niż w ogólnej populacji, nie dotyczy to atopii [16]. De Olano i wsp. [32] określili częstość występowania chorób alergicznych w populacji 210 chorych z CM lub SM na 23,9% (na podstawie wywiadu, testów skórnych oraz sIgE). U 36 występowały objawy anafilaksji w wywiadzie, w tym u 9 osób potwierdzono mechanizm IgE zależny. Ponadto wyniki pracy potwierdzają pogląd, że zwykle całkowite stężenie IgE w mastocytozie jest obniżone - najpewniej z powodu związania z



powierzchnią zwiększonej liczby mastocytów [95], a objawy anafilaksji są wynikiem uwolnienia mediatorów komórek tucznych. Rozpoznanie choroby nie jest trudne przy obecności pokrzywki barwnikowej lub CM. Coraz częściej mastocytoza rozpoznawana jest w przypadku nawracających reakcji anafilaktycznych, u chorych bez zmian skórnych z minimalnymi zmianami w szpiku kostnym, a spełniających trzy małe kryteria mastocytozy [132]. Zdarza się, że choroba przez długi czas nie jest rozpoznana, ponieważ jej objawy są podobne do tych występujących w chorobach alergicznych, reakcjach pseudoalergicznym, chorobach żołądkowo-jelitowych, zapaleniu naczyń, chorobach endokrynologicznych oraz anafilaksji idiopatycznej [50]. Przy podejrzeniu mastocytozy powinno się oznaczyć stężenie sBT w surowicy [4]. Powszechnie zaakceptowano górną granicę normy - punkt odcięcia dla sBT na 11,4 ng/ml, a sBT większe niż 20 ng/ml jest kryterium małym SM [127] mimo, że podwyższone stężenie sBT nie jest patognomoniczne dla tej choroby.

Podwyższone stężenie sBT można stwierdzić także w chorobach mieloproliferacyjnych, w przewlekłej białaczce eozynofilowej związanej z występowaniem mutacji FIP1L1/PDGFRA, jak również w schyłkowej niewydolności nerek, zatorze płynem owodniowym, ortostatycznej tachykardii [127]. Co więcej, zwiększona liczba atypowych mastocytów w tkankach występuje także w reaktywnej hiperplazji w wielu chorobach zapalnych oraz nowotworowych [50].

### *1.7. Leczenie mastocytozy*

Nie ma przyczynowych metod leczenia chorych na mastocytozę. U chorych z obecnością objawów aktywacji i uwolnienia mediatorów mastocytów stosuje się terapię objawową składającą się z następujących elementów: 1) edukacja chorych i ich opiekunów, 2) unikanie czynników wywołujących objawy choroby, 3) leczenie nagłych objawów związanych z uwolnieniem mediatorów, 4) leczenie objawów przewlekłych związanych z degranulacją mastocytów oraz 5) leczenie cytoredukcyjne w przypadku zajęcia narządów wewnętrznych [138]. Podstawą postępowania profilaktycznego jest edukacja chorego. Zaleca się informowanie pacjenta o czynnikach mogących powodować masywne uwalnianie histaminy oraz nasilać reakcje skórne, jak: ekspozycja na nagłe

zmiany temperatury otoczenia, użądlenia owadów błonkoskrzydłych, niektóre leki (morfina, kodeina, polimyksyna B, dekstran, kwas acetylosalicylowy i inne niesteroidowe leki przeciwzapalne, leki zwiotczające mięśnie, sympatykomimetyki, radiologiczne środki kontrastowe), spożycie alkoholu i niektórych polipeptydów zawartych w pożywieniu (homary, kraby, niektóre ryby), podrażnienia mechaniczne, zakażenia bakteryjne, wysiłek fizyczny oraz stres [138].

Zgodnie z zaleceniami EAACI u wszystkich chorych na mastocytozę zaleca się profilaktyczne stosowanie antagonistów receptorów histaminowych H1 (np. cetyryzyna) i H2 (np. ranitydyna) [138]. Łączne stosowanie antagonistów receptorów H1 i H2 ma także znaczenie w profilaktyce wystąpienia choroby wrzodowej oraz łagodzeniu objawów żołądkowo-jelitowych. W przypadku utrzymujących się objawów ze strony przewodu pokarmowego wskazane jest zastosowanie antagonistów receptorów H2, inhibitorów pompy protonowej lub doustnego kromoglikanu sodowego. Przy nieskuteczności leczenia objawowego "pierwszej linii" stosuje się stabilizatory błon komórkowych mastocytów (kromoglikan sodowy, ketotifen) oraz leki antyleukotrienowe (montelukast). Glikokortykosteroidy włącza się u pacjentów z nawracającymi epizodami hipotensji, obecnością puchliny brzusznej czy utrzymującymi się biegunkami i zespołem złego wchłaniania [74]. Wszyscy chorzy z układowymi ciężkimi reakcjami wywołanymi uwolnieniem mediatorów mastocytów powinni być wyposażeni w co najmniej 2 ampułkostrzykawkę z adrenaliną i używać ich zgodnie ze wskazaniem w razie wystąpienia reakcji anafilaktycznej [138]. Ponadto powinni być stale wyposażeni w indywidualny zestaw ratunkowy w skład którego, poza adrenaliną, wchodzi leki przeciwhistaminowe w dawce 30 mg (np. cetyryzyna) oraz prednizon w dawce 100 mg. Znieczulenie ogólne jest procedurą podwyższonego ryzyka wystąpienia reakcji anafilaktycznej, dlatego zaleca się premedykację przed zabiegiem [18]. U chorych z zagrażającymi życiu reakcjami anafilaktycznymi IgE-zależnymi zalecana jest immunoterapia swoista. Ryzyko leczenia powinno być oszacowane w odniesieniu do możliwych reakcji niepożądanych. Nie zaleca się prowadzenia immunoterapii swoistej bez potwierdzenia obecności sIgE [52]. U chorych z alergią na jady owadów błonkoskrzydłych wskazana jest swoista immunoterapia, która z powodu

podwyższonego ryzyka wystąpienia fatalnej anafilaksji po zaprzestaniu leczenia, prowadzona jest przez całe życie [18]. Z uwagi na doniesienia o zakończonych zgonem poużądleniowych reakcjach anafilaktycznych [111,120], nawet bez poprzedzających objawów alergii na jady owadów, niektórzy autorzy sugerują leczenie profilaktyczne wszystkich chorych na mastocytozę [123]. Ponieważ statystycznie mniej niż połowa chorych na mastocytozę będzie miała poużądleniową anafilaksję w ciągu całego życia ta strategia leczenia profilaktycznego stanowiłaby niepotrzebne obciążenie zbyt dużej grupy pacjentów. W związku z tym kluczową sprawą jest określenie, którzy chorzy mają podwyższone ryzyko wystąpienia anafilaksji. Jak dotąd nie można tego ryzyka ocenić.

Istnieją doniesienia o skuteczności leczenia omalizumabem (anty-IgE) wybranych pacjentów z anafilaksją idiopatyczną oraz anafilaksją podczas kursu wstępnego immunoterapii swoistej [70,117]. Nie zaleca się stosowania leków cytoredukcyjnych u chorych, u których występują wyłącznie reakcje anafilaktyczne i inne objawy zależne od uwolnienia mediatorów komórek tucznych [138]. Leki cytoredukcyjne (IFN- $\alpha$ , kladribina, cytarabina, fludarabina, hydroksymocznik) wskazane są w leczeniu agresywnej mastocytozy układowej i białaczki mastocytarnej [46,74].

Nową strategią terapeutyczną stanowi terapia celowana. Obecnie trwają intensywne prace nad wprowadzeniem inhibitorów kinazy tyrozynowej: imatinib, dasatinib, masitinib, bafetinib, midostaurin. Okazuje się, że imatinib, masitinib oraz bafetinib nie są zdolne do blokowania aktywności kinazy KIT D816V, podczas gdy midostaurin i dasatinib wykazują pewną aktywność hamującą kinazę KIT D816V [46,74,86]. Niestety dasatinib wykazał niezadowalające efekty w badaniach klinicznych oraz poważne działania niepożądane. Kolejne leki celowane: midostaurin, masitinib i bafetinib są nadal w sferze badań klinicznych [18]. Leki celowane mogą być stosowane pojedynczo, w kombinacjach inhibitora KIT z inhibitorem kinazy niezależnej od KIT, a także w połączeniu z chemioterapią [74]. Wprowadzenie leków działających w sposób celowany daje nadzieję na uzyskanie stabilnej długotrwałej remisji [18].

Odpowiedź na leczenie określana jest na podstawie analizy objawów, dokumentacji poszczególnych epizodów oraz zaznaczanie częstości ich występowania. W celu obiektywnej oceny efektów zastosowanej terapii zaleca się ocenę za pomocą kryteriów odpowiedzi na leczenie [138]. Stworzoną do tego celu klasyfikację przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Klasyfikacja odpowiedzi na leczenie objawów związanych z aktywacją mastocytów [138].

Odpowiedź na leczenie	Definicja
Całkowita remisja	Wszystkie objawy ustąpiły, brak nawrotu przez 12 miesięcy po zakończeniu leczenia
Trwająca całkowita remisja	Brak nawrotu przez kolejne 2 lata
Znaczna remisja	Zmniejszenie częstości występowania o >50% i/lub znaczące zmniejszenie częstości występowania objawów
Częściowa remisja	Zmniejszenie ciężkości lub zmniejszenie częstości występowania objawów o 10-50%
Brak remisji	Zmniejszenie ciężkości o <10% i brak zmniejszenia częstości występowania objawów

### 1.8. Rokowanie

U większości dzieci chorujących na mastocytozę skóry dochodzi do całkowitego lub częściowego ustępowania zmian skórnych przed okresem dojrzewania, w trakcie lub nieco później. Zdarza się jednak, że zmiany skórne utrzymują się i wówczas najczęściej dochodzi do rozwoju SM [54,74,138,155]. U chorych, u których zmiany skórne pojawiły się w życiu dorosłym choroba ma zwykle stabilny przebieg lub następuje jej stopniowa progresja. U większości z nich choroba przechodzi w postać układową [138]. Tylko w nielicznych przypadkach nasilenie zmian skórnych może się zmniejszać lub może dojść do całkowitego ich ustąpienia. U tych chorych należy rozważyć możliwość progresji choroby do agresywnej mastocytozy układowej [138,155]. U pacjentów z najcięższymi postaciami mastocytozy: ASM i MCL, z reguły nie stwierdza się zmian skórnych. Występowanie zmian skórnych dotyczy przede wszystkim chorych na

łagodnie postaci mastocytozy. Wobec tego zajęcie skóry można uważać za pomyślny czynnik rokowniczy [54,138,155].

Przebieg kliniczny mastocytozy układowej uzależniony jest od wieku chorego, postaci choroby, zajętych narządów, współistniejących chorób oraz obecności mutacji genetycznych warunkujących odpowiedź na leczenie. Najczęściej występująca u osób dorosłych - mastocytoza układowa o powolnym przebiegu, jest chorobą łagodną, z reguły dobrze rokującą i nie wpływającą na długość życia [138]. Problem stanowią zagrażające życiu reakcje anafilaktyczne mogące wystąpić u każdego chorego. Mimo że w ISM ryzyko wystąpienia ciężkich reakcji anafilaktycznych pod wpływem przeróżnych bodźców jest wysokie, anafilaksja nie występuje u wszystkich chorych. Niestety dotychczas nie jest znana metoda pozwalająca wyróżnić tych chorych ani oszacować indywidualne ryzyko wystąpienia anafilaksji. Rokowanie u chorych na mastocytozę z klonalnym rozrostem linii komórkowych niemastocytarnych zależy od współistniejącej choroby szpiku. Rokowanie w ASM jest zróżnicowane w zależności od obecności genu c-kit: postać bez genu c-kit dobrze reaguje na leczenie i przebiega łagodnie, w pozostałych przypadkach następuje progresja choroby i zgon w ciągu 12-24 miesięcy. Złe rokowanie mają chorzy na MCL. U większości z nich przebieg choroby jest gwałtowny z postępującą niewydolnością wątroby, szpiku kostnego i innych narządów, a do zgonu zwykle dochodzi w ciągu roku od rozpoznania [114].

### *1.9. nierozwiązane problemy w mastocytozie*

Rozpoznanie mastocytozy często jest utrudnione i znacząco opóźnione z powodu zarówno jej zmiennego przebiegu, nietypowego obrazu klinicznego jak i skomplikowanych inwazyjnych procedur diagnostycznych. Obowiązującą procedurą niezbędną do ustalenia rozpoznania jest trepanobiopsja szpiku kostnego z talerza kości biodrowej. Chociaż procedura nie jest skomplikowana ani niebezpieczna dla pacjenta, to możliwe są rzadkie powikłania: złamanie igły biopsyjnej, przedłużające się krwawienie, krwotok zagrażający życiu oraz zakażenie wirusami hepatotropowymi (HBV, HCV) [89]. Obecnie trwają prace nad znalezieniem mniej inwazyjnej procedury diagnostycznej. Nadzieję dają badania ekspresji genów w komórkach krwi obwodowej. Niedośzytko i wsp.

[104] przedstawili różnice w ekspresji profili genetycznych komórek krwi obwodowej chorych na ISM w porównaniu do osób zdrowych i określili profil genetyczny zawierający znaczące i znamienne różnice w ekspresji transkryptów 29 genów występujący u chorych z ISM. Warte uwagi jest to, że różnice w ekspresji genów wykazano w innych niż mastocyty komórkach krwi obwodowej. Potwierdzili, że efekty specyficznych mutacji KIT występujących w mastocytozie mogą być wykrywalne także w innych liniach komórkowych niż mastocyty. Ponadto wykazali znaczące różnice w ekspresji genów wśród chorych na ISM z reakcjami anafilaktycznymi w porównaniu do chorych z ISM bez anafilaksji w wywiadzie [100]. Autorzy sugerują, że należałoby potwierdzić te wyniki w niezależnej grupie chorych na ISM. W kolejnych badaniach klinicznych należałoby ocenić czy analiza profilu genetycznego będzie mogła znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej: w rozpoznaniu mastocytozy i określeniu jej postaci klinicznej, ocenie ryzyka anafilaksji u chorych na mastocytozę, a także w ocenie ryzyka progresji choroby. W związku z tym że statystycznie 30% chorych na mastocytozę [7,124] będzie miało poużądleniową anafilaksję, kluczową sprawą jest określenie, którzy chorzy mają podwyższone ryzyko wystąpienia anafilaksji. Niestety obecnie nie można przewidzieć, których chorych to dotyczy ani oszacować jej ryzyka.

Badania ekspresji genów u chorych leczonych z powodu alergii na jady owadów oraz u chorych na mastocytozę układową (u 30% występowała anafilaksja po użądleniu przez owada) dają nadzieje na stworzenie nowego narzędzia diagnostycznego pomocnego w leczeniu w/w chorób. Dzięki badaniu ekspresji genów będzie można określić efektywność stosowanej immunoterapii oraz przewidzieć zagrożenie reakcją anafilaktyczną u chorych na mastocytozę [99].

## *2. Cele pracy.*

1. Ocena ekspresji wybranych genów za pomocą techniki RT-PCR (z zastosowaniem kart mikrocieczowych) we krwi obwodowej u chorych na mastocytozę w zależności od stadium choroby: CM, ISM, SSM oraz ASM w porównaniu do osób zdrowych.
2. Ekspresja genów u chorych na mastocytozę z współistniejącą alergią na jady owadów oraz u chorych bez reakcji anafilaktycznych w wywiadzie.
3. Porównanie ekspresji genów we krwi obwodowej oraz we krwi szpikowej.
4. Analiza czynników wywołujących oraz określenie czynników ryzyka wystąpienia reakcji anafilaktycznych w badanej grupie chorych.

### 3. Materiał i metody

#### 3.1. Opis grupy badanej:

Do badania zostało włączonych 152 chorych na mastocytozę (106 kobiet, 46 mężczyzn, w wieku od 18 do 78 lat) leczonych w Klinice Alergologii GUMed w ramach the Polish Center of Excellence of the European Competence Network on Mastocytosis (ECNM) w latach 2004 - 2011. Rozpoznanie choroby zostało przeprowadzone zgodnie z zaleceniami WHO i European Competence Network on Mastocytosis na podstawie badania szpiku kostnego: histopatologicznego, immunofenotypizacji – określenia występowania antygenów CD2 oraz CD25, cytologii, oceny w kierunku mutacji KIT, a także określenia stężenia tryptazy mastocytarnej w surowicy.

#### 3.2. Kryteria włączenia i wyłączenia:

Kryterium włączenia do badania stanowiło rozpoznanie mastocytozy układowej lub skórnej.

Kryterium wyłączenia: ciąża, niewydolność wątroby, nerek, serca, niewydolność oddechowa.

Na badanie została wydana zgoda Niezależnej Komisji Bioetycznej przy GUMed nr NKEBN/151/2010. Osoby biorące udział w badaniu podpisały dobrowolną świadomą zgodę.

W badanej grupie wyłoniono 57 chorych spełniających kryteria włączenia i nie spełniających kryteriów wyłączenia z badania (42 kobiety, 15 mężczyzn, w wieku od 18 do 77 lat, średnia wieku 41,8 lat) leczonych w Klinice Alergologii GUMed w latach 2010 - 2011, u których przeprowadzono badanie ekspresji wybranych genów za pomocą techniki RT-PCR (z zastosowaniem kart mikrocieczowych).

Dodatkowo u 7 chorych (5 kobiet, 2 mężczyzn, w wieku od 32 do 44 lat, średnia wieku 36 lat) leczonych w Klinice Alergologii GUMed w latach 2012-2013 podczas rutynowej trepanobiopsji szpiku kostnego wykonywanej w czasie diagnostyki w kierunku mastocytozy układowej dodatkowo pobrano krew szpikową celem oceny ekspresji genów za pomocą techniki *whole genome*



*expression analysis.*

### *3.3. Opis grupy kontrolnej badania ekspresji genów za pomocą kart mikrocieczowych:*

Grupę kontrolną stanowi 19 zdrowych ochotników (14 kobiet, 5 mężczyzn, w wieku od 21 do 50 lat, średnia wieku 34 lata) bez reakcji anafilaktycznych w wywiadzie rekrutowanych wśród osób zgłaszających się do badania w ramach medycyny pracy.

### *3.4. Opis procedur wykonanych u chorych:*

W celu rozpoznania mastocytozy wykonywano w znieczuleniu miejscowym (znieczulenie nasiękowe z użyciem 2-4 ml 1% roztworu lignokainy) rutynową trepanobiopsję szpiku kostnego z kolca biodrowego górnego tylnego. Pobierano trepanobiopsję długości od 1 do 2 cm oraz około 5 ml krwi szpikowej do próbki z antykoagulantem. Badanie histopatologiczne trepanobiopsji wykonano w Zakładzie Patomorfologii GUMed. Badania immunofenotypizację i cytologię wykonano za pomocą cytometru w Klinice Hematologii i Transplantologii GUMed. Badanie genetyczne w kierunku mutacji D816V genu KIT wykonano w Zakładzie Biologii i Genetyki GUMed.

Stężenie tryptazy mastocytarnej w surowicy określano za pomocą testu fluoroimmunoenzymatycznego (ImmunoCAP Tryptase, Uppsala Sweden) w Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii GUMed. Zgodnie z zaleceniami WHO mastocytozę układową (SM) rozpoznawano, gdy było spełnione 1 większe oraz 1 mniejsze bądź 3 mniejsze kryteria rozpoznania. U pacjentów, którzy nie mieli zmian skórnych a zgłaszali występowanie anafilaksji w wywiadzie, którzy spełniali tylko 1 lub 2 kryteria mniejsze (poza podwyższonym stężeniem tryptazy mastocytarnej) rozpoznawano monoklonalny zespół aktywacji mastocytów (MCAS). W celu różnicowania podtypów SM oceniano występowanie objawów układowych spowodowanych naciekiem organów lub tkanek przez mastocyty.

W celu potwierdzenia mastocytozy skóry konsultowano chorych dermatologicznie w Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii GUMed. Dokonywano oceny występowania objawów zajęcia skóry; pokrzywki barwnikowej, objawu Darier'a wraz z biopsją zmienionej skóry oraz oceniano

zakres i intensywność zajęcia skóry za pomocą indeksu SCORMA.

Podczas badania podmiotowego chorzy byli pytani o występowanie reakcji anafilaktycznych w wywiadzie. Anafilaksję definiowano jako nagle występującą, ciężką, zagrażającą życiu reakcję ogólną lub systemową zgodnie z definicją EAACI [63]. Ciężkość reakcji anafilaktycznej oceniono przy użyciu skali Ringa i Messmera [121]. Jako stopień I reakcji anafilaktycznej oceniano łagodną reakcję anafilaktyczną z objawami ze strony skóry i błon śluzowych (rumień, świąd, pokrzywka, obrzęk naczynioruchowy). Stopień II charakteryzował się występowaniem objawów ze strony skóry i błon śluzowych, układu sercowo-naczyniowego (tachykardia, hipotensja,  $>20$  mmHg), układu oddechowego (nieżyt nosa, chrypka, duszność) lub układu pokarmowego (nudności, kurczowe bóle brzucha, biegunka). Na obraz III stopnia reakcji anafilaktycznej składał się bronchospazm, utrata przytomności, wstrząs, sinica. IV stopień to zatrzymanie akcji serca lub oddechu. Ze względu na patomechanizm reakcje anafilaktyczne podzielono na nieimmunologiczne oraz immunologiczne, a te na IgE-zależne oraz zależne od innych mechanizmów immunologicznych. Alergię potwierdzano za pomocą punktowych testów skórnych i/lub oceny stężenia sIgE w surowicy. Diagnostykę w kierunku alergii na jady owadów błonkoskrzydłych przeprowadzano u chorych z reakcją anafilaktyczną po użądleniu przez owada w wywiadzie. Alergię na jady owadów błonkoskrzydłych rozpoznawano na podstawie oceny sIgE oraz punktowych i śródskórnych testów skórnych z jadami owadów zgodnie z wytycznymi EAACI. Nadwrażliwość na leki (niesteroidowe leki przeciwzapalne, antybiotyki, leki znieczulające miejscowo) rozpoznawano za pomocą punktowych i/lub śródskórnych testów skórnych oraz za pomocą próby prowokacji (DPT) podczas pobytu w Klinice Alergologii GUMed u wybranych chorych. DPT oceniano klinicznie i spirometrycznie. Prowokację oceniano jako dodatnią, gdy u chorego wystąpiły objawy wcześniej zgłaszane lub obiektywne objawy reakcji alergicznej jak pokrzywka lub spadek FEV1 o co najmniej 20% w spirometrii. Procedury wykonywano zgodnie z zaleceniami EAACI/ENDA.

### *3.4.1. Pobranie materiału oraz przeprowadzenie badań genetycznych*

W celu oceny ekspresji genów za pomocą kart mikrocieczowych pobrano krew obwodową przy użyciu probówek Tempus Blood RNA Tube firmy Applied Biosystems® w objętości 3 ml.

Po pobraniu krwi obwodowej energicznie wstrząsano probówką przez 20 sekund celem dokładnego wymieszania jej z zawartym odczynnikiem stabilizującym, dzięki któremu komórki krwi ulegają natychmiastowej lizie z następującą izolacją i stabilizacją RNA. Odczynnik stabilizujący inaktywuje RNAzy komórkowe i selektywnie wytrąca RNA, natomiast DNA genomowy pozostaje w roztworze. Następnie próbki były przechowywane w pozycji pionowej przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie materiał był zamrażany w  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Materiał przechowywany był maksymalnie 6 miesięcy do czasu izolacji RNA. Procedurę wykonywano zgodnie z zaleceniami producenta probówek, Applied Biosystems®. Procedurę wykonywano w Klinice Alergologii GUMed.

Izolację RNA z krwi obwodowej, następnie odwrotną transkrypcję PCR oraz badanie ekspresji wybranych genów przeprowadzono w Katedrze Medycyny Sądowej GUMed. Izolację RNA z komórek krwi obwodowej wykonano zestawem Tempus™ Spin RNA Isolation Kit (Ambion®). W temperaturze pokojowej rozmrożono materiał. Następnie zwirowano oraz przeniesiono zawartość probówek do 50 mL tub, rozcieńczono PBS i energicznie zwirowano przez co najmniej 30 sekund, uważając, aby lizat przemieszczał się do góry w rurze. Kolejnym etapem izolacji RNA było wirowanie w wirówce w temperaturze  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  w  $3000\times g$  (RCF) przez 30 minut. Następnie ostrożnie zlano supernatant; na dnie pozostał osad RNA, który przeniesiono ponownie do filtra oczyszczającego. Następnie osad oczyszczano i eluowano RNA stosując mikrowirówkę. Jakość oraz ilość wyizolowanego RNA określono za pomocą spektrofotometru NanoDrop. Ponadto określono walidację RNA, czyli pomiar koncentracji oraz jakości RNA, w tym RNA Integrity Number (RIN), za pomocą Bioanalyzer (Bioanalyzer, Bio-RAD) w Pracowni Genomiki Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Tylko próbki z RNA integrity number  $\text{RIN} > 7.5$  zakwalifikowano do dalszego etapu badania. Uzyskany roztwór RNA

zamrożono i przechowywano w temperaturze  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez maksymalnie 12 miesięcy.

Odwrotną transkrypcję wykonano zestawem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits RNase Inhibitor (Invitrogen™) umożliwiającym przeprowadzenie konwersji ilościowej 2  $\mu\text{g}$  całkowitego RNA w wyjątkowo wysokiej jakości jednoniciowy cDNA (w 20  $\mu\text{L}$  mieszaniny reakcyjnej). Zestaw umożliwia przeprowadzenie odwrotnej transkrypcji z ilości od 0,02 do 2 mg całkowitego RNA. Reakcje skalowano do 100  $\mu\text{L}$  do generowania 10 ng cDNA z jednej reakcji. Wg zaleceń producenta zestawu celem optymalnego przeprowadzenia reakcji należy stosować RNA wolne od RNAaz, inhibitorów odwrotnej transkrypcji i PCR, rozpuszczone w PCR kompatybilnym roztworze. W celu wyeliminowania aktywności RNAaz stosowano RNase Inhibitor podczas końcowego etapu odwrotnej transkrypcji. Zamrożone próbki RNA rozmrażano i przechowywano na lodzie w trakcie całej procedury. Do przeprowadzenia reakcji zastosowano RNA w ilości 100 ng w stężeniu 10ng/ $\mu\text{L}$ . Następnie przygotowano na lodzie roztwory 2xRT Master Mix na 20  $\mu\text{L}$  objętości mieszaniny reakcyjnej i dokładnie zwirowano wg protokołu. Przygotowano RT-PCR wg protokołu: do każdego stripa podano pipetą 10  $\mu\text{L}$  2xRT Master Mix, następnie pipetą podano 10  $\mu\text{L}$  RNA i dwukrotnie zmieszano roztwór w pipiecie, zamknięto szczelnie stripy, krótko zwirowano aby uzyskać materiał na dnie stripów i wyeliminować pęcherzyki powietrza. Następnie umieszczono materiał reakcyjny w termocyklerze i zaprogramowano przeprowadzenie RT-PCR wg ustawień zalecanych w protokole: objętość reakcji 20  $\mu\text{L}$ , krok I: 10 minut w temperaturze  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , krok II: 120 minut w  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , krok III: 5 minut w  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  i krok IV:  $\infty$  w  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Następnie materiał zamrożono i przechowywano w  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez okres od 2 do 8 miesięcy.

Ekspresję genów zbadano za pomocą metody MFC RT PCR zestawem TaqMan® Array Micro Fluidic Cards firmy Applied Biosystems. Do zestawu należą karty 384-dołkowe z preinstalowanym testami ekspresji wybranych genów. Karty TaqMan Array pozwalają mierzyć ekspresję genów przy użyciu metody względnie ilościowej, porównawczej CT ( $\Delta\Delta\text{CT}$ ). Na jednej karcie umieszczano 8 próbek. W każdej studzience karty TaqMan Array obecny jest pojedynczy zestaw starter/sonda. Tylko jeden cel może być powielony w dołku.

W trakcie badania łączono próbkę cDNA z TaqMan® master mix, a następnie podawano pipetą otrzymaną mieszaninę reakcyjną i umieszczano płytkę w 7900HT Fast Real-Time PCR System z zainstalowanym TaqMan® Array Micro Fluidic Card Thermal Cycling Block. W trakcie PCR następowała amplifikacja docelowych genów w czasie rzeczywistym, a następnie określenie względnego poziomu ekspresji genu. Przygotowano mieszaninę reakcyjną na 1 próbkę składającą się z 45 µl wody wolnej od RNAaz (Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated) Ambion®), 5 µl cDNA oraz 50 µl TaqMan® Master Mix uzyskując 25 ng cDNA w mieszaninie. Następnie wypełniono pipetą 8 portów karty przygotowanymi mieszaninami reakcyjnymi. Następnie kartę zwirowano i uszczelniono uzyskując równomierne rozmieszczenie mieszanin reakcyjnych we wszystkich 384 dołkach. Po usunięciu paska z portami umieszczono płytkę w 7900HT Fast Real-Time PCR System z zainstalowanym TaqMan® Array Micro Fluidic Card Thermal Cycling Block. Zaprogramowano płytkę wykorzystując oprogramowanie SDS i przeprowadzono badanie RT PCR. Ten etap badania wykonano w Katedrze Medycyny Sądowej GUMed.

W celu oceny ekspresji genomu techniką whole genome expression pobrano krew obwodową za pomocą próbek PAXgene blood RNA tubes (Qiagen, USA) w objętości 2.5 ml oraz krew szpikową przy użyciu próbek PAXgene Bone Marrow RNA Tubes firmy Qiagen w objętości 2 ml podczas rutynowej trepanobiopsji szpiku kostnego wykonywanej celem diagnostyki w kierunku mastocytozy zgodnie z kryteriami WHO. Następnie materiał przekazano do Kliniki Alergologii Uniwersyteckiego Centrum Medycznego w Groningen w Holandii (UMCG).

Analizę whole genome expression we krwi obwodowej oraz we krwi szpikowej przeprowadzono w Klinice Alergologii Uniwersyteckiego Centrum Medycznego w Groningen w Holandii (UMCG). Izolację RNA z krwi szpikowej wykonano za pomocą zestawu PAXgene Bone Marrow RNA Kit CE (Qiagen, USA). Próbkę RNA przechowywano w temperaturze -80 °C do czasu znakowania i hybrydyzacji. Walidację RNA, czyli pomiar koncentracji oraz jakości RNA, w tym RNA Integrity Number (RIN), przeprowadzono za pomocą Bioanalyzer (2100 Bioanalyzer, Agilent, Amstelveen, the Netherlands) oraz RNA 600 Nano Kit. Do kolejnego etapu badania zakwalifikowano próbki z RIN > 7.5.

### 3.4.2. Analiza ekspresji genomu

Znakowanie i amplifikacja RNA wykonana została zestawem Illumina TotalPrep 96 RNA Amplification Kit (Applied Biosystems, Nieuwerkerk ad IJssel, The Netherlands). Do oznaczenia użyto 200 ng RNA z każdej próbki. Ludzkie tablice ekspresji całego genomu HT-12\_V3\_expression arrays (Illumina, San Diego, USA) opracowano zgodnie z zaleceniami producenta. Slajdy z wynikiem badania skanowano bezpośrednio po badaniu za pomocą Illumina BeadStation iScan (Illumina, USA).

### 3.4.3. Wybór genów do badania

W badaniu ekspresji genów [104] za pomocą techniki *whole genome expression analysis* stwierdzono różnice w ekspresji profilów genetycznych komórek krwi obwodowej chorych na ISM w porównaniu do osób zdrowych oraz określono profil genetyczny zawierający znaczące i znamienne różnice w ekspresji transkryptów 29 genów występujący u chorych z ISM. Ponadto wykazano znaczące różnice w ekspresji genów wśród chorych na ISM z reakcjami anafilaktycznymi w porównaniu do chorych z ISM bez anafilaksji w wywiadzie [100]. Na podstawie powyższych badań wybrano 15 genów celem walidacji ich ekspresji metodą kart mikrocieczowych w niezależnej grupie chorych. Symbole, nazwy oraz wzory transkryptów przedstawiono w poniższej tabeli 5.

Tabela 5. Symbole i wzory transkryptów wybranych genów.

	Symbol genu	Nazwa genu	Wzór transkryptu Applied Biosystems®
1	ABI3BP	abi gene family, member 3 (nesh) binding protein	<a href="#">Hs00227206_m1*</a>
2	ANKRD6	ankyrin repeat domain 6	<a href="#">Hs00208902_m1*</a>
3	B3GAT1	beta-1,3-glucuronyltransferase 1 (glucuronosyltransferase p)	<a href="#">Hs00218629_m1*</a>
4	CDC42B PA	cdc42 binding protein kinase alpha (dmpk-like)	<a href="#">Hs00177522_m1*</a>
5	DVL1	dishevelled, dsh homolog 1 (drosophila)	<a href="#">Hs00182896_m1*</a>

6	ITGAV	integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	Hs00233808_m1*
7	G0S2	g0/g1switch 2	<a href="#">Hs00274783_s1*</a>
8	HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, dr beta 1	<a href="#">Hs03027795_uH*</a>
9	JUP	junction plakoglobin	<a href="#">Hs00158408_m1*</a>
10	ITGB1	INTEGRIN BETA 1	<a href="#">Hs00559595_m1*</a>
11	MAP2K3	mitogen-activated protein kinase kinase 3	<a href="#">Hs00177127_m1*</a>
12	MLL3	MYELOID/LYMPHOID OR MIXED-LINEAGE LEUKEMIA 3	<a href="#">Hs01005521_m1*</a>
13	ZMAT3	zinc finger, matrin type 3	<a href="#">Hs00536976_m1*</a>
14	TNFRSF4	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	<a href="#">Hs00533968_m1*</a>
15	TRAF4	tnf receptor-associated factor 4	<a href="#">Hs00188755_m1*</a>
16	18s		Hs03003631_g1

#### 3.4.4. Krótka charakterystyka wybranych genów

ABI3BP - lokalizacja cytogenetyczna 3q12.2; gen dla białka wiążącego ABI3 (dawniej zwanego TARSH). Uważa się, że ABI3BP oddziałuje z domeną SH3 w ABI3 (*Abl-interactor member 3*). ABI3 wraz z czynnikami oddziałującymi z Abl: E3B1/Abi2/Argbp1 należą do rodziny cytoplazmatycznych adapterów molekularnych zawierających SH3, które oddziałują z rodziną kinaz tyrozynowych Abl. Spekuluje się, że czynniki oddziałujące na kinazy Abl wpływają negatywnie na wzrost komórek oraz ich transformację poprzez tłumienie sygnalizacji odpowiedniej kinazy. Nadekspresja rodziny tych kinaz związana jest z hamowaniem proliferacji, redukcją potencjalnej transformacji oraz supresją ruchliwości komórek, tym samym możliwości przerzutowania komórek nowotworowych. Sugeruje się, że czynniki oddziałujące na Abl mogą być czynnikami hamującymi rozwój guza. Dlatego przewiduje się, że jeśli dochodzi do połączenia ABI3BP z ABI3 w komórce następuje zablokowanie wzrostu. Potwierdzeniem tych przypuszczeń są doniesienia o znacznie

mniejszej ekspresji ABI3BP w raku płuca i innych nowotworach pierwotnych [77].

ANKRD6 - lokalizacja cytogenetyczna 6q15; produkt genu, nazywany też diwersyną, jest wszechobecnym białkiem związanym z etapem wczesnego rozwoju ontogenetycznego ssaków; u ludzi ulega silnej ekspresji w komórkach mózgu, rdzenia kręgowego i serca. Wykazano, że centralna domena mysiej diwersyny wchodzi w interakcje z ludzką kinazą kazeinową 1E (CSNK1E) oraz z C-końcową domeną konduktyny lub Axin1. Ponadto diwersyna i Gsk3- $\beta$  (GSK3B) występuje w potrójnych kompleksach z pełnometrażową dimeryczną konduktyną. Schwarz-Romond wykazał, że dimeryczna konduktyna może jednocześnie wiązać diwersynę i GSK3b, a monomeryczna konduktyna może wiązać albo diwersynę albo GSK3b. Ekspresja diwersyny w ludzkich embrionalnych komórkach nerek zwiększa degradację  $\beta$ -kateniny (CTNNB1) a degradację blokują inhibitory proteasomu [129].

B3GAT1 - lokalizacja cytogenetyczna 11q25; gen dla  $\beta$ 1,3-glukuronylotransferazy-1, kluczowego enzymu zaangażowanego w biosyntezie węglowodanowego epitopu HNK1 (*human natural killer-1*) znanego także jako CD 57. Jego działanie polega na dodaniu kwasu glukuronowego (GlcA) do reszty *N*-acetylolaktozaminowej (Lac) disacharydu tworząc HNK-1. Za pomocą mikroskopu immunoelektronowego przedstawiono epitop HNK-1 w komórkach ludzkiej siatkówki, zarówno w komórkach glejowych jak i nerwowych oraz fotoreceptorach. Tylko zewnętrzne segmenty pręcików i czopków oraz komórki śródbłonka naczyń włosowatych siatkówki nie zostały oznakowane. Uważa się, że epitop ten może brać udział w adhezji neuronów i gleju ludzkich komórek siatkówki [136]. Ponadto stwierdzono, że CD57+/CXCR5+ komórki T lokalizują się preferencyjnie w świetle strefy rozmnażania i są bardziej skuteczne w indukowaniu produkcji przeciwciał przez komórki B niż komórki CD57-/CXCR5+ komórki T zlokalizowane na obrzeżu pomiędzy strefą płaszcza a strefą rozmnażania [13].

CDC42BPA - lokalizacja cytogenetyczna 1q42.13. Białko kodowane przez ten gen należy do rodziny kinaz białkowych seryna / treonina. Kinaza ta zawiera wiele domen funkcjonalnych, w tym domenę kinazy bardzo podobną do kinazy



białkowej dystrofii miotonicznej (DMPK). Kinaza ta zawiera również domenę interaktywnego wiązania Rac (CRIB) i wiąże CDC42. Może ona działać jako efektor mediatora CDC42 w indukcji obwodowej formacji aktyny i promować reorganizację cytoszkieletu.

DVL1 - lokalizacja cytogenetyczna 1p36.33. Produkt genu jest fosfoproteiną regulującą wzrost oraz biorącą udział w procesach rozwojowych komórek nerwowych (w tym podziałach i rozwoju neuroblastów).

ITGAV - lokalizacja cytogenetyczna 2q32.1; gen dla alfa-V integryny nazywanej też receptorem witronektyny VNRA. Integryny należą do głównych receptorów adhezji i migracji oraz organizacji cytoszkieletu, proliferacji komórek, przeżycia i różnicowania. Integryny alfa-V zawierają wspólną podjednostkę alfa-V w połączeniu z 1 z 5 podjednostek beta (beta-1,-3, -5, -6, -8). Większość alfa-V integryn rozpoznaje sekwencję RGD różnych ligandów (witronektyny, fibronektyny, osteopontyny, sialoproteiny kości, trombospondyny, fibrynogenu, czynnika von Willebranda, tenascyny i agryny), oraz, w przypadku alfa-V-8, lamininy i kolagenu typu IV. Stąd integryny alfa-V biorą udział w wielu procesach rozwojowych i są celami terapeutycznymi do hamowania angiogenezy i osteoporozy.

G0S2 - lokalizacja cytogenetyczna 1q32.2. W badaniu ekspresji genów z ludzkich fibroblastów wykazano, że gen G0S2 jest indukowany w pierwotnych ludzkich komórkach przez działanie TNF- $\alpha$  w sposób zależny od NF-kB. Ponadto G0S2 indukuje apoptozę w liniach komórkowych ludzkiego raka i uwrażliwia komórki pierwotne na apoptozę. G0S2 indukuje apoptozę poprzez bezpośrednie oddziaływanie z Bcl-2 zapobiegając tworzeniu heterodimerów z Bax. Ponadto stwierdzono, że G0S2 jest epigenetycznie wyciszony w kilku liniach komórkowych ludzkiego raka, a w niedrobnokomórkowym raku płuca jego ekspresja jest znacznie obniżona. Proapoptotyczna aktywność G0S2 i jego epigenetyczne wyciszenie w liniach komórkowych komórek raka wskazują, że G0S2 jest genem supresorowym [153].

HLA-DRB4 - lokalizacja cytogenetyczna 6p21.32; produkt genu należy do białek HLA klasy II zawierających podjednostkę z łańcuchem  $\beta$ . Białko HLA klasy II poprzez przedstawianie peptydów pochodzących z białka

zewnątrzkomórkowego odgrywa kluczową rolę w układzie immunologicznym. Częsteczką klasy II jest wyrażana w komórkach prezentujących antygen (APC): limfocytach B, makrofagach, komórkach dendrytycznych. Łańcuch beta zawiera wszystkie polimorfizmy określające specyficzności wiązania peptydowego w cząsteczce DR. Określenie tych polimorfizmów jest rutynowo wykonywane przed transplantacją szpiku kostnego czy nerek. DRB1 ulega ekspresji na poziomie pięciokrotnie wyższym niż DRB3, DRB4 i DRB5. Obecność DRB4 jest połączona z wariantami alleli DRB1. Istnieją powiązane pseudogeny: DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 i DRB9.

JUP - lokalizacja cytogenetyczna 17q21.2; gen dla plakoglobiny, inaczej zwanej desmoplakiną III czy  $\gamma$ -kateniną. Plakoglobina związana jest z regionem cytoplazmatycznym desmogleiny I, jednego z desmosomalnych białek przezłonowych. Wchodzi też w skład kompleksu kadheryna-katenina. Kateniny pełnią ważną rolę w połączeniu kadheryn do filamentów aktyny i wchodzi w skład sieci białek przezłonowych. Kateniny biorą udział w adhezji komórek i szlaku sygnałowym Wnt. W związku z tym, że istnieje interakcja kompleksu katenina-kadheryna z EGFR oraz tym, że plakoglobina oraz  $\beta$ -katenina są substratami dla fosforylacji tyrozyny stymulującej EGF, a także tym, że kateniny są związane z białkiem supresorowym guza APC, sugeruje się, że kateniny uczestniczą w szlakach sygnałowych i tworzenie się guzów. Mutacje w białku supresorowym APC lub N-końcowym fragmencie  $\beta$ -kateniny stabilizują  $\beta$ -kateninę zwiększając jej zdolność do aktywacji transkrypcji TCF/LEF genów docelowych. Białko APC reguluje funkcje  $\beta$ - i  $\gamma$ -kateniny jako onkogenów. Ponadto  $\gamma$ -kateniny silnie aktywują ekspresję c-myc. Sugeruje się, że mutacje APC zmieniają regulację kateniny  $\beta$  i  $\gamma$ , stąd w raku jelita grubego stwierdza się znacznie więcej mutacji APC niż  $\beta$ -kateniny. Podwyższona ekspresja c-myc w nowotworach z defektem APC może prowadzić do zmian w regulacji  $\gamma$ - i  $\beta$ -katenin. Uważa się, że  $\gamma$ - i  $\beta$ -kateniny mogą mieć różne role w sygnalizacji Wnt oraz w nowotworach poprzez odmienny wpływ na geny docelowe [69].

ITGB1 - lokalizacja cytogenetyczna 10p11.22; gen dla  $\beta$ 1-integryny CD29 zaangażowanej w kancerogenezę, m. in. w raku płuca. Produkt genu należy do

rodziny integryn, receptorów błonowych w adhezji komórkowej i występujących w różnorodnych procesach, w tym w embriogenezie, hemostazie, odbudowie tkanek, odpowiedzi immunologicznej i przerzutach komórek nowotworowych.

MAP2K3 - mitogen-activated protein kinases 3, lokalizacja cytogenetyczna 17p11.2. Produkt tego genu należy do rodziny kinaz MAP, charakteryzuje się podwójną specyficznością. Kinaza ta jest aktywowana przez stres mitogeny i stres środowiska, a także uczestniczy w kaskadzie kinaz MAP. Dochodzi wówczas do fosforylacji i aktywacji MAPK14/p38-MAPK. Rezultatem aktywacji i akumulacji powyższej kinazy jest ekspresja onkogenu RAS prowadząca do konstytutywnej aktywacji MAPK14 i transformacji onkogennej komórek pierwotnych.

MLL3 - lokalizacja cytogenetyczna 7q36.1. Aktywowane komórki B z niedoborem komponentu PTIP kompleksu MLL3-MLL4 mają zaburzony proces trimetylacji histonu H3 i inicjacji transkrypcji łańcucha ciężkiego immunoglobuliny (Igh), co prowadzi do wadliwego przełączania klas immunoglobulin. Uważa się, że PTIP sprzyjają specyficzne zmiany chromatyny, które kontrolują dostęp do rekombinacji przełącznika klas, a kompleks MLL3-MLL4 ma wpływ na zmianę funkcji efektorowych przeciwciała [30].

ZMAT3 - lokalizacja cytogenetyczna 3q26.32. Gen koduje białko zbudowane z trzech domen zawierających cynk oraz mające sygnał lokalizacji jądrowej. MRNA i białko genu są regulowane przez p53 typu dzikiego i nadmierna ekspresja tego genu hamuje wzrost komórek nowotworowych. Stąd uważa się, że gen może odgrywać rolę w rozwoju szlaku regulacyjnego zależnego od p53. Istnieją dwie izoformy genu różniące się tylko jednym aminokwasem.

TNFRSF4 - lokalizacja cytogenetyczna 1p36.33. TNFRSF4 koduje białko transbłonowe należące do nadrodziny receptorów TNF. Białko TNFRSF4 jest cząsteczką kostymulującą zaangażowaną w długotrwałą odporność komórek T.

TRAF4 - lokalizacja cytogenetyczna 17q11-q12. Stwierdzono, że gen podlega nadekspresji w raku piersi. Koduje białko z charakterystyczną domeną N-końcową CART zlokalizowaną bardziej centralnie oraz C-końcową domeną

TRAF. CART1 znajduje się w jądrze i podlega ekspresji w komórkach nabłonka tylko w raku piersi oraz przerzutach. Stwierdzono, że CART1 wydaje się być zaangażowane w transdukcji sygnału TNF-zależnego w raku piersi [119].

### *3.5. Analiza ekspresji genów*

Wyniki badania ekspresji genów przedstawia się za pomocą programu SDS Software 2.2.1. zawierającego  $\Delta\Delta$ CT Study program. Analiza porównawcza CT ( $\Delta\Delta$ CT) jest metodą stosującą formułę arytmetyczną w celu określenia zmiany w ekspresji genu w próbce eksperymentalnej w stosunku do tego samego genu w próbce referencyjnej.  $\Delta\Delta$ CT stosowana jest z wysoką wydajnością w ocenie względnej ekspresji genu, gdy istnieje wiele genów w wielu próbkach; w tym badaniu oceniano względną ekspresję 16 genów w 8 próbkach na płycie.

Uzyskane wyniki zapisano w bazie danych poddanej analizie statystycznej programem Statistica v.10 StatSoft (Tulsa, USA) oraz Genespring v. 8.0.0 (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA). W analizie statystycznej użyto testów U Manna Whitneya, T Studenta, Wilcoxon, korelacji Pearsona, analizy regresji logistycznej. Zastosowano także testy dla analizy porównań wielokrotnych (post hoc): test Bonferoniego i Benjamina Hochberga.

### *3.6. Analiza ekspresji genomu*

Pierwszym etapem analizy statystycznej była korekcja sygnału tła i normalizacja kwantylowa uzyskanych danych za pomocą programu Genomestudio Gene Expression Analysis module v 1.0.6 Statistics. Geny, które w przynajmniej 75% próbek miały wartość sygnału powyżej 20 percentyla całości sygnału porównywanych grup, włączano do dalszej analizy. Analiza danych wykonana została za pomocą programu GeneSpring package version 12.6 (Agilent Technologies Santa Clara CA, USA). Geny, których ekspresja różniła się w porównywanych grupach, wybrane były na podstawie istotności statystycznej w teście t-Studenta, korekcji wyniku testem dla porównań wielokrotnych Benjamini Hochberga i dwukrotnej różnicy ekspresji.

Znaczenie funkcjonalne genów zostało zbadane za pomocą programu Genecodis [21,106], bazy danych genów KEGG [65,66].

## 4. Wyniki

### 4.1. Wyniki części klinicznej

#### 4.1.1. Ryzyko wystąpienia objawów aktywacji mastocytów w zależności od postaci choroby

Badaniem objęto 152 chorych (46 mężczyzn i 106 kobiet, w wieku od 18 do 78 lat, średnia wieku 41 lat) leczonych w Klinice Alergologii GUMed w latach 2004 - 2011. Klinikną charakterystykę populacji badanej przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Charakterystyka kliniczna chorych na mastocytozę.

Dane kliniczne	Mężczyźni (n,%)	Kobiety (n,%)	Wiek zakres średnia (lata)	Zajęcie skóry (n,%)	Tryptaza średnia, zakres
<b>Wszyscy</b>	46 (30%)	106 (70%)	18-78 41	142 93.4%	42.8 1.0-296
<b>CM</b>	23 (34.8%)	43 (65.2%)	18-63 37	66 100%	11.4 1.0-34
<b>ISM</b>	21 (27.6%)	55 (72.4%)	18-78 43	70 92.1%	58.7 6.6-200
<b>SSM</b>	1 (33.3%)	2 (66.7%)	45-57 51	3 100%	211.3 138-296
<b>ASM</b>	0	3 (100%)	52-73 59	3 100%	170.7 112-200
<b>MAS</b>	1 (25%)	3 (75%)	40-66 51	0	27 18.9-33.8

Mastocytozę układową (SM) rozpoznano u 82 (54%) osób, w tym mastocytozę układową o łagodnym przebiegu (ISM) u 76 (50%), mastocytozę układową o podstępny przebiegu (SSM) i agresywną mastocytozę (ASM) u 6 (4%), mastocytozę skóry (CM) rozpoznano u 66 osób (43%) oraz monoklonalny zespół aktywacji mastocytów (MMAS) u 4 (3%) osób. Reakcję anafilaktyczną I

stopnia w wywiadzie stwierdzono u 19 (12.5%), II stopnia u 18 (11.8%), a III stopnia u 38 (25%) chorych (tabela 7). W grupie badanej nie stwierdzono reakcji anafilaktycznej IV stopnia wg Ringa i Messmera. Występowanie reakcji anafilaktycznej w grupie badanej wynosi 49.3%, a reakcji wywołanych uwolnieniem mediatorów mastocytów spowodowanych czynnikami fizykalnymi 74%. Nie stwierdzono reakcji anafilaktycznych w grupie chorych na agresywne postaci mastocytozy (SSM, ASM). Czynniki wywołujące objawy aktywacji mastocytów oraz anafilaksję przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 7. Występowanie reakcji anafilaktycznych w zależności od rozpoznania.

Stopień ciężkości reakcji anafilaktycznych	Stopień I	Stopień II	Stopień III
<b>Liczba chorych z reakcjami anafilaktycznymi</b> <b>N=75</b>			
<b>Wszyscy</b> <b>N = 75</b>	19 25%	18 24%	38 51%
<b>CM</b> <b>N = 25 (33%)</b>	9 36%	5 20%	11 44%
<b>ISM</b> <b>N=46 (61%)</b>	9 20%	12 26%	25 54%
<b>SSM</b> <b>N=0</b>	0	0	0
<b>ASM</b> <b>N=0</b>	0	0	0
<b>MAS</b> <b>N=4 (6%)</b>	1 25%	1 25%	2 50%

Tabela 8. Wykaz czynników wywołujących objawy anafilaksji oraz zespołu aktywacji mastocytów w badanej grupie w zależności od rozpoznania.

Czynniki wywołujące MRS*/anafilaksję	Czynniki fizyczne	Alergeny pokarmowe	Jady owadów	Leki
<b>Wszyscy</b>	112 74%	44 29%	34 22%	28 18.4%
<b>CM</b>	43 28.3%	15 9.9%	13 8.5%	10 6.6%
<b>ISM</b>	62 40.8%	25 16.4%	19 12.5%	14 9.2%
<b>SSM</b>	2 1.3%	0	0	0
<b>ASM</b>	2 1.3%	1 0.6%	0	1 0.6%
<b>MAS</b>	3 2%	3 2%	2 1.3%	3 2%

\* Mast cell related symptoms

Częstość występowania reakcji anafilaktycznych była istotnie wyższa w grupie chorych na mastocytozę układową (46 chorych - 60.5%) w porównaniu do chorych na mastocytozę skóry (25 chorych - 37.8%) ( $p=0.007$ ), jak również ilość reakcji anafilaktycznych w wywiadzie była istotnie wyższa u osób z ISM w porównaniu do osób z CM ( $p=0.026$ ). Ponadto częstość występowania reakcji anafilaktycznych była istotnie wyższa u chorych z zajęciem skóry (67 chorych - 48%) ( $p=0.028$ ). Charakterystykę pacjentów w zależności o występowania reakcji anafilaktycznej przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Charakterystyka pacjentów w zależności od występowania reakcji anafilaktycznych.

Grupa badana	Anafilaksja w wywiadzie	Bez anafilaksji w wywiadzie	Różnica statystyczna
<b>Mężczyźni (n/%)</b>	22 (28.9%)	24 (31.6%)	ns
<b>Kobiety (n/%)</b>	54 (71%)	52 (68.4%)	ns
<b>Wiek (zakres, średnia)</b>	18-73 (41.4)	18-78 (40.5)	ns
<b>Postać choroby</b>			
<b>CM</b>	25 (38%)	41 (62%)	
<b>ISM</b>	46 (61%)	30 (39%)	p=0.007*
<b>MAS</b>	4 (100%)	0	
<b>SSM</b>	0	3 (100%)	
<b>ASM</b>	0	3 (100%)	
<b>Zajęcie skóry</b>	67 (48%)	74 (52%)	p=0.028**
<b>Tryptaza (średnia, zakres)</b>	43.6 (1.7-192)	38 (2-296)	p=0.029**

\*częstość występowania anafilaksji u chorych z ISM w porównaniu do chorych z CM

\*\*chorzy z CM, ISM i MAS

Do najczęstszych czynników wyzwalających objawy wynikające z aktywacji komórek tucznych (MCAS) należały: czynniki fizyczne (112 chorych - 74%),



alergeny pokarmowe (44 chorych - 29%), jady owadów błonkoskrzydłych (34 chorych - 22%) oraz leki (22 chorych - 15%).

Najczęstszymi czynnikami wywołującymi ciężką reakcję anafilaktyczną (stopień II i III) były jady owadów błonkoskrzydłych (34 chorych - 22%), następnie pokarmy (26 chorych - 17%) oraz leki (17 chorych - 11%).

Najczęstszymi czynnikami wywołującymi łagodną anafilaksję (stopień I) były pokarmy (18 chorych - 12%) oraz leki (5 chorych - 3%).

#### *4.1.2. Mechanizm reakcji*

Najczęstszymi czynnikami wywołującymi objawy zespołu aktywacji mastocytów były czynniki fizyczne, stwierdzone u 112 chorych w grupie badanej (74%). Z kolei u wszystkich 34 chorych z reakcją anafilaktyczną po użądleniu przez owady błonkoskrzydłe potwierdzono alergię na jady owadów.

Objawy nietolerancji pokarmowej stwierdzono u 44 chorych (29%), podczas gdy alergię na pokarm potwierdzono u 14 chorych (9%). Jednakże u większości chorych (39 pacjentów - 26%) potwierdzono nadwrażliwość nieimmunologiczną na pokarmy. Diagnostyka w kierunku alergii na pokarmy najczęściej wywołujące objawy, takie jak: alkohol (czerwone wino, piwo, whisky, brandy), ryby, czekolada, owoce (truskawki, owoce cytrusowe) oraz surowe warzywa (marchew, pietruszka, seler) nie potwierdziła alergii zarówno w testach skórnych jak i sIgE. Dlatego uważa się, że objawy były spowodowane wysoką zawartością histaminy w wymienionych pokarmach. Alergia na pokarmy została potwierdzona w punktowych testach skórnych lub sIgE z następującymi alergenami: orzech laskowy (n=4), mięso (n=1), przyprawy (n=4), pomidor (n=5), mleko (n=2), jajo (n=2) oraz mieszanka alergenów pokarmowych (ocena sIgE) (n=12).

Nadwrażliwość na leki potwierdzono u 28 chorych (18.4%). Wśród leków powodujących objawy alergiczne występowały: niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) (n=17), antybiotyki (n=9), leki miejscowo znieczulające (n=5), heparyna drobnocząsteczkowa (n=2) oraz środki kontrastowe (n=1).

Nie stwierdzono istotnych różnic między postaciami mastocytozy a występowaniem IgE-zależnej anafilaksji, np. z jadami owadów, objawami alergii pokarmowej, nietolerancją pokarmową, potwierdzoną alergią pokarmową.

#### *4.1.3. Identyfikacja czynników ryzyka wystąpienia reakcji anafilaktycznej*

Z powodu braku objawów MCAS u chorych na agresywną mastocytozę dalszą analizę przeprowadzono w grupie 142 chorych na CM i ISM (odpowiednio 76 oraz 66 chorych).

Średnie stężenie tryptazy (sBT) było wyższe u chorych z anafilaksją w wywiadzie (43.76ng/ml) w porównaniu do chorych bez anafilaksji w wywiadzie (30.02 ng/ml) ( $p=0.029$ ). Częstość występowania reakcji anafilaktycznych była istotnie wyższa u chorych na SM ( $n=46$ ) w porównaniu do chorych na CM ( $n=25$ ) ( $p=0.007$ ). Ponadto u chorych na SM stężenie tryptazy było wyższe ( $p=0.0001$ ). sBT było istotnie wyższe u chorych z objawami MCAS prowokowanymi czynnikami fizycznymi w porównaniu do chorych, którzy nie zgłaszali objawów MCAS ( $p=0.002$ ).

Ponadto u chorych z SM częściej obserwowano hipotensję niż u chorych z CM ( $p=0.03$ ). Także objawy MCAS prowokowane czynnikami fizycznymi częściej stwierdzano w grupie chorych na SM niż na CM ( $p=0.026$ ).

Ryzyko wystąpienia reakcji spowodowanej uwolnieniem mediatorów komórek tucznych było wyższe u chorych na ISM (OR 2.15 CI: 1.02 - 4.52). Wśród chorych zgłaszających objawy MCAS sBT było istotnie wyższe ( $p=0.014$ ) oraz częściej występowała mutacja kit ( $p=0.008$ ) w porównaniu do chorych nie zgłaszających objawów MCAS.

#### *4.1.4. Zapobieganie wystąpieniu objawów MCAS i anafilaksji*

U wszystkich chorych na mastocytozę stosowano profilaktykę wystąpienia reakcji anafilaktycznej w postaci leków przeciwhistaminowych (H1- oraz H2-blokerów) zgodnie z zaleceniami EAACI oraz ECNM [138]. U kilku chorych stosowano także inne leki, jak glikokortykosteroidy ( $n=3$ ) oraz kromony ( $n=2$ ). Wszyscy chorzy byli zaopatrzeni w tak zwany "zestaw ratunkowy" zawierający ampułkostrzykawkę z adrenaliną, lek antyhistaminowy i prednizon. Chorzy byli

przeszkoleni w technice samodzielnego podania leku. Immunoterapia swoista z jadami owadów błonkoskrzydłych (VIT) była prowadzona u 26 chorych (76.5%) z potwierdzoną alergią na jady owadów (n=34). Pozostali chorzy (n=8) (23.5%) mieli zaplanowany termin rozpoczęcia VIT. Leczenie prowadzono zgodnie z protokołem ultrarush (osa) lub rush (pszczoła) do osiągnięcia dawki podtrzymującej 100 mikrogram. Zgodnie z obowiązującymi wytycznymi u chorych na mastocytozę leczenie powinno być prowadzone do końca życia. Jako profilaktykę wystąpienia objawów niepożądanych stosowano leki przeciwhistaminowe blokujące receptor H1 w wysokich dawkach (np. 40 mg cetyryzyny/dzień). Objawy niepożądane stwierdzono tylko u jednego chorego, u którego w trakcie kursu wstępnego VIT z jadem pszczoły wystąpiła reakcja anafilaktyczna III stopnia wg Ringa i Messmera (wstrząs anafilaktyczny). Kurs podtrzymujący VIT nie był powikłany wystąpieniem działań niepożądanych, co potwierdza, że VIT może być bezpiecznie stosowana u chorych na mastocytozę [150]. U jednej osoby, która zakończyła swoistą immunoterapię z alergenem jadu osy w 2000 roku, po kilku latach wystąpiła poużądleniowa reakcja anafilaktyczna III stopnia wg Ringa i Messmera (wstrząs anafilaktyczny). Następnie u chorego potwierdzono mastocytozę, rozpoczęto ponownie swoistą immunoterapię z alergenem jadu osy, która jest obecnie kontynuowana bez powikłań. Odpowiedź na leczenie z zastosowaniem leków przeciwhistaminowych, kortykosteroidów, kromonów oraz VIT u wszystkich pacjentów z anafilaksją w wywiadzie przedstawiono w tabeli 10. Leczenie było prowadzone przynajmniej przez rok przed obecną oceną kliniczną. Dane wskazują, że u 8 (10.5%) chorych nie udało się osiągnąć kontroli objawów choroby, co może wskazywać na możliwość zastosowania u tych osób leczenia biologicznego (np. omalizumab, KIT inhibitor). U kolejnych 14 chorych (18%) osiągnięto tylko częściową remisję. U 3 chorych nie oceniono skuteczności leczenia z powodu zbyt krótkiego okresu terapii (leczenie wprowadzono tuż przez zbieraniem danych).

Tabela 10. Odpowiedź na leczenie profilaktyczne: VIT, leki przeciwhistaminowe, kromony, i/lub glikokortykosteroidy.

Rodzaj odpowiedzi	Liczba chorych	% chorych z anafilaksją
Całkowita odpowiedź	7	9.2
Znaczna odpowiedź	44	57.8
Częściowa odpowiedź	14	18.4
Brak odpowiedzi	8	10.5

#### 4.2. Wyniki badania ekspresji genów z zastosowaniem techniki RT-PCR

Grupa badana składała się z 57 chorych, w tym 23 chorych na CM, 32 chorych na ISM, 2 chorych na SSM oraz 19 osób zdrowych bez reakcji anafilaktycznych w wywiadzie.

Objawy MCAS stwierdzono u 23 chorych (40.3%). Alergię na jady owadów błonkoskrzydłych potwierdzono u 13 chorych (22.8%).

##### 4.2.1. Wyniki badania ekspresji wybranych 16 genów z użyciem kart mikrocieczowych u chorych na mastocytozę w porównaniu do osób zdrowych

Stwierdzono istotne różnice w ekspresji genów B3GAT1 ( $p=0,006$ ) oraz ITGB1 ( $p=0,02$ ) u chorych na mastocytozę w porównaniu do osób zdrowych. Oba geny podlegały obniżonej ekspresji u chorych na mastocytozę (tabela 11).

Tabela 11. Ekspresja genów u chorych na mastocytozę w porównaniu do osób zdrowych.

Gen	Mastocytoza	Kontrola	fc mastocytoza/kontrola	p
Ct	9,87898	9,98657	0,989226503	0,304965
18S-Hs99999901_s1	9,87898	9,98657	0,989226503	0,304965
ABI3BP-Hs00227206_m1	54,25767	61,64240	0,88020045	0,288300
ANKRD6-Hs00208902_m1	32,17114	31,15650	1,032565995	0,371331
B3GAT1-Hs00218629_m1	29,38893	30,09169	0,976645979	0,005770

CDC42BPA-Hs00177522_m1	29,44687	29,24433	1,006925742	0,617185
DVL1-Hs00182896_m1	28,13153	28,20894	0,997255997	0,277531
G0S2-Hs00274783_s1	30,50334	30,76468	0,991505124	0,322246
HLA-DRB4-Hs03027795_uH	62,26722	65,29632	0,953610024	0,721161
ITGAV-Hs00233808_m1	31,62139	30,35559	1,041698973	0,467507
ITGB1-Hs00559595_m1	25,85044	25,92594	0,997088049	0,024794
JUP-Hs00158408_m1	27,84032	27,49300	1,012633071	0,721161
MAP2K3-Hs00177127_m1	22,97515	23,03259	0,997506013	0,282881
MLL3-Hs01005521_m1	25,98323	26,06638	0,99681009	0,404204
TNFRSF4-Hs00533968_m1	28,94907	29,09905	0,994845826	0,316417
TRAF4-Hs00188755_m1	30,09023	29,99981	1,003014174	0,677084
ZMAT3-Hs00536976_m1	26,91940	26,79540	1,00462762	0,592232

Ponadto stwierdzono istotne różnice w ekspresji B3GAT1 u chorych na SSM ( $p=0.02$ ), ISM ( $p=0.01$ ) oraz CM ( $p=0.04$ ). Różnica w ekspresji genu ITGB1 występowała jedynie u chorych na ISM ( $p=0,03$ ). Porównując ekspresję wybranych genów u osób chorych na ISM oraz CM nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic.

#### *4.2.2. Ekspresja genów u chorych na mastocytozę z współistniejącą alergią na jady owadów w porównaniu do chorych na mastocytozę bez reakcji anafilaktycznych w wywiadzie*

Ponadto stwierdzono istotne różnice w ekspresji B3GAT1 ( $p=0,003$ ) oraz ITGB1 ( $p=0.02$ ) wśród chorych na mastocytozę z IVA w porównaniu do chorych na mastocytozę bez anafilaksji w wywiadzie. U chorych na mastocytozę z anafilaksją w wywiadzie oba geny podlegały obniżonej ekspresji (tabela 12).

Tabela 12. Ekspresja genów u chorych na mastocytozę z współistniejącą alergią na jady owadów w porównaniu do chorych na mastocytozę bez reakcji anafilaktycznych w wywiadzie.

Gen	IVA	brak IVA	Fc IVA/brak IVA
Ct	10,19434	9,84635	1,035341
18S-Hs99999901_s1	10,19434	9,84635	1,035341
ABI3BP-Hs00227206_m1	49,37462	57,49242	0,858802
ANKRD6-Hs00208902_m1	36,26235	31,02092	1,168965
B3GAT1-Hs00218629_m1	28,86069	29,70987	0,971417
CDC42BPA-Hs00177522_m1	29,67974	29,33773	1,011658
DVL1-Hs00182896_m1	28,21779	28,13708	1,002869
G0S2-Hs00274783_s1	31,00941	30,47773	1,017445
HLA-DRB4-Hs03027795_uH	60,30974	63,58468	0,948495
ITGAV-Hs00233808_m1	30,58916	31,45264	0,972547
ITGB1-Hs00559595_m1	25,75965	25,89194	0,99489
JUP-Hs00158408_m1	27,93660	27,71571	1,00797
MAP2K3-Hs00177127_m1	22,94885	22,99790	0,997867
MLL3-Hs01005521_m1	26,14975	25,97395	1,006768
TNFRSF4-Hs00533968_m1	29,05661	28,97211	1,002917
TRAF4-Hs00188755_m1	30,16049	30,04847	1,003728
ZMAT3-Hs00536976_m1	26,90725	26,88451	1,000846

Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji genów u chorych w zależności od występowania anafilaksji w wywiadzie czy objawów aktywacji komórek tucznych (MCAS).

#### 4.3. Wyniki badania ekspresji genów z zastosowaniem techniki whole genome expression analysis

Grupa badana składała się z 7 chorych, u których rozpoznano następujące postaci mastocytozy: u 2 chorych rozpoznano mastocytozę skóry, u 4 chorych mastocytozę układową o łagodnym przebiegu, a u 1 chorego mastocytozę układową o podstępny przebiegu.

Z 47 323 odcinków RNA warunki jakości wymagane do dalszej analizy spełniło 32379 transkryptów. Przy zastosowaniu testu T i korekcji testem Benjamina Hochberga w analizie wielokrotnych porównań profili ekspresji we krwi szpikowej i obwodowej stwierdzono istotne różnice w ekspresji 7689 z analizowanych transkryptów. Przy ograniczeniu liczby genów do tych z różnicą w ekspresji powyżej 2 stwierdzono istotne różnice w ekspresji 943 transkryptów, z których 361 ulegało nadekspresji, a 582 ulegało słabszej ekspresji. Przy przyjęciu  $p=0.00001$  i różnicy w ekspresji powyżej 8 stwierdzono istotne różnice w ekspresji 45 genów (Tabela 13). Wśród genów o istotnej różnicy w ekspresji w krwi szpikowej nie znajdują się geny ITGB1 i B3GAT1, których ekspresja wykazała największe różnice w badaniu RT PCR.

Tabela 13. Ekspresja genów przy założeniu  $p=0.00001$  oraz  $fc>8$ .

Symbol genu	Nazwa genu	FC ([1] vs [3])	Log FC ([1] vs [3])	FC (abs) ([1] vs [3])	Regulation ([1] vs [3])	Chromosome
TFRC	transferrin receptor (p90, CD71)	9.886323	3.305434	9.886323	up	chr3
CAMP	cathelicidin antimicrobial peptide	11.728601	3.551959	11.728601	up	chr3
GPLY	granulysin, transcript variant NKG5	-8.072106	-3.0129452	8.072106	down	chr2
ABCB10	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 10	8.248884	3.044199	8.248884	up	chr1
DEFA4	defensin, alpha 4, corticostatin	37.540657	5.230382	37.540657	up	chr8
TYMS	thymidylate synthetase	9.56988	3.2585008	9.56988	up	chr18
LOC100131726	HCC-related HCC-C11_v3	-11.832875	-3.5647287	11.832875	down	chr8
LCN2	lipocalin 2	18.22163	4.18758	18.22163	up	chr9
ELANE	elastase, neutrophil expressed	37.486782	5.22831	37.486782	up	chr19
HP	haptoglobin	11.95241	3.5792296	11.95241	up	chr16
RNASE2	ribonuclease, RNase A family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin)	16.909721	4.079781	16.909721	up	chr14
CA2	carbonic anhydrase II	10.775433	3.429674	10.775433	up	chr8
CA2	carbonic anhydrase II	9.898173	3.3071623	9.898173	up	chr8
LOC643332	misc_RNA (LOC643332), miscRNA	20.637053	4.367165	20.637053	up	chr14
PI3	peptidase inhibitor 3, skin-derived	-10.623919	-3.409244	10.623919	down	chr20

(SKALP)						
AZU1	azurocidin 1	35.752193	5.15996	35.752193	up	chr19
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	10.8339205	3.4374835	10.8339205	up	chr17
CDC20	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	10.251054	3.3577003	10.251054	up	chr1
IL8RB	interleukin 8 receptor, beta	-8.532397	-3.092951	8.532397	down	chr2
LOC100008589	28S ribosomal RNA (LOC100008589), non-coding RNA	94.85674	6.5676785	94.85674	up	
CEACAM6	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	31.874397	4.994326	31.874397	up	chr19
BEX1	brain expressed, X-linked 1	10.859512	3.4408875	10.859512	up	chrX
IGLL3	immunoglobulin lambda-like polypeptide 3	8.114341	3.020474	8.114341	up	chr22
CTSG	cathepsin G	59.20048	5.887537	59.20048	up	chr14
RNASE3	ribonuclease, RNase A family, 3 (eosinophil cationic protein)	54.952248	5.7801065	54.952248	up	chr14
SPTA1	spectrin, alpha, erythrocytic 1 (elliptocytosis 2)	14.352309	3.843211	14.352309	up	chr1
BPI	bactericidal/permeability-increasing protein	21.420856	4.420944	21.420856	up	chr20
MYB	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	10.96326	3.4546049	10.96326	up	chr6
UHRF1	ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1	8.338087	3.0597165	8.338087	up	chr19
PRTN3	proteinase 3	38.961636	5.2839823	38.961636	up	chr19
NUSAP1	nucleolar and spindle associated protein 1	9.502366	3.2482867	9.502366	up	chr15
LOC100134364	hypothetical protein LOC100134364	10.081837	3.3336866	10.081837	up	
PRG2	proteoglycan 2, bone marrow (natural killer cell activator, eosinophil granule major basic protein)	74.680916	6.2226677	74.680916	up	chr11
OLR1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	10.95227	3.453158	10.95227	up	chr12
OLFM4	olfactomedin 4	13.429554	3.7473395	13.429554	up	chr13
MS4A3	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (hematopoietic cell-specific)	12.495837	3.6433756	12.495837	up	chr11
TCN1	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	10.422698	3.381657	10.422698	up	chr11
LOC441763	hypothetical LOC441763	66.114075	6.0468855	66.114075	up	chr16
RHAG	Rh-associated glycoprotein	10.913121	3.4479918	10.913121	up	chr6
MPO	myeloperoxidase, nuclear gene encoding mitochondrial protein	46.85335	5.5500803	46.85335	up	chr17
MS4A3	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (hematopoietic cell-specific)	18.549732	4.2133265	18.549732	up	chr11
LOC100133565	similar to hCG23738	110.51496	6.788098	110.51496	up	
CEACAM8	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8	27.783113	4.7961364	27.783113	up	chr19
COL17A1	collagen, type XVII, alpha 1	12.463927	3.6396868	12.463927	up	chr10
CD24	CD24 molecule	11.378944	3.5082948	11.378944	up	chrY



Produkty genów, których różnice w ekspresji były istotnie różne, są zaangażowane w cyklu komórkowym, replikacji DNA, interakcji cytokiny - receptor dla cytokin, a także w ścieżce sygnalizacji p53 oraz w ścieżkach sygnalizacji w raku (Tabela 14).

Tabela 14. Funkcje genów podlegających istotnie różnej ekspresji w krwi obwodowej i krwi szpikowej na podstawie bazy danych KEGG.

Geny	NG R	TNG R	NG	TN G	HYP	Hyp*	Adnotacje
<b>25 genów</b>	123	3420 8	25	66 0	1.23497e- 18	2.22295e- 16	(KEGG) 04110: Cell cycle
<b>11 genów</b>	35	3420 8	11	66 0	3.47977e- 11	3.13179e- 09	(KEGG) 03030: DNA replication
<b>14 genów</b>	83	3420 8	14	66 0	6.71451e- 10	4.02871e- 08	(KEGG) 04640: Hematopoietic cell lineage
<b>10 genów</b>	40	3420 8	10	66 0	3.36138e- 09	1.51262e- 07	(KEGG) 04110: Cell cycle
<b>12 genów</b>	67	3420 8	12	66 0	5.4894e-09	1.97618e- 07	(KEGG) 04115: p53 signaling pathway
<b>8 genów</b>	24	3420 8	8	66 0	1.03078e- 08	3.09234e- 07	(KEGG) 04115: p53 signaling pathway (KEGG) 04110: Cell cycle
<b>5 genów</b>	6	3420 8	5	66 0	1.55517e- 08	3.99901e- 07	(KEGG) 04115: p53 signaling pathway (KEGG) 04110: Cell cycle
<b>21 genów</b>	259	3420 8	21	66 0	4.05908e- 08	9.13293e- 07	(KEGG) 04060: Cytokine-cytokine receptor interaction
<b>5 genów</b>	7	3420 8	5	66 0	5.35627e- 08	1.07125e- 06	(KEGG) 03030: DNA replication (KEGG) 04110: Cell cycle
<b>4 geny</b>	4	3420 8	4	66 0	1.37337e- 07	2.47206e- 06	(KEGG) 05200: Pathways in cancer (KEGG) 04110: Cell cycle

NGR = *ang. number of annotated genes in the reference list*; liczba

odnotowanych genów na liście referencyjnej

TNGR = *ang. total number of genes in the reference list*; całkowita liczba genów na liście referencyjnej

NG = *ang. number of annotated genes in the input list*; liczba odnotowanych genów w liście wejściowej

TNG = *ang. total number of genes in the input list*; całkowita liczba genów na

liście wejściowej

Hyp = *ang. hypergeometric pValue*; hipergeometryczna wartość p

Hyp\* = *ang. corrected hypergeometric pValue*; skorygowana  
hipergeometryczna wartość p

Istotne różnice w ekspresji genów B3GAT1 oraz ITGB1 stwierdzone u chorych na mastocytozę za pomocą kart mikrocieczowych nie znalazły potwierdzenia w badaniu whole genome expression analysis przy przyjęciu testu T i korekcji testem Benjamina Hochberga w analizie wielokrotnych porównań profili ekspresji we krwi szpikowej i obwodowej.

## 5. Omówienie wyników

### 5.1. Anafilaksja

W badaniu stwierdzono, że niemal połowa (49.3%) pacjentów z mastocytozą miała reakcje anafilaktyczne w wywiadzie. Częstość występowania objawów aktywacji mastocytów prowokowanych czynnikami fizykalnymi była jeszcze wyższa u chorych na mastocytozę (74%). Nie stwierdzono reakcji anafilaktycznych u chorych na podstępłą i agresywną postać mastocytozy. Do czynników ryzyka wystąpienia reakcji anafilaktycznej u chorych na mastocytozę układową o łagodnym przebiegu i pokrzywkę barwnikową należały: choroba układowa oraz podwyższone stężenie tryptazy. Najczęstszymi czynnikami wywołującymi reakcje anafilaktyczne były jady owadów błonkoskrzydłych, pokarmy oraz leki, co jest zgodne z danymi wcześniej opisanymi [34,36,86]. Ciekawym i nowatorskim wynikiem badania jest identyfikacja nieopisywanych dotychczas czynników wywołujących objawy aktywacji komórek tucznych, mianowicie czynników fizycznych. Objawy aktywacji komórek tucznych prowokowane przez czynniki fizyczne stwierdzono aż u 74% chorych (n=112). Zgodnie z wytycznymi EAACI oraz ECNM zastosowana profilaktyka wystąpienia anafilaksji była skuteczna u większości chorych (89.5%). Natomiast nieco więcej niż 10% chorych nie osiągnęło zamierzonych efektów leczenia i może wymagać leczenia biologicznego (obecnie w trakcie badań klinicznych).

Wyniki badania wskazują, że anafilaksja znacznie częściej występuje u chorych na mastocytozę (49.3%) niż w populacji ogólnej, gdzie rozpowszechnienie reakcji anafilaktycznych stanowi od 0.05% do 2% [101,130]. Ponadto uważa się, że przebieg anafilaksji jest cięższy u chorych na mastocytozę [83]. W badanej grupie częstość występowania reakcji anafilaktycznych była wyższa u chorych na mastocytozę układową w porównaniu do chorych na mastocytozę skóry, co jest zgodne z doniesieniami Brockowa i współautorów [16]. Czynnikiem wywołującym ciężkie reakcje anafilaktyczne u chorych na mastocytozę były: jady owadów błonkoskrzydłych, następnie pokarmy oraz leki. Najcięższe reakcje wywołane były alergią na jad owadów błonkoskrzydłych, były one również znacznie częstsze niż w populacji ogólnej. Łagodne reakcje anafilaktyczne powodowane były spożyciem pokarmu lub przyjęciem leku.

Dodatkowo, w przypadku nadwrażliwości na leki i pokarm, nie stwierdzono istotnych różnic w częstości występowania anafilaksji IgE-zależnej u chorych na mastocytozę w porównaniu do populacji ogólnej. Większość objawów wywoływanych spożyciem pokarmu nie było następstwem reakcji IgE-zależnej. Vlieg-Boerstra i współautorzy [149] wykazali, że pokarmy o wysokiej zawartości amin biogennych oraz składników uwalniających histaminę mogą powodować uwolnienie mediatorów komórek tucznych. Ponadto postulują, że objawy będące następstwem uwolnienia mediatorów wynikały raczej ze zwiększonej ilości komórek tucznych niż ich podatności do degranulacji [149]. Anafilaksja polekowa najczęściej była konsekwencją nadwrażliwości na leki z grupy NLPZ, alergii na antibiotyki oraz środki znieczulające miejscowo. Wyniki tej pracy potwierdzają doniesienia Moneret-Vautrin i współautorów [92], że zagrażająca życiu anafilaksja polekowa była najczęściej spowodowana amoksycyliną, cefalosporyną lub NLPZ.

Uważa się, że tryptaza jest niezawodnym markerem degranulacji komórek tucznych i może być uważana za marker wystąpienia anafilaksji [50]. W tym badaniu podwyższone stężenie tryptazy było istotnie związane z występowaniem anafilaksji oraz może być rozpatrywane jako czynnik ryzyka ciężkiej reakcji alergicznej. Potwierdza to wcześniejsze doniesienia dotyczące anafilaksji poużądleniowej i podwyższonego stężenia tryptazy u chorych na alergię na jady owadów [83,123]. Inne wnioski zostały zaprezentowane w badaniu van Anrooij i współautorów [145], którzy ocenili ryzyko wystąpienia anafilaksji u chorych na mastocytozę w zależności od liczby mastocytów, którą odzwierciedlały markery mastocytów: stężenie tryptazy w surowicy oraz metabolity histaminy w moczu (metylhistamina oraz kwas metyloimidazoloctowy - MIMA). Badacze przedstawili rozbieżny związek między liczbą mastocytów a częstością występowania anafilaksji poużądleniowej (HVAn). Zaobserwowali, że niezależnie od podtypu mastocytozy oraz narażenia na użądlenia przez owady błonkoskrzydłe, rozpowszechnienie HVAn stopniowo wzrastało od 36% do 47% wraz ze wzrostem stężenia tryptazy do 28.0 µg/L, metylihistaminy do 231.0 µg/L oraz MIMA do 2.7 mmol/mol kreatyniny, a następnie obniżało się z dalszym wzrostem powyższych markerów. Następnie związek między liczbą mastocytów

a występowaniem HVAn analizowano w grupie chorych na ISM narażonych na użądlenia przez błonkówki w wieku dojrzałym i stwierdzono, że stężenie tryptazy, MIMA oraz metylhistaminy były niezależnymi negatywnymi predyktorami anafilaksji poużądleniowej. Ponadto w badanej grupie czynnikami ryzyka HVAn były: wiek, w którym nastąpiło ostatnie użądlenie (im starszy tym wyższe ryzyko HVAn), nieobecność zmian skórnych typu pokrzywki barwnikowej. Autorzy dodają, że pacjenci ekspozycyjni na użądlenia przez owady błonkoskrzydłe nie mają wyższego ryzyka HVAn dopóki nie rozwinie się u nich mastocytoza. Dlatego aktualne rozpowszechnienie HVAn może być wyższe u pacjentów ekspozycyjni na użądlenia już po rozpoczęciu procesu chorobowego. Wyniki badania są sprzeczne z dotychczas opublikowanymi, ponieważ poprzednie badania ograniczały się do pacjentów z potwierdzoną IgE-zależną IVA niezależnie od obecności mastocytozy. Poza tym, średnie stężenie tryptazy w prezentowanym badaniu było znacznie wyższe (25.2  $\mu\text{l/L}$ , zakres 14.0-51.2  $\mu\text{l/L}$ ) niż w największej opublikowanej dotychczas grupie chorych na IVA (5.84 - 8.36  $\mu\text{l/L}$ ) [125]. W mastocytozie komórki tuczne są atypowe, a im większa atypia tym bardziej zaburzona funkcja, co może prowadzić do supresji HVAn. Ostatnia hipoteza znalazła potwierdzenie w wynikach badań ekspresji profili genetycznych, gdzie stwierdzono większe zaburzenia w różnicowaniu fenotypu mastocytów u chorych z ISM bez HVAn w porównaniu do chorych z ISM z HVAn w wywiadzie [100]. Brak HVAn u chorych z wyższą liczbą mastocytów nieprawidłowo zróżnicowanych wynika najpewniej z ich dysfunkcji. Van Anrooij określa większą liczbę mastocytów mianem niezależnego predyktora niższego ryzyka wystąpienia HVAn u chorych z ISM. Z powodu rozbieżności wyników tej analizy z badaniami dotychczas opublikowanymi należy dodać, że kluczowym etapem do oceny ryzyka wystąpienia HVAn jest ocena klonalności mastocytów [145]. W badanej przez mnie grupie chorych nie stwierdzono występowania reakcji anafilaktycznych u chorych leczonych z powodu mastocytozy o podstępny przebiegu, jak i u chorych na agresywną postać choroby. Może to w części potwierdzać spostrzeżenia van Anrooij i współautorów, gdyż w tej grupie chorych stężenia tryptazy mastocytarnej są najwyższe.

Podwyższone ryzyko zagrażającej życiu anafilaksji może występować podczas wysiłku fizycznego, ekspozycji na ekstremalne temperatury, wilgotność, wysokie stężenie pyłku, a także podczas gorączki czy ostrej infekcji [130]. Brockow podaje, że w niektórych przypadkach nie udaje się określić czynnika wywołującego anafilaksję [16]. Dodatkowo u chorych na mastocytozę objawy kliniczne mogą być efektem masywnej degranulacji komórek tucznych i uwolnienia mediatorów wazoaktywnych [143]. W badanej grupie chorych udało się zidentyfikować czynnik sprawczy reakcji alergicznej w większości przypadków. Dodatkowo u większości chorych (74%) stwierdzono objawy wynikające z degranulacji mastocytów pod wpływem następujących czynników fizycznych: wysiłek fizyczny, pocieranie skóry, zimno, gorąco, ekspozycja na światło słoneczne. U chorych na mastocytozę układową częściej występowały incydenty hipotensji niż u chorych na mastocytozę skóry. Co więcej u chorych na SM częściej stwierdzano objawy degranulacji komórek tucznych pod wpływem czynników fizycznych. Z kolei sBT było istotnie wyższe u chorych z objawami degranulacji komórek tucznych pod wpływem czynników fizycznych w porównaniu do chorych bez tych objawów. Uważa się, że chorzy na SM lub z podwyższonym stężeniem sBT mają podwyższone ryzyko wystąpienia reakcji anafilaktycznej. W badanej grupie stwierdzono także częstsze występowanie objawów reakcji anafilaktycznej wynikających z degranulacji komórek tucznych pod wpływem czynników fizycznych u chorych z anafilaksją w wywiadzie. U tych pacjentów sBT było istotnie wyższe oraz częściej wykrywano mutacje c-kit, co jest zgodne z opublikowanymi danymi. Wobec tego można sądzić, że u chorych na mastocytozę objawy aktywacji mastocytów pod wpływem czynników fizycznych mogą stanowić czynnik ryzyka wystąpienia anafilaksji i ich występowanie powinno być rutynowo oceniane i dokumentowane w historii choroby każdego chorego.

Uważam, że osobnego omówienia wymaga temat zespołu aktywacji mastocytów (MCAS). Ponieważ objawy wynikające z aktywacji komórek tucznych i uwolnienia ich mediatorów są bardzo różnorodne i występują z różną częstością u chorych na mastocytozę stwarzając dylematy diagnostyczne, uważa się, że powinna istnieć ujednolicona klasyfikacja obejmująca mastocytozę oraz MCAS jako choroby zależne od mastocytów (MCAD) [137].

Uważa się, że powinna ona naturalnie obejmować choroby wewnętrzne, w których patogenezie rolę odgrywają, tym samym ułatwiać diagnostykę między innymi chorób alergicznych, immunologicznych, mastocytozy oraz chorób skóry [137]. Zaproponowano ogólną klasyfikację chorób zależnych od mastocytów oraz od ich nieprawidłowych reakcji obejmującą udział linii komórek tłuszczowych oraz zarówno stany nowotworowe jak i nienowotworowe (czego nie było w poprzedniej klasyfikacji mastocytozy wg WHO). Pełną obecnie obowiązującą klasyfikację przedstawiono w tabeli 15 [137].

Tabela 15. Klasyfikacja chorób zależnych od mastocytów [137].

Rozpoznanie	Definicja lub charakterystyka
<b>Hiperplazja mastocytów (MCs)</b>	Zwiększona ilość MCs (niemonoklonalnych) w tkankach, w większości przypadków reaktywna, potwierdzona obecność choroby zasadniczej, brak objawów MCA, także obecna w chorobach limfoproliferacyjnych oraz po podaniu SCF
<b>Mastocytoza (+-MCAS)</b>	Zwiększona ilość monoklonalnych MCs
<b>Mastocytoza układowa</b>	Spełnione kryteria SM
<b>Mastocytoza skóry</b>	Spełnione kryteria MIS przy braku kryteriów SM
<b>Mastocytoma</b>	Zlokalizowane łagodne monoklonalne MCs
<b>Mięsak mastocytarny</b>	Zlokalizowane agresywne monoklonalne MCs
<b>Zespół aktywacji mastocytów</b>	MCA rozpoznany na podstawie istniejących kryteriów
<b>Pierwotny MCAS</b>	CM, SM, MMAS
<b>Wtórny MCAS</b>	Atopia lub inna choroba związana z obecnością MCA
<b>Idiopatyczny MCAS</b>	Nie potwierdzono przyczyny objawów MCA
<b>Obecność mielomastocytów</b>	Udział linii MCs w rozroście nowotworowym szpiku
<b>AML (trypaza+)</b>	Brak spełnienia kryteriów SM lub MML, blasty trypaza+
<b>Białaczka mielomastocytowa</b>	Udział linii MCs w MDS/AML z obecnością co najmniej 10% klonalnych MCs w szpiku i/lub w rozmazach krwi obwodowej, brak spełnienia kryteriów SM

Udział linii MCs w MDS/AML z obecnością co najmniej 10% klonalnych MCs w szpiku i/lub w rozmazach krwi obwodowej, brak spełnienia kryteriów SM.

Główną zaletą obecnie obowiązujących kryteriów i samej klasyfikacji ma być właściwe rozpoznanie oraz uniknięcie nadinterpretacji występujących objawów MCA w codziennej praktyce klinicznej. Chorzy z obecnością słabo wyrażonych objawów powinni być diagnozowani w kierunku chorób współistniejących przebiegających z obrazem klinicznym MCA celem ustalenia właściwego rozpoznania ostatecznego. Należy zwrócić szczególną uwagę na obecność

chorób układu krążenia (pacjenci z hipotensją, wstrząsem), pewnych chorób endokrynologicznych, chorób nowotworowych, układu pokarmowego, różnych chorób infekcyjnych, neurologicznych czy psychicznych. Należy wziąć pod uwagę wszystkie możliwe rozpoznania i po dokładnym zbadaniu chorego oraz uzyskaniu wyników badań dodatkowych (tryptaza mastocytarna, histamina i/lub jej metabolity, PGD2 i/lub jej metabolity) rozpoznać właściwą jednostkę chorobową. Trudności diagnostyczne wystąpić mogą, gdy nie stwierdza się podwyższonego stężenia tryptazy. Wówczas powinno się oznaczyć histaminę i/lub jej metabolity. Jeśli stężenie tryptazy nie jest podwyższone a histamina i/lub jej metabolity są podwyższone w okresie objawowym to należy wziąć pod uwagę zespół aktywacji bazoofilów lub guz wydzielający histaminę. Dodatkowa miejscowa degranulacja komórek tłuszcznych w przebiegu różnych stanów zapalnych, np. w chorobach zapalnych jelita grubego, nie jest dowodem na obecność pierwotnego MCAS. Dotyczy to szczególnie chorych z typowymi objawami MCA dobrze odpowiadających na leczenie kromonami doustnymi w dużych dawkach [96]. Wartym szczególnej uwagi rozpoznaniem jest intoksykacja histaminą występująca po spożyciu produktów bogatych w histaminę (lub jej metabolity): wina, owoców morza, ryb czy sosu sojowego [25].

*Objawy związane z aktywacją mastocytów oraz uwolnieniem mediatorów komórek tłuszcznych.*

Do aktywacji mastocytów (*ang. mast cell activation, MCA*) dochodzi w reakcji alergicznej IgE-zależnej, w różnych stanach zapalnych oraz w mastocytozie. Aktywowane komórki tłuszczne poprzez reakcję IgE-zależną lub inny receptorowy lub niereceptorowy bodziec gwałtownie uwalniają oraz wytwarzają de novo mediatory odpowiedzialne za objawy reakcji anafilaktycznej [135]. Wiadomo, że w przeciwieństwie do większości osób, u których w reakcji anafilaktycznej można zidentyfikować specyficzny alergen odpowiedzialny za wystąpienie anafilaksji, u osób z mastocytozą stężenia swoistych IgE są bardzo niskie lub nieoznaczalne [135]. Objawy układowe wynikające z MCA mogą potęgować choroby współistniejące: alergie IgE-zależne, czynne zakażenia, choroby autoimmunologiczne, chorobę wrzodową żołądka i dwunastnicy. Stąd przy ocenie powyższych objawów należy zawsze wykluczyć inne niż MCA przyczyny. Objawy powodowane MCA są najczęściej zgłaszanymi



dolegliwościami przez chorych na mastocytozę. Stanowią szerokie spektrum objawów: od nudności, kurczowych bóli brzucha, biegunki, świądu, po kołatania serca i inne arytmie, spadek ciśnienia tętniczego, pełnoobjawową anafilaksję, a także zaburzenia neurologiczne i psychiatryczne. Ich niejednorodność można wytłumaczyć indywidualnym przebiegiem choroby u każdego pacjenta, w zależności od zajętego narządu, różnymi czynnikami wywołującymi MCA, różnorodnością oraz ilością uwalnianych mediatorów komórek tłuszczowych, a także obecnością chorób współistniejących [145]. Objawy MCA mogą być ostre lub przewlekłe oraz trwać od kilku minut do wielu godzin. Mediatory uwalniane w czasie aktywacji mastocytów oraz powodowane przez nie objawy przedstawiono w tabeli 16 [145].

Tabela 16. Mediatory komórek tłuszczowych i powodowane przez nie objawy MCA [145].

Mediatory	Objawy działania mediatorów MCA
<b>Histamina</b>	Ból głowy, hipotensja, pokrzywka, obrzęk naczynioruchowy, świąd, biegunka
<b>PGD2</b>	Wydzielanie śluzu, skurcz oskrzeli, niestabilność naczyń
<b>PAF</b>	Kurczowy ból brzucha, obrzęk płuc, pokrzywka, skurcz oskrzeli, hipotensja, arytmia
<b>Cytokiny prozapalne</b>	Miejscowy stan zapalny, obrzęk naczynioruchowy, migracja leukocytów
<b>LTC4 i LTD4</b>	Wydzielanie śluzu, obrzęk naczynioruchowy, niestabilność naczyń
<b>Chemokiny</b>	Ostre zapalenie i rekrutacja leukocytów, migracja leukocytów
<b>Tryptaza</b>	Aktywacja śródbłonna z następującymi reakcjami stanu zapalnego

Mimo powszechności w występowaniu objawów MCA istnieją trudności w ich obiektywnej ocenie i właściwym rozpoznaniu. Dopiero w 2010 roku grono ekspertów wypracowało jednolite kryteria oceny oraz klasyfikację aktywacji mastocytów (MCA) oraz zespołu aktywacji mastocytów (MCAS) [137]. Ustalono, że w celu rozpoznania układowych objawów wynikających z MCA konieczne jest spełnienie następujących kryteriów: 1) typowe objawy podmiotowe i przedmiotowe, 2) znaczny i przejściowy wzrost markerów uwolnionych przez komórki tłuszczowe (preferowane stężenie tryptazy mastocytarnej w surowicy, ale także histaminy bądź jej metabolitów lub prostaglandyny D2 lub jej metabolitów w moczu) w trakcie lub bezpośrednio po incydencie lub co najmniej 24 godziny po ustąpieniu objawów oraz 3) odpowiedź na leczenie inhibitorami receptorów

dla mediatorów lub lekami blokującymi aktywację komórek tucznych. Aby rozpoznać MCA muszą być spełnione wszystkie powyższe kryteria. Do typowych objawów sugerujących MCA należą: czerwienienie się, świąd, pokrzywka, obrzęk naczynioruchowy, blokada i/lub świąd nosa, obrzęk gardła, świszczący oddech, ból głowy, spadek ciśnienia oraz biegunka. Żaden z powyższych objawów nie jest charakterystyczny dla MCA, stąd koniecznie należy ocenić pozostałe kryteria diagnostyczne. Podwyższone stężenie tryptazy mastocytarnej również nie dowodzi a prawidłowe jej stężenie nie wyklucza istnienia MCA. Wzrost stężenia tryptazy w czasie reakcji anafilaktycznej następuje do 15-60 minut po wystąpieniu objawów a następnie obniża się z 2 godzinnym czasem półtrwania. Aby kryterium zostało spełnione należy stwierdzić wzrost stężenia tryptazy o co najmniej 20% oraz 2 ng/ml podczas lub 4 godziny po ustąpieniu objawów. Stosując to kryterium należy pamiętać o oznaczeniu podstawowego stężenia tryptazy w surowicy nie wcześniej niż 24 godziny po ustąpieniu objawów. Ma to na celu potwierdzenie, że objawy są przejściowe oraz wykluczenie bądź stwierdzenie podwyższonego stężenia tryptazy charakterystycznego dla mastocytozy [137]. Uważa się, że rozpoznanie MCA nie powinno stanowić rozpoznania ostatecznego. Chorego z objawami MCA należy ocenić w kierunku monoklonalnej choroby mastocytów (pierwotny MCAS), alergii bądź innej nieprawidłowości wynikiem której są objawy MCA (wtórny MCAS) lub idiopatycznego MCAS, gdy nie potwierdza się klonalność mastocytów ani nie można ustalić czynnika wywołującego aktywację komórek tucznych. Oczywiście istnienie pierwotnego MCAS nie wyklucza obecności wtórnego MCAS, a istnienie wtórnego - pierwotnego MCAS [137]. Chorzy z pierwotnym MCAS mają mastocytozę lub MMAS. Natomiast chorzy z MMAS mogą mieć wczesną lub ograniczoną postać mastocytozy układowej i podobne ryzyko wystąpienia zagrażającej życiu reakcji anafilaktycznej co chorzy z potwierdzoną mastocytozą układową. Klasyfikację MCAS przedstawiono w tabeli 17.

Tabela 17. Klasyfikacja zespołu aktywacji mastocytów MCAS [137].

Kategoria oraz wariant	Kryteria
<b>Pierwotny MCAS</b>	Spełnione kryteria MCA oraz klonalność mastocytów
<b>Mastocytoza</b>	(CD25+ i/lub KIT D816V)*

<b>Monoklonal MCAS</b>	
<b>Wtórny MCAS</b>	
<b>Alergia</b>	Spełnione kryteria MCA oraz kryteria potwierdzające alergię lub inną chorobę z obrazem klinicznym MCA
<b>Inne choroby **</b>	
<b>Idiopatyczny MCAS ***</b>	Spełnione kryteria MCA, brak rozpoznania czynnika wywołującego MCA

\* Mastocyty CD25+ oraz obecna mutacja KIT D816V lub obecna mutacja KIT D816V i brak immunofenotypu CD25+

\*\* Choroby związane z obecnością objawów MCA: choroby autoimmunologiczne, pewne infekcje bakteryjne, objawy niepożądane niektórych leków

\*\*\* Idiopatyczny MCAS stanowi rozpoznanie ostateczne, jednakże wymaga wykluczenia wszystkich potencjalnych przyczyn wystąpienia objawów MCA. Idiopatyczny oraz wtórny MCAS występować u jednego pacjenta

Jak dotąd nie ma skutecznej terapii przyczynowej mastocytozy, a leczenie polega na unikaniu czynników wyzwalających objawy, hamujących objawy aktywacji komórek tucznych oraz stosowaniu swoistej immunoterapii u chorych z potwierdzoną alergią [18]. W badaniu opisanym przez Brockowa [16] u chorych na mastocytozę stosowano leki przeciwhistaminowe i/lub glikokortykosteroidy, a adrenalinę w ampułkostrzykawce przepisywano tylko u 11% chorych. W innym badaniu opisano podobne wyniki przepisywania adrenaliny u 10% do 16% chorych z anafilaksją w wywiadzie [26,27]. Jednakże autorzy powyższych prac zalecają by każdy pacjent z mastocytozą był zaopatrzony w tak zwany zestaw ratunkowy, "emergency kit", w którego skład wchodzi ampułkostrzykawka z adrenaliną, do czasu wprowadzenia zwalidowanej oceny czynników predykcyjnych ryzyka anafilaksji do codziennej praktyki lekarskiej.

W badanej grupie chorych leczenie profilaktyczne objawów aktywacji mastocytów było nieskuteczne u 8 (10.5%), a tylko częściową regresję stwierdzono u kolejnych 14 chorych (18%). Wobec tego sugeruje się, że w przyszłości można by rozważyć leczenie biologiczne (np. omalizumab) oraz inhibitory KIT przynajmniej u osób bez regresji choroby (obecnie w trakcie badań klinicznych).

Podsumowując analizę dotyczącą anafilaksji stwierdzam, że w badaniu potwierdzono istotnie wyższą częstość występowania reakcji anafilaktycznych u chorych na mastocytozę, szczególnie na postać układową. Stwierdzono także znaczna częstość występowania objawów aktywacji mastocytów pod wpływem czynników fizycznych u chorych na mastocytozę z anafilaksją w wywiadzie. U tych pacjentów stwierdzono także wyższe stężenie tryptazy oraz częściej wykrywano mutację KIT. Wydaje się, że zespół objawów aktywacji mastocytów może być czynnikiem ryzyka anafilaksji u chorych na mastocytozę i jego występowanie powinno być oceniane u każdego chorego.

## *5.2. Ocena ekspresji genów za pomocą techniki RT-PCR*

Ponieważ liczba mastocytów we krwi obwodowej jest niewielka, różnice w ekspresji genów wynikają z różnic w ekspresji genów innych linii komórkowych. W badaniu Garcia-Montero i wsp. [45] wykazano, że mutacje KIT występują nie tylko w komórkach tucznych, ale także w innych liniach komórkowych szpiku i krwi obwodowej, a ich występowanie ma znaczenie w prognozowaniu przebiegu mastocytozy. W obecnym badaniu przedstawiono różnice w ekspresji kolejnych genów.

W badanej grupie stwierdzono istotne różnice w ekspresji genów B3GAT1 oraz ITGB1 u chorych na mastocytozę w porównaniu do osób zdrowych. Oba geny podlegały słabszej ekspresji u osób chorych na mastocytozę w porównaniu do osób zdrowych. Ponadto stwierdzono istotne różnice w ekspresji B3GAT1 w zależności od postaci choroby: SSM, ISM oraz CM. Różnica w ekspresji genu ITGB1 występowała jedynie u chorych na mastocytozę układową o łagodnym przebiegu.

Ponadto stwierdzono istotne różnice w ekspresji B3GAT1 oraz ITGB1 wśród chorych na mastocytozę z alergią na jady owadów błonkoskrzydłych (IVA) w porównaniu do chorych na mastocytozę bez anafilaksji w wywiadzie. Oba geny podlegały słabszej ekspresji u chorych na mastocytozę z IVA w porównaniu do chorych na mastocytozę bez anafilaksji w wywiadzie.

Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji genów u chorych w zależności od występowania objawów aktywacji komórek tucznych (MCAS).

Gen B3GAT1 zlokalizowany na chromosomie 11q25 koduje  $\beta$ 1,3-glukuronylotransferazę-1, która jest kluczowym enzymem zaangażowanym w biosyntezie epitopu HNK1 znanego jako CD57. Komórki zawierające antygen CD57 biorą udział w regulacji układu immunologicznego oraz są odpowiedzialne za cytotoksyczność. Olloquequi i współautorzy [110] stwierdzili ich znamienne wzrost w ekotopowych pęcherzykach limfoblastycznych (LFs - lymphoid follicles) znajdujących się w tkance płucnej chorych na POCHP. Badacze po raz pierwszy stwierdzili istotny wzrost komórek CD57+ w pęcherzykach osób chorych na POCHP w porównaniu do osób niepalących oraz palących bez POCHP. W świetle tych wyników komórki zawierające antygen CD57 stanowią marker reakcji zapalnej toczącej się w tkance płucnej [113], a nawet marker dysfunkcji całego układu immunologicznego niezależnie od choroby zasadniczej [41]. Ponadto w ostatnim czasie stwierdzono, że antygen CD57+ jest także markerem komórek ostatecznie zróżnicowanych o wysokim potencjale cytolitycznym [24]. Chattopadhyay i współautorzy [24] uważają, że ekspresja CD57 jest ściśle związana z jednoczesną ekspresją molekuł proapoptotycznych, takich jak: granzym A, granzym B oraz perforyna. Zatem zwiększona gęstość komórek CD57+ w pęcherzykach płucnych chorych na POCHP może wytłumaczyć zwiększoną ilość CD57+ w LFs z apoptozą komórek. Fakt ten potwierdza hipotezę o dysfunkcji układu immunologicznego chorych na POCHP [110]. Niezależnie od cytotoksyczności, Kim i współautorzy [67] przedstawili że część komórek CD57+ znajduje się w centrum germinalnym tkanki limfatycznej i indukuje różnicowanie komórek B oraz produkcję immunoglobulin.

Uważa się, że antygen CD57 jest markerem niezdolności limfocytów T do replikacji. Ekspresja CD57 na limfocytach CD8+ determinuje utratę zdolności do proliferacji, a związane jest to z krótszymi telomerami definiującymi replikacyjne starzenie. Limfocyty T CD57+CD8+ występują w wielu przewlekłych procesach związanych z aktywacją układu immunologicznego, takich jak infekcje wirusowe, jak zakażenie HIV-1 [14], choroby zapalne w tym reumatoidalne zapalenie stawów czy ziarniniak Wegenera oraz w procesach nowotworowych [40]. Mogą rozprzestrzeniać się także pod wpływem stresu fizycznego [131] i w procesie starzenia [133]. Mimo że mają mniejsze zdolności do proliferacji i

przeżycia, to charakteryzują się właściwością cytotoksyczną i zdolnością do migracji poza tkankę limfatyczną bez dalszego krążenia. Limfocyty T CD57+CD8+ prezentują nadmierną ekspresję cytotoksycznych genów wskazujących na większe zdolności cytotoksyczne i zwiększoną produkcję INF- $\gamma$  oraz TNF- $\alpha$  pod wpływem stymulacji TCR [24,78]. Ekspresja CD57 na limfocytach CD4+ również związana jest z obniżoną zdolnością do proliferacji, ale także zmienia funkcje limfocytów T CD4+: zwiększa produkcję INF- $\gamma$ , a obniża IL-2 [112]. Batista i współautorzy [9] ocenili rolę ekspresji antygenu CD57 na limfocytach T u chorych na łuszczycę i stwierdzili silniejszą ekspresję CD57 limfocytów CD4+ i CD8+ w skórze niezmienionej w porównaniu do skóry zmienionej, podczas gdy w zdrowej skórze kontrolnej w ogóle nie stwierdzono ekspresji CD57. Ponieważ uważa się, że CD57+ jest markerem przewlekłej stymulacji antygenowej, Batista i współautorzy sądzą, że niektóre limfocyty autoreaktywne nazywane limfocytami skin-resident znajdujące się w niezmienionej skórze chorych na łuszczycę, mogą prezentować antygen CD57 jako efekt poprzedniej stymulacji antygenowej. Ponieważ ekspresja CD57 na limfocytach T wiąże się z obniżoną zdolnością do replikacji wysoki obrót komórkowy w skórze zmienionej łuszczycowo może powodować niższą przeżywalność limfocytów T CD57+, a zatem obniżoną ekspresję antygenu CD57 w skórze zmienionej. Autorzy badania uważają, że wyższa ekspresja CD57 jest specyficzna dla niezmienionej skóry u chorych na łuszczycę, a wyniki potwierdzają różnice fenotypowe i funkcjonalne limfocytów T występujących w różnych częściach ciała chorego [9].

Złożoność układu immunologicznego stanowi nadal wyzwanie dla zrozumienia ludzkiej odporności oraz wprowadzenia metod diagnostycznych do codziennej praktyki klinicznej. W badaniu Chiang i współautorów [19] stwierdzono, że ekspresja CD57 jest użytecznym markerem obecności cytotoksycznych limfocytów T (CTLs) zawierających perforinę, co uzupełnia wyniki badania Chattopadaya i współautorów [24]. Dzięki badaniu ekspresji CD57 jako markera i porównaniu zawartości ziarnistości oraz funkcji CTLs w komórkach krwi obwodowej, stwierdzono nadspodziewane różnice w zawartości ziarnistości, ale podobne skłonności do degranulacji. Co więcej degranulacja CTLs była podobnie upośledzona w niedoborze Munc12-4, syntaxin-11 lub

Munc18-2. W opisanym badaniu porównano fenotyp oraz zawartość ziarnistości odrębnych limfocytów CD57+ ex vivo. Analiza przedstawiła różną zawartość ziarnistości cytotoksycznych. Komórki NK cechowała większa ekspresja perforyny i granzymu A niż komórki T CD8+CD57+, natomiast komórki T CD8+CD57+ większa ekspresja granzymu B. Granzym B jest potencjalnym induktorem apoptozy w mechanizmie zależnym jak i niezależnym od kaspazy. Granzym A uważany jest za słaby mediator niezależnej od kaspazy śmierci komórki. Odpowiednia aktywacja poszczególnych komórek powodowała ostatecznie śmierć komórki mimo różniących się ziarnistości cytotoksycznych. Autorzy proponują, aby ocena ekspresji CD57+ stosowana był jako marker CTLs. Ocena liczby limfocytów T CD57+ może być pomocna w diagnostyce zespołów z nieprawidłowymi CTLs. Analiza danych ilościowych degranulacji zarówno komórek NK jak i CTLs może dawać lepsze możliwości diagnostyczne u chorych z późnym początkiem FHL ze zmianami subtelnymi w cytotoksycznej degranulacji limfocytów. Skuteczność diagnostyczna analizy ilościowej degranulacji komórek CD8+CD57+ w rozpoznaniu defektów limfocytów cytotoksycznych będzie w przyszłości oceniana.

Antygen CD57 ulega także ekspresji preferencyjnie przez grupę komórek NK z fenotypem definiującym subpopulację limfocytów NK o wysokim stopniu zróżnicowania [10,82]. Komórki NK CD57+ wykazują wyższe zdolności cytotoksyczne, wyższą wrażliwość na stymulację poprzez CD16 oraz obniżoną reaktywność na cytokiny [82]. Istnieją badania wskazujące, że ekspansja komórek NK NKG2C+ związana jest z ludzkim wirusem cytomegalii (CMV), natomiast ich aktywność w odpowiedzi na komórki zawierające tego wirusa pozostaje niejasna. Zatem przedstawiono hipotezę [156], że komórki NK NKG2C+ wykazujące ekspresję CD57+ mogą posiadać wyjątkowe właściwości w zakażeniu CMV. Wu i współbadacze [156] przedstawili, że komórki NKG2C+ wykazujące silną ekspresję CD57 mogą być rozpoznawane fenotypowo jako komórki NK indukowane wirusem HCMV przez komórki zakażone wirusem HCMV. Komórki NK NKG2C+ CD57+ wykazują wysoką reaktywność w stosunku do autologicznych makrofagów zakażonych HCMV tylko przy obecności przeciwciał przeciwwirusowych. Zatem przedstawiono, że komórki NK NKG2C+ CD57+ pojawiają się wyłącznie u osób seropozytywnych pod

względem HCMV. Natomiast zmienność pojawiania się badanych komórek u osób HCMV seropozytywnych jest nadal niejasna. Sugeruje się, że może być związana ze statusem utajonej infekcji HCMV, na przykład czasem jaki upłynął od zakażenia pierwotnego oraz okresu reaktywacji zakażenia. Wiadomo, że aktywność komórek NK regulowana jest poprzez działanie na receptory aktywujące i hamujące. Wykazano, że pobudzenie receptorów NKp46, 2B4 oraz DNAM-1 prowadzi do odpowiedzi komórek NK na zakażone HCMV makrofagi [122]. Receptor NKp46 jest ważnym mediatorem cytotoksyczności komórek NK. Wchodzi w interakcje także z wirusami grypy i para grypy [68]. 2B4 jest receptorem wyraźnie aktywującym lub współaktywującym [76]. Pobudzony receptor DNAM-1 wywołuje migrację i aktywację komórek NK [75]. Autorzy pracy wykazali, że komórki NK NKG2C+ CD57+ wykazują niższy poziom ekspresji receptora aktywującego NKp46, a podobny poziom ekspresji receptorów 2B4 i DNAM-1 w porównaniu do komórek NKG2C-. Niższy poziom ekspresji receptora NKp46 może prowadzić do obniżonej odpowiedzi przeciwko zakażonym makrofagom przy braku przeciwciał przeciwko wirusowi cytomegalii. Badacze wykazali także większą ekspresję CD158b (KIR2D/L3) na komórkach NKG2C+ CD57+, co może prowadzić do osłabienia ich odpowiedzi, jednakże spostrzeżenie to wymaga dalszych badań. Przedstawili także, że komórki NKG2C+ CD57+ wysoce reaktywne wobec HCMV przy obecności przeciwciał przeciwwirusowych, a także że odpowiedź na stymulację CD16 komórek CD57+ jest lepsza niż komórek NK CD57- [156].

### *Polimorfizm B3GAT1*

Większość ludzkich białek jest potranslacyjnie modyfikowana przez kowalencyjne wiązania jednego bądź więcej kompleksu oligosacharydowego (glikanu). Zmiany w procesie glikozylacji związane są z występowaniem licznych chorób, a glikany przyciągają coraz większą uwagę z powodu tego, że mogłyby stanowić biomarkery chorób oraz cele terapeutyczne [59]. Defekty genetyczne dotyczące ścieżki biosyntezy bądź degradacji glikozylacji są związane z wieloma chorobami wrodzonymi [44,61]. Wiele białek jest modyfikowanych przez kowalencyjne wiązanie glikanów, a zatem bierze udział w składaniu i degradacji białek, przekaznictwie sygnału komórkowego, sekrecji, funkcji immunologicznej i transkrypcji [53,59,107]. Nieprawidłowa regulacja



procesu glikozylacji związana jest z szeregiem powszechnie występujących chorób takich jak: choroby nowotworowe, cukrzyca, choroby układu krążenia, układu immunologicznego czy choroby zakaźne [28,85,107]. Jednakże nadal nie poznano genetycznych regulacji procesu glikozylacji.

B3GAT1 należy do rodziny genów glukuronylotransferazy. Jego produkt pełni kluczową rolę w biosyntezie wodorowęglanowego epitopu HNK-1 i polega na dodaniu kwasu glukuronowego (GlcA) do końca N-acetyloosaktozaminowego disacharydu formując prekursor epitopu HNK-1 [90,109]. HNK-1 ulega ekspresji na limfocytach NK, ale nie został dotychczas wykryty w białkach osocza. Huffman i współautorzy [59] przedstawili za pomocą analizy spektrometrii mas, że kwas glukuronowy jest obecny na niektórych glikanach osocza składających się na pulę glikanów osocza DG13. Przeprowadzili pierwsze tak obszerne badanie genetyczne ludzkiego *glikomu* osocza oceniając glikozylację 46 cech w osoczu 3533 osób z czterech izolowanych populacji europejskich. Potwierdzili przewagę występowania loci zaangażowanych w fukozylację przejawiającą się najsilniejszym związkiem z poziomem glikanów w osoczu [59]. Dzięki postępom technologicznym w metodach analizy N-glikanów można obecnie oceniać ich cechy w wielkich kohortach. W swoim badaniu naukowcy przeanalizowali ich cechy dzięki GWAS (genome-wide association study) i wykryli wiele powiązań genome-wide wyjaśniających genetyczną kontrolę odległych szlaków biologicznych, włączając fukozylację, sializację oraz transfer glukuronowy. Wiadomo, że zmiany w niektórych z nich występują w procesach chorobowych. Fukozylacja białek ostrej fazy jest zmodyfikowana w wielu chorobach jak: ostre zapalenie [55], reumatoidalne zapalenie stawów czy cukrzyca [56]. Zmiany w poziomie fukozylowanych glikanów związane są z wieloma ważnymi procesami chorobowymi włączając nowotworzenie oraz zapalenie [116]. Autorzy uważają, że różnorodność glikozylacji białek osocza spowodowana polimorfizmem ocenianych genów, w tym B3GAT1, MGAT5 i SLC9A9, może być czynnikiem predysponującym lub prognostycznym wielu chorób, ale wymaga dalszych badań w odpowiednich kohortach [59].

Podsumowując powyższe doniesienia naukowe dotyczące genu B3GAT1 (i jego produktu) podkreślam jego rolę w odporności organizmu oraz w procesie nowotworzenia. Komórki zawierające antygen CD57 biorą udział w regulacji

układu immunologicznego oraz są odpowiedzialne za cytotoksyczność. Antygen CD57+ jest markerem komórek zróżnicowanych o wysokim potencjale cytolitycznym. Ponadto stanowi marker dysfunkcji układu immunologicznego niezależnie od choroby zasadniczej. Limfocyty CD57+ występują w wielu przewlekłych procesach związanych z aktywacją układu immunologicznego, takich jak infekcje wirusowe, choroby zapalne oraz nowotworowe, a także mogą pojawiać się pod wpływem stresu fizycznego i w procesie starzenia. Antygen CD57 wykrywany jest w prawidłowym rozwoju układu nerwowego, ale ulega także ekspresji w wysoce agresywnych komórkach neuroblastoma. Polimorfizmem między innymi genu B3GAT1 powodując różnorodność glikozylacji białek osocza może być czynnikiem predysponującym lub prognostycznym wielu chorób.

Badania Alvarez Twose i współautorów [1], Kirstensena i współautorów [72] wykazały, że u chorych na mastocytozę można stwierdzić mutację genu KIT we krwi obwodowej. Dodatkowo badacze hiszpańscy wykazali, że występuje ona nie tylko w mastocytach, ale także innych komórkach krwi. Podobnie wyniki badania ekspresji całego genomu Nidoszytko i współautorów wykazały istotne różnice w ekspresji dużej grupy genów we krwi obwodowej. Wyniki obecnego badania, wskazujące na różnicę w ekspresji genu B3GAT1, który odgrywa rolę w różnicowaniu, apoptozie i funkcjach immunologicznych licznych komórek krwi stanowią połączenie danych klinicznych pracy, jak i otwierają nowe pole do badań nad patofizjologią objawów stwierdzanych w mastocytozie.

Gen ITGB1 zlokalizowany na chromosomie 10p11.22 koduje  $\beta$ 1-integrynę, która jest zaangażowana w kancerogenezie, m. in. w raku płuca, a także w embriogenezie, hemostazie, odbudowie tkanek oraz odpowiedzi immunologicznej.

Z powodu znaczącej roli integryn w procesie nowotworowym przedstawię pokrótce kilka doniesień naukowych na ten temat. Wiodącą chorobą nowotworową będącą przyczyną największej ilości zgonów z powodu chorób nowotworowych na świecie jest rak płuca. Zdolność do tworzenia przerzutów stanowi o jego złośliwości i jest przyczyną niepowodzeń leczenia i śmierci [151]. W kaskadzie biologicznej procesu powstawania przerzutów nowotworów

dostrzega się następujące etapy: utrata przyczepności komórek, zwiększona ruchliwość i inwazyjność, przenikanie i zdolność przeżycia w układzie krążenia, rozprzestrzenianie się w nowej tkance oraz ostatecznie kolonizacja odległej lokalizacji [88]. Dotychczas wykazano, że tylko niektóre subpopulacje guza pierwotnego mają potencjał inwazyjny i przerzutowy. Na podstawie tych badań wprowadzono podstawowe pojęcia jak: subpopulacje przerzutowe oraz nieefektywność przerzutowa [98,134]. Zatem badanie różnych profili ekspresji genów między komórkami przerzutuującymi oraz nieefektywnymi przerzutowo ujawni kluczowe geny zaangażowane w procesie rozsiewu choroby nowotworowej. Wiele dowodów wskazuje, że osteopontyna ułatwia przyłączanie komórek do macierzy pozakomórkowej poprzez wiązanie do kilku rodzajów integryn, wzmacniając ekspresję i aktywność MMP-2 oraz promując wzrost guza i przerzutów poprzez aktywację szlaków przeżycia [37,42,151]. Także laminina promuje adhezję komórkową i migrację przez oddziaływanie z integrynami [108]. Wang i współautorzy [151] porównali ekspresję wybranych genów ITGB1, osteopontyny oraz LAMB3 w tkankach zawierających komórki raka płuca i dopasowanych przez barwienia immunohistochemiczne sąsiadujących zdrowych tkankach. Ekspresja powyższych genów była istotnie związana z przerzutami w węzłach chłonnych, a jej poziom był istotnie wyższy u chorych na raka płuca z przerzutami do układu limfatycznego w porównaniu do osób bez przerzutów. Poza tym poziomy ITGB1, osteopontyny i LAMB3 były istotnie wyższe w rakach pierwotnych niż w zdrowych tkankach. Badacze przedstawili, że wysokie poziomy ITGB1, osteopontyny i LAMB3 dodatkowo korelują ze stadium klinicznym, stopniem rozwoju histologicznego oraz obecnością przerzutów limfatycznych w raku płuc. Jednocześnie wskazali, że te trzy geny odgrywają istotną rolę w występowaniu i progresji raka płuca i w przyszłości mogą być celami terapeutycznymi.

W innej pracy poświęconej rozwojowi i progresji raka płuca oceniono funkcje RBP2 [159]. Autorzy publikacji wskazują, że RBP2 jest onkoproteiną ulegającą nadekspresji w raku płuca, dzięki czemu promowana jest proliferacja komórkowa, ich ruchliwość, migracja, inwazja oraz przerzutowanie. Odkryto także, że RBP2 tłumi ekspresję genu p27 a aktywuje syntezę mRNA dla cyklin D1/E1 oraz integryny  $\beta 1$  (ITGB1) w komórkach raka płuca. Białko p27 oraz

cykliny i integryny potencjalnie przyczyniają się do pośredniczonego poprzez RBP2 wzrostu komórek, a także ich migracji, inwazji i przerzutowania. Wiadomo, że integryny oraz ich receptory pośredniczą w pierwszym etapie przerzutowania, a mianowicie w interakcji komórka - macierz pozakomórkowa [148,159]. Istnieją doniesienia, że zwiększona ekspresja integryn  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  i  $\beta 3$  koreluje ze złym rokowaniem u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC) [34]. Ponadto w badaniach na liniach komórkowych NSCLC stwierdzono, że zwiększona ilość integryny  $\beta 1$  wiązała się z opornością na leczenie gefitinibem, podczas gdy jej zmniejszenie przywracało wrażliwość komórek na gefitinib [64]. Stwierdzenie, że RBP2 bezpośrednio aktywuje ekspresję integryny  $\beta 1$  sugeruje dalej, że RBP2 jest ważnym elementem pośredniczącym w przerzutowaniu raka płuca oraz jego oporności na leczenie. Mimo że ITGB1 jest zaangażowana w proliferację komórek, to w opisywanym badaniu ITGB1 nie mogła odwrócić defektu proliferacji związanej z niedoborem RBP2. Sugeruje to, że ITGB1 nie odgrywa roli we wzroście komórek następującym pod wpływem RBP2. Faktycznie istnieją doniesienia, że integryna  $\beta 1$  nie jest konieczna do proliferacji komórek raka płaskonabłonkowego sromu, ale jest ważna w procesie inwazji komórkowej [15]. Autorzy badania [159] wskazują, że RBP2 jest potencjalnym celem terapeutycznym w terapii nowotworów.

Kolejne badanie opisujące rolę integryn w onkologii układu pokarmowego zaprezentował Chang i współautorzy [23], którzy ocenili zgodność oraz siłę prognostyczną 25 genów, w tym ITGB1 w tkankach zawierających raka jelita grubego. Ekspresja każdego z genów ITGB1 oraz GRB2, PTPN11 i POSTIN w komórkach raka związana była z przeżyciem bez nawrotu choroby (disease-free survival). Pięć wybranych oznaczeń genetycznych miało wysoki wskaźnik prognozowania i było co najmniej umiarkowanie skorelowane. Wobec powyższych wyników skonstruowano sygnaturę immunohistochemiczną, która lepiej przewidywała DSS (disease specific survival) niż klasyfikacja TNM (tumour-node-metastasis). Ponieważ poza transkrypcją inne czynniki mogą mieć wpływ na poziom ekspresji białek, autorzy porównali mRNA oraz poziomy białek i potwierdzili, że poziom mRNA istotnie korelował z poziomem białek dla 4 molekuł w tkankach raka jelita grubego. Wysoki poziom mRNA dla ITGB1

oraz POSTIN w guzach wiązał się ze złym rokowaniem, podczas gdy niski poziom mRNA dla PTPN11 także przewidywał złe rokowanie.

Następne badanie przedstawiające rolę integryn w onkologii narządu rodowego przedstawili Wójcik-Krowirandra i współautorzy [154] ocenili ekspresję mRNA dla ITGB1 oraz CDH1 za pomocą techniki rt-pcr w próbkach endometrium chorych na raka trzonu macicy. Ekspresja wybranych genów była skorelowana ze złośliwością raka (G). W komórkach guza o wysokim stopniu zróżnicowania (G1), ekspresja genów CDH1 i ITGB1 była najwyższa, podczas gdy w komórkach o niższych stopniach zróżnicowania (G2 oraz G3) ekspresja obu genów była odpowiednio stopniowo niższa. Wobec powyższych wyników autorzy uważają, że poziom ekspresji genów ITGB1 oraz CDH1 stanowi marker progresji oraz tworzenia przerzutów guzów złośliwych endometrium.

Kolejne badanie ekspresji genów przeprowadzone na komórkach raka prostaty pozwoliło wykryć microRNA – MIR-506 regulujący translację i degradację mRNA dla genów ITGB1 oraz ITGB3. Autorzy badania uważają, że ITGB1 może odgrywać istotną rolę w patogenezie raka prostaty [80].

Van den Broeck i współautorzy [146] przeprowadzili badanie mające na celu zdefiniowanie charakterystyki molekularnej progresji raka trzustki (PDAC - pancreatic ductal adenocarcinoma) na podstawie badania ekspresji całego genomu przeprowadzonego w dwóch podgrupach chorych na raka trzustki z podobnymi cechami klinicznymi i patologicznymi, ale odmiennymi wskaźnikami przeżycia po leczeniu chirurgicznym. Przedstawili, że we wszystkich próbkach ścieżki integryn i efryn uległy zwiększeniu ekspresji. Obie ścieżki wydają się odgrywać ważną rolę w interakcji komórek raka z komórkami otaczającego zrębu. Receptory adhezyjne dla integryn zaangażowane są w procesie progresji guza, ponieważ za ich pośrednictwem dochodzi do oddziaływania komórek guza z mikrośrodowiskiem poprzez wiązanie bezpośrednio z macierzą pozakomórkową (ECM) [59]. Z powodu obfitości w ECM sygnalizacja adhezji komórkowej zależnej od integryn może odgrywać istotną rolę we wzroście komórek guza, ich migracji a nawet oporności na terapię [146]. W badaniach na liniach komórkowych przedstawiono, ITGB1 odgrywa kluczową rolę w progresji, a w szczególności w przerzutowaniu komórek raka trzustki [8,51]. Biorąc pod

uwagę powyższe dane, autorzy uważają, że ITGB1 a także EPHA2 mogą być markerem raka trzustki, a ich ekspresja wydaje się być związana z prognozowaniem przebiegu choroby. Ponadto wydaje się, że ITGB1 może być także potencjalnym celem terapeutycznym.

Nishioka i współautorzy [105] przedstawili, że na podstawie oceny ekspresji profilu genetycznego można przewidzieć patologiczną odpowiedź na przedoperacyjną chemoradioterapię (CRT) u chorych na raka odbytnicy. Badanie przeprowadzono w grupie 17 chorych poddanych chemoradioterapii przedoperacyjnej. Próbki tkanek pobrano przed leczeniem. 10 próbek zakwalifikowano jako odpowiadające i 7 jako nieodpowiadające na leczenie na podstawie oceny histologicznej chirurgicznie usuniętych tkanek. 17 genów uległo istotnie zróżnicowanej ekspresji między odpowiadającymi i nieodpowiadającymi na leczenie. Wszystkie geny ulegały silniejszej ekspresji w grupie odpowiadającej w porównaniu do grupy nieodpowiadającej na leczenie. Wśród genów wyróżnionych badano ekspresję MMP, NFKB2, TGFB1, TOP1 oraz ITGB1. W badaniu tym zdefiniowano wzór ekspresji genetycznej dla przewidzenia odpowiedzi na leczenie CRT poprzez dostosowane i skoncentrowane mikromacierze DNA oraz przeprowadzono immunohistochemiczną walidację genu ulegającego najsilniejszej nadekspresji, MMP7. Obecnie prowadzone są badania wieloośrodkowe, których celem jest ocena przewidywania odpowiedzi na leczenie za pomocą techniki dostosowanych i skoncentrowanych mikromacierzy DNA. Autorzy jednak podkreślają, że niezbędne jest potwierdzenie powyższych wyników w większej grupie chorych.

Kolejne badanie onkologiczne dotyczące ekspresji genów w raku żołądka miało na celu identyfikację niewielkiej grupy genów, których ekspresja przewidywałaby przeżycie [157]. Do badania włączono 48 chorych u których oceniono ekspresję 84 genów wybranych na podstawie wcześniejszych doniesień o ich udziale w transformacji nowotworowej i tumorigenezie. Wyniki pozwoliły skonstruować model składający się z trzech genów przewidujących całkowite przeżycie chorych z rakiem żołądka. W modelu tym ekspresja ITGB1, PDGFB i TWIST korelowała z krótkim przeżyciem. Wobec powyższych danych,

autorzy uważają, że integryna  $\beta 1$  mogłaby być ważnym celem terapeutycznym [157].

Odchodząc od tematyki nowotworów chciałabym przedstawić badanie z zakresu zdrowia publicznego. W celu poznania mechanizmów molekularnych i powiązanych szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za patofizjologię cytotoksyczności polichlorowanych bifenoli (PCB), Dutta i współautorzy [35] przeprowadzili badanie ekspresji genów w grupie dzieci narażonych na wysokie stężenie PCB w porównaniu do osób narażonych na niskie stężenie PCB. Badanie ekspresji profili genetycznych przeprowadzono za pomocą mikromacierzy z użyciem RNA komórek krwi obwodowej (GeneChip Human genome U133 Plus 2.0 Array). Wyniki badania wskazują, że główne zmiany molekularne oraz zmiany w funkcji komórek związane z różnicami w ekspresji zmienionych genów u dzieci narażonych na wysokie stężenia PCB dotyczyły sygnalizacji oraz interakcji międzykomórkowej, ruchu komórki, sygnalizacji komórkowej, transportu komórkowego oraz metabolizmu witamin i minerałów. Autorzy sądzą, że zmiany w ekspresji genów wydają się odgrywać kluczową rolę w rozwoju potencjalnych chorób, w tym chorób układu sercowo-naczyniowego czy nowotworowych, u osób narażonych na PCB. Podkreślają rolę kilku godnych uwagi genów: ITGB1, BCL2 i PON1, których ekspresja była istotnie zmieniona. Największą istotnością cechowały się zmiany molekularne i funkcyjne w sygnalizacji oraz interakcji międzykomórkowej. Biorąc pod uwagę istniejące doniesienia dotyczące wpływu PCB na sygnalizację komórkową [33] badacze uważają, że ekspozycja na wysokie stężenie PCB może zmieniać u ludzi przekazywanie sygnału w komórce. I tak obniżoną ekspresję stwierdzono dla ITGB1 i BCL2. Badacze stwierdzają, że molekuly ITGB1 i ITGB4 były kluczowymi molekułami powiązanymi z różnymi ścieżkami funkcjonalnymi, w których zmiany mogą dotyczyć integracji ścieżek sygnału i mogą być związane ze zmienionymi funkcjami fizjologicznymi. W podsumowaniu stwierdzają, że zmienione ITGB1, BCL2 i PON1 mogą stanowić markery narażenia na PCB.

Podsumowując powyższe doniesienia naukowe dotyczące genu ITGB1 podkreślam jego rolę w procesie nowotworzenia. Produkt genu ITGB1 należy do rodziny integryn i jest jednym z rodzajów receptorów powierzchniowych komórki propagującym wiele kluczowych sygnałów wewnątrzkomórkowych. Co

ważne, jest białkiem wielofunkcyjnym ulegającym ekspresji na komórkach śródbłonna, głównie regulującym adhezję, migrację oraz przeżycie podczas angiogenezy embrionalnej. Integryna oraz jej receptory pośredniczą w pierwszym etapie przerzutowania, a mianowicie w interakcji komórka - macierz pozakomórkowa [148,159]. Ponieważ przy braku integryny  $\beta 1$  proliferacja między innymi komórek nabłonkowych gruczołów piersiowych, keratynocytów oraz mózgowych komórek ziarnistych jest zredukowana, integryna  $\beta 1$  mogłaby być ważnym celem terapeutycznym [157]. Powiązanie doniesień o narażeniu na PCB, które wpływa na ekspresję genu ITGB1 może być ważną wskazówką w poszukiwaniu czynników środowiskowych wpływających na występowanie mastocytozy.

### *5.3. Ocena ekspresji profili genetycznych za pomocą techniki whole genome expression analysis*

Porównanie ekspresji genów w krwi obwodowej i krwi szpikowej u chorych na mastocytozę techniką *whole genom expression* wykazało istotną różnicę w ekspresji 7689 analizowanych genów. Przy przyjęciu  $p=0.00001$  i różnicy w ekspresji powyżej 8 stwierdzono istotne różnice w ekspresji 45 genów. Wśród genów o istotnej różnicy w ekspresji w krwi szpikowej nie znajdują się geny ITGB1 i B3GAT1, których ekspresja wykazała największe różnice w badaniu RT PCR. Nie znaleziono również różnic w ekspresji pozostałych 13 genów badanych metodą RT-PCR. Tak więc różnicę w ekspresji tych genów mierzoną we krwi obwodowej można odnieść do wyników badania szpiku, bez obciążenia chorego inwazyjnym zabiegiem trepanobiopsji szpiku. Funkcja genów o odmiennej ekspresji w szpiku i krwi obwodowej związana była z udziałem w cyklu komórkowym, replikacji DNA, zaangażowanych w tworzeniu linii komórkowych, co odpowiada funkcji komórek szpiku. Ponadto stwierdzono ich zaangażowanie w cyklu p53 i w procesach nowotworowych, co może mieć związek z mastocytozą.

Badanie ekspresji genów w krwi szpikowej u chorych na mastocytozę przeprowadzili D'Ambrosio i współautorzy [29]. Wykazali różnice w ekspresji 168 genów w krwi szpikowej 8 chorych na mastocytozę w porównaniu do 5 osób zdrowych, z których 104 geny ulegały nadekspresji a 64 geny obniżonej



ekspresji. Produkty genów podlegających nadekspresji zaangażowane były w proliferacji komórkowej, transformacji nowotworowej oraz apoptozie. We wnioskach autorzy zaproponowali grupę 10 genów o najwyższej różnicy w ekspresji w szpiku u chorych na mastocytozę. Należą do nich geny: GADD45 $\beta$ , CDKN1A,  $\alpha$ -Tryptase,  $\beta$ -Tryptase, MC-CPA, CLU, maf-F, TSSC-3, GATA-2, ATF-3. Spośród nich nadekspresja  $\alpha$ -Tryptase, maf-F oraz ATF-3 skorelowana była ze stężeniem tryptazy. Należy zaznaczyć, że w przedstawionej pracy uwzględniono jedynie różnicę w ekspresji genów, bez analizy statystycznej istotności wyników.

W badaniu Niedoszytko i współautorów [100] przedstawiono różnice w ekspresji profili genetycznych całego genomu u chorych na mastocytozę o łagodnym przebiegu (ISM) z IVA w porównaniu do osób bez reakcji anafilaktycznych w wywiadzie. Ze wszystkich transkryptów poddanych analizie zaobserwowano statystycznie istotnie różną ekspresję 1951 transkryptów, z czego ekspresja 49% genów była podwyższona, a 51% obniżona u chorych na ISM z IVA. Zróżnicowana ekspresja dotyczyła genów zaangażowanych w ścieżkach regulujących i mających wpływ na równowagę między proliferacją a różnicowaniem, a zatem: przekazywanie sygnału komórkowego, rozwoju organizmu, różnicowaniu komórkowym, procesach metabolicznych i transporcie jonów. Największą istotnością cechowały się ścieżki sygnału biorące udział w rozwoju raka, adhezji ogniskowej, proteolizy pod wpływem ubikwityny, sygnalizacji Wnt oraz sygnalizacji Ca. Na podstawie analizy 104 transkryptów, których ekspresja była istotnie różna u osób z ISM z IVA i bez IVA stwierdzono, że u chorych na ISM z IVA ekspresja 36% transkryptów była podwyższona, a 64% obniżona, w tym dla genu B3GAT1. Badanie dowodzi, że nie podwyższona liczba mastocytów, ale ich poziom zróżnicowania może być skorelowany z podatnością na występowanie reakcji anafilaktycznych u chorych na mastocytozę. Wyniki badania wskazują, że chorzy z ISM z bardziej zróżnicowanym fenotypem komórek tłuszczowych są w grupie ryzyka wystąpienia reakcji anafilaktycznej. Co więcej, na podstawie oceny profilu genetycznego komórek krwi obwodowej autorzy wyróżnili chorych z ISM z IVA oraz bez IVA. Zatem przedstawiono, że dzięki badaniu ekspresji genów komórek krwi obwodowej można by identyfikować chorych na ISM, u których istnieje

podwyższone ryzyko wystąpienia reakcji anafilaktycznej oraz którzy mogliby odnieść korzyść z leczenia profilaktycznego. Dane przedstawione w publikacji wskazują, że całkowita liczba mastocytów nie prowadzi do podwyższonego ryzyka wystąpienia anafilaksji. Ponadto autorzy postulują, że brak anafilaksji może być spowodowany wyraźniejszą dysfunkcją komórek tłuszczowych u chorych na mastocytozę bez reakcji anafilaktycznych w wywiadzie. Potwierdzeniem tej tezy jest badanie van Anrooij i współautorów [145], którzy stwierdzili, że im większa jest atypia komórek tłuszczowych u chorych na mastocytozę, tym bardziej zaburzona jest ich funkcja, co może prowadzić do supresji reakcji anafilaktycznej. Zatem brak HVAn u chorych z wyższą liczbą mastocytów nieprawidłowo zróżnicowanych wynika najpewniej z ich dysfunkcji.

W kolejnym badaniu oceniającym ekspresję całego genomu w komórkach krwi obwodowej Niedoszytko i współautorzy [104] przedstawili różnice w ekspresji genów i nieprawidłową ekspresję genów u chorych na mastocytozę układową w porównaniu do osób zdrowych oraz przedstawili specyficzny dla mastocytozy profil ekspresji genów. Różnice w ekspresji dotyczyły 2330 transkryptów (z 48794 transkryptów analizowanych w badaniu). Nieprawidłowości w ekspresji genów u chorych na mastocytozę układową o łagodnym przebiegu powiązane są z procesami biologicznymi występującymi także w innych chorobach. Na podstawie analizy funkcji wykazano, że głównymi szlakami, w których były zaangażowane omawiane geny o istotnie zróżnicowanej ekspresji były: proteoliza zależna od ubikwityny, ścieżka sygnalizacji MAPK oraz JAK-STAT, a także ścieżki związane ze złośliwym nowotworzeniem. Ponadto badacze zaproponowali profil ekspresji genów występujący w badanej grupie chorych na ISM, na który składa się 29 genów ulegających najbardziej zróżnicowanej ekspresji w porównywanych grupach. Geny podzielono na 2 grupy, gdzie geny z pierwszej były już opisywane w patogenezie guzów oraz w nowotworach hematologicznych. W populacji badanej zaobserwowano nadekspresję protoonkogenów oraz obniżoną ekspresję genów supresorowych. Niektóre z nich opisywano w raku płuca (ZMAT3, ACTR2 i CHNRA5), inne w raku piersi (PRR5 i PLEC1), w raku jelita grubego (PRR5), w raku jajnika (PLEC1), w ostrej białaczce szpikowej (ITGB1, ATM, ETS1 i SIAH1), w chłoniaku (LRAP) czy w zespole mielodysplastycznym (LRRFIP1). Wszystkie geny z drugiej grupy

podlegały nadekspresji w mastocytozie. Znaczne różnice w ekspresji genów zaobserwowane w badanych grupach sugerują, że badanie to mogłoby być użyteczne w diagnostyce w kierunku mastocytozy, szczególnie w różnicowaniu chorych z zespołem mieloproliferacyjnym czy nakładającym się zespołem mielodysplastycznym maskującymi mastocytozę bądź u osób odmawiających wykonania trepanobiopsji szpiku kostnego niezbędnej do rozpoznania choroby. Autorzy podkreślają jednak konieczność walidacji swoich wyników badań w niezależnej grupie chorych na mastocytozę, a także chorych na inne choroby hematologiczne w celu potwierdzenia profilu typowego dla mastocytozy. Przedstawione wyniki niewątpliwie rozpoczęły nową erę w badaniach naukowych.

#### *5.4. Rola badań ekspresji genów we współczesnej alergologii*

Badania ekspresji genów znalazły miejsce w leczeniu farmakogenetycznym chorób nowotworowych (np. w określeniu wskazań do chemioterapii w raku piersi). W alergologii znaczenie tych badań jest jeszcze niewielkie.

Ponieważ szacuje się, że 10-20% chorych z IVA jest nadal narażonych na wystąpienie anafilaksji po użądleniu przez owada mimo zakończenia leczenia [99,111] Niedoszytko i współautorzy [99] analizowali ekspresję genów całego genomu w celu oceny skuteczności swoistej immunoterapii (VIT). Przeprowadzono analizę ekspresji genów w komórkach krwi obwodowej u chorych na IVA, którzy zakończyli leczenie i porównano ich profile ekspresji z pacjentami, którzy ponownie byli żądleni przez owady mimo stosowania VIT. Z grupy genów istotnie zróżnicowanych w ekspresji wybrano te, których różnice w ekspresji były najistotniejsze. Dzięki temu stworzono model prognozowania skuteczności VIT zawierający 18 genów (z użyciem analizy naiwnej Bayesa). Badacze przedstawili profil ekspresji genów mogący pomóc różnicować chorych na IVA w zależności od skuteczności leczenia. Przedstawili wzór ekspresji genetycznej charakterystyczny dla skutecznej VIT, który stwierdzono u wszystkich chorych, którzy osiągnęli sukces w leczeniu, a który nie wystąpił u chorych z niepowodzeniem leczenia. Ponadto stwierdzono, że model ekspresji genów typowy dla osiągnięcia sukcesu w leczeniu wystąpił u 88% chorych w trakcie leczenia podtrzymującego. Podkreślają konieczność dalszej oceny tej grupy chorych, aby ocenić wartość predykcyjną opisywanego modelu. Ponadto

badacze uważają, że powinno się przeprowadzić prowokację z jadem owada po zakończeniu leczenia w celu definitywnej oceny końcowego wyniku leczenia.

W badaniu funkcjonalności genów o zróżnicowanych ekspresjach genetycznych w grupach chorych odnoszących sukces oraz niepowodzenie w leczeniu VIT przedstawiono geny zaangażowane w dobrze poznanych mechanizmach immunoterapii [99], a mianowicie FcεRI, JAK-STAT, MAPK oraz ścieżka sygnalizacji Wnt i Ca, sygnalizacji komórkowej lub transkrypcji, a także wiele transkryptów, których funkcja jeszcze nie jest znana. Co ciekawe, nie stwierdzono różnic w ekspresji genów związanych z poznanymi mechanizmami VIT, a mianowicie Il-10, Il-4 i osteopontyny. Badacze uważają, że nie wyklucza to istotnych różnic w poziomie białek czy zmian w ekspresji RNA w podgrupach komórek, jak limfocyty T regulatorowe, a może wynikać z zastosowania modelu oceny RNA z komórek krwi pełnej. Między innymi stwierdzono nadekspresję genu TWIST2 u chorych, którzy osiągnęli sukces w leczeniu. Gen ten promuje produkcję Il-10, a obniża Il-4. Ponieważ w badaniu nie stwierdzono różnic w ekspresji powyższych interleukin, uważa się, że ta nadekspresja TWIST2 może być odpowiedzialna za różnice w poziomie cytokin i podtypach komórek typowych dla immunoterapii.

Badacze stawiają ważne pytanie: czy możemy używać oceny ekspresji genów w codziennej praktyce lekarskiej? Uważa się, że ciężkość reakcji anafilaktycznej po ponownym użądleniu przez owada zależy nie tylko od czynników osobniczych chorego, ale także może być zależna od cech owada żądłącego, stanu ogólnego zdrowia chorego oraz obecności innych chorób przewlekłych czy skłonności pacjenta, a także od stosowanych leków. Dlatego Niedoszytko i współautorzy uważają, że optymalne narzędzie diagnostyczne powinno brać pod uwagę, poza ekspresją profilu genetycznego, także powyższe czynniki. Badacze podkreślają konieczność przeprowadzenia analizy ekspresji genów w większej niezależnej grupie chorych poddawanych VIT w celu oceny trafności zaproponowanego profilu. Sugerują także możliwość wykorzystania analizy ekspresji genów w celu oceny skuteczności immunoterapii swoistej z innymi alergenami by ocenić czy wzór genetyczny jest specyficzny dla alergenów w IVA czy może bardziej przewiduje mechanizm działania swoistej immunoterapii [99].

Poza opisanymi badaniami nad ekspresją genów w SM i IVA, przeprowadzono także badania w innych chorobach alergicznych. Ekspresja genetyczna była oceniana na mysim modelu desensytyzacji owoalbuminą, w której przedstawiono istotne różnice w komórkach nabłonkowych jelita [79]. Doustna immunoterapia swoista (OIT) jest metoda obiecującą i potencjalnie leczącą alergię pokarmową, ale nie zbadano dotychczas jej skuteczności i bezpieczeństwa u ludzi. Ponieważ mechanizmy klinicznej ochrony są trudne do zbadania u ludzi, a błona śluzowa jelita jest praktycznie niedostępna dla badań, stworzono myszy model doustnej immunoterapii. Następnie przeprowadzono analizę całego genomu komórek jelita myszy uczulonych w porównaniu do myszy poddawanych OIT. Badacze odkryli, że główny komponent mechanizmu ochrony klinicznej jest zlokalizowany w komórkach przewodu pokarmowego i związany jest z istotnymi zmianami ekspresji genów w jego komórkach. Ponadto odkryli, że intensywnie ogrzewany antygen niezdolny do wywołania anafilaksji może prowadzić skuteczną desensytyzację u myszy. Dodatkowo badacze uważają, że kliniczna reaktywność na alergeny pokarmowe może ulec redukcji bez zmniejszenia poziomu sIgE czy zwiększenia IgG, a za potencjalny mechanizm protekcji odpowiada IgA. Badacze zaobserwowali istotny wzrost poziomu specyficznych alergenowo IgA związanych z OIT. Podkreślają konieczność weryfikacji swoich wyników w badaniach klinicznych u chorych na alergię pokarmową ludzi.

W kolejnym badaniu [12] stwierdzono różnice w ekspresji genów w komórkach błony śluzowej nosa u chorych poddawanych immunoterapii pyłkowej. Stwierdzono tylko niewielkie różnice w proporcji limfocytów T CD4+ z ekspresją Th1 (CCR5+, CXCR3+), Th2 (CRTh2+, CCR4+) oraz Treg (CD25+, CD127-, Foxp3+). Zaobserwowano zmniejszoną ekspresję Il-4 oraz Il-10 oraz zmniejszoną sekrecję Il-10 oraz obniżenie liczby komórek Th2 CD27- u pacjentów otrzymujących aktywną substancję badaną, jednakże nie stwierdzono korelacji z korzystnym efektem klinicznym. Na podstawie badania ekspresji genów nie można zatem stwierdzić, że wspomniane zmiany w strukturze obwodowych limfocytów T CD4+ mogą stanowić marker wczesnej skutecznej odpowiedzi na immunoterapie podjęzykową.

W badaniu ekspresji genów całego genomu w komórkach krwi obwodowej u chorych na alergiczny nieżyt nosa poddawanych wieloalergenowej immunoterapii swoistej wg protokołu rush (RIT) Davis i współautorzy [31] przedstawili istotne wczesne zmiany w ekspresji genów pod wpływem RIT. W badaniu zastosowano dwa punkty czasowe analizy wyników badania: wczesny, po 7 dniach od RIT oraz późny, po 7 i 16 tygodniach od RIT. Zidentyfikowano 28 transkryptów genów, które podlegały nadekspresji oraz 16, których ekspresja była obniżona. Zidentyfikowano zmiany w genach istotnych w odpowiedzi immunologicznej wrodzonej i nabytej. Analizując wyniki ekspresji z obu punktów czasowych stwierdzono nadekspresję transkryptów dla już poznanych molekuł zaangażowanych w regulację odpowiedzi immunologicznej jak *IL-8*, *IL-1 $\beta$* , *CD40L*, *CXCL1*, *BCL-6*, *BTK* oraz *COX2*. Analizując wyniki w późnym punkcie czasowym stwierdzono zmniejszony poziom ekspresji *Fc $\epsilon$ RI* oraz wzrost poziomu *sIgG4* w surowicy. Wyniki potwierdzają model, w którym RIT indukuje szybką i silną odpowiedź komórkową Th zależną zmieniającą produkcję przeciwciał przez limfocyty B w kierunku wzrostu *IgG4*. Na podstawie wyników badania autorzy sugerują, że w następstwie RIT powstają wczesne i dynamiczne zmiany w układzie immunologicznym zaangażowanym zarówno we wrodzoną jak i nabytą odporność, które mogą być bezpośrednio związane ze zmianami w klasach alergenowo specyficznych immunoglobulin. Warto zaznaczyć, że jednym z ograniczeń badania była niewielka grupa badana składająca się tylko z trzech chorych.

Badania dotyczące ekspresji genów u chorych poddawanych immunoterapii swoistej nie są stosowane rutynowo w alergologii. Ekspresja genów może różnić się w zależności od stadium choroby, a także może być modyfikowana stosowanym leczeniem. Dlatego analiza ekspresji pojedynczych genów oraz całego genomu opisuje funkcje genomu tylko w rzeczywistym czasie analizy. Ponadto dane uzyskane z badań analizy całego genomu czy oceny ekspresji pojedynczych genów wymagają skomplikowanych procedur matematycznych do interpretacji i postawienia diagnozy [102]. Jedynym skutecznym leczeniem przyczynowym alergii na jady owadów (IVA) jest swoista immunoterapia (VIT) prowadzona od 3 do 5 lat. Na podstawie oceny próby prowokacji lub oceny użądleń oceniono jej skuteczność nawet do 95%. Dotychczas nie ma metody

laboratoryjnej oceny skuteczności VIT. W celu oceny skuteczności leczenia IVA powinno się wziąć pod uwagę dane kliniczne, współistnienie mastocytozy, profil genetyczny chorego, a także stężenia tryptazy i inne markery in vitro [102]. Należałoby postawić na rozwój badań naukowych w kierunku znalezienia narzędzia diagnostycznego mogącego wiarygodnie prognozować skuteczność swoistej immunoterapii w alergii na jady owadów, tym samym zmniejszać ryzyko wystąpienia ponownej anafilaksji poużądleniowej, wykorzystującego dane kliniczne, stężenie tryptazy oraz profil ekspresji genów. Potwierdzeniem tej sugestii jest to, że EAACI jako nadrzędny cel postawiła na poprawę molekularnych metod diagnostycznych w alergologii.

## 6. Wnioski

1. W badaniu ekspresji wybranych genów za pomocą techniki RT-PCR (z zastosowaniem kart mikrocieczowych) we krwi obwodowej stwierdzono istotne różnice w ekspresji dwóch genów: B3GAT1 oraz ITGB1 u chorych na mastocytozę w porównaniu do osób zdrowych. Ponadto stwierdzono istotne różnice w ekspresji B3GAT1 u chorych na SSM, ISM oraz CM. Różnica w ekspresji genu ITGB1 występowała jedynie u chorych na ISM.

2. Stwierdzono istotne różnice w ekspresji genów B3GAT1 oraz ITGB1 wśród chorych na mastocytozę z IVA w porównaniu do chorych na mastocytozę bez anafilaksji w wywiadzie.

3. W badaniu ekspresji profili genetycznych techniką whole genome expression analysis stwierdzono istotne różnice w ekspresji 7689 z analizowanych transkryptów. Przy ograniczeniu liczby genów do tych z różnicą w ekspresji powyżej 2 stwierdzono istotne różnice w ekspresji 943 transkryptów, natomiast przy przyjęciu  $p=0.00001$  i różnicy w ekspresji powyżej 8 stwierdzono istotne różnice w ekspresji 45 genów. Geny B3GAT i ITGB1 nie wykazywały różnicy ekspresji w szpiku w porównaniu z krwią obwodową.

4. Najczęstszymi czynnikami wywołującymi reakcje anafilaktyczne były jady owadów błonkoskrzydłych, pokarmy oraz leki.

Zidentyfikowano nieopisywane dotychczas czynniki wywołujące objawy aktywacji komórek tucznych, mianowicie czynniki fizyczne. Wobec tego można sądzić, że u chorych na mastocytozę objawy aktywacji mastocytów pod wpływem czynników fizycznych mogą stanowić czynnik ryzyka wystąpienia anafilaksji.

Ponadto do czynników ryzyka wystąpienia reakcji anafilaktycznej należały: choroba układowa oraz podwyższone stężenie tryptazy.



## 7. Streszczenie

Tytuł: Ocena ekspresji wybranych genów za pomocą techniki RT-PCR u chorych na mastocytozę.

Wprowadzenie: Mastocytoza jest grupą chorób charakteryzującą się patologicznym rozrostem oraz nagromadzeniem atypowych mastocytów w jednym lub wielu narządach. W obrazie klinicznym choroby stwierdza się objawy wynikające z uwolnienia mediatorów komórek tucznych, reakcje anafilaktyczne, a także objawy wynikające z upośledzenia funkcji zajętych narządów. Patofizjologia choroby nie jest dokładnie poznana. Badania ekspresji genów u chorych leczonych z powodu alergii na jady owadów oraz u chorych na mastocytozę układową dają nadzieję na stworzenie nowego narzędzia diagnostycznego pomocnego w leczeniu w/w chorób.

Cele pracy: Celami badania są: 1. Ocena ekspresji wybranych genów za pomocą techniki RT-PCR (z zastosowaniem kart mikrocieczowych) we krwi obwodowej oraz we krwi szpikowej u chorych z mastocytozą w zależności od stadium choroby: CM, ISM, SSM oraz ASM w porównaniu do osób zdrowych. 2. Ekspresja genów u chorych na mastocytozę z współistniejącą alergią na jady owadów oraz u chorych bez reakcji anafilaktycznych w wywiadzie. 3. Porównanie ekspresji genów we krwi obwodowej oraz we krwi szpikowej. 4. Analiza czynników wywołujących oraz określenie czynników ryzyka wystąpienia reakcji anafilaktycznych w badanej grupie chorych. Materiał i metody: Do badania zostało włączonych 152 chorych na mastocytozę leczonych w Klinice Alergologii GUMed w latach 2004 - 2011. Spośród nich wyłoniono 57 chorych, u których przeprowadzono badanie ekspresji wybranych genów za pomocą techniki RT-PCR (TaqMan® Array Micro Fluidic Cards, Applied Biosystems). Ponadto 7 chorych zakwalifikowano do porównania ekspresji profili genetycznych w próbkach RNA z krwi obwodowej i szpikowej (HT-12\_V3\_expression arrays, Illumina, San Diego). Grupę kontrolną stanowiło 19 zdrowych ochotników bez reakcji anafilaktycznych w wywiadzie. Na badanie została wydana zgoda Niezależnej Komisji Bioetycznej przy GUMed nr NKEBN/151/2010.

Wyniki: Stwierdzono istotne różnice w ekspresji genów B3GAT1 ( $p=0,006$ ) oraz ITGB1 ( $p=0,02$ ) u chorych na mastocytozę w porównaniu do osób zdrowych. Ponadto stwierdzono istotne różnice w ekspresji B3GAT1 ( $p=0,003$ ) oraz ITGB1 ( $p=0,02$ ) wśród chorych na mastocytozę z IVA w porównaniu do chorych na mastocytozę bez anafilaksji w wywiadzie. W analizie porównawczej profili ekspresji genomów we krwi obwodowej i szpikowej stwierdzono istotne różnice w ekspresji 7689 z analizowanych transkryptów. Spośród nich większe niż dwukrotne różnice w ekspresji stwierdzono w 943 transkryptach, a różnice w ekspresji powyżej 8 stwierdzono w 45 genach. Geny B3GAT i ITGB1 nie wykazywały różnicy ekspresji w szpiku w porównaniu z krwią obwodową. Występowanie reakcji anafilaktycznej w grupie badanej wynosiło 49.3%. Częstość występowania reakcji anafilaktycznych była istotnie wyższa w grupie chorych na mastocytozę układową w porównaniu do chorych na mastocytozę skóry ( $p=0.007$ ). Najczęstszymi czynnikami wywołującymi anafilaksję były: pokarmy (29%), użądlenia przez owady błonkoskrzydłe (22%) oraz leki (15%). Średnie stężenie tryptazy było wyższe u chorych z anafilaksją w wywiadzie ( $p=0.029$ ), a także wśród chorych z objawami MCAS prowokowanymi czynnikami fizycznymi ( $p=0.002$ ). Występowanie objawów MCAS prowokowanych czynnikami fizycznymi stwierdzono u 112 chorych w grupie badanej (74%) i było istotnie wyższe wśród chorych na mastocytozę układową w porównaniu do chorych na mastocytozę skóry ( $p=0.026$ ).

Wnioski: W badaniu ekspresji genów we krwi obwodowej stwierdzono istotne różnice u chorych na mastocytozę w porównaniu do osób zdrowych. Co więcej różnice te występowały także u chorych z alergią na jady owadów w porównaniu do chorych bez anafilaksji w wywiadzie. Stwierdzono również istotne różnice w ekspresji profili genetycznych we krwi obwodowej w porównaniu do krwi szpikowej. W grupie badanej stwierdzono istotne występowanie MCAS prowokowanych czynnikami fizycznymi u chorych na mastocytozę z anafilaksją w wywiadzie. W badanej grupie sBT było predyktorem występowania anafilaksji pod wpływem czynników fizycznych. Przyjmujemy, że ocena ekspresji genów może być przydatna w praktyce klinicznej w celu przewidywania rozwoju mastocytozy oraz ryzyka anafilaksji

powodowanej użądleniami przez owady błonkoskrzydłe u chorych na mastocytozę.

## 8. Abstract

Title: Gene expression profile assessment using rt-pcr in patients with mastocytosis.

Background: Mastocytosis is a group of disorders characterized by an abnormal proliferation and accumulation of atypical mast cells in different organs including bone marrow, skin, liver, spleen, lymph nodes and gastrointestinal tract. Symptoms resulting from the activation and release of mediators from the mast cells are frequent among patients with mastocytosis. The most severe - anaphylactic reactions occur in 30% of all patients with mastocytosis and in 49.3% of patients with systemic mastocytosis.

Objective: The aims of this study were: 1. to find differences in gene expression in peripheral blood cells of patients with mastocytosis compared to healthy controls; 2. to analyze any differences in gene expression in peripheral blood cells between patients with insect venom allergy (IVA) compared to patients without anaphylaxis in history; 3. to compare gene expression in peripheral blood cells to bone marrow aspirate; 4. to analyze the prevalence of the anaphylactic reactions and to identify causative and risk factors of anaphylaxis in mastocytosis patients depending on the variant of the disease.

Methods: The study group included 152 adult patients with mastocytosis. Among them 57 patients were qualified to assess gene expression analysis using RT-PCR (TaqMan® Array Micro Fluidic Cards, Applied Biosystems). Moreover 7 patients were qualified to compare gene expressions using whole genome expression analysis (HT-12\_V3\_expression arrays, Illumina, San Diego) between peripheral blood and bone marrow aspirate RNA samples. The control group included 19 healthy persons.

Results: Significant differences in gene expression were found for B3GAT1 ( $p=0,006$ ) and ITGB1 ( $p=0,02$ ) in mastocytosis patients compared to controls. Furthermore significant differences were found in gene expression for B3GAT1 ( $p=0,003$ ) and ITGB1 ( $p=0.02$ ) in patients with IVA compared to patients without anaphylaxis in the medical history. Comparison of gene expression in peripheral blood cells to bone marrow aspirate revealed a significant difference in 7689 of

the analysed transcripts. Among them a fold change difference  $> 2$  in gene expression was found in 943 of the 32379 analysed transcripts and a fold change difference  $> 8$  in gene expression was found in 45 analysed transcripts. No difference in expression was found for B3GAT1 and ITGB1 gene. The prevalence of anaphylactic reactions was 49.3%. Such reactions were more prevalent in patients with indolent systemic mastocytosis than in cutaneous mastocytosis. The most frequent triggers of anaphylaxis were food (29%), insect stings (22%) and drugs (15%). Serum tryptase levels were higher in patients with anaphylaxis ( $p=0.029$ ), also in physical factors related syndromes ( $p=0.002$ ). The frequency of those symptoms was reported in 112 (74%) patients and was higher in systemic mastocytosis patients compared with cutaneous mastocytosis ( $p=0.026$ ).

Conclusions: We found differences in gene expression in peripheral blood cells of patients with mastocytosis compared to healthy controls. Furthermore these differences were also found in patients with a history of IVA compared to those without anaphylaxis. We also found significant differences in whole genome expression in peripheral blood cells compared to bone marrow aspirate. We reported significant incidence of physical factors related syndromes in mastocytosis patients with anaphylaxis in history. Serum tryptase level was a significant predictor for the anaphylaxis resulting from physical factors. We assume that gene expression assessment may be useful in clinical practice to predict the presence of mastocytosis and the risk of anaphylaxis on insect venom in patients with mastocytosis.

## 9. Piśmiennictwo

1. A'lvarez-Twose I., de Olano D.G., Sa'nchez-Mun'oz L., Matito A., Esteban-L'opez M.I., Vega A., Mateo M.B., Alonso D'az de Durana M.D., de la Hoz B., Del Pozo Gil M.D., Caballero T., Rosado A., S'anchez Matas I., Teod'sio C., Jara-Acevedo M., Mollejo M., Garc'ia-Montero A., Orfao A., Escribano L.: Clinical, biological, and molecular characteristics of clonal mast cell disorders presenting with systemic mast cell activation symptoms. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010, 6: 1269-1278
2. Akin C., Fumo G., Yavuz A.S., Lipsky P.E., Neckers L., Metcalfe D.D.: A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood* 2004, 103, 3222-3225
3. Akin C., Kirshenbaum A.S., Semere T., Worobec A.S., Scott L.M., Metcalfe D.D.: Analysis of the surface expression of c-kit and occurrence of the c-kit Asp816Val activating mutation in T cells, B cells, and myelomonocytic cells in patients with mastocytosis. *Exp. Hematol.* 2000, 28:140-147
4. Akin C., Schwartz L.B., Kitoh T., Obayashi H., Worobec A.S., Scott L.M., Metcalfe D.D.: Soluble stem cell factor receptor (CD117) and IL-2 receptor alpha chain (CD25) levels in the plasma of patients with mastocytosis: relationships to disease severity and bone marrow pathology. *Blood* 2000, 96: 1267-1273
5. Akin C., Scott L.M., Kocabas C.N., Kushnir-Sukhov N., Brittain E., Noel P., Metcalfe D.D.: Demonstration of an aberrant mast-cell population with clonal markers in a subset of patients with "idiopathic" anaphylaxis. *Blood* 2007, 110(7): 2331-2333
6. Akin C., Valent P., Metcalfe D.D.: Mast cell activation syndrome: Proposed diagnostic criteria. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010, 126(6): 1099-1104
7. Akin C.: Anaphylaxis and Mast Cell Disease: What Is the Risk? *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2010, 10: 34-38
8. Arao S., Masumoto A., Otsuki M.: Beta1 integrins play an essential role in adhesion and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Pancreas.* 2000, 20(2): 129-37
9. Batista M.D., Tincati C., Milush J.M., Ho E.L., Ndhlovu L.C., York V.A., Kallas E.G., Kalil J., Keating S.M., Norris P.J., Chang D., Unemori P., Leslie K.S.,

- Maurer T., Liao W., Nixon D.: CD57 expression and cytokine production by T cells in lesional and unaffected skin from patients with psoriasis. *LoS ONE* 8(2): e52144. doi:10.1371/journal.pone.0052144
10. Bjorkstrom N.K., Riese P., Heuts F., Andersson S., Fauriat C., Ivarsson M.A., Bjorklund A.T., Flodstrom-Tullberg M., Michaelsson J., Rottenberg M.E., Guzman C.A., Ljunggren H.G., Malmberg K.J.: Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* 2010, 116: 3853–3864
  11. Bonadonna P., Perbellini O., Passalacqua G., Caruso B., Colarossi S., Dal Fior D., Castellani L., Bonetto C., Frattini F., Dama A., Martinelli G., Chilosi M., Senna G., Pizzolo G., Zanotti R.: Clonal mast cell disorders in patients with systemic reactions to Hymenoptera stings and increased serum tryptase levels. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009, 3: 680-686
  12. Bonvalet M., Moussu H., Wambre E., Ricarte C., Horiot S., Rimaniol A.C., Kwok W.W., Horak F., de Beaumont O., Baron-Bodo V., Moingeon P.: Allergen-specific CD4+ T cell responses in peripheral blood do not predict the early onset of clinical efficacy during grass pollen sublingual immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy* 2012, 42(12): 1745-1755
  13. Bossaller L., Burger J., Draeger R., Grimbacher B., Knoth R., Plebani A., Durandy A., Baumann U., Schlesier M., Welcher A. A., Peter H.H., Warnatz K.: ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. *J. Immunol.* 2006, 177: 4927-4932
  14. Brenchley J.M., Karandikar N.J., Betts M.R., Ambrozak D.R., Hill B.J., Crotty L.E., Casazza J.P., Kuruppu J., Migueles S.A., Connors M., Roederer M., Douek D.C., Koup R.A.: Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* 2003, 101: 2711–2720
  15. Brockbank E.C., Bridges J., Marshall C.J., Sahai E.: Integrin beta1 is required for the invasive behaviour but not proliferation of squamous cell carcinoma cells in vivo. *Br. J. Cancer* 2005, 92: 102–112
  16. Brockow K., Jofer C., Behrendt H., Ring J.: Anaphylaxis in patients with mastocytosis: a study on history, clinical features and risk factors in 120 patients. *Allergy* 2008, 63(2): 226-32.

17. Brockow K., Metcalfe D.D.: Mastocytosis. *Chem. Immunol. Allergy.* 2010, 95, 110-124
18. Brockow K., Ring J.: Update on Diagnosis and Treatment of Mastocytosis. *Curr. Allergy Asthma. Rep.* 2011, 11(4): 292-299
19. Bronner-Fraser M.: Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. *Dev. Biol.* 1986, 115: 44–55
20. Bronner-Fraser M.: Perturbation of cranial neural crest migration by the HNK-1 antibody. *Dev. Biol.* 1987; 123: 321–331
21. Carmona-Saez P., Chagoyen M., Tirado F., Carazo JM., Pascual-Montano A.: GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* 2007, 8, 1, R3
22. Caughey G.: Tryptase genetics and anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006, 117, 1411-1414
23. Chang W., Gao X., Han Y., Du Y., Liu Q., Wang L., Tan X., Zhang Q., Liu Y., Zhu Y., Yu Y., Fan X., Zhang H., Zhou W., Wang J., Fu C., Cao G.: Gene expression profiling-derived immunohistochemistry signature with high prognostic value in colorectal carcinoma. *Gut* 2013, 0: 1–11
24. Chattopadhyay P.K., Betts M.R., Price D.A., Gostick E., Horton H., Roederer M., De Rosa S.C.: The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J. Leukoc. Biol.* 2009, 85: 88–97
25. Chin K.W., Garriga M.M., Metcalfe D.D.: The histamine content of oriental foods. *Food Chem. Toxicol.* 1989, 27: 283-287
26. Clark S., Bock S.A., Gaeta T.J., Brenner B.E., Cydulka R.K., Camargo C.A.: Multicenter study of emergency department visits for food allergies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004, 113: 347–352
27. Clark S., Long A.A., Gaeta T.J., Camargo C.A.Jr.: Multicenter study of emergency department visits for insect sting allergies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005, 116: 643–649
28. Crocker P.R., Paulson J.C., Varki A.: Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2007, 7: 255–266
29. D'Ambrosio C., Akin C., Wu Y., Magnusson M.K., Metcalfe D.D.: Gene



- expression analysis in mastocytosis reveals a highly consistent profile with candidate molecular markers. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003, 112: 1162-1170
30. Daniel J.A., Santos M.A., Wang Z., Zang C., Schwab K.R., Jankovic M., Filsuf D., Chen H.T., Gazumyan A., Yamane A., Cho Y.W., Sun H.W., Ge K., Peng W., Nussenzweig M.C., Casellas R., Dressler G.R., Zhao K., Nussenzweig A.: PTIP promotes chromatin changes critical for immunoglobulin class switch recombination. *Science* 2010, 329: 917-923
  31. Davis L.S., Bhutani S., Barnett S.R., Khan D.A.: Early gene expression changes with rush immunotherapy. *Clin. Mol. Allergy* 2011, 30, 9: 12 doi: 10.1186/1476-7961-9-12
  32. de Olano D.G., de la Hoz Caballer B., Nuñez Lopez R., Sánchez Muñoz L., Cuevas Agustín M., Diéguez M.C., Alvarez Twose I., Castells M.C., Escribano Mora L.: Prevalence of allergy and anaphylactic symptoms in 210 adult and pediatric patients with mastocytosis in Spain: a study of the Spanish network on mastocytosis (REMA). *Clin. Exp. Allergy* 2007, 37: 1547-1555
  33. Dietrich C., Kaina B.: The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis*. 2010, 31(8): 1319-1328
  34. Dingemans A.M., van den Boogaart V., Vosse B.A., van Suylen R.J., Griffioen A.W., Thijssen V.L.: Integrin expression profiling identifies integrin alpha5 and beta1 as prognostic factors in early stage non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* 2010,9: 152
  35. Dutta S.K., Mitra P.S., Ghosh S., Zang S., Sonneborn D., Hertz-Picciotto I., Trnovec T., Palkovicova L., Sovcikova E., Ghimbovski S., Hoffman E.P.: Differential gene expression and a functional analysis of PCB-exposed children: understanding disease and disorder development. *Environ. Int.* 2012, 40: 143-154
  36. Ehrlich P.: *Beitrag Zur theoretic und Praxis de histologischer Faerbung* (Ph.D thesis, Leipzig, Germany: University of Leipzig; 1878)
  37. El-Tanani M.K.: Role of osteopontin in cellular signaling and metastatic phenotype. *Front. Biosci.* 2008, 13: 4276–4284
  38. Escribano L.: Mastocytosis: current concepts in diagnosis and treatment. *Ann. Hematol.* 2002, 81: 677-690
  39. Florian S., Krauth M.T., Simonitsch-Klupp I., Sperr W.R., Fritsche-Polanz R., Sonneck K., Födinger M., Agis H., Böhm A., Wimazal F., Horny H.P., Valent P.:

- Indolent Systemic Mastocytosis with Elevated Serum Tryptase, Absence of Skin Lesions, and Recurrent Severe Anaphylactoid Episodes. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2005, 136: 273–280
40. Focosi D., Bestagno M., Burrone O., Petrini M.: CD57+T lymphocytes and functional immune deficiency. *J. Leukoc. Biol.* 2010, 87: 107–116
41. Focosi D., Petrini M.: CD57 expression on lymphoma microenvironment as a new prognostic marker related to immune dysfunction. *J. Clin. Oncol.* 2007, 25: 1289–1291
42. Fong Y.C., Liu S.C., Huang C.Y., Li T.M., Hsu S.F., Kao S.T., Tsai F.J., Chen W.C., Chen C.Y., Tang C.H.: Osteopontin increases lung cancer cells migration via activation of the avb3 integrin/FAK/ Akt and NF- $\kappa$ B-dependent pathway. *Lung Cancer* 2009, 64: 263–270
43. Fontanabla A., Real P.J., Fernandez-Luna J.L., Agirre X., Prosper F., Richard C.: Identification of c-Kit gene mutations in patients with polycythemia vera. *Leuk. Res.* 2006, 30: 1325-1326
44. Freeze H.H.: Genetic defects in the human glycome. *Nat. Rev. Genet.* 2006, 7: 537–551
45. Garcia-Montero A.C., Jara-Acevedo M., Teodosio C., Sanchez M.L., Nunez R., Prados A., Aldanondo I., Sanchez L., Dominguez M., Botana L.M., Sanchez-Jimenez F., Sotlar K., Almeida J., Escribano L., Orfao A.: KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006, 108: 2366-2372
46. Gleixner K.V., Mayerhofer M., Aichberger K.J., Derdak S., Sonneck K., Böhm A., Gruze A., Samorapoompichit P., Manley P.W., Fabbro D., Pickl W.F., Sillaber C., Valent P.: PKC412 inhibits in vitro growth of neoplastic human mast cells expressing the D816V-mutated variant of KIT: comparison with AMN107, imatinib, and cladribine (2Cda) and evaluation of cooperative drug effects. *Blood* 2006, 107: 752-759
47. Golkar L., Bernhard J.D.: Mastocytosis. *Lancet.* 1997, 10, 349(9062):1379-85
48. Górska A., Niedożytko M., Chelmińska M., van Doormaal J., de Monchy J., Oude Elberink H., Jassem E.: Prevalence of insect venom allergy in mastocytosis patients and safety of VIT in Polish patients with mastocytosis [abstract]. EAACI2010 29<sup>th</sup> Congress of the European Academy of Allergy and

- Clinical Immunology. Allergy 2010, 65 (92): 100-101
49. Górska A., Niedoszytko M., Lange M.: Mastocytosis and clonal mast cell activation syndrome. *Post. Dermatol. Alergol.* 2011; 28 (3): 217-223
  50. Greenhawt M., Akin C.: Mastocytosis and allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2007, 7: 387–392
  51. Grzesiak J.J., Tran Cao H.S., Burton D.W., Kaushal S., Vargas F., Clopton P., Snyder C.S., Deftos L.J., Hoffman R.M., Bouvet M.: Knockdown of the  $\beta(1)$  integrin subunit reduces primary tumor growth and inhibits pancreatic cancer metastasis. *Int. J. Cancer.* 2011, 129(12): 2905-2915
  52. Haeberli G., Broñnimann M., Hunziker T., Müller U.: Elevated basal serum tryptase and hymenoptera venom allergy: relation to severity of sting reactions and to safety and efficacy of venom immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy* 2003, 33: 1216–1220
  53. Hart G.W., Housley M.P., Slawson C.: Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 2007, 446: 1017–1022
  54. Hartmann K.: Cutaneous mastocytosis - clinical heterogeneity. *Int. Arch. Allergy Clin. Immunol.* 2002, 127: 143-146
  55. Higai K., Aoki Y., Azuma Y., Matsumoto K.: Glycosylation of site-specific glycans of alpha1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 2005, 1725: 128–135
  56. Higai K., Azuma Y., Aoki Y., Matsumoto K.: Altered glycosylation of alpha1-acid glycoprotein in patients with inflammation and diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta* 2003, 329: 117–125
  57. Hoehner J.C., Hedborg F., Eriksson L., Sandstedt B., Grimelius L., Olsen L., Pålman S.: Developmental gene expression of sympathetic nervous system tumors reflects their histogenesis. *Lab. Invest.* 1998, 78: 29–45
  58. Horny H.P.: An Unusual Clonal Disorder of Bone Marrow-Derived Hematopoietic Progenitor Cells. *Am. J. Clin. Pathol.* 2009, 132: 438-447
  59. Huffman J.E., Knezčevic A., Vitart V., Kattla J., Adamczyk B., Novokmet M., Igl W., Pucic M., Zgaga L., Johannson Å., Redzic I., Gornik O., Zemunik T., Polasek O., Kolcic I., Pehlic M., Koeleman C.A., Campbell S., Wild S.H., Hastie N.D., Campbell H., Gyllensten U., Wuhrer M., Wilson J.F., Hayward C., Rudan I., Rudd P.M., Wright A.F., Lauc G.: Polymorphisms in B3GAT1, SLC9A9 and

- MGAT5 are associated with variation within the human plasma N-glycome of 3533 European adults. *Human Molecular Genetics* 2011, 20: 24: 5000–5011
60. Inaoui R., Petit B., Jaccard A., Bertin P., Trèves R.: Aggressive systemic mastocytosis. *Joint Bone Spine*. 2003, 70(1): 64-66
61. Jaeken J.: Congenital disorders of glycosylation (CDG): It's all in it! *J. Inherit. Metab. Dis.* 2003, 26: 99–118
62. Jeffries A.R., Mungal A.J., Dawson E., Halls K., Langford C.F., Murray R.M., Dunham I., Powell J.F.: b-1,3-Glucuronyltransferase-1 gene implicated as a candidate for a schizophrenia-like psychosis through molecular analysis of a balanced translocation. *Molecular Psychiatry* 2003, 8: 654–663
63. Johansson S.G., Bieber T., Dahl R., Friedmann P.S., Lanier B.Q., Lockey R.F., Motala C., Ortega Martell J.A., Platts-Mills T.A., Ring J., Thien F., Van Cauwenberge P., Williams H.C.: Revised nomenclature for allergy for global use: report of the Nomenclature Review Committee of the world Allergy Organization, October 2003. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004, 113: 832-836
64. Ju L., Zhou C., Li W., Yan L.: Integrin beta1 over-expression associates with resistance to tyrosine kinase inhibitor gefitinib in non-small cell lung cancer. *J. Cell Biochem.* 2010, 111: 1565–1574
65. Kanehisa M., Araki M., Goto S., Hattori M., Hirakawa M., Itoh M., Kawashima S., Okuda S., Tokimatsu T., Yamanishi Y.: KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36, 480-484
66. Kanehisa M., Goto S., Hattori M., Aoki-Kinoshita KF., Itoh M., Kawashima S., Katayama T., Araki M., Hirakawa M.: From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, 354-357
67. Kim J.R., Lim H.W., Kang S.G., Hillsamer P., Kim C.H.: Human CD57+ germinal center-T cells are the major helpers for GC-B cells and induce class switch recombination. *BMC Immunol.* 2005, 6: 3
68. Koch J., Steinle A., Watzl C., Mandelboim O.: Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol.* 2013, 34: 182–191
69. Kolligs F.T., Kolligs B., Hajra K.M., Hu G., Tani M., Cho K.R., Fearon E.R.: Gamma-catenin is regulated by the APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of beta-catenin. *Genes. Dev.* 2000, 14: 1319-1331

70. Kontou-Fili K., Filis C., Voulgari C., Panayiotidis P.G.: Omalizumab monotherapy for bee sting and unprovoked "anaphylaxis" in a patient with systemic mastocytosis and undetectable specific IgE. *Ann. Allergy Clin. Immunol.* 2010, 104: 537-539
71. Krańke B., Sturm G., Aberer W.: Negative venom skin test results and mastocytosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004, 113(1): 180-181
72. Kristensen T., Vestergaard H., Muller M.B.: Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *J. Mol. Diagn.* 2011, 13(2): 180-188
73. Kuna P., Jarmakowska K.: Patofizjologia. Mediators komórek tucznych. W Niedożytko M., Jassem E., Kruszewski J.(red.): Mastocytoza - rozpoznanie i leczenie. Białystok 2007
74. Lange M., Niedożytko B., Górska A., Zawrocki A., Sobjanek M., Kozłowski D.: Mastocytosis in children and adults: clinical disease heterogeneity. *Arch. Med. Sci.* 2012, 8(3): 533-41
75. Lanier L.L.: NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2005, 23: 225-274
76. Lanier L.L.: Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* 2008, 9: 495–502
77. Latini F.R.M., Hemerly J.P., Oler G., Riggins G.J., Cerutti J.M.: Re-expression of ABI3 -binding protein suppresses thyroid tumor growth by promoting senescence and inhibiting invasion. *Endocrine-Related Cancer* 2008, 15: 787–799
78. Le Priol Y., Puthier D., Lecureuil C., Combadiere C., Debre P., Nguyen C., Combadière B.: High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent CD8+ CD57+ cells in HIV-infected and uninfected individuals. *J. Immunol.* 2006, 177: 5145–5154.
79. Leonard S.A., Martos G., Wang W., Nowak-Węgrzyn A., Berin M.C.: Oral immunotherapy induces local protective mechanisms in the gastrointestinal mucosa. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012, 129(6): 1579-1587
80. Li J., Xu Y.H., Lu Y., Ma X.P., Chen P., Luo S.W., Jia Z.G., Liu Y., Guo Y.: Identifying Differentially Expressed Genes and Small Molecule Drugs for Prostate Cancer by a Bioinformatics Strategy. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2013, 14(9): 5281-5286

81. Longley B.J., Metcalfe D.D., Tharp M., Wang X., Tyrrell L., Lu S.Z., Heitjan D., Ma Y.: Activating and dominant inactivating c-kit catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96:1609-1614
82. Lopez-Verges S., Milush J.M., Pandey S., York V.A., Arakawa-Hoyt J., Pircher H., Norris P.J., Nixon D.F., Lanier L.L.: CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56 dim CD16NK-cell subset. *Blood* 2010, 116: 3865–3874
83. Ludolph-Hauser D., Rueff F., Fries C., Schöpf P., Przybilla B.: Constitutively raised serum concentrations of mast-cell tryptase and severe anaphylactic reactions to Hymenoptera stings. *Lancet* 2001, 357: 361–362.
84. Marone G., Bova M., Detoraki A., Onorati A.M., Rossi F.W., Spadaro G., Betoraki A.: The human heart as a shock organ in anaphylaxis. *Novartis Found. Symp.* 2004, 257: 133–149.
85. Marth J.D., Grewal P.K.: Mammalian glycosylation in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2008, 8: 874–887
86. Metcalfe D.D.: Mast cells and mastocytosis. *Blood* 2008, 112, 946-956
87. Metcalfe D.D.: Regulation of normal and neoplastic human mast cell development in mastocytosis. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 2005, 116, 185-203
88. Mierke T., Rosel D., Fabry B., Brabek J.: Contractile forces in tumor cell migration. *Eur. J. Cell Biol.* 2008, 87: 669–76
89. Mital A.: Nowotwory mieloproliferacyjne. Mastocytoza. W Szczeklik A.(red.): *Choroby wewnętrzne. Stan wiedzy na rok 2011. Medycyna Praktyczna. Kraków* 2011
90. Mitsumoto Y., Oka S., Sakuma H., Inazawa J., Kawasaki T.: Cloning and chromosomal mapping of human glucuronyltransferase involved in biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope. *Genomics* 2000, 65: 166–173
91. Molderings G.J., Meis K., Kolck U.W., Homann J., Frieling T.: Comparative analysis of mutation of tyrosine kinase kit in mast cells from patients with systemic mast cell activation syndrome and healthy subject. *Immunogenetics* 2010, 62: 721-727

92. Moneret-Vautrin D.A., Morisset M., Flabbee J., Beaudouin E., Kanny G.: Epidemiology of life-threatening and lethal anaphylaxis: a review. *Allergy* 2005, 60: 443–451
93. Müller U.R., Horat W., Wüthrich B., Conroy M., Reisman R.E.: Anaphylaxis after hymenoptera stings in three patients with urticaria pigmentosa. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1983, 72: 685–689.
94. Mueller U.R.: Cardiovascular disease and anaphylaxis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2007, 7(4): 337–341
95. Muller U., Helbling A., Hunziker T., Wüthrich B., Péroud A., Gilardi S., Beretta E., Fasel J., Messerli W., Maurer P.: Mastocytosis and atopy: a study of 33 patients with urticaria pigmentosa. *Allergy* 1990, 45: 597–603
96. Murphy S., Kelly H.W.: Cromolyn sodium: a review of mechanism and clinical use in asthma. *Drug Intell. Clin. Pharm.* 1987, 21: 22-35
97. Nedoszytko B.: Badania dodatkowe. Tryptaza i metabolity histaminy. W Nedoszytko M., Jassem E., Kruszewski J.(red.): *Mastocytoza - rozpoznanie i leczenie.* Białystok 2007
98. Nguyen D.X.: Tracing the origins of metastasis. *J. Pathol.* 2011, 223: 195–204
99. Nedoszytko M., Bruinenberg M., de Monchy J., Wijmenga C., Platteel M., Jassem E., Oude Elberink J.N.: Gene expression analysis in predicting the effectiveness of insect venom immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010, 125(5): 1092-1097
100. Nedoszytko M., Bruinenberg M., van Doormaal J.J., de Monchy J.G., Nedoszytko B., Koppelman G.H., Nawijn M.C., Wijmenga C., Jassem E., Oude Elberink J.N.G.: Gene expression analysis predicts insect venom anaphylaxis in indolent systemic mastocytosis. *Allergy* 2011, 66: 648–657
101. Nedoszytko M., de Monchy J., van Doormaal J., Jassem E., Oude Elberink J.N.G.: Mastocytosis and insect venom allergy: diagnosis, safety and efficacy of venom immunotherapy. *Allergy* 2009, 64: 1237–1245
102. Nedoszytko M., Gruchała-Nedoszytko M., Jassem E.: Gene expression analysis in allergology: the prediction of Hymenoptera venom allergy severity and treatment efficacy. *Clin. Transl. Allergy.* 2013, 27, 3: 35
103. Nedoszytko M., Lange M., Chelminska M., Jaśkiewicz K., Piskosz A., Wasag B., Lewandowski K., Mital A., Renke J., Gruchała-Nedoszytko M., Woźniak M.,

- Babińska A., Jassem E.: [Systemic mastocytosis] *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2005, 73, 3, 239-244
104. Niedozytko M., Oude Elberink J.N., Bruinenberg M., Niedozytko B., de Monchy J.G., te Meerman G.J., Weersma R.K., Mulder A.B., Jassem E., van Doormaal J.J.: Gene expression profile, pathways, and transcriptional system regulation in indolent systemic mastocytosis. *Allergy*. 2011, 66(2): 229-237
105. Nishioka M., Shimada M., Kurita N., Iwata T., Morimoto S., Yoshikawa K., Higashijima J., Miyatani T.: Gene expression profile can predict pathological response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Cancer Genomics Proteomics*. 2011, 8(2): 87-92
106. Nogales-Cadenas R., Carmona-Saez P., Vazquez M., Vicente C., Yang X., Tirado F., Carazo JM., Pascual-Montano A.: GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, 317-322
107. Ohtsubo K., Marth J.D.: Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 2006, 126: 855–867
108. Oikawa Y., Hansson J., Sasaki T., Rousselle P., Domogatskaya A., Rodin S., Tryggvason K., Patarroyo M.: Melanoma cells produce multiple laminin isoforms and strongly migrate on  $\alpha 5$  laminin(s) via several integrin receptors. *Exp. Cell. Res.* 2011, 317(8): 1119–1133
109. Oka S., Terayama K., Kawashima C., Kawasaki T.: A novel glucuronyltransferase in nervous system presumably associated with the biosynthesis of HNK-1 carbohydrate epitope on glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 1992, 267: 22711–22714
110. Olloquequi J., Montes J.F., Prats A., Rodriguez E., Montero M.A., Garcia-Valero F.: Significant increase of CD57 cells in pulmonary lymphoid follicles of COPD patients. *Eur. Respir. J.* 2011, 37: 289–298
111. Oude Elberink J.N., de Monchy J.G., Kors J.W., van Doormaal J., Dubois A.E.: Fatal anaphylaxis after a yellow jacket sting, despite immunotherapy, in two patients with mastocytosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997, 99: 153–154
112. Palmer B.E., Blyveis N., Fontenot A.P., Wilson C.C.: Functional and phenotypic characterization of CD57+ CD4+ T cells and their association with HIV-1-induced T cell dysfunction. *J. Immunol.* 2005, 175: 8415–8423



113. Palmer B.E., Mack D.G., Martin A.K., Maier L.A., Fontenot A.P.: CD57 expression correlates with alveolitis severity in subjects with beryllium-induced disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007, 120: 184–191
114. Pardanani A., Akin C., Valent P.: Pathogenesis, clinical features, and treatment advances in mastocytosis. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2006, 19(3): 595-615
115. Peavy R., Metcalfe D.D.: Understanding the mechanisms of anaphylaxis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2008, 8: 310–315
116. Peracaula R., Sarrats A., Rudd P.M.: Liver proteins as sensor of human malignancies and inflammation. *Proteomics Clin. Appl.* 2010, 4: 426–431
117. Pitt T.J., Cisneros N., Kalicinsky C., Becker A.B.: Successful treatment of idiopathic anaphylaxis in an adolescent. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010, 126: 415-416
118. Potier A., Lavigne C.D., Chappardz J., Verret J.L., Chevailler A., Nicolie B., Drouet M.: Cutaneous manifestations in Hymenoptera and Diptera anaphylaxis: relationship with basal serum tryptase. *Clin. Exp. Allergy* 2009, 39: 717–725
119. Regnier C.H., Tomasetto C., Moog-Lutz C., Chenard M.P., Wendling C., Basset P., Rio M.C.: Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma. *J. Biol. Chem.* 1995, 270: 25715-25721
120. Reimers A., Muller U.: Fatal outcome of a *Vespula* sting in a patient with mastocytosis after specific immunotherapy with honey bee venom. *Allergy Clin. Immunol. Int. J. WAO Org.* 2005, 17: 68–70
121. Ring J., Messmer K.: Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet* 1977,1: 466-469
122. Romo N., Magri G., Muntasell A., Heredia G., Baia D., Angulo A., Guma M., Lopez-Botet M.: Natural killer cell-mediated response to human cytomegalovirus-infected macrophages is modulated by their functional polarization. *J. Leukoc. Biol.* 2011, 90: 717–726
123. Rueff F., Placzek M., Przybilla B.: Mastocytosis and hymenoptera venom allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2006, 6: 284–288
124. Ruëff F., Wenderoth A., Przybilla B.: Patients still reacting to a sting challenge while receiving conventional Hymenoptera venom immunotherapy are protected

- by increased venom doses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001, 108(6): 1027-32
125. Rueff F., Przybilla B., Bilo M.B., Muller U., Scheipl F., Aberer W., Birnbaum J., Bodzenta-Lukaszyk A., Bonifazi F., Bucher C., Campi P., Darsow U., Egger C., Haeberli G., Hawranek T., Körner M., Kucharewicz I., Küchenhoff H., Lang R., Quercia O., Reider N., Severino M., Sticherling M., Sturm G.J., Wüthrich B.: Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase—a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009,124: 1047–1054
126. Schlitter A.M., Dorneburg C., Barth T.F.E., Wahl J., Schulte J.H., Brüderlein S., Debatin K.M., Beltinger C.: CD57high Neuroblastoma Cells Have Aggressive Attributes Ex Situ and an Undifferentiated Phenotype in Patients. *PLoS ONE* 2012; 7(8): e42025. doi:10.1371/journal.pone.0042025
127. Schwartz L.: Tryptase, a mediator of human mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1990, 86, 594-598
128. Schwartz LB: Diagnostic value of tryptase in anaphylaxis and mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006;26:451–463
129. Schwarz-Romond T., Asbrand C., Bakkens J., Kuhl M., Schaeffer H.J., Huelsken J., Behrens J., Hammerschmidt M., Birchmeier W.: The ankyrin repeat protein diversin recruits casein kinase I-epsilon to the beta-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. *Genes Dev.* 2002, 16: 2073-2084
130. Simons F.E.: Anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010,125: 161-181
131. Simpson R.J., Cosgrove C., Ingram L.A., Florida-James G.D., Whyte G.P., Pircher H., Guy K.: Senescent T-lymphocytes are mobilised into the peripheral blood compartment in young and older humans after exhaustive exercise. *Brain Behav. Immun.* 2008, 22: 544–551
132. Sonneck K., Florian S., Müllauer L., Wimazal F., Födinger M., Sperr W.R., Valent P.: Diagnostic and subdiagnostic accumulation of mast cells in the bone marrow of patients with anaphylaxis: monoclonal mast cell activation syndrome. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2007,142: 158-64.

133. Tarazona R., DelaRosa O., Alonso C., Ostos B., Espejo J., Peña J., Solana R.: Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mech. Ageing Dev.* 2000, 121: 77–88.
134. Tarin D.: Clinical and Biological Implications of the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron.* 2012, 5: 95–112
135. The diagnosis and management of anaphylaxis. Joint Task Force on Practice Parameters, American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, American College of Allergy, Asthma and Immunology, and the Joint Council of Allergy, Asthma and Immunology. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1998, 101: 465-528
136. Uusitalo M., Schlotzer-Schrehardt U., Kivela T.: Ultrastructural localization of the HNK-1 carbohydrate epitope to glial and neuronal cells of the human retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003, 44: 961-964
137. Valent P., Akin C., Sperr W.R., Mayerhofer M., Födinger M., Fritsche-Polanz R., Sotlar K., Escribano L., Arock M., Horny H.P., Metcalfe D.D.: Mastocytosis: Pathology, genetics, and current options for therapy. *Leuk. Lymphoma.* 2005, 46(1): 35–48
138. Valent P., Akin C., Arock M., Brockow K., Butterfield J.H., Carter M.C., Castells M., Escribano L., Hartmann K., Lieberman P., Nedoszytko B., Orfao A., Schwartz L.B., Sotlar K., Sperr W.R., Triggiani M., Valenta R., Horny H.P., Metcalfe D.D.: Definitions, Criteria and Global Classification of Mast Cell Disorders with Special Reference to Mast Cell Activation Syndromes: A Consensus Proposal. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012, 157: 215–225
139. Valent P., Akin C., Escribano L., Födinger M., Hartmann K., Brockow K., Castells M., Sperr W.R., Kluijn-Nelemans H.C., Hamdy N.A., Lortholary O., Robyn J., van Doormaal J., Sotlar K., Hauswirth A.W., Arock M., Hermine O., Hellmann A., Triggiani M., Nedoszytko M., Schwartz L.B., Orfao A., Horny H.P., Metcalfe D.D.: Standards and standardization in mastocytosis: Consensus Statements on Diagnostics, Treatment Recommendations and Response Criteria. *Eur. J. Clin. Invest.* 2007, 37, 435–453
140. Valent P., Arock M., Bischoff S.C., Bühring H.J., Brockow K., Escribano L., Födinger M., Grabbe J., Hartmann K., Henz B.M., Horny H.P., Kluijn-Nelemans H.C., Lima M., Marone G., Orfao A., Parwaresch R.M., Sillaber C., Sotlar K., Sperr W.R., Triggiani M., Van Doormaal J.J., Wolff K., Zuberbier T.: The

- European Competence Network on Mastocytosis (ECNM). *Wien. Klin. Wochenschr.* 2004, 116: 647-651
141. Valent P., Horny H.P., Escribano L., Longley B.J., Li C.Y., Schwartz L.B., Marone G., Nuñez R., Akin C., Sotlar K., Sperr W.R., Wolff K., Brunning R.D., Parwaresch R.M., Austen K.F., Lennert K., Metcalfe D.D., Vardiman J.W., Bennett J.M.: Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: A consensus proposal. *Leuk. Res.* 2001, 25: 603–625.
142. Valent P., Horny H.P., Li C.Y. i wsp.: World Health Organization (WHO) Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Oxford, Oxford University Press, 2001, 1: 291–302.
143. Valent P., Sperr W.R., Schwartz L.B., Horny H.P.: Classification of systemic mast cell disorders: Delineation from immunologic disease and non mast cell lineage hematopoietic neoplasms. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004,114: 3-11
144. Valent P.: Mast cell activation syndromes: definition and classification. *Allergy* 2013, 68: 417-424
145. van Anrooij B., van der Veer E., de Monchy J.G., van der Heide S., Kluijn-Nelemans J.C., van Voorst Vader P.C., van Doormaal J.J., Oude Elberink J.N.: Higher mast cell load decreases the risk of Hymenoptera venom-induced anaphylaxis in patients with mastocytosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013, 132(1): 125-30
146. Van den Broeck A., Vankelecom H., Van Eijnsden R., Govaere O., Topal B.: Molecular markers associated with outcome and metastasis in human pancreatic cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2012, 31 :68
147. van Doormaal J.J., Arends S., Brunekreeft K.L., van der Wal V.B., Sietsma J., van Voorst Vader P.C., Oude Elberink J.N., Kluijn-Nelemans J.C., van der Veer E., de Monchy J.G.: Prevalence of indolent systemic mastocytosis in a Dutch region. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013, 131(5): 1429-1431
148. van Zijl F., Krupitza G., Mikulits W.: Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat. Res.* 2011, 728: 23–34
149. Vlieg-Boerstra B.J., van der Heide S., Oude Elberink J.N.G., Kluijn-Nelemans J.C., Dubois E.A.J.: Mastocytosis and adverse reactions to biogenic amines and histamine-releasing foods: what is the evidence? *Neth. J. Med.* 2005, 63: 244-249

150. Vrdima J.: The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002, 100: 2292-302
151. Wang X.M., Li J., Yan M.X., Liu L., Jia D.S., Geng Q., Lin H.C., He X.H., Li J.J., Yao M.: Integrative Analyses Identify Osteopontin, LAMB3 and ITGB1 as Critical Pro-Metastatic Genes for Lung Cancer. *PLoS ONE* 2013, 8(2): e55714 doi:10.1371/journal.pone.0055714
152. Webb L.M., Lieberman P.: Anaphylaxis: a review of 601 cases. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2006, 97: 39–43
153. Welch C., Santra M.K., El-Assaad W., Zhu X., Huber W.E., Keys R.A., Teodoro J.G., Green M.R.: Identification of a protein, G0S2, that lacks Bcl-2 homology domains and interacts with and antagonizes Bcl-2. *Cancer Res.* 2009, 69: 6782-6789
154. Wójcik-Krowiranda K., Forma E., Zaczek A., Bryś M., Anna M.K., Bieńkiewicz A.: Expression of E-cadherin and beta1-integrin mRNA in endometrial cancer. *Ginekol. Pol.* 2013, 84(11): 910-914
155. Wolff K., Komar M., Petzelbauer P.: Clinical and histopathological aspects of cutaneous mastocytosis. *Leuk. Res.* 2001, 25: 519-528
156. Wu Z., Sinzger C., Frascaroli G., Reichel J., Bayer C., Wang L., Schirmbeck R., Mertensa T.: Human Cytomegalovirus-Induced NKG2Chi CD57hi Natural Killer Cells Are Effectors Dependent on Humoral Antiviral Immunity. *JVI* 2013, 87: 7717-7725
157. Xu Z.Y., Chen J.S., Shu Y.Q.: Gene expression profile towards the prediction of patient survival of gastric cancer. *Biomed. Pharmacother.* 2010, 64(2): 133-139
158. Yang Y., Letard S., Borge L.: Pediatric mastocytosis associated KIT extracellular domain mutations exhibit different functional and signaling properties compared with KIT-phosphotransferase domain mutations. *Blood* 2010, 116: 114-1123
159. Yu-Ching Teng Y.C., Lee C.F., Li Y.S., Chen Y.R., Hsiao P.W., Chan M.Y., Lin F.Y., Huang H.D., Chen Y.T., Jeng Y.M., Hsu C.H., Yan Q., Tsai M.D., Juan L.J.: Histone Demethylase RBP2 Promotes Lung Tumorigenesis and Cancer Metastasis. *Cancer Res.* 2013, 73(15): 4711-21