



Karol Kempieński

Analiza skuteczności i bezpieczeństwa leczenia oraz prospektywne badanie ekspresji wybranych genów za pomocą techniki RT-PCR u chorych z alergią na jad owadów błonkoskrzydłych.

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. Marek Niedożytko, prof. nadzw. GUMed

Klinika Alergologii

Katedry Pneumonologii i Alergologii

Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk 2016

Podziękowania

- Dr hab. n. med. Marta Chełmińska, Klinika Alergologii i Pneumonologii GUMed
- Dr n. med. Aleksandra Górka, Klinika Alergologii i Pneumonologii GUMed
- Prof. dr hab. n. med. Ewa Jassem, Klinika Alergologii i Pneumonologii GUMed
- Prof. dr hab. n. med. Janusz Limon, Zakład Biologii i Genetyki GUMed
- Dr hab. n. med. Agnieszka Maciejewska, Katedra Medycyny Sądowej GUMed
- Prof. dr hab. n. med. Ryszard Pawłowski, Katedra Medycyny Sądowej GUMed
- Dr n. med. Marcin Skrzypski, Klinika Onkologii i Radioterapii GUMed

SPIS TREŚCI

| | |
|--|----|
| Wykaz stosowanych skrótów | 6 |
| <u>1. Wstęp</u> | 9 |
| 1.1 Epidemiologia | 9 |
| 1.2. Charakterystyka błonkówek | 10 |
| 1.3. Patofizjologia alergii na jad owadów | 13 |
| 1.3.1 Jady | 13 |
| 1.3.2 Reakcje po użądleniach | 13 |
| 1.4 Diagnostyka alergii na jad owadów błonkoskrzydłych | 15 |
| 1.5 Leczenie alergii na jad owadów błonkoskrzydłych | 18 |
| 1.5.1 Leczenie doraźne i profilaktyka użądleń | 18 |
| 1.5.2 Immunoterapia z jadem owadów błonkoskrzydłych (VIT) | 20 |
| 1.5.2.1 Mechanizm immunoterapii | 21 |
| 1.5.2.2 Ocena skuteczności VIT | 21 |
| 1.5.2.2.1 Długość terapii i nasilenie pierwotnej reakcji po użądleniu | 22 |
| 1.5.2.2.2 Dobór szczepionki i rodzaju terapii | 24 |
| 1.5.2.2.3 Przebieg i bezpieczeństwo terapii | 25 |
| 1.5.2.2.4 Wyjściowe stężenie tryptazy w surowicy i choroby związane z aktywacją mastocytów | 27 |
| 1.5.2.2.5 Wiek, płeć i choroby współistniejące | 29 |
| 1.5.2.2.6 Częstotliwość ekspozycji | 30 |
| 1.5.2.2.7 Inne czynniki predykcyjne skuteczności VIT | 30 |
| <u>2. Cele pracy</u> | 32 |
| <u>3. Materiały i metody</u> | 33 |
| 3.1 Opis grupy badanej | 33 |
| 3.2 Kryteria włączenia i wyłączenia | 34 |
| 3.3 Opis grupy kontrolnej badania ekspresji genów | 34 |
| 3.4 Opis procedur wykonywanych u chorych | 34 |
| 3.4.1 Pobranie materiału oraz przeprowadzenie badań genetycznych | 35 |
| 3.4.2 Wybór genów do badania | 38 |
| 3.4.3 Krótka charakterystyka wybranych genów | 39 |
| 3.5 Analiza ekspresji genów | 45 |

| | |
|---|----|
| <u>4. Wyniki</u> | 46 |
| 4.1 Wyniki części klinicznej | 46 |
| 4.1.1 Charakterystyka kliniczna badanych | 46 |
| 4.1.2 Wyniki badania skuteczności w grupie chorych w trakcie i po zakończonym VIT | 46 |
| 4.1.3 Wyniki badania wpływu wybranych czynników klinicznych na nasilenie reakcji po użądleniu, bezpieczeństwo i skuteczność VIT | 54 |
| 4.1.3.1 Płeć | 54 |
| 4.1.3.2 Wiek | 55 |
| 4.1.3.3 Immunoterapia z jadem osy i z jadem pszczoły | 56 |
| 4.1.3.4 Działania niepożądane | 58 |
| 4.1.3.5 Długość terapii | 59 |
| 4.1.3.6 Choroby układu krążenia | 59 |
| 4.1.3.7 Mastocytoza | 60 |
| 4.1.3.8 Choroby atopowe | 61 |
| 4.1.3.9 Choroby gruczołu tarczowego | 62 |
| 4.1.3.10 Choroby autoimmunologiczne | 62 |
| 4.2 Wyniki badania ekspresji genów z zastosowaniem techniki RT-PCR | 66 |
| 4.2.1 Wyniki badania ekspresji 15 wybranych genów z użyciem kart mikrocieczowych u chorych z alergią na jad osy w porównaniu do osób zdrowych | 66 |
| 4.2.2 Wyniki badania ekspresji 15 wybranych genów z użyciem kart mikrocieczowych u chorych przed i w trakcie VIT z jadem osy | 68 |
| <u>5. Omówienie wyników</u> | 69 |
| 5.1 Skuteczność immunoterapii | 69 |
| 5.2 Wpływ czynników klinicznych na skuteczność immunoterapii z jadem | 72 |
| 5.2.1 Tryptaza mastocytarna, mastocytoza | 72 |
| 5.2.2 Wiek i płeć chorych | 74 |
| 5.2.3 Choroby układu krążenia | 75 |
| 5.2.4 Działania niepożądane VIT | 75 |
| 5.2.5 Alergia na jad osy vs alergia na jad pszczoły | 76 |
| 5.2.6 Długość immunoterapii | 77 |

| | |
|--|-----|
| <i>5.2.7 Choroby autoimmunologiczne, choroby atopowe, choroby tarczycy</i> | 78 |
| <i>5.3 Różnice w ekspresji genów</i> | 79 |
| <i>5.3.1 Różnice w ekspresji genów pomiędzy chorymi na HVA a chorymi bez chorób alergicznych w wywiadzie</i> | 79 |
| <i>5.3.2 Różnice w ekspresji genów u chorych na HVA przed i w trakcie VIT z jadem osy</i> | 84 |
| <u><i>6. Wnioski</i></u> | 89 |
| <u><i>7. Streszczenie</i></u> | 90 |
| <u><i>8. Abstract</i></u> | 92 |
| <u><i>9. Wykaz rycin, tabel, wykresów i zdjęć.</i></u> | 94 |
| <u><i>10. Bibliografia</i></u> | 97 |
| <u><i>11. Suplement</i></u> | 118 |
| <i>11.1 Ankieta</i> | 118 |

Wykaz stosowanych skrótów

AIT – *allergen immunotherapy* / immunoterapia alergenowa

APC – *antigen-presenting cell* / komórka prezentująca antygen

AR – *adverse reaction* / działanie niepożądane

BAL – *bronchoalveolar lavage* / płukanie oskrzelowo-płucne

BAT – *basophil activation test* / test aktywacji bazofilów

BP – *biological process* / process biologiczny

CCD – *cross-reactive carbohydrate determinant* / krzyżowo reagująca determinanta węglowodanowa

CDK – *cyclin-dependent kinase* / kinaza zależna od cyklin

CRD – *component-resolved diagnosis* / diagnostyka molekularna oparta na oznaczaniu przeciwciał przeciwko alergenom rekombinowanym

CRIT – *component-resolved immunotherapy* / immunoterapia z użyciem alergenów rekombinowanych

DCs – *dendritic cells* / komórki dendrytyczne

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

EADOAS – badanie '*the Effect of Antihypertensive Drugs on severity of Anaphylaxis and Side-effects during venom immunotherapy*'

ECAP – badanie Epidemiologia Chorób Alergicznych w Polsce

FEV1 – *forced expiratory volume in 1 second* / natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa

GWAS – *genome-wide association study* / badania asocjacyjne całego genomu

HVA – *hymenoptera venom allergy* / alergia na jady owadów błonkoskrzydłych

IFN – interferon

IgA – immunoglobulina A

IgG – immunoglobulina G

IKK – *inhibitor kappa B ($I\kappa B$) kinase* / kinaza inhibitora kappa B

IL – *interleukin* / interleukina

inhACE – *angiotensin-converting-enzyme inhibitor* / inhibitor konwertazy
angiotensyny

JAK – *Janus-activated kinase* / kinaza Janusowa

LLR – *large local reaction* / duża reakcja lokalna

LPS – *bacterial lipopolysaccharides* / lipopolisacharydy bakteryjne

ŁZS – łuszczycowe zapalenie stawów

MAPK – *mitogen-activated protein kinases* / kinazy aktywowane mitogenami

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

MFC RT-PCR – *microfluidic card reverse transcription polymerase chain reaction* /
reakcja łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją i użyciem kart
mikrocieczowych

MHC – *major histocompatibility complex* / główny układ zgodności tkankowej

NF κ B – *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* / czynnik
jądrowy wzmacniający sekwencję łańcucha lekkiego *kappa* aktywowanych
limfocytów B

NIAID - *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* / Narodowy Instytut
Alergii i Chorób Zakaźnych (amerykański)

PBL – *peripheral blood leukocyte* / leukocyty krążące w krwi obwodowej

PBS – *phosphate buffered saline* / zbuforowany roztwór soli fizjologicznej

PCR – *polymerase chain reaction* / reakcja łańcuchowej polimerazy

p-MCAS – *primary monoclonal mast cell activation syndrome* / pierwotny monoklonalny zespół aktywacji mastocytów

PUFA – *polyunsaturated fatty acids* / wielonienasycone kwasy tłuszczowe

RAST – *radioallergosorbent test* / test radioalergosorbpcji

RIN – *RNA integrity numer* / współczynnik integralności RNA

RMS – *rhabdomyosarcoma* / mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy

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

RZS – reumatoidalne zapalenie stawów

slgE – *specific immunoglobuline E* / swoista immunoglobulina E

SLIT – *sublingual immunotherapy* / immunoterapia podjęzykowa

SM –skala Muellera

SNP – *single nucleotide polymorphism* / polimorfizm pojedynczego nukleotydu

SPT - *skin prick test* / punktowe testy skórne

STAT – *signal transducer and activator of transcription* / grupa białek odpowiedzialna za transdukcję sygnału i aktywację transkrypcji

TGF β - *transforming growth factor beta* / transformujący czynnik wzrostu beta

TLR – *toll-like receptor* / receptory typu toll-like

TNF – *tumor necrosis factor* / czynnik martwicy nowotworu

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

ZZSK – zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa

1. Wstęp

Alergia na jad owadów jest rozpoznawana u chorych, u których wystąpiła co najmniej jedna reakcja systemowa po użądleniu przez owada i wykazany został mechanizm IgE-zależny nadwrażliwości na alergeny jadu ¹. Choroba wiąże się z ryzykiem ponownego wystąpienia zagrażającej życiu reakcji anafilaktycznej, łączy się ze znacząco obniżoną jakością życia oraz upośledzoną zdolnością do pracy ²³.

1.1 Epidemiologia

W zależności od klimatu danego kraju 56,6-94,5% mieszkańców deklaruje, że była użądlnona przez owady błonkoskrzydłe przynajmniej raz w życiu ⁴. Około 10% spośród żądlnych podaje nadwrażliwość na jad, u 50-100% udaje się obiektywnie potwierdzić alergię ⁵. W Europie problem anafilaksji dotyczy 0,05% do 5,1% ogółu populacji, oraz od 0,3% do 8,9% żądlnych, przy śmiertelności rzędu 0,03 do 1,6 na 10⁶ mieszkańców na rok ⁶⁻⁹. Dowodem na niedoszacowanie powyższych danych może być badanie amerykańskie, w którym wykazano post-mortem podwyższone stężenie sIgE przeciw jadom u 23% osób, które w sposób nagły i niewytłumaczalny zmarły na świeżym powietrzu w okresie od maja do listopada ¹⁰. Wśród grup zawodowych narażonych na użądlenia te odsetki wydają się jeszcze większe. W jednym z badań 6,5% pszczelarzy deklarowało reakcję uogólnioną po użądleniu w ciągu ostatnich 12 miesięcy; 9/494 (2%) z tych reakcji przebiegało z objawami ze strony układu oddechowego i krążenia ¹¹. Reakcje anafilaktyczne po użądleniu owada należą do najczęstszych przyczyn anafilaksji i zgonu w jej przebiegu. Częstość występowania reakcji anafilaktycznych różni się w zależności od badanej populacji (położenie geograficzne, wiek, choroby współistniejące) ⁴⁶¹². Duże reakcje lokalne (ang. *local large reactions*; LLR) po użądleniu, które charakteryzują się obrzękiem o średnicy większej niż 10cm i czasem trwania powyżej 24 godzin, występują u 2,4% do 26,4% żądlnych ¹.

W Polsce, w badaniu ECAP, 2-3% respondentów deklarowało nadwrażliwość na jad owadów ¹³. W badaniach Nittner-Marszalskiej aż 20,7% mieszkańców Dolnego Śląska opisało u siebie objawy alergii na jad błonkówek, w tym 11,8% LLR a 8,9% reakcje systemowe, u około połowy z nich potwierdzono uczulenie na jad, co ciekawe

dodatnie wyniki testów występowały u 17% żądlnych bez objawów nadwrażliwości¹⁴.

Stwierdzone różnice wyników badań prawdopodobnie uwarunkowane są dużymi różnicami w ekspozycji pomiędzy regionami geograficznymi wynikającymi m.in. z okresu i intensywności rojenia owadów⁸.

1.2 Charakterystyka błonkówek

Owady z rzędu błonkoskrzydłych (*Hymenoptera*) to między innymi pszczoły, osy i mrówki. Znajomość klasyfikacji błonkówek jest pomocna w diagnostyce i leczeniu alergii na jad, zwłaszcza przy doborze właściwego jadu do testów i immunoterapii u chorych z anafilaksją w wywiadzie.

Większość uogólnionych reakcji w Polsce występuje po użądleniach przez owady reprezentujące rząd błonkoskrzydłych z nadrodziny pszczołowatych (*Apidae*): pszczoła, trzmiel, oraz osowatych (*Vespidae*): osa, szerszeń wraz z rzadko występującym rodzajem klecanki (*Polistes*) – Ryc. 1.

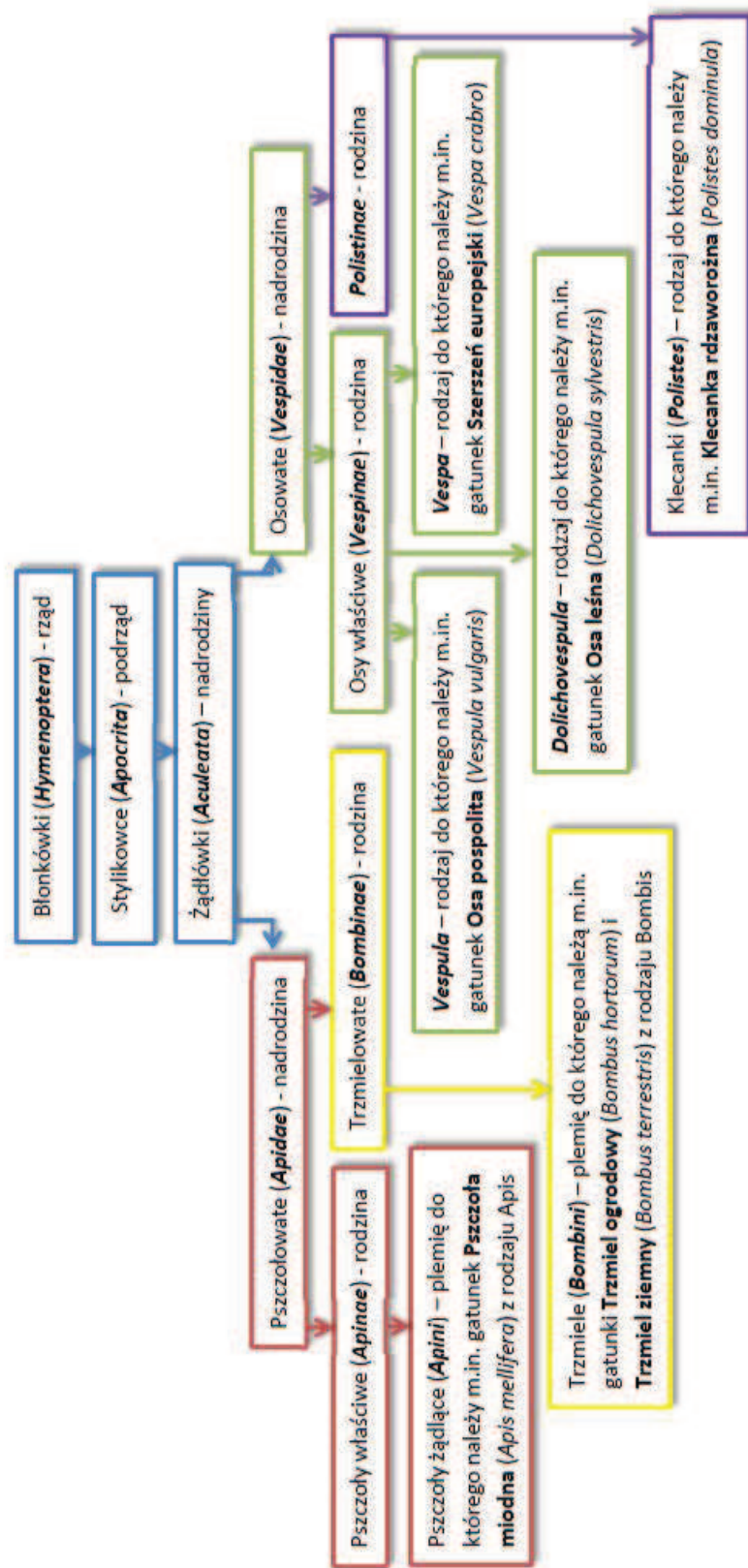
Osa pospolita (*Vespa vulgaris*) – jest owadem najczęściej powodującym reakcje po użądleniu⁶. Owady wielkości 12-20mm o charakterystycznym kształcie i ubarwieniu (Zdj. 1) roją się od marca do października, gniazdują w ziemi. Osy nie pozostawiają żądła w skórze wobec czego mogą żądlić wielokrotnie pozostawiając od 2-17 μg jadu. Użądlenia najczęściej wiążą się ze spożywaniem słodkich pokarmów i napojów, zwłaszcza na świeżym powietrzu²⁷³. Pszczoła miodna (*Apis mellifera*) – równie charakterystyczny owad (zdj.2) o wielkości 12,7-25,3mm, roją się od marca do października, ale wylatują również w słoneczne zimowe dni. Samica pszczoły może użądlić tylko raz i po użądleniu ginie;



Zdj. 1 Osa pospolita (*Vespa vulgaris*)²⁷⁴



Zdj. 2 Pszczoła miodna (*Apis mellifera*)²⁷⁴



Ryc. 1 . Skrócona klasyfikacja błonkoskrzydłych istotnych ze względu na potencjalne zagrożenie reakcją po użądleniu na terenie Polski i Europy Środkowej. W obrębie nadrodziny *Apidae* oraz rodziny *Vespidae* występuje istotna klinicznie reaktywność krzyżowa na jad. Pomiędzy nadrodzinami *Vespidae* i *Apidae*, a także rodzinami *Vespinae* i *Polistinae* reaktywność krzyżowa jest ograniczona¹⁶.

wynika to z faktu, że pozostawia w skórze człowieka fragment odwłoka z aparatem żądłowym. Budowa i mechanizm działania żądła powodują dalsze jego zagłębianie się w skórze i wstrzykiwanie pozostałej w woreczku porcji jadu ¹⁵. Pszczoła podaje 50-140 μg jadu w trakcie użądlenia. Najczęściej atakuje w pasiekach, sadach i ogrodach. Nie żądli niesprovokowana. Gniazduje w ulach i dziuplach.

Szerszeń europejski (*Vespa crabro*) – największy z osowatych występujących w Europie Środkowej, osiąga rozmiary od 17 do 35mm (zdj. 3), roi się od marca do października. Znacznie mniej agresywny niż osa, żądłąc nie pozostawia żądła. Pozostawia prawdopodobnie mniej niż 200 μg jadu, a zwykle broniąc się około 10 μg . Gniazdowanie – dziuple, poddasza, strychy, garaże ,a także kominy i systemy wentylacyjne itp.

Trzmiel (*Bombus*) – ogrodowy (*hortorum*), ziemny (*terrestris* – zdj.4), kamiennik (*lapidarius*), gajowy (*lucorum*) czy rudy (*pascuorum*) to często spotykane, mało agresywne owady rojące się w zależności od gatunku od marca do października, i osiągające rozmiary od 9 do 30mm. Uczuleni na jad trzmieli są przede wszystkim narażeni zawodowo (np. leśnicy, pracownicy szklarni). Owady te żądłąc nie pozostawiają żądła, podają około 10 do 31 μg jadu. Gniazdują w różnych miejscach w zależności od gatunku: ziemia, dziuple, kupki kamieni lub gałęzi.

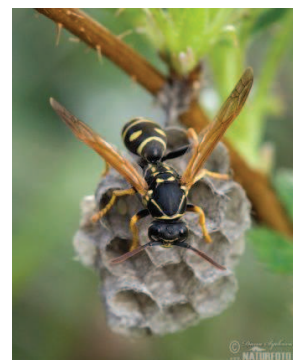
Znacznie rzadziej żądłące osy leśne (*Dolichovespula sylvestris*) i niezwykle rzadko powodujące anafilaksję, występujące w Polsce, klecanki rdzaworożne (*Polistes dominula* – zdj.5) czy klecanki polne (*Polistes nimpha*) mogą dawać reakcje krzyżowe w alergii na jad osy, a ich użądlenia należą do najbardziej bolesnych ¹⁶.



Zdj.3 - Szerszeń europejski (*Vespa crabro*) ²⁷⁴



Zdj. 4 – Trzmiel ziemny (*Bombus terrestris*) ²⁷⁴
str. 12



Zdj. 5 – Klecanka rdzaworożna (*Polistes dominula*) ²⁷⁴

1.3 Patofizjologia alergii na jad owadów

1.3.1 Jady

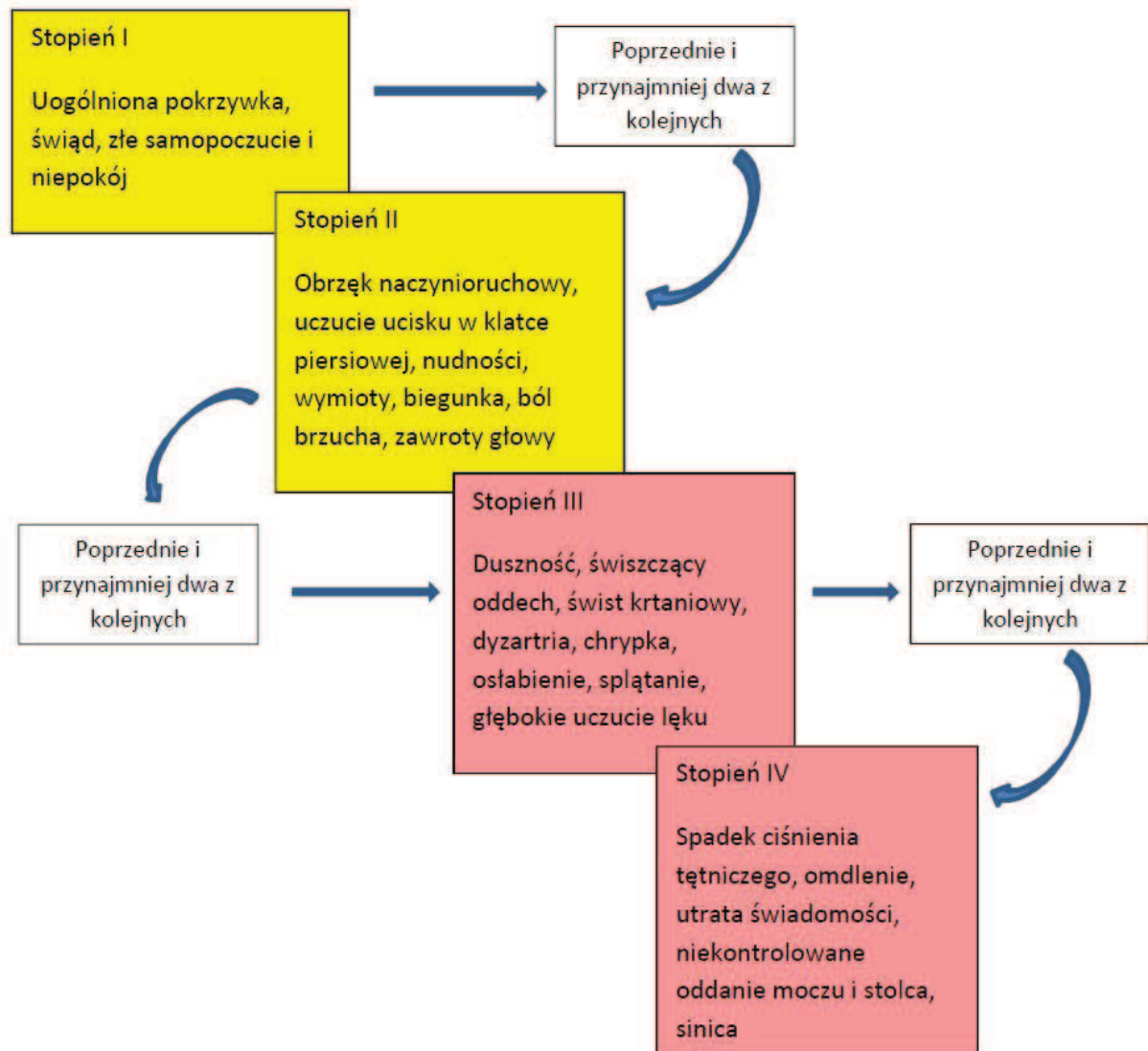
Jady błonkówek są swoistym koktajlem amin biogennych, białek o małej i dużej masie molekularnej, toksyn i wielu innych. Składnikami jadu odpowiedzialnymi za reakcje po użądleniach są głównie białka enzymatyczne, glikoproteiny o niskiej masie molekularnej (10-50 kDa). Zdecydowanie najlepiej scharakteryzowany jest skład jadu pszczoły. Zidentyfikowano tu przynajmniej 113 substancji białkowych w jadzie¹⁷, o masie białkowej 3-200 kDa. Wśród pszczołowatych, z bardzo dużym stopniem homologii pomiędzy pszczołami i trzmielami, to białka takie jak fosfolipaza A2 (np. Api m1 dla pszczoły miodnej lub Bom t1 dla trzmiela ziemnego, homologia 53% – wg oficjalnej nomenklatury^{7,18}), fosfataza kwaśna (Api m3), czy panalergeny takie jak dipeptydylopeptydaza IV (Api m5), hialuronidaza (Api m2) i witellogenina (Api m12), które wykazują podobieństwo z substancjami obecnymi w jadzie osowatych (odpowiednio Ves v3, Ves v2 i Ves v6 dla osy pospolitej). W jadach występują również białka o innym charakterze często warunkujące izolowaną nadwrażliwość na dany rodzaj błonkówek, np. mellityna (Api m4) czy ikarapina 2 (Api m10). Wśród osowatych krzyżową reaktywność warunkuje homologia występującej dość powszechnie w tym rodzaju fosfolipazy A1B (np. Vesp c1 dla szerszenia europejskiego lub Ves v1 dla osy pospolitej), czy tzw. antygeny 5, który nie występuje u pszczołowatych, ale jest dość powszechny wśród *Vespidae* (Ves v5, czy Pol d5 dla kłecanki rdzaworożnej)¹⁶, homologia białek jadu u osowatych sięga 95%⁷.

Wiedza na temat składu molekularnego jadu rozwija się niezwykle szybko, niestety wydaje się, że równie szybko może zmieniać się jego skład, w związku z dużą heterogenicznością białek czy zmienną ich glikozylacją, które są wyrazem naturalnego dostosowywania się gatunków do środowiska¹⁹.

1.3.2 Reakcje po użądleniach.

Normalne reakcje po użądleniu zwykle charakteryzuje się jako reakcje lokalne, w miejscu użądlenia, przebiegające z bólem, zaczerwienieniem i niewielkim obrzękiem o średnicy do 10cm ustępujące zwykle do 24 godzin.

Alergiczne reakcje systemowe obejmujące skórę, układ pokarmowy, oddechowy i krwionośny, w większości przypadków są IgE-zależne. Do innych rzadziej występujących mechanizmów nadwrażliwości należą: aktywacja dopełniacza, niedobór angiotensynogenu, cytotoksyczność. Najczęściej klasyfikuje się je według skali Muellera⁷ (Ryc.2).



Ryc. 2. Klasyfikacja reakcji systemowych po użądleniach wg H.L. Mueller²⁷⁵.

Do najcięższych reakcji po użądleniach należą reakcje anafilaktyczne. Anafilaksja jest ciężką, uogólnioną bądź systemową reakcją z nadwrażliwości, potencjalnie zagrażającą życiu. Charakteryzuje się gwałtownym przebiegiem z groźnymi dla życia zaburzeniami oddychania i/lub dróg oddechowych, i/lub krążenia, zwykle, lecz nie zawsze, związanymi z objawami ze strony skóry i błon śluzowych^{20,21}. Anafilaksja

jest wskazaniem do leczenia przyczynowego HVA (ang. *hymenoptera venom allergy*; HVA).

Po użądleniach możliwe są również reakcje alergiczne opóźnione (objawy alergii kontaktowej, reakcje dwufazowe), nietypowe (zawał serca, zaburzenia rytmu i przewodzenia, niedokrwienie OUN, zapalenie wielonerwowe, zapalenie nerwu wzrokowego, zapalenie mózgu, objawy zespołu demielinizacyjnego, epizody drgawkowe, skaza małopłytkowa, niedokrwistość hemolityczna, zespół wykrzepiania wewnątrznaczyniowego, plamica typu Henocha i Schoenleina, kłębuszkowe i śródmiąższowe zapalenie nerek), oraz toksyczne spowodowane proteolitycznym działaniem jadu (rabdomioliza i hemoliza, ostra niewydolność nerek, obrzęk mózgu, uszkodzenie wątroby, cewkowo-śródmiaższowe zapalenie nerek i wykrzepianie wewnątrznaczyniowe). Reakcja toksyczna występuje po użądleniu przez kilkadziesiąt pszczoł lub kilkaset os²².

1.4 Diagnostyka alergii na jad owadów błonkoskrzydłych

Standard diagnostyki obejmuje dokładny wywiad dotyczący przebiegu reakcji, wraz z próbą identyfikacji owada żądającego oraz obecności sIgE przeciwko składnikom jadu. W celu potwierdzenia alergii sIgE zależnej stosowane są testy skórne i/lub oznaczenie stężenia sIgE w surowicy krwi wykonane nie wcześniej niż 2 tygodnie od użądlenia (do tego czasu sIgE mogą być trudno lub niewykrywalne dostępnymi metodami). W przypadkach, kiedy chory nie jest pewny co do tego jaki owad go użądlił, diagnostyka jest znacząco utrudniona w związku z problemami i ograniczeniami obu testów np.: do 50% chorych wykazuje uczulenie na więcej niż jeden jad. Niektóre ograniczenia wynikają z użycia wyciągu z całego jadu do testu co podobnie jak w innego rodzaju wyciągach diagnostycznych takich jak pyłki i kurz domowy może generować dużą zmienność w składzie alergenowym¹⁹.

Diagnostyka alergii na jad owadów powinna być podejmowana tylko u chorych z wywiadem reakcji systemowej po użądleniu. Zalecenie to wynika z wysokiego odsetka występowania bezobjawowego uczulenia w populacji europejskiej, sięgającego 27,1-40,7%²³. Ostatnie badania pokazują iż tylko 5,3% uczulonych na jad błonkówek z dodatnim wynikiem sIgE, ale bez reakcji uogólnionej w wywiadzie,

zareaguje systemowo na ponowne użądlenie, w porównaniu do 25-52% z anafilaksją po użądleniu, niemniej mają oni 9,5 razy większe ryzyko wystąpienia LLR²⁴.

Testy in-vivo obejmują testy skórne ze standaryzowanymi wyciągami jadu osy i pszczoły (1-100 µg/ml), a w przypadku ich ujemnych wyników wykonuje się testy śródskórne ze stężeniami od 0,001 µg/ml do 1 µg/ml jadu. Wyższe stężenia mogą dawać wyniki fałszywie pozytywne. Czułość i swoistość testów skórnych może osiągać 80%^{7,25,26}.

Testy in-vitro opierają się głównie na oznaczaniu specyficznych IgE metodami immunoenzymatycznymi. Specyficzność tych testów waha się od 82 do 98%, przy czułości od 53 do 91% ze stosunkowo najniższą wartością dla alergenów pokarmowych²⁷. Niedoskonałość testów może wynikać ze zróżnicowanej zawartości alergenów w wyciągach z naturalnego jadu. Api m1 i Api m4 stanowią odpowiednio 12 i 50% suchej masy jadu (przy czym Api m4 nie jest alergenem głównym, czyli takim, który uczula przynajmniej 50% chorych), natomiast istotne alergeny takie jak Api m3, Api m5 czy Api m10 stanowią mniej niż 1% lub może nie być ich wcale²⁸.

Jedną z głównych przyczyn uczulenia bezobjawowego, a także kłopotów diagnostycznych związanych z tzw. podwójnym uczuleniem, zarówno na jad osy i pszczoły jest występowanie sIgE skierowanych przeciwko tzw. determinantom węglowodanowym (ang. *cross-reactive carbohydrate determinants*; CCDs) obecnym na glikozyłowanych białkach, zarówno roślinnych jak i zwierzęcych (białka glikozyłowane w jadzie błonkówek to np.: Api m1-3, Api m10, Ves v2-3). Silnie immunogenną, odpowiedzialną za około 75% reakcji krzyżowych, jest alfa-1,3-fukoza, jednak komercyjnie najczęściej dostępne są przeciwciała skierowane na epitop w postaci łańcucha glikoproteinowego – MUXF3, pochodzące z glikoprotein roślinnych takich jak bromeleina, peroksydaza chrzanowa, czy oksydaza askorbinianowa²⁹. Zastosowanie przeciwciał anty-CCD może być pomocne w różnicowaniu reakcji krzyżowych. Należy pamiętać, że ich podwyższone stężenie nie wyklucza alergii na więcej niż jeden rodzaj jadu^{19,29-31}.

Obecnie dzięki biologii molekularnej można oznaczać sIgE przeciwko tzw. rekombinowanym alergenom (ang. *component-resolved diagnosis*; CRD). Są to białka produkowane przez stymulowane sztucznie drobnoustroje lub linie

komórkowe, i tak np.: system oparty na komórkach larwy motyla *Spodoptera frugiperda* (Sf9) można zaprogramować do produkcji oczyszczonych i wolnych od glikozylacji Api m10³². Niemniej jednak w codziennej diagnostyce dostępne są jedynie niektóre z głównych alergenów (Api m1, Api m2, Api m10, Ves v1, Ves v5 i Pol d5) co pozwala osiągnąć około 92-98% czułości i swoistości w przypadku diagnozy HVA na jad osy, lecz niewystarczającą w przypadku jadu pszczoły. Do uzyskania 95% czułości potrzeba tu aż sześciu testów (Api m1-5 oraz Api m10)^{19,29}, natomiast zastosowanie Ves v1-5 pozwala osiągnąć do 100% czułości w przypadku alergii na jad osy²⁹. Badania Michel i wsp. pokazują iż u chorych z mastocytozą użycie CRD obniża ryzyko wyników fałszywie ujemnych o około 8% w stosunku do standardowej diagnostyki³³.

Oznaczenia sIgE przy zastosowaniu alergenów rekombinowanych w połączeniu z oznaczeniem anty-CCD umożliwiają obecnie najbardziej dokładną identyfikację alergenu rzeczywiście wywołującego anafilaksję po użądleniu, ograniczając efekt tzw. fałszywej polisensytyzacji³⁴.

U około 2% chorych z anafilaksją po użądleniu nie udaje się oznaczyć sIgE dostępnymi metodami. U tych chorych zaleca się użycie testu aktywacji bazofilów (ang. *basophil activation test*; BAT). BAT polega na zastosowaniu cytometrii przepływowej w celu oznaczenia stopnia ekspresji charakterystycznych markerów powierzchniowych (CD63 i CD203c) na powierzchni bazofilów w obecności jadu, które są znacznikami aktywacji i świadczą o alergii³⁵. BAT wydaje się przewyższać oznaczenia sIgE zwłaszcza u chorych z mastocytozą³⁶, także biorąc pod uwagę sIgE z użyciem alergenów rekombinowanych²⁶. Wykazuje mniejszy odsetek fałszywej polisensytyzacji³⁷, a ostatnie badania nad BAT z użyciem alergenów rekombinowanych dają nadzieję na przezwycięzenie tego problemu^{26,37,38}.

Problemem w wykorzystaniu BAT wydaje się być przede wszystkim ciągle duża różnorodność w technice wykonywania testu. Wyniki pracy EuroBAT (grupy działającej przy Europejskiej Akademii Alergii i Immunologii Klinicznej (ang. *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*; EAACI) zmierzają do standaryzacji i ostatecznego określenia klinicznej wartości BAT m.in. w rozpoznawaniu alergii na jad owadów błonkoskrzydłych (czułość 85-100%, swoistość

83-100%), przewidywaniu ciężkości anafilaksji czy monitorowaniu skuteczności i działań niepożądanych VIT (ang. *venom immunotherapy*; VIT) ³⁷.

Inne testy in-vitro takie jak testy zahamowania (*CAP-inhibition*, *RAST-inhibition*) są dobrą alternatywą w przypadku wątpliwości diagnostycznych ³⁹, ale wciąż pozostają kontrowersje co do ich koszt- i czasochłonności oraz wątpliwości interpretacyjnych.

Nadal wyzwaniem diagnostycznym poza chorymi z uczuleniem bezobjawowym, lub fałszywym podwójnym uczuleniem są chorzy, u których powyższe testy diagnostyczne są ujemne pomimo anafilaksji w wywiadzie. Najczęściej dotyczy to chorych z mastocytozą układową i może być związane z dużą absorpcją krążących IgE przez komórki, bądź aktywnością samego jadu. W tej grupie chorych wykonywano próbę prowokacyjną z żywym owadem, jednak obecnie uważana się, że jest to postępowanie nieetyczne przed włączeniem immunoterapii ²⁵.

Od wielu lat do standardu diagnostyki HVA dołącza oznaczenie stężenia tryptazy w surowicy krwi. Wyników można użyć jako markera anafilaksji, gdzie próbka krwi powinna być pobrana 15 minut do 3 godzin od wystąpienia reakcji a potem do kilku godzin po jej ustąpieniu. Wysokie stężenie w trakcie reakcji pomaga w różnicowaniu rozpoznania. Jest to także badanie przesiewowe dla mastocytozy. Badania kliniczne pozwoliły na zastosowanie tryptazy jako testu pomocnego w określaniu ryzyka anafilaksji, przewidywania ciężkości reakcji, a także przewidywania przebiegu i skuteczności VIT ^{26,35}.

1.5 Leczenie alergii na jad owadów błonkoskrzydłych.

1.5.1 Leczenie doraźne i profilaktyka użądleń

U osób uczulonych na jad zaleca się zachowanie zasad profilaktyki użądleń w trakcie okresu rojenia się owadów. W zakres postępowania profilaktycznego wchodzi: powstrzymanie się od picia, jedzenia i uprawiania sportu na świeżym powietrzu, a zwłaszcza w miejscach gdzie kwitną kwiaty a na ziemi mogą leżeć owoce; unikanie chodzenia bez obuwia; utrzymywanie miejsc składowania śmieci szczelnie zamkniętych; ubieranie się w niejaskrawe kolory (biały, zielony, beżowy) oraz w miarę możliwości zakrywając powierzchnię skóry (długie nogawki, długie rękawy, kapelusze, rękawiczki, okulary); unikanie prac ziemnych w ogrodzie i zbierania

owoców; zakaz samodzielnego usuwania gniazd owadów; unikanie przebywania w pobliżu pasiek w okresie zbioru miodu ⁴⁰. U chorych leczonych z powodu niepowikłanego nadciśnienia tętniczego zaleca się zamianę, jeżeli to możliwe, B-blokerów i inhibitorów konwertazy angiotensyny II (inhACE), ze względu na możliwość zwiększenia ryzyka ciężkiego przebiegu anafilaksji i ograniczenia w skuteczności leczenia reakcji systemowych ²⁰. Obecnie prowadzone jest wielośrodkowe badanie EADOAS, które ma ocenić bezpieczeństwo leczenia nadciśnienia tętniczego u chorych leczonych z powodu alergii na jady owadów ⁴¹. U chorych leczonych z powodu choroby wieńcowej leczenie można kontynuować stosując te grupy leków. Wszystkie te działania nie zapobiegają w pełni anafilaksji po użądleniu, a mogą być przyczyną znaczącego obniżenia jakości życia chorego ^{1,42}.

Nie jest również znana skuteczna profilaktyka farmakologiczna. Chorzy z anafilaksją w wywiadzie powinni być wyposażeni w doraźne zestawy ratunkowe będące pierwszą linią leczenia po zadziałaniu czynnika sprawczego. I tak w przypadku HVA w skład takiego zestawu ma wchodzić autostrzykawka z adrenaliną (do samodzielnego podania), porcja podwójnej dobowej dawki doustnego leku przeciwhistaminowego (np.: cetyryzyna lub loratadyna 20mg) i ewentualnie glikokortykosteroid doustny (np.: prednizon 100mg) ¹. Dowody na korzyści ze stosowania steroidów w anafilaksji wciąż pozostawiają wątpliwości i zalecenia co do ich stosowania mają charakter opinii ekspertów²⁰.

Pierwszą linią leczenia anafilaksji jest usunięcie czynnika sprawczego i podanie adrenaliny. Jest to jedyny lek leczący wszystkie objawy uogólnionej reakcji alergicznej. Wczesne podanie adrenaliny jest interwencją ratującą życie i ogranicza konieczność przyjęcia chorego do szpitala. Nie ma bezwzględnych przeciwwskazań do zastosowania adrenaliny. Wobec tych faktów każdy chory z anafilaksją po użądleniu powinien przyjąć w zależności od wieku chorego: od 0-6 lat – 0,15mg; 6-12 lat – 0,3mg; powyżej 12 r.ż. – 0,5mg domięśniowo (górnym, zewnętrznym kwadrantem uda); lub w przeliczeniu na masę ciała: 0,01ml/kg adrenaliny w stężeniu 1mg/ml. Drugą linią leczenia jest odpowiednie ułożenie chorego, tlenoterapia i płynoterapia oraz podanie B2-mimetyków wziewnie. Trzecią linią winno być podanie leków przeciwhistaminowych oraz ewentualnie glikokortykosteroidów dożylnie.

Szczegółowe wytyczne leczenia anafilaksji przekraczają ramy niniejszego opracowania i są przedmiotem licznych publikacji i wytycznych^{20,21,42}.

1.5.2 Immunoterapia z jadem owadów błonkoskrzydłych (VIT)

Chorzy z anafilaksją po użądleniu w wywiadzie kwalifikowani są do immunoterapii. Od 1974 roku VIT jest ciągle udoskonalaną i najskuteczniejszą metodą leczenia alergii na jad owadów, zarówno w odniesieniu do zapobiegania reakcjom systemowym jak i do poprawy jakości życia^{1,43,44}. Obecnie funkcjonuje kilka zalecanych schematów immunoterapii¹. Z reguły standardową dawkę podtrzymującą - 100 µg jadu - podaje się co 4 tygodnie przez 3-5 lat, dzięki czemu ryzyko ponownej reakcji systemowej może spaść z przedziału 30-70% do 2-15%, co daje ryzyko zbliżone do ogółu populacji dorosłych^{45,46}. Niemniej jednak ciągle u części chorych terapia jest nieskuteczna.

Wskazaniem do zwiększenia dawki podtrzymującej do 200 µg są kolejne reakcje systemowe w trakcie fazy podtrzymującej immunoterapii, zarówno po kolejnych iniekcjach leku jak i po użądleniach oraz wysokie środowiskowe ryzyko użądleń (np.: w przypadku pszczelarzy). Wykazano, iż prawdopodobnie poprzez zwiększenie dawki podtrzymującej u niemal wszystkich chorych leczenie może być skuteczne^{1,47}. Niemniej jednak nawet w Stanach Zjednoczonych gdzie podaje się chorym w terapii podtrzymującej 300 µg mieszanki jadów błonkoskrzydłych do 2% chorych nie jest zabezpieczonych⁴⁸.

Wybór chorych poddawanych VIT polega głównie na ocenie danych z wywiadu, takich jak historia reakcji po użądleniach i obecności czynników ryzyka ponownej reakcji systemowej. Wskazaniem do immunoterapii jest, zarówno u dzieci jak i dorosłych, przebyte ciężkiej, systemowej reakcji obejmującej objawy ze strony układu krążenia i oddechowego – 3 lub 4 stopień wg klasyfikacji Muellera - oraz udokumentowane za pomocą testów skórnych i/lub stężenia sIgE, IgE-zależny mechanizm nadwrażliwości na jad odpowiedniego owada¹. Uczulenie bez przebytej reakcji nie jest wskazaniem do VIT. Ujemne testy skórne (u około 20-35% chorych z alergią) nie są z kolei czynnikiem dyskwalifikującym, jeśli uda wykazać się IgE-zależny mechanizm nadwrażliwości innymi badaniami immunologicznymi, takimi jak sIgE czy BAT. Przebieg leczenia u tych chorych jest taki sam jak u osób z dodatnimi

wynikami testów skórnych^{46,49}. Dopuszcza się rozpoczęcie VIT w przypadku reakcji niezagrażających życiu (II stopień reakcji wg Muellera) przy współistniejących czynnikach zwiększających ich ryzyko, a także w przypadku znacznego upośledzenia jakości życia spowodowanego na przykład silnym lękiem przed użądleniem¹.

Istotna dla przebiegu leczenia jest również odpowiednia premedykacja. Chorzy poddawani VIT odnoszą korzyść ze stałego przyjmowania leków blokujących receptory H1⁵⁰, natomiast istnieją dane wskazujące na negatywny wpływ przyjmowania blokerów receptorów H2 na przebieg i efektywność immunoterapii⁵¹.

1.5.2.1 Mechanizm immunoterapii

Nie ulega obecnie wątpliwości, że u większości chorych można osiągnąć stan tolerancji poprzez immunoterapię z jadem owadów (VIT, ang. *venom immunotherapy*)^{44,52}. Jednak mechanizm tego procesu nie jest wystarczająco poznany. Długotrwała tolerancja kliniczna i immunologiczna polega na zmianie profilu alergenowo-specyficznych komórek pamięci T i B, syntezie izotypów specyficznych przeciwciał według niezapalnego wzorca, i w końcu zahamowaniu aktywacji, migracji i degranulacji komórek efektorowych⁹.

Uważa się, że główną rolę w uzyskaniu anergii bierze udział stymulowanie przez VIT populacji limfocytów T regulatorowych, czego wyrazem jest wzrost stężenia w surowicy IL-10 oraz TGFβ, jako głównych interleukin regulatorowych dla procesów zapalnych. Wskazuje się m.in. na związane z tym supresorowy efekt w stosunku do obwodowych limfocytów Th2, Th1 i Th17; ograniczenie zarówno ilości komórek tucznych, bazofili (efekt wczesny, desensytyzacja) i eozynofili jak i ilości degranulowanych przez nie cytokin prozapalnych; zmniejszenie stężenia sIgE w odniesieniu do IgG4, IgA i IgG1 poprzez stymulację populacji limfocytów B regulatorowych; oraz zmianę profilu antygenowego i funkcji komórek dendrytycznych^{53,54}.

1.5.2.2 Ocena skuteczności VIT

Szereg długotrwałych obserwacji, dotyczących okresu po zakończeniu VIT wskazuje, że od 2,7% do 17% chorych poddanych terapii ponownie reaguje systemowo na

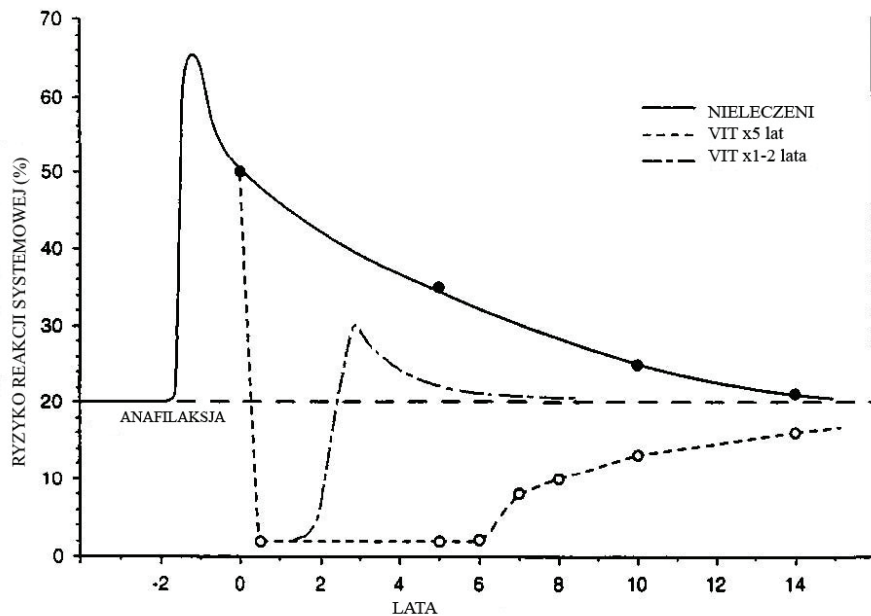
użądlenia^{44,55}. Porównanie grup skutecznie i nieskutecznie leczonych pozwoliło wyodrębnić czynniki wpływające na ostateczny efekt terapii.

1.5.2.2.1 Długość terapii i nasilenie pierwotnej reakcji po użądleniu

Po wdrożeniu VIT do codziennej praktyki lekarskiej zakładano, że terapia musi trwać do końca życia chorego lub przynajmniej do czasu uzyskania negatywizacji testów skórnych. Okazało się jednak, że u większości chorych potrzeba ponad 10 lat terapii, aby osiągnąć brak reaktywności skóry, a pomimo to u kilku do 10% z nich mogą wystąpić kolejne reakcje po użądleniach⁴⁵. Pierwsze serie badań z lat 1985-1997 weryfikujące skuteczność VIT za pomocą prób prowokacyjnych obejmowały analizą chorych odczulanych przez co najmniej 3 lata i poddanych obserwacji po 1-3 lat od zakończenia immunoterapii. Wykazano utrzymywanie się ochronnego wpływu VIT u 83-100% chorych, z korzystniejszym efektem u odczulanych jadem osy w porównaniu z jadem pszczoły oraz u dzieci w porównaniu z dorosłymi¹.

Jednym z pierwszych badań obejmujących chorych obserwowanych aż 5 lat po zakończeniu VIT była analiza Reimana, w której zebrano 113 chorych żądlnych po zakończeniu VIT w naturalnym środowisku⁵⁶. Zanalizowano m.in. zależności pomiędzy skutecznością a nasileniem reakcji pierwotnej, czasem trwania terapii, czasem od zakończenia VIT. Wykazano zależność pomiędzy nasileniem pierwotnej reakcji a końcowym wynikiem leczenia. Chorzy z ciężką anafilaksją po użądleniu w wywiadzie trzykrotnie częściej ponownie reagowali po zakończeniu VIT, u tych chorych konieczne było leczenie co najmniej pięcioletnie, pozostali osiągnęli dobre wyniki po 2-3 latach VIT.

W latach 1996-2000 Golden i wsp. opublikowali serię analiz dotyczących grupy 74 chorych odczulanych w większości jadem osy przez co najmniej 5 lat^{45,49,57}. Wykazali, że przez 5 lat od zakończenia terapii u 90% nie występowały reakcje systemowe po użądleniach, a u pozostałych chorych były to reakcje łagodne. Po wydłużeniu obserwacji do 7 lat od zakończenia VIT odnotowano jednak kolejne, również ciężkie, systemowe reakcje, zwłaszcza u chorych żądlnych w warunkach naturalnych. Ryzyko ciężkiej reakcji systemowej rosło z każdą reakcją po zakończeniu terapii, jednak nawet do 13 lat, u ogółu chorych, utrzymywało się w przedziale 10-15% (Ryc. 3).



Ryc. 3. Historia naturalna alergii na jad owadów błonkoskrzydłych z uwzględnieniem ryzyka ponownej reakcji systemowej po użądleniu u chorych nieleczonych, poddawanych VIT przez 1-2 lata i przez średnio 6 lat (na podstawie i za zgodą Golden DBK i wsp. ⁴⁹)

Lerch i Mueller przedstawili z kolei analizę 358 przypadków, w której VIT stosowano nawet przez 10 lat ⁵⁸. 200 chorych poddano ponownie użądleniom. U 15,6% chorych odczulanych jadem pszczoły i 7,5% leczonych jadem osy wystąpiły ponowne reakcje anafilaktyczne, wykazano tym samym różnice w skuteczności obu terapii, choć nie były one istotne ($p=0,081$). Większość reakcji wystąpiła w pierwszym roku po zakończeniu VIT i miała łagodny charakter. U większości chorych kolejne użądlenia przynosiły nasilenie ciężkości anafilaksji. Wreszcie u chorych leczonych jadem pszczoły wykazano związek czasu terapii ze skutecznością. Chorzy leczeni 3 lata reagowali wyraźnie częściej niż leczeni przez 5 lat ($p=0,007$). Różnice te były nieznamiennie u chorych, jeśli reakcje oceniano w pierwszym roku po zakończeniu leczenia. Także tym razem nie stwierdzono istotnych różnic w zależności od stopnia nasilenia reakcji przed VIT.

Ze względu na koszty i możliwość pogorszenia współpracy z chorym w miarę czasu trwania VIT, prowadzone są badania nad skróceniem terapii poniżej 5 lat. Dotychczasowe oceny skuteczności po 1-2 latach wskazują na jej brak. Jakkolwiek niektóre badania nad chorymi leczonymi przynajmniej 3 lata dopuszczają możliwość zakończenia leczenia po tym okresie ^{1,56,59-61}.

Na podstawie historii choroby, wyników powtarzanych testów, oceny czynników ryzyka anafilaksji takich jak narażenie środowiskowe, czy choroby współistniejące, zaleca się aby decyzja co do ukończenia immunoterapii była dokonywana pomiędzy 3 a 5 rokiem immunoterapii z preferencją w kierunku 5 lat jej trwania ⁶².

1.5.2.2.2 Dobór szczepionki i rodzaju terapii

Do pierwszych obserwacji dotyczących skuteczności immunoterapii należały randomizowane badania Hunta z lat 70-tych ubiegłego wieku. Pojedynczo zaślepiona, prospektywna próba objęła 60 chorych poddanych immunoterapii wyciągiem z całych ciał błonkoskrzydłych, preparatami samego jadu i *placebo*. Po 6 tygodniach poddano chorych ponownym użądleniom, reakcje systemowe wystąpiły odpowiednio u 5,3% chorych odczulanych jadem, 63,6% wyciągiem z owada i 58,3% *placebo*. W kolejnym badaniu Muellera chorzy poddani VIT, w porównaniu z terapią wyciągiem z owada, reagowali równie często, jakkolwiek reakcje miały zdecydowanie mniejsze nasilenie ¹.

Od roku 1980 do dziś opublikowano szereg obserwacji dotyczących skuteczności VIT wykazując powtarzającą się różnicę pomiędzy odczulanymi jadem osy i pszczoły. Immunoterapia jadem pszczoły jest znacznie częściej związana z reakcjami po kolejnych iniekcjach w trakcie terapii, po użądleniach w trakcie i po VIT oraz znacząco mniejszą ochroną przed nasiloną anafilaksją (75%-85% odczulanych jadem pszczoły i 85%-95% jadem osy) ^{46,58,63,64}. Przyczyny tego stanu rzeczy doszukiwano się w fakcie, iż pszczoła wstrzykuje większą i bardziej stałą objętość jadu w porównaniu z osą. W związku z tym bierze się pod uwagę przedłużenie terapii u chorych z alergią na jad pszczoły ⁶³. Inną przyczyną może być sposób pozyskiwania jadu do szczepionek. Jad pszczeli pozyskuje się poprzez elektrostymulację od żywych owadów, natomiast jad osy z wyciętych woreczków jadowych, w związku z tym zawartość proteaz w preparacie może powodować zmniejszenie immunogenności jadu ⁶⁵.

Immunoterapię podjęzykową (ang. *sublingual immunotherapy*; SLIT) stosuje się coraz częściej głównie ze względu na łatwość podawania leku. Na dzień dzisiejszy istnieją dane dokumentujące efektywność i bezpieczeństwo SLIT w alergii na pyłki roślin oraz kurzu domowego, jednak zastosowanie SLIT w innych przypadkach nadal

jest kontrowersyjne i wymaga przeprowadzenia odpowiednich badań^{66,67}. W leczeniu alergii na jad błonkoskrzydłych z zastosowaniem SLIT opublikowano jedynie kilka prac^{68,69}, które jednak ze względów metodologicznych stały się przedmiotem znaczących kontrowersji. Na podstawie dotychczasowych doniesień nie zaleca się SLIT w leczeniu alergii na jad owadów⁷⁰.

Wszystkie dotychczasowe doświadczenia dotyczące immunoterapii zdają się potwierdzać tezę o bezpośrednim związku bezpieczeństwa i skuteczności leczenia z jakością preparatu służącego immunizacji. Badania molekularne ujawniają istotne różnice pomiędzy surowym jadem a dostępnymi ekstraktami co może istotnie wpływać zarówno na diagnostykę jak i warunkować skuteczność immunoterapii. Opisuje się kłopoty ze zmniejszoną reprezentacją Ves v5, Api m3 czy Api m10 w komercyjnie dostępnych preparatach używanych do diagnostyki i terapii. Ostatnie badania przeprowadzone przez Fricka i wsp. pokazują jak duże są różnice w zawartości alergenów w preparatach stosowanych obecnie w leczeniu alergii na jad pszczoły. Brak albo śladowa zawartość Api m10 w preparacie stosowanym w leczeniu wraz z udokumentowaną alergią na Api m10 była w badanej grupie głównym predyktorem braku skuteczności terapii⁷¹. Rozwiązaniem jest modyfikacja składu szczepionek przez dodanie odpowiednich alergenów bądź produkcja preparatów o kontrolowanym składzie, złożonych jedynie z alergenów rekombinowanych, zapewne jednak wskazana jest diagnostyka uwzględniająca powyższy problem²⁶. Prowadzone są badania nad CRIT (ang. *component resolved immunotherapy*; CRIT), leczeniu opartym na alergenach rekombinowanych¹.

1.5.2.2.3 Przebieg i bezpieczeństwo terapii

W kilku badaniach wykazano, że wystąpienie reakcji systemowych, jako powikłań VIT, wiąże się ze znacząco większym ryzykiem nawrotu po jej zakończeniu^{63,72}. Pośrednio wpływ na ten czynnik ryzyka może mieć dobór terapii wstępnej. W wielu badaniach obserwowano zmniejszenie liczby epizodów anafilaksji jako powikłań VIT wraz ze zmniejszeniem liczby wstrzyknień w dochodzeniu do dawki podtrzymującej⁷³⁻⁷⁵, z drugiej strony jednak ryzyko rosło wraz ze zwiększeniem szybkości wzrastania dawek^{65,76,77}. Większą liczbę reakcji systemowych stwierdzano również w trakcie VIT z jadem pszczoły w porównaniu z jadem osy^{51,65,72,75,76}. Goldberg i wsp. udowodnili, że stan tolerancji w alergii na jad pszczoły osiąga się bezpośrednio po

uzyskaniu dawki podtrzymującej u około 95% chorych, co jest wynikiem porównywalnym z wynikami osiąganymi u chorych z alergią na jad osy, przy czym u części wymaga to zwiększenia dawki podtrzymującej do 200-250 µg jadu ⁷⁸. Potwierdzają to obserwacje opisane przez Rueff i wsp ^{47,55}. Z kolei Cavallucci i wsp. zaobserwowali brak wpływu wydłużenia odstępu pomiędzy dawkami nawet do 3 miesięcy już w czwartym roku immunoterapii ⁷⁹. Wyniki powyższych badań wskazują, że efektywność i bezpieczeństwo terapii jadem pszczoły może ulec poprawie poprzez zwiększenie dawki podtrzymującej, jednak bieżące metaanalizy wskazują na brak dostatecznej ilości odpowiedniej jakości danych do określenia zaleceń w tej sprawie ⁸⁰. Dawka leku wydaje się być jednym z zasadniczych czynników wpływających na ogólną skuteczność wszystkich rodzajów VIT, jednak wymaga to niewątpliwie dalszych obserwacji.

Jedną z propozycji klasyfikacji działań niepożądanych VIT jest skala Mosbecha i Muellera (Tab. 1)

Tabela 1. Klasyfikacja działań niepożądanych immunoterapii z jadem owadów błonkoskrzydłych (wg Mosbecha i Muellera ⁶⁵).

| Stopień natężenia | Typ reakcji | Objawy |
|-------------------|----------------|---|
| 0 | Duża lokalna | Obrzęk > 10cm przez > 2 dni |
| 1 | Mała | Świąd, pokrzywka, obrzęk, pogorszenie samopoczucia, niepokój |
| 2 | Uogólniona | Ucisk w klatce piersiowej, kołatanie serca, zawroty głowy, nudności, ból głowy |
| 3 | Ciężka | Senność, kłopoty z oddychaniem, wymioty, biegunka, niemożność utrzymania moczu lub stolca |
| 4 | Anafilaktyczna | Zaburzenia świadomości, spadek ciśnienia tętniczego, głęboki lęk, utrata przytomności, sinica, śmierć |

1.5.2.2.4 Wyjściowe stężenie tryptazy w surowicy i choroby związane z aktywacją mastocytów

Stężenie tryptazy w surowicy, jako zmiennej określającej pośrednio liczbę i stan aktywacji mastocytów w organizmie człowieka, jest czynnikiem wpływającym bezpośrednio na nasilenie reakcji anafilaktycznej i standardowo używa się go do charakteryzowania chorych z alergią na jad owadów błonkoskrzydłych^{64,81–83}. Dane z wielośrodkowego badania Grupy Zainteresowań nad Nadwrażliwością na Jad Owadów działającej przy EAACI⁸⁴ obejmujące 962 chorych, wydaje się ostatecznym dowodem na istotność stężenia tryptazy w surowicy w diagnostyce alergii na jad błonkoskrzydłych. Opisano nieliniową zależność (Ryc. 2) pokazującą gwałtowny wzrost ryzyka systemowej reakcji anafilaktycznej po użądleniu już przy stężeniu tryptazy 5 µg/l. Jako niezależne czynniki ryzyka określono również płeć męską, występowanie wcześniejszych reakcji o mniejszym nasileniu, alergię na jad osy, starszy wiek oraz stosowanie leków z grupy inhACE, nie wykazano natomiast związku nasilenia anafilaksji z przyjmowaniem leków z grupy B-blokerów.

W kolejnym badaniu, obejmującym 680 chorych z wielu ośrodków, wykazano, że już stężenie tryptazy 4,21 µg/l w surowicy krwi wiązało się z gwałtownym, liniowym wzrostem ryzyka anafilaksji podczas fazy wstępnej VIT⁷⁶, jednak u 357 chorych z tej grupy przeprowadzono obserwację w trakcie fazy podtrzymującej i nie obserwowano wpływu stężenia tryptazy (>11,4 µg/ml) w surowicy na częstość anafilaksji po użądleniach w trakcie VIT ($p=0,393$)⁷². W innym badaniu obejmującym 1532 chorych różnica w skuteczności VIT była wyraźna, w zależności od stężenia tryptazy w surowicy, ale zastosowano zdecydowanie wyższy punkt odcięcia (>20 µg/ml) ($p=0,003$)⁵⁵.

Mastocytoza jest chorobą spowodowaną monoklonalnym rozrostem patologicznych mastocytów w wielu narządach. Jednym z kryteriów diagnostycznych tej choroby jest stężenie tryptazy w surowicy przekraczające 20 µg/l⁸⁵. U około 30% chorych współwystępuje alergia na jad owadów, która jest przyczyną znaczącej większości reakcji anafilaktycznych u chorych na mastocytozę²⁵, a reakcje po użądleniach są znacząco bardziej nasilone niż w ogólnej populacji⁸⁶. U tych chorych VIT jest leczeniem z wyboru^{63,87–89}, pomimo tego, że jest obarczone większym ryzykiem

powikłań (zwłaszcza u chorych z alergią na jad osy) ^{64,76,87} oraz wydaje się nieść ze sobą mniejszą efektywność (72%) w porównaniu z ogółem chorych poddawanych VIT ⁸⁷. W przytaczanym już badaniu Rueff i wsp. u 9 z 32 badanych chorych wykryli stężenie tryptazy powyżej 13,5 µg/l. U 7 z nich odczulanych dawką 100 µg jadu wystąpiły reakcje systemowe po kolejnym użądleniu ⁴⁷. Po zwiększeniu dawki, do co najmniej 200 µg u tego typu chorych uzyskiwano bezpiecznie anergię już w trakcie fazy podtrzymującej immunoterapii ^{47,87}. Dotychczas brak dużych prospektywnych obserwacji dotyczących długotrwałego działania ochronnego VIT po jej zakończeniu u chorych na mastocytozę. Dane retrospektywne wskazują na duże ryzyko zgonu spowodowanego użądleniem po przerwaniu immunoterapii, w związku z tym sugeruje się kontynuowanie terapii do końca życia chorego ^{88,89}. Badania przeprowadzone we Włoszech potwierdzają, że już stężenie tryptazy rzędu 11,4 µg/l u chorych z alergią na jady owadów jest wskazaniem do pogłębienia diagnostyki w kierunku mastocytozy układowej. Przy tym stężeniu tryptazy, u około połowy chorych można spodziewać się rozpoznania mastocytozy, nie mniej prawidłowe stężenie tryptazy w surowicy nie wyklucza tego rozpoznania. Wstrząs anafilaktyczny po użądleniu, bez współwystępujących zmian pokrzywkowych czy obrzęku naczynioruchowego może być najważniejszym wskaźnikiem rozpoznania mastocytozy, istotniejszym niż podwyższone stężenie tryptazy w surowicy ⁹⁰. U ogółu chorych z alergią na jad owadów występowanie mastocytozy mieści się w granicach 1%-7,9% ⁹¹.

Od kilku lat sugeruje się wyodrębnienie jednostek klinicznych związanych z aktywacją mastocytów i niespełniających wszystkich kryteriów rozpoznania mastocytozy. Taką chorobą jest zespół monoklonalnej aktywacji mastocytów (ang. *Monoclonal Mast Cell Activation Syndrome*; MCAS), w którym nawracające reakcje anafilaktyczne łączą się z objawami aktywacji mastocytów (np.: podwyższone stężenie tryptazy w surowicy), jako wyrazu obecności monoklonalnego rozrostu patologicznych mastocytów (obecność mutacji genu *KIT*, obecność patologicznych mastocytów CD25 w szpiku) ^{89,92,93}. Należy rozważyć u tych chorych prowadzenie VIT jak u chorych z rozpoznaną mastocytozą.

1.5.2.2.5 Wiek, płeć i choroby współistniejące

Jeżeli uwzględnimy wiek chorych, okazuje się, że anafilaksja po użądleniu dotyczy około 1% dzieci i około 3% ogółu populacji dorosłych, a ogólne ryzyko anafilaksji i nasilenie reakcji rośnie z wiekiem chorego^{46,94}. U dzieci, znacznie częściej niż u dorosłych, reakcje ograniczone są tylko do objawów skórnych (pokrzywka, obrzęk naczynioruchowy). U dorosłych natomiast częściej występuje obturacja dróg oddechowych i spadek ciśnienia tętniczego⁴⁶.

Wyniki badania Goldena wskazują, że większość dzieci „wyrasta” z alergii na jad owadów bez stosowania immunoterapii. Jednak u 32% procent po 20 latach od pierwotnej anafilaksji, wystąpiły reakcje systemowe po użądleniu. W porównaniu do 5% wśród dzieci odczulanych różnica była istotna ($p=0,007$). Wśród dzieci z łagodnymi reakcjami w wywiadzie różnica wynosiła odpowiednio 13% i 0%, lecz nie była znamienna. Na podstawie tych danych można wnioskować, że wskazania do VIT są podobne zarówno u dzieci jak u dorosłych⁹⁵. Wydaje się również, że VIT u młodszych chorych może wiązać się z większą skutecznością^{56,95}.

Większa skuteczność VIT u młodszych i rosnące z wiekiem ogólne ryzyko anafilaksji coraz częściej jest związane ze stężeniem tryptazy w surowicy. W kolejnych badaniach obserwowano dodatnią korelację narastania stężenia tryptazy (średnio 1,3% rocznie) wraz z wiekiem chorego^{83,94,96,97}.

Poza mastocytozą narastanie zawartości tryptazy w surowicy może występować w astmie, przewlekłej pokrzywce, wyprysku pieniążkowatym, ostrej białaczce szpikowej, różnych zespołach mielodysplastycznych, zespołach związanych z mutacją *FIP1L1-PDGFR* (np.: zespół hypereozynofilowy), schyłkowej niewydolności nerek, chorobach pasożytniczych (np. onchocerkozie) oraz chorobach układu krążenia^{94,96}.

Choroby układu sercowo-naczyniowego są związane ze zwiększonym odsetkiem zgonów w przebiegu anafilaksji, jednak ciągle trudno ustalić czy jest to związane z wiekiem chorych, lekami stosowanymi w terapii tych schorzeń (inhACE, B-blokery), czy bezpośrednio z zaawansowaniem choroby układu krążenia^{76,84,98}. Wydaje się jednak, że ogólne ryzyko zgonu tych chorych jest większe bez immunoterapii z jadem owadów niż podczas VIT, w trakcie którego niezależnie stosowane są B-blokery⁶³.

Istnieją badania wykazujące korzyść z odstawienia bądź zamiany inhACE (jako silnego, niezależnego czynnika ryzyka anafilaksji) na inny lek ^{55,84}, choć m.in. publikacje Stoevesandt i wsp. ^{72,99,100} przeczą tej tezie.

U chorych leczonych z powodu alergii na jady owadów wykazano częstsze występowanie polimorfizmu MM 235 genu angiotensynogenu związane z mniejszym stężeniem białek układu renina-angiotensyna ¹⁰¹. Wykazano również niższe stężenia białek tego układu u chorych, którzy nie osiągnęli tolerancji alergenu w wyniku VIT ¹⁰².

W publikowanych dotychczas danych wykazywano sprzeczne informacje wiążące ryzyko anafilaksji, skuteczność i bezpieczeństwo immunoterapii z płcią ^{8,65,84,103,104}.

1.5.2.2.6 Częstotliwość ekspozycji

W przytaczanych już badaniach nad długoterminowymi efektami VIT wykazano zwiększenie ryzyka kolejnej reakcji systemowej po każdym kolejnym uządleniu od zakończenia VIT (ryzyko nasilało się wraz ze zwiększeniem częstotliwości uządleń) ^{45,49,56,58,60}. W związku z tym u chorych, u których ryzyko kolejnych uządleń jest bardzo duże (np.: pszczelarze, pracownicy cukierni) rozważa się, indywidualnie dla każdego chorego, kontynuację immunoterapii do czasu usunięcia czynników zwiększających ryzyko uządleń ⁶³.

1.5.2.2.7 Inne czynniki predykcyjne skuteczności VIT

W 2010 roku opublikowano wyniki współpracy ośrodków w Gdańsku (Polska) i Groningen (Holandia). U 46 chorych leczonych VIT podzielono na trzy grupy: (1) chorych, u których uzyskano długotrwałą ochronę po VIT, (2) chorych, u których VIT okazała się nieskuteczna, (3) i chorych pozostających w trakcie fazy podtrzymującej VIT. U wszystkich poddanych badaniu zbadano ekspresję 48071 genów, następnie za pomocą modelu predykcyjnego Bayesa wyodrębniono 18 genów charakterystycznych dla chorych z dobrym efektem immunoterapii ¹⁰⁵. Kolejne badanie obejmujące 50 chorych podzielonych na 3 grupy: (1) chorych przed VIT, (2) w trakcie fazy podtrzymującej i (3) tych, którzy uzyskali ochronę po VIT. Opisano 89 genów, które zmieniają ekspresję zarówno w grupie w trakcie jak i po VIT ¹⁰⁶.

Od początku prowadzenia badań nad VIT szukano czynnika pozwalającego lepiej przewidzieć jej skuteczność niż próby prowokacyjne. Z badań długoterminowych wynika, iż jedynie negatywizacja testów skórnych osiągnana u nie więcej niż jednej trzeciej chorych po zakończeniu VIT i spadek stężenia tryptazy mogą wiązać się z długotrwałą ochroną chorego ^{45,49,57,58,96}. Natomiast ani stężenie sIgE ani sIgG4 nie pozwalają bezpośrednio przewidzieć ryzyka ponownej reakcji.

BAT poza zwiększeniem czułości testów diagnostycznych w HVA wydaje się dodatkowo dawać nadzieję na uzyskanie prostego badania pozwalającego przewidzieć zarówno ryzyko działań niepożądanych VIT ¹⁰⁷ jak i skuteczność terapii ^{37,108-110}.

Czynnikiem pośrednio określającym rosnący z wiekiem poziom aktywacji mastocytów w organizmie jest całkowite stężenie IgE ⁹⁷. Wykazano, że stężenie >250 kUa/l wiąże się z obniżeniem ryzyka anafilaksji, natomiast stężenie <50 kUa/l - istotnie je zwiększa. Uważa się, że niskie stężenie IgE w surowicy może być wynikiem wiązania swoistych immunoglobulin tego typu na powierzchni komórek efektorowych, a wyrazem tego, poza badaniami określającymi bezpośrednio stan aktywacji mastocytów czy bazofilii (np.: tryptaza, BAT), może być odniesienie sIgE do całkowitego IgE. Wynik >4% wiąże się z wysokim ryzykiem anafilaksji ¹¹¹.

Z kolei w 2005 roku, Konno opisał swoje badania nad osteopontyną jako potencjalnym biomarkerem skuteczności immunoterapii ¹¹². Badanie zmian stężenia osteopontyny u dzieci poddawanych VIT wskazują, że może to być potencjalny marker skutecznej immunoterapii ¹¹³.

2. Cele pracy

1. Analiza wpływu wybranych czynników klinicznych na nasilenie reakcji po użądleniach, bezpieczeństwo oraz skuteczność immunoterapii z jadem w grupie chorych z alergią na jad owadów błonkoskrzydłych.
2. Ocena ekspresji wybranych genów za pomocą techniki RT-PCR (z zastosowaniem kart mikrocieczowych) we krwi obwodowej u chorych z alergią na jad osy w porównaniu do osób zdrowych.
3. Ocena zmiany ekspresji wybranych genów za pomocą techniki RT-PCR (z zastosowaniem kart mikrocieczowych) we krwi obwodowej u chorych z alergią na jad osy pod wpływem immunoterapii z jadem osy.

3. Materiały i metody

3.1. Opis grupy badanej

W latach 2003-2014, w Klinice Alergologii w Gdańsku, immunoterapii z jadem owadów (VIT) poddawano 489 chorych z alergią na jad owadów błonkoskrzydłych (HVA).

W 2014 roku u 127 chorych (75 kobiet i 52 mężczyzn w wieku od 20 do 81 lat; średnia 49 lat) rozpoczynających leczenie i będących w trakcie terapii przeprowadzono badanie ankietowe dotyczące historii reakcji po użądleniach, narażenia na użądlenia, przebiegu dotychczasowej terapii oraz chorób współistniejących.

Wykonano również retrospektywne badanie ankietowe (listownie bądź telefonicznie) u 119 chorych z HVA (65 kobiet i 54 mężczyzn, w wieku od 24 do 84 lat; średnia 53 lata), w grupie chorych, którzy do 2014 zakończyli 5 letni kurs VIT, dotyczące przebiegu choroby (przed, w trakcie i po leczeniu jadem) oraz chorób współistniejących i narażenia na użądlenia.

Wśród chorych rozpoczynających VIT w Klinice Alergologii w latach 2010-2014 wyłoniono 45 osób z alergią na jad osy (42 kobiety, 15 mężczyzn, w wieku od 18 do 77 lat, średnia wieku 41,8 lat), u których przeprowadzono analizę zmian ekspresji wybranych genów w przebiegu VIT, za pomocą techniki RT-PCR (z zastosowaniem kart mikrocieczowych).

U wszystkich badanych rozpoznanie choroby i kwalifikacja do leczenia zostały przeprowadzone zgodnie z zaleceniami EAACI.

Badania były finansowane ze środków uzyskanych w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki (2011/01/M/NZ501362) oraz grantu Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed) (MN/01-0123/08/231/2014).

3.2. Kryteria włączenia i wyłączenia

Kryterium włączenia do badania ankietowego stanowiło rozpoznanie alergii na jad owadów błonkoskrzydłych i kwalifikacja do VIT.

Kryterium włączenia do badania ekspresji wybranych genów stanowiło rozpoznanie alergii na jad osy i kwalifikacja do immunoterapii z jadem osy.

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

Na badanie została wydana zgoda Niezależnej Komisji Bioetycznej przy GUMed nr NKBBN/468/2013. Osoby biorące udział w badaniu podpisały dobrowolną świadomą zgodę.

3.3. Opis grupy kontrolnej badania ekspresji genów

Grupę kontrolną stanowi 38 ochotników (19 kobiet i 19 mężczyzn, w wieku od 25 do 77 lat, średnia wieku 46 lat) bez alergii w wywiadzie, rekrutowanych wśród osób zgłaszających się do badania w ramach medycyny pracy oraz badań profilaktycznych w opiece podstawowej.

3.4. Opis procedur wykonanych u chorych

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 badania podmiotowego, przedmiotowego, punktowych testów skórnych i śródskórnych oraz oznaczenia poziomu specyficznych przeciwciał klasy IgE w surowicy krwi zgodnie z wytycznymi EAACI⁷.

Podczas badania ankietowego chorzy byli pytani o dane demograficzne (wiek, płeć, zawód), występowanie i przebieg objawów reakcji po użądleniach przez owady oraz ich związek czasowy z użądleniem, leczenie doraźne występujących reakcji, występowanie potencjalnych czynników ryzyka anafilaksji po użądleniach takich jak choroby współistniejące (atopowe, autoimmunologiczne, choroby tarczycy i układu krążenia, nowotworowe) oraz leki, pod wpływem których chorzy pozostawali w trakcie użądlenia. Kolejne pytania dotyczyły przebiegu VIT (objawy niepożądane,

czas trwania) oraz obecności innego rodzaju alergii czy nadwrażliwości w wywiadzie (Suplement – ankieta).

Następnie oceniano ciężkość reakcji po użądleniach. Podzielono reakcje na grupy: normalne reakcje miejscowe, duże reakcje miejscowe (LLR), reakcje anafilaktyczne. Za normalne reakcje miejscowe uważa się ból, rumień i niewielki obrzęk wokół użądlenia ustępujące do 24 godzin po użądleniu, natomiast LLR charakteryzuje obrzęk wokół użądlenia przekraczający wymiar 10cm i utrzymujący się dłużej niż dobę⁷. Reakcja anafilaktyczna to ciężka, potencjalnie zagrażająca życiu systemowa reakcja z nadwrażliwości charakteryzująca się gwałtownym przebiegiem z groźnymi dla życia objawami ze strony dróg oddechowych, oddychania i krążenia, oraz zwykle, ale nie zawsze, towarzyszącymi objawami skórnymi i ze strony błon śluzowych¹¹⁴. Ciężkość reakcji anafilaktycznych kwalifikowano przy użyciu skali Muellera⁷. Jako stopień I reakcji anafilaktycznej oceniano uogólnioną pokrzywkę z towarzyszącym świądem, złe samopoczucie, niepokój. Stopień II charakteryzował się występowaniem objawów jak w stopniu I oraz przynajmniej dwu z następujących: obrzęk naczynioruchowy, ucisk w klatce piersiowej, nudności, wymioty, biegunka, ból brzucha czy zawroty głowy. Na obraz III stopnia reakcji anafilaktycznej składały się objawy jak w stopniu II oraz przynajmniej dwa z następujących: duszność, świszczący oddech, świst krtaniowy, upośledzenie mowy, chrypka, osłabienie, dezorientacja i głębokie uczucie lęku. IV stopień to objawy stopnia III i przynajmniej dwa z kolejnych: spadek ciśnienia tętniczego, omdlenie, utrata świadomości, niekontrolowane oddanie moczu lub kału, sinica.

Wśród niektórych chorych zakwalifikowanych do badania zmian ekspresji wybranych genów oznaczano podczas diagnostyki HVA stężenie tryptazy mastocytarnej w surowicy. Badanie wykonano za pomocą testu fluoroimmunoenzymatycznego (ImmunoCAP Tryptase, Uppsala Sweden) w Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii GUMed.

3.4.1. Pobranie materiału oraz przeprowadzenie badań genetycznych

W celu oceny zmian ekspresji genów za pomocą kart mikrocieczowych dwukrotnie (przed rozpoczęciem immunoterapii i po osiągnięciu sumarycznej dawki 500 do 600 mikrogramów jadu – około 3 miesiące immunoterapii) pobrano krew obwodową przy

użyciu probówek Tempus Blood RNA Tube firmy Applied Biosystems® w objętości 6ml.

Po pobraniu krwi obwodowej energicznie wstrząsano probówką przez 10 do 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 materiał był zamrażany w -80 °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 zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (ang. *phosphate buffered saline*; PBS) i energicznie wytrząsano przez co najmniej 60 sekund, uważając, aby lizat przemieszczał się do góry w rurze. Następnie wirowano tuby w temperaturze 4 °C w 3000xg (RCF) przez 45 minut. Następnie ostrożnie zlano supernatant; na dnie pozostał osad RNA, który przeniesiono na celulozowy filtr oczyszczający. Następnie wg zaleceń producenta zestawu 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 RIN (ang. *RNA Integrity Number*; RIN), za pomocą bioanalizatora (Bioanalyzer, Bio-RAD) w Pracowni Genomiki Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Tylko próbki z RIN >7.5 zakwalifikowano do dalszego etapu badania. Uzyskany roztwór RNA zamrożono i przechowywano w temperaturze -80 °C przez maksymalnie 12 miesięcy.

Odwrotną transkrypcję wykonano zestawem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits RNase Inhibitor (Invitrogen™) umożliwiającym przeprowadzenie konwersji ilościowej 2 µg całkowitego RNA w wyjątkowo wysokiej jakości

jednociowy cDNA (w 20 μ L mieszaniny reakcyjnej). Zestaw umożliwia przeprowadzenie odwrotnej transkrypcji z ilości od 0,02 do 2 mg całkowitego RNA. Reakcje skalowano do 100 μ 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 500 ng w stężeniu 50ng/ μ l. Następnie przygotowano na lodzie roztwory 2xRT Master Mix na 20 μ L objętości mieszaniny reakcyjnej i dokładnie zwirowano wg protokołu. Przygotowano RT-PCR wg protokołu: do każdego stripa podano pipetą 10 μ l 2xRT Master Mix, następnie pipetą podano 10 μ l RNA i dwukrotnie zmieszano roztwór w pipecie, 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 μ l, krok I: 10 minut w temperaturze 25 °C, krok II: 120 minut w 37 °C, krok III: 5 minut w 85 °C i krok IV: ∞ w 4 °C. Następnie materiał zamrożono i przechowywano w -20 °C przez okres od 1 do 6 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 preinstalowanymi testami ekspresji wybranych genów. Karty TaqMan Array pozwalają mierzyć ekspresję genów przy użyciu metody względnie ilościowej, porównawczej CT ($\Delta\Delta$ 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 μ l 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.

3.4.2. Wybór genów do badania

W badaniu ekspresji genów za pomocą techniki *whole genome expression analysis* stwierdzono różnice w ekspresji profili genetycznych komórek krwi obwodowej chorych na HVA, którzy uzyskali długotrwałą ochronę przed anafilaksją w wyniku VIT w porównaniu do chorych z anafilaksją po użądleniu pomimo VIT. Określono profil genetyczny zawierający znaczące i znamienne różnice w ekspresji transkryptów 43 genów¹⁰⁵. W kolejnym badaniu wykazano znaczące różnice w ekspresji 89 genów wśród chorych na HVA przed VIT w porównaniu do chorych na HVA w trakcie i po immunoterapii¹⁰⁶. 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 (Tab. 2).

Tabela 2. Lista 15 wybranych genów.

| | Symbol genu | Nazwa genu | Wzór transkryptu Applied Biosystems® |
|---|---------------|--|--------------------------------------|
| 1 | <i>CLDN1</i> | claudin 1 | Hs00221623_m1* |
| 2 | <i>CNGB3</i> | cyclic nucleotide gated channel beta 3 | Hs01555863_m1* |
| 3 | <i>COMMD8</i> | copper metabolism Murr-1 domain-containing 8 | Hs00215252_m1* |
| 4 | <i>DAZ2</i> | deleted in azoospermia 2 | Hs00414014_m1* |
| 5 | <i>FADS1</i> | fatty acid desaturase 1 | Hs00203685_m1* |

| | | | |
|----|-----------------|---|----------------|
| 6 | <i>HES6</i> | transcription cofactor HES-6 | Hs00936587_g1* |
| 7 | <i>HLA-DRB5</i> | major histocompatibility complex, class II, DR beta 5 | Hs03046116_m1* |
| 8 | <i>HTR3B</i> | 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3b | Hs00175775_m1* |
| 9 | <i>KLF10</i> | krüppel-like factor 10 | Hs00921811_m1* |
| 10 | <i>PCDHB10</i> | protocadherin beta 10 | Hs01585827_s1* |
| 11 | <i>PRLR</i> | prolactin receptor | Hs00168739_m1* |
| 12 | <i>SLC16A4</i> | solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 4 | Hs00190794_m1* |
| 13 | <i>SNX33</i> | sh3 and px domain containing 3 | Hs00542077_m1* |
| 14 | <i>SOCS3</i> | suppressor of cytokine signaling 3 | Hs02330328_s1* |
| 15 | <i>TWIST2</i> | twist homolog 2 (drosophila) | Hs00382379_m1 |
| 16 | <i>18S</i> | | Hs03003631_g1 |

3.4.3. Krótka charakterystyka wybranych genów:

CLDN1 – lokalizacja cytogenetyczna 3q28-q29; gen dla kładyny 1 znany również jako *CLD1*, *SEMP1* (*seminal metalloproteinase 1*) lub *ILVASC* (*ichtyosis, leukocyte vacuoles, alopecia and sclerosis cholangitis*) koduje białko będące integralną częścią błon komórkowych i wchodzące w skład tzw. połączeń ścisłych (ang. *tight-junction*; TJ) w tkankach nabłonkowych i śródbłonku. Białka z rodziny kładyn warunkują właściwości połączeń międzykomórkowych: trwałość barier międzybłonowych, transport międzykomórkowy oraz transdukcję sygnału ¹¹⁵. Zaburzenia ekspresji *CLDN1* wykryto w patogenezie bardzo wielu nowotworów warunkujących zarówno powstawanie jak i stopień ich złośliwości ¹¹⁶, również poprzez wzajemne oddziaływanie z czynnikami prozapalnymi takimi jak $TNF\alpha$ i $NF\kappa B$ ¹¹⁷. Wykazano, iż inwazyjność wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) jest zależna od kondycji

połączeń międzykomórkowych. Klaudyna 1 jest wspólnie z CD81 ko-receptorem dla wejścia HCV do infekowanej komórki ¹¹⁸. Zastosowanie specyficznych przeciwciał przeciwko klaudynie 1 hamuje rozwój zakażenia HCV u myszy ¹¹⁹. Mutacje w genie *CLDN1* związane są z występowaniem chorób dziedzicznych związanych z zaburzeniem funkcjonowania TJ, takich jak: pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych z rybią łuską, czy wrodzona głuchota. Zaburzenia struktury TJ biorą udział w rozwoju choroby Crohna, cukrzycy typu I, stwardnienia rozsianego i wielu innych chorób ¹²⁰.

CNMG3 – lokalizacja cytogenetyczna 8q21.3; gen dla podjednostki b3 bramkowanego cyklicznym nukleotydem kanału jonowego, znany również jako *ACHM1* (achromatopsia 1). Białko pełni funkcję regulacyjną w heterotetramerycznych kanałach transdukujących sygnał z komórek czopkonośnych siatkówki. Mutacja genu prowadzi do achromatopsji typu 3, która jest rzadką wrodzoną chorobą dziedziczną autosomalnie recesywnie, charakteryzującą się całkowitym brakiem rozróżniania barw, oczopląsem, krótkowzrocznością i światłowstrętem ¹²¹.

COMMD8 – lokalizacja cytogenetyczna 4p12; gen dla białka wchodzącego w skład kompleksu aktywującego czynnik transkrypcyjny NF κ B ¹²². COMMD są grupą białek biorących udział w wielu procesach fizjologicznych takich jak homeostaza miedzi w organizmie, balans sodu i adaptacja do niedotlenienia. Białko COMMD8 wspólnie z innymi białkami COMMD, CCDC22 oraz CRL1 tworzy kompleks inicjujący ubikwitynację czynnika I κ B co powoduje aktywację NF κ B, prozapalnego czynnika transkrypcyjnego dla blisko 400 genów warunkujących odpowiedź układu immunologicznego, rozwój układu immunologicznego oraz proliferację i przeżycie komórek ¹²³.

DAZ2 – lokalizacja cytogenetyczna Yq11.223; gen jest członkiem rodziny genów *DAZ* (ang. *deleted in azoospermia*), uważanym za ludzki czynnik warunkujący azoospermie (ang. *azoospermia factor*; AZF). Ekspresja genu ogranicza się głównie do premejotycznych komórek rozrodczych. Gen koduje białko wiążące RNA istotne dla spermatogenezy, a jego mutacje powodują niepłodność typu męskiego.

FADS1 – lokalizacja cytogenetyczna 11q12.2-q13.1; znany również jako *D5D*, *TU12*, *FADS6*, *FADSD5* oraz *LLCDL1*. Gen koduje enzym desaturazę kwasów tłuszczowych działająca poprzez duplikację wiązań pomiędzy atomami węgla w resztach acylowych. Uważa się, że polimorfizm pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphism*; SNP) w obrębie genów grupy *FADS* wpływa na efekt jaki wywierają wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. *polyunsaturated fatty acids*; PUFA) na organizm człowieka. Warianty *FADS* wpływają na metabolizm i biodostępność PUFA, co poza codzienną dietą wpływa na ich poziom we krwi, mleku matki i nasycenie w tkankach, co z kolei może przekładać się na występowanie chorób alergicznych, chorób skóry oraz rozwój umysłowy, a nawet zachowanie i osobowość u dzieci ^{124,125}.

HES6 – lokalizacja cytogenetyczna 2q37.3; znany również jako *bHLHb41*, *bHLHc23* lub *C-HAIRY1*. Jest członkiem rodziny genów regulujących różnicowanie komórek. Produkt genu jest białkiem działającym jako kofaktor hamujący inne czynniki transkrypcyjne. Uważa się, że białko HES6 bierze udział w patogenezie wielu nowotworów: gruczołu krokowego¹²⁶, mięsaka komórek prążkowanych (ang. *rhabdomyosarcoma*; RMS) ¹²⁷, glejaka ¹²⁸, raka piersi ¹²⁹ i jelita grubego¹³⁰. Opisywano również rolę białka HES6 w patogenezie zaburzeń nastroju i odpowiedzi na leczenie przeciwdepresyjne¹³¹ oraz leczeniu cukrzycy¹³².

HLA-DRB5 – lokalizacja cytogenetyczna 6p21.3; należy do genów kodujących białka głównego układu zgodności tkankowej klasy II, paralogów łańcucha beta. Antygeny klasy II (ang. *Major Histocompatibility Complex class II*; MHC II) znajdują się na komórkach prezentujących antygen (ang. *antigen-presenting cell*; APC). Znalaziono związek pomiędzy ekspresją genu a patogenezą chorób neurodegeneracyjnych takich jak stwardnienie rozsiane¹³³ czy choroba Alzheimera¹³⁴, a także autoimmunologicznych: toczeń układowy¹³⁵, autoimmunologiczne zapalenie wątroby¹³⁶.

HTR3B – lokalizacja cytogenetyczna 11q23.1; gen koduje białko budujące podjednostkę B receptora dla serotoniny (5-hydroksytryptaminy) typu 3. Receptor funkcjonuje jako pentaheteromeryczny kompleks. Do zachowania funkcjonalności

potrzebna jest podjednostka A (HTR3A), która po połączeniu z serotoniną powoduje szybką depolaryzację neuronów. Uważa się że polimorfizm w obrębie genu może warunkować przebieg i leczenie depresji ^{137–139}, skłonność do uzależnień ¹⁴⁰ oraz odpowiedź na leczenie przeciwwymiotne ^{141–143}.

KLF10 – lokalizacja cytogenetyczna 8q22.2; znany również jako *TIEG1* i *EGR- α* . Gen dla białka tworzącego domenę tzw. palców cynkowych typu C2H2. Jest represorem transkrypcji działającym jako efektor transformującego czynnika wzrostu beta (TGF β), reguluje przesyłanie sygnału zależne od TGF β 1 w limfocytach T CD4+ oraz ekspresję receptora TGF- β RII na komórka CD8+ co może mieć zasadniczy wpływ na odpowiedź immunologiczną organizmu w chorobach wirusowych i nowotworowych¹⁴⁴. Prawdopodobnie poprzez oddziaływanie z układem kinaz zależnych od cyklin (ang. *cyclin-dependent kinases*; CDKs)¹⁴⁵ bierze udział w patogenezie wielu chorób nowotworowych: rak jasnokomórkowy nerki ¹⁴⁶, gruczolakorak trzustki ¹⁴⁷, rak piersi ¹⁴⁸, czy białaczki limfoblastyczne ¹⁴⁹, oraz innych chorób związanych z zaburzeniami wzrostu tkanek i cyklu komórkowego ¹⁵⁰. Praca Xiong i wsp. opisująca wpływ KLF10 na rozwój FOXP3+ (ang. *forkhead box p3*; FOXP3) komórek T regulatorowych. KLF10 poprzez integrację z antagonistycznymi systemami modyfikującymi białka histonowe wykazują aktywujący bądź aktywujący wpływ na Treg ¹⁵¹.

PCDHB10 – lokalizacja cytogenetyczna 5q31; geny dla białek z grupy protokadheryn najsilniejszą ekspresję wykazują w tkance nerwowej. Unikalna struktura i regulacja ekspresji tej grupy genów prawdopodobnie warunkuje molekularną bazę ogromnej różnorodności układu nerwowego ¹⁵². Białka te regulują procesy formowania się synapsów oraz przeżycia komórek nerwowych ¹⁵³.

PRLR – lokalizacja cytogenetyczna 5p13.2; znany również jako *HPRL* i *MFAB*. Jest genem kodującym białko receptorowe dla prolaktyny. Receptor PRLR jest częścią sieci transdukcji sygnału związanego z kinazami aktywowanymi onkogenami (kinazy MAP; MAPK ang. *mitogen-activated protein kinases*), które są zaangażowane w działania większości pozajądrowych onkogenów, a także ścieżki związanej z kinazami JAK/STAT ¹⁵⁴. Są zaangażowane w odpowiedź komórkową na działanie

czynników wzrostu ¹⁵⁵. Prawdopodobnie dlatego *PRLR* jest szeroko opisywany jako jeden z ważnych czynników onkogenezy raka piersi ^{156–158}, raka szyjki macicy ¹⁵⁹, raka gruczołu krokowego ¹⁶⁰, nowotworów z komórek rozrodczych (m.in. raka jądra czy raka jajnika)^{161,162}. W badaniu chorych na toczeń układowy miała miejsce wzmożona ekspresja *PRLR* na powierzchni Treg. Wykazano funkcję supresorową *PRLR* w stosunku do Treg ¹⁶³. U chorych na reumatoidalne zapalenie stawów ekspozycja na prolaktynę zwiększa wydzielanie prozapalnego TNF α z komórek CD14+, efekt znosi blokada *PRLR* ¹⁶⁴. Poprzez ścieżkę sygnałową STAT5 (ang. *signal transducer and activator of transcription 5*) *PRLR* obecne w wątrobie mogą wpływać na wrażliwość tkanek na insulinę ¹⁶⁵, a polimorfizm w zakresie *PRLR* może warunkować rozwój cukrzycy ¹⁶⁶.

SLC16A4 – lokalizacja cytogenetyczna 1p13.3; znany również jako *MCT4*. *SLC16* (ang. *solute carrier family 16*) są grupą białek transportujących kwasy monokarboksylowe (ang. *monocarboxylate transporters*; MCTs). MCT 1-4 są transporterami kwasu mlekowego w tkance i mięśniowej, nerwowej, nabłonkowych, nerkach, wątrobie oraz narządach rozrodczych regulując metabolizm oraz równowagę kwasowo-zasadową. W tkankach nowotworowych MCT4 jest często nadmiernie reprezentowane ¹⁶⁷. Ekspresja *MCT4* może regulować metabolizm i przeżycie komórek raka piersi ¹⁶⁸, wątroby ¹⁶⁹, żołądka ¹⁷⁰, czy płuca ¹⁷¹.

Istnieje coraz więcej danych opisujących udział glikolizy w aktywacji komórek układu odpornościowego. Wysoka ekspresja *MCT4* koreluje z aktywacją TLR2 i TLR4 (ang. *toll-like receptors*; TLR) oraz zwiększeniem transkrypcji genów aktywowanych przez NF κ B, a zatem mechanizmów prozapalnych ^{172,173}.

SNX33 – lokalizacja cytogenetyczna 15q24.2; znany także jako *SNX30* lub *SH3PX3*, jest genem kodującym białko biorące udział w procesach reorganizacji cytoszkieletu, transporcie endosomalnym, mitozie czy endocytozie. Może brać udział w patogenezie zespołu Wiskotta-Aldricha ¹⁷⁴.

SOCS3 – lokalizacja cytogenetyczna 17q25.3; koduje białko supresorowe sygnału cytokinowego (ang. *suppressor of cytokine signaling*; SOCS). Grupa tych białek jest grupą negatywnych regulatorów przekazywania sygnału cytokinowego. Ich ekspresja

jest regulowana przez różne cytokiny, w tym IL6, IL10 oraz IFN γ . Białko kodowane przez ten gen może hamować aktywność kinazy JAK2 (ang. *Janus-Activated Kinase 2*; JAK2). Opisano SOCS3 jako czynniki zwiększający udział prozapalnej TNF α w lipogenezie i oporności hepatocytów na insulinę¹⁷⁵, a polimorfizm genu może warunkować dyslipidemię¹⁷⁶. Podobnie zwiększenie ekspresji SOCS3 opisano w trakcie nasilenia procesów zapalnych w przebiegu chorób autoimmunologicznych¹⁷⁷, natomiast zmniejszenie ekspresji może wiązać się z rozwojem nowotworów np.: raka dróg żółciowych¹⁷⁸, raka szyjki macicy¹⁷⁹, raka wątrobowokomórkowego¹⁸⁰, raka płuca¹⁸¹ czy raka pęcherza moczowego¹⁸², prawdopodobnie w związku z regulacją procesów apoptozy komórek¹⁸³. Bardzo szeroko opisuje się udział SOCS3 w procesach zapalnych zarówno infekcyjnych (np.: zwiększenie ekspresji SCOS3 w trakcie zakażenia wirusem ospy wietrznej¹⁸⁴, wirusem ebola¹⁸⁵, czy prątkami gruźlicy¹⁸⁶) jak i immunopatologicznych (np.: wytlumienie ekspresji SOCS3 w eozynofilach chorych na astmę upośledzało ich adhezję, migrację i degranulację¹⁸⁷, wysoka ekspresja SOCS3 koreluje z szybkimi nawrotami wrzodziejącego zapalenia jelita grubego¹⁸⁸, wypadnięcie funkcji SOCS3 może być związane z rozwojem choroby Sjogrena¹⁸⁹). SOCS3 może mieć wpływ na rozwój chorób alergicznych takich jak alergiczny nieżyt nosa¹⁹⁰ lub astma¹⁹¹, prawdopodobnie również przez zmniejszanie ekspresji FOXP3 na powierzchni limfocytów Treg¹⁹².

TWIST2 – lokalizacja cytogenetyczna 2q37.3; znany również jako *AMS*, *FFDD3* czy *bHLHa39*. Jest czynnikiem transkrypcyjnym z grupy helisa-pętla-helisa (ang. *helix-loop-helix*; HLH), skwalifikowanym w klasie II. Są to czynniki odpowiedzialne za dimeryzację białek związanych ze szlakiem sygnalizacyjnym opartym na TGF β , związanym z kolei z patogenezą przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego będącego jednym z podstawowych mechanizmów progresji chorób nowotworowych^{193,194}. Opisywano udział TWIST2 w patogenezie m.in.: przewlekłej białaczki limfocytowej¹⁹⁵, raka jajnika¹⁹⁶, raka jelita grubego¹⁹⁷ i raka szyjki macicy¹⁹⁸. Białka TWIST1 i TWIST2 wydają się również mieć wpływ na przebieg procesów zapalnych poprzez związek z regulacją produkcji IL10 i TGF β ^{199,200}.

18s – lokalizacja cytogenetyczna 22p12; geny kodujące podjednostkę mniejszą rybosomalnego RNA są obecne w tzw. sekwencjach repetytywnych rDNA. Defekty w

genach kodujących rybosomalne DNA aktywują białko p53 do procesów degradacji komórki²⁰¹. Geny kodujące rybosomalne DNA ze względu na swoją stałość są podstawą wielu badań filogenetycznych dotyczących zarówno pochodzenia gatunków jak i rodowodu poszczególnych tkanek w organizmach żywych^{202,203}. Jest genem cytohomeostatycznym (referencyjnym) (z ang. *housekeeping gene*), tzn. takim, którego funkcja i ekspresja w komórkach jest stała i ciągła niezależnie od warunków w większości komórek. Uznaje się, że ekspresja tych genów nie zmienia się w warunkach eksperymentalnych wobec tego świetnie nadają się do normalizacji wyników ekspresji innych genów w badaniach z użyciem techniki RT-PCR. Geny referencyjne, jako stale podlegające ekspresji na tym samym poziomie, służą jako kontrola równoległych reakcji (czy ilość matrycy jest identyczna we wszystkich reakcjach) oraz jako punkt odniesienia w ilościowych oznaczeniach ekspresji genów²⁰⁴.

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. Jako próby referencyjnej użyto mRNA referencyjnego (Universal Human Reference RNA; Agilent Technologies). Gen *18s* zastosowany został jako gen referencyjny. $\Delta\Delta$ 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 płytce.

Uzyskane wyniki zapisano w bazie danych poddanej analizie statystycznej programem Statistica v.12 StatSoft (Tulsa, USA). W analizie statystycznej użyto testów U Manna Whitneya, T Studenta, Wilcozona oraz Chi-kwadrat. Zastosowano także testy dla analizy porównań wielokrotnych (post hoc): test Bonferoniego i Benjamina Hochberga.

4. Wyniki

4.1 Wyniki części klinicznej

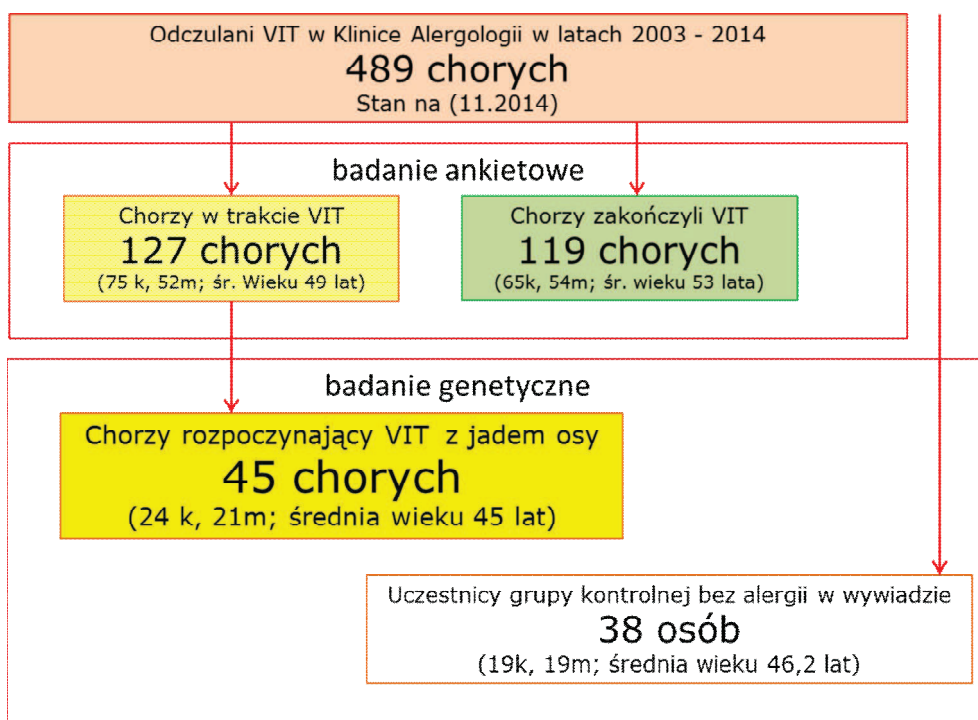
4.1.1 Charakterystyka kliniczna badanych

Badaniem objęto 246 chorych leczonych z powodu alergii na jady owadów, w tym 127 chorych w trakcie leczenia oraz 119, którzy zakończyli immunoterapię. Dodatkowo badaniami objęto grupę kontrolną składającą się z 38 zdrowych ochotników, którzy nie podawali alergii ani reakcji anafilaktycznych w wywiadzie, dobranych pod względem płci i wieku do chorych rozpoczynających VIT. Grupa w trakcie odczulania składała się z 75 kobiet i 52 mężczyzn w wieku od 21 do 82 lat, średnia wieku 49 lat leczonych jadem owadów błonkoskrzydłych w latach 2010-2014 w Klinice Alergologii GUMed. W tej grupie 45 chorych rozpoczynających w latach 2010–2014 VIT z jadem osy poddano badaniu ekspresji wybranych genów. Badania ekspresji genów wykonano również u 38 osób z grupy kontrolnej. Klinikzną charakterystykę populacji badanej w trakcie VIT i grupy kontrolnej przedstawiono w tabeli (Tab. 4).

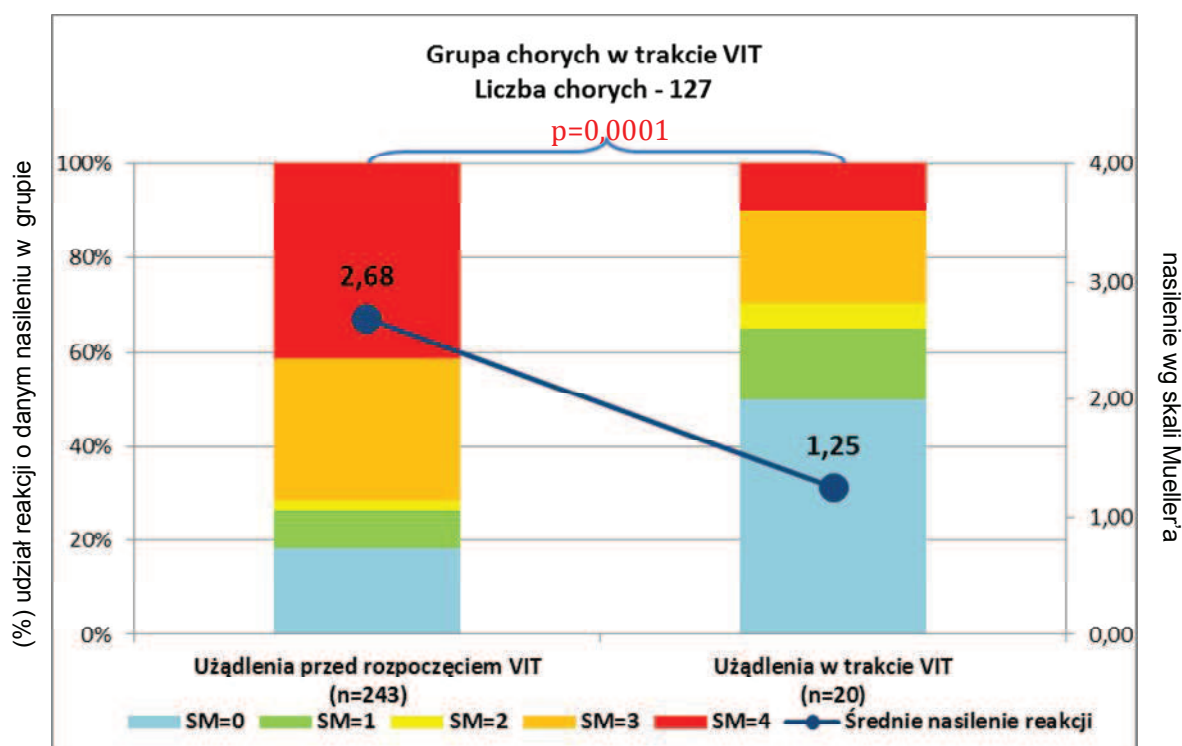
Grupa badana retrospektywnie obejmowała 119 chorych (65 kobiet i 54 mężczyzn w wieku od 25 do 84 lat, średnia wieku 53 lata), którzy w latach 2003-2014 ukończyli 5 letni kurs VIT. Klinikzną charakterystykę populacji badanej po zakończonym VIT przedstawiono w tabeli (Tab.5). Wyniki rekrutacji przedstawiono na wykresie (Wyk. 1).

4.1.2 Wyniki badania skuteczności immunoterapii w grupie chorych w trakcie i po zakończonym VIT

Zarówno w grupie w trakcie jak i po zakończonym VIT wykazano znamienne zmniejszenie średniego nasilenia reakcji po użądleniu (wg skali Muellera) ocenianej przed i w trakcie leczenia (odpowiednio 2,68 z 243 reakcji do 1,25 z 20 reakcji przy $p=0,0001$, w grupie w trakcie VIT; oraz 2,84 z 205 reakcji do 0,87 z 23 reakcji przy $p<0,0001$, w grupie po zakończonym VIT), natomiast po zakończonej terapii średnie nasilenie reakcji nie różniło się istotnie w stosunku do reakcji w trakcie VIT (0,87 z 23 reakcji do 1,11 z 19 reakcji przy $p=0,8897$). Wyniki przedstawiono na wykresach (Wyk. 2 i Wyk. 3), natomiast podsumowanie licznosci analizowanych reakcji i liczby chorych w poszczególnych grupach przedstawiono w tabeli (Tab. 3).



Wykres 1. Wyniki rekrutacji do badania.



Wykres 2. Średnie nasilenie reakcji po užądleniu wg skali Muellera (SM) przed rozpoczęciem VIT (n=243 raportowane reakcje) i w trakcie VIT (n=20 raportowanych reakcji) w grupie chorych w trakcie VIT.

Tabela 3. Podsumowanie liczności użądleń (raportowanych reakcji) i liczby chorych w analizowanych grupach.

| Grupa badana | Użądlenia | Liczba chorych (%) | Liczba użądleń (%) |
|---------------------------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------|
| W trakcie VIT^{\$} | Przed VIT | 127 (100%) | 243 (100%) |
| | W trakcie VIT | 17 (13,4%) | 20 (8,2%) |
| Po zakończonym VIT[#] | Przed VIT | 119 (100%) | 205 (100%) |
| | W trakcie VIT | 23 (19,3%) | 23 (11,2%) |
| | Po VIT | 19 (15,9%) | 19 (9,3%) |
| | W trakcie i po VIT [±] | 37 (31%) | 42 (20,5%) |

\$ - pięcioro chorych było żądlnych dwukrotnie w trakcie VIT w tej grupie; # - troje chorych było żądlnych zarówno w trakcie jak i po VIT w tej grupie; ± - zsumowano reakcje mające miejsce zarówno w trakcie jak i po VIT w tej grupie

Podobne wyniki uzyskano wyodrębniając grupę chorych odczulanych jadem osy: Wskaźniki wynosiły odpowiednio 2,8 z 207 reakcji do 1,06 z 18 reakcji przy $p < 0,0001$ u chorych w trakcie VIT z jadem osy i 2,9 z 158 reakcji do 0,78 z 18 reakcji przy $p < 0,0001$ u chorych po zakończonym VIT z jadem osy, oraz 0,78 z 18 reakcji do 1,13 z 16 reakcji przy $p = 0,2817$ porównując nasilenie reakcji w trakcie i po zakończeniu VIT z jadem osy (Wyk. 4 i Wyk. 5).

Tabela 4. Charakterystyka kliniczna badanych w trakcie immunoterapii z jadem owadów z wyodrębnioną grupą chorych poddanych badaniu genetycznemu, oraz uczestników grupy kontrolnej.

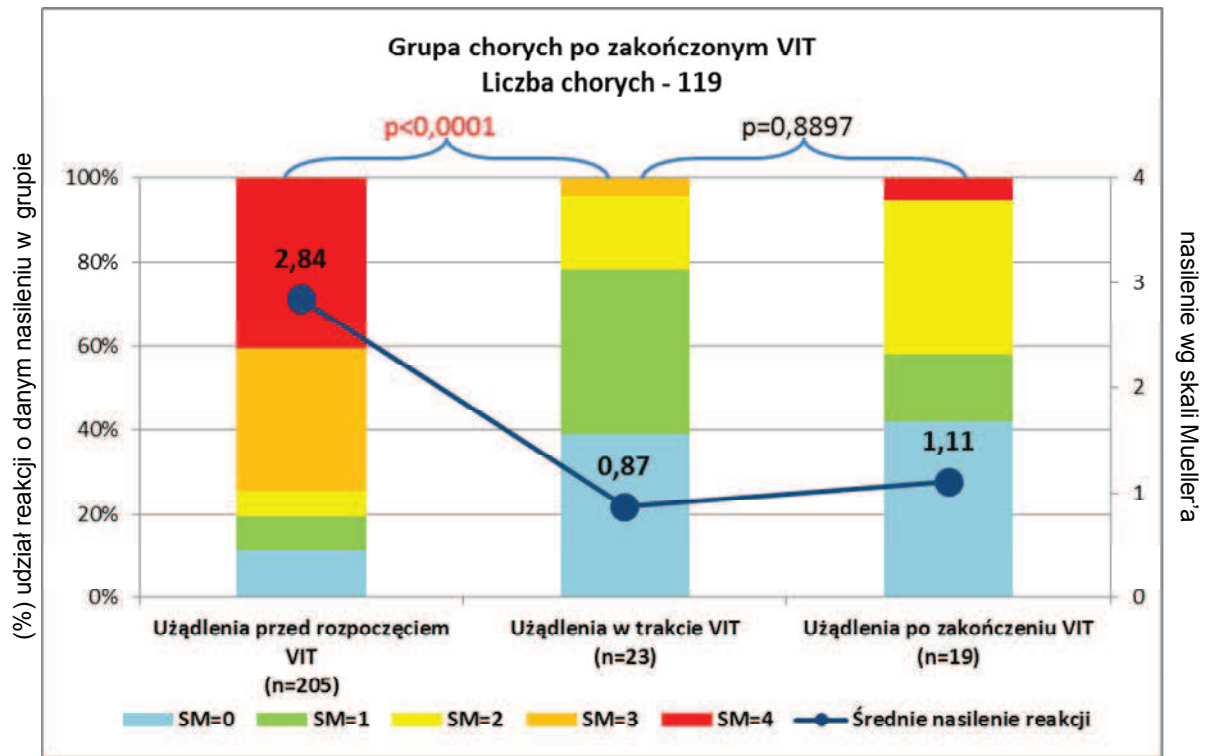
| Dane kliniczne (n, %) | Mężczyźni (n, %) | Kobiety (n, %) | Wiek zakres Średnia (lata) | Nasilenie reakcji użądlenia przed VIT * | Działania niepożądane VIT # (n, %) | Choroby układu krążenia (n, %) | Choroby atopowe (n, %) | Choroby tarczycy (n, %) | Choroby autoimmunologiczne (n, %) | Mastocytoza (n, %) |
|---|------------------|----------------|----------------------------|---|------------------------------------|--------------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| Wszyscy n=127 (100%) | 52 (41%) | 75 (59%) | 21-82 (49) | 243 (2,68) | 22 (17,3%) | 41 (32,3%) | 47 (37%) | 21 (16,5%) | 9 (7%) | 10 (7,9%) |
| VIT Osa n=114 (89,8%) | 47 (41,3%) | 67 (58,7%) | 21-82 (50) | 207(2,8) | 18 (7%) | 40 (35%) | 44 (38,6%) | 19 (16,6%) | 9 (7,9%) | 9 (7,9%) |
| VIT Pszczola n=13 (10,2%) | 5 (38,4%) | 8 (61,6%) | 28-61 (45) | 36 (2,0) | 4 (30,7%) | 1 (7,7%) | 3 (23%) | 2 (15,4%) | 0 | 1 (7,7%) |
| Badane geny n=45 (35,4%) | 22 (48,8%) | 23 (51,1%) | 21-72 (45) | 88 (2,38) | 9 (20%) | 12 (26,6%) | 12 (26,6%) | 6 (13,3%) | 2 (4,4%) | 0 |
| Grupa kontrolna badania genów n=38 | 19 (50%) | 19 (50%) | 25-77 (46,2) | - | - | 13 (34,2%) | 0 | 5 (13,1%) | 0 | 0 |

* - (liczba deklarowanych użądleń, średnie nasilenie reakcji); # - inne niż obrzęk miejscowy po szczepieniu (reakcje stopnia 1-4 wg Mosbecha i Muellera)⁶⁵

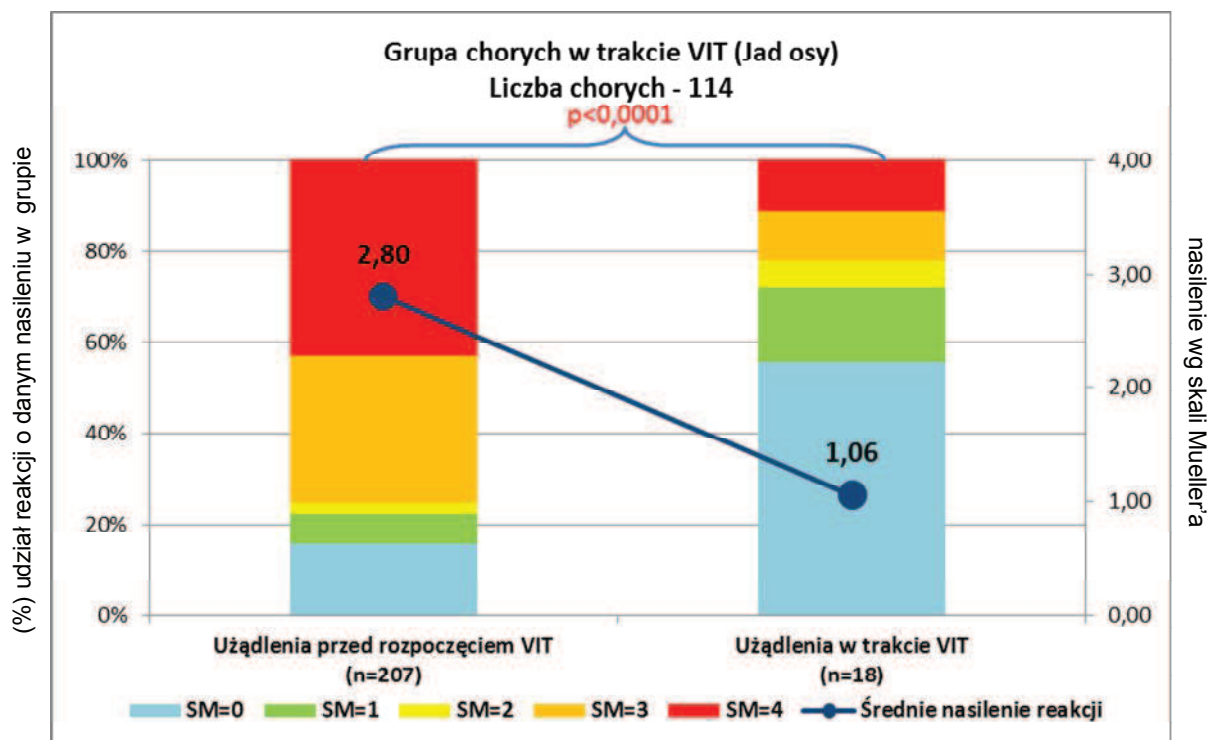
Tabela 5. Charakterystyka kliniczna badanych po zakończonej immunoterapii z jadem owadów.

| Dane kliniczne (n, %) | Mężczyźni (n, %) | Kobiety (n, %) | Wiek zakres Średnia (lata) | Nasilenie reakcji użądlenia przed VIT | Działania niepożądane VIT (n, %) | Choroby układu krążenia (n, %) | Choroby atopowe (n, %) | Choroby tarczycy (n, %) | Choroby autoimmunologiczne (n, %) | Mastocytoza (n, %) |
|--------------------------------|------------------|----------------|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| Wszyscy n=119 (100%) | 54 (45,4%) | 65 (54,6%) | 25-84 (53) | 205 (2,84) | 27 (22,7%) | 56 (47%) | 44 (37%) | 16 (13,4%) | 14 (11,7%) | 2 (1,7%) |
| VIT osa n=94 (79%) | 43 (45,7%) | 51 (54,3%) | 25-84 (54) | 158 (2,9) | 21 (22,3%) | 46 (48,9%) | 35 (37,2%) | 11 (11,7%) | 14 (14,9%) | 2 (2,1%) |
| VIT pszczoła N=25 (21%) | 11 (44%) | 14 (56%) | 28-73 (51) | 47 (2,66) | 6 (24%) | 10 (40%) | 9 (36%) | 5 (20%) | 0 | 0 |

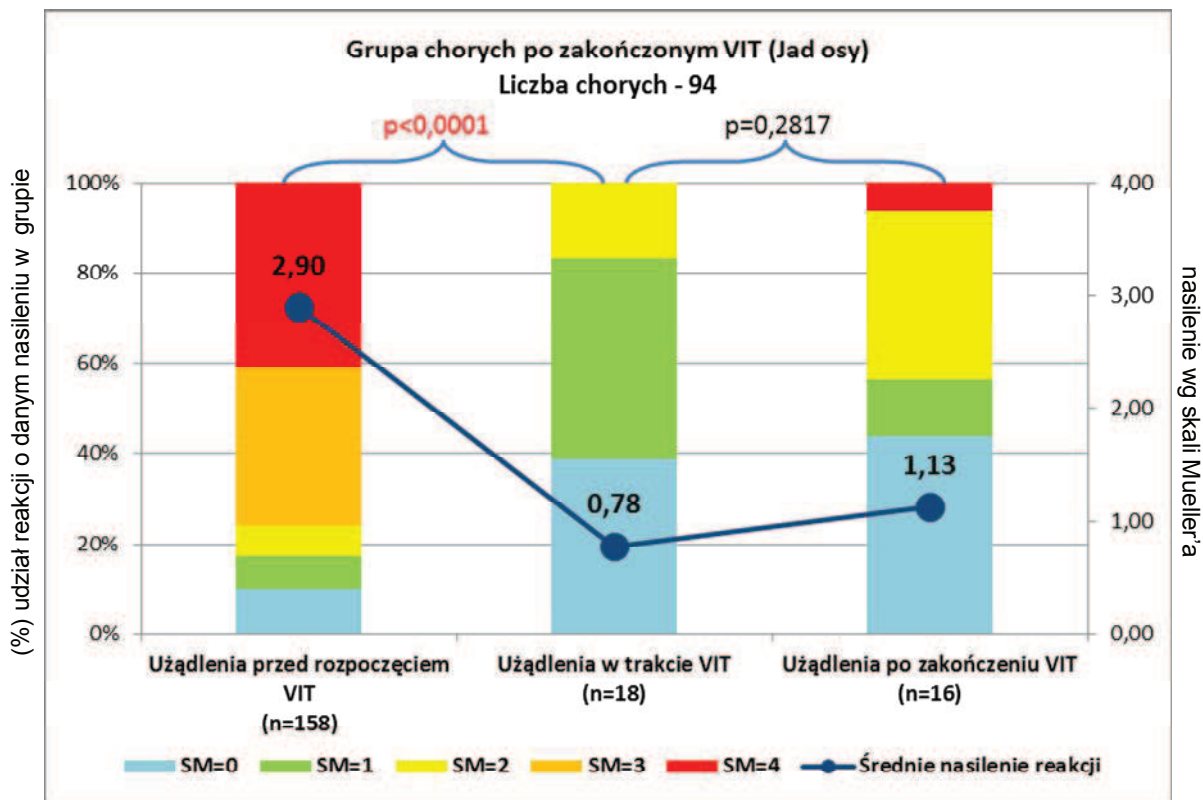
* - liczba deklarowanych użądleń, średnie nasilenie reakcji; # - inne niż obrzęk miejscowy po szczepieniu (reakcje stopnia 1-4 wg Mosbecha i Muellera)⁶⁵



Wykres 3. Średnie nasilenie reakcji po użądleniu przed rozpoczęciem VIT (n=205) i w trakcie VIT (n=23) oraz po zakończeniu VIT (n=19) w grupie chorych po zakończonej terapii.



Wykres 4. Średnie nasilenie reakcji po użądleniu wg skali Muellera (SM) przed rozpoczęciem VIT z jadem osy (n=207 raportowanych reakcji) i w trakcie VIT z jadem osy (n=18 raportowanych reakcji) w grupie chorych w trakcie VIT.

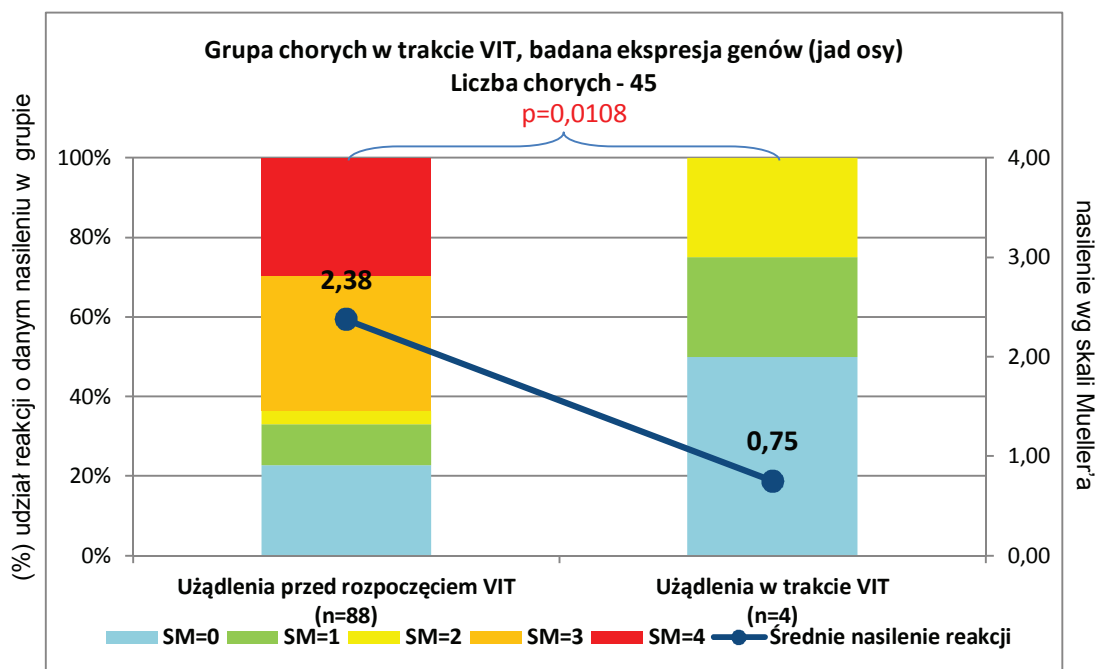


Wykres 5. Średnie nasilenie reakcji po użądleniu przed rozpoczęciem VIT z jadem osy (n=158) i w trakcie VIT (n=18) oraz po zakończeniu VIT (n=16) w grupie chorych po 5 latach terapii.

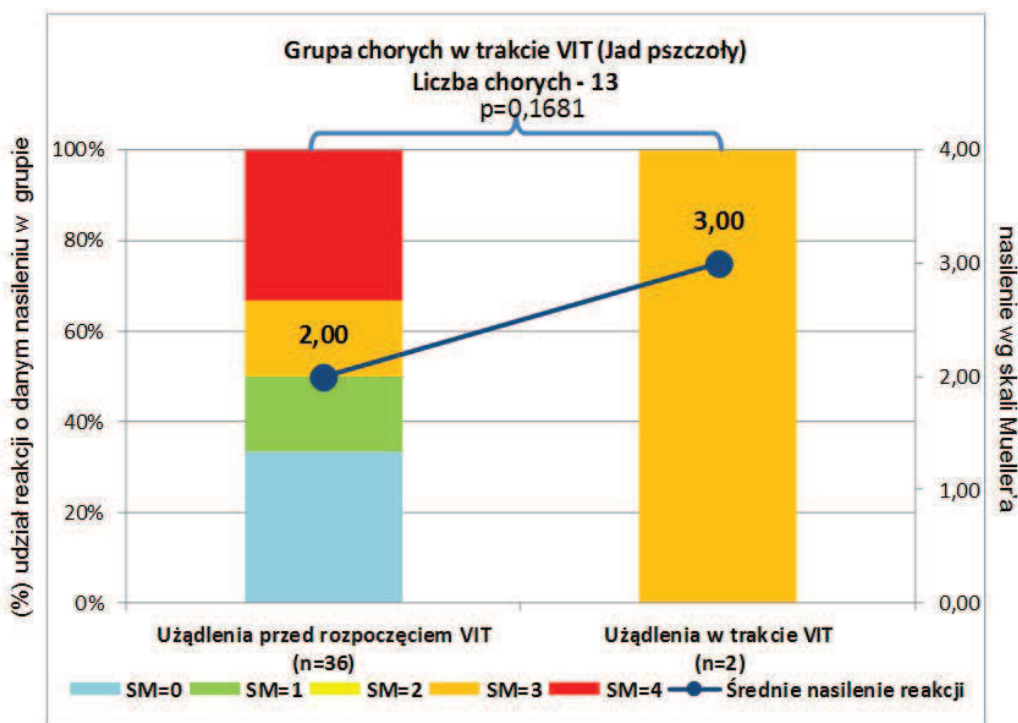
W grupie w trakcie immunoterapii z jadem osy odrębną analizie poddano grupę 45 chorych poddanych badaniu genetycznemu. Podobnie jak w całej populacji zanotowano istotny spadek średniej nasilenia reakcji po użądleniach (2,38 z 88 reakcji do 0,75 z 4 reakcji, przy $p=0,0108$) (Wyk. 6).

Natomiast w grupie chorych w trakcie VIT z jadem pszczoły stwierdzono jedynie 2 użądlenia w czasie trwania leczenia. Zaobserwowano wzrost średniej nasilenia reakcji (2,0 z 36 reakcji do 3,0 z 2 reakcji) jednak obserwowany wzrost nie był znamieny statystycznie ($p=0,1681$) (Wyk. 7).

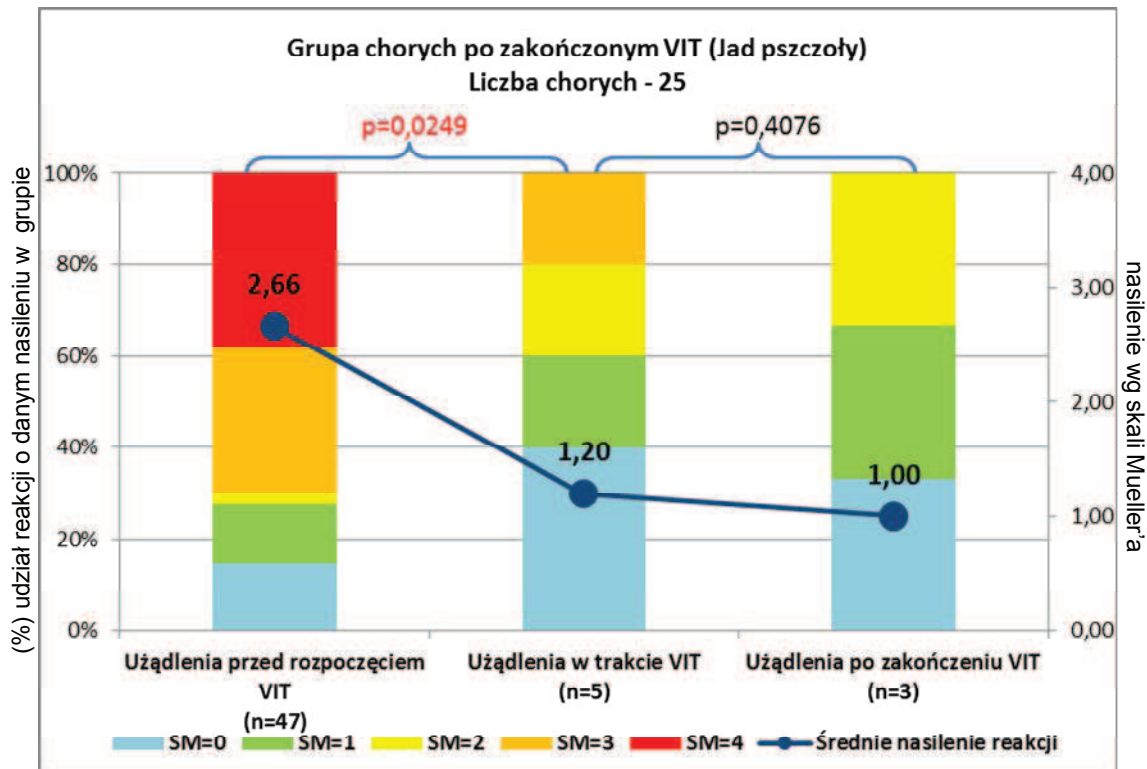
W grupie po zakończonym VIT z jadem pszczoły wyniki były podobne do tych odnoszących się do całej badanej grupy jednak wyniki opierają się również na analizie niewielkiej liczby raportowanych użądleń (47 użądleń przed VIT, 5 użądleń w trakcie i 3 po zakończeniu VIT). Średnie nasilenie reakcji po użądleniu spadło w tej grupie po rozpoczęciu terapii z wartości 2,66 do 1,2 przy $p=0,0249$. Po zakończeniu terapii średnia nasilenia reakcji spadła wg relacji chorych do 1,0 przy $p=0,4076$ (Wyk. 8).



Wykres 6. Średnie nasilenie reakcji po użądleniu wg skali Muellera (SM) przed rozpoczęciem VIT z jadem osy (n=88 raportowanych reakcji) i w trakcie VIT z jadem osy (n=4 raportowane reakcje) w grupie chorych, u których przeprowadzono badanie genetyczne.



Wykres 7. Średnie nasilenie reakcji po użądleniu wg skali Muellera (SM) przed rozpoczęciem VIT z jadem pszczoły (n=36) i w trakcie VIT z jadem pszczoły (n=2) w grupie chorych w trakcie VIT.



Wykres 8. Średnie nasilenie reakcji po użądleniu przed rozpoczęciem VIT z jadem pszczoły (n=47) i w trakcie VIT (n=5) oraz po zakończeniu VIT (n=3) w grupie chorych po 5 latach terapii.

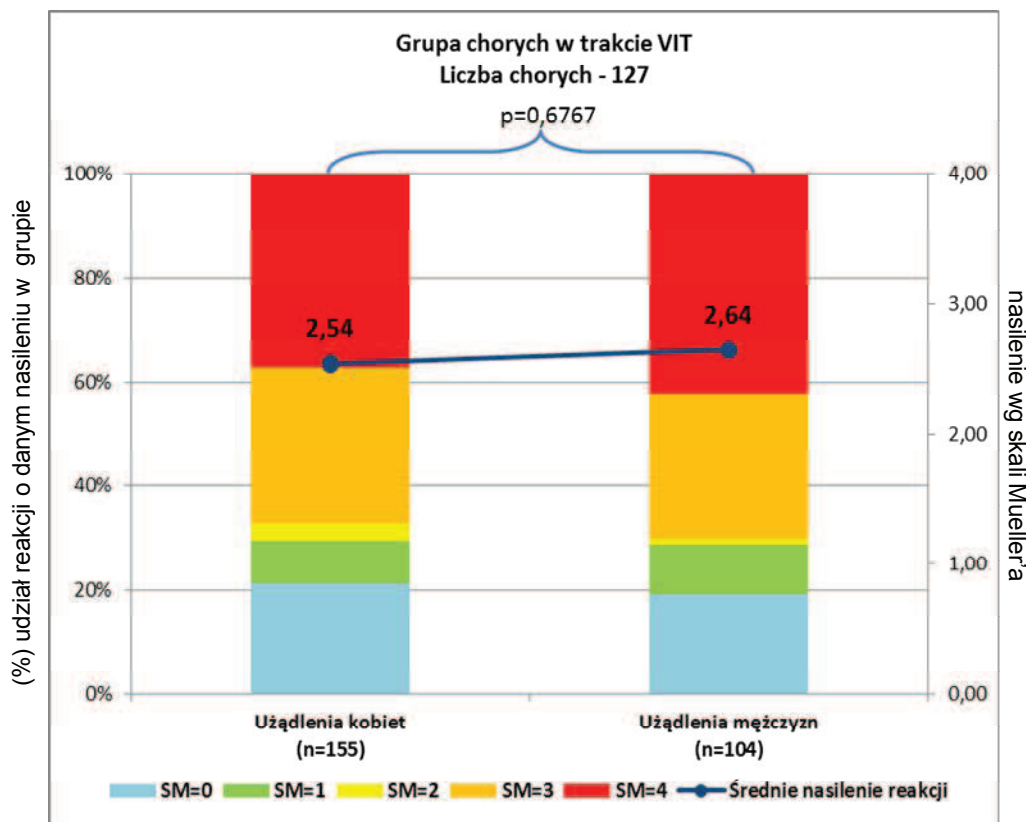
4.1.3 Wyniki badania wpływu wybranych czynników klinicznych na nasilenie reakcji po użądleniu, bezpieczeństwo i skuteczność VIT

Wyniki badania ankietowego przeanalizowano również wobec czynników klinicznych, które mogą wpływać na skuteczność immunoterapii takich jak płeć, wiek, alergia na jad osy bądź pszczoły, długość terapii, występowanie działań niepożądanych w trakcie terapii, współwystępowanie określonych chorób (chorób układu krążenia, chorób atopowych, chorób gruczołu tarczowego, chorób autoimmunologicznych).

4.1.3.1 Płeć

Nie zaobserwowano różnic w nasileniu reakcji w grupie kobiet i mężczyzn, zarówno w grupie w trakcie VIT (średnia 2,54 ze 155 reakcji dla kobiet i 2,64 ze 104 reakcji dla mężczyzn przy $p=0,6767$) (Wyk. 9), jak i po immunoterapii (średnia 2,55 ze 109 reakcji dla kobiet i 2,5 ze 112 reakcji dla mężczyzn przy $p=0,2779$). Nie było również różnic analizując reakcje w trakcie VIT (grupa w trakcie VIT; $p=0,4924$) oraz w trakcie i po VIT (grupa po VIT; $p=0,1878$). Nie odnotowano wpływu płci na częstość występowania działań niepożądanych. Dla grupy w trakcie VIT: spośród 75 kobiet u

15 wystąpiły działania niepożądane (20%), mężczyźni – 7 z 52 (13%) przy $p=0,3384$. Dla grupy po VIT: u 17 z 65 kobiet (26%) i 10 z 54 mężczyzn (19%) przy $p=0,3221$.

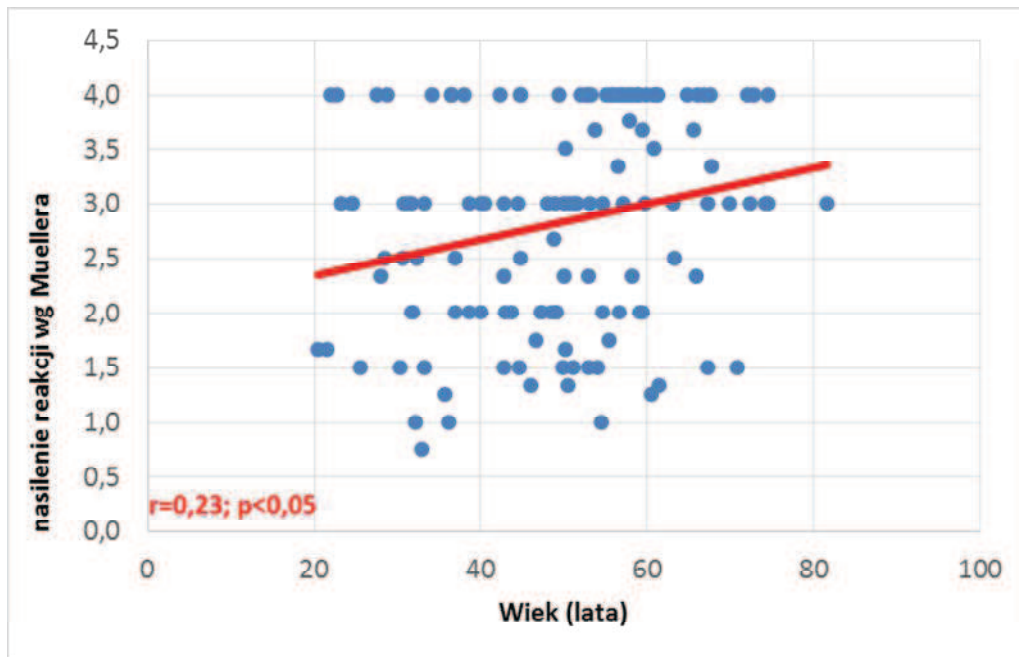


Wykres 9. Średnie nasilenie reakcji po użądleniu przed VIT w grupie chorych w trakcie VIT w zależności od płci chorego.

4.1.3.2 Wiek

Wykazano dodatnią korelację nasilenia reakcji po użądleniu z wiekiem chorych ($r=0,23$ przy $p<0,05$) w grupie chorych w trakcie VIT (Wyk. 10), jednak w grupie po zakończonym VIT nie zaobserwowano podobnej relacji ($r=-0,04$ przy $p>0,05$). Wyodrębniając użądlenia w trakcie i po VIT wskaźniki wyniosły odpowiednio $r=0,2073$ przy $p>0,05$ i $r=-0,1367$ przy $p>0,05$. Przyjmując punkt odcięcia – 45 rok życia, nie odnotowano różnic w skuteczności immunoterapii w obu grupach (w trakcie VIT: ≤ 45 lat średnia 1,0 z 4 reakcji, >45 lat 1,31 z 13 reakcji ($p=0,8247$); po zakończonym VIT: ≤ 45 lat 1,21 z 14, >45 lat 0,86 z 28 reakcji ($p=0,6084$)). Średnia wieku w grupie w trakcie VIT, którzy deklarowali działania niepożądane VIT inne niż odczyny miejscowe wyniosła 47 lat, natomiast chorych którzy nie mieli działań ubocznych 41 lat ($p=0,3365$). W grupie po VIT odpowiednio 55 i 50 lat przy

$p=0,2526$. Odmienne, przyjmując punkt odcięcia 45 lat podzielono chorych na dwie grupy (powyżej i poniżej tej granicy). W grupie w trakcie VIT ≤ 45 lat 10 z 48 chorych (21%) raportowało działania niepożądane, a niewiele mniejszy procent w grupie >45 lat (12 z 79 – 15%), przy $p=0,4152$. W grupie po zakończonym VIT odpowiednio: ≤ 45 lat 10 z 39 (26%) i >45 lat 17 z 80 (21%) przy $p=0,5914$.



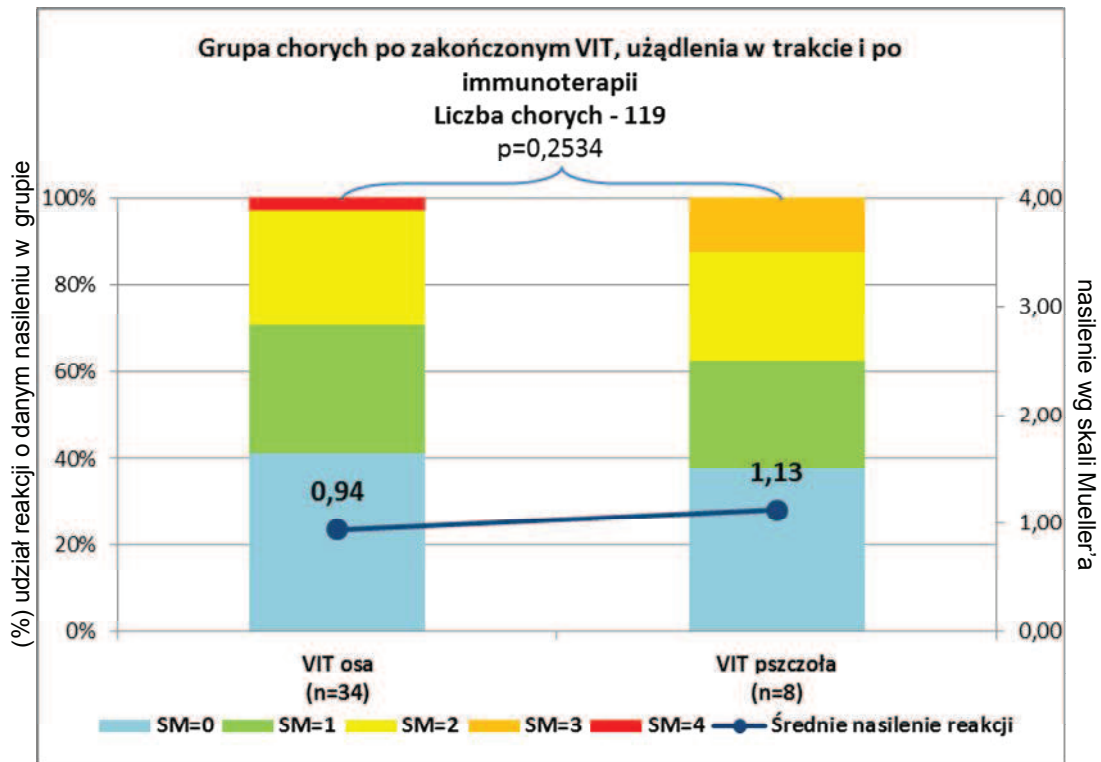
Wykres 10. Nasilenie reakcji po użądleniu wobec wieku chorego.

4.1.3.3 Immunoterapia z jadem osy i z jadem pszczoły

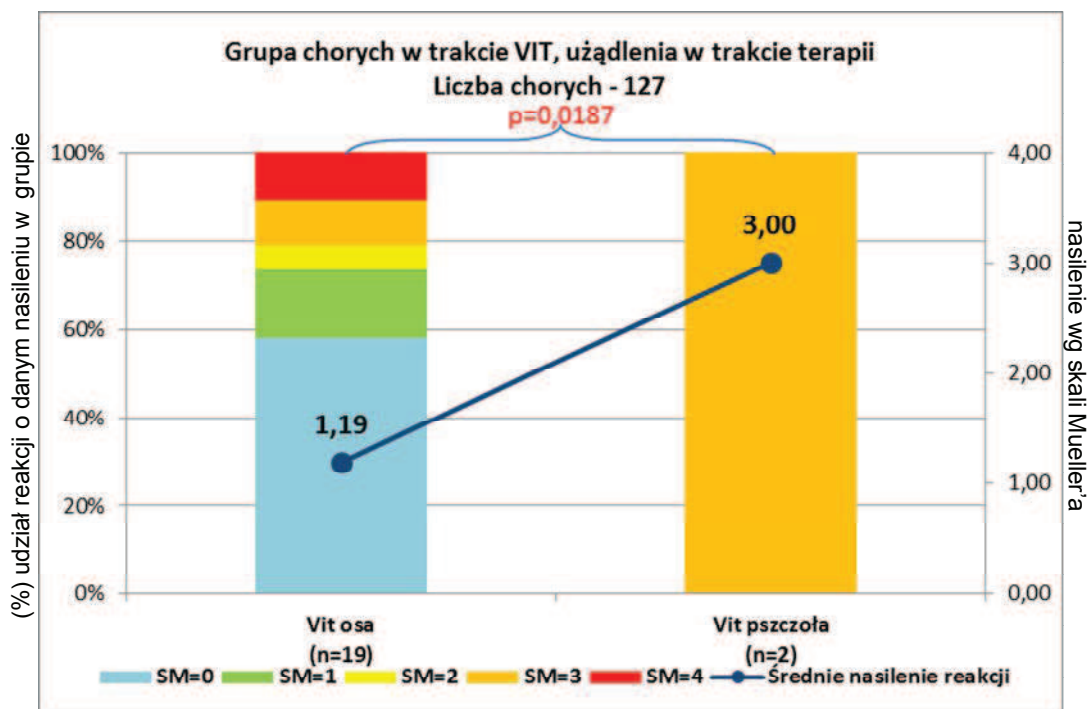
Nie wykazano istotnych różnic skuteczności VIT mierzonej jako średnie nasilenie reakcji po użądleniu w trakcie i po immunoterapii, pomiędzy odczulanymi jadem osy i pszczoły w grupie chorych, którzy ukończyli VIT (0,94 dla 34 użądleń podczas i po VIT z jadem osy do 1,13 dla 8 użądleń podczas i po VIT z jadem pszczoły przy $p=0,2534$) (Wyk. 11).

Jednak w grupie chorych w trakcie immunoterapii obserwowano średnie nasilenie o wartości 1,19 dla 19 użądleń w trakcie VIT z jadem osy i 3,00 dla 2 użądleń w trakcie VIT z jadem pszczoły przy $p=0,0187$ (Wyk. 12).

Rodzaj jadu stosowanego do immunoterapii wpływał na jej bezpieczeństwo. Działania niepożądane inne niż miejscowe odczyny poszczepienne występowały u



Wykres 11. Średnie nasilenie reakcji po użądleniu w trakcie i po VIT w grupie chorych po zakończonym VIT w zależności od stosowanego jadu w immunoterapii.

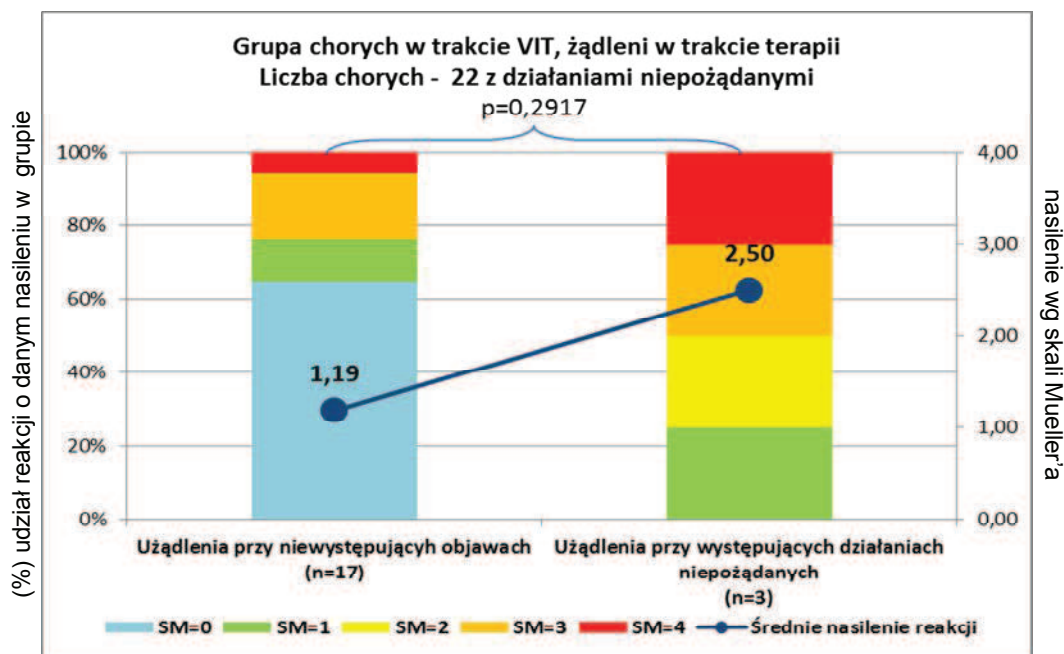


Wykres 12. Średnie nasilenie reakcji po użądleniu w trakcie VIT w grupie chorych w trakcie VIT w zależności od stosowanego jadu w immunoterapii.

44% chorych po zakończonym VIT z jadem pszczoły (u 11 z 25 chorych) i 17% po VIT z jadem osy (u 16 z 94 chorych) przy $p=0,0042$; odpowiednio dla grupy w trakcie VIT: 30% (4 z 13) dla pszczoły i 16% (18 ze 113) dla osy, przy $p=0,182$.

4.1.3.4 Działania niepożądane

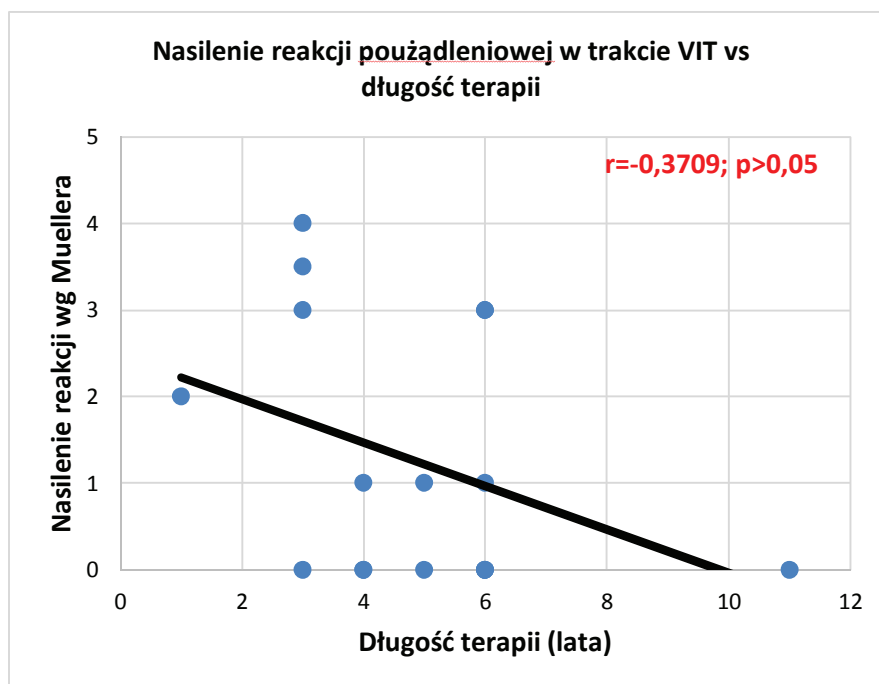
Analizowano całą grupę chorych w trakcie VIT pod względem występowania działań niepożądanych terapii. Średnie nasilenie wszystkich raportowanych reakcji poużądleniowych przy występujących objawach ubocznych wyniosło 2,43 dla 54 reakcji oraz 2,58 dla 211 reakcji u chorych bez działań ubocznych ($p=0,179$). Chorzy, u których występowały działania niepożądane inne niż miejscowe odczyny poszczepienne (stopień 1-4 wg Mosbecha i Muellera – Tab.1⁶⁵) raportowali 17 użądleń w trakcie VIT, a chorzy, u których występowały reakcje poszczepienne o charakterze uogólnionym raportowali 3 użądlenia w trakcie VIT. Średnie nasilenie reakcji w oby grupach wynosiło w tym przypadku odpowiednio 1,19 do 2,5 przy $p=0,2917$ (Wyk. 13). W grupie po zakończonym VIT podobna analiza wyniosła odpowiednio: dla wszystkich użądleń 2,55 z 55 przy obecności objawów ubocznych VIT, w stosunku do 2,52 ze 153 bez objawów niepożądanych ($p=0,7092$); dla użądleń w trakcie i po VIT odpowiednio 1,18 z 11 i 0,9 z 25 przy $p=0,539$.



Wykres 13. Średnie nasilenie reakcji po użądleniu w trakcie VIT, w grupie chorych w trakcie VIT w zależności od występowania działań niepożądanych terapii innych niż reakcja miejscowa po szczepieniu.

4.1.3.5 Długość terapii

W grupie chorych w trakcie VIT analizowano korelację nasilenia reakcji po użądleniach w trakcie VIT wobec długości przebytej terapii do czasu użądlenia. Zaobserwowano ujemną korelację tych czynników ($r=-0,37$) (Wyk. 14).

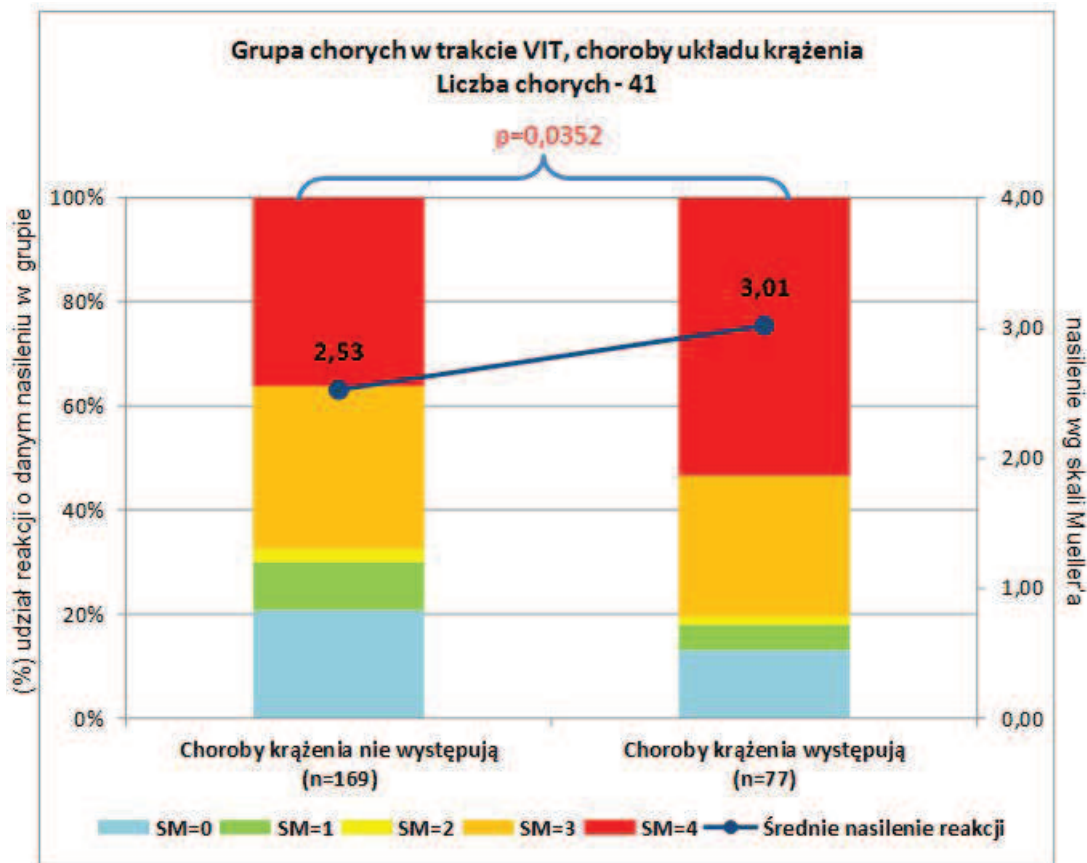


Wykres 14. Nasilenie reakcji po użądleniu wobec długości przebytej terapii do czasu użądlenia.

4.1.3.6 Choroby układu krążenia

Współwystępowanie chorób układu krążenia, takich jak nadciśnienie tętnicze, niewydolność mięśnia sercowego, choroba niedokrwienna serca, istotnie wpływało na wzrost średniej nasilenia reakcji po użądleniu zarówno w grupie po (56 chorych z rozpoznaną chorobą układu krążenia) jak i w trakcie VIT (41 chorych z rozpoznaną chorobą układu krążenia). W grupie w trakcie VIT średnie nasilenie reakcji przed VIT wyniosło 3,01 z 77 raportowanych użądleń u osób z chorobami krążenia, w stosunku do średniej 2,53 ze 169 użądleń raportowanych przez chorych bez choroby układu krążenia w wywiadzie (Wyk. 15) ($p=0,0352$). Odpowiednio po VIT: 2,72 ze 106 do 2,38 ze 117 przy $p=0,03$. Analiza wyodrębnionych użądleń w trakcie i po VIT nie wykazała natomiast istotnych różnic: po VIT średnia z chorobami układu krążenia 1,05 z 19 reakcji do 0,91 z 23 u chorych bez rozpoznania chorób układu krążenia przy $p=0,1878$; i odpowiednio w trakcie VIT 2,2 z 5 do 0,93 z 15 przy $p=0,091$. W obu

grupach nie ma różnic w częstości występowania objawów ubocznych VIT: w grupie po VIT działania niepożądane wystąpiły u 11 z 56 chorych z rozpoznaną chorobą krążenia (20%), w stosunku do 16 z 63 (25%) bez takiego rozpoznania przy $p=0,4544$; natomiast w trakcie VIT odpowiednio 5 z 41 (12,1%) i 17 z 86 (19,7%) przy $p=0,2918$.

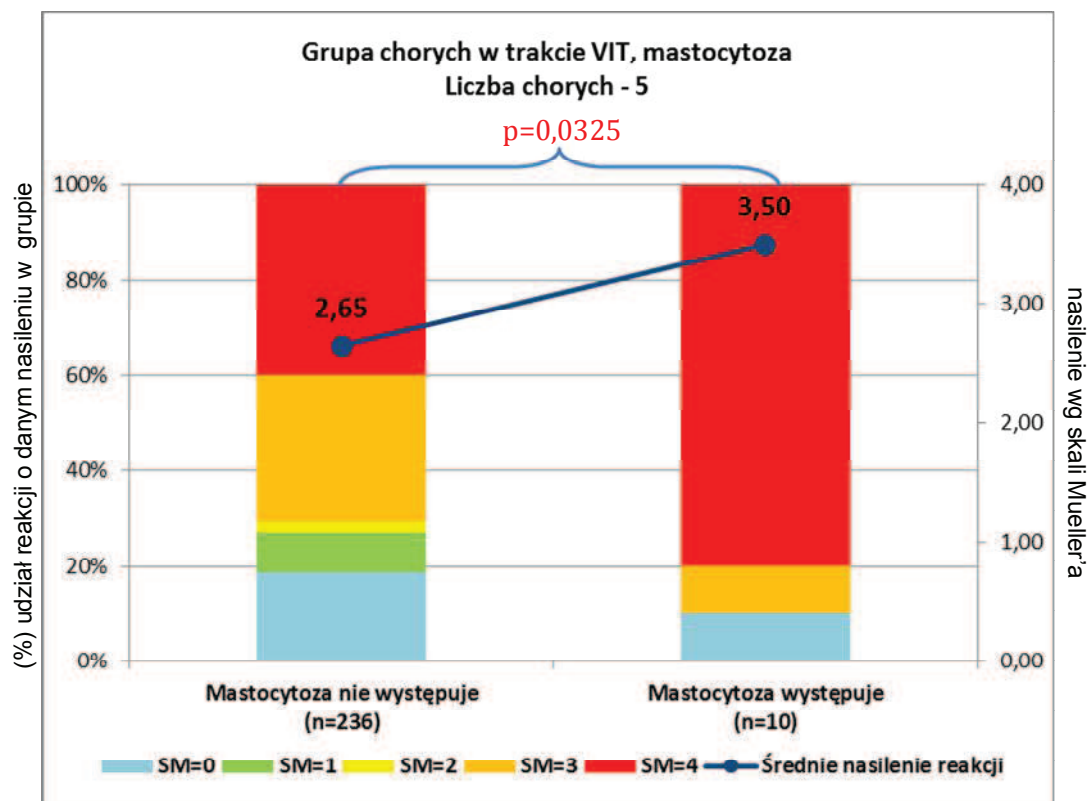


Wykres 15. Średnie nasilenie reakcji po użądleniu przed VIT w grupie chorych w trakcie VIT w zależności od współwystępowania chorób układu krążenia.

4.1.3.7 Mastocytoza

W grupie chorych w trakcie VIT ankietowano 5 chorych ze współistniejącą mastocytozą. Średnie nasilenie reakcji w tej wyodrębnionej grupie było znacząco wyższe niż u pozostałych chorych (odpowiednio 3,5 z 10 reakcji do 2,65 z 236 reakcji przy $p=0,0325$) (Wyk. 16). W grupie po zakończonym VIT ankietowano zaledwie dwóch chorych na mastocytozę. Tendencje były podobne, jednak nieistotne statystycznie: 3,4 z 5 do 2,51 ze 193 przy $p=0,3802$. Nie można było ocenić skuteczności VIT wśród chorych na mastocytozę: w grupie w trakcie VIT tylko jeden

chory na mastocytozę był żądny podczas trwania immunoterapii (zareagował zmianami pokrzywkowymi, które ustąpiły po przyjęciu leków przeciwhistaminowych i kortykosteroidów) ($p=0,5169$). W grupie po VIT żaden chory z mastocytozą nie był żądny w trakcie lub po VIT. Analizując bezpieczeństwo VIT u chorych na mastocytozę zaobserwowano trend w kierunku częstszego występowania działań niepożądanych wśród chorych na mastocytozę. W grupie w trakcie VIT u 2 z 5 chorych na mastocytozę (40%) wystąpiły działania niepożądane VIT inne niż miejscowe odczyny skórne w stosunku do 20 ze 122 (16%) bez tego rozpoznania ($p=0,1716$). W grupie po VIT odpowiednio: u 1 z 2 (50%) do 26 ze 117 (22%) przy $p=0,3524$.



Wykres 16 . Średnie nasilenie reakcji po użądleniu przed VIT w grupie chorych w trakcie VIT w zależności od współwystępowania mastocytozy.

4.1.3.8 Choroby atopowe

Wśród chorych w trakcie i po zakończonym VIT nie wykazano różnic nasilenia reakcji po użądleniu w zależności od współwystępowania innych chorób atopowych (w trakcie VIT: 47 chorych ze średnim nasileniem 2,63 z 95 użądleń w stosunku do 2,7 ze 151 użądleń wśród chorych bez rozpoznanych chorób atopowych, przy $p=0,7644$;

po VIT: 44 chorych ze średnim nasileniem 2,52 z 77 reakcji do 2,53 ze 169 bez innej atopii, przy $p=0,6598$), również w zakresie użądleń w trakcie i po immunoterapii (grupa w trakcie VIT: 0,8 z 10 użądleń przy współwystępujących chorobach atopowych w stosunku do 1,7 z 10 bez współwystępującej atopii, przy $p=0,3291$; grupa po VIT: 0,79 z 14 użądleń do 1,07 z 28 reakcji, przy $p=0,3055$). W grupie w trakcie VIT zaobserwowano nieistotny statystycznie trend w kierunku większej częstości występowania działań niepożądanych VIT wśród chorych z innymi chorobami atopowymi w stosunku do chorych bez innej atopii poza HVA (grupa z inną atopią: 12 z 47 chorych zgłosiło działania niepożądane (26%); do 10 z 80 chorych (13%) bez innej atopii, przy $p=0,061$). W grupie po zakończonym VIT było podobnie: 13 z 44 (30%) do 14 z 75 (19%) przy $p=0,1714$.

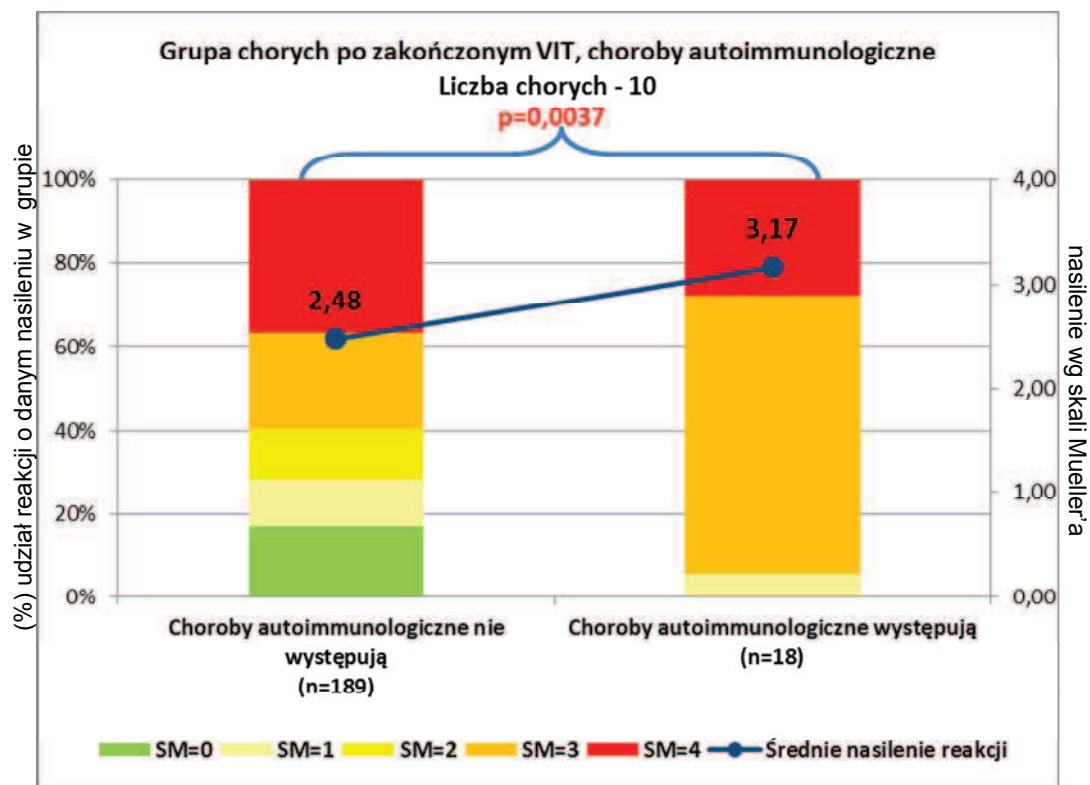
4.1.3.9 Choroby gruczołu tarczowego

Choroby gruczołu tarczowego pozostawały bez wpływu na VIT (w trakcie VIT: 21 chorych z 2,65 z 45 użądleń do 2,68 z 201 użądleń u chorych bez choroby tarczycy, przy $p=0,7686$; po VIT odpowiednio: 17 chorych z 2,69 z 39 użądleń do 2,5 ze 172 użądleń, przy $p=0,0917$). W trakcie VIT użądlenie deklarował w tej grupie tylko jeden chory, który nie zareagował w tym przypadku reakcją systemową ($p=0,5818$). W grupie po VIT 6 chorych było żądłonych w trakcie i po VIT. Różnice w skuteczności były następujące: 1,29 z 7 użądleń wśród chorych z rozpoznaną chorobą tarczycy do 0,91 z 35 wśród pozostałych, przy $p=0,1949$. U 4 chorych w trakcie VIT z 21 z rozpoznaną chorobą tarczycy występowały działania niepożądane inne niż miejscowe (19%) w stosunku do 18 ze 106 bez tego rozpoznania (17%) ($p=0,8192$). Odpowiednio w grupie po VIT: 4 z 17 (24%) do 23 ze 102 (22,5%) przy $p=0,7091$.

4.1.3.10 Choroby autoimmunologiczne

Analizując wpływ chorób autoimmunologicznych w grupie w trakcie VIT opisano w sumie 9 chorych z rozpoznanymi chorobami (w stadium remisji): reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) – 4 chorych, łuszczycowe zapalenie stawów (ŁZS) – 3 chorych, toczeń układowy – 1 chory, niedokrwistość Addisona-Biermera – 1 chory, ze średnim nasileniem reakcji 3,06 z 17 użądleń do 2,66 z 229 użądleń wśród chorych bez rozpoznanej choroby autoimmunologicznej przy $p=0,1139$. W grupie po zakończonym VIT 10 chorych: RZS – 3 chorych, ŁZS – 2 chorych, toczeń – 2

chorych, choroba Hashimoto – 2 chorych, zeszytniające zapalenie stawów kręgosłupa (ZZSK) – 1 chory, ze średnim nasileniem 3,17 z 18 uządleń do 2,48 ze 189 uządleń przy znaczącej istotności statystycznej ($p=0,0037$) (Wyk. 17). Jednak biorąc pod uwagę jedynie uządlenia w trakcie VIT odpowiednio: 2,0 z 2 uządleń do 1,17 z 18 uządleń przy $p=0,5153$, i odpowiednio w trakcie i po VIT w grupie po VIT: 0,67 z 3 do 1,0 z 39 przy $p=0,6877$. Wśród 9 chorych z chorobami autoimmunologicznymi u dwojga wystąpiły działania niepożądane VIT (22%) w stosunku do 20 chorych z działaniami niepożądanymi bez chorób autoimmunologicznych w wywiadzie (17%), przy $p=0,687$. W grupie po VIT: 2 z 10 (20%) do 25 ze 109 (23%), przy $p=0,832$.



Wykres 17. Średnie nasilenie reakcji po uządleniu przed VIT w grupie chorych w po zakończonym VIT w zależności od współwystępowania chorób autoimmunologicznych.

Wyniki badania wpływu powyższych wybranych czynników na występowanie działań niepożądanych oraz skuteczność immunoterapii podsumowano poniżej w tabelach (Tab. 6 i 7).

Tabela 6. Wpływ wybranych czynników klinicznych na występowanie działań niepożądanych (ang. *adverse reactions*; AR) VIT, innych niż miejscowe odczyny poszczepienne (reakcje stopnia 1-4 wg Mosbecha i Muellera – Tab. 1)⁶⁵

| Czynnik | Grupa w trakcie VIT | | P | Grupa po VIT | | p |
|-----------------------------------|------------------------------|-----------------|--------|------------------------------|-----------------|---------------|
| | AR z występującym czynnikiem | AR bez czynnika | | AR z występującym czynnikiem | AR bez czynnika | |
| AR w całej grupie | 22 chorych ze 127 (17,3%) | | | 27 chorych ze 117 (23%) | | |
| Wiek | ≤45 lat: 10 z 48 (21%) | | 0,4152 | >45 lat: 17 z 80 (21%) | | 0,5914 |
| Płeć | Kobiety 15 z 75 (20%) | | 0,3384 | Mężczyźni 10 z 54 (19%) | | 0,3221 |
| VIT osa/pszczoła | Osa 18 ze 113 (16%) | | 0,182 | Pszczoła 11 z 25 (44%) | | 0,0042 |
| Mastocytoza | 2 z 5 (40%) | | 0,1716 | 26 ze 117 (22%) | | 0,3524 |
| Choroby tarczycy | 4 z 21 (19%) | | 0,8192 | 23 ze 102 (22,5%) | | 0,7091 |
| Choroby układu krążenia | 5 z 41 (12,1%) | | 0,2918 | 16 z 63 (25%) | | 0,4544 |
| Choroby autoimmunologiczne | 2 z 9 (22%) | | 0,687 | 25 ze 109 (23%) | | 0,832 |
| Choroby atopowe | 12 z 47 (26%) | | 0,061 | 14 z 75 (19%) | | 0,1714 |

Tabela 7. Wpływ wybranych czynników klinicznych na skuteczność VIT[#].

| Czynnik | Grupa w trakcie VIT | | P | Grupa po VIT [§] | | p |
|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|---------------|---------------------------------------|--------------------------|--------|
| | Skuteczność z występującym czynnikiem | Skuteczność bez czynnika | | Skuteczność z występującym czynnikiem | Skuteczność bez czynnika | |
| Skuteczność w całej grupie | 1,25 (20) | | | W trakcie: 0,87 (23) | Po VIT: 1,11 (19) | |
| Wiek | | | | | | |
| | ≤45 lat: 1,0 (4) | >45 lat: 1,31 (13) | 0,8247 | ≤45 lat: 1,21 (14) | >45 lat: 0,86 (28) | 0,6084 |
| Płeć | | | | | | |
| | Kobiety: 1,25 (8) | Mężczyźni: 1,25 (12) | 0,4924 | Kobiety: 0,87 (23) | Mężczyźni: 1,11 (19) | 0,1878 |
| VIT osa/pszczoła | | | | | | |
| | Osa: 1,06 (18) | Pszczoła: 3,0 (2) | 0,0187 | Osa: 0,94 (34) | Pszczoła: 1,13 (8) | 0,2534 |
| Mastocytoza | 1,0 (1) | 1,2 (19) | 0,5169 | (0) | (42) | - |
| Choroby tarczycy | 0 (1) | 1,25 (19) | 0,5818 | 1,29 (7) | 0,91 (35) | 0,1949 |
| Choroby układu krążenia | 2,2 (5) | 0,93 (15) | 0,091 | 1,05 (19) | 0,91 (23) | 0,1878 |
| Choroby autoimmunologiczne | 2,0 (2) | 1,17 (18) | 0,5153 | 0,67 (3) | 1,0 (39) | 0,6877 |
| Choroby atopowe | 0,8 (10) | 1,7 (10) | 0,3291 | 0,79 (14) | 1,07 (28) | 0,3055 |

- skuteczność wyrażona jako średnie nasilenie reakcji po uzdaleniu w trakcie i po zakończeniu VIT; współczynnik p został obliczony jako stosunek liczby reakcji ocenionych jako 0-II stopnia wg Muellera do liczby reakcji III-IV stopnia (test Chi-kwadrat); w nawiasach () podano liczbę raportowanych reakcji

§ - w grupie chorych po zakończonym VIT zsumowano podczas analizy czynników uzdalenia w trakcie i po VIT

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

Grupa badana składała się z 45 chorych z alergią na jad osy, którzy rozpoczęli immunoterapię oraz 38 uczestników grupy kontrolnej bez alergii w wywiadzie.

4.2.1 Wyniki badania ekspresji wybranych 15 genów z użyciem kart mikrocieczowych u chorych z alergią na jad osy w porównaniu do osób zdrowych.

Wykazano istotne różnice w ekspresji 12 genów u chorych z alergią na jad owadów w stosunku do osób zdrowych.

Podczas analizy ekspresji genów *CLDN1* ($p=0,000023$), *CNGB3* ($p=0,000035$), *FADS1* ($p=0,03385$), *HES6* ($p=0,007665$), *HLA-DRB5* ($p=0,010112$), *HTR3B* ($p=0,00004$), *PRLR* ($p=0,037961$), *SLC16A4* ($p=0,027395$), *SNX33* ($p=0,000763$), *SOCS3* ($p=0,000848$) oraz *TWIST2* ($p=0,004828$) wykazano istotnie niższą ekspresję powyższych genów w grupie chorych z alergią na jad owadów w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast gen *COMMD8* wykazał jak jedyny znacząco wyższą ekspresję u chorych w stosunku do zdrowych przy $p=0,000515$. Do analizy wyników znamienności statystycznej zastosowano korektę dla porównań wielokrotnych (Tab. 8).

Przy pomocy bioinformatycznej bazy danych GENOCODIS uzyskano wyniki ontologicznych powiązań funkcjonalnych wyżej wymienionych genów (Tab. 9).

Tabela 8. Porównanie wyników ekspresji wybranych genów u chorych zakwalifikowanych do VIT w stosunku do uczestników grupy kontrolnej.

| Gen | Stosunek średniej ekspresji zdrowych i chorych przed VIT (fold change) | P |
|--|--|----------|
| <i>CLDN1-Hs00221623_m1</i> | 5,41 | 0,000023 |
| <i>CNGB3-Hs01555863_m1</i> | 2,36 | 0,000035 |
| <i>COMMD8-Hs00215252_m1</i> | 0,83 | 0,000515 |
| <i>DAZ3;DAZ2;DAZ4;DAZ1-Hs00414014_m1</i> | 281,99 | 0,887951 |
| <i>FADS1-Hs00203685_m1</i> | 2,92 | 0,033850 |
| <i>HES6-Hs00936587_g1</i> | 1,39 | 0,007665 |

| | | |
|-------------------------------|------|----------|
| <i>HLA-DRB5-Hs03046116_m1</i> | 3,43 | 0,010112 |
| <i>HTR3B-Hs00175775_m1</i> | 2,37 | 0,000040 |
| <i>KLF10-Hs00921811_m1</i> | 3,47 | 0,272316 |
| <i>PCDHB10-Hs01585827_s1</i> | 4,62 | 0,126240 |
| <i>PRLR-Hs00168739_m1</i> | 3,68 | 0,037961 |
| <i>SLC16A4-Hs00190794_m1</i> | 2,45 | 0,027395 |
| <i>SNX33-Hs00542077_m1</i> | 2,93 | 0,000763 |
| <i>SOCS3-Hs02330328_s1</i> | 2,36 | 0,000848 |
| <i>TWIST2-Hs00382379_m1</i> | 2,90 | 0,004828 |

Tabela 9. Funkcje genów podlegających istotnie różnej ekspresji w krwi obwodowej u chorych z HVA w porównaniu do osób zdrowych, na podstawie bazy danych GENECODIS.

| Geny | NGR | TNGR | NG | TNG | HYP | Hyp* | Adnotacje |
|--|-----|-------|----|-----|-------------|-------------|---|
| 3 geny (<i>PLR</i> , <i>SOCS3</i> , <i>TWIST 2</i>) | 200 | 34208 | 3 | 11 | 3.13806e-05 | 6.27612e-05 | GO:0006916 : anti-apoptosis (BP) |
| 3 geny (<i>CNGB3</i> , <i>HTR3B</i> , <i>FADS 1</i>) | 604 | 34208 | 3 | 11 | 0.000813097 | 0.000813097 | GO:0006810 : transport (BP) |
| 2 geny (<i>PRLR</i> , <i>SOCS3</i>) | 28 | 34208 | 2 | 11 | 3.53721e-05 | 0.0016448 | GO:0007259 : JAK-STAT cascade (BP) |
| 2 geny (<i>HLA-DRB5</i> , <i>SCOS3</i>) | 82 | 34208 | 2 | 11 | 0.000307839 | 0.00572581 | GO:0060333 : interferon-gamma-mediated signaling pathway (BP) |

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

4.2.2 Wyniki badania ekspresji 15 wybranych genów z użyciem kart mikrocieczowych u chorych przed i w trakcie VIT z jadem osy.

Wykazano istotną zmianę ekspresji genu *COMMD8* w grupie chorych odczulanych jadem osy po upływie około 3 miesięcy terapii. Ekspresja genu uległa zmniejszeniu przy $p=0,012413$. Pozostałe geny nie zmieniły ekspresji w istotny sposób. Do analizy wyników znamienności statystycznej zastosowano korektę dla porównań wielokrotnych. (Tab. 10)

Tabela 10. Porównanie wyników ekspresji wybranych genów u chorych poddawanych VIT z jadem osy przed i w trakcie immunoterapii.

| Gen | Stosunek średniej ekspresji przed i w trakcie VIT (fold change) | P |
|--|---|----------|
| <i>CLDN1-Hs00221623_m1</i> | 0,35 | 0,095931 |
| <i>CNGB3-Hs01555863_m1</i> | 0,85 | 0,345932 |
| <i>COMMD8-Hs00215252_m1</i> | 1,08 | 0,012413 |
| <i>DAZ3;DAZ2;DAZ4;DAZ1-Hs00414014_m1</i> | 2,15 | 0,845081 |
| <i>FADS1-Hs00203685_m1</i> | 0,97 | 0,672089 |
| <i>HES6-Hs00936587_g1</i> | 0,98 | 0,941512 |
| <i>HLA-DRB5-Hs03046116_m1</i> | 0,91 | 0,607544 |
| <i>HTR3B-Hs00175775_m1</i> | 0,85 | 0,357607 |
| <i>KLF10-Hs00921811_m1</i> | 1,03 | 0,058670 |
| <i>PCDHB10-Hs01585827_s1</i> | 0,49 | 0,256628 |
| <i>PRLR-Hs00168739_m1</i> | 0,98 | 0,286120 |
| <i>SLC16A4-Hs00190794_m1</i> | 0,93 | 0,100521 |
| <i>SNX33-Hs00542077_m1</i> | 0,91 | 0,852253 |
| <i>SOCS3-Hs02330328_s1</i> | 1,07 | 0,055718 |
| <i>TWIST2-Hs00382379_m1</i> | 0,74 | 0,208189 |

5. Omówienie wyników

5.1 Skuteczność immunoterapii.

Analiza skuteczności immunoterapii w badanej grupie chorych wykazała zmniejszenie ciężkości reakcji po użądleniu pod wpływem VIT.

Zmiana nasilenia reakcji po użądleniu przed, w trakcie i po immunoterapii, zarówno w przebiegu próby prowokacyjnej z żywym owadem jak i naturalnych użądleń, jest opisywana jako podstawowa miara efektywności terapii^{55,205}. W retrospektywnie zbadanych grupach w trakcie i po zakończeniu VIT przedstawiliśmy różnicę w średnim nasileniu reakcji po użądleniu oraz istotność statystyczną różnicy stosunku reakcji lokalnych i uogólnionych pierwszego i drugiego stopnia do reakcji anafilaktycznych (trzeciego i czwartego stopnia wg Muellera) porównując reakcje po użądleniach naturalnych, które dokonały się przed VIT oraz w trakcie lub po VIT. Jako cel terapii postawiono w tym przypadku przede wszystkim minimalizację zagrożenia życia chorego po użądleniu przez owada. uznając terapię za skuteczną jeżeli chory żądłony po fazie wstępnej VIT nie reagował reakcją anafilaktyczną uzyskując wyniki jak powyżej.

W wieloośrodkowym badaniu Rueff i wsp. prospektywnie oceniano efektywność VIT w grupie 357 chorych, mając na celu określenie wpływu stężenia tryptazy mastocytarnej i innych czynników na efektywność immunoterapii, takich jak wiek, płeć, prewencyjne przyjmowanie leków przeciwalergicznych po użądleniu, dawka alergenu podawanego w trakcie VIT, stosowanie leków przeciwnadciśnieniowych, rodzaj jadu, działania niepożądane w trakcie VIT, nasilenie reakcji przed terapią i długość trwania VIT⁷². W badaniu u wszystkich chorych można było ocenić bądź użądlenie naturalne (203 chorych) bądź próbę prowokacyjną żywym owadem (154 chorych), które miały miejsce po fazie wstępnej VIT, jako weryfikację skuteczności immunoterapii. Terapię oceniano jako nieskuteczną w przypadku wystąpienia jakiegokolwiek reakcji uogólnionej, zarówno ograniczonej do skóry jak i zagrażającej życiu (stopień I-IV wg Ringa i Messmera²⁰⁶), pomimo stosowania leczenia prewencyjnego bezpośrednio po użądleniu (leki przeciwhistaminowe i kortykosteroidy doustne). Wykluczono chorych deklarujących izolowane objawy ze strony układu oddechowego, które nie wymagały leczenia farmakologicznego, uznając je za często

nadinterpretowane i mające przyczyny psychowegetatywne. Wykluczono również chorych z łagodnymi objawami ze strony układu pokarmowego czy krążenia jeśli nie towarzyszyły im uogólnione zmiany pokrzywkowe uznając je za trudne do oceny. W całej przebadanej grupie u 22 chorych (6,2%) VIT uznano za nieskuteczny tzn. wystąpiła u nich reakcja systemowa po użądleniu.

W badaniu ankietowym chorych leczonych w Klinice Alergologii GUMed pomimo zapytania o zakres występowania zmian skórnych (Suplement: ankieta) wielu z chorych pomijało oznaczenie zakresu zmian, co uniemożliwia określenie czy były to zmiany uogólnione, czy jedynie nasiloną reakcją miejscową. Wobec tego kwalifikowano każdą deklarację pokrzywki czy obrzęku naczynioruchowego jako reakcję uogólnioną jeśli tylko ankietowany nie zaznaczył że było inaczej. Przyjmując sposób oceny zastosowany przez Rueff i wsp. można w naszym badaniu ocenić w sumie 62 użądlenia u 54 chorych z 246, którzy deklarowali użądlenia po fazie wstępnej immunoterapii. W tym 17 chorych (20 użądleń) z grupy 127 w trakcie VIT i 37 chorych z grupy 119 po zakończonym VIT (w tym 23 chorych w trakcie leczenia i 19 po jego zakończeniu, wśród nich 5 chorych żądlnych było w trakcie i po zakończeniu leczenia). Daje to łącznie 40 chorych w trakcie leczenia oraz 19 chorych użądlnych po jego zakończeniu. W tej grupie u 21 chorych deklarowane reakcje oceniono na przynajmniej pierwszy stopień wg skali Muellera, co daje 38%, w tym z pewnością znajduje się część chorych, którzy po użądleniu zareagowali jedynie reakcją miejscową. W tej grupie jakiegokolwiek reakcje ze strony układu oddechowego, krążenia, pokarmowego stwierdzono u 5 chorych (9%) co może świadczyć o reakcji anafilaktycznej.

Z kolei w metaanalizie Cochrane obejmującej 392 chorych z 7 randomizowanych badań, 113 chorych z 4 analizowanych badań było użądlnych w fazie podtrzymującej i po VIT, gdzie można było jednocześnie precyzyjnie ocenić nasilenie reakcji po użądleniu. Tylko 3 chorych leczonych VIT (2,7%) doznało jakiegokolwiek reakcji systemowej⁴⁴.

W przypadku grupy badanej wskaźnik jednak wydaje się zawyżać przyjęcie każdej, niesprecyzowanej co do zakresu pokrzywki jako uogólnionej. Odrzucając całkowicie przypadki, w których chory nie określił zakresu zmian skórnych pozostaje 37 chorych gdzie u 5 wystąpiła reakcja uogólniona co nadal daje 13,5%. Porównując dalej, w

cytowanej już pracy Rueff i wsp. wykluczono chorych, którzy deklarowali zmiany ze strony układu oddechowego, pokarmowego i łagodne ze strony układu krwionośnego (II i III stopień wg Ringa i Messmera), jeżeli nie towarzyszyły im uogólnione zmiany skórne, zwłaszcza wtedy kiedy ustępowały samoistnie bez leczenia farmakologicznego⁷².

Przyjmując zatem w analizowanej populacji, podobnie jak w badaniu Rueff i wsp., że kryterium niepowodzenia leczenia jest reakcja o nasileniu będącym podstawą do zwiększenia dawki stosowanego leku, lub przedłużenia czasu trwania terapii, takie nasilenie reakcji stwierdzono u trzech chorych (dwóch chorych leczonych alergenem osy i jeden leczony alergenem pszczoły) wśród 54 badanych co daje ostatecznie 5,5% chorych wykazujących brak skuteczności leczenia.

Chorzy leczeni z powodu alergii na jad pszczoły w grupie, która zakończyła VIT leczeni byli preparatem o znikomej zawartości Api m10, co mogło spowodować brak skuteczności leczenia⁷¹. Obecnie leczenie prowadzone jest preparatem o pełnym składzie alergenu. Ponadto chorzy w grupie po zakończonym VIT, którzy rozpoczęli terapię przed 2006 rokiem przyjmowali blokery receptora H2 jako standardową premedykację co również mogło wpłynąć na efektywność VIT^{51,207}. Od 2006 roku premedykacja obejmuje jedynie blokery receptora H1.

W wyodrębnionej grupie chorych, gdzie badano ekspresję wybranych genów (45 chorych w trakcie VIT), 4 chorych było żądlnych naturalnie w trakcie fazy podtrzymującej immunoterapii, 1 osoba doznała uogólnionej pokrzywki, która ustąpiła szybko po przyjęciu leków przeciwhistaminowych, natomiast jedna osoba doznała bólu brzucha i wymiotów jednak bez towarzyszących im zmian skórnych, osoba ta przyjęła lek przeciwhistaminowy (20mg loratadyny) oraz glikokortykosteroid (100mg prednizonu) doustnie zaraz po użądleniu.

Wyniki skuteczności VIT uzyskane w badanej grupie, nie odbiegają od wyników leczenia w innych ośrodkach europejskich, które wskazują na brak skuteczności leczenia u 2,7% do 6,5%^{44,55,72}.

Trudność w porównaniu wyników skuteczności uzyskanych w badanej grupie w stosunku do innych publikowanych badań nie polega jedynie na nieco nowatorskim sposobie oceny w niniejszym badaniu (zmiana średniej nasilenia reakcji po użądleniu

oraz zliczanie reakcji po użądleniu *versus* ocena liczby chorych nadal spełniających kryteria rozpoczęcia leczenia). Różnice w wynikach skuteczności, które na świecie sięgają 0%-36% chorych nieodnoszących korzyści z terapii ²⁰⁸, wynikają również z odmiennej charakterystyki grup poddawanych badaniu. W grupie opisywanej przez Rueff i wsp. do VIT kwalifikowano chorych, którzy mieli I-IV stopień reakcji po użądleniu wg Ringa i Messmera, czyli również takich którzy mieli w wywiadzie jedynie uogólnione reakcje skórne ⁵⁵. W Klinice Alergologii GUMed kwalifikowane do immunoterapii z jadem owadów są jedynie osoby które mają w wywiadzie reakcje III i IV stopnia wg Muellera, czyli takie które reagowały co najmniej z udziałem układu oddechowego, zatem u podstaw są to grupy trudne do porównania.

Należy również pamiętać o innych ograniczeniach metodologii badania skuteczności VIT. Badanie ankietowe polega na samodzielnym udzielaniu odpowiedzi, wobec tego zawsze istnieje możliwość niezrozumienia pytań o terminy, które mogą odbiegać znaczeniem w rozumieniu potocznym i fachowym, a także pytania o szczegóły zdarzeń znacząco odległych w czasie. Ankieta może być nieprawidłowo zbudowana: zbyt dużo pytań, co wymaga poświęcenia znacznej ilości czasu na odpowiedź ²⁰⁹. Istnieje również zagrożenie nieświadomej lub celowej agrawacji lub dysymulacji opisywanych objawów ²¹⁰.

Sposób oceny skuteczności immunoterapii może podlegać dyskusji i na pewno najlepiej aby chory nie reagował systemowo w żadnym zakresie, również ograniczonym jedynie do skóry, zwłaszcza, że każda reakcja systemowa zwiększa ryzyko anafilaksji przy kolejnym użądleniu ⁴⁹. Wskazana jest zatem stała analiza wyników leczenia chorych, co może zapobiec np.: stosowaniu leczenia alergenem o niepełnym składzie antygenowym ⁷¹, czy stosowania premedykacji zmniejszającej skuteczność leczenia ^{51,207}.

5.2. Wpływ czynników klinicznych na skuteczność immunoterapii z jadem.

5.2.1 Tryptaza mastocytarna, mastocytoza.

Podstawowym czynnikiem badanym przez Rueff i wsp. mającym wpływać na skuteczność immunoterapii było stężenie tryptazy w surowicy krwi. W badaniu opisanym w 2010 roku 680 chorych zbadano pod względem wpływu stężenia tryptazy w surowicy na występowanie działań niepożądanych w trakcie fazy

wstępnej. Wykazano ścisły związek wzrostu stężenia tryptazy ($>11,4 \mu\text{g/l}$) ze wzrostem ryzyka występowania działań niepożądanych immunoterapii ⁷⁶, u 323 z tej grupy chorych dokonano obserwacji w fazie podtrzymującej immunoterapii badając ponownie wpływ stężenia tryptazy na skuteczność immunoterapii – nie odnotowano istotnego wpływu⁷². W grupie badanej uzyskano szczerkowe dane dotyczące stężenia tryptazy w surowicy. W grupie gdzie badano ekspresję genów przeprowadzono oprócz ankiety także wywiad chorobowy, uzyskano dane dotyczące stężenia tryptazy od 32 z 45 badanych. U 8 z 32 wystąpiły działania niepożądane w trakcie VIT. U 4 z 8 stężenie tryptazy wynosiło $>11,4 \mu\text{g/l}$, natomiast w podgrupie gdzie nie odnotowano działań niepożądanych VIT 3 z 24 tryptaza przekroczyła stężenie $>11,4 \mu\text{g/l}$. Ryzyko względne wystąpienia działań niepożądanych u chorych z podwyższonym stężeniem tryptazy było czterokrotnie wyższe niż u pozostałych (RR=4,0; 95% przedział ufności 1,13 do 14,17 przy $p=0,0317$), natomiast żadne z chorych z podwyższonym stężeniem tryptazy nie deklarowało uządleń podczas immunoterapii wobec czego nie można ocenić wpływu stężenia tryptazy na skuteczność VIT w tej grupie.

Prawidłowe stężenie tryptazy nie wyklucza rozpoznania pierwotnego zespołu aktywacji mastocytów (ang. *primary-Mast Cell Activation Syndrome*; p-MCAS) ²¹¹, które warunkują zdecydowanie częstsze i bardziej nasilone reakcje systemowe po uządleniu ⁸⁷. W grupie badanej w trakcie VIT ocenialiśmy 5 chorych z rozpoznaną mastocytozą którzy raportowali w sumie 10 uządleń, z kolei w grupie po zakończonym VIT: 2 chorych i 5 raportowanych uządleń. Reakcje pouządleniowe wśród chorych na mastocytozę były istotnie bardziej nasilone w grupie w trakcie VIT ($p=0,0325$), po VIT podobnie, lecz przy $p=0,3802$. Zaobserwowaliśmy również tendencję do częstszego występowania działań niepożądanych VIT wśród chorych z rozpoznaną mastocytozą (40% do 16% przy $p=0,1716$ w trakcie VIT, i 50% do 22% przy $p=0,3524$ po VIT). W grupie badanej trakcie i po VIT chorzy z mastocytozą raportowali tylko jedną reakcję w trakcie VIT miała charakter pokrzywki uogólnionej. Dane literaturowe wskazują na znacząco niższą skuteczność VIT wśród chorych na mastocytozę (72%) ²¹², a wśród chorych na p-MCAS do utrzymania tej skuteczności VIT powinna być prowadzona do końca życia chorego ²⁵.

Na podstawie powyższych danych należy wnioskować o rutynowe oznaczanie stężenia tryptazy w surowicy krwi chorych z anafilaksją po użądleniu w wywiadzie, a w przypadku reakcji szczególnie nasilonych (zwłaszcza reakcje wstrząsowe bez reakcji skórnej²⁵) dążenie do wykluczenia p-MCAS (trepanobiopsja szpiku kostnego) pomimo prawidłowych stężeń tryptazy, najpóźniej przed decyzją o zakończeniu VIT.

5.2.2 Wiek i płeć chorych.

Analiza wpływu płci na nasilenie reakcji po użądleniach, skuteczność VIT czy występowanie działań niepożądanych, zarówno w grupie w trakcie jak i po VIT w Klinice Alergologii nie wykazała istotnych statystycznie różnic, przy czym procentowo częściej kobiety zgłaszały działania niepożądane (20% kobiety do 13% mężczyźni w grupie w trakcie VIT przy $p=0,3384$ i odpowiednio 26% do 19% w grupie po VIT przy $p=0,3221$). Zasadniczo w jednym dużym badaniu wykazano dotąd istotną przewagę występowania działań niepożądanych VIT wśród kobiet w stosunku do mężczyzn⁶⁵, jednak analizując dane z wielu badań nad wpływem płci na przebieg i skuteczność VIT jednak nadal są to dane sprzeczne¹⁰⁴.

W grupie badanej w trakcie VIT wykazano słabą dodatnią korelację nasilenia reakcji z wiekiem chorych ($r=0,23$), jakkolwiek nie było podobnych zależności w grupie po zakończonym VIT ($r=-0,04$). Analizując tylko reakcje w trakcie i po VIT świadczące o skuteczności VIT wskaźniki korelacji były podobne. Przyjmując jako punkt odcięcia 45 rok życia także nie było znamienych różnic w obu grupach (Tab. 6). Nie było też istotnego wpływu wieku na występowanie działań niepożądanych. W literaturze dotyczącej HVA opisywano dodatnią korelację dotyczącą narastania nasilenia reakcji po użądleniach, ryzyka działań niepożądanych czy skuteczności VIT wraz z wiekiem chorych^{46,62,95,96} nie mniej jednak istnieją dane ambiwalentne wykazujące raczej różnicę w rodzaju reaktywności bardziej niż zwiększenia częstości występowania i nasilenia reakcji^{76,213}. Dzieci częściej wykazują objawy ze strony skóry, natomiast dorośli częściej mają objawy ze strony układu krążenia, lecz w ostatnio przeprowadzanych badaniach polskich nie były to różnice znaczące²¹³. Różnice w profilu reaktywności mogą wynikać przede wszystkim z narastania bazowego stężenia tryptazy w surowicy wraz z wiekiem chorego⁹⁴ a także nagromadzenia mastocytów w tkankach, a zwłaszcza w układzie krążenia, które zwiększa się z wiekiem oraz w przebiegu chorób układu krążenia^{83,214}.

5.2.3 Choroby układu krążenia

W badaniach z przełomu XX i XXI wieku opartych głównie na studium przypadków i retrospektywnych obserwacjach populacji chorych na HVA obserwowano pogorszenie przebiegu choroby: cięższe reakcje po użądleniu ze zwiększeniem ich śmiertelności, zwiększenie ryzyka zawału serca czy udaru w przebiegu anafilaksji⁹⁸, które tłumaczono przede wszystkim wpływem chorób układu krążenia na zmniejszenie odporności układu na dodatkowe obciążenia, a także negatywny wpływ leków z grupy B-blokerów²¹⁵ i inhibitorów konwertazy angiotensyny²¹⁶ na przebieg reakcji po użądleniu oraz odpowiedzi na leczenie anafilaksji. Dane te w różnych badaniach nie były jednoznaczne²¹⁷. Obecnie mamy do dyspozycji dane z badań prospektywnych, które nie potwierdzają wszystkich wcześniejszych doniesień^{72,99,100} jednak pozostawiając sugestię iż leczenie B-blokerami i inhibitorami ACE może utrudniać leczenie anafilaksji, nasilać działania niepożądane VIT bez zmiany częstości ich występowania²¹⁸, natomiast stosowanie ACE inhibitorów może również redukować długoterminową skuteczność VIT⁵⁵. W ankiecie skierowanej do chorych były zawarte pytania dotyczące leków stosowanych do leczenia układu krążenia stosowanych w trakcie użądleń przed VIT nie mniej odpowiedzi w zdecydowanej większości ankiet były skąpe albo niepełne, a chorzy tłumaczyli brak odpowiedzi trudnością z przywołaniem nazw przyjmowanych wtedy leków. W trakcie VIT nie było żadnego chorego leczonego ACE inhibitorami (u wszystkich chorych przed rozpoczęciem VIT w Klinice Alergologii GUMed leczenie inhACE jest zamieniane na alternatywne), oraz dwóch chorych leczonych B-blokerami, z których żaden nie doznał poważnych działań niepożądanych w trakcie VIT, jeden z nich był żądłony w trakcie VIT bez reakcji uogólnionej. W grupie badanej w trakcie VIT wykazano jednak nasiloną reaktywność wśród chorych z rozpoznaną chorobą układu krążenia, bez wpływu na skuteczność i bezpieczeństwo VIT (Tab. 5 i 6). Pomimo ciągłych niejasności co do przyczyn pogorszenia przebiegu HVA i wpływu na profil bezpieczeństwa VIT należy szczególną opieką otoczyć chorych ze współistniejącymi chorobami układu krążenia.

5.2.4. Działania niepożądane VIT.

Działania niepożądane VIT są niezależnym czynnikiem warunkujący skuteczność VIT

^{55,63}, choć nie wszystkie badania to w pełni potwierdzają ⁷². W grupie w trakcie VIT można zauważyć trend nasilenia reakcji po użądleniach w trakcie VIT u chorych, u których występowały działania uboczne VIT, jednak podobnie jak w badaniu wieloośrodkowym wspomnianym powyżej nie były to różnice statystycznie istotne. W grupie badanej może to być spowodowane uznaniem za działanie niepożądane wszystkich objawów poza miejscowym odczynem poszczepiennym, a zatem również tzw. objawy mniejsze wg Mosbecha i Muellera ⁶⁵, inaczej niż w przytoczonych pracach gdzie kwalifikowano tylko systemowe reakcje alergiczne.

Analizując całą grupę w trakcie VIT (17,3% działań niepożądanych VIT) nie znaleziono związku występowania objawów ubocznych ze średnim nasileniem wszystkich raportowanych reakcji. W grupie po VIT (23% obj. ubocznych) również nie znaleziono takiego związku. Natomiast czynnikiem wpływającym na częstość występowania działań niepożądanych w całej grupie badanej okazał się rodzaj jadu stosowanego do VIT.

5.2.5. Alergia na jad osy vs alergia na jad pszczoły

W grupie badanej po zakończonej terapii chorzy po zakończonym VIT z jadem pszczoły raportowali istotnie więcej działań niepożądanych (44%) niż odczulani jadem osy (17%) ($p=0,0042$), podobny trend (30% vs 16%) jednak statystycznie nieistotny występował w grupie w trakcie VIT ($p=0,182$). Dane to pozostają w zgodzie z wieloma badaniami oceniającymi wpływ różnych predyktorów na występowanie działań niepożądanych zarówno w fazie wstępnej jak i podtrzymującej ^{44,51,65,76,219,220}, należy jednak zwrócić uwagę, iż wpływ na częstość działań niepożądanych w ankietowanych grupach mógł mieć również schemat zastosowanej terapii wstępnej. W Klinice Alergologii GUMed chorzy z alergią na jad pszczoły dochodzą do dawki podtrzymującej VIT w schemacie *rush*, a w przypadku jadu osy w schemacie *ultrarush*, co może wpływać na bezpieczeństwo terapii ⁷³.

Alergia na jad pszczoły zdaje się być obarczona również gorszym rokowaniem co do skuteczności terapii. W badaniu wieloośrodkowym opisanym przez Rueff i wsp. 4% chorych po fazie wstępnej VIT z jadem osy i 11% z jadem pszczoły zareagowało reakcją uogólnioną na prowokację żywym owadem lub użądlenie naturalne ($p=0,027$) ⁷². Kolejne wspomniane także badanie nad chorymi leczonymi w Oddziale

Dermatologii i Alergologii Uniwersytetu Ludwika Maksymiliana w Monachium obejmujące 1609 przypadków wykazała jeszcze bardziej sugestywne różnice (3,9% do 15,8%; $p < 0,001$)⁵⁵. Wcześniejsze znaczące obserwacje również nie pozostawiały wątpliwości w tej materii^{45,63}, tym bardziej jako nietypowe mogą być ocenione wyniki analizy grupy badanej po zakończonym VIT gdzie różnice w skuteczności nie były istotne statystycznie. Średnie nasilenie reakcji w trakcie i po VIT w tej grupie uwzględniając odczulanych jadem osy wyniosło 0,94 z 34 reakcji, uwzględniając jad pszczoły 1,13 z 8 reakcji przy $p = 0,2534$. Stosując jednak korektę i wykluczenia z analizy, jak w ustępie o skuteczności całkowitej VIT, ocena tej grupy staje się znacznie ograniczona, ponieważ tylko dwoje chorych w tej grupie miało niebudzącą wątpliwości reakcję uogólnioną po użądleniu. W tym przypadku było to po jednym chorym z alergią na jad osy i pszczoły (porównanie: VIT osa – 1 reakcja 4 stopnia z 16 chorych żądlnych, VIT pszczoła 1 reakcja 3 stopnia z 3 chorych żądlnych; $p = 0,2412$). Natomiast w grupie w trakcie VIT w analizie odnotowano istotną różnicę w średnim nasileniu reakcji po użądleniu w porównaniu wyników VIT z jadem pszczoły (średnia 3,0 z 2 reakcji) *versus* VIT z jadem osy (średnia 1,19 z 19 reakcji) przy $p = 0,0187$. Stosując alternatywny sposób oceny nie ma żadnej podlegającej kwalifikacji jako niepowodzenie reakcji po użądleniu w trakcie VIT w grupie odczulanej z jadem pszczoły i jedna reakcja IV stopnia z 12 raportowanych po użądleniu w trakcie VIT z jadem osy.

Pomijając niedostatki metodologiczne i wiarygodność niniejszego badania ankietowego gorsze wyniki i mniej bezpieczny VIT z jadem pszczoły wydaje się być faktem trudnym do podważenia. Ogłoszona drukiem w maju 2016 i wspomniana już praca M. Frick i wsp. wydaje się podsuwać rozwiązanie problemu efektywności terapii z jadem pszczoły⁷¹, z kolei większa ilość działań niepożądanych podczas VIT z jadem pszczoły może być spowodowana wysoką reaktywnością bazofili wśród chorych z alergią na ten rodzaj jadu²²¹.

5.2.6. Długość immunoterapii

Kolejną obserwacją w niniejszym badaniu jest wykazanie ujemnej korelacji pomiędzy długością przebytej terapii a nasileniem reakcji poużądleniowych, które miały miejsce w trakcie VIT ($r = -0,37$) (Wyk. 14). Wynik ten zgadza się z innymi obserwacjami na temat wpływu długości terapii na skuteczność VIT^{62,63}

5.2.7 Choroby autoimmunologiczne, choroby atopowe, choroby tarczycy

Współwystępowanie chorób autoimmunologicznych jest opisywane jako przeciwwskazanie do immunoterapii alergenowej w m.in. zaleceniach brytyjskich²²² i francuskich²²³. W 2015 roku opublikowano zbiorową pracę ekspertów EAACI podsumowującą przeciwwskazania do AIT (ang. *allergen immunotherapy*; AIT). Większość danych ma charakter opisów przypadków klinicznych i często są ze sobą sprzeczne. Wobec braku danych EAACI zaleca ostrożność we wdrażaniu AIT u chorych ze współistniejącymi chorobami autoimmunologicznymi. Współistnienie chorób autoimmunologicznych w stadium remisji pozostaje przeciwwskazaniem względnym, a aktywnych przeciwwskazaniem bezwzględnym do AIT²¹⁸. Wśród badanych chorych w trakcie ankietowano 9 chorych ze współistniejącymi chorobami autoimmunologicznymi i 10 w grupie po zakończonym VIT, kwalifikowanych do VIT w trakcie remisji choroby, nie odnotowano wpływu tych chorób na bezpieczeństwo ($p=0,687$ i $p=0,832$) i skuteczność VIT ($p=0,5153$ i $p=0,6877$). Obserwując jednak wpływ współwystępowania chorób autoimmunologicznych na średnią nasilenia reakcji raportowanych przed VIT, można zaobserwować ich istotny statystycznie wpływ. W grupie w trakcie VIT chorzy z chorobami autoimmunologicznymi reagowali ze średnim nasileniem 3,06 a chorzy bez tego rozpoznania 2,48 przy $p=0,1139$, natomiast w grupie po zakończonym VIT różnica była jeszcze bardziej wyrazista, po kolei jak wyżej: 3,17 do 2,48 przy $p=0,0037$ (Wyk. 17). Podsumowując dane z badania ankietowego wydaje się, że współwystępowanie chorób autoimmunologicznych może wpływać na przebieg reakcji przed leczeniem HVA, ale raczej nie wpływa na bezpieczeństwo i skuteczność leczenia.

Immunoterapia z alergenem związanym z wywoływaniem objawów ze strony górnych dróg oddechowych jest jednym ze sposobów leczenia astmy atopowej, warunkiem wdrożenia AIT jest jednak pełna kontrola objawów astmy²¹⁸. W badaniach epidemiologicznych odnotowywano nasilenie systemowych działań niepożądanych immunoterapii u osób ze współistniejącą astmą²²⁴, co może budzić obawy co do prowadzenia AIT u tego rodzaju chorych. Nie ma danych literaturowych, które wiążą współrozpoznanie astmy, czy innych chorób z kręgu atopii, z przebiegiem VIT. W badaniu w grupie chorych w trakcie VIT jak i po VIT, współistniejące choroby atopowe, w tym astma, nie wpłynęły na skuteczność VIT ($p=0,3291$ i $p=0,3055$),

jednak przewaga deklaracji występowania działań niepożądanych w obu grupach stwierdzana była u chorych z atopią poza HVA w wywiadzie (26% i 30%) w porównaniu z badanymi bez współistniejących chorób atopowych (13% i 19%), jednak nie były to różnice istotne statystycznie ($p=0,061$ w trakcie VIT i $p=0,1714$ po zakończonym VIT).

W literaturze istnieją obserwacje wskazujące na wzajemny wpływ chorób gruczołu tarczowego i chorób alergicznych^{225,226}. Prawdopodobnie te i podobne dane są przyczyną wątpliwości w trakcie wdrażania VIT u chorych z HVA i współistniejącymi chorobami tarczycy. Nie ma jednak dostępnych badań opisujących bezpośrednio wpływ chorób tarczycy na przebieg i skuteczność immunoterapii z jadem owadów błonkoskrzydłych. W badaniu ankietowym w grupie w trakcie i po zakończonym VIT nie zaobserwowaliśmy istotnego wpływu współwystępowania chorób tarczycy na średnie nasilenie reakcji po użądleniu ($p=0,7686$ i $p=0,0917$), skuteczność immunoterapii ($p=0,5818$ i $p=0,1949$) czy występowanie działań niepożądanych ($p=0,8192$ i $p=0,7091$).

5.3 Różnice w ekspresji genów

5.3.1 Różnice w ekspresji genów pomiędzy chorymi na HVA a chorymi bez chorób alergicznych w wywiadzie

Wyniki ekspresji genów we krwi obwodowej 46 chorych z alergią na jad osy, przed rozpoczęciem immunoterapii porównano z kontrolną grupą zdrową 38 odpowiednio dobranych badanych bez jakiegokolwiek reakcji alergicznej w wywiadzie chorobowym. Dwanaście genów (*CLDN1*, *CNGB3*, *FADS1*, *HES6*, *HLA-DRB5*, *HTR3B*, *PRLR*, *SLC16A4*, *SNX33*, *SOCS3* oraz *TWIST2*) badanych w RNA leukocytów krwi obwodowej miało w naszym badaniu inną ekspresję wśród chorych z wywiadem anafilaksji po użądleniu osy (przed VIT) w stosunku do kontrolnej grupy zdrowej, wynik przedstawiono w tabeli (Tab. 8).

Ponad 100 lat od pierwszych opisów Portiera i Richeta dotyczących anafilaksji, uogólnione reakcje alergiczne, często zagrażające życiu budzą lęk wśród chorych i lekarzy oraz stanowią wyzwanie dla nauki. Wciąż nie do końca wiemy dlaczego lokalna reakcja alergiczna przechodzi w uogólnioną, dlaczego tylko niektórzy chorzy reagują anafilaksją na dany alergen a inni nie, pomimo wysokich stężeń sIgE w

surowicy, w końcu dlatego ten sam chory może zareagować w różny sposób na podobną ekspozycję na alergen ²²⁷. Na podstawie wiedzy o działaniu mediatorów stanu zapalenia wydaje się że synergistyczne działanie wielu czynników warunkuje wystąpienie i nasilenie reakcji. Koncepcja mastocytowo-leukocytarnej kaskady cytokinowej została zaproponowana jako model amplifikacji reakcji ²²⁸. W trakcie badań nad mysim modelem anafilaksji opisano zasadniczą rolę bazofili i leukocytów krążących we krwi (ang. *peripheral blood leukocyte*; PBL).

Jedną z metod wykorzystywanych w badaniach nad anafilaksją jest ocena ekspresji genów. Wobec ogromnej ilości informacji wykorzystuje się bioinformatyczną bazę danych stworzoną przez amerykański Narodowy Instytut Alergii i Chorób Zakaźnych (ang. *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*; NIAID). Baza DAVID (ang. *the Database for Annotation, Visualisation and Integrated Discovery*; DAVID - <https://david.ncicrf.gov/home.jsp>) jest jednym z wielu narzędzi służących do analizy ekspresji genów. Baza ta skupia informacje z badań nad funkcją genów obejmującą badania z lat 2003-2016 i na bieżąco aktualizowaną. Pozwala na konwertowanie dużych list genów w grupy funkcjonalne, tworzenie map ko-ekspresji i wiele innych ^{229,230}. Baza GENECODIS, często stosowana w Europie, jest wynikiem współpracy naukowców hiszpańskich. Opiera się ona na nieco innym algorytmie, podobnie skupia dostępną w ramach internetu wiedzę na temat konotacji funkcjonalnych opisanych do tej pory genów ²³¹⁻²³³. Tradycyjną metodą wzbogacania powiązań funkcyjnych genów jest metoda porównywania kolejno każdego pojedynczego genu z analizowaną listą genów (ang. *singular enrichment analysis*; SEA), najczęściej opiera się ona na powiązaniach ontologicznych poszczególnych genów (ang. *gene ontology*; GO) ²³⁴.

Badaniem, które analizowało zmianę ekspresji genów w czasie anafilaksji była praca Stone i wsp. W jego trakcie analizowano ekspresję w krwi obwodowej, analizując leukocytarne RNA komórek PBL, bezpośrednio po rozpoczęciu, godzinę po i trzy godziny po rozpoczęciu leczenia anafilaksji u 6 dorosłych. Bezpośrednio po przyjęciu do oddziału ratunkowego (średnio około godziny od wystąpienia anafilaksji) jedynie 2 geny miały inną ekspresję w porównaniu do grupy kontrolnej, po kolejnej godzinie było to 67 genów, natomiast po 3 godzinach aż 2801 genów miało inną ekspresję niż uczestnicy grupy kontrolnej dobrani wg wieku i płci, ale bez anafilaksji w wywiadzie

²³⁵. W przytaczanym badaniu w pierwszej godzinie od anafilaksji zmieniały ekspresję 2 geny biorące udział w procesach aktywacji i funkcjonowania limfocytów NK, brak innych różnic może świadczyć o zaangażowaniu procesów cytotoksycznych oraz opartych na odpowiedzi typu Th1 w tej fazie reakcji, które przede wszystkim bazują na wykorzystaniu wytworzonych wcześniej i zmagazynowanych białek. Przy pomocy bazy DAVID określono powiązania funkcjonalne genów o odmiennej ekspresji. Po około dwu godzinach zmieniała się stopniowo ekspresja genów zaangażowanych w regulację wielu szlaków zapalnych oraz mechanizmów apoptozy takich jak: grupa *MAPK* – transdukcja sygnału, regulacja procesów zapalnych, aktywowana przez czynniki stresowe, zarówno zewnętrzne (fizyczne) jak i wewnętrzne np.: cytokiny prozapalne, reguluje również cykl życiowy komórek – m.in. mechanizm apoptozy; *NFKBIA* – gen kodujący podjednostkę ($I\kappa B$), bezpośrednio hamującą czynnik NF κ B kluczowy w aktywacji wielu procesów immunologicznych będących odpowiedzią na bodźce zewnętrzne: infekcje wirusowe, bakteryjne, a także stres czy alergen; *STAT3* – transdukcja sygnału i regulacja procesów zapalnych, aktywowana m.in. przez IL5 oraz IL6 jako część układu transdukcji JAK-STAT, lecz także przez MAPK, jest kluczowa w różnicowaniu limfocytów Th17, wypadnięcie funkcji skutkuje zespołem hipereozynofilowym; grupa białek TLR – aktywacja produkcji cytokin prozapalnych poprzez indukcję komórek dendrytycznych w ramach odporności nieswoistej, prawdopodobnie kluczowe w różnicowaniu populacji limfocytów Treg; a także *CREB*, *ESP300*, *MMP9* – istotne dla mechanizmów regulacji apoptozy; czy IL1B będąca czynnikiem aktywującym limfocyty oraz częścią rodziny cytokin kontrolujących procesy proliferacji i różnicowania komórek, a także apoptozy. Wszystkie te różnice mogą świadczyć o dużym zaangażowaniu procesów regulujących, zmieniających odpowiedź immunologiczną na antygen wywołujący już w pierwszych godzinach po anafilaksji, także spowodowanej użądleniem ²³⁵, co z kolei może być kluczem do przewidywania odpowiedzi układu odpornościowego na kolejny kontakt z danym antygenem.

Wyniki uzyskane w badanej grupie chorych leczonych z powodu alergii na jady owadów potwierdzają obserwacje Stone'a i wsp. Różnice w ekspresji w badanej grupie dotyczą mechanizmów regulujących odpowiedź zapalną oraz procesy zaplanowanej śmierci komórki.

Niemal wszystkie geny w badanej grupie miały istotnie mniejszą ekspresję w porównaniu do osób zdrowych, poza *COMMD8* (wyższa ekspresja) oraz *KLF10*, *PCDHB10* i *DAZ*, które nie różniły się istotnie (Tab. 8), ich ontologiczne powiązania funkcjonalne uzyskane przy pomocy bazy GENOCODIS przedstawiono w Tab. 9.

Geny *FADS1*, *HTR3B* oraz *CNGB3* odpowiadają m.in. za transport substancji lub składników błon komórkowych. *HTR3B* jest białkiem receptorowym dla serotoniny, w związku z tym jego funkcjonalność opisywana jest głównie w patogenezie chorób psychicznych, jednak istnieje teoria łącząca niskie stężenie serotoniny z aktywacją komórek tucznych^{236,237}.

Natomiast *PRLR*, *SOCS3* i *TWIST2* za mechanizmy hamowania apoptozy. *SOCS3* i *PRLR* wraz z *HLA-DRB5* związane są ontologicznie z transdukcją sygnału zależną od cytokin, $IFN\gamma$ oraz *JAK2*.

Ponadto wiadomo, iż zarówno *PRLR*, *SOCS3* i *TWIST2* są zaangażowane w regulację konkretnych procesów immunologicznych.

PRLR koduje białko, które bezpośrednio bierze udział w transdukcji sygnału zależnego zarówno od kinazy *MAPK*¹⁵⁵ jak i *JAK-STAT*¹⁵⁴. Kinaza *MAPK* może mieć istotne znaczenie w patogenezie chorób alergicznych. Świadczyć o tym mogą choćby ostatnie doniesienia gdzie hamowanie *MAPK* ograniczało objawy atopowego zapalenia skóry^{238,239}, z kolei badania doświadczalne pokazują, że aktywacja *MAPK* może indukować mechanizmy regulacyjne poprzez zwiększanie produkcji *IL10*²⁴⁰ czy też zależną od $TGF\beta 1$ indukcję limfocytów *Treg*²⁴¹. Ścieżka transdukcji sygnału zależna od układu kinaz *JAK-STAT* ma przede wszystkim znaczenie regulacyjne i ma szeroki wachlarz działań w zależności od komórek, w których działa. Z jednej strony stymulacja *STAT6* aktywuje *GATA3* tym samym hamując *FOXP3*, a *STAT3* stymuluje różnicowanie *Th2* oraz *Th17*²⁴², z drugiej jednak wyhamowanie lub wypadnięcie funkcji *STAT3* powoduje powstawanie objawów zespołu hypereozynofilowego²⁴³ oraz może nasilać aktywację $NF\kappa B$ ²⁴⁴.

Natomiast *SOCS3* to jeden z głównych czynników negatywnie regulujących *IL-6* zależną aktywację *STAT3*²⁴⁵ działający również hamująco na $NF\kappa B$ ²⁴⁶, ale aktywuje *MAPK*²⁴⁷. W badaniach klinicznych nad astmą, atopowym zapaleniem skóry,

alergicznym nieżytem nosa i alergią pokarmową ekspresja *SOCS3* w limfocytach T CD3+ koreluje dodatnio z nasileniem choroby. Dane kliniczne wskazują na zaangażowanie *SOCS3* w progresję chorób alergicznych²⁴⁵. Istnieją jednak dane eksperymentalne odnajdujące pozytywną korelację pomiędzy ekspresją *SOCS3* i dodatnią regulacją białek związanych z pozytywnym efektem immunoterapii (*FOXP3*, *Tbet*) i negatywnie z *IL4* (hamowanych w trakcie immunoterapii)²⁴⁸.

TWIST2 jest wspólnie z *TWIST1* układem regulacyjnych czynników transkrypcyjnych działających jak molekularne przełączniki²⁴⁹, które mogą być związane z mechanizmami regulatorowymi zarówno aktywującymi jak i hamującymi mechanizmy transkrypcji białek cytokin²⁰⁰.

HLA-DRB5 jest genem kodującym białko tworzące cząsteczki MHC II, w oczywisty sposób związane z regulacją procesów immunologicznych. Polimorfizm tego genu był odnotowany jako potencjalny predyktor alergii na penicylinę²⁵⁰, polipów nosa w astmie²⁵¹

W latach 2010-2013 na podstawie badań GWAS uzyskano profil ekspresji genów, które mogą warunkować efektywność VIT, badania te były podstawą wyboru genów do niniejszego badania^{105,106}. W tych badaniach geny mające warunkować sukces immunoterapii miały związek m.in. ze szlakami transdukcji sygnału (*FcεRI*, *MAPK*, *Wnt*, *JAK-STAT*, *Ca*). Ekspresja genów *CLDN1*, *SNX33*, *TWIST2* i *SLC16A4* była wyższa w badaniu Niedoszytko i wsp.¹⁰⁵ u chorych z niepowodzeniem VIT w stosunku do chorych z efektywnym leczeniem, odwrotnie *COMMD8* i *PRLR*. Pośrednio traktując chorych poddawanych VIT z dobrym efektem jako zdrowych lub „zdrowszych” od tych, którzy nie odnieśli korzyści z VIT można odnieść do nich wyniki porównania ekspresji u zdrowych i chorych. Jedynie stosunek *PRLR* prezentował w terażniejszym badaniu odmienny stosunek ekspresji. W badaniu z 2013 roku¹⁰⁶ geny *SOCS3*, *FADS1* i *HES6* miały istotnie bardziej nasiloną ekspresję u chorych przed VIT niż w trakcie i po efektywnym VIT podobnie jak w bieżącym badaniu, natomiast *HLA-DRB5*, *CNGB3* i *HTR3B* odmiennie istotnie niższą ekspresję. Geny *CLDN1*, *COMMD8* i *SLC16A4* są kolejnymi genami związanymi z regulacją procesów zapalnych poprzez oddziaływanie z *NFκB*^{117,123,173}, natomiast *CNGB3*, *HTRB3*, *HES6* oraz *FADS1* poprzez swój udział w funkcjonowaniu układu

nerwowego mogą być potwierdzeniem tezy Siebenhaara i wsp., który opisał postulowany już wcześniej związek nerwów czuciowych z aktywacją mastocytów przez IgE ²⁵².

Podsumowując powyższe można zaryzykować przyjęcie tezy, że inaczej niż po kilku godzinach od anafilaksji kiedy jak pokazuje badanie Stone i wsp., procesy regulatywne są bardzo nasilone i podobnie jak na początku anafilaksji kiedy reakcja alergiczna polega na balansie ustalonym wcześniej w układzie immunologicznym, tak u chorych z alergią na jad osy, którzy zakwalifikowani zostali do VIT, a w porównaniu do osób zdrowych, procesy regulujące szlaki związane z zapaleniem alergicznym są wyhamowane, natomiast VIT może przywrócić im stan homeostazy.

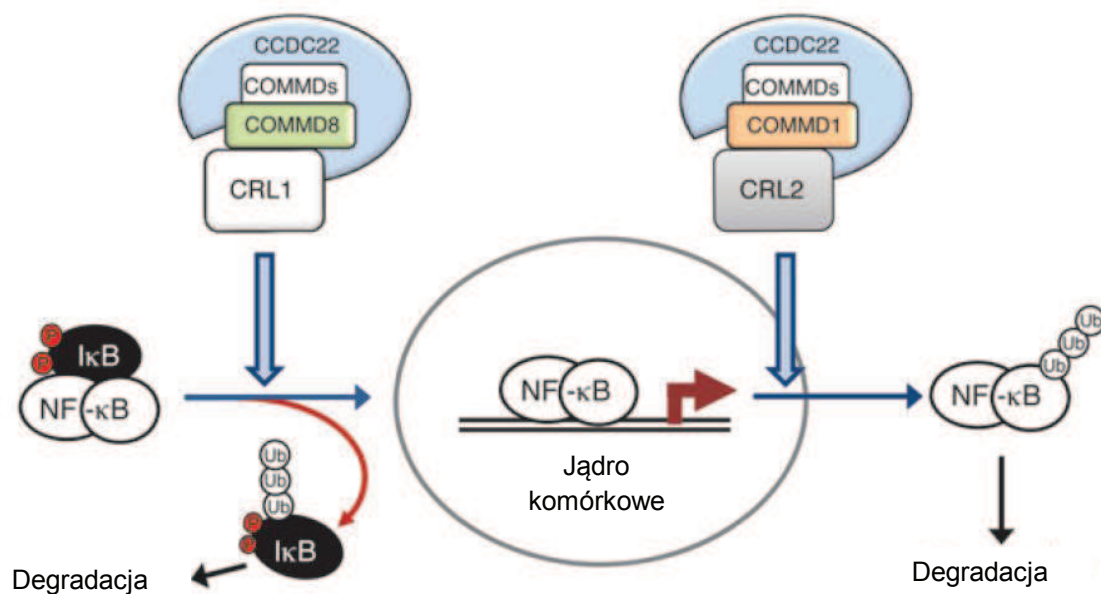
Jedynym genem, który przedstawia inny rodzaj ekspresji był w naszym badaniu *COMMD8* związany bezpośrednio z aktywacją NFκB, szczegółowo opisany poniżej.

5.3.2 Różnice w ekspresji genów u chorych na HVA przed i w trakcie VIT z jadem osy.

Ekspresja *COMMD8* zmniejszyła się pod wpływem immunoterapii z jadem osy u chorych z HVA w niniejszym badaniu.

Białka *COMMD* (ang. *Copper metabolism Murr 1 domain containing protein*; *COMMD*) są grupą dziesięciu ewolucyjnie stałych protein obecnych w bardzo wielu organizmach żywych włączając w to rośliny, pierwotniaki, robaki, owady i kręgowce²⁵³. Białko *COMMD1*, najlepiej poznane, związane jest z wieloma fizjologicznymi procesami takimi jak metabolizm miedzi ²⁵⁴, regulacja stężenia sodu ²⁵⁵ i adaptacja do niedotlenienia ²⁵⁶. Prawdopodobnie białka *COMMD* wpływają na działanie innych białek poprzez ich ubikwitynację czyli zjawisko unieczynnienia dzięki przyłączeniu ubikwityny, same również będąc regulowane w ten sposób ²⁵⁷. *COMMD* wchodzi w interakcje i regulują aktywność grupy ligaz ubikwitynowych znanych jako CRLs (ang. *Cullin-RING ligases*; CRLs), są to białka zawierające kulliny (produkty genów *Cul 1-7*) jako białka szkieletowe, które przyłączając białka typu RING-finger (*Rbx1* i *Rbx2* – białka o typie tzw. palców cynkowych; ang. *Really Interesting New Gene*; RING) tworzą około 25% ligaz ubikwitynowych regulujących procesy od cyklu komórkowego, przez naprawę DNA do wielu ścieżek transdukcji sygnału, włączając w to szlak oparty na NFκB ¹²³.

Aktywacja NF κ B jest zależna od wielu procesów ubikwitynacji. Jednym z nich jest degradacja kompleksu I κ B, konstytutywnego inhibitora tego szlaku ²⁵⁸. Białka I κ B- α , I κ B- β lub I κ B- ϵ przyłączając się do dimerów NF κ B maskują ich jądrową sekwencję lokalizującą, utrzymując je nieaktywne w cytozolu. Degradacja I κ B przebiega przy udziale kompleksu Cul1 i β TrCP (ang. *β transducin repeat-containing protein*; β TrCP), które tworzą CRL1- β TrCP. Fosforylacja I κ B przez kompleks IKK (ang. *I κ B kinase complex*; IKK) tworzy motyw fosfo-serynowy na N-końcu I κ B rozpoznawany przez β TrCP co prowadzi do ubikwitynacji I κ B przez CRL1 i degradacji tego białka ²⁵⁹. Starokadomskyy i wsp. opisali kompleks CCDC22 (ang. *coiled-coil domain-containing protein 22*; CCDC22) oraz COMMD8, który wydaje się być kluczowy dla degradacji I κ B (Ryc. 5), jako czynnik niezbędny do aktywacji CRL1 ¹²³. Z drugiej strony indukowane niezależną od IKK fosforylacją CRL2 mogą dokonać degradacji podjednostki NF κ B wiążącej chromatynę (RelA znane również jako p65), która bierze istotny udział w hamowaniu ekspresji genów, proces ten wydaje się być zależny od obecności COMMD1 ^{123,259} (Ryc. 5).



Ryc. 5. Rola kompleksów CCDC22-COMMD w regulacji systemu zależnego od NF κ B (na podstawie Starokadomskyy i wsp. ¹²³) opis w tekście.

NF κ B jest czynnikiem transkrypcyjnym o plejotropowej funkcji. Jest jednym z głównych regulatorów mechanizmów zarówno wrodzonej (nieswoistej) jak i nabytej (swoistej) odpowiedzi układu immunologicznego, apoptozy, cyklu komórkowego i onkogenezy. Bierze zatem udział w patogenezie chorób układu immunologicznego i nowotworowych. Białka NF κ B1 (p50), NF κ B2 (p52), RelA (p65), c-Rel i RelB pozostają w cytoplazmie w nieaktywnej formie aby po aktywacji pod postacią dimerów przedostać się do jądra komórkowego i regulować ekspresję genów takich białek jak TNF α , IL1 β , IL6, IL8 oraz cyklooksygenazy 2²⁶⁰. La Grutta i wsp. obserwowali dodatnią korelację stężenia RelA i fosforylowanego I κ B z nasileniem objawów astmy u dzieci²⁶¹.

Wpływ NF κ B na mechanizmy indukujące tolerancję są nadal słabo poznane i momentami kontrowersyjne.

RelB jako podjednostka NF κ B, jest jedną z kluczowych dla różnicowania i dojrzewania komórek dendrytycznych (ang. *dendritic cells*; DCs). Regulując obecność CD40 i MHC na powierzchni komórek dendrytycznych RelB warunkuje zdolność DC do dojrzewania²⁶². Istnieją doniesienia sugerujące, iż to właśnie stopień dojrzałości DC stymuluje różnicowanie limfocytów T do Treg i Tr1²⁶³. Niedojrzałe komórki dendrytyczne (ang. *immature dendritic cells*; imDCs) nie mają jednak możliwości produkowania IL6 i IL12 co ogranicza ich wpływ na limfocyty T. Obecnie odróżnia się imDCs, które charakteryzują się brakiem CD40 od komórek dendrytycznych indukujących tolerancję (ang. *tolerogenic DCs*; tolDCs), które mają obecną, jakkolwiek zmniejszoną, ekspresję CD40 oraz charakteryzują się obecnością CD80 i CD86 na powierzchni²⁶⁴. Inne prace eksperymentalne opisujące wpływ IL12 na lokalizację jądrową białek NF κ B1 i RelA sugerują, iż wyhamowana ekspresja NF κ B jest również cechą charakterystyczną dla tolDCs²⁶⁵. Prawdopodobnie ekspresja NF κ B ma wpływ na różnicowanie tolDCs.

Podjednostka c-Rel jest także niezbędna dla dojrzewania i różnicowania komórek Treg niemal na każdym etapie, również jako czynnik stymulujący ekspresję Foxp3 na powierzchni Treg. Dimery p50-c-Rel warunkują ekspresję genu Foxp3. Pozostaje niejasne czy aktywność NF κ B jest potrzebna do zachowania funkcji supresorowych TregFoxp3+ po wygenerowaniu Foxp3 na powierzchni komórki. Z jednej strony

myszy pozbawione c-Rel posiadają normalną ilość komórek Treg o zachowanym fenotypie, z drugiej istnieją doniesienia o zahamowaniu właściwości immunosupresyjnych Treg w przypadku blokowania fosforylacji IKK2 oraz o pozytywnych interakcjach pomiędzy c-Rel i p65 a Foxp3²⁶⁶. Ostatnio publikowane obserwacje potwierdzają, że aktywacja NFκB jest niezbędna dla utrzymania przeżycia, proliferacji i funkcji supresorowych Treg²⁶⁷. Rozwiązanie tej kwestii oczekuje wyjaśnienia.

Szlak NFκB ma także wpływ na różnicowanie limfocytów Th17. Stymulacja receptorów TLR4 przez LPS (lipopolisacharydy bakteryjne; ang. *lipopolysaccharides*; LPS) lub białko MYD88 powoduje prawdopodobnie zwiększenie ilości p65 i aktywację p50 w komórkach T co stymuluje różnicowanie i proliferację do Th17^{268,269}.

Badania doświadczalne na modelu zwierzęcym sugerują możliwość uzyskania bezpośredniego efektu klinicznego poprzez zahamowanie aktywacji NFκB.

Taher i wsp. zastosowali selektywny inhibitor IKK2 (PS-1145) w modelu mysim. Myszy uczulone na owoalbuminę leczono suboptymalnymi dawkami tego białka nie uzyskując efektu klinicznego. Po dodaniu PS-1145 do terapii uzyskano spadek o 64% eozynofilii obwodowej, odpowiednio o 62% i 50% spadło stężenie IL-5 i IL13 i o 24% TGFβ w surowicy krwi, natomiast stężenie IL10 wzrosło o 85% (p<0,01)²⁶³.

Prace chińskich badaczy nad plazmidową szczepionką zawierającą DNA białka Der p2 również przyniosły wyhamowanie STAT6 i NFκB. Podanie myszom szczepionki DNA zawierającej sekwencje Der p2 skutkowało zmniejszeniem ilości komórek zapalnych w tkankach płuc i popłuczynach oskrzelikowo-pęcherzykowych (ang. *bronchoalveolar lavage*; BAL), spadkiem stężenia sIgE w surowicy krwi, spadkiem stężenia IL4 i IL13 w BAL oraz spadkiem ekspresji STAT6 i p65 w preparatach uzyskanych z płuc²⁷⁰.

Badania kliniczne opisują hamujący wpływ immunoterapii na aktywację układu zależnego od NFκB.

Bazując na wiedzy, iż białka TLR przy pomocy białka MYD88 aktywują NFκB, badano wpływ immunoterapii z alergenami kurzu domowego na translokację NFκB

do jądra komórkowego. Czterdzieścioro dzieci z alergią na kurz i astmą podzielono na dwie grupy: poddawanych AIT z alergenami kurzu domowego oraz nieleczonych immunoterapią. Po roku obserwacji oznaczono stężenia IL10, TGF β , Foxp3, MYD88, p65 oraz wielu innych. Badano także korelację stężeń białek i zmian w spirometrii. Obserwowano m.in. wzrostu stężeń IL10, TGF β i Foxp3 jednocześnie z poprawą FEV1 i objawów astmy u dzieci w trakcie immunoterapii. W grupie poddawanej AIT odnotowano istotnie mniejsze stężenie p65 (RelA) w nukleoplazmie i spadek cytokin będących częścią ścieżki zależnej od MYD88 w komórkach Treg, w porównaniu do dzieci nieleczonych immunoterapią²⁷¹.

W obserwacji Ventura i wsp. badano aktywację NF κ B w neutrofilach stymulowanych LPS u astmatyków leczonych AIT z powodu alergii wziewnej. Mierzono m.in. aktywację białek p52 i p65 w jądrze komórkowym oraz fosforylację I κ B w grupach leczonych i nieleczonych immunoterapią. W jądrze komórkowym stymulowanych neutrofilii uzyskanych od chorych poddawanych AIT odnotowano istotnie ($p < 0,001$) niższe stężenia p52 i p65. Stężenie p52 i p65 silnie dodatnio (odpowiednio $r = 0,823$ przy $p = 0,001$ i $r = 0,864$ przy $p = 0,003$) korelowało z nasileniem objawów alergii. Stężenie fosforylowanego I κ B było również istotnie niższe u chorych leczonych immunoterapią²⁷².

Podsumowując powyższe dane można stwierdzić, że układ związany z NF κ B ma istotny wpływ na mechanizmy związane z zapaleniem alergicznym i wytwarzaniem tolerancji na alergeny. Istnieją kontrowersje co do jednoznacznej funkcji białek tego układu wynikające z pewnego dysonansu obserwacji doświadczalnych i klinicznych. Wyniki niniejszego badania wskazujące na spadek ekspresji COMMD8 jako białka kluczowego dla aktywacji NF κ B w przebiegu VIT z jadem osy czynią z genu COMMD8 obiecującego kandydata do dalszych badań nad mechanizmami immunoterapii oraz potencjalnego biomarkera skuteczności VIT.

6. Wnioski

1. Analiza wyników klinicznych leczenia wykazała skuteczność prowadzonej immunoterapii, która jest porównywalna z danymi podawanymi w literaturze światowej. Czynniki klinicznymi mającymi istotny wpływ na stopień nasilenia reakcji po użądleniu u chorych na HVA było rozpoznanie mastocytozy, chorób układu krążenia i chorób autoimmunologicznych oraz wiek chorych, Jako czynniki wpływające na bezpieczeństwo VIT zidentyfikowano podwyższone stężenie tryptazy mastocytarnej oraz odczulanie jadem pszczoły. Skuteczność immunoterapii może być niższa u chorych poddawanych VIT z jadem pszczoły i rosnać wraz z czasem trwania terapii.

2. Porównanie ekspresji wybranych genów za pomocą techniki RT-PCR (z zastosowaniem kart mikrocieczowych) we krwi obwodowej u chorych z alergią na jad osy w porównaniu do osób zdrowych wykazała istotną różnicę w ekspresji w przypadku 12 badanych genów zaangażowanych w patogenezę procesów zapalnych (*CLDN1*, *CNGB3*, *COMMD8*, *FADS1*, *HES6*, *HLA-DRB5*, *HTR3B*, *PRLR*, *SLC16A4*, *SNX33*, *SOCS3* oraz *TWIST2*), co może w przyszłości przyczynić się do identyfikacji mechanizmów wpływających na występowanie HVA oraz stanowić podstawę wprowadzenia nowych metod diagnostycznych.

3. Ocena zmiany ekspresji wybranych genów za pomocą techniki RT-PCR (z zastosowaniem kart mikrocieczowych) we krwi obwodowej u chorych z alergią na jad osy pod wpływem immunoterapii z jadem osy wykazała istotne zmniejszenie ekspresji genu *COMMD8*, co z uwagi na jego kluczową funkcję w aktywacji szlaku NFκB, który ma udział mechanizmie VIT, czynią z genu obiecującego kandydata do dalszych badań nad mechanizmami immunoterapii oraz potencjalnego biomarkera skuteczności VIT.

7. Streszczenie

Tytuł: Analiza skuteczności i bezpieczeństwa leczenia oraz prospektywne badanie ekspresji wybranych genów za pomocą techniki RT-PCR u chorych z alergią na jad owadów błonkoskrzydłych.

Wprowadzenie: Leczeniem z wyboru dla chorych z alergią na jad owadów błonkoskrzydłych z wysokim ryzykiem reakcji systemowej po użądleniu jest immunoterapia z jadem owadów (VIT). Efektywność VIT jest dobrze udokumentowana, jednak ciągle część chorych poddawanych terapii nie uzyskuje ochrony przed anafilaksją po użądleniu. W związku z tym ciągle potrzebujemy narzędzi, dzięki którym będziemy prawidłowo kwalifikować chorych do VIT oraz, usprawniając proces leczenia, będziemy mogli przewidzieć przebieg i efektywność VIT.

Cele pracy: (1) Analiza wpływu wybranych czynników klinicznych na nasilenie reakcji po użądleniach, bezpieczeństwo oraz skuteczność immunoterapii z jadem w grupie chorych z alergią na jad owadów błonkoskrzydłych. (2) Ocena ekspresji wybranych genów za pomocą techniki MFC RT-PCR we krwi obwodowej u chorych z alergią na jad osy w porównaniu do osób zdrowych. (3) Ocena zmiany ekspresji wybranych genów za pomocą techniki MFC RT-PCR we krwi obwodowej u chorych z alergią na jad osy pod wpływem immunoterapii z jadem osy.

Metody: Do badania zakwalifikowano 246 chorych, którzy byli poddawani VIT w Klinice Alergologii GUMed. Grupa obejmowała 119 chorych, którzy do roku 2014 zakończyli 5 letni kurs VIT oraz 127 chorych, którzy w latach 2010-2014 roku byli w trakcie VIT. Chorych poddano badaniu ankietowemu dotyczącemu przebiegu choroby zasadniczej i terapii z jadem, oraz chorób współistniejących. Z grupy chorych w trakcie VIT wyodrębniono 45 chorych z alergią na jad osy u których przeprowadzono analizę ekspresji wybranych genów za pomocą techniki MFC RT-PCR (TaqMan® Array Micro Fluidic Cards, Applied Biosystems). Grupę kontrolną stanowiło 38 ochotników bez alergii w wywiadzie. Na badanie została wydana zgoda Niezależnej Komisji Bioetycznej przy GUMed nr NKBBN/468/2013.

Wyniki: Spośród 246 chorych poddanych badaniu ankietowemu 54 była żądlnych naturalnie w trakcie lub po zakończeniu VIT, z czego 3 (5,5%) ponownie rozwinęło

reakcję anafilaktyczną. Obserwowano istotny spadek nasilenia reakcji po użądleniach pod wpływem VIT zarówno w grupie w trakcie jak i po zakończonym VIT ($p=0,0001$ i $p<0,0001$). Odnotowano istotny wpływ współrozpoznania mastocytozy ($p=0,0325$), chorób układu krążenia ($p=0,0352$) i chorób autoimmunologicznych ($p=0,0037$) na średnie nasilenie reakcji oraz, w grupie w trakcie VIT, korelację wieku chorych z nasileniem reakcji po użądleniu ($r=0,23$; $p<0,05$). Immunoterapia z jadem pszczoły w grupie po VIT ($p=0,0042$), a także podwyższone stężenie tryptazy mastocytarnej u chorych przed VIT z jadem osy ($p=0,0317$) zwiększały ryzyko występowania działań niepożądanych VIT. Odczulanie jadem pszczoły zmniejszało skuteczność VIT w grupie w trakcie VIT ($p=0,0187$), a długość terapii w tej grupie korelowała ze zmniejszeniem nasilenia reakcji po użądleniach w trakcie terapii ($r=-0,37$; $p<0,05$). Wykazano niższą ekspresję 11 genów (*CLDN1* ($p=0,000023$), *CNGB3* ($p=0,000035$), *FADS1* ($p=0,03385$), *HES6* ($p=0,007665$), *HLA-DRB5* ($p=0,010112$), *HTR3B* ($p=0,00004$), *PRLR* ($p=0,037961$), *SLC16A4* ($p=0,027395$), *SNX33* ($p=0,000763$), *SOCS3* ($p=0,000848$), *TWIST2* ($p=0,004828$)) oraz wyższą ekspresję genu *COMMD8* ($p=0,000515$) w grupie chorych z alergią na jad osy w porównaniu z grupą kontrolną. Ekspresją genu *COMMD8* u chorych zmniejszyła się istotnie ($p=0,012413$) po około 3 miesiącach immunoterapii.

Wnioski: (1) Analiza wyników klinicznych leczenia wykazała skuteczność prowadzonej immunoterapii, która jest porównywalna z danymi podawanymi w literaturze światowej. Czynniki klinicznymi mającymi istotny wpływ na stopień nasilenia reakcji po użądleniu, bezpieczeństwo i skuteczność VIT było rozpoznanie mastocytozy, chorób układu krążenia i autoimmunologicznych, wiek chorych, stężenie tryptazy mastocytarnej, odczulanie jadem pszczoły oraz czas trwania terapii. (2) Porównanie ekspresji wybranych genów u chorych z alergią na jad osy w porównaniu do osób zdrowych wykazała istotną różnicę w ekspresji 12 badanych genów zaangażowanych w patogenezę zapalenia, co może w przyszłości przyczynić się do wprowadzenia nowych metod diagnostycznych. (3) Ocena zmiany ekspresji wybranych genów u chorych z alergią na jad osy pod wpływem VIT wykazała istotne zmniejszenie ekspresji genu *COMMD8*, co z uwagi na jego kluczową funkcję w aktywacji szlaku NF κ B, czynią z genu kandydata do dalszych badań nad mechanizmami immunoterapii oraz potencjalnego biomarkera skuteczności VIT.

8. Abstract

Title: The analysis of safety and effectiveness of treatment and a prospective_RT-PCR analysis of chosen genes expression in patients with hymenoptera venom allergy

Introduction: The treatment of choice for patients with hymenoptera venom allergy (HVA), at high risk of systemic reaction after the sting, is insect venom immunotherapy (VIT). Effectiveness of immunotherapy is well documented. However there are still patients treated with VIT, who do not achieve protection from anaphylaxis. Therefore we still need tools to properly qualify the patients, improve treatment regimen and also to predict the course and effectiveness of immunotherapy.

Aims: (1) Analysis of the factors influencing the sting reaction severity, safety and effectiveness of VIT (2) Assessment of the expression of selected genes using MFC RT-PCR method in peripheral blood cells of patients with wasp venom allergy compared to healthy controls. (3) Analysis of the changes in gene expression using MFC RT-PCR in peripheral blood cells in patients with wasp venom allergy in the course of venom immunotherapy.

Methods: The study group included 246 adult patients treated with VIT in Department of Allergology at Medical University of Gdańsk. Group consisted of 119 patients who completed their 5-year course of VIT till the end of 2014 and 127 patients, who were treated with VIT in the period 2010-2014. The patients were asked for the progress of their HVA symptoms, treatment and comorbidities using constructed questionnaire. Among patients under VIT, 45 with wasp venom allergy were qualified to assess the gene expression analysis using MFC RT-PCR (TaqMan® Array Micro Fluidic Cards, Applied Biosystems). The control group included 38 healthy volunteers without allergy in their medical history.

Results: Among 246 patients 54 underwent field stings during or after VIT, 3 of them (5,5%) reacted with anaphylaxis. We observed significant improvement in the average severity of sting reactions, both in the group under (p=0,001) and after VIT (p<0,001). There was a significant influence of coexistence of mastocytosis (p=0,0325), cardiovascular (p=0,0352) and autoimmune diseases (p=0,0037) on

average severity of sting reactions. We also noticed correlation between severity of the reactions and age of the patients in the group during VIT ($r=0,23$; $p<0,05$). Therapy with bee venom in the group after VIT ($p=0,0042$) and increased tryptase among allergic to wasp venom ($p=0,0317$) were raising a risk of VIT adverse reactions. Effectiveness of immunotherapy was conditioned, only in the group during VIT, with bee venom therapy ($p=0,0187$) and with length of VIT ($r=-0,37$; $p<0,05$). Significantly lower gene expression were found for 11 genes (*CLDN1* ($p=0,000023$), *CNGB3* ($p=0,000035$), *FADS1* ($p=0,03385$), *HES6* ($p=0,007665$), *HLA-DRB5* ($p=0,010112$), *HTR3B* ($p=0,00004$), *PRLR* ($p=0,037961$), *SLC16A4* ($p=0,027395$), *SNX33* ($p=0,000763$), *SOCS3* ($p=0,000848$), *TWIST2* ($p=0,004828$) and higher expression for 1 gene (*COMMD8*; $p=0,000515$) in wasp venom allergic patients compared to controls. Furthermore significant lowering was found in expression for *COMMD8* after about 3 months of immunotherapy ($p=0,012413$).

Conclusions: (1) Analysis of clinical outcomes of the treatment showed the effectiveness of the immunotherapy in the study group which is comparable with literature data reported in other countries. A clinical factors having a significant influence on the severity of the reaction after stinging, a safety and effectiveness of VIT were co-occurring mastocytosis, cardiovascular and autoimmune diseases, age of the patients, tryptase concentration, bee venom therapy and duration of VIT. (2) Our data revealed significant differences between patients and control group, in expression of 12 genes believed to be involved in pathogenesis of inflammation. This data can serve for implementing new diagnostic methods in the future. (3) *COMMD8* gene expression was lowered in the course of VIT what, due to its function, makes it likely to become a marker of immunotherapy.

9. Wykaz rycin, tabel, wykresów i zdjęć.

| | <u>Tytuł</u> | <u>Nr str.</u> |
|--------|---|----------------|
| Zdj. 1 | Osa pospolita (<i>Vespa vulgaris</i>) | 10 |
| Zdj. 2 | Pszczoła miodna (<i>Apis mellifera</i>) | 10 |
| Ryc. 1 | Skrócona klasyfikacja błonkoskrzydłych istotnych ze względu na potencjalne zagrożenie reakcją po użądleniu na terenie Polski i Europy Środkowej | 11 |
| Zdj. 3 | Szerszeń europejski (<i>Vespa crabro</i>) | 12 |
| Zdj. 4 | Trzmiel ziemny (<i>Bombus terrestris</i>) | 12 |
| Zdj. 5 | Klecanka rdzaworożna (<i>Polistes dominula</i>) | 12 |
| Ryc. 2 | Klasyfikacja reakcji systemowych po użądleniach wg H.L. Mueller | 14 |
| Ryc. 3 | Historia naturalna alergii na jad owadów błonkoskrzydłych z uwzględnieniem ryzyka ponownej reakcji systemowej po użądleniu u chorych nieleczonych, poddawanych VIT przez 1-2 lata i przez średnio 6 lat | 23 |
| Tab. 1 | Klasyfikacja działań niepożądanych immunoterapii z jadem owadów błonkoskrzydłych (wg Mosbecha i Muellera) | 26 |
| Tab. 2 | Lista 15 wybranych genów | 38 |
| Wyk. 1 | Wyniki rekrutacji do badania | 47 |
| Wyk. 2 | Średnie nasilenie reakcji po użądleniu wg skali Muellera przed rozpoczęciem VIT i w trakcie VIT w grupie chorych w trakcie VIT | 47 |
| Tab. 3 | Podsumowanie liczności użądleń (raportowanych reakcji) i liczby chorych w analizowanych grupach | 48 |
| Tab. 4 | Charakterystyka kliniczna badanych w trakcie immunoterapii z jadem owadów z wyodrębnioną grupą chorych poddanych badaniu genetycznemu, oraz uczestników grupy kontrolnej | 49 |
| Tab. 5 | Charakterystyka kliniczna badanych po zakończonej immunoterapii z jadem owadów | 50 |
| Wyk. 3 | Średnie nasilenie reakcji po użądleniu przed rozpoczęciem VIT i w trakcie VIT oraz po zakończeniu VIT w grupie chorych po | 51 |

| | | |
|---------|---|----|
| | zakończonych terapii | |
| Wyk. 4 | Średnie nasilenie reakcji po użądleniu wg skali Muellera przed rozpoczęciem VIT z jadem osy i w trakcie VIT z jadem osy w grupie chorych w trakcie VIT | 51 |
| Wyk. 5 | Średnie nasilenie reakcji po użądleniu przed rozpoczęciem VIT z jadem osy i w trakcie VIT oraz po zakończeniu VIT w grupie chorych po 5 latach terapii | 52 |
| Wyk. 6 | Średnie nasilenie reakcji po użądleniu wg skali Muellera przed rozpoczęciem VIT z jadem osy i w trakcie VIT z jadem osy w grupie chorych, u których przeprowadzono badanie genetyczne | 53 |
| Wyk. 7 | Średnie nasilenie reakcji po użądleniu wg skali Muellera przed rozpoczęciem VIT z jadem pszczoły i w trakcie VIT z jadem pszczoły w grupie chorych w trakcie VIT | 53 |
| Wyk. 8 | Średnie nasilenie reakcji po użądleniu przed rozpoczęciem VIT z jadem pszczoły i w trakcie VIT oraz po zakończeniu VIT w grupie chorych po 5 latach terapii | 54 |
| Wyk. 9 | Średnie nasilenie reakcji po użądleniu przed VIT w grupie chorych w trakcie VIT w zależności od płci chorego | 55 |
| Wyk. 10 | Nasilenie reakcji po użądleniu wobec wieku chorego | 56 |
| Wyk. 11 | Średnie nasilenie reakcji po użądleniu w trakcie i po VIT w grupie chorych po zakończonym VIT w zależności od stosowanego jadu w immunoterapii | 57 |
| Wyk. 12 | . Średnie nasilenie reakcji po użądleniu w trakcie VIT w grupie chorych w trakcie VIT w zależności od stosowanego jadu w immunoterapii | 57 |
| Wyk. 13 | Średnie nasilenie reakcji po użądleniu w trakcie VIT, w grupie chorych w trakcie VIT w zależności od występowania działań niepożądanych terapii innych niż reakcja miejscowa po szczepieniu | 58 |
| Wyk. 14 | Nasilenie reakcji po użądleniu wobec długości przebytej terapii do czasu użądlenia | 59 |
| Wyk. 15 | Średnie nasilenie reakcji po użądleniu przed VIT w grupie | 60 |

| | | |
|---------|--|----|
| | chorych w trakcie VIT w zależności od współwystępowania chorób układu krążenia | |
| Wyk. 16 | Średnie nasilenie reakcji po uządleniu przed VIT w grupie chorych w trakcie VIT w zależności od współwystępowania mastocytozy | 61 |
| Wyk. 17 | Średnie nasilenie reakcji po uządleniu przed VIT w grupie chorych w po zakończonym VIT w zależności od współwystępowania chorób autoimmunologicznych | 63 |
| Tab. 6 | Wpływ wybranych czynników klinicznych na występowanie działań niepożądanych VIT | 64 |
| Tab. 7 | Wpływ wybranych czynników klinicznych na skuteczność VIT | 65 |
| Tab. 8 | Porównanie wyników ekspresji wybranych genów u chorych zakwalifikowanych do VIT w stosunku do uczestników grupy kontrolnej | 66 |
| Tab. 9 | Funkcje genów podlegających istotnie różnej ekspresji w krwi obwodowej u chorych z HVA w porównaniu do osób zdrowych, na podstawie bazy danych GENECODIS | 67 |
| Tab. 10 | Porównanie wyników ekspresji wybranych genów u chorych poddawanych VIT z jadem osy przed i w trakcie immunoterapii | 68 |
| Ryc. 5 | Rola kompleksów CCDC22-COMMD w regulacji systemu zależnego od NF κ B | 85 |

10. Bibliografia

1. Bonifazi, F., Jutel, M., Biló, B. M., Birnbaum, J. & Muller, U. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. *Allergy* **60**, 1459–70 (2005).
2. Oude Elberink, J. N. G. & Dubois, A. E. J. Quality of life in insect venom allergic patients. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **3**, 287–93 (2003).
3. Paolocci, G., Folletti, I., Torén, K., Muzi, G. & Murgia, N. Hymenoptera venom allergy: work disability and occupational impact of venom immunotherapy. *BMJ Open* **4**, e005593 (2014).
4. Bilò, B. M. & Bonifazi, F. Epidemiology of insect-venom anaphylaxis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **8**, 330–7 (2008).
5. Gelincik, A. *et al.* The prevalence of Hymenoptera venom allergy in adults: the results of a very crowded city in Euroasia. *Allergol. Int.* **64**, 35–40 (2015).
6. Worm, M. *et al.* First European data from the network of severe allergic reactions (NORA). *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **69**, 1397–1404 (2014).
7. Bilo, B. M. *et al.* Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy* **60**, 1339–1349 (2005).
8. Tejedor Alonso, M. A., Moro Moro, M. & Múgica García, M. V. Epidemiology of anaphylaxis. *Clin. Exp. Allergy* **45**, 1027–39 (2015).
9. Global Atlas of Allergy - EAACI. at <<http://www.eaaci.org/resources/scientific-output/global-atlas-of-allergy.html>>
10. Schwartz, H. J., Squillace, D. L., Sher, T. H., Teigland, J. D. & Yunginger, J. W. Studies in stinging insect hypersensitivity: postmortem demonstration of antivenom IgE antibody in possible sting-related sudden death. *Am. J. Clin. Pathol.* **85**, 607–10 (1986).
11. Panesar, S. S. *et al.* The epidemiology of anaphylaxis in Europe: a systematic review. *Allergy* **68**, 1353–61 (2013).
12. Grabenhenrich, L. B. *et al.* Anaphylaxis in children and adolescents: The European Anaphylaxis Registry. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1–11 (2016). doi:10.1016/j.jaci.2015.11.015
13. ECAP - Epidemiologia Chorób Alergicznych w Polsce. at <<http://www.ecap.pl/>>
14. Nittner-Marszalska, M. *et al.* Prevalence of Hymenoptera venom allergy and its immunological markers current in adults in Poland. *Med. Sci. Monit.* **10**, CR324–9 (2004).
15. Alergia na jad owadów | Alergie.mp.pl - Medycyna Praktyczna: Lekarze pacjentom. at <<http://alergie.mp.pl/chorobyalergiczne/choroby/59841,alergia-na-jad-owadow>>

16. Krishna, M. T. *et al.* Diagnosis and management of hymenoptera venom allergy: British Society for Allergy and Clinical Immunology (BSACI) guidelines. *Clin. Exp. Allergy* **41**, 1201–20 (2011).
17. Van Vaerenbergh, M., Debyser, G., Devreese, B. & de Graaf, D. C. Exploring the hidden honeybee (*Apis mellifera*) venom proteome by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with FTMS. *J. Proteomics* **99**, 169–178 (2014).
18. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Home Page. at <<http://www.allergen.org/index.php>>
19. Ollert, M. & Blank, S. Anaphylaxis to Insect Venom Allergens: Role of Molecular Diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep* **15**, 527 (2015).
20. Muraro, A. *et al.* Anaphylaxis: Guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **69**, 1026–1045 (2014).
21. Truhl????, A. *et al.* European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015. Section 4. Cardiac arrest in special circumstances. *Resuscitation* **95**, 148–201 (2015).
22. Alergia, choroby alergiczne, astma Tom II pod red. M. Fala. 465–480 (2011). at <<http://www.mp.pl/ksiegarnia/info.php?id=7354>>
23. Sturm, G. J. *et al.* Asymptomatic sensitization to hymenoptera venom is related to total immunoglobulin E levels. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **148**, 261–4 (2009).
24. Sturm, G. J. *et al.* Sensitization to Hymenoptera venoms is common, but systemic sting reactions are rare. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 1635–43.e1 (2014).
25. Bonadonna, P., Bonifacio, M., Lombardo, C. & Zanotti, R. Hymenoptera Allergy and Mast Cell Activation Syndromes. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **16**, 5 (2016).
26. Golden, D. B. K. New directions in diagnostic evaluation of insect allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **14**, 334–9 (2014).
27. Boccagni, P., Favari, F., Zanoni, G., Pezzini, A. & Tridente, G. Comparison of four in vitro assays for specific IgE detection. *Int. J. Clin. Lab. Res.* **24**, 102–5 (1994).
28. Spillner, E., Blank, S. & Jakob, T. Hymenoptera allergens: from venom to ‘venome’. *Front. Immunol.* **5**, 77 (2014).
29. Matricardi, P. M. *et al.* EAACI Molecular Allergology User’s Guide. *Pediatr. Allergy Immunol.* **27**, 1–250 (2016).
30. Brehler, R., Grundmann, S. & Stocker, B. Cross-reacting carbohydrate determinants and hymenoptera venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **13**, 360–364 (2013).
31. Sturm, G. J. *et al.* Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between

- bee and vespid venom allergy. *PLoS One* **6**, e20842 (2011).
32. Blank, S. *et al.* Api m 10, a genuine *A. mellifera* venom allergen, is clinically relevant but underrepresented in therapeutic extracts. *Allergy* **66**, 1322–9 (2011).
 33. Michel, J. *et al.* Added sensitivity of component-resolved diagnosis in hymenoptera venom-allergic patients with elevated serum tryptase and/or mastocytosis. *Allergy* n/a–n/a (2016). doi:10.1111/all.12850
 34. Incorvaia, C., Mauro, M., Pravettoni, V. & Pucci, S. Hypersensitivity to Hymenoptera venom: advances in diagnosis and implications for treatment. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* **5**, 128–35 (2011).
 35. Nittner-Marszalska, M. & Cichocka-Jarosz, E. Insect sting allergy in adults: key messages for clinicians. *Pol. Arch. Med. Wewnętrznej* **125**, 929–37 (2015).
 36. Bonadonna, P. *et al.* The role of basophil activation test in special populations with mastocytosis and reactions to hymenoptera sting. *Allergy* **67**, 962–5 (2012).
 37. Hoffmann, H. J. *et al.* The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy* **70**, 1393–1405 (2015).
 38. Balzer, L. *et al.* Basophil activation test using recombinant allergens: highly specific diagnostic method complementing routine tests in wasp venom allergy. *PLoS One* **9**, e108619 (2014).
 39. Savi, E., Peveri, S., Makri, E., Pravettoni, V. & Incorvaia, C. Comparing the ability of molecular diagnosis and CAP-inhibition in identifying the really causative venom in patients with positive tests to *Vespula* and *Polistes* species. *Clin. Mol. Allergy* **14**, 3 (2016).
 40. Bilò, M. B. *et al.* Self-medication of anaphylactic reactions due to Hymenoptera stings—an EAACI Task Force Consensus Statement. *Allergy* **71**, 931–43 (2016).
 41. EAACI - Minutes of the Insect Venom Hypersensitivity IG yearly Business Meeting EAACI 2014. at <<http://www.eaaci.org/organisation/eaaci-interest-groups/ig-on-insect-venom-hypersensitivity/activities/2969-ct-venom-hypersensitivity-ig-yearly-business-meeting-eaaci-2014.html>>
 42. Simons, F. E. R. *et al.* International consensus on (ICON) anaphylaxis. *World Allergy Organ. J.* **7**, 9 (2014).
 43. Oude Elberink, J. N. G., van der Heide, S., Guyatt, G. H. & Dubois, A. E. J. Immunotherapy improves health-related quality of life of adult patients with dermal reactions following yellow jacket stings. *Clin. Exp. Allergy* **39**, 883–9 (2009).
 44. Boyle, R. J. *et al.* Venom immunotherapy for preventing allergic reactions to insect stings.

Cochrane database Syst. Rev. **10**, CD008838 (2012).

45. Golden, D. B., Kwiterovich, K. A., Kagey-Sobotka, A., Valentine, M. D. & Lichtenstein, L. M. Discontinuing venom immunotherapy: outcome after five years. *J. Allergy Clin. Immunol.* **97**, 579–87 (1996).
46. Golden, D. B. K. Stinging insect allergy. *Am. Fam. Physician* **67**, 2541–6 (2003).
47. 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.* **108**, 1027–32 (2001).
48. Aberer, W. & Sturm, G. Venom immunotherapy: pitfalls and open questions. *Immunotherapy* **3**, 1277–9 (2011).
49. Golden, D. B., Kagey-Sobotka, A. & Lichtenstein, L. M. Survey of patients after discontinuing venom immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 385–90 (2000).
50. Brockow, K. *et al.* Efficacy of antihistamine pretreatment in the prevention of adverse reactions to Hymenoptera immunotherapy: a prospective, randomized, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* **100**, 458–63 (1997).
51. Gorska, L. *et al.* Analysis of safety, risk factors and pretreatment methods during rush hymenoptera venom immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **147**, 241–5 (2008).
52. Ross, R. N., Nelson, H. S. & Finegold, I. Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of hymenoptera venom hypersensitivity: a meta-analysis. *Clin. Ther.* **22**, 351–8 (2000).
53. Cavkaytar, O., Akdis, C. A. & Akdis, M. Modulation of immune responses by immunotherapy in allergic diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* **17**, 30–7 (2014).
54. Akdis, C. A. & Akdis, M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ. J.* **8**, 17 (2015).
55. Ruëff, F. *et al.* Predictors of clinical effectiveness of Hymenoptera venom immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy* **44**, 736–746 (2014).
56. Reisman, R. E. Duration of venom immunotherapy: relationship to the severity of symptoms of initial insect sting anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**, 831–6 (1993).
57. Golden, D. B., Kwiterovich, K. A., Kagey-Sobotka, A. & Lichtenstein, L. M. Discontinuing venom immunotherapy: extended observations. *J. Allergy Clin. Immunol.* **101**, 298–305 (1998).
58. Lerch, E. & Müller, U. R. Long-term protection after stopping venom immunotherapy: results of re-stings in 200 patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* **101**, 606–12 (1998).

59. van Halteren, H. K., van der Linden, P. W., Burgers, J. A. & Bartelink, A. K. Discontinuation of yellow jacket venom immunotherapy: follow-up of 75 patients by means of deliberate sting challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* **100**, 767–70 (1997).
60. Hafner, T., DuBuske, L. & Kosnik, M. Long-term efficacy of venom immunotherapy. *Ann. Allergy. Asthma Immunol.* **100**, 162–5 (2008).
61. Lang, R. & Hawranek, T. Hymenoptera venom immunotherapy and field stings. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **16**, 224–31 (2006).
62. Muller, U. R. & Ring, J. When Can Immunotherapy for Insect Sting Allergy Be Stopped? *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **3**, 324–328 (2015).
63. Golden, D. B. K. Long-term outcome after venom immunotherapy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **10**, 337–41 (2010).
64. Haeberli, G., Brönnimann, 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* **33**, 1216–20 (2003).
65. Mosbech, H. & Müller, U. Side-effects of insect venom immunotherapy: results from an EAACI multicenter study. European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* **55**, 1005–1010 (2000).
66. Jutel, M. *et al.* International consensus on allergy immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 556–68 (2015).
67. Jutel, M. *et al.* Sublingual immunotherapy (SLIT) - indications, mechanism, and efficacy Position paper prepared by the Section of Immunotherapy, Polish Society of Allergy. *Ann. Agric. Environ. Med.* **23**, 44–53 (2016).
68. Patriarca, G. *et al.* Sublingual desensitization in patients with wasp venom allergy: preliminary results. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **21**, 669–77
69. Severino, M. G. *et al.* Sublingual immunotherapy for large local reactions caused by honeybee sting: a double-blind, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, 44–8 (2008).
70. Ruëff, F. *et al.* Sublingual immunotherapy with venom is not recommended for patients with Hymenoptera venom allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 272–3; author reply 273 (2009).
71. Frick, M. *et al.* Predominant Api m 10 sensitization as risk factor for treatment failure in honey bee venom immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **0**, 330–337 (2016).
72. Ruëff, F. *et al.* Clinical effectiveness of hymenoptera venom immunotherapy: a prospective observational multicenter study of the European academy of allergology and clinical

- immunology interest group on insect venom hypersensitivity. *PLoS One* **8**, e63233 (2013).
73. Brehler, R., Wolf, H., Kütting, B., Schnitker, J. & Luger, T. Safety of a two-day ultrarush insect venom immunotherapy protocol in comparison with protocols of longer duration and involving a larger number of injections. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 1231–5 (2000).
 74. Goldberg, A. & Confino-Cohen, R. Rush venom immunotherapy in patients experiencing recurrent systemic reactions to conventional venom immunotherapy. *Ann. Allergy. Asthma Immunol.* **91**, 405–10 (2003).
 75. Birnbaum, J., Ramadour, M., Magnan, A. & Vervloet, D. Hymenoptera ultra-rush venom immunotherapy (210 min): a safety study and risk factors. *Clin. Exp. Allergy* **33**, 58–64 (2003).
 76. Ruëff, F. *et al.* Predictors of side effects during the buildup phase of venom immunotherapy for Hymenoptera venom allergy: The importance of baseline serum tryptase†. *J. Allergy Clin. Immunol.* **126**, 105–11.e5 (2010).
 77. Brown, S. G. A. *et al.* Ultrarush versus semirush initiation of insect venom immunotherapy: a randomized controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* **130**, 162–8 (2012).
 78. Goldberg, A. & Confino-Cohen, R. Bee venom immunotherapy - how early is it effective? *Allergy* **65**, 391–5 (2010).
 79. Cavallucci, E. *et al.* Maintenance venom immunotherapy administered at a 3-month interval preserves safety and efficacy and improves adherence. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **20**, 63–8 (2010).
 80. Park, J. H., Yim, B. K., Lee, J.-H., Lee, S. & Kim, T.-H. Risk associated with bee venom therapy: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **10**, e0126971 (2015).
 81. Sturm, G. J. *et al.* The CD63 basophil activation test in Hymenoptera venom allergy: a prospective study. *Allergy* **59**, 1110–7 (2004).
 82. Ludolph-Hauser, D. *et al.* Constitutively raised serum concentrations of mast-cell tryptase and severe anaphylactic reactions to Hymenoptera stings. *Lancet* **357**, 361–362 (2001).
 83. Kucharewicz, I., Bodzenta-Lukaszyk, A., Szymanski, W., Mroczko, B. & Szmitkowski, M. Basal serum tryptase level correlates with severity of hymenoptera sting and age. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **17**, 65–9 (2007).
 84. Ruëff, F. *et al.* 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.* **124**, 1047–54 (2009).

85. Valent, P. *et al.* Diagnosis and classification of mast cell proliferative disorders: delineation from immunologic diseases and non–mast cell hematopoietic neoplasms. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**, 3–11 (2004).
86. 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* **63**, 226–32 (2008).
87. Niedoszytko, M., de Monchy, J., van Doormaal, J. J., Jassem, E. & Oude Elberink, J. N. G. Mastocytosis and insect venom allergy: diagnosis, safety and efficacy of venom immunotherapy. *Allergy* **64**, 1237–1245 (2009).
88. Ruëff, F., Placzek, M. & Przybilla, B. Mastocytosis and Hymenoptera venom allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **6**, 284–8 (2006).
89. Bonadonna, P., Zanotti, R. & Müller, U. Mastocytosis and insect venom allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **10**, 347–53 (2010).
90. Zanotti, R. *et al.* Clonal mast cell disorders in patients with severe Hymenoptera venom allergy and normal serum tryptase levels. *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 135–9 (2015).
91. Bonadonna, P. *et al.* Clonal mast cell disorders in patients with systemic reactions to Hymenoptera stings and increased serum tryptase levels. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 680–6 (2009).
92. Sonneck, K. *et al.* Diagnostic and subdiagnostic accumulation of mast cells in the bone marrow of patients with anaphylaxis: Monoclonal mast cell activation syndrome. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **142**, 158–64 (2007).
93. Akin, C. *et al.* Mast cell activation syndrome: Proposed diagnostic criteria. *J. Allergy Clin. Immunol.* **126**, 1099–104.e4 (2010).
94. Guenova, E. *et al.* Basal serum tryptase as risk assessment for severe Hymenoptera sting reactions in elderly. *Allergy* **65**, 919–23 (2010).
95. Golden, D. B. K., Kagey-Sobotka, A., Norman, P. S., Hamilton, R. G. & Lichtenstein, L. M. Outcomes of allergy to insect stings in children, with and without venom immunotherapy. *N. Engl. J. Med.* **351**, 668–74 (2004).
96. Dugas-Breit, S. *et al.* Serum concentration of baseline mast cell tryptase: evidence for a decline during long-term immunotherapy for Hymenoptera venom allergy. *Clin. Exp. Allergy* **40**, 643–9 (2010).
97. Blum, S., Gunzinger, A., Müller, U. R. & Helbling, A. Influence of total and specific IgE, serum tryptase, and age on severity of allergic reactions to Hymenoptera stings. *Allergy* **66**, 222–8 (2011).

98. Mueller, U. R. Cardiovascular disease and anaphylaxis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **7**, 337–341 (2007).
99. Stoevesandt, J. *et al.* Hymenoptera venom immunotherapy while maintaining cardiovascular medication: safe and effective. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **114**, 411–416 (2015).
100. Stoevesandt, J., Hain, J., Stolze, I., Kerstan, A. & Trautmann, A. Angiotensin-converting enzyme inhibitors do not impair the safety of Hymenoptera venom immunotherapy build-up phase. *Clin. Exp. Allergy* **44**, 747–55 (2014).
101. Niedoszytko, M. *et al.* The angiotensinogen AGT p.M235T gene polymorphism may be responsible for the development of severe anaphylactic reactions to insect venom allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **153**, 166–72 (2010).
102. Hermann, K. & Ring, J. The renin-angiotensin system in patients with repeated anaphylactic reactions during hymenoptera venom hyposensitization and sting challenge. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **112**, 251–6 (1997).
103. Chen, W., Mempel, M., Schober, W., Behrendt, H. & Ring, J. Gender difference, sex hormones, and immediate type hypersensitivity reactions. *Allergy* **63**, 1418–27 (2008).
104. Nittner-Marszalska, M., Liebhart, J. & Dor-Wojnarowska, A. Sex-related clinical aspects in insect venom anaphylaxis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **28**, 187–93 (2015).
105. Niedoszytko, M. *et al.* Gene expression analysis in predicting the effectiveness of insect venom immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, 1092–7 (2010).
106. Niedoszytko, M. *et al.* Changes in gene expression caused by insect venom immunotherapy responsible for the long-term protection of insect venom-allergic patients. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **106**, 502–510 (2011).
107. Kosnik, M., Silar, M., Bajrovic, N., Music, E. & Korosec, P. High sensitivity of basophils predicts side-effects in venom immunotherapy. *Allergy* **60**, 1401–6 (2005).
108. Peternelj, A., Silar, M., Erzen, R., Kosnik, M. & Korosec, P. Basophil sensitivity in patients not responding to venom immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **146**, 248–54 (2008).
109. Ebo, D. G. *et al.* Flow-assisted quantification of in vitro activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy. *Cytometry B. Clin. Cytom.* **72**, 196–203 (2007).
110. Kucera, P., Cvackova, M., Hulikova, K., Juzova, O. & Pachtl, J. Basophil activation can predict clinical sensitivity in patients after venom immunotherapy. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **20**, 110–6 (2010).

111. Hamilton, R. G., MacGlashan, D. W. & Saini, S. S. IgE antibody-specific activity in human allergic disease. *Immunol. Res.* **47**, 273–84 (2010).
112. Konno, S., Hizawa, N., Nishimura, M. & Huang, S. K. Osteopontin: a potential biomarker for successful bee venom immunotherapy and a potential molecule for inhibiting IgE-mediated allergic responses. *Allergol.Int.* **55**, 355–359 (2006).
113. Yavuz, S. T. *et al.* Increased osteopontin levels in children undergoing venom immunotherapy may serve as a marker of clinical efficacy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **165**, 206–13 (2014).
114. Muraro, A. *et al.* Anaphylaxis: Guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **69**, 1026–1045 (2014).
115. Krause, G. *et al.* Structure and function of claudins. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1778**, 631–645 (2008).
116. Ouban, A. & Ahmed, A. A. Claudins in human cancer: A review. *Histol. Histopathol.* **25**, 83–90 (2010).
117. Shiozaki, A. *et al.* Claudin 1 mediates tumor necrosis factor alpha-induced cell migration in human gastric cancer cells. *World J. Gastroenterol.* **20**, 17863–76 (2014).
118. Bonander, N. *et al.* Structural characterization of CD81-Claudin-1 hepatitis C virus receptor complexes. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 537–540 (2011).
119. Mailly, L. *et al.* Clearance of persistent hepatitis C virus infection in humanized mice using a claudin-1-targeting monoclonal antibody. *Nat. Biotechnol.* **33**, 549–54 (2015).
120. Cereijido, M. *et al.* New Diseases Derived or Associated with the Tight Junction. *Arch. Med. Res.* **38**, 465–478 (2007).
121. Remmer, M. H., Rastogi, N., Ranka, M. P. & Ceisler, E. J. Achromatopsia. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **26**, 333–340 (2015).
122. Bartuzi, P., Hofker, M. H. & Van de Sluis, B. Tuning NF- κ B activity: A touch of COMMD proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1832**, 2315–2321 (2013).
123. Starokadomskyy, P. *et al.* CCDC22 deficiency in humans blunts activation of proinflammatory NF- κ B signaling. *J. Clin. Invest.* **123**, 2244–2256 (2013).
124. Glaser, C., Lattka, E., Rzehak, P., Steer, C. & Koletzko, B. Genetic variation in polyunsaturated fatty acid metabolism and its potential relevance for human development and health. *Matern. Child Nutr.* **7 Suppl 2**, 27–40 (2011).
125. Jensen, H. A. R. *et al.* FADS single-nucleotide polymorphisms are associated with behavioral outcomes in children, and the effect varies between sexes and is dependent on PPAR

- genotype. *Am. J. Clin. Nutr.* **100**, 826–832 (2014).
126. Annala, M. *et al.* DOT1L-HES6 fusion drives androgen independent growth in prostate cancer. *EMBO Mol. Med.* **6**, 1121–3 (2014).
 127. Wickramasinghe, C. M. *et al.* HES6 enhances the motility of alveolar rhabdomyosarcoma cells. *Exp. Cell Res.* **319**, 103–12 (2013).
 128. Haapa-Paananen, S. *et al.* HES6 gene is selectively overexpressed in glioma and represents an important transcriptional regulator of glioma proliferation. *Oncogene* **31**, 1299–310 (2012).
 129. Hartman, J., Lam, E. W.-F., Gustafsson, J.-A. & Ström, A. Hes-6, an inhibitor of Hes-1, is regulated by 17beta-estradiol and promotes breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res.* **11**, R79 (2009).
 130. Swearingen, M. L., Sun, D., Bourner, M. & Weinstein, E. J. Detection of differentially expressed HES-6 gene in metastatic colon carcinoma by combination of suppression subtractive hybridization and cDNA library array. *Cancer Lett.* **198**, 229–39 (2003).
 131. Glubb, D. M., Joyce, P. R. & Kennedy, M. A. Expression and association analyses of promoter variants of the neurogenic gene HES6, a candidate gene for mood disorder susceptibility and antidepressant response. *Neurosci. Lett.* **460**, 185–90 (2009).
 132. Ball, A. J., Abrahamsson, A. E., Tyrberg, B., Itkin-Ansari, P. & Levine, F. HES6 reverses nuclear reprogramming of insulin-producing cells following cell fusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 331–7 (2007).
 133. Caillier, S. J. *et al.* Uncoupling the roles of HLA-DRB1 and HLA-DRB5 genes in multiple sclerosis. *J. Immunol.* **181**, 5473–80 (2008).
 134. Yu, L. *et al.* Association of Brain DNA methylation in SORL1, ABCA7, HLA-DRB5, SLC24A4, and BIN1 with pathological diagnosis of Alzheimer disease. *JAMA Neurol.* **72**, 15–24 (2015).
 135. Wu, L. *et al.* Copy number variations of HLA-DRB5 is associated with systemic lupus erythematosus risk in Chinese Han population. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **46**, 155–60 (2014).
 136. Zepeda-Gomez, S. *et al.* HLA-DR allele frequencies in Mexican mestizos with autoimmune liver diseases including overlap syndromes. *Immunol. Invest.* **38**, 276–83 (2009).
 137. Tanaka, M. *et al.* Genetic polymorphisms in the 5-hydroxytryptamine type 3B receptor gene and paroxetine-induced nausea. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **11**, 261–7 (2008).
 138. Krzywkowski, K., Davies, P. A., Feinberg-Zadek, P. L., Bräuner-Osborne, H. & Jensen, A. A. High-frequency HTR3B variant associated with major depression dramatically augments the

- signaling of the human 5-HT_{3A}B receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 722–7 (2008).
139. Hammer, C. *et al.* Replication of functional serotonin receptor type 3A and B variants in bipolar affective disorder: a European multicenter study. *Transl. Psychiatry* **2**, e103 (2012).
 140. Yang, J. & Li, M. D. Association and interaction analyses of 5-HT₃ receptor and serotonin transporter genes with alcohol, cocaine, and nicotine dependence using the SAGE data. *Hum. Genet.* **133**, 905–18 (2014).
 141. Tremblay, P.-B. *et al.* Variations in the 5-hydroxytryptamine type 3B receptor gene as predictors of the efficacy of antiemetic treatment in cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **21**, 2147–55 (2003).
 142. Kim, M.-S., Lee, J.-R., Choi, E.-M., Kim, E. H. & Choi, S. H. Association of 5-HT_{3B} Receptor Gene Polymorphisms with the Efficacy of Ondansetron for Postoperative Nausea and Vomiting. *Yonsei Med. J.* **56**, 1415–20 (2015).
 143. Lehmann, A. S. *et al.* Pharmacogenetic predictors of nausea and vomiting of pregnancy severity and response to antiemetic therapy: a pilot study. *BMC Pregnancy Childbirth* **13**, 132 (2013).
 144. Papadakis, K. A. *et al.* Krüppel-like factor KLF10 regulates transforming growth factor receptor II expression and TGF- β signaling in CD8⁺ T lymphocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **308**, C362–71 (2015).
 145. Lin, C.-H. *et al.* CDK2 phosphorylation regulates the protein stability of KLF10 by interfering with binding of the E3 ligase SIAH1. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1174–81 (2015).
 146. Ivanov, S. V *et al.* Two novel VHL targets, TGFBI (BIGH3) and its transactivator KLF10, are up-regulated in renal clear cell carcinoma and other tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **370**, 536–40 (2008).
 147. Chang, V. H. S. *et al.* Krüppel-like factor 10 expression as a prognostic indicator for pancreatic adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* **181**, 423–30 (2012).
 148. Jin, W. *et al.* TIEG1 inhibits breast cancer invasion and metastasis by inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) transcription and the EGFR signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 50–63 (2012).
 149. Døsen-Dahl, G. *et al.* Bone marrow stroma cells regulate TIEG1 expression in acute lymphoblastic leukemia cells: role of TGF β /BMP-6 and TIEG1 in chemotherapy escape. *Int. J. Cancer* **123**, 2759–66 (2008).
 150. Subramaniam, M., Hawse, J. R., Rajamannan, N. M., Ingle, J. N. & Spelsberg, T. C. Functional role of KLF10 in multiple disease processes. *Biofactors* **36**, 8–18

151. Xiong, Y. *et al.* Differential coupling of KLF10 to Sin3-HDAC and PCAF regulates the inducibility of the FOXP3 gene. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **307**, R608–20 (2014).
152. Morishita, H. & Yagi, T. Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 584–92 (2007).
153. Junghans, D., Haas, I. G. & Kemler, R. Mammalian cadherins and protocadherins: about cell death, synapses and processing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 446–452 (2005).
154. Ramírez de Arellano, A. *et al.* STAT3 activation is required for the antiapoptotic effects of prolactin in cervical cancer cells. *Cancer Cell Int.* **15**, 83 (2015).
155. Zhang, C. *et al.* A Residue Quartet in the Extracellular Domain of the Prolactin Receptor Selectively Controls Mitogen-activated Protein Kinase Signaling. *J. Biol. Chem.* **290**, 11890–904 (2015).
156. Yonezawa, T. *et al.* Anti-metastatic outcome of isoform-specific prolactin receptor targeting in breast cancer. *Cancer Lett.* **366**, 84–92 (2015).
157. Sutherland, A. *et al.* The Role of Prolactin in Bone Metastasis and Breast Cancer Cell-Mediated Osteoclast Differentiation. *J. Natl. Cancer Inst.* **108**, (2016).
158. Zhang, C. *et al.* Residue 146 regulates prolactin receptor folding, basal activity and ligand-responsiveness: Potential implications in breast tumorigenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **401**, 173–188 (2015).
159. Ascencio-Cedillo, R. *et al.* Prolactin and prolactin receptor expression in cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Pathol. Oncol. Res.* **21**, 241–6 (2015).
160. Tan, D. *et al.* Histone trimethylation of the p53 gene by expression of a constitutively active prolactin receptor in prostate cancer cells. *Chin. J. Physiol.* **56**, 282–90 (2013).
161. Gu, S. *et al.* Molecular mechanisms of regulation and action of microRNA-199a in testicular germ cell tumor and glioblastomas. *PLoS One* **8**, e83980 (2013).
162. Tan, D. *et al.* Prolactin increases survival and migration of ovarian cancer cells: importance of prolactin receptor type and therapeutic potential of S179D and G129R receptor antagonists. *Cancer Lett.* **310**, 101–8 (2011).
163. Legorreta-Haquet, M. V. *et al.* Function of Treg Cells Decreased in Patients With Systemic Lupus Erythematosus Due To the Effect of Prolactin. *Medicine (Baltimore)*. **95**, e2384 (2016).
164. Tang, C. *et al.* Prolactin increases tumor necrosis factor alpha expression in peripheral CD14 monocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Cell. Immunol.* **290**, 164–168 (2014).

165. Yu, J. *et al.* PRLR regulates hepatic insulin sensitivity in mice via STAT5. *Diabetes* **62**, 3103–13 (2013).
166. Le, T. N., Elsea, S. H., Romero, R., Chaiworapongsa, T. & Francis, G. L. Prolactin receptor gene polymorphisms are associated with gestational diabetes. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* **17**, 567–71 (2013).
167. Adijanto, J. & Philp, N. J. in *Current Topics in Membranes* **70**, 275–312 (2012).
168. Baenke, F. *et al.* Functional screening identifies MCT4 as a key regulator of breast cancer cell metabolism and survival. *J. Pathol.* **237**, 152–65 (2015).
169. Gao, H.-J. *et al.* Monocarboxylate transporter 4 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and is associated with cell proliferation and migration. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **141**, 1151–62 (2015).
170. Yan, P., Li, Y.-H., Tang, Z.-J., Shu, X. & Liu, X. High monocarboxylate transporter 4 protein expression in stromal cells predicts adverse survival in gastric cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **15**, 8923–9 (2014).
171. Guo, X. *et al.* Genetic variations in monocarboxylate transporter genes as predictors of clinical outcomes in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol.* **36**, 3931–9 (2015).
172. Tan, Z. *et al.* The monocarboxylate transporter 4 is required for glycolytic reprogramming and inflammatory response in macrophages. *J. Biol. Chem.* **290**, 46–55 (2015).
173. Samuvel, D. J., Sundararaj, K. P., Nareika, A., Lopes-Virella, M. F. & Huang, Y. Lactate boosts TLR4 signaling and NF-kappaB pathway-mediated gene transcription in macrophages via monocarboxylate transporters and MD-2 up-regulation. *J. Immunol.* **182**, 2476–84 (2009).
174. Zhang, J., Zhang, X., Guo, Y., Xu, L. & Pei, D. Sorting nexin 33 induces mammalian cell micronucleated phenotype and actin polymerization by interacting with Wiskott-Aldrich syndrome protein. *J. Biol. Chem.* **284**, 21659–69 (2009).
175. Ruscica, M. *et al.* Suppressor of Cytokine Signaling-3 (SOCS-3) Induces Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 (PCSK9) Expression in Hepatic HepG2 Cell Line. *J. Biol. Chem.* **291**, 3508–3519 (2016).
176. Yao, X. G. *et al.* Relationship between polymorphism of SOCS-3 and dyslipidemia in China Xinjiang Uygur. *Genet. Mol. Res.* **14**, 1338–46 (2015).
177. Chen, C.-H. *et al.* Suppressors of cytokine signalling in ankylosing spondylitis and their associations with disease severity, acute-phase reactants and serum cytokines. *Clin. Exp. Rheumatol.* **34**, 100–5

178. Wang, Y. *et al.* The Prognostic Role of SOCS3 and A20 in Human Cholangiocarcinoma. *PLoS One* **10**, e0141165 (2015).
179. Kim, M.-H. *et al.* Suppressor of cytokine signaling (SOCS) genes are silenced by DNA hypermethylation and histone deacetylation and regulate response to radiotherapy in cervical cancer cells. *PLoS One* **10**, e0123133 (2015).
180. Jiang, B. *et al.* SOCS3 Genetic Polymorphism Is Associated With Clinical Features and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma Patients Receiving Hepatectomy. *Medicine (Baltimore)*. **94**, e1344 (2015).
181. Wan, J., Che, Y., Kang, N. & Wu, W. SOCS3 blocks HIF-1 α expression to inhibit proliferation and angiogenesis of human small cell lung cancer by downregulating activation of Akt, but not STAT3. *Mol. Med. Rep.* **12**, 83–92 (2015).
182. Gaballah, H. H., Shafik, N. M., Wasfy, R. E. & Abou Farha, M. O. Significance of suppressor of cytokine signaling-3 expression in bladder urothelial carcinoma in relation to proinflammatory cytokines and tumor histopathological grading. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **16**, 307–14 (2015).
183. Huang, Y. *et al.* Molecular mechanism of ER stress-induced gene expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in macrophages. *FEBS J.* **282**, 2361–78 (2015).
184. Choi, E.-J., Lee, C.-H. & Shin, O. S. Suppressor of Cytokine Signaling 3 Expression Induced by Varicella-Zoster Virus Infection Results in the Modulation of Virus Replication. *Scand. J. Immunol.* **82**, 337–44 (2015).
185. Okumura, A. *et al.* Suppressor of Cytokine Signaling 3 Is an Inducible Host Factor That Regulates Virus Egress during Ebola Virus Infection. *J. Virol.* **89**, 10399–406 (2015).
186. Rottenberg, M. E. & Carow, B. SOCS3 and STAT3, major controllers of the outcome of infection with Mycobacterium tuberculosis. *Semin. Immunol.* **26**, 518–532 (2014).
187. Zafra, M. P. *et al.* SOCS3 silencing attenuates eosinophil functions in asthma patients. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 5434–51 (2015).
188. Xu, A. T. *et al.* High suppressor of cytokine signaling-3 expression impairs STAT3-dependent protective effects of interleukin-22 in ulcerative colitis in remission. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 241–50 (2015).
189. Vartoukian, S. R. *et al.* Dysregulation of the suppressor of cytokine signalling 3-signal transducer and activator of transcription-3 pathway in the aetiopathogenesis of Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* **177**, 618–29 (2014).
190. Kim, T. H. *et al.* Expression of SOCS1 and SOCS3 is altered in the nasal mucosa of patients

- with mild and moderate/severe persistent allergic rhinitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **158**, 387–96 (2012).
191. Sun, D., Wang, J., Yang, N. & Ma, H. *Matrine suppresses airway inflammation by downregulating SOCS3 expression via inhibition of NF- κ B signaling in airway epithelial cells and asthmatic mice.* *Biochemical and Biophysical Research Communications* **477**, (2016).
192. Lan, F. *et al.* Forkhead box protein 3 in human nasal polyp regulatory T cells is regulated by the protein suppressor of cytokine signaling 3. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 1314–1321.e3 (2013).
193. Teng, Y. & Li, X. The roles of HLH transcription factors in epithelial mesenchymal transition and multiple molecular mechanisms. *Clin. Exp. Metastasis* **31**, 367–77 (2014).
194. Pieni \acute{z} ek, M., Donizy, P., Zi \acute{e} tek, M., Szynglarewicz, B. & Matkowski, R. [The role of TGF- β -related signal transduction pathways in pathogenesis of epithelial-mesenchymal transition as a key element in cancer development and progression]. *Post \acute{e} py Hig. i Med. do \acute{s} wiadczalnej* **66**, 583–91 (2012).
195. Raval, A. *et al.* TWIST2 demonstrates differential methylation in immunoglobulin variable heavy chain mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **23**, 3877–85 (2005).
196. Terauchi, M. *et al.* Possible involvement of TWIST in enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *Clin. Exp. Metastasis* **24**, 329–39 (2007).
197. Galv \acute{a} n, J. A. *et al.* TWIST1 and TWIST2 promoter methylation and protein expression in tumor stroma influence the epithelial-mesenchymal transition-like tumor budding phenotype in colorectal cancer. *Oncotarget* **6**, 874–85 (2015).
198. Liu, Y. *et al.* The indicative function of Twist2 and E-cadherin in HPV oncogene-induced epithelial-mesenchymal transition of cervical cancer cells. *Oncol. Rep.* **33**, 639–50 (2015).
199. van den Bosch, M. W. M., Palsson-Mcdermott, E., Johnson, D. S. & O'Neill, L. A. J. LPS induces the degradation of programmed cell death protein 4 (PDCD4) to release Twist2, activating c-Maf transcription to promote interleukin-10 production. *J. Biol. Chem.* **289**, 22980–90 (2014).
200. Zheng, S., Hedl, M. & Abraham, C. Twist1 and Twist2 Contribute to Cytokine Downregulation following Chronic NOD2 Stimulation of Human Macrophages through the Coordinated Regulation of Transcriptional Repressors and Activators. *J. Immunol.* **195**, 217–26 (2015).
201. H \ddot{o} lzel, M. *et al.* Defects in 18 S or 28 S rRNA processing activate the p53 pathway. *J. Biol. Chem.* **285**, 6364–70 (2010).

202. Kuo, B. A., Gonzalez, I. L., Gillespie, D. A. & Sylvester, J. E. Human ribosomal RNA variants from a single individual and their expression in different tissues. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4817–24 (1996).
203. Gonzalez, I. L. & Sylvester, J. E. Human rDNA: Evolutionary Patterns within the Genes and Tandem Arrays Derived from Multiple Chromosomes. *Genomics* **73**, 255–263 (2001).
204. Eisenberg, E. *et al.* Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet.* **29**, 569–74 (2013).
205. Dhami, S. *et al.* Allergen immunotherapy for insect venom allergy : protocol for a systematic review. *Clin. Transl. Allergy* 1–6 (2016). doi:10.1186/s13601-016-0095-x
206. Ring, J. & Messmer, K. INCIDENCE AND SEVERITY OF ANAPHYLACTOID REACTIONS TO COLLOID VOLUME SUBSTITUTES. *Lancet* **309**, 466–469 (1977).
207. Jutel, M. *et al.* Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* **413**, 420–5 (2001).
208. Hockenhull, J. *et al.* A systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of Pharmedin® for the treatment of bee and wasp venom allergy. *Health Technol. Assess.* **16**, III–IV, 1–110 (2012).
209. Burgess, T. Guide to the Design of Questionnaires. *A Gen. Introd. to Des. Quest.* ... 29 (2001). at <[http://www.cavehill.uwi.edu/cermes/socmonpub/workshop_trainin_resources/recommended_reading/questionnaire design and analysis/burgess_2001_survey_design.pdf](http://www.cavehill.uwi.edu/cermes/socmonpub/workshop_trainin_resources/recommended_reading/questionnaire_design_and_analysis/burgess_2001_survey_design.pdf)>
210. van de Mortel, T. F. Faking it : social desirability response bias in self- report research report research. *Aust. J. Adv. Nurs.* **25**, 40–48 (2008).
211. Valent, P. *et al.* Definitions, criteria and global classification of mast cell disorders with special reference to mast cell activation syndromes: A consensus proposal. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **157**, 215–225 (2012).
212. Niedoszytko, M., Bonadonna, P., Oude Elberink, J. N. G. & Golden, D. B. K. Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Hymenoptera Venom Allergy in Mastocytosis Patients. *Immunol. Allergy Clin. NA* **34**, 365–381 (2014).
213. M, N.-M. *et al.* Safety of Ultrarush Venom Immunotherapy: Comparison Between Children and Adults. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **26**, 20–47 (2016).
214. Marone, G., Genovese, A., Varricchi, G. & Granata, F. Human heart as a shock organ in anaphylaxis. *Allergo J. Int.* **23**, 60–66
215. Hepner, M. J. *et al.* Risk of systemic reactions in patients taking beta-blocker drugs receiving

- allergen immunotherapy injections. *J. Allergy Clin. Immunol.* **86**, 407–11 (1990).
216. Stumpf, J. L., Shehab, N. & Patel, A. C. Safety of Angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with insect venom allergies. *Ann. Pharmacother.* **40**, 699–703 (2006).
217. White, K. M. *et al.* Safety of angiotensin-converting enzyme inhibitors while receiving venom immunotherapy. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **101**, 426–430 (2008).
218. Pitsios, C. *et al.* Clinical contraindications to allergen immunotherapy: an EAACI position paper. *Allergy* **70**, 897–909 (2015).
219. Lockey, R. F. *et al.* The Hymenoptera venom study. III: Safety of venom immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **86**, 775–80 (1990).
220. MULLER, U. *et al.* Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety. *J. Allergy Clin. Immunol.* **89**, 529–535 (1992).
221. Koro??ec, P. *et al.* Immunological and clinical factors associated with adverse systemic reactions during the build-up phase of honeybee venom immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy* **45**, 1579–1589 (2015).
222. Walker, S. M. *et al.* Immunotherapy for allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy* **41**, 1177–1200 (2011).
223. Alvarez-Cuesta, E. & Beristain, A. Practical management of immunotherapy. [/data/revues/18770320/v0043i05/03001941/](#)
224. Schiappoli, M. *et al.* A prospective Italian survey on the safety of subcutaneous immunotherapy for respiratory allergy. *Clin. Exp. Allergy* **39**, 1569–74 (2009).
225. Degirmenci, P. B. *et al.* Allergic rhinitis and its relationship with autoimmune thyroid diseases. *Am. J. Rhinol. Allergy* **29**, 257–61
226. Przybylik-Mazurek, E., Kotlinowska, B., Kasztelnik, M., Stefańska, A. & Huszno, B. [Autoimmunological and allergic disorders with Hashimoto and Graves disease]. *Przegląd Lek.* **63**, 719–22 (2006).
227. Stone, S. F. & Brown, S. G. A. Mediators Released During Human Anaphylaxis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **12**, 33–41 (2012).
228. Williams, C. M. & Galli, S. J. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 847–859 (2000).
229. Sherman, B. T. *et al.* DAVID Knowledgebase: a gene-centered database integrating heterogeneous gene annotation resources to facilitate high-throughput gene functional analysis. *BMC Bioinformatics* **8**, 426 (2007).

230. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2009).
231. Carmona-Saez, P., Chagoyen, M., Tirado, F., Carazo, J. M. & Pascual-Montano, A. GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* **8**, R3 (2007).
232. Nogales-Cadenas, R. *et al.* GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res.* **37**, W317–22 (2009).
233. Tabas-Madrid, D., Nogales-Cadenas, R. & Pascual-Montano, A. GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res.* **40**, W478–83 (2012).
234. Tipney, H. *et al.* An introduction to effective use of enrichment analysis software. *Hum. Genomics* **4**, 202 (2010).
235. Stone, S. F. *et al.* Genomic responses during acute human anaphylaxis are characterized by upregulation of innate inflammatory gene networks. *PLoS One* **9**, e101409 (2014).
236. Kritas, S. K. *et al.* Relationship between serotonin and mast cells: inhibitory effect of anti-serotonin. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **28**, 377–80
237. Kushnir-Sukhov, N. M., Brittain, E., Scott, L. & Metcalfe, D. D. Clinical correlates of blood serotonin levels in patients with mastocytosis. *Eur. J. Clin. Invest.* **38**, 953–8 (2008).
238. LI, L., ZHANG, X.-H., LIU, G.-R., LIU, C. & DONG, Y.-M. Isoquercitrin suppresses the expression of histamine and pro-inflammatory cytokines by inhibiting the activation of MAP Kinases and NF- κ B in human KU812 cells. *Chin. J. Nat. Med.* **14**, 407–412 (2016).
239. He, X., Pan, W., Yao, Y. & Zhang, H. Recent highlights of Chinese herbs in treatment of allergic disease: Acting via mitogen-activated protein kinase signal pathway. *Chin. J. Integr. Med.* 1–4 (2016). doi:10.1007/s11655-016-2526-x
240. Garaud, S. *et al.* CD5 expression promotes IL-10 production through activation of the MAPK/Erk pathway and upregulation of TRPC1 channels in B lymphocytes. *Cell. Mol. Immunol.* (2016). doi:10.1038/cmi.2016.42
241. Wu, M. *et al.* TGF- β 1 contributes to CD8⁺ Treg induction through p38 MAPK signaling in ovarian cancer microenvironment. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.10003
242. Bao, L., Zhang, H. & Chan, L. S. The involvement of the JAK-STAT signaling pathway in chronic inflammatory skin disease atopic dermatitis. *JAK-STAT* **2**, e24137 (2013).
243. Mogensen, T. H. STAT3 and the Hyper-IgE syndrome: Clinical presentation, genetic origin,

- pathogenesis, novel findings and remaining uncertainties. *JAK-STAT* **2**, e23435 (2013).
244. Wang, W.-B., Levy, D. E. & Lee, C.-K. STAT3 negatively regulates type I IFN-mediated antiviral response. *J. Immunol.* **187**, 2578–85 (2011).
245. Yin, Y., Liu, W. & Dai, Y. SOCS3 and its role in associated diseases. *Hum. Immunol.* **76**, 775–80 (2015).
246. Baetz, A., Frey, M., Heeg, K. & Dalpke, A. H. Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins Indirectly Regulate Toll-like Receptor Signaling in Innate Immune Cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 54708–54715 (2004).
247. Chaves De Souza, J. A. *et al.* SOCS3 expression correlates with severity of inflammation, expression of proinflammatory cytokines, and activation of STAT3 and p38 MAPK in LPS-induced inflammation in vivo. *Mediators Inflamm.* **2013**, (2013).
248. Daegelmann, C. *et al.* Association between suppressors of cytokine signalling, T-helper type 1/T-helper type 2 balance and allergic sensitization in children. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 438–48 (2008).
249. Franco, H. L., Casasnovas, J., Rodríguez-Medina, J. R. & Cadilla, C. L. Redundant or separate entities?—roles of Twist1 and Twist2 as molecular switches during gene transcription. *Nucleic Acids Res.* **39**, 1177–86 (2011).
250. Guéant, J.-L. *et al.* HLA-DRA variants predict penicillin allergy in genome-wide fine-mapping genotyping. *J. Allergy Clin. Immunol.* **135**, 253–9 (2015).
251. Kim, J.-H. *et al.* HLA-DRA polymorphisms associated with risk of nasal polyposis in asthmatic patients. *Am. J. Rhinol. Allergy* **26**, 12–7
252. Siebenhaar, F. *et al.* Mast cell-driven skin inflammation is impaired in the absence of sensory nerves. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 955–961 (2008).
253. Burstein, E. *et al.* COMMD Proteins, a Novel Family of Structural and Functional Homologs of MURR1. *J. Biol. Chem.* **280**, 22222–22232 (2005).
254. McDonald, F. J. *et al.* COMMD1 and ion transport proteins: what is the COMMection? Focus on "COMMD1 interacts with the COOH terminus of NKCC1 in Calu-3 airway epithelial cells to modulate NKCC1 ubiquitination". *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **305**, C129–30 (2013).
255. Chang, T., Ke, Y., Ly, K. & McDonald, F. J. COMMD1 regulates the delta epithelial sodium channel (δ ENaC) through trafficking and ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **411**, 506–11 (2011).

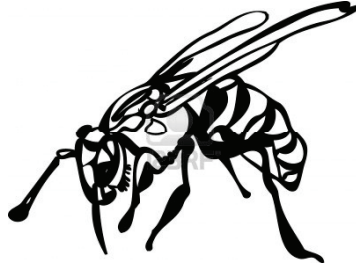
256. van de Sluis, B. *et al.* Increased activity of hypoxia-inducible factor 1 is associated with early embryonic lethality in *Commd1* null mice. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 4142–56 (2007).
257. Maine, G. N. *et al.* COMMD1 expression is controlled by critical residues that determine XIAP binding. *Biochem. J.* **417**, 601–9 (2009).
258. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344–62 (2008).
259. Bartuzi, P., Hofker, M. H. & van de Sluis, B. Tuning NF-kB activity: A touch of COMMD proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1832**, 2315–2321 (2013).
260. Tak, P. P. & Firestein, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* **107**, 7–11 (2001).
261. La Grutta, S. *et al.* Clinical and biological heterogeneity in children with moderate asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**, 1490–5 (2003).
262. Martin, E., O'Sullivan, B., Low, P. & Thomas, R. Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity* **18**, 155–67 (2003).
263. Taher, Y. a., van Esch, B. C. a. M., Hofman, G. a., Henricks, P. a. J. & van Oosterhout, a. J. M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Potentiates the Beneficial Effects of Allergen Immunotherapy in a Mouse Model of Allergic Asthma: Role for IL-10 and TGF- β . *J. Immunol.* **180**, 5211–5221 (2008).
264. Yoo, S. & Ha, S.-J. Generation of Tolerogenic Dendritic Cells and Their Therapeutic Applications. *Immune Netw.* **16**, 52–60 (2016).
265. Grohmann, U. *et al.* IL-12 Acts Directly on DC to Promote Nuclear Localization of NF-kB and Primes DC for IL-12 Production. *Immunity* **9**, 315–323 (1998).
266. Gerondakis, S., Fulford, T. S., Messina, N. L. & Grumont, R. J. NF-kB control of T cell development. *Nat. Immunol.* **15**, 15–25 (2014).
267. Lu, Y. *et al.* miR-146b antagomir treated human Tregs increase TRAF6-NFkB expression, suppressor function and GVHD inhibitory potency. *Blood* blood–2016–05–714535 (2016). doi:10.1182/blood-2016-05-714535
268. Park, J.-H., Jeong, S.-Y., Choi, A.-J. & Kim, S.-J. Lipopolysaccharide directly stimulates Th17 differentiation in vitro modulating phosphorylation of RelB and NF-kB1. *Immunol. Lett.* **165**, 10–9 (2015).
269. Chang, J. *et al.* MyD88 is essential to sustain mTOR activation necessary to promote T helper

- 17 cell proliferation by linking IL-1 and IL-23 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 2270–5 (2013).
270. Li, G., Liu, Z., Zhong, N., Liao, B. & Xiong, Y. Therapeutic effects of DNA vaccine on allergen-induced allergic airway inflammation in mouse model. *Cell Mol Immunol* **3**, 379–384 (2006).
271. Tsai, Y.-G., Chiou, Y.-L., Chien, J.-W., Wu, H.-P. & Lin, C.-Y. Induction of IL-10+ CD4+ CD25+ regulatory T cells with decreased NF- κ B expression during immunotherapy. *Pediatr. Allergy Immunol.* **21**, e166–73 (2010).
272. Ventura, I. *et al.* Allergen immunotherapy decreases LPS-induced NF- κ B activation in neutrophils from allergic patients. *Pediatr. Allergy Immunol.* **25**, 129–35 (2014).
273. Joanna, M. Ocena czynników ryzyka występowania reakcji alergicznych po użądleniu przez pszczołę u pszczelarzy i ich rodzin. (2012). at <http://www.wbc.poznan.pl/dlibra/docmetadata?id=252411&from=publication>
274. Images Pictures: Birds Mammals Reptiles Plants | NaturePhoto. at <http://www.naturephoto-cz.com/>
275. Mueller, H. L. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *J. Asthma Res.* **3**, 331–3 (1966).

11. Suplement

11.1 Ankieta

Kwestionariusz dotyczący alergii na jady owadów



Imię i nazwisko:

Adres:

województwo:

Data urodzenia:

Zawód wykonywany:

Czy przebywa Pani (Pan) w potencjalnym narażeniu na ukąszenie przez owady błonkoskrzydłe? (np. hodowla pszczoł (pasieka), cukiernia, straż pożarna, służby oczyszczania miasta itp.)

- Nie
- Tak, często mam kontakt z owadami. Jakimi?
- W jakich okolicznościach?

Czy można się z Panią(Panem) skontaktować telefonicznie/ miałowo w razie ewentualnych pytań?

- Nie
- Tak

Numer telefonu do domu:

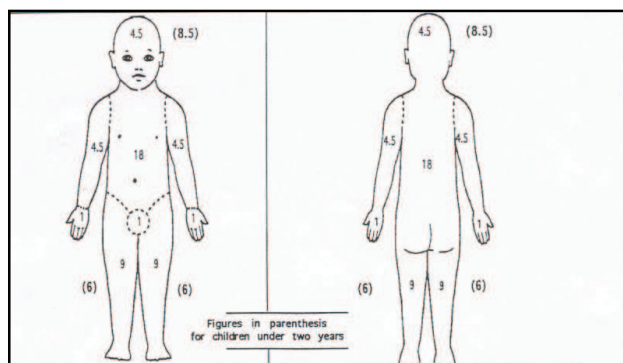
Numer telefonu komórkowego:

E-mail:

Zgodnie z ustawą z dn. 29.08.97 r. o Ochronie danych Osobowych (jedn. Dz. Ust. 2002 r. nr 101 poz. 926), wyrażam zgodę na przetwarzanie moich danych osobowych dla potrzeb niezbędnych do realizacji badania naukowego.

Data i podpis Chorego.....

1. Czy pamięta Pani (Pan) **pierwsze** użądlenie przez owada? :
- 1a. Kiedy i gdzie była Pani (Pan) użądłona(y)? (proszę podać rok i miejsce np.: las, łąka, miasto)
- 1b. Jaki owad użądlił Panią (Pana)?
- 1c. Czy może Pani (Pan) zaznaczyć, miejsce na ciele w które była Pani (Pan) użądłona (y)?



1d. Jakie objawy miała Pani (Pan) po użądleniu?

| Objaw | TAK | NIE | Po jakim czasie od użądlenia? (min) |
|--|-----|-----|-------------------------------------|
| Silny ból w miejscu użądlenia | | | |
| Silny obrzęk w miejscu użądlenia* większy niż 10 cm | | | |
| Świąd ciała** | | | |
| Wysypka na ciele | | | |
| Wilgotna/spocona skóra | | | |
| Zawroty głowy | | | |
| Nudności/wymioty | | | |
| Ból brzucha/biegunka | | | |
| Obrzęk w innym miejscu niż miejsce użądlenia | | | |
| Uczucie ucisku/bólu w piersiach | | | |
| Uczucie kołatania/szybkiego bicia serca | | | |
| Zaburzenia połykania | | | |
| Chrypka | | | |
| Duszność | | | |
| Świsty przy oddychaniu | | | |
| Uczucie zimna/gorąca | | | |
| Lęk/niepokój | | | |
| Drętwienie/bezwład kończyn | | | |
| Omdlenie | | | |
| Utrata świadomości | | | |
| Bezwiedne oddanie moczu/stolca | | | |

*Jeżeli tak, czy może Pani/Pan zaznaczyć na **czzerwono** na rysunku powyżej obrzeknięte miejsca

Jeżeli tak, czy może Pani/Pan zaznaczyć na **niebiesko na rysunku powyżej swędzące miejsca

1e. Czy po użądleniu zastosowała (zastosował) Pani (Pan) lub inna osoba ampulkostrzykawkę z adrenaliną (Epipen, Adrenalina, Anapen, Fastject)?

Nie Tak: W jaki czas po użądleniu ? minut / godzin

1f. Czy pomocy udzielał lekarz POZ? tak / nie Czy wezwano pogotowie? tak / nie
Czy skierowano Panią (Pana) do szpitala? tak / nie

Jeżeli tak, to jak długo była (był) Pani (Pan) hospitalizowana (y)?godziny/dni

1g. Czy po użądleniu zastosowała (zastosował) Pani (Pan) również inne leki?

Nie Tak Jakie?.....w czasie minut/godzin

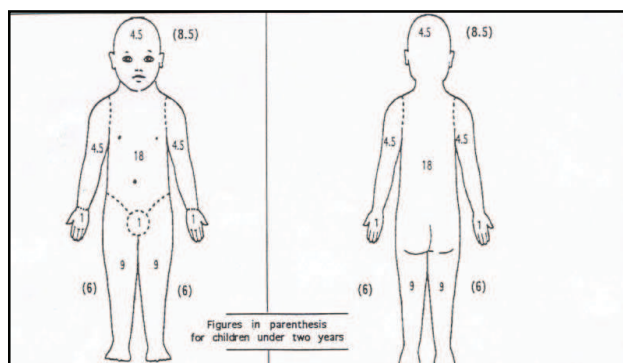
1h. Czy w czasie użądlenia wiedziała (wiedział) Pani (Pan) o rozpoznaniu choroby układu krążenia i/lub choroby tarczycy?

Nie

Tak, ale nie przyjmowałam (-em) w tym czasie żadnych leków

Tak i była (byłem) leczony lekami:

2. Czy pamięta Pani (Pan) **drugie** użądlenie przez owada? :
- 2a. Kiedy i gdzie była Pani (Pan) użądłona(y)? (proszę podać rok i miejsce np.: las, łąka, miasto)
-
- 2b. Jaki owad użądlił Panią (Pana)?
- 2c. Czy może Pani (Pan) zaznaczyć, miejsce na ciele w które była Pani (Pan) użądłona (y)?



2d. **Jakie objawy miała Pani (Pan) po użądleniu?**

| Objaw | TAK | NIE | Po jakim czasie od użądlenia? (min) |
|--|-----|-----|-------------------------------------|
| Silny ból w miejscu użądlenia | | | |
| Silny obrzęk w miejscu użądlenia* | | | |
| większy niż 10 cm | | | |
| Świąd ciała** | | | |
| Wysypka na ciele | | | |
| Wilgotna/spocona skóra | | | |
| Zawroty głowy | | | |
| Nudności/wymioty | | | |
| Ból brzucha/biegunka | | | |
| Obrzęk w innym miejscu niż miejsce użądlenia | | | |
| Uczucie ucisku/bólu w piersiach | | | |
| Uczucie kołatania/szybkiego bicia serca | | | |
| Zaburzenia połykania | | | |
| Chrypka | | | |
| Duszność | | | |
| Świsty przy oddychaniu | | | |
| Uczucie zimna/gorąca | | | |
| Lęk/ niepokój | | | |
| Drętwienie/bezwład kończyn | | | |
| Omdlenie | | | |
| Utrata świadomości | | | |
| Bezwiedne oddanie moczu/stolca | | | |

*Jeżeli tak, czy może Pani/Pan zaznaczyć na **czzerwono** na rysunku powyżej obrzeknięte miejsca

Jeżeli tak, czy może Pani/Pan zaznaczyć na **niebiesko na rysunku powyżej swędzące miejsca

2e. Czy po użądleniu zastosowała (zastosował) Pani (Pan) lub inna osoba ampulkostrzykawkę z adrenaliną (Epipen, Adrenalina, Anapen, Fastject)?

Nie Tak: W jaki czas po użądleniu? minut / godzin

2f. Czy pomocy udzielał lekarz POZ? tak / nie Czy wezwano pogotowie? tak / nie

Czy skierowano Panią (Pana) do szpitala? tak / nie

Jeżeli tak, to jak długo była (był) Pani (Pan) hospitalizowana (y)?godziny/dni

2g. Czy po użądleniu zastosowała (zastosował) Pani (Pan) również inne leki?

Nie Tak Jakie?.....w czasie minut/godzin

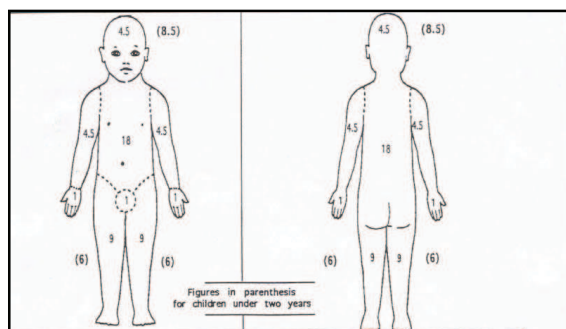
2h. Czy w czasie użądlenia wiedziała (wiedział) Pani (Pan) o rozpoznaniu choroby układu krążenia i/lub choroby tarczycy?

Nie

Tak, ale nie przyjmowałam (-em) w tym czasie żadnych leków

Tak i byłam (byłem) leczony lekami:

3. Czy pamięta Pani (Pan) **trzęcie** użądlenie przez owada? :
- 3a. Kiedy i gdzie była Pani (Pan) użądłona(y)? (proszę podać rok i miejsce np.: las, łąka, miasto)
-
- 3b. Jaki owad użądlił Panią (Pana)?
- 3c. Czy może Pani (Pan) zaznaczyć, miejsce na ciele w które była Pani (Pan) użądłona (y)?



3d. Jakie objawy miała Pani (Pan) po użądleniu?

| Objaw | TAK | NIE | Po jakim czasie od użądlenia? (min) |
|--|-----|-----|-------------------------------------|
| Silny ból w miejscu użądlenia | | | |
| Silny obrzęk w miejscu użądlenia* większy niż 10 cm | | | |
| Świąd ciała** | | | |
| Wysypka na ciele | | | |
| Wilgotna/spocona skóra | | | |
| Zawroty głowy | | | |
| Nudności/wymioty | | | |
| Ból brzucha/biegunka | | | |
| Obrzęk w innym miejscu niż miejsce użądlenia | | | |
| Uczucie ucisku/bólu w piersiach | | | |
| Uczucie kołatania/szybkiego bicia serca | | | |
| Zaburzenia połykania | | | |
| Chrypka | | | |
| Duszność | | | |
| Świsty przy oddychaniu | | | |
| Uczucie zimna/gorąca | | | |
| Lęk/niepokój | | | |
| Drętwienie/bezwład kończyn | | | |
| Omdlenie | | | |
| Utrata świadomości | | | |
| Bezwiedne oddanie moczu/stolca | | | |

*Jeżeli tak, czy może Pani/Pan zaznaczyć na **czerwono** na rysunku powyżej obrzęknięte miejsca

*Jeżeli tak, czy może Pani/Pan zaznaczyć na **niebiesko** na rysunku powyżej swędzące miejsca

3e. Czy po użądleniu zastosowała (zastosował) Pani (Pan) lub inna osoba ampulkostrzykawkę z adrenaliną (Epipen, Adrenalina, Anapen, Fastject)?

Nie Tak: W jaki czas po użądleniu? minut / godzin

3f. Czy pomocy udzielał lekarz POZ? tak / nie Czy wezwano pogotowie? tak / nie

Czy skierowano Panią (Pana) do szpitala? tak / nie

Jeżeli tak, to jak długo była (był) Pani (Pan) hospitalizowana (y)?godziny/dni

3g. Czy po użądleniu zastosowała (zastosował) Pani (Pan) również inne leki?

Nie Tak Jakie?.....w czasie minut/godzin

3h. Czy w czasie użądlenia wiedziała (wiedział) Pani (Pan) o rozpoznaniu choroby układu krążenia i/lub choroby tarczycy?

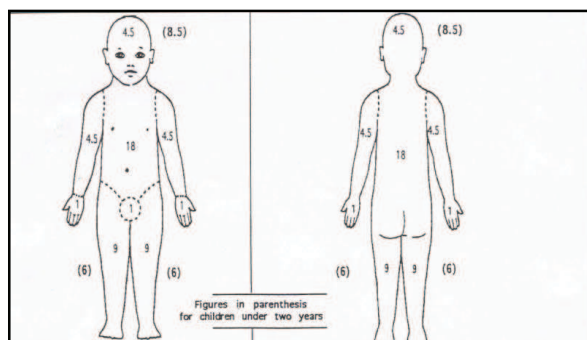
Nie

Tak, ale nie przyjmowałam (-em) w tym czasie żadnych leków

Tak i byłam (byłem) leczony lekami:

4. Czy pamięta Pani (Pan) **czwarte** użądlenie przez owada? :
 4a. Kiedy i gdzie była Pani (Pan) użądłona(y)? (proszę podać rok i miejsce np.: las, łąka, miasto)

 4b. Jaki owad użądlił Panią (Pana)?
 4c. Czy może Pani (Pan) zaznaczyć, miejsce na ciele w które była Pani (Pan) użądłona (y)?



4d. **Jakie objawy miała Pani (Pan) po użądleniu?**

| Objaw | TAK | NIE | Po jakim czasie od użądlenia? (min) |
|--|-----|-----|-------------------------------------|
| Silny ból w miejscu użądlenia | | | |
| Silny obrzęk w miejscu użądlenia* większy niż 10 cm | | | |
| Świąd ciała** | | | |
| Wysypka na ciele | | | |
| Wilgotna/spocona skóra | | | |
| Zawroty głowy | | | |
| Nudności/wymioty | | | |
| Ból brzucha/biegunka | | | |
| Obrzęk w innym miejscu niż miejsce użądlenia | | | |
| Uczucie ucisku/bólu w piersiach | | | |
| Uczucie kołatania/szybkiego bicia serca | | | |
| Zaburzenia połykania | | | |
| Chrypka | | | |
| Duszność | | | |
| Świsty przy oddychaniu | | | |
| Uczucie zimna/gorąca | | | |
| Lęk/ niepokój | | | |
| Drętwienie/bezwład kończyn | | | |
| Omdlenie | | | |
| Utrata świadomości | | | |
| Bezwiedne oddanie moczu/stolca | | | |

*Jeżeli tak, czy może Pani/Pan zaznaczyć na **czzerwono** na rysunku powyżej obrzeknięte miejsca

Jeżeli tak, czy może Pani/Pan zaznaczyć na **niebiesko na rysunku powyżej swędzące miejsca

4e. Czy po użądleniu zastosowała (zastosował) Pani (Pan) lub inna osoba ampulkostrzykawkę z adrenaliną (Epipen, Adrenalina, Anapen, Fastject)?

Nie Tak: W jaki czas po użądleniu? minut / godzin

4f. Czy pomocy udzielał lekarz POZ? tak / nie Czy wezwano pogotowie? tak / nie
 Czy skierowano Panią (Pana) do szpitala? tak / nie

Jeżeli tak, to jak długo była (był) Pani (Pan) hospitalizowana (y)?godziny/dni

4g. Czy po użądleniu zastosowała (zastosował) Pani (Pan) również inne leki?

Nie Tak Jakie?.....w czasie minut/godzin

4h. Czy w czasie użądlenia wiedziała (wiedział) Pani (Pan) o rozpoznaniu choroby układu krążenia i/lub choroby tarczycy?

Nie

Tak, ale nie przyjmowałam (-em) w tym czasie żadnych leków

Tak i byłam (byłem) leczony lekami:

Pytania ogólne

5. Na jad, którego owada stwierdzono u Pani (Pana) alergię?

- Pszczoła
- Osa
- Szerszeń

6. Czy jest/była (był) Pani (Pan) odczulany na jad owadów ?

- Nie
- Tak

Jeżeli tak, kiedy rozpoczęto leczenie? (proszę podać rok)

Jeżeli tak to jakim jadem?

- Pszczoły
- Osy

7. Jeżeli tak, czy występowały objawy uboczne po leczeniu?

- Nie
- Tak

Jeżeli tak - jakie?

8. Czy leczenie zostało przerwane/zakończone?

- Nie
- Tak

Jeżeli tak, to jaki był powód zaprzestania leczenia?.....

Kiedy zakończono leczenie?.....

9. Czy może Pani (Pan) wskazać, które z użądleń było w czasie immunoterapii:

- 0 nie byłam (byłem) odczulana (y)
- 0 1 użądlenie: przed / w trakcie / po leczeniu
- 0 2 użądlenie: przed / w trakcie / po leczeniu
- 0 3 użądlenie: przed / w trakcie / po leczeniu
- 0 4 użądlenie: przed / w trakcie / po leczeniu

10. Czy choruje Pani (Pan) na choroby układu krążenia? (proszę zaznaczyć wszystkie właściwe)

- 0 Nadciśnienie tętnicze
- 0 Choroba wieńcowa
- 0 Niewydolność serca

0 Inne. Jakież?.....

.....

11. Czy choruje Pani (Pan) na chorobę tarczycy? (proszę zaznaczyć wszystkie właściwe)

- 0 Niedoczynność tarczycy
 autoimmunologiczna (Hashimoto)
 Inne. Jakiej?.....
- 0 Nadczynność tarczycy
 autoimmunologiczna (Graves-Basedowa)
 Inne. Jakiej?.....
- 0 Inne choroby tarczycy. Jakiej?.....
- 0 Nie wiem jaki charakter ma moja choroba tarczycy.

Jakie leki przyjmuje Pani (Pan) w leczeniu choroby krążenia/choroby tarczycy:

.....
.....
.....
.....

12. Czy choruje/chorowała Pani (Pan) na inne choroby atopowe/alergiczne? (proszę zaznaczyć wszystkie właściwe)

- 0 Astma
0 Alergiczny nieżyt nosa i spojówek
0 Atopowe zapalenie skóry
0 Pokrzywka
0 Alergia na leki
0 Inne. Jakiej?.....

13. Na jakie inne alergeny (poza jadem owadów) stwierdzono u Pani (Pana) alergię?

.....
.....

14. Czy choruje/chorowała (chorował) Pani (Pan) na choroby nowotworowe?

- 0 Nie, nie chorowałam (chorowałem)
- 0 Tak, choruje/chorowałam (chorowałem). Na jaki rodzaj nowotworu?.....

15. Czy choruje/chorowała (chorował) Pani (Pan) na choroby autoimmunizacyjne? Takie jak: reumatoidalne zapalenie stawów, zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa, toczeń układowy, twardzina, zespół Sjögrena, sarkoidoza, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, choroba Crohna, miastenia, stwardnienie rozsiane, łuszczyca itp.??*

- 0 Nie, nie chorowałam (chorowałem)
- 0 Tak, choruje/chorowałam (chorowałem). Na jaką chorobę?.....

*UWAGA! Nie dotyczy to choroby zwyrodnieniowej stawów potocznie zwanej "reumatyzmem".