

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Marek Niedożytko

**Wykorzystanie badania ekspresji genów metodą
mikromacierzy RNA w ocenie efektywności immunoterapii
swoistej jadem owadów, rozpoznaniu mastocytozy i ocenie
zagrożenia alergią na jady owadów u chorych na mastocytozę**

Klinika Alergologii Katedry Pneumonologii i Alergologii

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: prof. dr hab. med. Ewa Jassem

Gdańsk 2011

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Wydawca: Gdański Uniwersytet Medyczny
Druk: Dział Wydawnictw GUMed
Gdańsk, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a
Zlecenie KW/42/11

Marcie, Józiowi, Rodzicom i Rodzeństwu

SPIS TREŚCI

WYKAZ PRAC BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY	7
WYKAZ SKRÓTÓW	9
1. WSTĘP	11
1.1. Epidemiologia, rozpoznanie i leczenie alergii na jady owadów	11
1.1.1. Epidemiologia i patofizjologia alergii na jady owadów	11
1.1.2. Rola szlaku renina angiotensyna aldosteron	13
1.1.3. Leczenie alergii na jad owadów błonkoskrzydłych	14
1.1.4. Ocena efektywności immunoterapii jadem owadów błonkoskrzydłych	16
1.2. Epidemiologia, rozpoznanie i leczenie mastocytozy	17
1.2.1. Immunoterapia swoista w alergii na jady owadów u chorych na mastocytozę	19
1.3. Farmakogenetyka w medycynie i alergologii	20
2. CELE PRACY	21
3. MATERIAŁ I METODY	22
3.1. Badanie roli polimorfizmu AGT M235T w alergii na jady owadów	22
3.2. Ocena skuteczności immunoterapii jadem owadów błonkoskrzydłych za pomocą profilu ekspresji genów	23
3.3. Bezpieczeństwo i skuteczność immunoterapii jadem owadów w mastocytozie	24
3.4. Ocena ryzyka alergii na jady owadów u chorych na mastocytozę za pomocą profilu ekspresji genów	24
3.5. Profil ekspresji genów i system regulacji transkrypcji genów w mastocytozie układowej	25
3.6. Analiza ekspresji całego genomu za pomocą mikromacierzy RNA	25
3.7. Analiza statystyczna wyników mikromacierzy RNA	26
4. OMÓWIENIE WYNIKÓW	28

4.1. Rola polimorfizmu angiotensynogenu AGT M235T w alergii na jady owadów.....	28
4.2. Ocena skuteczności immunoterapii jadem owadów błonkoskrzydłych za pomocą profilu ekspresji genów	29
4.3. Bezpieczeństwo i skuteczność immunoterapii jadem owadów w mastocytozie	30
4.4. Ocena ryzyka alergii na jady owadów u chorych na mastocytozę za pomocą profilu ekspresji genów	32
4.5. Profil ekspresji genów i system regulacji transkrypcji genów w mastocytozie układowej	33
5. WNIOSKI.....	34
6. PIŚMIENNICTWO	35
PRACE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM ROZPRAWY.....	45

WYKAZ PRAC BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY

1. Niedoszytko M. **Mastocytoza - rozrostowa choroba komórek tucznych związana z ryzykiem reakcji anafilaktycznej**. Pol. Merk. Lek. 2006;21,126:570-572. **MEiN 5**
2. Niedoszytko M., Ratajska M., Chełmińska M., Makowiecki M., Malek E., Siemińska A., Limon J., Jassem E.: **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.2010;153:166-172.**IF 2,542**
3. Niedoszytko M., Bruinenberg M., de Monchy J., Wijmenga C., Platteel M., Jassem E., Oude Elberink J.N.G.: **Gene expression analysis in predicting the effectiveness of insect venom immunotherapy**. J. Allergy Clin. Immunol. 2010;125,5:1092-1097. **IF 9,165**
4. Niedoszytko M., de Monchy J., van Doormaal J., Jassem E., Oude Elberink J.N.G.: **Mastocytosis and insect venom allergy : diagnosis, safety and efficacy of venom immunotherapy**. Allergy 2009;64:1237-1245.**IF 6,38**
5. Niedoszytko M., Bruinenberg M., van Doormaal J., de Monchy J., Nedoszytko B., Koppelman G., Nawijn M., Wijmenga C., Jassem E. , Oude Elberink J. **Gene expression analysis predicts insect venom anaphylaxis in indolent systemic mastocytosis**. Allergy 2011 doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02521.x. **IF 6,38**
6. Niedoszytko M., Oude Elberink J.N.G., Bruinenberg M., Nedoszytko B., de Monchy J., te Meerman G., Weersma R.K., Mulder A., Jassem E., van Doormaal J.J. MD PHD. **Gene expression profile, pathways and transcriptional system regulation in indolent systemic mastocytosis**. Allergy 2011;66,2:229-237. **IF 6,38**

(Łączny IF 30,847)

Finansowanie

Grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego 2008-2010

Numery: N402085934 i N40201031

Stypendium Kolumb Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej

WYKAZ SKRÓTÓW

ACE – *angiotensin converting enzyme* / enzym konwertaza angiotensyny

AGT – *angiotensinogen* / angiotensynogen

GRADE – *Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation* / system oceny jakości danych i klasyfikacji siły zaleceń

GO – *gene ontology* / baza funkcji genów

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

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

sIgE – *specific immunoglobuline E* / swoista immunoglobulina E

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

MAPK – *mitogen activated protein kinase* / kinaza aktywowana mitogenami

NB – *Naïve Bayes prediction model* / model predykcyjny *Naïve Bayes*

PCR - *polymerase chain reaction* / reakcja łańcuchowej polimerazy

RAS – *renin angiotensin system* / układ renina angiotensyna aldosteron

SPT - *skin prick test* / punktowe testy skórne

TSR – *Transcriptional System Regulators* / regulatory systemu transkrypcji

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

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

Wnt – *wingless int pathway* / szlak sygnałowy wnt

1. WSTĘP

1.1. Epidemiologia, rozpoznanie i leczenie alergii na jady owadów

1.1.1. Epidemiologia i patofizjologia alergii na jady owadów

Alergia na jady owadów, definiowana jako wystąpienie przynajmniej jednej reakcji układowej w ciągu życia po użądleniu przez owada, występuje u 1 do 3% populacji [16]. Do grup ryzyka reakcji układowej po użądleniu należą pszczelarze (reakcja układowa po użądleniu występuje u 13 do 43% z nich) [6,28] oraz chorzy na mastocytozę (wstrząs anafilaktyczny, często o ciężkim przebiegu, dotyka 30% chorych, w tym 50% chorych na mastocytozę układową) [12, 29,72,75]. Obecność swoistych IgE na jady owadów w teście skórnym lub w badaniu sIgE stwierdza się u 20% osób w populacji ogólnej [32,34]. Odczyny miejscowe po użądleniu (nawet o dużym nasileniu) występują u 26% osób. Nie stanowią one zagrożenia życia i nie są wskazaniem do leczenia [32,34]. Do gatunków owadów najczęściej wywołujących reakcje anafilaktyczne w Polsce należą osy, pszczoły, szerszenie (jad wykazuje reaktywność krzyżową z jadem osy) i trzmiele (jad wykazuje reaktywność krzyżową z jadem pszczoły) [93]. W większości krajów europejskich opisywana jest większa częstość alergii na jad osy w regionach nadmorskich, natomiast częstość alergii na jad pszczoły wzrasta wraz z wysokością nad poziomem morza. W obszarze śródziemnomorskim Europy występują częste reakcje anafilaktyczne po użądleniu przez kłecanki. Doniesienia z Niemiec wskazują na pojawienie się tych owadów w południowej części kraju oraz przy granicy z Francją. Prawdopodobnie jest to związane z ocieplaniem się klimatu. Podobna sytuacja epidemiologiczna występuje w USA [63]. Natomiast w krajach tropikalnych opisywane są reakcje na wiele gatunków owadów, wśród których jedynie alergia na mrówki w Australii może być leczona za pomocą VIT [6].

Mechanizm immunologiczny alergii na jady owadów, jak i immunoterapii swoistej, nie został w pełni poznany. Nadwrażliwość na jad może przebiegać w mechanizmie nadwrażliwości alergicznej I typu w klasyfikacji Gella i Coombsa (dominująca forma) jak i nieimmunologicznej. Spotykane są również reakcje nietypowe, które pojawiają się zwykle w kilka dni po użądleniu jak choroba posurowicza, zapalenie stawów, alergiczne zapalenie naczyń, zespół

nerczycowy, objawy neurologiczne (zapalenie nerwów obwodowych, zapalenia wielonerwowe, napady drgawek, zaburzenia koncentracji, zespół psychoorganiczny, zespół pozapiramidowy, zapalenie kłębuszków nerkowych) [6,10,93]. Alergia na jady owadów występuje z podobną częstością u atopików jak i chorych bez atopii w wywiadzie. Osoby z wysokimi wartościami sIgE na jady owadów często tolerują użądlenia, natomiast ciężkie reakcje poużądleniowe mogą występować u chorych o niskich wartościach sIgE w surowicy krwi [6,10,28,58,60]. Niektóre osoby tolerujące użądlenia, nawet dużą ich liczbę (jak pszczelarze) z niewiadomych przyczyn rozwijają objawy alergii. Nie jest również znana przyczyna znacznie częstszego występowania IVA u chorych na mastocytozę (30%) w porównaniu z ogólną populacją. Pierwsze doniesienia Muellera i wsp. [70] wskazywały na niskie bądź nieznaczalne stężenia IgE u wielu chorych. Dało to podstawę do teorii o farmakologicznym mechanizmie nadwrażliwości. Badania wskazują na degranulację mastocytów pod wpływem alergenu jadu owadów, której nie stwierdza się w kontakcie z alergenami wziewnymi i pokarmowymi. Dotyczy to jednak stężeń alergenu, które nie występują w czasie użądlenia owada. Badania z użyciem obecnie stosowanych, czułych metod, pozwalają na potwierdzenie mechanizmu IgE zależnego u większości chorych [3]. Wyniki oznaczenia sIgE oraz SPT u chorych na mastocytozę są przeważnie słabiej wyrażone niż u pozostałych chorych. Prawdopodobnie jest to związane z adsorpcją krążących IgE na powierzchni mastocytów tkankowych [86]. Wprowadzenie do diagnostyki testu aktywacji bazofilów umożliwiło stwierdzenie reakcji IgE zależnej u prawie wszystkich chorych [9]. Alternatywny mechanizm aktywacji opisany został na modelu zwierzęcym, gdzie kompleksy IgG antygen mogą aktywować makrofagi poprzez łączenie z receptorem dla IgG (FcγRIII). Nie ma na razie danych potwierdzających znaczenie tego mechanizmu u ludzi. Kluczowym elementem anafilaksji jest aktywacja mastocytów, mediowana przez szlaki sygnałowe zależne od wewnątrzkomórkowych kinaz tyrozynowych (Kit, Lyn, Syk and Fyn) [75]. Obecność mutacji KIT D816V może świadczyć o aktywacji i proliferacji komórek tucznych, jakkolwiek nie wpływa na wzrost ryzyka anafilaksji [1,12,95,96]. Natomiast zaburzenia czynności kanałów wapniowych, związane ze zwiększonym napływem wapnia do komórek i łatwiejszą degranulacją, mogą odgrywać rolę w zwiększeniu ryzyka anafilaksji [2,99]. Opisywana jest również rola kanałów TRMP (transient receptor potential membrane proteins), które odgrywają rolę w hamowaniu aktywacji komórek tucznych [98]. Białko TRPM-4 jest zaangażowane w reakcjach nadwrażliwości. Substancje aktywujące kanał jonowy, który tworzą białka TRMP, mogą służyć jako leki hamujące reakcje alergiczne [98].

Kluczowym elementem alergii na jady owadów jest zaburzenie stosunku pomiędzy specyficznymi alergenowo limfocytami T regulatorowymi i limfocytami Th2 [48]. Komórki prezentujące antygen pod wpływem IL 4 wpływają na różnicowanie „naiwnych” limfocytów T w komórki Th2. Aktywowane limfocyty Th2 wytwarzają IL-4, IL-5 i IL-13, które z kolei zwiększają produkcję IgE, napływ i aktywację eozynofili oraz skurcz mięśni gładkich [48].

Innym postulowanym mechanizmem alergii na jady owadów i efektywności immunoterapii jest szlak sygnałowy osteopontyny, którego aktywacja występuje głównie w monocytach [55]. W literaturze są również doniesienia dotyczące udziału aktywacji dopełniacza [51] oraz genów związanych z kalcytoniną [99].

1.1.2. Rola szlaku renina angiotensyna aldosteron

Ważnym mechanizmem, który może brać udział w nadwrażliwości na jady owadów jest upośledzenie funkcji układu renina angiotensyna, aldosteron [43]. Angiotensyna II jest silną substancją wazokonstrykcyjną [80,88]. Stężenia białka zależą od produkcji jej prekursorów: angiotensynogenu i angiotensyny I, aktywności enzymu konwertującego angiotensynę I do II oraz aktywności receptora dla angiotensyny II [81,88]. Angiotensynogen jest nieaktywnym białkiem produkowanym w wątrobie. Renina, enzym obecny w nerkach, przekształca angiotensynogen w angiotensynę I, która z kolei po wpływie konwertazy angiotensyny zamieniana jest do angiotensyny II [81,88].

U większości ludzi użądlenie owada prowadzi do reakcji miejscowej charakteryzującej się typowymi cechami stanu zapalnego: zaczerwienieniem, wzrostem temperatury, obrzękiem, bólem [5,32]. Skurcz naczyń wywołany aktywacją angiotensyny II może ograniczyć uogólnienie się reakcji [5,32]. Obserwacje kliniczne wskazują, że wielu chorych, którzy przeżyli reakcję anafilaktyczną po użądleniu przez owada, nie miało reakcji miejscowej po użądleniu. W badaniach Hermanna i wsp. wykazano mniejsze stężenia angiotensynogenu, angiotensyny I, II reniny u chorych z alergią na jady owadów, w porównaniu z osobami zdrowymi [40-44,55,]. Niskie stężenia białek tego układu stwierdzono również u chorych, u których występowały niepożądane objawy leczenia, nawracające reakcje anafilaktyczne pomimo leczenia, z dodatnim wynikiem próby prowokacji z żywym owadem [40,41,42,44]. Niskie stężenia białek układu RAS korelowały z ciężkością objawów klinicznych [40,41,42,44]. U chorych, którzy osiągnęli tolerancję jadu owadów, stężenia angiotensyny I i II są podobne jak u

osób zdrowych, natomiast stężenie angiotensynogenu, pierwszego białka układu, nadal pozostało istotnie niższe niż u osób zdrowych. Dotychczas nie udało się wykazać przyczyn niskiego stężenia białek układu RAA chorych leczonych z powodu alergii na jad owadów błonkoskrzydłych.

1.1.3. Leczenie alergii na jad owadów błonkoskrzydłych

Reakcję kliniczną po użądleniu klasyfikuje się według kilku skal, z których najpopularniejsza jest klasyfikacja wg Muellera [67].

- stopień I: pokrzywka, świąd, nudności
- stopień II: obrzęk naczynioruchowy, świąd gardła, wymioty, biegunka, ból brzucha, mdłości
- stopień III: duszność, świsty, trudności w mówieniu, zaburzenia połykania, lęk, hypodynamia
- stopień IV: spadek ciśnienia tętniczego, utrata przytomności, nietrzymanie moczu i stolca, sinica

Leczeniem z wyboru chorych z III i IV stopniem ciężkości reakcji według Muellera [67] jest immunoterapia swoista (ang. VIT) [6,10,11,92,101]. Ryzyko reakcji układowej po użądleniu wynosi u tych chorych około 70%, jest większe u chorych na mastocytozę, u których dochodzi do 100%. W niektórych sytuacjach po użądleniu przez osę nie dochodzi do wniknięcia jadu do ciała chorego, dlatego ryzyko reakcji nie jest 100% [33,34].

VIT można również stosować u chorych z mniej nasiloną reakcją o zwiększonym ryzyku ciężkiej reakcji spowodowanym wykonywanym zawodem (pszczelarze, cukiernicy), chorobami współistniejącymi (np. mastocytozą) oraz znacznym upośledzeniem jakości życia [10]. Kwalifikacja do leczenia składa się z badania podmiotowego, w trakcie którego należy ocenić (1) ciężkość reakcji, (2) sytuację, w której do niej doszło, (2) prawdopodobny gatunek bądź gatunki owadów odpowiedzialnych za wystąpienie objawów, (3) ryzyko powtórzenia się reakcji w przyszłości, (4) występowanie chorób współistniejących (np. ciężka astma, niewydolność krążenia, mastocytoza) oraz stosowanego leczenia (stosowanie B-blokerów, inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę), które mogą wpłynąć na ryzyko lub przebieg reakcji poużadleniowej. Ważnym elementem kwalifikacji do leczenia jest ocena jakości życia i nasilenia lęku u chorych z reakcją o mniejszym stopniu nasilenia. Kolejnym etapem diagnostyki

jest wykonanie punktowych testów skórnych i testów śródskórnych, ich przeprowadzenie i interpretację opisują standardy Europejskiej Akademii Alergologii [6,10]. Badaniami laboratoryjnymi wykonywanymi u wszystkich chorych jest ocena stężenia swoistych IgE z jadem osy, pszczoły i szerszenia. Zaleca się również ocenę stężenia tryptazy mastocytarnej w surowicy, która może być markerem mastocytozy, jak i ryzyka działań niepożądanych oraz ciężkiej reakcji poużądleniowej u chorych bez tej choroby [60,83,84,86]. Wszyscy chorzy, u których wystąpiła reakcja anafilaktyczna na jady owadów powinni być wyposażeni w zestaw ratunkowy, którego najważniejszym elementem jest ampułkostrzykawka z adrenaliną oraz leki przeciwhistaminowe i glikokortykoidy. Chorych należy poinstruować o sposobach unikania narażenia na użądlenia przez owada. Jedyną przyczynową metodą leczenia IVA jest immunoterapia swoista. W przeciwieństwie do chorych leczonych z powodu alergii na alergen wziewny, VIT prowadzony jest jedynie w formie iniekcji podskórnych, badania kliniczne z alergenem podjęzykowym nie wykazały różnic w skuteczności w porównaniu z placebo. Faza wstępna VIT może być prowadzona schematem konwencjonalnym, przyspieszonym (*rush*) i ultraszybkim (*ultrarush*). Po osiągnięciu dawki podtrzymującej ryzyko wystąpienia reakcji poużądleniowej zmniejsza się do 2-3% i jest podobne do ryzyka takich reakcji w populacji ogólnej. U chorych, którzy nie osiągnęli tolerancji w wyniku leczenia ocenionej na podstawie próby prowokacji alergenowej [30], użądlenia w warunkach naturalnych, bądź u których w trakcie terapii podtrzymującej wystąpiły działania niepożądane leczenia, dawkę leku można zwiększyć do 200 µg jadu [87]. Taką dawkę stosuje się również u chorych pracujących jako pszczelarze [6,10]. Częstość występowania działań niepożądanych w trakcie leczenia zależy od stosowanego jadu owada (większe u chorych leczonych z powodu alergii na jad pszczoły 25% w porównaniu z 11% leczonych jadem osy) [6,10]. U większości chorych leczenie powinno być prowadzone przez 5 lat, a u osób ze współistniejącą mastocytozą prawdopodobnie do końca życia [10]. Stężenie tryptazy mastocytarnej w surowicy krwi wykazuje liniową zależność z ciężkością reakcji anafilaktycznej oraz występowaniem działań niepożądanych podczas leczenia [83,84]. W tej grupie chorych stwierdzano przypadki śmiertelnej anafilaksji po użądleniu, które nastąpiło po zakończeniu VIT [74,79]. Zalecenia amerykańskie mówią o leczeniu trwającym do czasu negatywizacji testów skórnych, jednak u większości chorych wydłuża to czas leczenia do 7-10 lat, nie wpływając na jego skuteczność [34]. Standardy Europejskiej Akademii Alergologii i Immunologii Klinicznej zalecają pięcioletni czas leczenia. Może ono trwać trzy lata jeżeli stwierdza się negatywizację wyników testów skórnych i stężenia sIgE. Leczenie pięcioletnie umożliwia osiągnięcie tolerancji alergenu u większości chorych. Dłuższe leczenie wskazane jest u chorych zagrożonych wyższym ryzykiem

reakcji (1) leczonych z powodu mastocytozy, większym stężeniem tryptazy mastocytarnej, z wywiadem ciężkiej reakcji poużądleniowej (2) osób, które doświadczyły reakcji niepożądanych podczas leczenia podtrzymującego lub nie osiągnęły tolerancji użądlenia, (3) osób o dużym ryzyku użądlenia jak pszczelarze i ich rodziny [10].

1.1.4. Ocena efektywności immunoterapii jadem owadów błonkoskrzydłych

Dotychczas nie ma wskaźników pozwalających ocenić skuteczność leczenia i reakcję chorego po użądleniu. Ponad 90% chorych leczonych z powodu alergii na jad osy i 80% na jad pszczoły osiąga tolerancję kolejnych użądleń po zakończeniu VIT. Gorsze efekty leczenia stwierdza się u osób z cięższą reakcją przed leczeniem, chorych z działaniami niepożądanymi w trakcie immunoterapii, współistniejącymi chorobami serca, zwiększonym stężeniem tryptazy mastocytarnej oraz u chorych na mastocytozę [62,65,66,68,69,83,84]. Bardziej efektywna ochrona przed kolejnym użądleniem związana jest z dłuższym czasem leczenia i większym dawką alergenu stosowanego w trakcie VIT [6,10]. Negatywizacja testów skórnych w wyniku leczenia wskazuje prawdopodobnie na mniejsze ryzyko powtórnej reakcji, jednak występuje ona jedynie u 20-30% leczonych chorych [33,34]. Ponadto u części osób (np. chorych na mastocytozę) wyniki testów skórnych bywają negatywne bądź graniczne przed VIT, co nie koreluje z ciężkością reakcji anafilaktycznej [86]. Do badań laboratoryjnych stosowanych w ocenie skuteczności leczenia należą badanie swoistych IgE, test aktywacji bazofilów, ocena stężenia IgG4, IL10, IL4. Zmniejszenie stężenia IgE, podobnie jak negatywizacja testów skórnych może u pewnej części chorych świadczyć o mniejszym ryzyku reakcji. Podobne znaczenie ma zmniejszenie reaktywności bazofilów [24,61]. Wykazanie wzrostu stężenia IL10 i zmniejszenie stężenia IL4 może świadczyć o zwiększeniu puli limfocytów Th2 i zmniejszeniu liczby limfocytów Th1. Dodatkowo wykazać można zwieszenie Foxp3 - białka świadczącego o zwiększeniu puli limfocytów T regulatorowych [48]. U chorych leczonych z powodu alergii na jad pszczoły wykazano zwiększenie stężenia osteopontyny w wyniku skutecznej immunoterapii [55]. Dotychczas żadne z powyższych badań nie weszło jednak do praktyki klinicznej i ocena ryzyka reakcji po ponownym użądleniu z zastosowaniem metod *in vitro* nie jest możliwa.

1.2. Epidemiologia, rozpoznanie i leczenie mastocytozy

Mastocytoza to zespół chorobowy, w którym dochodzi do patologicznego rozrostu komórek tucznych w szpiku oraz innych narządach. U większości chorych występują zmiany skórne, nacieki narządów wewnętrznych takich jak śledziona, wątroba, kości, przewód pokarmowy, układ oddechowy, serce. Nacieki te mogą doprowadzić do upośledzenia funkcji zajętych narządów. Pierwsze objawy choroby mogą pojawić się w każdym wieku. U dzieci dominuje postać skórna choroby, rzadko występuje postać układowa. Dorośli chorują przede wszystkim na mastocytozę układową. W najcięższych postaciach choroby często nie ma zmian na skórze [1,27,47,95,96].

Klasyfikacja choroby według WHO obejmuje 7 postaci tego zespołu (Tabela 1).

Tabela 1. Klasyfikacja mastocytozy wg WHO [95]

1.	Postać skórna (CM) a) pokrzywka barwnikowa (łac. <i>urticaria pigmentosa</i>) b) mastocytoma skóry
2.	Systemowa mastocytoza o powolnym przebiegu (ISM) a) izolowana mastocytoza szpiku kostnego
3.	Mastocytoza układowa z klonalnym rozrostem linii komórkowych nie- mastocytarnych (SM-AHNMD)
4.	Agresywna układowa mastocytoza (ASM)
5.	Białaczka mastocytarna (MCL)
6.	Chłoniak mastocytarny
7.	Mastocytoma w narządach poza skórą

Postacie agresywne choroby są bardzo rzadkie, dotyczą mniej niż 5% chorych dorosłych i wyjątkowo występują u dzieci. Wymagają zastosowania chemioterapii z powodu występowania nacieków proliferujących mastocytów upośledzających funkcję zajętych narządów [47,94,95].

Mechanizm niekontrolowanej proliferacji mastocytów, jak i naciekania narządów w mastocytozie, nie jest jasny. Dominującą zmianą genetyczną u chorych jest mutacja genu KIT kodującego przezbłonowy receptor o aktywności kinazy tyrozynowej dla czynnika wzrostu komórek pnia. Mutacja punktowa D816V stwierdzana jest u większości chorych, u części spotykane są mutacje w innych miejscach genu. Obecność mutacji prowadzi do niekontrolo-

wanej autofosforylacji receptora i proliferacji mastocytów [1,36,95,96]. Wykazano jej obecność w innych, poza mastocytarną, liniach komórkowych, co jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym rozwoju agresywnych postaci mastocytozy [31]. Obecność samej mutacji genu KIT nie jest wystarczająca do wystąpienia mastocytozy. Badania polimorfizmu genów wykazały rolę polimorfizmu Q576R genu receptora IL4 [18] w rozwoju pokrzywki barwnikowej, polimorfizmu, występowania allelu T w miejscu -1112 promotora genu IL-13 jako czynnika ryzyka mastocytozy układowej [71]. Analiza ekspresji genów w szpiku chorych na mastocytozę wykazała duże różnice w ekspresji genów u chorych na mastocytozę, w porównaniu z osobami zdrowymi. Zidentyfikowano grupę 10 genów, których ekspresja znacznie różniła się u chorych na mastocytozę, w tym największe różnice stwierdzono w odniesieniu do ekspresji genu α -tryptazy [19]. Trwają obecnie badania nad zaburzeniem regulacji apoptozy w mastocytozie. Prawdopodobnie umożliwią one wykorzystanie nowych leków w leczeniu agresywnych postaci choroby. Mastocytoza jest rzadką chorobą. ECNM (Europejska Sieć Mastocytozy) podaje różne dane dotyczące epidemiologii choroby, zależne częściowo od zaawansowania badań nad chorobą i wielkości kraju. Wydaje się, że częstość występowania choroby można określić na 7/100 000 mieszkańców w tym 4/100 000 to mastocytoza układowa (tabela 2) [47].

Szacuje się, że w Polsce liczba chorych na mastocytozę może wynosić około 800 [72]. Pod opieką Polskiej Sieci Mastocytozy znajduje się obecnie 300 chorych (rejestr ośrodka gdańskiego), w tym około 60% dorosłych i 40% dzieci [47].

Tabela 2. Epidemiologia mastocytozy w wybranych europejskich krajach i USA (dane ECNM) [47]

Kraj/liczba ludności	Liczba chorych na mastocytozę N (n*)	Pokrzywka barwnikowa N (n*)	Mastocytoza układowa N (n*)	Agresywna mastocytoza N (n*)
Austria/8 mln ¹	2000 (25)	1600 (20)	400 (5)	16 (0,2)
Holandia/16.5 mln ²	1220 (7,4)	600 (3,6)	600 (3,6)	20 (0.12)
Niemcy/82 mln ³	5000 (6)			
USA ⁵	3500 (1,13)			
Polska/38 mln ⁵	300 (0,8)	200 (0,6)	100 (0,2)	5 (0,013)

* n – liczba chorych na 100 000

Autor uzyskał dane od kierowników ośrodków mastocytozy: ¹ Peter Valent, ² Jaap van Doormaal, ³ Knut Brockow, ⁴ USA Mastocytosis Group, ⁵ Gdański Ośrodek Mastocytozy

Rozpoznanie postaci układowej mastocytozy opiera się na kryteriach WHO [95]. Głównym badaniem jest trepanobiopsja szpiku kostnego. Kryterium większym rozpoznania jest stwierdzenie w badaniu histopatologicznym szpiku nacieków powyżej 15 atypowych mastocytów w skupisku, o atypowym kształcie. Do kryteriów mniejszych zalicza się stwierdzenie w badaniu cytologicznym ponad 25% mastocytów o atypowym kształcie, obecność mutacji D816V genu KIT, ekspresję CD2 i CD25 na mastocytach, stwierdzenie stężenia tryptazy powyżej 20 ng/ml w surowicy krwi obwodowej [95]. Mastocytozę układową rozpoznaje się po stwierdzeniu 1 dużego i 1 małego bądź 3 małych kryteriów WHO [95,96]. Wykonanie badania szpiku zlecane jest u wszystkich dorosłych, u których podejrzewa się mastocytozę tj. u chorych na pokrzywkę barwnikową, anafilaksję ze współistniejącym zwiększonym stężeniem tryptazy mastocytarnej, osteoporozę bez czynników ryzyka i zwiększonym stężeniem tryptazy, a także u chorych na choroby hematologiczne, u których wykazano obecność zwiększonej liczby lub linii atypowych mastocytów w badaniu szpiku. Badania u dzieci wykonywane są w przypadku podejrzenia agresywnej postaci choroby (upośledzenie funkcji narządów – szpik, wątroba, śledziona, układ pokarmowy, osteoporoza) bądź w przypadku stężenia tryptazy mastocytarnej powyżej 20 ng/ml [94,95,96]. Jedynie 1 z 5 kryteriów wg WHO opiera się na badaniu krwi obwodowej, pozostałe wymagają biopsji szpiku kostnego. Wprowadzenie do praktyki klinicznej narzędzia umożliwiającego rozpoznanie choroby w sposób mniej inwazyjny mogłoby zwiększyć możliwości rozpoznania choroby.

1.2.1. Immunoterapia swoista w alergii na jady owadów u chorych na mastocytozę

Objawy degranulacji komórek tucznych występują u większości chorych na mastocytozę. Ich nasilenie jest różne - od świądu skóry po hipotensję i wstrząs anafilaktyczny. Reakcje anafilaktyczne występują u 50% chorych na mastocytozę układową, w tym u 30% chorych reakcje anafilaktyczne występują po użądleniu przez owada. U większości chorych są to reakcje bardzo ciężkie, zagrażające życiu [8,12,15,35,36,59,96]. Uważa się, że większość zgonów w wyniku anafilaksji na jady owadów dotyczy chorych na mastocytozę. Dotychczas opisano co najmniej 6 zgonów po użądleniu przez owada u chorych na mastocytozę. Trzech chorych nie było odczulanych [22,24,25]. U trzech kolejnych wstrząs nastąpił po użądleniu, do którego doszło po zakończeniu leczenia [74,90]. W przeciwieństwie do populacji ogólnej chorych

na alergię na jady owadów, w której immunoterapia jest leczeniem z wyboru, opinie na temat odczulania chorych na mastocytozę znacznie różniły się. Część ośrodków uważała mastocytozę za przeciwwskazanie do leczenia, głównie z powodu częstszych działań niepożądanych i mniejszej skuteczności leczenia [22]. W innych klinikach współistnienie mastocytozy i alergii na jady owadów uważano za jedno z najważniejszych wskazań do leczenia [8-10,82-87]. Postulowano również profilaktyczne leczenie chorych na mastocytozę, u których do reakcji anafilaktycznej po użądleniu jeszcze nie doszło [86,100]. Stąd pojawiła się konieczność analizy dostępnych danych z uwzględnieniem stosunku ryzyka do korzyści leczenia.

Metody diagnostyczne dostępne obecnie nie pozwalają na ocenę ryzyka anafilaksji u chorych na mastocytozę. Wprowadzenie takiej metody miałyby duże znaczenie praktyczne i pozwoliło na indywidualizację leczenia chorych.

1.3. Farmakogenetyka w medycynie i alergologii

Wyniki badań genetycznych stosowane są już szeroko w medycynie, zwłaszcza w hematologii, onkologii, pediatrii [17,64,76,81,97], gdzie znacząco poprawiły wyniki leczenia, zmniejszyły liczbę działań niepożądanych, koszty leczenia. Analiza obecności mutacji D816V genu KIT jest też standardowym elementem rozpoznania mastocytozy układowej, gdzie jest nie tylko małym kryterium rozpoznania wg WHO, ale pozwala uniknąć nieefektywnego leczenia imatinibem w przypadku występowania linii komórkowej D816V dodatkowo, która jest oporna na imatinib [1,94-96]. Z kolei leczenie chorych na astmę może być efektywniejsze po uwzględnieniu oceny odpowiedzi na leki z grupy β 2 agonistów za pomocą badania polimorfizmu genu receptora β 2 adrenergicznego (ARDB2), receptora kortykotropiny (CRHR1) i odpowiedzi na glikokortykosteroidy, czy genu syntazy leukotrienu C_4 i 5-lipooksygenazy w odpowiedzi na inhibitory leukotrienów [53]. Wprowadzenie farmakogenetyki jako metody pomocniczej w badaniu chorych leczonych z powodu alergii na jad owadów błonkoskrzydłych mogłoby poprawić wyniki leczenia i zwiększyć bezpieczeństwo chorych.

2. CELE PRACY

1. Ocena częstości występowania wariantów polimorficznych genu *AGT* (M235T) i *ACE* (I/D, I/I, D/D) u chorych leczonych z powodu alergii na jady owadów, ocena ich związku z ciężkością reakcji anafilaktycznej i działaniami niepożądanymi podczas leczenia.
2. Ocena zastosowania badania ekspresji genów w ocenie skuteczności immunoterapii swoistej jadem owadów błonkoskrzydłych.
3. Ocena danych dotyczących występowania, rozpoznania, bezpieczeństwa i skuteczności immunoterapii swoistej jadem owadów błonkoskrzydłych u chorych na mastocytozę układową.
4. Ocena różnic w ekspresji genów u chorych na mastocytozę układową i alergię na jady owadów w porównaniu z chorymi, u których nigdy nie wystąpiła reakcja anafilaktyczna.
5. Ocena różnic w ekspresji genów we krwi obwodowej u chorych na mastocytozę układową i określenie profilu genów charakterystycznego dla chorych na mastocytozę.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Badanie roli polimorfizmu AGT M235T w alergii na jady owadów

Materiał i metodę badań opublikowano w [pracy 2]. Badanie wykonane we współpracy z Katedrą i Zakładem Genetyki GUMed, kierownik Katedry Prof. dr hab. med. Janusz Limon.

Grupę badaną stanowiło 107 chorych leczonych z powodu alergii na jady owadów błonkoskrzydłych w Klinice Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, średnia wieku 41 lat (zakres 18-75), w tym 59 (55%) kobiet i 48 (45%) mężczyzn. Rozpoznanie alergii na jady owadów ustalono zgodnie z zaleceniami EAACI. Grupę kontrolną stanowiło 113 zdrowych dawców krwi o średniej wieku 41 lat (zakres 21-74), w tym 48 (42%) kobiet i 65 (58%) mężczyzn. Badanie uzyskało zgodę komisji etycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (NKEBN/811/2004).

Badanie polimorfizmu genu (p.M235T) wykonano metodą ASO-PCR (*allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction*) [45,54]. W celu potwierdzenia otrzymanych wyników co dziesiąta próbka analizowana była za pomocą sekwencjonowania analizatorem ABI PRISM 310.

Badanie polimorfizmu *ACE I/D, I/I, D/D (rs1799752)* wykonano metodą PCR [54,80]. W celu potwierdzenia otrzymanych wyników co dziesiątą próbkę sekwencjonowano analizatorem ABI PRISM 310.

Pomiar stężenia angiotensyny I wykonano za pomocą metody ELISA (Phoenix Pharmaceuticals, CA, USA).

3.2. Ocena skuteczności immunoterapii jadem owadów błonkoskrzydłych za pomocą profilu ekspresji genów

Materiał i metodę badań opublikowano w [pracy 3]. Badanie wykonane we współpracy z Katedrą Genetyki UMCG (Groningen, Holandia), kierownik Katedry Prof. Cisca Wijmenga.

Grupa badana składała się z 46 chorych leczonych z powodu alergii na jady owadów w Klinice Alergologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Groningen (Holandia). Wszyscy chorzy zakwalifikowani zostali do leczenia z powodu reakcji anafilaktycznej po użądleniu przez owada ocenionej jako stopień III lub IV wg Muellera [67], dodatnich wyników testów skórnych i/lub sIgE według zaleceń EAACI [10]. Kryteriami wyłączenia z badania był brak zgody chorego, ciąża, choroby przewlekłe o ciężkim przebiegu, choroby nowotworowe i mastocytoza.

Leczenie rozpoczęto według schematu *semi-rush*, pierwszego dnia leczenia chory osiągnął dawkę 10 µg leku. Wzrastające dawki leku do osiągnięcia dawki 100 µg podawane były w odstępach tygodniowych. Dawki podtrzymujące podawane były w odstępach 6 tygodniowych przez 3 do 5 lat. Badanie zaakceptowane było przez komisję etyczną UMCG (METc 2008/340).

Chorzy biorący udział w badaniu podzieleni zostali na 3 grupy:

Grupa 1. Osoby, które były leczone z powodu alergii na jady owadów, po zakończeniu leczenia były użądłone co najmniej 3 razy przez owada i nie doszło u nich do reakcji anafilaktycznej (n = 17, średnia wieku 53 lata (zakres 28-70). W tym 9 mężczyzn (53%) i 8 kobiet (47%))

Grupa 2. Osoby, które były leczone z powodu alergii na jady owadów, po jego zakończeniu byli użądłeni przez owada przynajmniej 2 razy, pomimo leczenia doszło u nich do reakcji anafilaktycznej (n=12, średnia wieku 56 (zakres 42-75) w tym 4 mężczyzn (33%) i 8 kobiet (67%))

Grupa 3. Osoby, które nadal leczone są w schemacie terapii podtrzymującej VIT, które nie były użądłone w czasie odczulania (n=17, średnia wieku 55 (zakres 21-75) w tym 6 mężczyzn (35%) i 11 kobiet (65%)).

3.3. Bezpieczeństwo i skuteczność immunoterapii jadem owadów w mastocytozie

Materiał i metodę badań opublikowano w [pracy 4].

Analiza danych wykonana została wspólnie przez lekarzy z Kliniki w Groningen (Holandia), gdzie po publikacjach Dubois [22] immunoterapia u chorych na mastocytozę nie była wykonywana oraz przez lekarzy z Kliniki Alergologii w Gdańsku, gdzie leczenie było stosowane na podstawie zaleceń EAACI [10] i publikacji Rueff [86]. W celu zebrania jak największej liczby danych przeanalizowano publikacje zawarte w bazie Pubmed, streszczenia z kongresów alergologicznych w latach 2003-2008. W razie wątpliwości, co do interpretacji wyników z autorami kontaktowano się osobiście. Jakość dowodów naukowych oceniano za pomocą systemu GRADE (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation) [13,38]. Jakość dowodów oceniano w skali czterostopniowej (A wysoka, B średnia, C niska, D bardzo niska), siłę rekomendacji określono jako: 1 – silną, 2 – słabą.

3.4. Ocena ryzyka alergii na jady owadów u chorych na mastocytozę za pomocą profilu ekspresji genów

Materiał i metodę badań opublikowano w [pracy 5]. Badanie wykonane we współpracy z Katedrą Genetyki UMCG (Groningen, Holandia), kierownik Katedry Prof. Cisca Wijmenga.

Grupę 22 chorych na mastocytozę układową o powolnym przebiegu (ISM), leczonych w Klinice Alergologii UMCG (średnia wieku 53 (zakres 35-73), w tym 7 mężczyzn (31%) i 15 kobiet (68%)) podzielono na dwie podgrupy w zależności od reakcji po użądleniu przez owady błonkoskrzydłe:

Grupa 1: Chorzy, u których w przeszłości wystąpiła reakcja anafilaktyczna IV stopnia wg Muellera po użądleniu przez owady błonkoskrzydłe. Żaden z chorych nie otrzymał immunoterapii swoistej. Rozpoznanie alergii na jad owadów błonkoskrzydłych potwierdzono dodatnim wynikiem SPT i/lub sIgE wg zaleceń EAACI.

Grupa 2: Chorzy, którzy byli użądleni przynajmniej raz przez owada błonkoskrzydłego po rozpoznaniu mastocytozy układowej i nie wystąpiła u nich reakcja anafilaktyczna. Nie wystąpiła u nich dotychczas reakcja anafilaktyczna ani reakcja hipotensyjna w żadnej innej sytuacji po rozpoznaniu mastocytozy lub w ciągu ostatnich 10 lat. Badanie zaakceptowane było przez komisję etyczną UMCG (METc 2008/340).

3.5. Profil ekspresji genów i system regulacji transkrypcji genów w mastocytozie układowej

Materiał i metodę badań opublikowano w [pracy 6]. Badanie wykonane we współpracy z Katedrą Genetyki UMCG (Groningen, Holandia), kierownik Katedry Prof. Cisca Wijmenga.

Grupa badana składała się z 22 chorych na mastocytozę układową o powolnym przebiegu (ISM), leczonych w Klinice Alergologii UMCG (średnia wieku 53 (zakres 35-73), w tym 7 mężczyzn (31%) i 15 kobiet (68%)). Rozpoznanie choroby ustalone było zgodnie z zaleceniami WHO i obejmowało badanie histopatologiczne szpiku kostnego, immunofenotypizację, badanie cytologiczne, oznaczenie stężenia tryptazy mastocytarnej w surowicy krwi obwodowej. Dodatkowo badano stężenie metabolitów histaminy w moczu. Grupa kontrolna składała się z 43 zdrowych osób (średnia wieku 47,7 (zakres 19-73), w tym 22 mężczyzn (51%) i 21 kobiet (49%)). Badanie zaakceptowane było przez komisję etyczną UMCG (METc 2008/340).

3.6. Analiza ekspresji całego genomu za pomocą mikromacierzy RNA

Izolacja RNA

Próbki RNA krwi obwodowej zebrano za pomocą próbek PAXgene blood RNA tubes (Qiagen, USA). Wszystkie próbki zamrożono w temperaturze -20 °C do czasu izolacji (maksymalnie 2 miesiące od pobrania materiału). RNA izolowano za pomocą zestawu

PAXgene blood RNA Kit CE (Qiagen, Venlo, The Netherlands). Próbki RNA przechowywano w temperaturze -80 °C do czasu znakowania i hybrydyzacji.

Jakość RNA oznaczano za pomocą analizatora 2100 Bioanalyzer (Agilent, Amstelveen, The Netherlands) i Agilent RNA 6000 Nano Kit. Próbki krwi o wskaźniku integralności > 7,5 używane były do dalszej analizy.

Analiza ekspresji genomu

Znakowanie i amplifikacja RNA wykonana została zestawem Illumina TotalPrep 96 RNA Amplification Kit (Applied Biosystems, Nieuwerkerk ad IJssel, The Netherlands). Do oznaczenia użyto 200 ng RNA z każdej próbki. Ludzkie tablice ekspresji całego genomu HT-12_V3_expression arrays (Illumina, San Diego, USA) opracowano zgodnie z zaleceniami producenta. Slajdy z wynikiem badania skanowano bezpośrednio po badaniu za pomocą Illumina BeadStation iScan (Illumina, USA).

3.7. Analiza statystyczna wyników mikromacierzy RNA

Pierwszym etapem analizy statystycznej była korekcja sygnału tła i normalizacja kwantytowa uzyskanych danych za pomocą programu Genomestudio Gene Expression Analysis module v 1.0.6 Statistics. Geny, które w przynajmniej 75% próbek miały wartość sygnału powyżej 20 percentyla całości sygnału porównywanych grup, włączano do dalszej analizy.

Analiza danych wykonana została za pomocą program GeneSpring package version 8.0.0 (Agilent Technologies Santa Clara CA, USA). Geny, których ekspresja różniła się w porównywanych grupach, wybrane były na podstawie dwukrotnej różnicy ekspresji, istotności statystycznej w teście t-Studenta i korekcji wyniku testem dla porównań wielokrotnych Benjamini Hochberga. Model predykcyjny Naïve Bayes został stworzony w celu określenia zestawu genów, który może być użyty w dalszych badaniach i w diagnostyce klinicznej [52,56]. Metoda Naïve Bayes zakłada, że wpływ ekspresji pojedynczego genu nie jest związany z wpływem ekspresji pozostałych genów na wartość wyniku predykcji. Metoda ta nie bierze pod uwagę interakcji pomiędzy genami wchodzącymi w skład modelu predykcyjnego, ani wpływu czynników środowiska.

Znaczenie funkcjonalne genów zostało zbadane za pomocą programu Genecodis [14,73], bazy danych genów KEGG [49,50] i analizy GoSlim.

Różnice w ekspresji genów pomiędzy chorymi na mastocytozę i osobami zdrowymi przeanalizowano również za pomocą analizy TSR (systemów regulacji transkrypcji) i analizy wieloczynnikowej opisanej przez Fehrmana i wsp. [26]. Metoda ta stworzona została na podstawie analizy 17550 eksperymentów badających ekspresję całego genu w różnych tkankach i procesach chorobowych, przeprowadzonych metodą analizy ekspresji całego genomu zestawem firmy Affimetrix. Zaobserwowano duże podobieństwo ekspresji genów w badanych doświadczeniach. Na ich podstawie wyznaczono komponenty główne – TSR (systemy regulacji transkrypcji) opierając się na korelacji pomiędzy genami ulegającymi wspólnej regulacji ekspresji. Wprowadzona analiza pozwala wytłumaczyć 64% wszystkich różnic w ekspresji genomu [26]. Interpretacja biologiczna i medyczna znaczenia różnic w ekspresji każdego z TSR zależy od funkcji genów, które mają największy wpływ na jego ostateczną wartość. Celem analizy jest wykorzystanie podobieństwa w ekspresji genów i stworzenia TSR, które mają większą powtarzalność i ich wartość jest pochodną ekspresji wielu genów współdziałających ze sobą w różnych procesach biologicznych. W wyniku TSR utracie ulega wartość pojedynczego genu, ale rozwiązaniu ulega problem braku powtarzalności wyników i wpływu warunków doświadczenia na ostateczny wynik badania.

Wartości ekspresji genów z bieżącego doświadczenia poddano logarytmicznej normalizacji, używając średnich wartości ekspresji genu. Następnie wartości ekspresji genów transformowano do 50 głównych systemów regulacji transkrypcji, opisanych wcześniej przez Fehrmana i wsp [26]. Następnie przeprowadzono analizę wieloczynnikową, redukując liczbę parametrów opisujących ekspresję genów do 8 czynników.

Analizę statystyczną wykonano oprogramowaniem Systat 12.0 i programem napisanym w języku Delphi 5.0.

4. OMÓWIENIE WYNIKÓW

4.1. Rola polimorfizmu angiotensynogenu AGT M235T w alergii na jady owadów

Wyniki badań opublikowano w [pracy 2]

Wyniki badania roli polimorfizmu AGT M235T genu angiotensynogenu potwierdzają rolę układu RAS w alergii na jady owadów. Dodatkowo wskazują na czynnik genetyczny, odpowiedzialny za niższe stężenia angiotensynogenu u chorych na cięższą postać nadwrażliwości. Wykazano, że wariant MM polimorfizmu genu AGT M235T jest znacznie częstszy u chorych z ciężką reakcją anafilaktyczną po użądleniu przez owada. Związany jest on z niższym stężeniem angiotensynogenu w surowicy. Nie stwierdzono natomiast różnic w występowaniu wariantów polimorficznych I/D ACE genu konwertazy angiotensyny I.

Częstość występowania wariantu polimorficznego MM 235 genu AGT była niższa u chorych leczonych z powodu alergii na jady owadów (30%) w porównaniu z osobami zdrowymi (17%). Obecność allele MM 235 była również czynnikiem ryzyka reakcji IV typu po użądleniu przez owada (OR=2,5 CI 1,04-6,08). Dodatkowo, u homozygot MM stwierdzano mniejsze stężenia angiotensyny I. Mniejsze stężenia białek układu RAS u chorych na ciężkie postaci alergii na jady owadów opisano już poprzednio [40-44]. Mogą one wynikać z niższego stężenia angiotensynogenu, pierwszego białka układu RAS. Podobne wyniki do stwierdzanych w tym badaniu wykazano u chorych na astmę i współistniejące inne choroby alergiczne (alergiczny nieżyt nosa, atopowe zapalenie skóry) [45].

W badanej grupie nie stwierdzono różnic w występowaniu alleli I/D genu ACE zarówno u chorych leczonych z powodu alergii na jady owadów i grupie kontrolnej, jak i porównując chorych o różnych stopniach ciężkości reakcji anafilaktycznej. Różnic w aktywności tego enzymu nie wykazano również w badaniach Hermanna i wsp. [40-44]. Wyniki badania potwierdzają również znaczenie mechanizmów innych niż reakcja alergiczna typu I wg Gella i Coombsa.

Znaczenie układu RAS w alergii na jady owadów potwierdzają również wyniki badań, w których wykazano znaczne zwiększenie ryzyka ciężkiej reakcji anafilaktycznej, u chorych leczonych inhibitorami konwertazy angiotensyny [83,84,91].

Wyniki badania pozwalają przypuszczać, że leczenie oparte na farmakogenetyce może w przyszłości pozwolić na indywidualizację farmakoterapii.

4.2. Ocena skuteczności immunoterapii jadem owadów błonkoskrzydłych za pomocą profilu ekspresji genów

Wyniki badań opublikowano w [pracy 3]

Wyniki badania wskazują na możliwość oceny efektywności VIT za pomocą badania profilu ekspresji genów we krwi obwodowej. Różnice w ekspresji dotyczą znanych mechanizmów różnicowania limfocytów T, aktywacji komórek tucznych, jak i wskazują na nowe procesy pamięci immunologicznej. Użyta w badaniu metoda oceny ekspresji całego genomu we krwi obwodowej, bez wcześniejszego sortowania komórek, jest wystandaryzowaną i prostą metodą, która może stanowić podstawę do stworzenia narzędzia stosowanego w praktyce klinicznej. Model predykcyjny, który może być użyty w dalszej praktyce klinicznej, oparty jest na 18 genach. Profil ekspresji genów charakterystyczny dla tolerancji alergenu wykazano u 100% chorych uznanych za wyleczonych w wyniku stosowania VIT, nie znaleziono go u żadnego chorego, który nie osiągnął tolerancji alergenu. Obecność tego profilu genów potwierdzono również u 88% chorych będących w trakcie immunoterapii podtrzymującej. Wyniki tego badania stanowią podstawę do dalszych badań, konieczna jest walidacja wyników w innej populacji chorych, obserwacje prospektywne chorych i badania nad funkcją transkryptów genów o nieznanym dotychczas roli w mechanizmie tolerancji alergenu. Analiza funkcjonalna genów, których ekspresja różniła się w badanych grupach, wskazuje na udział znanych mechanizmów VIT jak szlak związany z przekazaniem sygnału przez receptor FcγR1, JAK-STAT, MAPK, Wnt, kanały wapniowe, przekazanie sygnału pomiędzy komórkami i regulację transkrypcji genów. Funkcja wielu transkryptów nie jest jeszcze znana. Do genów o największym znaczeniu w identyfikacji chorych, którzy osiągnęli efekt leczenia zaliczono TWIST-2, PRLR, CLDN1. TWIST 2 jest czynnikiem transkrypcyjnym stymulującym ekspresję IL10 i zmniejszającym produkcję IL4 [89]. Po leczeniu zwiększeniu uległa również ekspresja genu CLDN1, którego produkt kładyna 1 jest cząsteczką adhezyjną odpowiedzialną za adhezję i migrację komórek dendrytycznych. Jego stężenie wzrasta po interakcji komórek z TGF-β, cytokiną zwiększającą liczbę komórek T regulatorowych [102]. Zmniejszenie ekspresji PRLR

(receptora dla prolaktyny) po VIT może wskazywać na zwiększenie puli limfocytów Th1. Prolaktyna stymuluje syntezę receptora γ/δ TCR, który zwiększa zależną od IL4 produkcję IgE i IgG1, zwiększa również pulę limfocytów Th2 [46]. Zmiany w ekspresji wymienionych genów pozwalają połączyć wyniki badania z doniesieniami dotyczącymi zmiany stężeń cytokin w trakcie immunoterapii [48].

Wyniki badania pozwalają przypuszczać, że możliwa jest ocena skuteczności immunoterapii za pomocą badania ekspresji genów, które może dostarczyć nowych informacji na temat mechanizmu tolerancji alergenu.

4.3. Bezpieczeństwo i skuteczność immunoterapii jadem owadów w mastocytozie

Wyniki badań opublikowano w [pracy 4]

Bezpieczeństwo immunoterapii swoistej alergenem jadów owadów oceniono na podstawie analizy 117 chorych leczonych w 6 badaniach retrospektywnych [25,70,74,77] i 4 badaniach opisujących pojedyncze przypadki leczonych chorych [25,70,74,77]. Działania niepożądane opisano u 28 (23,9%) chorych na mastocytozę leczonych VIT, w tym objawy układowe u 20,5% chorych. W populacji chorych bez mastocytozy takie porównywalne reakcje występowały u 20,3% chorych (11,1 – 36%). Najsilniejsze działania niepożądane, w wyniku których leczenie zostało przerwane, bądź objawy układowe wymagały w leczeniu podania adrenaliny, występowały u 7,6% chorych. W populacji chorych bez mastocytozy takie działania niepożądane występowały rzadziej, u 3 do 7% chorych. Porównanie działań niepożądanych, w zależności od gatunku owada, który wywołał reakcje wykazało, że występowały one częściej u chorych leczonych alergenem jadu osy, w porównaniu z populacją ogólną (11,2% vs. 35%).

Efektywność VIT u chorych na mastocytozę opisano w 6 badaniach [9,20,21,22,39,86,] i jednym opisie przypadku [25], oceniając ją na podstawie wyniku próby prowokacji z żywym owadem, bądź reakcji na użądlenie przez owada w środowisku naturalnym. Reakcja ogólnoustrojowa po użądleniu wystąpiła w 23,9% opisywanych prób prowokacji i 33,3% użądleń w środowisku naturalnym. Najcięższą reakcją opisywano u chorego, który nie osiągnął dawki podtrzymującej VIT. Sumarycznie efektywność leczenia oceniono na 72%. Jest to

odsetek niższy niż w populacji ogólnej, który wynosi 80% dla chorych leczonych z powodu alergii na jad pszczoły i 95% u chorych leczonych z powodu alergii na jad osy [32]. Wyniki badania de Olano wskazują, że brak tolerancji użądlenia wystąpił zwłaszcza u chorych, u których wystąpiły działania niepożądane leczenia. Badania Rueff [33,85,86,87] wskazują, że podwyższenie dawki jadu stosowanej w czasie fazy podtrzymującej VIT może zwiększyć efektywność leczenia. Brak jest danych oceniających długotrwałą efektywność VIT, zwłaszcza po zakończeniu leczenia. Opisano jednak przypadki chorych na mastocytozę, którzy zmarli po użądleniu pomimo wcześniejszej VIT [74]. Na tej podstawie zalecenia EAACI wskazują na długotrwałość, być może trwającą całe życie czas leczenia [10].

Ze względu na występujące działania niepożądane opisywane są metody premedykacji, obejmujące stosowanie leków antyhistaminowych, sterydów, kromoglikanów, monitorowania chorego [21,25], zmianę preparatu na formę depot, a także stosowanie omalizumabu [21,22,25,37,57,74,87,101].

Ze względu na mniejszą efektywność leczenia w porównaniu z populacją ogólną chorzy na mastocytozę powinni stale być zabezpieczeni w zestaw ratunkowy zawierający ampułkostrzykawkę z adrenaliną [1,22,33,35,36,95,96].

Podsumowując wyniki analizy dostępnych danych na temat VIT u chorych na mastocytozę, pomimo niskiej jakości zebranych danych (B – D wg system GRADE), można wysunąć następujące wnioski: (1) chorzy na mastocytozę mają wyższe ryzyko reakcji po użądleniu owadów w porównaniu z populacją ogólną, zwłaszcza po użądleniu przez osę, (2) VIT może być zalecana u chorych na mastocytozę, (3) prawdopodobnie powinna być prowadzona przez całe życie, (4) VIT zmniejsza ryzyko reakcji anafilaktycznej u chorych na mastocytozę, choć jest mniej efektywny niż w populacji ogólnej, (5) u części chorych można rozważyć stosowanie wyższych dawek alergenu jadu, (6) VIT u chorych na mastocytozę związany jest z większą liczbą działań niepożądanych, (7) premedykacja i środki bezpieczeństwa powinny być brane pod uwagę w czasie VIT, (8) pomimo leczenia chorzy powinni być wyposażeni w zestaw ratunkowy z adrenaliną. Ze względu na jakość danych siłę zaleceń ocenić można jako słabą. Mimo tego zmieniły one pogląd wielu ośrodków zajmujących się leczeniem alergii na jady owadów u chorych na mastocytozę i IVA jest obecnie szerzej stosowana w tej grupie chorych.

4.4. Ocena ryzyka alergii na jady owadów u chorych na mastocytozę za pomocą profilu ekspresji genów

Wyniki badań opublikowano w [pracy 5]

Porównanie profilów ekspresji genów u chorych na mastocytozę układową, którzy chorują dodatkowo na alergię na jady owadów, z chorymi, którzy nie doświadczyli nigdy reakcji anafilaktycznej, pozwoliło na określenie genów różnicujących badane grupy. Analiza ich funkcji sugeruje, że nadwrażliwość na jady owadów może być związana ze stopniem zróżnicowania komórek. Profil ekspresji genów chorych, którzy nie doświadczyli reakcji anafilaktycznej po użądleniu, wskazuje na pobudzenie szlaków biorących udział w powstawaniu nowotworów, adhezji komórek, przekazywaniu sygnału szlakiem MAPK, oddziaływaniu białek międzykomórkowych. Tak więc nie sama liczba mastocytów ale ich stopień zróżnicowania może decydować o reakcji na alergen. Stężenia tryptazy i metabolitów histaminy w moczu (świadczące o całkowitej liczbie komórek tucznych) u chorych na mastocytozę i anafilaksję były niższe w porównaniu z chorymi na mastocytozę bez reakcji anafilaktycznych w wywiadzie. Dodatkowym potwierdzeniem tej tezy jest obserwacja kliniczna chorych na agresywne postaci choroby leczonych w Klinikach Alergologii w Groningen i Gdańsku, z których żaden nie podawał objawów alergii. Dodatkowo wyniki badania wskazują na możliwe wykorzystanie ich w praktyce klinicznej w celu różnicowania i modyfikacji leczenia chorych zagrożonych reakcją anafilaktyczną. Zaproponowany profil ekspresji 104 genów umożliwił różnicowanie chorych zagrożonych anafilaksją z wysoką 100% czułością i swoistością, co nie było możliwe przy użyciu dotychczas dostępnych metod. Wyniki tego badania wymagają jeszcze potwierdzenia w innych populacjach, wskazują jednak na możliwość stworzenia nowego narzędzia diagnostycznego. Być może możliwe będzie określenie ryzyka anafilaksji u chorego na mastocytozę, który dotychczas nie odczuwał objawów alergii i wprowadzenie leczenia profilaktycznego postulowanego przez Rueff i wsp. [86].

4.5. Profil ekspresji genów i system regulacji transkrypcji genów w mastocytozie układowej

Wyniki badań opublikowano w [pracy 6]

Porównanie profili ekspresji genów u chorych na mastocytozę układową i u osób zdrowych wykazało bardzo duże różnice w ekspresji pomiędzy porównywanymi grupami. W oparciu o grupę genów o największej różnicy w ekspresji zaproponowano panel 29 transkryptów, która może stać się podstawą do stworzenia nowego narzędzia diagnostycznego w mastocytozie układowej.

Liczba mastocytów we krwi obwodowej, w przeciwieństwie do szpiku kostnego i tkanek, jest niewielka. Różnice w ekspresji określone w niniejszej pracy, wynikają prawdopodobnie z różnicy w ekspresji w innych liniach komórkowych krwi obwodowej. Badania Garcii Montero i wsp. [31] wskazują na występowanie mutacji KIT w innych liniach komórkowych poza mastocytarną, nasze badania wskazują dodatkowo na zmianę ekspresji innych genów poza KIT.

Uzyskane wyniki poddano niezależnej analizie za pomocą analizy systemów regulacji transkrypcji (TSR), która potwierdziła znaczne różnice w ekspresji genów we krwi obwodowej u chorych na mastocytozę układową. Analiza funkcji genów o odmiennej transkrypcji wskazuje na odmienną transkrypcję genów zaangażowanych w szlaki biorące udział w nowotworzeniu, szlaki MAPK, Jak-STAT, p53, cykl komórkowy i apoptozę. Wskazują one również na nowe szlaki, które mogą stać się podstawą do stworzenia nowych leków na mastocytozę. Wyniki analizy ekspresji genów pozwalają na dalsze badania nad zastosowaniem tej techniki u chorych na mastocytozę, zarówno w celu rozpoznania choroby jak i rozpoznania zagrożenia anafilaksją, a być może w przyszłości również innymi chorobami mieloproiferycyjnymi. Konieczne są jednak dalsze badania nad walidacją profilu w innych populacjach i większej grupie chorych.

5. WNIOSKI

1. Wariant MM polimorfizmu genu AGT M235T występuje istotnie częściej u chorych leczonych z powodu alergii na jady owadów, związany jest z większym ryzykiem ciężkiej reakcji po użądleniu, mniejszym stężeniem angiotensyny I. Obserwowane wcześniej upośledzenie działania układu RAS u chorych leczonych z powodu alergii na jady owadów może mieć podłoże dziedziczne związane z mniejszą syntezą angiotensynogenu.
2. Zastosowanie badania polimorfizmu genów może pozwolić na określenie efektywności immunoterapii swoistej jadom owadów.
3. Różnice w ekspresji genów pozwalają na identyfikację chorych na mastocytozę układową zagrożonych reakcją anafilaktyczną po użądleniu przez owada. Dalsze badania mogą pozwolić na stworzenie nowego narzędzia diagnostycznego stosowanego w praktyce klinicznej.
4. Badanie profilu ekspresji genów wykazało istotne różnice w ekspresji genów w krwi obwodowej u chorych na mastocytozę w porównaniu z osobami zdrowymi, które wskazują na nowe możliwości diagnostyczne i terapeutyczne.

6. PIŚMIENICTWO

1. Akin C., Metcalfe D.: The biology of Kit in disease and the application of pharmacogenetics. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004, 114, 1, 13-19.
2. Baba Y., Nishida K., Fujii Y., Hirano T., Hikida M., Kurosaki T.: Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nat. Immunol.* 2008, 9,1,81-88.
3. Bernstein IL., Li JT., Bernstein DI., Hamilton R., Spector SL., Tan R., Golden DB., Khan DA., Nicklas RA., Portnoy JM., Blessing-Moore J., Cox L., Lang DM., Oppenheimer J., Randolph CC., Schuller DE., Tilles SA., Wallace DV., Levetin E., Weber R.: American Academy of Allergy, Asthma and Immunology; American College of Allergy, Asthma and Immunology. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2008,100,3 Suppl.3,1-148.
4. Biedermann T., Ruëff F., Sander CA., Przybilla B.: Mastocytosis associated with severe wasp sting anaphylaxis detected by elevated serum mast cell tryptase levels. *Br. J. Dermatol.* 1999,141,6,1110-1112.
5. Bilò MB., Brianzoni F., Cinti B., Napoli G., Bonifazi F. The dilemma of the negative skin test reactors with a history of venom anaphylaxis: will this always be the case? *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 2005,37,9,341-342.
6. Biló BM., Rueff F., Mosbech H., Bonifazi F., Oude-Elberink JN.; the EAACI Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity*. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy.* 2005,60,11,1339-1349.
7. Birnbaum J., Ramadour M., Magnan A., Vervloet D.: Hymenoptera ultra-rush venom immunotherapy (210 min): a safety study and risk factors. *Clin. Exp. Allergy.* 2003,33,1,58-64.
8. Bonadonna P., Perbellini O., Passalacqua G., Caruso B., Colarossi S., Dal Fior D., Castellani L., Bonetto C., Frattini F., Dama A., Martinelli G., Chilosi M., Senna G., Pizzolo G., Zanotti R.: Clonal mast cell disorders in patients with systemic reactions to Hymenoptera stings and increased serum tryptase levels. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009,123,3,680-686.
9. Bonadonna P., Zanotti R., Caruso B., Castellani L., Perbellini O., Colarossi S., Chilosi M., Dama A., Schiappoli M., Pizzolo G., Senna G., Passalacqua G.: Allergen specific immunotherapy is safe and effective in patients with systemic mastocytosis and Hymenoptera allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008,121,1,256-257.

10. Bonifazi F., Jutel M., Biló BM., Birnbaum J., Muller U.; EAACI Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. *Allergy* 2005,60,12,1459-1470.
11. 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.* 2000,105,6 Pt 1,1231-1235.
12. Brockow K., Jofer C., Behrendt H., Ring J.: Anaphylaxis in patients with mastocytosis: a study on history, clinical features and risk factors in 120 patients. *Allergy.*2008,63,2,226-232.
13. Brožek JL., Akl EA., Alonso-Coello P., Lang D., Jaeschke R., Williams JW., Phillips B., Horvath AR., Bousquet J., Guyatt GH., Schünemann HJ.; GRADE Working Group. Grading quality of evidence and strength of recommendations in clinical practice guidelines. *Allergy.* 2009,64,8,1109-1116.
14. Carmona-Saez P., Chagoyen M., Tirado F., Carazo JM., Pascual-Montano A. GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* 2007,8,1,R3.
15. Carter MC., Robyn JA., Bressler PB., Walker JC., Shapiro GG., Metcalfe DD.: Omalizumab for the treatment of unprovoked anaphylaxis in patients with systemic mastocytosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007,119,6,1550-1551.
16. Charpin D., Birnbaum J., Vervloet D.: Epidemiology of hymenoptera allergy. *Clin. Exp. Allergy.* 1994,24,11,1010-1015.
17. Crijns AP., Fehrmann RS., de Jong S., Gerbens F., Meersma GJ., Klip HG., Hollema H., Hofstra RM., te Meerman GJ., de Vries EG., van der Zee AG. Survival-related profile, pathways, and transcription factors in ovarian cancer. *PLoS Med.* 2009,6,2,e24.
18. Daley T., Metcalfe D., Akin C.: Association of the Q576R polymorphism in the interleukin-4 receptor alpha chain with indolent mastocytosis limited to the skin. *Blood* 2001, 98,3:880-882.
19. D'ambrosio C., Akin C., Wu Y., Magnusson MK., Metcalfe DD. Gene expression analysis in mastocytosis reveals a highly consistent profile with candidate molecular markers. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003,112,6,1162-1170.
20. Fricker M., Helbling A., Schwartz L., Müller U.: Hymenoptera sting anaphylaxis and urticaria pigmentosa: clinical findings and results of venom immunotherapy in ten patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997,100,1,11-15.

21. González de Olano D., Alvarez-Twose I., Esteban-López MI., Sánchez-Muñoz L., de Durana MD., Vega A. García-Montero A., González-Mancebo E., Belver T., Herrero-Gil MD., Fernández-Rivas M., Orfao A., de la Hoz B., Castells MC., Escribano L. Safety and effectiveness of immunotherapy in patients with indolent systemic mastocytosis presenting with Hymenoptera venom anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008,121,2,519-526.
22. Dubois AE.: Mastocytosis and Hymenoptera allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2004,4,4,291-295.
23. Dugas-Breit S., Przybilla B., Schöpf P., Ruëff F.: Possible circadian variation of serum mast cell tryptase concentration. *Allergy.* 2005,60,5,689-692.
24. Eberlein-König B., Varga R., Mempel M., Darsow U., Behrendt H., Ring J.: Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy. *Allergy.* 2006,61,9,1084-5.
25. Engler RJ., Davis WS.: Rush Hymenoptera venom immunotherapy: successful treatment in a patient with systemic mast cell disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994,94,3 Pt 1,556-559.
26. Fehrmann RS., de Jonge HJ., Ter Elst A., de Vries A., Crijns AG., Weidenaar AC., Gerbens F., de Jong S., van der Zee AG., de Vries EG., Kamps WA., Hofstra RM., Te Meerman GJ., de Bont ES. A new perspective on transcriptional system regulation (TSR): towards TSR profiling. *PLoS One.* 2008,3,2,e1656.
27. Fine J. Mastocytosis. *Int. J. Dermatol.* 1980,19,3,117-123.
28. Finegold I. Issues in stinging insect allergy immunotherapy: a review. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2008,8,4,343-347.
29. Florian S., Krauth MT., Simonitsch-Klupp I., Sperr WR., Fritsche-Polanz R., Sonneck K., Födinger M., Agis H., Böhm A., Wimazal F., Horny HP., Valent P.: Indolent systemic mastocytosis with elevated serum tryptase, absence of skin lesions, and recurrent anaphylactoid episodes. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2005,136,3,273-280.
30. Franken HH., Dubois AE., Minkema HJ., van der Heide S., de Monchy JG.: Lack of reproducibility of a single negative sting challenge response in the assessment of anaphylactic risk in patients with suspected yellow jacket hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994,93,2:431-436.
31. Garcia-Montero AC., Jara-Acevedo M., Teodosio C., Sanchez ML., Nunez R., Prados A., Aldanondo I., Sanchez L., Dominguez M., Botana LM., Sanchez-Jimenez F., Sotlar K., Almeida J., Escribano L., Orfao A. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood.* 2006,108,7,2366-2372.

32. Golden DB. Insect sting anaphylaxis. *Immunol. Allergy. Clin. North. Am.* 2007,27,2,261-272.
33. Golden D., Kwiterovich K., Kagey-Sobotka A., Lichtenstein L.: Discontinuing venom immunotherapy: Extended observations. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1998,101,3,298-305.
34. Golden DB., Marsh DG., Freidhoff LR., Kwiterovich KA., Addison B., Kagey-Sobotka A., Lichtenstein LM.: Natural history of Hymenoptera venom sensitivity in adults. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997,100,P Pt 1,760-766.
35. Golkar L., Bernhard J.: Mastocytosis. *Lancet.* 1997,349,9062,1379-1385.
36. Gonera R., Oranje W., Wolffenbittel B.: Shock of unknown origin-think of mastocytosis! *Neth. J. Med.* 1997;50,4,165-169.
37. Gorska L., Chelminska M., Kuziemski K., Skrzypski M., Niedozytko M., Damps-Konstanska I. Szymanowska A., Siemińska A., Wajda B., Drozdowska A., Jutel M., Jassem E.: Analysis of safety, risk factors and pretreatment methods during rush hymenoptera venom immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008,147,3,241-245.
38. Guyatt GH., Oxman AD., Kunz R., Falck-Ytter Y., Vist GE., Liberati A., Schünemann HJ.;GRADE Working Group. Going from evidence to recommendations. *BMJ.* 2008,336,7652,1049-1051.
39. 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.* 2003,33,9,1216-1220.
40. Hermann K., Donhauser S., Ring J.: Angiotensin in Human Leukocytes of Patients with Insect Venom Anaphylaxis and Healthy Volunteers. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1995,107,1-3,385-86.
41. Hermann K., Ring J.: Association between the renin angiotensin system and anaphylaxis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995, 377, 299-309.
42. Hermann J., Ring J.: Human leukocytes contain angiotensin I, angiotensin II and angiotensin metabolites. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1994,103,2,152-59.
43. Hermann K., Ring J.: The renin-angiotensin system in patients with treated anaphylactic reactions during Hymenoptera venom hyposensitization and sting challenge. *Int, Arch, Allergy Immunol.* 1997,112,3,251-256.
44. Hermann K., Ring J.: The renin angiotensin system and hymenoptera venom anaphylaxis. *Clin. Exp. Allergy.* 1993,23,9,762-769.

45. Holla L., Vask A., Znojil V., Sisková L., Vácha J.: Association of 3 gene polymorphisms with atopic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999,103,4,702-8.
46. Ippoliti F., De Santis W., Volterrani A., Lenti L., Canitano N., Lucarelli S., Frediani T.: Immunomodulation during sublingual therapy in allergic children. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2003,14,3,216-221.
47. Jassem E., Niedoszytko M. Mastocytoza rozpoznanie i leczenie. W Fal A.(red): *Alergia, choroby alergiczne, astma. T.2. Medycyna Praktyczna 2011 (w druku)*
48. Jutel M., Akdis M., Blaser K., Akdis CA.: Mechanisms of allergen specific immunotherapy-T-cell tolerance and more. *Allergy.* 2006,61,7,796-807.
49. Kanehisa M., Araki M., Goto S., Hattori M., Hirakawa M., Itoh M., Kawashima S., Okuda S., Tokimatsu T., Yamanishi Y.: KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res.* 2008,36,480-484.
50. Kanehisa M., Goto S., Hattori M., Aoki-Kinoshita KF., Itoh M., Kawashima S., Katayama T., Araki M., Hirakawa M.: From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 2006,34,354-357.
51. Kawabata Y., Yan T., Yokochi T, Matsushita M, Fujita T., Shibasaki M., Noikura T., Endo TY., Takada H.: Complement system is involved in anaphylactoid reactions induced by lipopolisaccharides in muramyldipeptide-treated mice. *Shock* 2000,14,5,572-577.
52. Kazmierska J., Malicki J. Application of the Naïve Bayesian Classifier to optimize treatment decisions. *Radiother. Oncol.* 2008,86,2,211-216.
53. Kazani S., Wechsler ME., Israel E. The role of pharmacogenomics in improving the management of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010,125,2,295-302.
54. Kim JJ., Kim HJ., Lee IK., Chung HT., Lee JH. Association between polymorphisms of the angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen genes and allergic rhinitis in a Korean population. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 2004,113,4,297-302.
55. Konno S., Hizawa N., Nishimura M., Huang SK.: Osteopontin: a potential biomarker for successful bee venom immunotherapy and a potential molecule for inhibiting IgE-mediated allergic responses. *Allergol. Int.* 2006,55,4,355-359.
56. Kononenko I.: Machine learning for medical diagnosis: history, state of the art and perspective. *Artif. Intell. Med.* 2001,23,1,89-109.
57. Kontou-Fili K. High omalizumab dose controls recurrent reactions to venom immunotherapy in indolent systemic mastocytosis. *Allergy.* 2008,63,3,376-378.
58. Kontou-Fili K. Patients with negative skin tests. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2002,2,4,353-357.

59. Kors JW., van Doormaal JJ., de Monchy JG.: Anaphylactoid shock following Hymenoptera sting as a presenting symptom of systemic mastocytosis. *J. Intern. Med.* 1993,233,3,255-258.
60. Kränke B., Sturm G., Aberer W.: Negative venom skin test results and mastocytosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004,113,1,180-181.
61. 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.* 2010,20,2,110-116.
62. Ludolph-Hauser D., Ruëff F., Fries C., Schöpf P., Przybilla B. Constitutively raised serum concentrations of mast-cell tryptase and severe anaphylactic reactions to Hymenoptera stings. *Lancet.* 2001,357,9253,361-362.
63. Mauss V. Potential effects of global warming on hymenoptera biology and the risk of stings. *Allergy* 2009,64,579.
64. Meeker ND., Yang JJ., Schiffman JD.: Pharmacogenomics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Expert Opin. Pharmacother.* 2010,11,10,1621-1632.
65. Mosbech H., Müller U.: Side effects of insect venom immunotherapy: results from an EAACI multicenter study. *Allergy* 2000,55,11,1005-1010.
66. Mueller UR.: Cardiovascular disease and anaphylaxis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2007,7,4,337-341.
67. Mueller HL. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *J. Asthma Res.* 1966,3,4,331-333.
68. Müller UR. New developments in the diagnosis and treatment of hymenoptera venom allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001,124,4:447-453.
69. Müller U., Helbling A., Berchtold E.: Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1992,89,2,529-535.
70. Müller UR., Horat W., Wüthrich B., Conroy M., Reisman RE.: Anaphylaxis after Hymenoptera stings in three patients with urticaria pigmentosa. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1983,72,6,685-689.
71. Nedoszytko B., Nedoszytko M., Lange M., van Doormaal J., Gleń J., Zabłotna M., Renke J., Vales A., Buljubasic F., Jassem E., Roszkiewicz J., Valent P.: Interleukin-13 promoter gene polymorphism -1112C/T is associated with the systemic form of mastocytosis. *Allergy.* 2009,64,2,287-294.

72. Niedoszytko M., Lange M., Chelminska M., Jaśkiewicz K., Piskosz A., Wasag B., Lewandowski K., Mital A., Renke J., Gruchała-Niedoszytko M., Woźniak M., Babińska A., Jassem E.: [Systemic mastocytosis] *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2005,73,3,239-244.
73. Nogales-Cadenas R., Carmona-Saez P., Vazquez M., Vicente C., Yang X., Tirado F., Carazo JM., Pascual-Montano A.: GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res.* 2009,37,317-322.
74. Oude Elberink JN., de Monchy JG., Kors JW., van Doormaal JJ., Dubois AE.: Fatal anaphylaxis after a yellow jacket sting, despite venom immunotherapy, in two patients with mastocytosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997,99,1 Pt 1,153-154.
75. Peavy R., Metcalfe D. Understanding the mechanisms of anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008,8,4,310-315.
76. Piekutowska-Abramczuk D., Olsen RK., Wierzba J., Popowska E., Jurkiewicz D., Ciara E., Oltarzewski M., Gradowska W., Sykut-Cegielska J., Krajewska-Walasek M., Andresen BS., Gregersen N., Pronicka E. A comprehensive HADHA c.1528G>C frequency study reveals high prevalence of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency in Poland. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2010 Sep 3. [Epub ahead of print]
77. Price LA., Safko M.: Bee venom allergy in a patient with urticaria pigmentosa. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1987,79,2,407-409.
78. Pumphrey R., Roberts I.: Postmortem findings after fatal anaphylactic reaction. *J. Clin. Pathol.* 2000,53,4,273-276.
79. Reimers A., Müller U.: Fatal outcome of a *Vespula* sting in a patient with mastocytosis after specific immunotherapy with honey bee venom. *Allergy Clin. Immunol. Int. J. WAO Org.* 2005,17,68-70.
80. Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F., Cambien F., Corvol P., Soubrier F.: An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J. Clin. Invest.* 1990,86,4,1343-46.
81. Roepman P., Jassem J., Smit EF., Muley T., Niklinski J., van de Velde T., Witteveen AT., Rzyman W., Floore A., Burgers S., Giaccone G., Meister M., Dienemann H., Skrzypski M., Kozłowski M., Mooi WJ., van Zandwijk N.: An immune response enriched 72-gene prognostic profile for early-stage non-small-cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2009,15,1,284-290.
82. Ruëff F, Bilò MB, Jutel M, Mosbech H, Müller U, Przybilla B: Sublingual immunotherapy with venom is not recommended for patients with Hymenoptera venom allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009,123,1,272-273.

83. Ruëff F., Przybilla B., Biló MB., Müller U., Scheipl F., Aberer W., Birnbaum J., Bodzenta-Lukaszyk A., Bonifazi F., Bucher C., Campi P., Darsow U., Egger C., Haerberli G., Hawranek T., Körner M., Kucharewicz I., Küchenhoff H., Lang R., Quercia O., Reider N., Severino M., Sticherling M., Sturm GJ., Wüthrich B.: Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase—a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009,124,5,1047-1054.
84. Ruëff F., Przybilla B., Biló MB., Müller U., Scheipl F., Aberer W., Birnbaum J., Bodzenta-Lukaszyk A., Bonifazi F., Bucher C., Campi P., Darsow U., Egger C., Haerberli G., Hawranek T., Kucharewicz I., Küchenhoff H., Lang R., Quercia O., Reider N., Severino M., Sticherling M., Sturm GJ., Wüthrich B.: European Academy of Allergy and Clinical Immunology Interest Group. 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.* 2010;126,1,105-111.
85. Rernick H., Przybilla B., Rueff F.: Venom immunotherapy (VIT) in patients with systemic mastocytosis (SM) and hymenoptera anaphylaxis (HVA): safety and efficacy of different maintenance doses. Abstract no 936, AAAAI 2009 annual meeting.
86. Ruëff F., Placzek M., Przybilla B.: Mastocytosis and Hymenoptera venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin. Immunol.* 2006,6,4,284-288.
87. Ruëff F., Wenderoth A., Przybilla B.: Patients still reacting to a sting challenge while receiving conventional Hymenoptera venom immunotherapy are protected by increased venom doses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001,108,6,1027-1032.
88. Rush JW., Aultman CD.: Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2008,33,1,162-72.
89. Sharabi AB., Aldrich M., Sosic D., Olson EN., Friedman AD., Lee SH., Chen SY.: Twist-2 controls myeloid lineage development and function. *PLoS Biol.* 2008,6,12,e316.
90. Soriano Gomis V., Gonzalez Delgado P., Niveiro Hernandez E.: Failure of omalizumab treatment after recurrent systemic reactions to bee-venom immunotherapy. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2008,18,3,225-256.
91. Stumpf JL., Shehab N., Patel AC.: Safety of Angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with insect venom allergies. *Ann. Pharmacother.* 2006,40,4,699-703.
92. Sturm G., Kränke B., Rudolph C., Aberer W.: Rush Hymenoptera venom immunotherapy: a safe and practical protocol for high-risk patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002,110,6,928-933.

93. Szymański W., Bodzenta-Łukaszyk A. Obraz kliniczny alergii na jady owadów. W red. Nitter-Marszalska M.: Alergia na jad owadów błonkoskrzydłych. Mediton. Łódź 2003.
94. Valent P., Akin C., Escribano L., Födinger M., Hartmann K., Brockow K., Castells M., Sperr WR., Kluin-Nelemans HC., Hamdy NA., Lortholary O., Robyn J., van Doormaal J., Sotlar K., Hauswirth AW., Arock M., Hermine O., Hellmann A., Triggiani M., Nidoszytko M., Schwartz LB., Orfao A., Horny HP., Metcalfe DD.: Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur. J. Clin. Invest.* 2007, 37, 6,435-453.
95. Valent P., Horny HP., Escribano L., Longley BJ., Li CY., Schwartz LB., Marone G., Nuñez R., Akin C., Sotlar K., Sperr WR., Wolff K., Brunning RD., Parwaresch RM., Austen KF., Lennert K., Metcalfe DD., Vardiman JW., Bennett JM.: Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk. Res.* 2001,25,7,603-625.
96. Valent P., Sperr W., Schwartz L., Horny H.: Diagnosis and classification of mast cell proliferative disorders: delineation from immunologic diseases and non-mast cell hematopoietic neoplasms. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004,114,1,3-11.
97. van 't Veer LJ., Dai H., van de Vijver MJ., He YD., Hart AA., Mao M., Peterse HL., van der Kooy K., Marton MJ., Witteveen AT., Schreiber GJ., Kerkhoven RM., Roberts C., Linsley PS., Bernards R., Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002,415,6871,530-536.
98. Vennekens R., Olausson J., Meissner M., Bloch W., Mathar I., Philipp SE., Schmitz F., Weissgerber P., Nilius B., Flockerzi V., Freichel M.: Increased IgE dependent mast cell activation and anaphylactic responses in mice lacking the calcium activated nonselective cation channel TRPM4. *Nat. Immunol.* 2007,8,3,312-320.
99. Volcheck G., Butterfield J., Yunginger J., Klee G.: Elevated serum levels of calcitonin gene-related peptide in Hymenoptera venom anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1998,102,1,149-151.
100. Wagner N., Fritze D., Przybilla B., Hagedorn M., Ruëff F.: Fatal anaphylactic sting reaction in a patient with mastocytosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2008,146,2,162-163.
101. Wenzel J., Meissner-Kraemer M., Bauer R., Bieber T., Gerdson R.: Safety of rush insect venom immunotherapy. The results of a retrospective study in 178 patients. *Allergy.* 2003,58,11,1176-1179.
102. Zimmerli SC., Hauser C. Langerhans cells and lymph node dendritic cells express the tight junction component claudin-1. *J. Invest. Dermatol.* 2007,127,10,2381-2390.