

**PRZYDATNOŚĆ MARKERÓW
AKTYWACJI MASTOCYTÓW
W DIAGNOSTYCE
I MONITOROWANIU
DZIECI UCZULONYCH
NA JAD OWADÓW
BŁONKOSKRZYDŁYCH**

**Klinika Chorób Dzieci Katedry Pediatrii Uniwersytetu Jagiellońskiego
Collegium Medicum**

Kierownik Katedry i Kliniki: Prof. dr hab. n. med. Jacek J. Pietrzyk

ROZPRAWY HABILITACYJNE UNIwersYTETU JAGIELLOŃSKIEGO
COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ LEKARSKI

EWA CICHOCKA-JAROSZ

PRZYDATNOŚĆ MARKERÓW
AKTYWACJI MASTOCYTÓW
W DIAGNOSTYCE
I MONITOROWANIU
DZIECI UCZULONYCH
NA JAD OWADÓW
BŁONKOSKRZYDŁYCH



WYDAWNICTWO UNIwersYTETU JAGIELLOŃSKIEGO

RECENZENT WYDAWNICZY
Prof. dr hab. n. med. Barbara Rogala

PROJEKT OKŁADKI
Dorota Heliasz

REDAKTOR PROWADZĄCY
Dorota Węgierska

ADIUSTACJA JĘZYKOWO-STYLISTYCZNA
Katarzyna Jagiela

KOREKTOR
Małgorzata Szul

SKŁAD I ŁAMANIE
Hanna Wiechecka

Publikacja sfinansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego
Nr N N407 254 134.

© Copyright by Ewa Cichocka-Jarosz & Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego
Wydanie I, Kraków 2011
All rights reserved

ISBN 978-83-233-3264-0



www.wuj.pl

Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego
Redakcja: ul. Michałowskiego 9/2, 31-126 Kraków
tel. 12-631-18-81, tel./fax 12-631-18-83
Dystrybucja: tel. 12-631-01-97, tel./fax 12-631-01-98
tel. kom. 506-006-674, e-mail: sprzedaz@wuj.pl
Konto: PEKAO SA, nr 80 1240 4722 1111 0000 4856 3325

*Mojemu Nauczycielowi,
Panu Profesorowi Jackowi J. Pietrzykowi,
składam serdeczne podziękowania i wyrazy wdzięczności.*

*Wszystkim,
którzy w jakikolwiek sposób okazali mi pomoc
podczas realizacji niniejszej pracy,
serdecznie dziękuję.*

SPIS TREŚCI

SKRÓTY	11
1. WSTĘP	15
1.1. Epidemiologia i historia naturalna alergii na jad owadów błonkoskrzydłych – skala problemu	15
1.2. Źródła alergenów	16
1.3. Rodzaje odczynów po użądleniach owadów	20
1.4. Rola mastocytów w patomechanizmie reakcji alergicznej na jad owadów	21
1.4.1. Mediatory preformowane	24
1.4.2. Mediatory syntetyzowane <i>de novo</i> – leukotrieny i prostaglandyny	25
1.4.3. Cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu	29
1.5. Podstawy diagnostyki w alergii na jad owadów błonkoskrzydłych	29
1.6. Podstawy leczenia alergii na jad owadów błonkoskrzydłych	30
2. UZASADNIENIE, CEL PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE	35
2.1. Uzasadnienie	35
2.2. Cel pracy	35
2.3. Hipotezy badawcze	36
3. ETAPY I PROTOKÓŁ BADANIA	37
4. MATERIAŁ I METODY – WPROWADZENIE	39
4.1. Materiał	40
4.1.1. Charakterystyka grupy dzieci zakwalifikowanych do immunoterapii swoistej na jad owadów	40
4.1.2. Charakterystyka grupy dzieci niezakwalifikowanych do immunoterapii swoistej na jad owadów	43
4.1.3. Charakterystyka grupy kontrolnej	44
4.1.4. Zgoda pacjenta na badanie i przetwarzanie danych osobowych	44
4.2. Metody	44
4.2.1. Wywiad chorobowy	44
4.2.2. Metody diagnostyki alergii zależnej od IgE w reakcji po użądleniu owadów błonkoskrzydłych	45
4.2.2.1. Punktowe testy skórne	45
4.2.2.2. Testy śródskórne	46
4.2.2.3. Badania laboratoryjne oznaczania swoistych i całkowitych przeciwciał IgE w surowicy krwi	46

4.2.2.3.1. Metodyka oznaczania swoistych przeciwciał klasy E (sIgE)	46
4.2.2.3.2. Metodyka oznaczania całkowitych przeciwciał klasy E (cIgE)	47
4.2.3. Metody laboratoryjne oznaczania wskaźników aktywacji mastocytów	47
4.2.3.1. Metodyka oznaczania tryptazy	47
4.2.3.2. Metodyka oznaczania metabolitów PGD ₂ w osoczu i w moczu	48
4.2.3.2.1. Metodyka oznaczania 9α,11β-PGF ₂ w osoczu i moczu	48
4.2.3.2.2. Metodyka oznaczania tetranor-PGD-M w moczu.....	48
4.2.4. Metoda immunoterapii swoistej.....	53
4.2.5. Metody analizy statystycznej	59
5. WYNIKI	61
5.1. Porównanie zależności pomiędzy reakcją kliniczną po użądleniu a podłożem zależnym od IgE i markerami aktywacji mastocytów w grupie dzieci leczonych metodą immunoterapii	61
5.2. Porównanie podstawowych wartości markerów aktywacji mastocytów pomiędzy grupami badanych.....	63
5.3. Model opisujący immunoterapię swoistą na jad owadów dawką wstępną podaną metodą szybką (<i>rush</i>) vs bardzo szybką (<i>ultra-rush</i>).....	65
5.3.1. Ocena markerów aktywacji mastocytów w grupie dzieci odczulanych ekstraktem jadu pszczoły	67
5.3.1.1. Ocena dynamiki stężenia tryptazy w surowicy krwi	67
5.3.1.2. Ocena dynamiki stężenia 9α,11β-PGF ₂ w osoczu	69
5.3.1.3. Ocena dynamiki stężenia 9α,11β-PGF ₂ w moczu	70
5.3.1.4. Ocena dynamiki stężenia tetranor-PGD-M w moczu	71
5.3.2. Ocena parametrów aktywacji mastocytów w grupie dzieci odczulanych ekstraktem jadu osy	73
5.3.2.1. Ocena dynamiki stężenia tryptazy w surowicy krwi	73
5.3.2.2. Ocena dynamiki stężenia 9α,11β-PGF ₂ w osoczu	74
5.3.2.3. Ocena dynamiki stężenia 9α,11β-PGF ₂ w moczu	75
5.3.2.4. Ocena dynamiki stężenia tetranor-PGD-M w moczu	77
5.4. Model opisujący zmianę markerów aktywacji mastocytów w przebiegu immunoterapii swoistej na jad owadów dawką podtrzymującą i czynniki warunkujące tę zmianę	78
5.4.1. Immunoterapia swoista ekstraktem jadu pszczoły	79
5.4.1.1. Ocena dynamiki stężenia tryptazy	79
5.4.1.2. Ocena dynamiki stężenia 9α,11β-PGF ₂ w osoczu.....	81
5.4.1.3. Ocena dynamiki stężenia 9α,11β-PGF ₂ w moczu	83
5.4.1.4. Ocena dynamiki stężenia tetranor-PGD-M w moczu	86
5.4.1.5. Ocena dynamiki stężenia sIgE dla jadu pszczoły	88
5.4.2. Immunoterapia ekstraktem jadu osy	90
5.4.2.1. Ocena dynamiki stężenia tryptazy w surowicy krwi	90
5.4.2.2. Ocena dynamiki stężenia 9α,11β-PGF ₂ w osoczu.....	92
5.4.2.3. Ocena dynamiki stężenia 9α,11β-PGF ₂ w moczu	94
5.4.2.4. Ocena dynamiki stężenia tetranor-PGD-M w moczu	96
5.4.2.5. Ocena dynamiki stężenia sIgE dla jadu osy.....	98
5.5. Ocena poczucia lęku przed użądleniem	100

6. OMÓWIENIE	101
6.1. Charakterystyka grupy i zachowania się stężeń podstawowych badanych markerów aktywacji komórek tucznych w grupie dzieci uczulonych zakwalifikowanych do immunoterapii (przed leczeniem), uczulonych niezakwalifikowanych i dzieci zdrowych	101
6.2. Wpływ leczenia wstępnego według protokołu szybkiego (<i>rush</i>) vs bardzo szybkiego (<i>ultra-rush</i>) na stężenie markerów aktywacji mastocytów i czynniki modyfikujące ten proces	105
6.3. Wpływ leczenia dawką podtrzymującą na stężenie markerów aktywacji mastocytów i czynniki modyfikujące ten proces	109
7. WNIOSKI	115
8. STRESZCZENIE	117
9. ABSTRACT	121
PIŚMIENNICTWO	125
SPIS TABEL	135
SPIS RYCIN	139
ZAŁĄCZNIK	141

SKRÓTY

- [²H₆] PGD-M – tetranor-PGD-M znakowany deuterem
- [²H₄] PGF₂α – prostaglandyna F₂α znakowana deuterem
- 5-LO – 5-lipooksygenaza
- 95% PU – 95% przedział ufności
- 9α,11β-PGF₂ – stereoizomer PGF_{2α}, produkt działania syntazy PGF
- AAAAI – Amerykańska Akademia Alergii, Astmy i Immunologii
- ACE – konwertaza angiotensyny (*angiotensin converting enzyme*)
- Api m1* – fosfolipaza A₂ jadu pszczoły
- Api m2* – hialuronidaza jadu pszczoły
- Api m4* – melityna jadu pszczoły
- BSTFA – trifluoro-N,O-bis-(trimetylosilylo)-acetamid
- CCD – reagujące krzyżowo determinanty węglowodanowe (*cross reacting carbohydrate determinants*)
- CD117 (*c-kit*) – receptor dla czynnika wzrostu komórek tucznych
- CD34 – wielopotencjalne komórki pnia szpiku kostnego
- CD₄Th₂ – limfocyty pomocnicze o fenotypie Th₂
- CD₈⁺Tc2 – limfocyty cytotoksyczne
- CGRP – peptyd związany z genem dla kalcytoniny (*calcitonine gene related peptide*)
- COX-1, COX-2 – cyklooksygenaza
- CRD – rozpoznanie alergii na podstawie indywidualnej odpowiedzi na alergeny główne (*component resolved diagnosis*)
- CRTh₂ – receptor dla prostaglandyny D₂ (*chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th₂ cells*)
- CXCR2 – receptor dla chemokin
- DIPE – diizopropylloetyloamina
- DP – błonowy receptor dla prostaglandyny D₂ związany z białkiem G (*prostanoid receptor*)
- EAACI – Europejska Akademia Alergologii i Immunologii Klinicznej
- EIA – test immunoenzymatyczny (*enzyme immunosorbant assay*)

- FLAP – białko aktywujące 5-lipooksygenazę (*5-lipooksygenase activating protein*)
- FP – błonowy receptor związany z białkiem G
- GC-MS-NICI – chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas, techniką ujemnej jonizacji chemicznej (*gas chromatography-mass spectrometry-negative ion chemical ionization*)
- GM-CSF – czynnik wzrostu granulocytów/makrofagów (*granulocyte/macrophage colony stimulating factor*)
- H₁, H₂, H₃, H₄ – receptory błonowe dla histaminy, związane z białkami G
- HPLC – wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa
- ICD – międzynarodowy wykaz chorób (International Classification of Diseases)
- IgE – immunoglobulina klasy E
- IL – interleukina
- ILT – transkrypt podobny do immunoglobuliny (*immunoglobulin-like transcript*)
- MAcCAM-1 – cząsteczka adhezyjna błon śluzowych (*mucosal addressin cell adhesion molecule 1*)
- MAPK – kinaza proteinowa aktywująca mitogen (*mitogen-activated protein kinase*) mastocytów MC_T – mastocyty zawierające wyłącznie tryptazę
- NANC – układ nieadrenergiczny niecholinergiczny (*non-adrenergic non-cholinergic*)
- NGF – czynnik wzrostu nerwów (*nerve growth factor*)
- PAF – czynnik aktywujący płytki (*platelet activating factor*)
- PAMP – receptory wzorca molekularnego związanego z patogenami (*patogen associated molecular pattern*)
- PAR – receptor aktywujący proteazy (*protease-activated receptor*)
- PFBBr – bromek pentafluorobenzylowy
- PGD₂ – prostaglandyna D₂
- PGF – prostaglandyna F
- PI3K – kinaza-3-fosfatydyloinozytolu
- PLC – fosfolipaza C
- PTS – punktowe testy skórne
- RANTES – chemokina (*regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*)
- rApi m1*, *rVes v5* – rekombinowane alergeny główne jadu pszczoły miodnej i jadu osy (*Vespula*)
- RAST-FEIA – test pozwalający na weryfikację podwójnego uczulenia (*radioallergosorbent test – fluorescent enzyme immunoassay*)
- receptor FcεRI – receptor o dużym powinowactwie do IgE
- RRW – receptory rozpoznające wzorzec
- rush* – metoda szybka immunoterapii swoistej
- SCF – czynnik komórek pnia (*stem cell factor*)
- Siglec-8 – podobna do immunoglobuliny lektyna 8 wiążąca kwas sialowy

- SIM – metoda monitorowania wybranych jonów (*selected ion monitoring*) w chromatografii gazowej
- SSR – systemowe objawy uboczne (*systemic side reaction*)
- STAT – białko przekazujące sygnały i aktywujące transkrypcję (*signal transducer and activators of transcription*)
- tetranor-PGD-M – kwas 9 α ,11 β -dihydroksy-15-keto-2,3,18,19-tetranorprost-5-ene-1,20-dikarboksylowy
- tetranor-PGE-M – kwas 9,15-diokso-11 α -hydroksy-13,14-dihydro-2,3,4,5-tetranorprostan-1,20-dioinowy
- TLC – chromatografia cienkowarstwowa (*thin layer chromatography*)
- TMS – grupy trimetylosilyłowe
- TNF- α – czynnik martwicy nowotworu (*tumor necrosis factor*)
- TRAIL ligand – liganda związana z TNF wywołująca apoptozę (*TNF-related apoptosis inducing ligand*)
- Treg Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ – limfocyty regulatorowe o ekspresji antygenów powierzchniowych (*cluster of differentiation*) CD25⁺ CD4⁺ i czynnika transkrypcyjnego Foxp3⁺ (*forkhead box p 3*)
- ultra-rush* – metoda bardzo szybka immunoterapii swoistej
- VCAM-1 – cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonna (*vascular cell adhesion molecule 1*)
- Ves v1* – fosfolipaza A₁ jadu osy
- Ves v2* – hialuronidaza jadu osy
- Ves v5* – antygen 5 jadu osy
- VIP – naczynioruchowy peptyd jelitowy (*vasoactive intestinal peptide*)
- VIT – immunoterapia swoista na jad owadów (*venom immunotherapy*)

1. WSTĘP

1.1. Epidemiologia i historia naturalna alergii na jad owadów błonkoskrzydłych – skala problemu

Prace epidemiologiczne poświęcone odczynom po użądleniach owadów są nieliczne, a podczas interpretacji wyników trzeba uwzględnić różnice w metodologii, które mogą powodować, że ich wyniki nie są porównywalne. Metodologia badań może opierać się na:

1. retrospektywnej analizie dokumentacji lekarskiej, w tym wizyt na oddziałach ratunkowych, z uwzględnieniem rozpoznania wg międzynarodowego wykazu chorób (ICD),
2. przekrojowych badaniach ankietowych (ang. *cross-sectional investigational research*),
3. ocenie wyników badań diagnostycznych *in vivo* i *in vitro* wykrywających uczulenie na jad,
4. połączeniu tych metod.

W kwestionariuszowych badaniach epidemiologicznych 56,6–94,5% dorosłych respondentów (w zależności od warunków klimatycznych) zgłasza użądlenie przez błonkówki przynajmniej jeden raz w życiu. Częstość występowania uczulenia na jad owadów oceniana na podstawie dodatniego wyniku testów skórnych i/lub dodatniego wyniku oznaczeń swoistych IgE w surowicy w dorosłej populacji osób niereagujących objawowo na użądlenie wynosi 9,3–28,7%, a u osób o dużej ekspozycji na użądlenia (pszczelarze) dochodzi do 30–60%. Klinicznie oceniane reakcje alergiczne na użądlenia dzieli się na odczyny miejscowe i systemowe. Częstość występowania dużych odczynów miejscowych po użądleniu szacuje się na 2,4–26,4% populacji ogólnej, a do 38% u pszczelarzy [1]. Według danych europejskich częstość występowania reakcji systemowych w populacji ogólnej wynosi 0,3–7,5%, a u pszczelarzy 14–43% [2]. Zgony w przebiegu anafilaksji systemowej po użądleniach owadów należą do rzadkości (0,03–0,48 zgonów na 1 milion mieszkańców na rok) [3]. W Niemczech w latach 1990–2006 odnotowano 335 zgonów (co odpowiada 0,246 zgonu na 1 milion mieszkańców na rok), w których bezpośrednią przyczyną było użądlenie owada (osy, pszczoły, szerszenia). Zdaniem autorów dane te są niedoszacowane [4]. Najwięcej badań europejskich dotyczących epidemiologii alergii na jad owadów u dzieci jest prowadzonych w rejonie basenu Morza Śródziemnego. Częstość występowania reakcji alergicznych oszacowana

na podstawie danych kwestionariuszowych wynosi 19,4%, w tym reakcji systemowych 0,34%. Częstość występowania uczulenia oceniana na podstawie wyników testów skórnych waha się w granicach 1,02–2,98%, w zależności od gatunku owada [5]. U dzieci łagodne odczyny systemowe mają tendencję do samoograniczania się wraz z wiekiem, choć mechanizm tego zjawiska próbowano wyjaśnić jedynie w nielicznych pracach. W badaniach europejskich [6, 7] dotyczących przyczyn anafilaksji u dzieci użądlenia owadów plasują się na drugim miejscu po pokarmach (najczęstszym czynnikiem przyczynowym są orzechy arachidowe), w badaniach australijskich zaś na trzecim miejscu po pokarmach i lekach [8]. Częstość ich występowania oszacowana na podstawie rozpoznai szpitalnych (wizyty na oddziałach ratunkowych) waha się od 7,3% (Belgia), poprzez 13% (Niemcy), aż do 22% w Stanach Zjednoczonych [1]. Największe ryzyko zgonu w przebiegu anafilaksji u dzieci bez względu na czynnik wywołujący związane jest ze współistnieniem astmy [9]. W żadnej pracy nie odnotowano zgonów u dzieci w przebiegu reakcji po użądleniu.

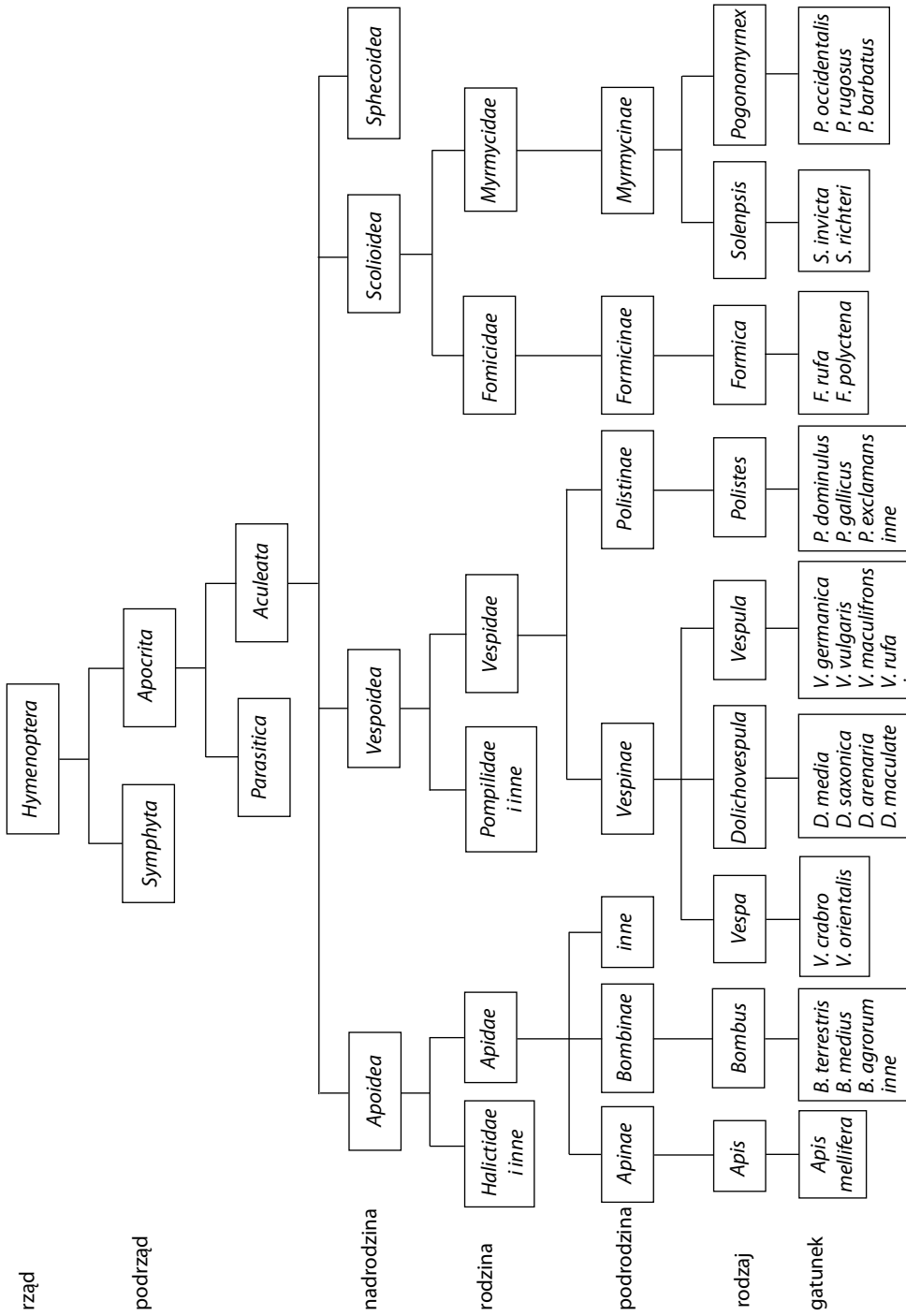
W Polsce jedyne dwa badania epidemiologiczne dotyczące alergii na jad owadów zostały przeprowadzone na Dolnym Śląsku, każde w dwóch etapach. Pierwszy etap stanowiło badanie kwestionariuszowe wypełniane samodzielnie przez pacjenta, drugi służył obiektywizacji danych poprzez ponowne wypełnienie kwestionariusza przy pomocy lekarza przez losowo wybraną grupę pacjentów, którzy w kwestionariuszu udzielili twierdzącej odpowiedzi na pytania dotyczące reakcji alergicznej na jad owadów. W pierwszym badaniu, dotyczącym populacji 1000 osób, wyniki pierwszego etapu badania wskazywały na częstość występowania odczynów na użądlenia w 20,7%, w tym 16% dużych reakcji miejscowych i 12,9% reakcji systemowych (8,7% – pokrzywka, 2,5% – obrzęk naczynioruchowy, 1,5% – objawy ze strony dróg oddechowych, 0,2% – utrata przytomności). Wyniki drugiego etapu badania potwierdziły dużą zgodność częstości występowania ciężkich odczynów systemowych po użądleniu, ale jednocześnie wykazały małą zgodność z łagodnymi odczynami systemowymi i dużą reakcją miejscową [10]. Drugie badanie, obejmujące populację 2050 respondentów z Wrocławia i jego okolic, dało podobne wyniki, co wskazuje na to, że samodzielne wypełnienie kwestionariusza przez chorego może zaowocować zawyżeniem częstości występowania zarówno dużych odczynów miejscowych, jak i łagodnych odczynów systemowych [11]. W Polsce nie prowadzono dotychczas odrębnych badań epidemiologicznych dotyczących częstości występowania alergii na jad owadów u dzieci.

1.2. Źródła alergenów

Większość autorów w pracach poświęconych owadom tworzącym struktury społeczne i zamieszkującym w pobliżu skupisk ludzi używa taksonomii według Chinery'ego, zgodnie z którą żądłówki (*Aculeata*) stanowią podrząd błonkówek (*Hymenoptera*), a do niego zaliczają się nadrodziny pszczołowatych (*Apidae*), osowatych (*Vespidae*) i mrówkowatych (*Formicidae*). Głównymi przedstawicielami pszczołowatych są rodzaje: pszczoła (z gatunkiem pszczoła miodna *Apis mellifera*) i trzmiel (*Bombus*), a osowatych: podrodziny *Vespinae* oraz *Polistinae* (typowa dla rejonu basenu Morza Śródziemnego). Podrodzina *Vespinae* reprezentują trzy rodzaje: osa (*Vespula*), osa krótkogłowa (*Dolichovespula*) i szer-

szeń (*Vespa*) (ryc. 1) [2, 12]. W praktyce w Europie największe znaczenie mają odczyny po użądleniach pszczoły miodnej i osy (gatunki *V. germanica* i *V. vulgaris*). Uczulenie na jad pszczoły dotyczy przede wszystkim populacji zamieszkujących tereny o charakterze użytków rolnych, gdzie mieszkańcy zawodowo zajmują się pszczelarstwem, co wiąże się z dużą ekspozycją na użądlenia tego gatunku. Obserwuje się rozbieżności w nazewnictwie poszczególnych gatunków owadów stosowanym w Europie i Stanach Zjednoczonych [2].

Istnieją zasadnicze różnice w morfologii błonkówek, charakterystyce ich użądleń oraz składnikach jadu. Samica pszczoły zdolna jest do pojedynczego użądlenia. Żądłacz, pozostawia w skórze człowieka aparat żądłaczy (żańdo wraz z zawierającym jad woreczkiem jadowym, mięśniami i zwojem nerwowym), którego fizjologia powoduje dalsze zagłębianie się w tkankach i powolne, opóźnione opróżnianie woreczka z pozostałego jadu. Uwalniana przez pszczołę dawka jadu waha się w zakresie 50–140 µg, podczas gdy zawartość woreczka jadowego może stanowić nawet > 300 µg jadu. Do rozwoju alergii na jad pszczoły dochodzi najczęściej w przypadku dużego narażenia na kontakt z owadami i powtarzających się użądleń. Osy, które nie pozostawiają żądła w skórze, zdolne są do wielokrotnych użądleń, a uwalniana dawka jadu wynosi 1,7–3,1 µg [2]. Istotne różnice pomiędzy jadem osy a jadem pszczoły dotyczą nie tylko dawki uwalnianego jadu oraz zawartości alergenów głównych, ale także tego, że jad osy cechuje się większą zawartością związków niskocząsteczkowych o dużej lokalnej cytotoxycznosci, zwłaszcza histaminy, serotoniny, mastoparanu i kinin [13]. Użądlenia przez trzmiele i szerszenia obserwuje się sporadycznie. Dawka jadu uwalniana przez szerszenia europejskiego nie jest znana, ale zawartość suchej masy jadu w woreczku jadowym szerszenia wynosi 260 µg. Wiedza na temat składu jadu i struktury jego alergenów stanowi podstawę właściwej diagnostyki oraz leczenia alergii na jad owadów błonkoskrzydłych. W przypadku pszczoł jad uzyskuje się z woreczka jadowego owadów metodą elektrostymulacji Bentona [14]. Metoda pozyskiwania jadu os ze źródeł naturalnych jest trudniejsza i polega na pozyskiwaniu pęcherzyków jadowych od indywidualnych owadów po wcześniejszym poddaniu całego gniazda narkozie, a następnie jego głębokim zamrożeniu. Po odmrożeniu poszczególnym osobnikom usuwa się narządy żądłace, by wyizolować pęcherzyki jadowe i uzyskać z nich jad [15]. Taka technika podyktowana jest względami bezpieczeństwa. Do rozdzielenia składników jadu na frakcje zależne od ich ciężaru cząsteczkowego stosuje się klasyczną chromatografię z zastosowaniem sefadesu lub biożelu. Dalszą analizę i rozkład składników umożliwiają: automatyczna chromatografia jonowymienna, chromatografia powinowactw, elektroforeza wysokonapięciowa, chromatografia cienkowarstwowa odwrotnej fazy oraz spektrometria masowa [13]. Dzięki tym metodom poznano budowę i sekwencję aminokwasową składników jadu *Hymenoptera*. W przypadku wielu z nich znana jest także struktura trójwymiarowa [16]. Dzięki metodom inżynierii genetycznej powstają rekombinowane analogi alergenów jadu (Protein Database, www.allergen.org). Systematyczna nomenklatura oczyszczonych alergenów wchodzących w skład jadu oparta jest na skrótach wg Linneusza, a cyfry arabskie wskazują na chronologię ich odkrywania. Procedura jest zgodna z wytycznymi Allergen Sub-Committee of the World Health Organization and International Union of Immunological Societies [17]. Zasadnicze składniki jadu obejmują enzymy i białka zasadowe o właściwościach alergenów oraz liczne substancje drobnocząsteczkowe. Ze względu na rolę biologiczną alergeny dzieli się na główne i mniejsze, przyjmując za kryterium rozróżnienia pomiędzy nimi odsetek >50% osób uczulonych, u których stwierdza się dodatnie swoiste przeciwciała IgE dla danego składnika jadu [18].



Ryc. 1. Taksonomia owadów błonkoskrzydłych (Hymenoptera) według Chinery'ego (Bilo B.M., Allergy 2005; 60: 1339–1349, Przedruk: Med. Prak., Wydanie specjalne 3/2006 Rozpoznanie, profilaktyka i leczenie alergii na jad owadów błonkoskrzydłych)

Najważniejszymi alergenami głównymi jadu pszczoły miodnej są fosfolipaza A₂ (*Api m1*), enzym o działaniu cytotoksycznym, oraz hialuronidaza (*Api m2*) o sekwencji aminokwasów w 50% zgodnej z hialuronidazą jadu osy. Inny składnik, melityna (*Api m4*), stanowiący 50% suchej masy jadu pszczoły, należy do alergenów mniejszych, wykazuje natomiast silne działanie cytotoksyczne. Nadrzędnymi składnikami i alergenami głównymi jadu osy są fosfolipaza A₁ (*Ves v1*), hialuronidaza (*Ves v2*) oraz antygen 5 (*Ves v5*). Dodatkowo w skład jadu obu gatunków owadów wchodzi substancje drobnocząsteczkowe (histamina, katecholaminy) i peptydy (w jadzie pszczoły apamina, peptyd MCD, tertiapina, kardiopeptyd, w jadzie osy – mastoparan, kininy) o lokalnie dużym potencjale cytotoksycznym, którego zakres może się rozszerzać w przypadku użądleń mnogich. Charakterystykę znanych alergenów będących składnikami jadu pszczoły i osy przedstawiono w tabeli 1 [19].

Tabela 1

Znane alergeny jadu pszczoły (*Apis mellifera*) i jadu osy (*Vespula vulgaris*) [19]

Alergen	Nazwa zwyczajowa/ funkcja	Masa cząsteczkowa (kDa)	Potencjalne miejsca N-glikozylacji	% suchej masy jadu
<i>Api m 1</i>	fosfolipaza A2	17	1	10–12
<i>Api m 2</i>	hialuronidaza	45	2	1–3
<i>Api m 3</i>	kwaśna fosfataza	49	2-3	1
<i>Api m 4</i>	melityna	3	0	50
<i>Api m 5</i>	alergen C/dipeptydyl peptydaza IV	100	5–7	1
<i>Api m 6</i>	bogaty w cysteinę inhibitor trypsyny	8	0	1–2
<i>Api m 7</i>	CUB proteaza serynowa	39	2–4	?
<i>Api m 8</i>	karboksylesteraza	70	4	?
<i>Api m 9</i>	karoksypeptydaza serynowa			
<i>Api m 10</i>	ikarapina-białko bogate w węglowodany	55	3	?
<i>VP 58</i>		58	3	?
<i>VP 60</i>		60	4–5	?
<i>VP 200</i>		200	1–2	?
<i>Ves v 1</i>	fosfolipaza A1	35	0	6–14
<i>Ves v 2a</i>	hialuronidaza	42	2–4	1–3
<i>Ves v 2b</i>	hialuronidaza	42	2	
<i>Ves v 3</i>	DPP IV	100	3	1
<i>Ves v 4</i>	CUB proteaza	42	2–4	?
<i>Ves v 5</i>	antygen 5	25	0	5–10
<i>Ves v 200 kd</i>		200	?	?

1.3. Rodzaje odczynów po użądleniach owadów

Ekspozycja na jad owadów błonkoskrzydłych prowadzi zarówno do miejscowych, jak i (rzadziej) ciężkich, zagrażających życiu, systemowych reakcji nadwrażliwości. Wydaje się, że zjawisko to jest związane z kilkoma czynnikami:

- 1) podskórnym wnikaniem alergenu, co powoduje jego większe stężenie *in situ*;
- 2) liczbą, wieloalergenowością i fizycznymi właściwościami alergenów jadu, które w większości są niskocząsteczkowymi białkami łatwo dyfundującymi do krążenia;
- 3) chemicznymi właściwościami składników jadu, z których większość wykazuje aktywność enzymatyczną w stosunku do fosfolipidów błon komórkowych, warunkując lokalnie toksyczne działanie;
- 4) dostępnością komórek tłuszczowych, które w skórze mają znacznie bogatszą reprezentację niż w innych tkankach ustroju.

Wszystkie te elementy sprawiają, że ekspozycja na jad owadów u osób uczulonych może przebiegać w postaci ciężkich reakcji systemowych.

Wśród reakcji klinicznych na użądlenia owadów wyróżnia się:

- 1) prawidłową reakcją miejscową;
- 2) dużą reakcją miejscową;
- 3) uogólnioną reakcją anafilaktyczną;
- 4) reakcje nietypowe;
- 5) reakcje toksyczne.

Prawidłowa reakcja miejscowa po użądleniu to brak odczynu lub obrzęk o średnicy < 10 cm, rumień i świąd utrzymujące się krócej niż 24 godziny, ustępujące samoistnie.

Duża reakcja miejscowa to obrzęk o średnicy > 10 cm utrzymujący się ponad 24 godziny. Alergiczne reakcje miejscowe, nawet bardzo rozległe, stanowią łagodną postać odczynu alergicznego. Szczególną sytuacją jest użądlenie w okolicę głowy, szyi lub jamy ustnej, gdy duża reakcja miejscowa może stanowić zagrożenie życia. Szybko narastający obrzęk okolicznych tkanek może wówczas prowadzić do ostrej niedrożności dróg oddechowych. Konieczne jest agresywne leczenie zgodnie ze stopniem ciężkości objawów oraz rozważenie intubacji dotchawiczej [20].

Zgodnie z definicją Amerykańskiej Akademii Alergii, Astmy i Immunologii (AAAAI) kryteria **anafilaksji** są spełnione w przypadku wystąpienia w ciągu kilku minut do kilku godzin od zadziałania bodźca co najmniej jednej z trzech możliwych sytuacji:

- 1) ostrego początku objawów z manifestacją skórą i/lub ze strony błon śluzowych oraz objawami ze strony co najmniej jednego narządu – układu oddechowego, układu krążenia (spadek ciśnienia tętniczego, zaburzenia funkcji narządów końcowych, gdy czynnik wywołujący jest nieznan);
- 2) co najmniej dwóch spośród wymienionych objawów wkrótce po ekspozycji na prawdopodobny alergen: zajęcie skóry lub błon śluzowych, niewydolność oddechu, spadek ciśnienia z towarzyszącymi objawami lub przedłużające się objawy żołądkowo-jelitowe;
- 3) spadku ciśnienia tętniczego po ekspozycji na znany, uczulający danego chorego alergen: spadek poniżej dolnej granicy normy dla wieku lub poniżej 30% w porównaniu z wartościami wyjściowymi [21].

Wartości określane jako spadek ciśnienia tętniczego zależą od wieku dziecka (zob. tab. 3). W przypadku alergii na jad owadów uogólniona reakcja obejmuje objawy systemowe na ogół ze strony:

- 1) skóry (uogólniona pokrzywka, obrzęk naczyńioruchowy);
- 2) przewodu pokarmowego (wymioty, ból brzucha, biegunka);
- 3) układu oddechowego (obrzęk krtani, obturacja oskrzeli);
- 4) układu sercowo-naczyniowego (spadek ciśnienia tętniczego, wstrząs anafilaktyczny).

Zwraca się uwagę na rolę mastocytów mięśnia sercowego w rozwoju niewydolności serca i zgonu z przyczyn sercowych podczas anafilaksji, w tym na występowanie zespołu Kounis, czyli ostrego zespołu wieńcowego pod wpływem mediatorów (histaminy, leukotrienu C₄, prostaglandyny D₂), uwalnianych z komórek tłuszczowych naczyń wieńcowych u dorosłych i dzieci [22, 23]. Klasyfikacja uogólnionych odczynów anafilaktycznych opiera się na skali Muellera lub skali Ringa [2]. W ocenie objawów neurologicznych pod postacią zmienionego stanu świadomości stosuje się skalę Glasgow.

Reakcje nietypowe występują po upływie kilku godzin lub kilku dni od użądlenia. Najczęściej są to objawy neurologiczne: zespół Guillaina i Barrégo, zapalenie nerwów obwodowych, napady padaczkowe i zespoły psychotyczne. Mechanizm uszkodzenia układu nerwowego nie został dotychczas poznany. Do innych reakcji nietypowych zalicza się zespół nerczycowy, płamicę Schönleina i Henocha oraz chorobę posurowiczą. Reakcje nietypowe mogą towarzyszyć klasycznej reakcji alergicznej miejscowej lub uogólnionej.

Reakcje toksyczne to objawy ujawniające się po mnogich użądleniach. W wyniku ich wystąpienia może dojść do zgonu. W przypadku większości dzieci dawkę śmiertelną stanowi równoważność 500 użądleń przez pszczołę [2]. Duża sumaryczna dawka jadu wyzwała objawy uszkodzenia wielonarządowego. Poza zmianami skórnymi obserwuje się ogólne osłabienie, wymioty, biegunkę, skurcz oskrzeli, często również objawy obrzęku płuc. Mogą wystąpić objawy psychozy i uszkodzenia wzroku. Toksyczne oddziaływanie fosfolipazy i melityny zawartych w jadzie jest przyczyną hemolizy, martwicy rozprzecznej mięśni prądkowanych, trombocytopenii i hemoglobinurii. Po kilku dniach od użądlenia może wystąpić niewydolność nerek.

Po użądleniu może dojść do rozwoju przewlekłej choroby, jeśli wystąpi zawał serca, zatorowość lub zakrzepica. Ciężka reakcja anafilaktyczna u kobiety ciężarnej związana jest z ryzykiem zgonu płodu lub uszkodzenia jego ośrodkowego układu nerwowego.

1.4. Rola mastocytów w patomechanizmie reakcji alergicznej na jad owadów

Mastocyty stanowią populację heterogennych, osiadłych w tkankach, wysoko wyspecjalizowanych komórek o właściwościach wydzielniczych, które poprzez uwalnianie mediatorów pełnią rolę regulacyjną w odniesieniu do różnych procesów zapalnych i naprawczych. Jako pierwszy na ten rodzaj komórek zwrócił uwagę von Recklinghausen w 1863 roku, opisując je w biopsji krezki żaby. Osiem lat później niemiecki anatom Waldeyer nazwał ziarniste komórki znalezione w tkance łącznej *Plasmazellen* [24].

Dalsze badania nad komórkami tucznymi (komórki dobrze odżywione, niem. *Mastzellen*) są zasługą Paula Ehrlicha, a ich wyniki zostały przedstawione przez autora w rozprawie doktorskiej, której obrona odbyła się w 1878 roku na uniwersytecie w Lipsku [25]. Dojrzałe komórki, zazwyczaj o kształcie owalnym i o średnicy około 20 μm , mają jednopłatowe jądro i liczne, wybarwiający się błękitem toluidyny, ziarnistości. Wiązanie barwnika z heparyną, która ma charakter polianionu o regularnym układzie reszt siarczanowych, powoduje zmianę jego koloru (na fioletowy), co uzasadnia dawną alternatywną nazwę: komórki metachromatyczne. Mastocyty różnicują się z wielopotencjalnych komórek pnia szpiku kostnego CD34+, a ich prekursorzy wykazują zdolność krążenia w krwi i zasiedlania wszystkich tkanek, poza tkanką mózgową. W procesie zasiedlania odgrywają rolę przede wszystkim cząstki adhezyjne (*vascular cell adhesion molecule* – VCAM-1 oraz *mucosal addressin cell adhesion molecule 1* – MAdCAM-1) i receptory dla chemokiny (CXCR2). Najbogatszą reprezentację mają w skórze oraz błonach śluzowych i podśluzowych układu oddechowego i przewodu pokarmowego, gdzie występują w okolicy naczyń, nerwów i gruczołów, a także na obrzeżach ognisk zapalnych oraz w ogniskach nowotworowych. Proces dojrzewania mastocytów w tkankach (ich czas przeżycia, różnicowanie, chemotaksja, wzmacnianie sygnałów w odpowiedzi na bodźce) przebiega przede wszystkim pod wpływem czynnika komórek pnia (*stem cell factor* – SCF), produkowanego przez komórki zębca, który oddziałuje na komórki prekursorowe mastocytów poprzez receptor *c-kit* (CD117), czyli przez zewnątrz błonowy receptor dla kinazy tyrozynowej [26]. Wiązanie SCF z receptorem CD117 powoduje autofosforylację reszt tyrozynowych, co uruchamia kaskadę sygnałów wewnątrzkomórkowych z udziałem kinazy-3-fosfatydyloinozytolu (PI3K), kinazy proteinowej aktywującej mitogen (MAPK), fosfolipazy C (PLC)- γ , kinazy Src, kinazy Janus oraz STAT (*signal transducer and activators of transcription*), prowadząc do transkrypcji odpowiednich genów [26]. Dodatkowo na procesy wzrostu, różnicowania i apoptozy komórek tucznych wpływają inne cytokiny, takie jak IL-3, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, oraz czynnik wzrostu nerwów (*nerve growth factor* – NGF) [26, 27]. W przypadku zależnej od IgE aktywacji komórek tucznych proces apoptozy regulowany jest przez wiązanie receptorów na powierzchni komórki z ligandem Fas i ligandem TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) [28]. Fenotyp dojrzałej komórki tucznej zależy od środowiska, w którym się znajduje. W różnych tkankach mastocyty stanowią heterogenną grupę pod względem morfologii, zawartości mediatorów i odpowiedzi na bodźce. Ziarnistości zawarte w cytoplazmie komórek tucznych odpowiadają sulfonowanym proteoglikanom (heparyna, siarczan chondroityny), które dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym wykazują zdolność magazynowania histaminy i proteaz. Obserwowane w mikroskopie elektronowym ziarnistości komórek tucznych w stanie spoczynkowym zawierają elektronowo gęsty materiał o strukturze krystalicznej, który w pobudzonej komórce przyjmuje strukturę amorficzną i dopiero w tej postaci jest uwalniany z ziarnistości. Dostępne metody immunocytochemiczne swoiste dla proteaz mastocytów pozwalają na wyodrębnienie populacji komórek o odmiennej zawartości ziaren, dlatego wyodrębnia się mastocyty MC_T, zawierające wyłącznie tryptazę (obojętna proteaza serynowa), oraz MC_{TC}, zawierające poza tryptazą drugą obojętną proteazę serynową – chymazę (barwienie na aktywność esterazy chlorooctanowej), karboskypetydazę (metaloproteazę zależną od cynku) i katepsynę G. Podział ten pokrywa się ze zróżnicowaniem funkcjonalnym zasiedlonych komórek tucznych na dwie grupy: komórki tuczne zależne od limfocytów T (w ziarnistościach cytoplazmatycznych występuje tylko tryptaza, a wśród metaboli-

tów pochodnych kwasu arachidonowego leukotrien C_4 przeważa nad prostaglandyną D_2) oraz komórki tuczne niezależne od limfocytów T (w ziarnistościach reprezentowane są wszystkie typowe dla mastocytów proteazy, a wśród metabolitów eikozanoidów prostaglandyna D_2 przeważa nad leukotriem C_4) [29]. Istnieje hipoteza o zróżnicowanych fenotypach komórek tucznych, a wśród nich puli, w której oddziaływanie na receptor dla Siglec-8 (podobna do immunoglobuliny lektyna 8 wiążąca kwas sialowy) i w konsekwencji uwalnianie tej lektyny może prowadzić do procesu autoregulacyjnego zahamowania reakcji zapalnej przez komórki tuczne [30], stąd próby wyodrębnienia fenotypu określanego jako mastocyty regulatorowe [31].

Do nadmiernej proliferacji mastocytów dochodzi w przebiegu nasilonych odczynów alergicznych z zależną od IgE aktywacją w obecności IL-4 oraz w zaburzeniach klonalnych mastocytów (m.in. mastocytoza układowa), natomiast wtórnie w wyniku przewlekłych chorób zapalnych (sklerodermia, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów), przewlekłych chorób wątroby i nerek, chorób zakaźnych i rozrostowych (białaczka, chłoniak nieziarniczny) [32].

Dojrzałe mastocyty:

- 1) odgrywają rolę komórek efektorowych w odpowiedzi alergicznej (receptor $Fc\epsilon RI$ o dużym powinowactwie do IgE);
- 2) inicjują wrodzoną (niezależną od antygeny) odpowiedź immunologiczną na patogeny poprzez receptory rozpoznające wzorzec – RRW (receptory *patogen associated molecular pattern* – PAMP), w tym m.in. receptory *toll-like*;
- 3) koordynują i wpływają hamująco na adaptacyjną (wywołaną antygenami) odpowiedź immunologiczną na patogeny.

W ramach nadrzędnej roli regulacyjnej w odpowiedzi alergicznej dojrzałe mastocyty:

- 1) przyczyniają się do zapoczątkowania pierwotnej odpowiedzi immunologicznej na alergeny;
- 2) nasilają zaostrzenia chorób alergicznych (sygnał odpowiedzi zależny od dawki alergenu);
- 3) w określonych warunkach mogą pełnić rolę komórek prezentujących antygen [33].

Choroby, w których patofizjologii dobrze udokumentowano kluczową rolę komórek tucznych i zależny od IgE mechanizm ich aktywacji, to choroby charakteryzujące się przewlekłym zapaleniem, takie jak astma oskrzelowa, alergiczny nieżyt nosa, alergiczne zapalenie spojówek i rogówki, atopowe zapalenie skóry i niektóre inne przewlekłe dermatozy, oraz ostre odczyny alergiczne bez cech przewlekłego zapalenia, np. w przebiegu alergii na jad owadów, w tym najcięższa postać takiej reakcji – anafilaksja.

W przebiegu tych chorób do pobudzenia komórek tucznych dochodzi w wyniku oddziaływania alergenu ze specyficznym przeciwciałem IgE zakotwiczonym w błonie komórki za pomocą receptora o dużym powinowactwie do IgE (receptor $Fc\epsilon RI$). Związanie odpowiedniej liczby przeciwciał z cząstkami alergenu (tzw. mostkowanie) powoduje agregację receptorów $Fc\epsilon RI$ na jednym biegunie komórki tucznej i uruchamia kaskadę sygnałów wewnątrzkomórkowych prowadzących do jej aktywacji. Aktywacja kinaz tyrozynowych wpływa na aktywację fosfolipazy C. Enzym ten odpowiada za hydrolizę difosforanu fosfatydyloinozytolu do diacyloglicerolu i trifosforanu inozytolu. W wyniku reakcji dochodzi do gwałtownego zwiększenia stężenia jonów wapnia w cytoplazmie. W obecności jonów wapnia diacyloglicerol aktywuje kinazę białkową C, a ta stymuluje fosforylację białek wewnątrzkomórkowych uczestniczących następnie w procesie egzocytozy mediatorów uwalnianych z ziarnistości oraz w syntezie mediatorów tworzonych *de novo*.

Przykładem ostrej, ciężko przebiegającej, potencjalnie zagrażającej życiu alergicznej reakcji systemowej z udziałem mediatorów komórek tłuszcznych jest anafilaksja. Najczęstszymi czynnikami wywołującymi anafilaksję są pokarmy, leki i jad owadów błonkoskrzydłych.

W wyniku reakcji zależnej od IgE dochodzi do uwalniania szerokiego spektrum mediatorów, zaliczanych do 3 kategorii: mediatorów preformowanych (magazynowanych w ziarnistościach), syntetyzowanych *de novo* oraz cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu. Uwalnianie mediatorów preformowanych i syntetyzowanych *de novo* narasta w ciągu kilku minut, dlatego biorą one udział we wczesnej fazie reakcji natychmiastowej. Tak szybki przebieg tego zjawiska wynika z magazynowania mediatorów w ziarnistościach w ich aktywnej postaci, a w przypadku metabolitów syntetyzowanych *de novo* z szybkiego przebiegu reakcji biochemicznej, której substratem są fosfolipidy błony komórkowej.

Cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu uwalniane są kilka godzin po zadziałaniu bodźca. Objawy kliniczne wywołane działaniem mediatorów mastocytów dotyczą przede wszystkim narządów, w których pula zasiedlających komórek tłuszcznych jest duża. Mediatorów preformowanych i syntetyzowanych *de novo* warunkują objawy kliniczne wczesnej (z reguły 5–30 minut) fazy reakcji alergicznej, takie jak obrzęk, zwiększenie przepuszczalności naczyń i skurcz oskrzeli. Cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu kształtują obraz kliniczny fazy późnej (z reguły 2–6 godz.), związanej z przewlekłym stanem zapalnym. Czynniki te jednocześnie oddziałują autokrynnie na stężenie mediatorów w mikrośrodowisku i na wzorzec ich uwalniania.

1.4.1. Mediatorów preformowanych

Mediatorów mastocytów zmagazynowane w ziarnistościach obejmują proteoglikany (heparyna, siarczan chondroityny), substancje drobnocząsteczkowe (histamina, serotonina, kininy) oraz aktywne enzymy proteolityczne, których zawartość stanowi co najmniej 25% ziarnistości komórki tłuszcznej [26]. Heparyna, główny proteoglikan mastocytów, dzięki właściwościom polianionu działa stabilizująco na wiązanie proteaz, a dodatkowo pełni funkcję antykoagulantu.

Histamina – prosta dwuamina biogenna, której źródłem są zarówno mastocyty, jak i bazofile – stanowi marker aktywacji obu rodzajów komórek. Uwalniana jest w trakcie degranulacji z komórek w ciągu 5–10 minut od zadziałania bodźca. Z powodu tak szybkiej dostępności biologicznej warunkuje większość wczesnych zmian patofizjologicznych podczas zależnej od IgE degranulacji komórki tłuszcznej. Działa poprzez grupę receptorów powierzchniowych związanych z białkami G: H_1 , H_2 , H_3 i H_4 , wywołując skurcz mięśniówki gładkiej, zwiększenie przepuszczalności naczyń i wzmożone wydzielanie żołądkowe. Wskutek szybkiego metabolizmu czas jej utrzymywania się nie przekracza 60 minut, stąd trudności w uchwyceniu zwiększonego stężenia histaminy w surowicy. Dłużej, bo do 24 godz., utrzymuje się zwiększone stężenie jej N-metylowej pochodnej oznaczanej w moczu. Odkryta w 1960 roku tryptaza od 1987 roku uznawana jest za specyficzny marker mastocytów, ponieważ komórki tłuszczne stanowią praktycznie jedyne liczące się jej źródło [34]. Zawartość tryptazy w bazofilach jest 100–1000 razy mniejsza niż w komórkach tłuszcznych, w pozostałych komórkach ustroju mediator ten nie występuje. Tryptaza, będąca główną proteazą związaną z heparyną w ziarnistościach mastocytów, jest tetramerem, której podjednostki o masie cząsteczkowej 31–38 kDa są

połączone niekowalencyjnie. Ze względu na budowę część aktywna cząsteczki jest niedostępna dla enzymów proteolitycznych działających na inne, będące monomerami proteazy. Ludzka tryptaza występuje w dwóch odmianach – α -tryptazy i β -tryptazy o dużej wzajemnej homologii. Właściwości enzymatyczne tryptazy upodabniają ją do trypsyny (działanie lityczne po zestawieniu C-końcowych reszt Lys/Arg). Istnieją różnice w postaci aktywności enzymatycznej tryptazy – nieaktywne pro- α -tryptaza i pro- β -tryptaza oraz aktywna, dojrzała β -tryptaza. Dostępne metody oznaczania stężenia tryptazy pozwalają na wykrycie obu proform i formy dojrzałej. Większość tryptazy oznaczanej w płynach ustrojowych u osób zdrowych ma charakter konstytutywnych, stale obecnych pro- α -tryptazy i pro- β -tryptazy, które stanowią marker całkowitej puli ustrojowej mastocytów, przydatny do oceny zaburzeń klonalnych mastocytów przebiegających z nadmiernym ich gromadzeniem w tkankach, takich jak mastocytoza układowa. Stężenie dojrzałej β -tryptazy magazynowanej w ziarnistościach mastocytów zwiększa się w przebiegu anafilaksji wskutek degranulacji komórek tucznych, stanowiąc marker ich aktywacji także *post mortem* [35]. Pewien wpływ na aktywność tryptazy wywiera ograniczona pojemność dyfuzyjna kompleksów proteoglikanów oraz pH mikrośrodowiska, do którego jest uwalniana; pH neutralne sprzyja jej uwalnianiu. Główne funkcje tryptazy obejmują degradację fibrynogenu, działanie chemotaktyczne na neutrofile poprzez wzbudzenie aktywności IL-8, stymulację angiogenezy, sprzyjanie proliferacji fibroblastów i komórek nabłonka, degradację VIP i CGRP oraz składowych C3 i C3a dopełniacza [29].

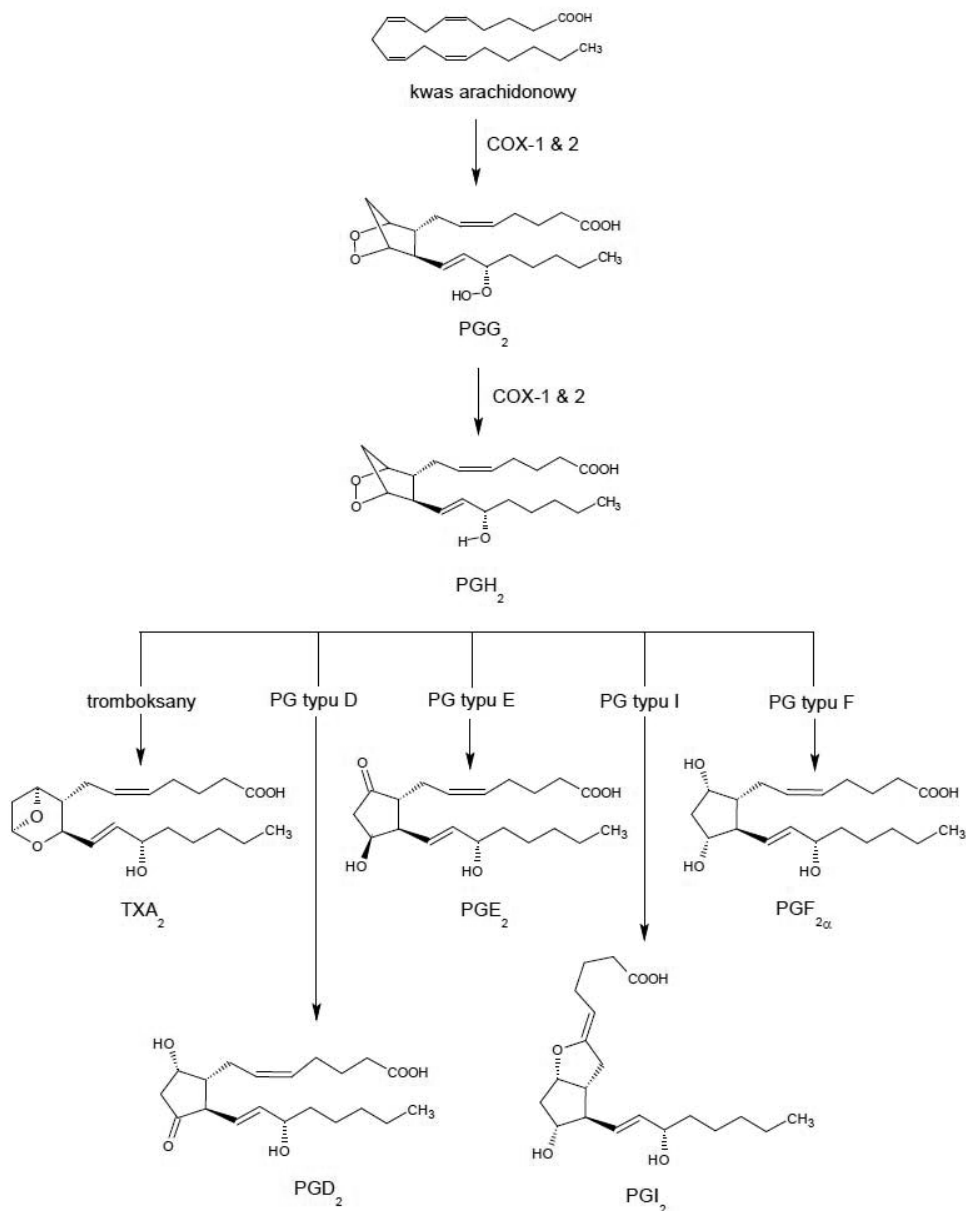
W przeciwieństwie do tryptazy chymaza, będąca także obojętną proteazą serynową, jest monomerem o działaniu zbliżonym do chymotrypsyny w zakresie reszt aminokwasów aromatycznych. Jej funkcje biologiczne obejmują pobudzenie wydzielania gruczołów śluzowych, pobudzenie angiogenezy, działanie chemotaktyczne na monocyty i neutrofile, wpływ na degradację mediatorów zapalnych, degradację macierzy pozakomórkowej, konwertowanie angiotensyny do angiotensyny II, a także wpływ na metabolizm endotelin, lipoprotein i metaloproteaz [34].

Karboksypeptydaza A jest monomerem o aktywności proteolitycznej w zakresie C-końcowych reszt aminokwasowych peptydów i białek, której działanie biologiczne w modelach zwierzęcych związane jest z mechanizmami odporności wrodzonej, w tym odporności przeciw pasożytniczej; uczestniczy również w degradacji endoteliny-1 (posocznica) oraz reakcji anafilaktycznej [36]. Mediatory typowe wyłącznie dla komórek tucznych – tryptaza i inne proteazy – stanowią obszar badań nad anafilaksją. Znane są ich geny i lokalizacja u ludzi: tryptaza α – gen *TPSA1* (16p13.3), tryptaza β – gen *TPSAB1* (16p13.3), chymaza – gen *CMA1* (14q11.2), karboksypeptydaza A – gen *CPA3* (3q24) [26]. Obecnie tryptaza uznawana jest za biomarker anafilaksji i mastocytozy. Istnieją sugestie, by również karboksypeptydaza A służyła za biomarker anafilaksji [36].

1.4.2. Mediatory syntetyzowane *de novo* – leukotrieny i prostaglandyny

Mediatory syntetyzowane *de novo* są metabolitami kwasu arachidonowego, uwalnianymi z fosfolipidów błon komórkowych pod wpływem cytoplazmatycznej fosfolipazy A_2 , która wykazuje zdolność wybiórczego rozkładania fosfolipidów zawierających kwasy tłuszczowe (np. kwas arachidonowy) w pozycji Sn-2 [37]. Fosfolipidy błon konwertowane są następnie do prostaglandyn, prostacykliny i tromboksanów w wyniku przemian zainicjowanych przez cyklooksyzgenazę (COX-1, COX-2) lub do leukotrienów, lipoksyn

i kwasów hydroksyeikozatetraenowych na drodze przemian rozpoczętych przez 5-lipooksygenazę (5-LO) współdziałającą z białkiem aktywującym 5-lipooksygenazę (*5-lipooksygenase activating protein* – FLAP). Obie grupy metabolitów nazywane są eikozanoidami ze względu na zawartość 20 (grec. *eikosi*) atomów węgla w cząsteczce (ryc. 2) [38].



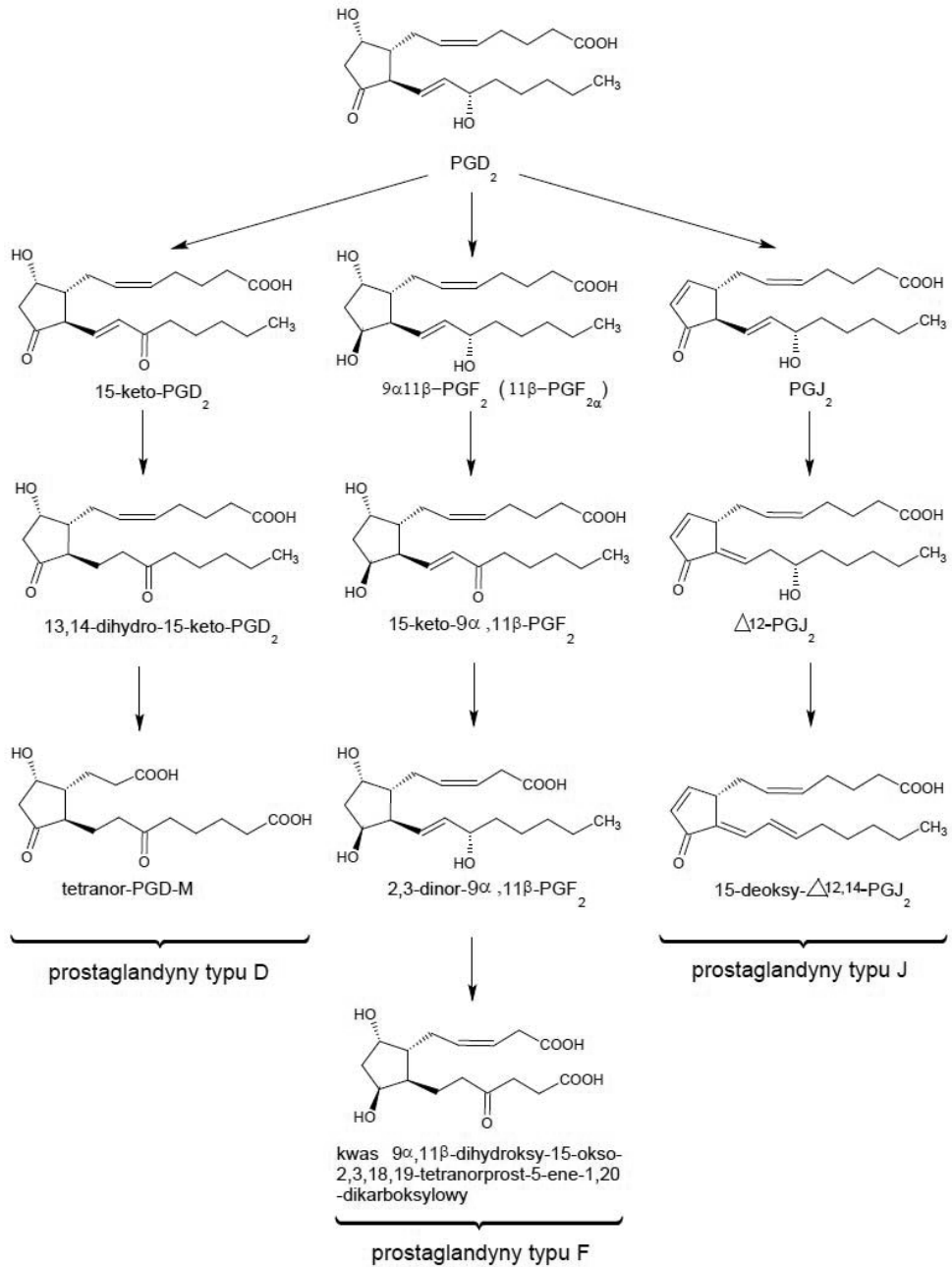
Ryc. 2. Pięć zasadniczych typów prostaglandyn powstających w wyniku metabolizmu kwasu arachidonowego

Cyklooksygenaza przekształca kwas arachidonowy w prostaglandynę G_2 (PGG_2), która pod wpływem peroksydazy ulega redukcji do prostaglandyny H_2 (PGH_2). Prostaglandyna D_2 jest bezpośrednim produktem PGH_2 powstającym w efekcie działania enzymatycznego (izomeraza PGD_2 , hematopoetyczna syntaza PGD_2 , S-transferaza glutationowa) lub nieenzymatycznego (w roztworze wodnym, w środowisku albumin) [39]. Jest głównym prostanoidem uwalnianym z mastocytów w ilościach nanogramowych w przebiegu aktywacji zależnej od IgE.

W dalszym przebiegu przemian metabolicznych niestabilna PGD_2 jest redukowana w obecności NADPH do pochodnej ketonowej – $PGF_{2\alpha}$ i jej stereoisomeru $9\alpha,11\beta$ - PGF_2 . Dalsza degradacja tych metabolitów PGD_2 wiąże się z β - i ω -oksydacją, prowadząc do powstania trwałego metabolitu końcowego, tzw. tetranoru PGD -M (kwas $9\alpha,11\beta$ -dihydroksy-15-keto-2,3,18,19-tetranor-prost-5-ene-1,20-dikarboksyłowy [ryc. 3]) [40]. Prostaglandyna D_2 , podobnie jak większość eikozanoidów, jest substancją nietrwałą, szybko ulegającą utlenieniu, w związku z czym w celu oceny jej endogennej produkcji wykrywa się jej bardziej stabilne metabolity końcowe w osoczu krwi lub w moczu. Przykładem metabolitów PGD_2 dostępnych do oznaczenia w badaniach laboratoryjnych są $9\alpha,11\beta$ - PGF_2 w osoczu krwi i w moczu oraz tetranor PGD -M w moczu. Ten ostatni metabolit uznawany jest także za marker aktywacji mastocytów. PGD_2 oraz $PGF_{2\alpha}$ działają przez błonowe receptory skorelowane z białkiem G, odpowiednio DP_1 i DP_2 dla PGD_2 oraz FP dla $PGF_{2\alpha}$. Ekspresję receptora DP_1 stwierdza się na komórkach kubkowych nabłonka błony śluzowej nosa i jelita grubego, wyściółce naczyń, limfocytach Th_2 , komórkach dendrytycznych i eozynofilach.

Działanie biologiczne wynikające z pobudzenia receptora DP_1 wiąże się ze wzmożonym wydzielaniem śluzu, zwiększeniem przepuszczalności naczyń, wpływem na czas przeżycia eozynofików, zahamowaniem wydzielania cytokin i hamowaniem chemotaksji. Receptor DP_2 wykazano na limfocytach $CD4^+Th_2$, $CD8^+Tc2$, bazofilach i eozynofilach. Pobudzenie tego receptora wywiera działanie chemotaktyczne na komórki efektorowe, powodując ich napływ szczególnie do tkanki płucnej, dodatkowo prowadząc do zwiększenia przepuszczalności naczyń i zwężania naczyń wieńcowych. Metabolit $9\alpha,11\beta$ - PGF_2 (produkt działania syntazy PGF) wywiera działanie biologiczne przez receptor FP reprezentowany w jajniku, nerce, oku, płucach, żołądku i sercu. Pobudzenie receptora wpływa na skurcz mięśni gładkich i przerost mięśnia sercowego. Efekty kliniczne działania metabolitów PGD_2 obejmują skurcz mięśni gładkich oskrzeli, skurcz naczyń płucnych i wieńcowych oraz rozszerzenie łożyska naczyń obwodowych [38, 41, 42]. Najprawdopodobniej PGD_2 wytwarzana przez mastocyty zlokalizowane w okolicy naczyń wieńcowych jest czynnikiem odpowiedzialnym za ich obkurczenie w przebiegu zespołu Kounis (ostry incydent wieńcowy) w reakcji anafilaktycznej [23, 43].

Większość prac dotyczących udziału $PGF_{2\alpha}$ w reakcjach alergicznych dotyczy astmy, zarówno u chorych dorosłych, jak i u dzieci [44–47]. W pracach tych stężenie metabolitów PGD_2 oznaczano nie tylko w osoczu i moczu, ale także w wydychanym powietrzu. Ostatnio ukazały się doniesienia wskazujące na przydatność metabolitów PGD_2 w monitorowaniu reakcji anafilaktycznej [48, 49]. Nie prowadzono badań dotyczących przydatności tych metabolitów u dzieci z alergią na jad owadów.

Ryc. 3. Metabolity prostaglandyny D_2

1.4.3. Cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu

Komórka tuczna nie ulega destrukcji w wyniku degranulacji, lecz staje się ważnym elementem sieci cytokinowej promującym fazę późną reakcji alergicznej. Wytwarzane przez mastocyty IL-4 i TNF- α powodują nasilenie syntezy RANTES i GM-CSF. IL-4 indukuje także rodzaj odpowiedzi typu Th2, a wspólnie z IL-13 wywołuje zjawisko przełączania klas immunoglobulin na syntezę IgE. Cytokiny te współdziałają także w nasilaniu ekspresji cząsteczek adhezyjnych na powierzchni śródbłonna, umożliwiając migrację komórek zapalnych ze światła naczyń do tkanek w narządach efektorowych [29]. Rola IL-33 (odgrywającej krytyczną rolę w podtrzymywaniu przewlekłego stanu zapalnego reakcji wywołanej zależną od IgE aktywacją mastocytów w przebiegu astmy) w anafilaksji nie została dotychczas poznana [50].

Jak wynika z przedstawionych następstw degranulacji komórki tucznej, jest ona jednym z najważniejszych elementów w patogenezie systemowej zależnej od IgE reakcji alergicznej po użądleniu, a uwalniane z niej mediatory odgrywają zasadniczą rolę w obrazie klinicznym tej reakcji i modulują przebieg odpowiedzi immunologicznej.

1.5. Podstawy diagnostyki w alergii na jad owadów błonkoskrzydłych

Postępowanie diagnostyczne i lecznicze u chorych uczulonych na jad owadów stanowi przedmiot zainteresowań międzynarodowych gremiów. Efektem tego są systematycznie ukazujące się opracowania aktualizujące wytyczne w tym zakresie [51–55]. Ranga problemu jest duża, a ze względu na potencjalnie zagrażające życiu reakcje po użądleniu nieprzestrzeganie zaleceń w codziennej praktyce może mieć konsekwencje medyczne dla chorego, a prawne dla lekarza.

Diagnostyka alergii na jad owadów dotyczy wyłącznie chorych po przebytej uogólnionej reakcji anafilaktycznej i ma na celu:

- 1) weryfikację stopnia reakcji i obiektywizację objawów;
- 2) identyfikację gatunku owada będącego przyczyną objawów;
- 3) ustalenie patomechanizmu reakcji;
- 4) ustalenie dodatkowych czynników ryzyka.

Pierwszy cel zostaje osiągnięty dzięki wywiadowi i analizie dokumentacji lekarskiej dotyczącej reakcji po użądleniu. Identyfikacji owada oraz ustaleniu patomechanizmu służą badania *in vivo* i/lub *in vitro*, mające na celu wykazanie swoistych przeciwciał IgE dla określonego gatunku owada. W przypadku testów skórnych potwierdzających obecność swoistych IgE na mastocytach skóry optymalne jest dwukrotne wykonanie badania: w ciągu kilku dni od użądlenia oraz po upływie 4–6 tygodni od wystąpienia reakcji ogólnoustrojowej [56, 57]. Testy wykonywane są metodą punktową w zakresie stężeń 0,01–100 $\mu\text{g/ml}$. Jeśli ich wyniki są negatywne, bezwzględnie należy wykonać testy śródskórne (objętość 0,02 ml roztworu alergenu jadu o zwiększającym się stężeniu 0,001–1,0 $\mu\text{g/ml}$) [2, 58]. Ze względu na większą czułość niektóre ośrodki wykonują jedynie testy śródskórne, uznawane za rozstrzygające w przypadku alergii na jad owadów. Oznaczeń swoistych IgE w surowicy należy dokonywać najczulszymi metodami, takimi

jak UniCAP lub Immulite 2000, których wykrywalność sięga zerowego stopnia stężenia, a wyniki są wyrażone w 6-stopniowej skali [59]. U części chorych, u których uzyskuje się dodatnie wyniki zarówno dla jadu osy, jak i pszczoły, konieczne jest rozstrzygnięcie prawdziwego podwójnego uczulenia na alergeny obu tych gatunków. U większości chorych dodatnie wyniki dla składników obu jadów są wynikiem krzyżowej reakcji na wspólne determinanty węglowodanowe (CCD), należące do grupy panalergenów świata roślin i pokarmów. Testem RAST-FEIA, umożliwiającym taką diagnostykę, dysponują jedynie pojedyncze ośrodki w Polsce [60]. Znaczny postęp w diagnostyce stanowiło opracowanie rekombinowanych alergenów głównych *rApi m1* i *rVes v5* [19, 61]. Metoda oznaczania rekombinowanych alergenów głównych (ImmunoCAP, Phadia) dostępna jest także w Polsce. Zbyt rzadko stosuje się procedurę zabezpieczenia krwi w fazie ostrych objawów w celu oznaczenia aktywności tryptazy na potwierdzenie anafilaksji. W celu oznaczenia aktywności tryptazy krew należy pobrać w ciągu 15 min do 3 godz. od wystąpienia objawów anafilaksji. Procedura przygotowania materiału nie jest trudna; optymalnie krew o objętości < 5 ml (u dzieci 0,5 ml) pobraną na skrzep należy odwirować i przechować w temperaturze -20°C . Tryptaza jest stabilna; 50% tryptazy jest oznaczalne nawet po 4 dniach przechowywania w temperaturze pokojowej [9]. Oznaczenia dokonuje się z zastosowaniem ImmunoCAP Tryptase (Phadia). Wyniki ostatnio przeprowadzonych międzynarodowych badań na dużej kohorcie chorych wskazują na zwiększone ryzyko wystąpienia ciężkich odczynów po użądleniach owadów przy wartościach podstawowych aktywności tryptazy $> 5,4 \mu\text{g/l}$ [62] oraz na większe u tych chorych ryzyko wystąpienia objawów ubocznych w trakcie odczulania dawką początkową [63].

Stężenia podstawowe $> 11,4 \mu\text{g/l}$ przemawiają za zaburzeniami klonalnymi komórek tucznych i znacznie zwiększają ryzyko wystąpienia po użądleniu odczynów zagrażających życiu [64]. Stężenia $> 20 \mu\text{g/l}$ należą do kryteriów rozpoznania układowej mastocytozy [65]. Mimo że zaburzenia klonalne mastocytów są u dzieci szczególnie rzadką jednostką chorobową, w przypadku ciężkich reakcji alergicznych po użądleniu należy je wziąć pod uwagę wśród czynników ryzyka, a w ocenie klinicznej skóry uwzględnić również pokrzywkę barwnikową [66].

1.6. Podstawy leczenia alergii na jad owadów błonkoskrzydłych

Postępowanie lecznicze należy rozpatrywać w aspekcie:

- 1) profilaktyki poprzez unikanie kontaktu z czynnikiem wywołującym;
- 2) postępowania interwencyjnego w przypadku wystąpienia objawów;
- 3) postępowania prewencyjnego w postaci swoistej immunoterapii [67].

W postępowaniu interwencyjnym podstawę stanowi szybkość działania. W przypadku pełnobjawowej anafilaksji lekiem ratującym życie jest adrenalina. Wykorzystuje się jej działanie na receptory adrenergiczne: α_1 (obkurczenie naczyń, zwiększenie oporu obwodowego, zmniejszenie obrzęku błon śluzowych), α_2 (hamowanie uwalniania insuliny i noradrenaliny), β_1 (dodatni wpływ chrono- i inotropowy) oraz β_2 (rozszerzenie oskrzeli, rozszerzenie naczyń, nasilenie glikogenolizy, hamowanie uwalniania mediatorów zapal-

nych) [68]. Nie ma bezwzględnych przeciwwskazań do jej zastosowania, choć ze względu na wąskie okno terapeutyczne zawsze należy rozważyć stosunek korzyści do ryzyka. Podczas wstępnej interwencji w przebiegu anafilaksji należy szybko podać tlen, rozpocząć intensywną resuscytację płynową, wezwać pomoc i przestrzegać zasady ułożenia chorego płasko z uniesionymi do góry kończynami dolnymi, co chroni go przed zgonem w mechanizmie pustej żyły górnej i pustej komory serca. Należy pamiętać, że inne (poza adrenalina) leki (przeciwhistaminowe i glikokortykosteroidy systemowe, a u chorych z astmą i obturacją oskrzeli dodatkowo wziewne szybko działające β_2 -mimetyki) mają w anafilaksji znaczenie wspomagające. Podkreśla się brak dobrze udokumentowanych badań z grupą kontrolną dotyczących leczenia anafilaksji, z wyjątkiem prac dotyczących immunoterapii na jad owadów [69, 70]. Bardziej zaawansowane postępowanie interwencyjne w przebiegu anafilaksji jest przedmiotem odrębnych opracowań [54, 71–73].

Historia immunoterapii podskórnej na jad owadów obejmuje około 50 lat. W początkowej fazie leczenie prowadzono wyciągiem z całego ciała owada. Z czasem okazało się, że jest to metoda mało skuteczna, a dawka alergenu mało powtarzalna, dlatego obecnie w leczeniu dawką wstępną i podtrzymującą wykorzystuje się wyciągi wodne ekstraktu jadu, a w leczeniu podtrzymującym dodatkowo istnieje możliwość stosowania preparatu typu *dépôt*. Coraz bardziej zaawansowane są prace nad powszechną dostępnością preparatów alergenów rekombinowanych, dobranych indywidualnie do profilu uczulenia u pacjenta (*component resolved diagnosis* – CRD) [74].

Immunoterapia swoista na jad owadów (*venom immunotherapy* – VIT) jest leczeniem z wyboru u pacjentów (zarówno dorosłych, jak i dzieci po 5. r.ż.) w przypadkach, w których spełnione są oba poniższe kryteria [2]:

- 1) ciężka reakcja uogólniona w wywiadzie z objawami ze strony układu oddechowego (III stopień wg H.L. Muellera) i/lub układu krążenia (IV stopień wg H.L. Muellera);
- 2) uczulenie w mechanizmie zależnym od IgE na dany gatunek owada.

W przypadku reakcji ogólnoustrojowych niezagrażających życiu (I i II stopień reakcji systemowej wg H.L. Muellera) na decyzję o zastosowaniu immunoterapii mogą wpływać inne czynniki, takie jak duże narażenie (zawodowe, członkowie rodzin pszczelarzy, osoby zamieszkałe w pobliżu pasiek), współistnienie chorób sercowo-naczyniowych, mastocytoza, czynniki psychiczne (np. znaczne pogorszenie jakości życia spowodowane lękiem przed użądleniem owadów, uniemożliwiające prawidłowe funkcjonowanie w codziennym życiu). U chorych z potwierdzonym podwójnym uczuleniem wskazana jest immunoterapia ekstraktem jadu zarówno osy, jak i pszczoły. Skuteczność leczenia jest duża i wynosi w zależności od rodzaju uczulenia 90–100% w przypadku jadu osy, a około 80% w przypadku jadu pszczoły [2]. W badaniach porównawczych na kohortach chorych odczulanych vs nieodczulanych stwierdzono istotne zmniejszenie ryzyka wystąpienia ciężkich reakcji układowych u chorych odczulanych [75–77]. Podkreślana od niedawna nowa korzyść wynikająca ze stosowania VIT to poprawa jakości życia chorych [78].

W Stanach Zjednoczonych publikowane są pilotowe prace poświęcone odczulaniu chorych z dużą reakcją miejscową [79]. Podjęzykowe zastosowanie swoistej immunoterapii na jad owadów u chorych z dużą reakcją miejscową, opisane kazuistycznie, nie jest zalecane [80, 81]. Nie rozważa się również stosowania VIT u osób, u których przypadkowo wykryto swoiste IgE dla jadu osy lub pszczoły, a wywiad w kierunku odczynów po

użądleniach jest ujemny. Nie zaleca się także stosowania VIT u chorych z dużą reakcją miejscową, toksyczną lub nietypową.

Protokół immunoterapii wstępnej, pozwalającej na osiągnięcie dawki podtrzymującej, może mieć charakter:

- 1) przyspieszony (kilka godzin do kilku dni), wówczas leczenie prowadzone jest w warunkach szpitalnych metodą ultraszybką (*ultra-rush*) lub metodą szybką (*rush*);
- 2) konwencjonalny lub klasterowy, kiedy leczenie prowadzone jest przez dłuższy czas (od kilku do kilkunastu tygodni).

Po osiągnięciu standardowej dawki podtrzymującej wynoszącej 100 µg/ml, co odpowiada około 2 użądleniom pszczoły i nawet kilkudziesięciu użądleniom osy, faza podtrzymująca leczenia powinna wynosić 3–5 lat. W uzasadnionych przypadkach, np. u chorych z zaburzeniami klonalnymi mastocytów lub u chorych w trakcie odczulania nadal reagujących systemowo na użądlenia polne, co oznacza brak wystarczającej ochrony immunologicznej, można stopniowo zwiększyć dawkę podtrzymującą ekstraktu jadu do 200 µg, rozpoczynając od początku schemat leczenia. W pierwszym roku leczenia odstęp między podaniem dawek podtrzymujących wynosi 4 tygodnie, w przypadku leczenia 2–5-letniego 6 tygodni, a w uzasadnionych przypadkach, w których leczenie trwa dłużej niż 5 lat, planowy odstęp pomiędzy dawkami zwiększa się do 8 tygodni. Ze względu na zminimalizowane, ale jednak istniejące, ryzyko wystąpienia reakcji systemowej każdy pacjent po wstrząsie anafilaktycznym pomimo przeprowadzonej immunoterapii powinien być wyposażony w zestaw przeciwwstrząsowy i nosić go zawsze z sobą. W polskich ośrodkach internistycznych najczęściej stosowanymi protokołami leczenia dawką początkową są schemat szybki (*rush*), a w ośrodkach dziecięcych zarówno schemat konwencjonalny, jak i bardzo szybki (*ultra-rush*) [82]. Szacuje się, że obecnie leczonych jest około 200 dzieci oraz kilkuset chorych dorosłych.

Przeciwwskazania do prowadzenia immunoterapii swoistej w przypadku alergii na jad owadów błonkoskrzydłych nie różnią się od ogólnie przyjętych przeciwwskazań dotyczących immunoterapii innymi alergenami. Należą do nich: brak współpracy ze strony chorego, wiek poniżej 5. roku życia, czynne choroby nowotworowe lub autoimmunologiczne, ciężkie niewyrównane choroby uogólnione, przewlekła niewydolność narządowa, ciąża (immunoterapia wstępna) oraz inne sytuacje, w których wskaźnik korzyść/ryzyko nie jest korzystny dla pacjenta. Przyjmowanie przez chorego leków blokujących receptory β i inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACE) uznawane jest za dodatkowy czynnik ryzyka wystąpienia systemowych objawów ubocznych, zwłaszcza w fazie stosowania zwiększającej się dawki immunoterapii [2, 51].

Podstawowym celem immunoterapii swoistej jest wytworzenie tolerancji obwodowych limfocytów T na uczulające alergeny. Z chwilą osiągnięcia stanu tolerancji immunologicznej limfocyty T-regulatorowe zaczynają wytwarzać w większej ilości cytokiny o działaniu przeciwzapalnym. W przypadku immunoterapii na jad owadów Treg o fenotypie Tr1 wydzielają więcej IL-10 [83]. W immunoterapii na alergeny inhalacyjne poza zwiększeniem wydzielania IL-10 zwiększa się również wydzielanie TGF- β [84]. Dobrze znane mechanizmy immunotolerancji uruchamiane przez VIT wiążą się z:

- 1) zmniejszeniem reaktywności komórek prezentujących antygen (komórki dendrytyczne) [85] i obwodowych komórek efektorowych (mastocyty, bazofile, eozynofile) [86] po stymulacji alergenem (efekt występujący po kilku dniach leczenia);

- 2) ekspansją limfocytów T regulatorowych (Treg Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺) i ekspresją ich wzorca cytokinowego (IL-10); efekt obserwowany jest po kilku miesiącach leczenia [87];
- 3) supresją komórek Th1 i Th2;
- 4) wpływem na regulację syntezy zależnej od limfocytów B z ograniczeniem wytwarzania swoistych IgE przy jednoczesnym wzmożonym wytwarzaniu przeciwciał blokujących IgG4 [88] i/lub IgA [89] (efekt obserwowany po kilku latach leczenia) [90–92].

W ostatnim czasie opisano zmiany wczesne, pojawiające się w ciągu kilku pierwszych godzin leczenia, związane z przyspieszoną degradacją tryptofanu w komórkach wielojądrowych i monocytach krwi, wzmożoną syntezą IL-10 oraz wzmożoną ekspresją cząstek z rodziny ILT (*immunoglobulin-like transcript*) [93].

W monitorowaniu właściwego momentu zakończenia leczenia „złotym standardem” jest żądlenie prowokowane przez żywego owada [94]. Służy ono do identyfikacji tych chorych, u których bezpiecznie można zakończyć leczenie. W praktyce procedurę tę stosują jedynie nieliczne ośrodki. Żądlenia prowokowanego nie zaleca się w celach diagnostycznych u chorych nieodczulanych jako potencjalnie niebezpiecznego oraz u odczulanych jadem osy jako mało powtarzalnego i wiarygodnego. Najnowsze prace wskazują, że określenie profilu ekspresji genów może być u indywidualnych chorych pomocnym narzędziem do oszacowania długofalowej skuteczności swoistej immunoterapii na jad owadów [95].

W badaniach nad alergią na jad owadów błonkoskrzydłych poszukuje się czynników o znaczeniu predykcyjnym, wskazujących na chorych z grup zwiększonego ryzyka wystąpienia objawów systemowych po użądleniu oraz pozwalających na monitorowanie chorych już odczulanych. Nie prowadzono tego typu badań u dzieci.

2. UZASADNIENIE, CEL PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE

2.1. Uzasadnienie

Mimo że ogólnoustrojowe reakcje alergiczne po użądleniach owadów obserwuje się u niespełna 1% dzieci, to, ze względu na potencjalnie zagrażającą życiu ciężkość, stanowią one bardzo istotny problem kliniczny. Szeroki wachlarz objawów alergicznych po użądleniu owadów jest wynikiem działania mediatorów komórek tucznych uwalnianych u dzieci prawie w 100% na drodze zależnego od IgE mechanizmu aktywacji. Mediatorami swoistymi tylko dla komórki tucznej są tryptaza, zaliczana do mediatorów preformowanych, oraz stabilne końcowe metabolity prostaglandyny D₂, należącej do grupy mediatorów syntetyzowanych *de novo*. Immunoterapia swoista na jad uczulającego owada u dzieci z nasiloną reakcją systemową jest jedyną metodą leczenia przyczynowego. Leczenie dawką początkową stanowi okres największego ryzyka wystąpienia systemowych działań niepożądanych. Wartości swoistych IgE i odczyn w testach skórnych nie korespondują z ciężkością objawów klinicznych po użądleniu i nie stanowią czynnika predykcyjnego ani przyszłych odczynów poszczepiennych, ani po kolejnych użądleniach polnych. Uzasadnia to podjęcie badań zmierzających do ustalenia, czy markery aktywacji komórek tucznych mogą być pomocne przy podejmowaniu decyzji diagnostyczno-terapeutycznych u dzieci leczonych immunoterapią z powodu alergii na jad owadów.

2.2. Cel pracy

1. Wskazanie, który z dwóch protokołów (szybki [*rush*] vs bardzo szybki [*ultra-rush*]) leczenia dawką początkową immunoterapii jest bezpieczniejszy, jak wpływa na zachowanie markerów aktywacji mastocytów i jakie dodatkowe czynniki rokownicze należy wziąć pod uwagę przy wyborze metody leczenia.
2. Ocena, czy leczenie dawką podtrzymującą wpływa na zachowanie markerów aktywacji mastocytów, jakie dodatkowe czynniki wpływają na proces leczenia i czy którykolwiek z nich ma charakter predykcyjny.

3. Ustalenie, czy podstawowe stężenia markerów aktywacji mastocytów pozwalają na rozróżnienie dzieci uczulonych na jad owadów i dzieci zdrowych oraz na bardziej szczegółowe zróżnicowanie w obrębie grupy dzieci uczulonych.

2.3. Hipotezy badawcze

Realizacja celów pracy ma za zadanie weryfikację następujących hipotez zerowych (H_0):

1. Protokoły *rush* i *ultra-rush* nie różnią się bezpieczeństwem mierzonym częstością występowania systemowych objawów ubocznych w ich przebiegu, a stopień ciężkości objawów po użądleniu nie ma istotnego wpływu na przebieg immunoterapii dawką początkową bez względu na rodzaj protokołu.
2. Żaden z dwóch protokołów leczenia dawką początkową oraz immunoterapia dawką podtrzymującą nie wpływa istotnie na zmianę stężenia markerów aktywacji komórek tucznych.
3. Nie ma dodatkowych czynników rokowniczych wywierających wpływ na proces leczenia dawką wstępną i podtrzymującą.
4. Podanie dawki początkowej wg protokołu *rush* nie prowadzi do szybkiego zwiększenia tolerancji na alergen po użądleniu polnym w fazie leczenia dawką podtrzymującą.
5. Podstawowe stężenie markerów aktywacji komórek tucznych nie dyskryminuje dzieci uczulonych od nieuczulonych, a w obrębie dzieci uczulonych nie różnicuje dzieci wymagających immunoterapii od tych, które nie spełniają kryteriów jej stosowania.

3. ETAPY I PROTOKÓŁ BADANIA

Wartości badanych parametrów laboratoryjnych uzyskane przed leczeniem określono jako stężenia podstawowe. U wszystkich dzieci diagnostykę prowadzono po upływie co najmniej 3 tygodni od ostatniego użądlenia polnego. Każdorazowo krew i mocz do oznaczeń były pobierane o stałych porach.

Grupa dzieci zakwalifikowanych do immunoterapii

1. Oznaczenia podstawowych stężeń badanych parametrów. Pobrania krwi i moczu (pierwsza poranna porcja lub po dwugodzinnej kolekcji w pęcherzu) dokonywano dwukrotnie: pierwszy pomiar rano (godz. 9.00–10.00) w dniu przyjęcia do diagnostyki, drugi pomiar rano (godz. 8.00–10.00) bezpośrednio przed podaniem pierwszej dawki szczepionki.
2. Oznaczenie stężeń badanych parametrów w trakcie leczenia. Pobrania krwi i moczu dokonywano w odstępach rocznych od chwili rozpoczęcia leczenia, pobierając materiał bezpośrednio przed podaniem kolejnej dawki szczepionki i po jej podaniu. Punkty pomiaru dobrano tak, by uchwycić hipotetycznie największe stężenia tryptazy w surowicy krwi (godzinę po podaniu dawki), $9\alpha 11\beta$ -PGF₂ w osoczu (5 minut po podaniu dawki) i w moczu oraz tetranor-PGD-M w moczu (po 1–2 godzinach kolekcji moczu w pęcherzu od podania dawki) w przebiegu leczenia.

Grupa dzieci niezakwalifikowanych do immunoterapii

1. Oznaczenia podstawowych stężeń badanych parametrów. Pobrania krwi i moczu (pierwsza poranna porcja lub po dwugodzinnej kolekcji w pęcherzu) dokonywano jednorazowo, rano (godz. 9.00–10.00) w dniu przyjęcia do diagnostyki.

Grupa kontrolna

1. Oznaczenia podstawowych stężeń badanych parametrów. Pobrania krwi i moczu (pierwsza poranna porcja lub po dwugodzinnej kolekcji w pęcherzu) dokonywano jednorazowo, rano (godz. 9.00–10.00) w dniu przyjęcia do diagnostyki.

Szczegółowy protokół badania przedstawiono w tabeli 2.

Protokół badania

Procedura	Etap badania								
	Diagnostyka i kwalifikacja do VIT	Dawka początkowa VIT <i>rush/ultra-rush</i>		Kontrola po roku podawania dawki odtzymującej VIT		Kontrola po 2 latach podawania dawki podtrzymującej VIT		Kontrola po 3 latach podawania dawki podtrzymującej VIT	
		przed	po	przed	po	przed	po	przed	po
Czas wykonania w stosunku do momentu podania szczepionki									
Wywiad dotyczący reakcji po użądleniu	X								
Szczegółowe badanie podmiotowe	X	X		X		X		X	
Informacja dla pacjenta i zgoda na udział w badaniu	X								
Zgoda na leczenie		X							
Szczegółowe badanie przedmiotowe	X	X		X		X		X	
PTS/ITS*	X								
clgE/sIgE**	X			X		X		X	
Tryptaza	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Metabolity PGD ₂	X	X	X	X	X	X	X	X	X

* PTS/ITS – punktowe testy skórne/testy śródskórne

**całkowite IgE/swoiste IgE

4. MATERIAŁ I METODY – WPROWADZENIE

Badanie miało charakter prospektywny. Diagnostykę prowadzono w warunkach szpitalnych, optymalnie w ciągu 3–6 tygodni od wystąpienia ostatniej reakcji ogólnoustrojowej po użądleniu, w trybie hospitalizacji jednodniowej. W trakcie wykonywania testów skórnych stan dzieci był monitorowany, z pełnym zabezpieczeniem resuscytacyjnym. Jeśli konieczna była diagnostyka w kierunku alergii na jeden gatunek owada, podczas jednorazowej hospitalizacji przeprowadzano wywiad, pobierano krew i wykonywano testy skórne, najpierw punktowe, a następnie śródskórne. Jeśli konieczna była diagnostyka alergii na oba gatunki owadów, testy skórne z drugim gatunkiem przeprowadzono w innym dniu. U dzieci z ciężką reakcją ogólnoustrojową (objawy ze strony układu oddechowego lub układu krążenia) po użądleniu w wywiadzie, u których uzyskano ujemne wyniki oznaczeń swoistych dla jądów IgE w testach skórnych i badaniu krwi, powtórzono pełny zestaw badań po upływie 3 miesięcy. U dzieci poniżej 5. roku życia przeprowadzono wywiad, oznaczono swoiste IgE w surowicy, a termin testów skórnych ustalono zaraz po ukończeniu 5. roku życia.

Kwalifikacja do odczulania odbywała się po uzyskaniu wszystkich wyników badań. Zgodnie z polskimi i europejskimi wytycznymi do leczenia kierowano dzieci z ciężkimi objawami w wywiadzie, tj. III i IV stopnia reakcji alergicznej wg klasyfikacji Muellera, u których potwierdzono podłoże zależne od IgE (tab. 3).

Dzieci z łagodniejszymi objawami, tj. reakcją I i II stopnia przy potwierdzonym podłożu zależnym od IgE, kwalifikowano do odczulania jedynie w przypadku zwiększonego ryzyka kolejnych użądleń (rodziny pszczelarzy), współistnienia astmy oraz znacznego lęku dziecka i/lub rodziców przed kolejnym użądleniem.

W trakcie leczenia nie wykonywano próby prowokacyjnej z żywym owadem ze względu na główne jej ograniczenia:

- 1) stosunkowo duże ryzyko wystąpienia anafilaksji oraz teoretyczną możliwość wywołania lub zwiększenia stopnia uczulenia i reaktywności klinicznej;
- 2) brak pełnej powtarzalności wyników próby, co sprawia, że kolejne użądlenie prowokacyjne, szczególnie przez osę, może dać inny wynik niż poprzednie;
- 3) brak powszechnie przyjętych standardów dotyczących kwalifikacji, przeprowadzenia i oceny próby [96, 97].

Klasyfikacja reakcji ogólnoustrojowych po użądleniu przez owady według L.H. Muellera [2]

Stopień	Objawy
Stopień I	Uogólniona pokrzywka, świąd skóry, osłabienie lub niepokój
Stopień II	Którykolwiek z wymienionych powyżej objawów i co najmniej 2 z następujących: obrzęk naczynioruchowy, uczucie ucisku w klatce piersiowej, nudności, wymioty, biegunka, ból brzucha, zawroty głowy
Stopień III	Którykolwiek z wymienionych powyżej objawów i co najmniej 2 z następujących: duszność, świszczący wydech, stridor, zaburzenia mowy, chrypka, osłabienie, splątanie, lęk przed śmiercią
Stopień IV	Którykolwiek z wymienionych powyżej objawów i co najmniej 2 z następujących: spadek ciśnienia tętniczego*, zapaść, utrata przytomności, nietrzymanie moczu i stolca, sinica

* Kryteria spadku ciśnienia tętniczego zależnie od wieku:

- poniżej 1. r.ż. < 70 mm Hg;
- 1–10 lat < (70 + [2 × wiek w latach]) mm Hg;
- 11–17 lat, dorośli < 90 mm Hg.

4.1. Materiał

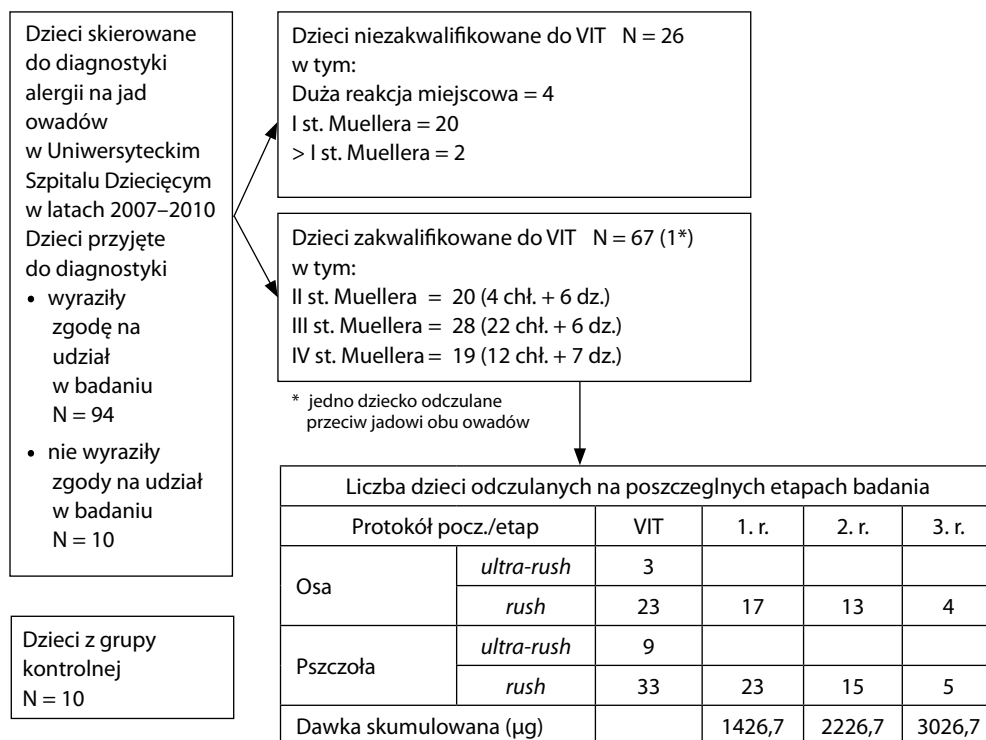
Do badania rekrutowano dzieci zgłaszające się do diagnostyki alergii na jad owadów błonkoskrzydłych w Klinice Chorób Dzieci Katedry Pediatrii UJ CM w latach 2007–2010. Rodzice 94 ze 104 dzieci wyrazili zgodę na udział w badaniu. Z tej grupy wyłoniono grupę dzieci (n = 68) zakwalifikowanych do immunoterapii swoistej na jad owadów i grupę dzieci (n = 26) do niej niezakwalifikowanych. Zasady podziału materiału na grupy przedstawiono na rycinie 4.

Dobór do grup leczonych różnymi protokołami nastąpił na podstawie terminu zgłoszenia się do badania. W okresie styczeń 2008–maj 2010 pacjentów przydzielano do protokołu szybkiego (*rush*), a od czerwca 2010 roku do protokołu bardzo szybkiego (*ultra-rush*). Strategia ta wynikała z faktu, że w okresie kiedy rozpoczynano badanie, doświadczenia ze stosowaniem protokołu *ultra-rush* były u dzieci w Polsce w fazie wstępnej. Taki dobór nie powinien wpłynąć na różnice pomiędzy badanymi.

4.1.1. Charakterystyka grupy dzieci zakwalifikowanych do immunoterapii swoistej na jad owadów

Grupa zakwalifikowana do immunoterapii swoistej liczyła 68 dzieci (49 chłopców, 19 dziewczynek) w wieku 4–17 lat (średnia wieku 10,8 roku, SD 3,7). Kwalifikacja do grupy wymagała spełnienia jednocześnie trzech kryteriów:

- 1) wywiad ogólnoustrojowej reakcji po użądleniu osy lub pszczoły w stopniu III lub IV wg klasyfikacji Muellera albo w stopniu I lub II z silnym poczuciem lęku i/ lub znacznym narażeniem na użądlenia (pasieka w pobliżu miejsca zamieszkania), i/ lub progresją objawów w porównaniu z wcześniejszymi użądleniami, i/ lub współistnieniem astmy oskrzelowej;



Ryc. 4. Schemat badania

- potwierdzony mechanizm zależnej od IgE reakcji w testach skórnych i/lub swoistych IgE w surowicy;
- zgoda na udział w badaniu.

Kryteria wykluczenia z grupy badanej obejmowały:

- miejscową reakcję po użądleniu, tj. obrzęk o średnicy > 10 cm utrzymujący się ponad 24 godziny;
- brak potwierdzonego podłoża zależnej od IgE reakcji po użądleniu;
- wcześniejszą immunoterapię na jad owadów;
- brak zgody na udział w badaniu.

Wszystkie dzieci zakwalifikowane do immunoterapii swoistej na jad owadów oraz ich opiekunowie wyrazili zgodę na udział w badaniu. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego (KBET nr 67/L/2007 z 28 czerwca 2007 r.).

Ciężkość reakcji klasyfikowana na podstawie 4-stopniowej skali Muellera miała w badanej grupie następującą częstość: stopień IV – 19 (28%), stopień III – 28 (41%), stopień II – 21 (31%). U wszystkich dzieci potwierdzono zależne od IgE podłoże reakcji na podstawie dodatnich wyników testów śródskórnych i/lub dodatnich wyników oznaczenia swoistych IgE dla jadu danego gatunku owada. W grupie 42 dzieci zakwa-

lifikowanych do immunoterapii ekstraktem jadu pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) u 37 potwierdzono podłoże zależne od IgE w dodatnich testach śródskórnych, u 42 na podstawie dodatnich wyników oznaczeń swoistych IgE w surowicy krwi. W grupie 26 dzieci zakwalifikowanych do immunoterapii ekstraktem jadu osy (*Vespula vulgaris*) u 21 dzieci potwierdzono podłoże zależne od IgE w dodatnich testach śródskórnych, u 26 na podstawie dodatnich wyników oznaczeń swoistych IgE w surowicy krwi. W grupie zakwalifikowanej do immunoterapii jadem pszczoły u czworga dzieci uzyskano także dodatnie wyniki testów śródskórnych z jadem osy, a u 24 były wykrywalne swoiste IgE dla jadu osy. W grupie zakwalifikowanej do immunoterapii jadem osy u jednego dziecka uzyskano także dodatnie wyniki testów śródskórnych z jadem pszczoły, a u 11 wykrywalne były swoiste IgE dla jadu pszczoły. U jednego dziecka z grupy zakwalifikowanej do immunoterapii jadem osy uzyskano dodatnie wyniki testów śródskórnych z jadem pszczoły. Jednego chłopca zakwalifikowano równocześnie do odczulania jadem obu gatunków owadów. U jednego dziecka w testach punktowych uzyskano dodatni odczyn z ekstraktem jadu osy w stężeniu 100 µg/ml. U żadnego dziecka nie obserwowano opóźnionej reakcji (po 8 i 24 godz.) w testach śródskórnych.

Średnie stężenie całkowitych IgE wynosiło 280,15 kU/l (SEM 49,81), średnie stężenie swoistych IgE dla jadu pszczoły w grupie dzieci zakwalifikowanych do immunoterapii swoistej ekstraktem jadu pszczoły – 33,3 kU/l (SEM 6,2), średnia proporcja IgE swoiste dla jadu pszczoły/całkowite – 0,22 (SEM 0,03). Średnie stężenie swoistych IgE dla jadu osy wynosiło 4,54 kU/l (SEM 1,53), średnia proporcja IgE swoiste dla jadu osy/całkowite – 0,06 (SEM 0,03). Liczba użądleń przed kwalifikacją do odczulania w grupie dzieci uczulonych na jad pszczoły wahała się w zakresie 1–7 (średnio 3,2 użądlenia, SEM 0,2), w grupie dzieci uczulonych na jad osy zaś w zakresie 1–5 (średnio 2,3 użądlenia, SEM 0,2). Czas od pierwszego użądlenia do kwalifikacji do leczenia w grupie dzieci uczulonych na jad pszczoły wynosił 0–12 lat (średnio 3,7 roku, SEM 0,4), w grupie dzieci uczulonych na jad osy w zakresie 0–11 lat (średnio 2,8 roku, SEM 0,6). U 18 dzieci (26,5%) na podstawie punktowych testów skórnych z alergenami inhalacyjnymi (*Allergopharma Joachim Ganzer KG*) stwierdzono podłoże atopowe, w tym u 9 o charakterze alergii wieloważnej. W grupie dzieci atopowych u 5 (7,4%) rozpoznano równocześnie astmę i alergiczny nieżyt nosa; u dwojga z nich konieczne było leczenie małą dawką wziewnego glikokortykosteroidu, u jednego stosowanie leku przeciwleukotrienowego, a u wszystkich doraźne stosowanie donosowych glikokortykosteroidów. U dwojga dzieci uczulonych na roztocza kurzu domowego, u których astma początkowo była niekontrolowana, zmodyfikowano leczenie poprzez zwiększenie dawki wziewnego glikokortykosteroidu i dołączenie wziewnego, długo działającego β_2 -mimetyku. Swoistą immunoterapię rozpoczęto po uzyskaniu kontroli astmy. Z 12 dzieci, u których występowały jedynie objawy alergicznego nieżyty nosa, u 7 konieczne było regularne stosowanie donosowych glikokortykosteroidów i wstawkowo leku przeciwhistaminowego, a u 5 stosowano leki doraźnie w okresach objawowych. Jedno dziecko nie zdradzało cech choroby alergicznej. U żadnego dziecka nie rozpoznano atopowego zapalenia skóry ani alergii pokarmowej. Jeden pacjent (10-letni chłopiec z reakcją III stopnia wg klasyfikacji Muellera po użądleniu pszczoły) ze względu na potwierdzone histopatologicznie rozpoznanie choroby Leśniowskiego i Crohna bez manifestacji klinicznej leczony był preparatem Pentasa z dobrą kontrolą objawów. Spośród 42 dzieci 32 (76%) zakwalifikowanych do odczulania jadem pszczoły pochodziło z rodzin pszczelarzy lub mieszkało w bezpośrednim sąsiedztwie pasieki.

4.1.2. Charakterystyka grupy dzieci niezakwalifikowanych do immunoterapii swoistej na jad owadów

Kryteria kwalifikacji do tej grupy obejmowały:

- 1) ogólnoustrojową reakcję po użądleniu w stopniu I i równocześnie brak progresji objawów w porównaniu z wcześniejszymi użądleniami, niski poziom leku przed kolejnym użądleniem, małe narażenie na użądlenia, bez względu na wynik badań w kierunku podłoża zależnego od IgE;
- 2) dużą reakcję miejscową, tj. obrzęk o średnicy > 10 cm utrzymujący się ponad 24 godziny, po użądleniu w okolicę twarzy lub szyi, bez względu na wynik badań w kierunku podłoża zależnego od IgE;
- 3) w przypadku reakcji ogólnoustrojowych w stopniu II–IV wg klasyfikacji Muellera dwukrotnie ujemne wyniki badań w kierunku podłoża zależnego od IgE reakcji po użądleniu;
- 4) zgodę na udział w badaniu.

Spośród 36 dzieci niezakwalifikowanych do odczulania na jad owadów zgodę na udział w badaniu wyraziło 26 dzieci i ich opiekunów, co oznaczało z ich strony zgodę na jednorazowe pobranie materiału (krwi i moczu) do badań zgodnie z protokołem. Brak zgody w żaden sposób nie rzutował na dalsze postępowanie z pacjentem, uwarunkowane względami medycznymi.

Grupa obejmowała 6 dziewczynek i 20 chłopców w wieku 4–17 lat (średnia wieku 10,7 roku, SD 1,6). U jednego dziecka stwierdzono reakcję IV stopnia po użądleniu (wstrząs anafilaktyczny), u jednego reakcję III stopnia z obturacją oskrzeli, u 20 reakcję I stopnia po użądleniu, u 4 dużą reakcję miejscową przy użądleniu w okolicę twarzy lub szyi. U 7 dzieci wykazano podłoże reakcji zależne od IgE na podstawie dodatnich wyników testów śródskórnych z jadem osy (*Vespula vulgaris*), u 8 dzieci na podstawie dodatnich wyników testów śródskórnych z jadem pszczoły; u pozostałych dzieci wyniki testów skórnych były ujemne. U 15 dzieci stwierdzono swoiste IgE dla jadu osy, u 15 swoiste IgE dla jadu pszczoły. Średnie stężenie całkowitych IgE wynosiło 265,14 kU/l (SEM 73,87), średnie stężenie swoistych IgE dla jadu pszczoły 15,42 kU/l (SEM 4,43), a średnia proporcja IgE swoiste dla jadu pszczoły/całkowite 0,10 (SEM 0,03). Średnie stężenie swoistych IgE dla jadu osy wynosiło 3,58 kU/l (SEM 1,48), a średnia proporcja IgE swoiste dla jadu osy/całkowite 0,016 (SEM 0,009). U żadnego dziecka nie uzyskano dodatniego wyniku w testach punktowych z ekstraktem jadu owadów w stężeniu 100 µg/ml ani nie obserwowano odczynów opóźnionych (po 8 i 24 godz.) w testach skórnych. U dwojga dzieci (9-letnia dziewczynka z IV stopniem reakcji po użądleniu i 6-letni chłopiec z III stopniem reakcji po użądleniu) badania diagnostyczne dokumentujące podłoże reakcji zależnej od IgE wykonano dwukrotnie w odstępie 3 miesiące, za każdym razem uzyskując wyniki ujemne zarówno w testach skórnych, jak i w swoistych IgE, co uzasadniało niezakwalifikowanie tych pacjentów do immunoterapii swoistej. Liczba użądleń w grupie dzieci niezakwalifikowanych wahała się w granicach 1–10 (średnio 2,6 użądlenia; SEM 0,4). Czas od pierwszego użądlenia do momentu zgłoszenia się do diagnostyki wynosił 0–11 lat (średnio 3,6 roku; SEM 0,6). U żadnego dziecka z tej grupy nie stwierdzono atopii (ujemne wyniki testów skórnych z alergenami inhalacyjnymi w zestawie *Allergopharma Joachim Ganzer KG*). Czworo z 26 dzieci (15%) pochodziło z rodzin pszczelarzy lub mieszkało w bezpośrednim sąsiedztwie pasieki.

4.1.3. Charakterystyka grupy kontrolnej

Grupę kontrolną stanowiło 10 dzieci w wieku 6–10 lat (średnio 8 lat, SD 1,7), w tym 7 dziewczynek i 3 chłopców. Dzieci były rekrutowane z Poradni Rehabilitacyjnej Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie. Pierwszy etap rekrutacji miał charakter wywiadu telefonicznego, na podstawie którego kryteriami kwalifikacji do grupy kontrolnej były:

- 1) ujemny wywiad osobniczy i rodzinny w kierunku atopii;
- 2) ujemny wywiad w kierunku reakcji po użądleniach owadów błonkoskrzydłych;
- 3) ujemny wywiad w kierunku chorób autoimmunologicznych.

Piętnaścioro dzieci spełniających powyższe kryteria, które wyraziły zgodę na udział w dalszej części badania, zgłosiło się do kolejnego etapu. Zgoda na badanie oznaczała zgodę na wykonanie testów skórnych z alergenami inhalacyjnymi, przeprowadzenie badania czynnościowego układu oddechowego oraz jednorazowe pobranie krwi i moczu do badań zgodnie z protokołem.

W celu kwalifikacji do grupy kontrolnej na tym etapie musiały być spełnione wszystkie poniższe warunki:

- 1) ujemny wynik badania przedmiotowego w kierunku objawów chorób atopowych i pokrzywki barwnikowej;
- 2) ujemny wynik testów skórnych punktowych z alergenami inhalacyjnymi i białka mleka krowiego (*Allergopharma Joachim Ganzer KG*);
- 3) prawidłowy wynik badania czynnościowego układu oddechowego;
- 4) ujemny wynik oznaczenia swoistych IgE dla jadu osy i jadu pszczoły.

Ostatecznie do grupy kontrolnej zakwalifikowano 10 dzieci. Średnie stężenie całkowitych IgE wynosiło 99,2 kU/l (SEM 72,3).

4.1.4. Zgoda pacjenta na badanie i przetwarzanie danych osobowych

Dzieci i ich opiekunowie przed zakwalifikowaniem do badania otrzymali pisemną informację o założeniach i celach badania. Po zapoznaniu się z nią podpisywali zgodę na udział w badaniu i związane z nim procedury (pobranie krwi, moczu, wypełnienie kwestionariusza oceny jakości życia). Uczestnikom badania zagwarantowano, że przy publikacji wyników badań zostanie zachowana anonimowość.

4.2. Metody

4.2.1. Wywiad chorobowy

Podczas zbierania wywiadu posługiwano się kwestionariuszem autorskim (Załącznik. Karta kwalifikacji pacjenta do immunoterapii swoistej). Pytania służyły:

- 1) sprecyzowaniu gatunku owada (osa, pszczoła, a w przypadku braku możliwości ustalenia gatunku „owad niezidentyfikowany”), liczby wcześniejszych użądleń i ich lokalizacji, progresji objawów, gdy liczba użądleń była większa niż 1;

- 2) sprecyzowaniu i obiektywizacji ciężkości objawów ogólnoustrojowych na podstawie wywiadu od pacjenta i jego rodziców oraz dokumentacji uzyskanej od lekarza, który udzielał pierwszej pomocy po użądleniu (pisemna informacja o obiektywnych objawach klinicznych, takich jak uogólniona pokrzywka, obrzęk naczyń ruchomych, stridor, *wheezing*, spadek ciśnienia tętniczego, oraz o zastosowanych lekach);
- 3) ustaleniu dodatkowych czynników ryzyka wystąpienia ciężkich odczynów w przypadku przyszłych użądleń, takich jak duże narażenie na użądlenia owadów (rodziny pszczołarzy), współistnienie astmy, pokrzywka barwnikowa;
- 4) dodatkowym analizowanym aspektem było poczucie lęku dziecka przed kolejnym użądleniem przez uczulającego owada. W momencie rozpoczęcia pracy brak było w piśmiennictwie wystandaryzowanego narzędzia mierzącego lęk przed użądleniem w tej grupie wiekowej. Stąd odwołano się do jego subiektywnej oceny przez dziecko, które mogło określić swój lęk jako mały, średni lub duży.

4.2.2. Metody diagnostyki alergii zależnej od IgE w reakcji po użądleniu owadów błonkoskrzydłych

4.2.2.1. Punktowe testy skórne

Punktowe testy skórne z roztworem ekstraktu jadu stosowanego w immunoterapii (Venomenhal, HALAllergy, Holandia oraz Pharmedgen, ALKAbello, Hørsholm, Dania) wykonywano zgodnie z obowiązującymi standardami [2, 67]. Jako kontrolę dodatnią stosowano roztwór histaminy do testów skórnych w stężeniu 10 mg/ml, a jako kontrolę ujemną roztwór albumin służący do rekonstruowania i rozpuszczania liofilizatu jadu. Przestrzegano okresu ważności rekonstruowanego liofilizatu jadu, ściśle według zaleceń producenta, przyjmując dla stężenia 100 µg/ml 6 miesięcy; mniejsze stężenia były przygotowywane *ex tempore*. Punktowe testy skórne (PTS) wykonywano ze stężeniem jadu 100 µg/ml (10^{-1} g/l). Roztwory nakładano na dłoniowej okolicy przedramion co najmniej 5 cm powyżej nadgarstka i co najmniej 3 cm poniżej dołu łokciowego, kontrolę dodatnią proksymalnie, kontrolę ujemną dystalnie, w odległości około 3 cm od siebie. Po nałożeniu kropli roztworu (ok. 0,05 ml) skórę nakłuwało metalowym lancetem o długości ostrza 1 mm metodą klasyczną, czyli prostopadle do powierzchni skóry, tak by nie spowodować krwawienia. Wynik testu odczytywano po 15 minutach. W interpretacji posługiwano się średnią średnic bąbla – najdłuższa i prosta prostopadła do niej, przechodząca przez jej środek. Wynik testu był miarodajny, jeśli bąbel po histaminie miał średnicę ≥ 3 mm, a w miejscu kontroli ujemnej na skórze nie stwierdzano odczynu. Wynik testu był dodatni, jeśli bąbel w miejscu aplikacji alergenu był większy lub równy reakcji na histaminę. U wszystkich dzieci przestrzegano zasad zapobiegających zafałszowaniu wyniku badania: testy były wykonywane przez tę samą doświadczoną pielęgniarkę, co gwarantowało powtarzalność wyników, dzieci nie miały cech infekcji (prawidłowe badanie przedmiotowe, prawidłowe wyniki badań leukocytozy, obrazu krwi i odczynu Biernackiego), nie przyjmowały leków przeciwhistaminowych ani glikokortykosteroidów systemowych, skóra na obszarze testów skórnych była niezmienną chorobowo, nie stosowano miejscowo na skórę glikokortykosteroidów ani inhibitorów kalcyneuryny.

4.2.2.2. Testy śródskórne

Po zakończeniu testów punktowych w tym samym dniu kontynuowano diagnostykę na podstawie testów śródskórnych z ekstraktem jadu danego gatunku owada. Testy wykonywano metodą miareczkowania punktu końcowego, tzn. zwiększając każdorazowo 10-krotnie stężenie alergenu w zakresie 0,0001–1,0 $\mu\text{g/ml}$ (10^{-7} – 10^{-3} g/l). Za kontrolę dodatnią służył roztwór histaminy o stężeniu 0,01%, a za kontrolę ujemną roztwór albumin do rekonstruowania i rozcieńczania liofilizatu jadu. Krople nakładano w okolicy dłoniowej przedramienia w odległości 5–6 cm. Za pomocą igły 27G ze strzykawki „tuberkulinówki” wprowadzano śródskórnie pod kątem 45° 0,02 ml roztworu jadu o danym stężeniu (igłą skierowaną ściętym końcem w dół), tak aby powstał bąbel pierwotny o średnicy 3 mm. Odczytu reakcji skóry na dane stężenie alergenu dokonywano po 15 minutach od nałożenia. Interpretacja wyniku testu śródskórnego polegała na ocenie bąbla i rumienia wyrażonych jako średnia średnic, przy ujemnym wyniku kontroli ujemnej. Zgodnie z wytycznymi [2, 52, 67] wynik uznawano za dodatni przy wielkości bąbla > 5 mm i wielkości rumienia > 10 mm. Po odczytaniu i interpretacji wyniku testu z danym stężeniem podejmowano decyzję o wykonaniu testu z kolejnym – większym – stężeniem roztworu alergenu. W dalszej dokumentacji wyników posługiwano się średnią średnicą bąbla poalergenowego.

4.2.2.3. Badania laboratoryjne oznaczania swoistych i całkowitych przeciwciał IgE w surowicy krwi

Krew żyłą w ilości 3 ml pobierano do probówki „na skrzep”. Pobrania dokonywano rano na czczo (godz. 9.00–10.00), u młodszych dzieci po wcześniejszym znieczuleniu skóry preparatem EMLA. Następnie probówkę z krwią wirowano w wirówce (Heraeus, Niemcy), z szybkością 4000 g/min w temperaturze $+4^\circ\text{C}$ przez 10 minut. Po odwirowaniu surowicę przenoszono do czystych i suchych probówek, zamrażano i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania oznaczenia. Okres przechowywania nie przekraczał 3 miesięcy. Oznaczenia dokonywano metodą fluoroenzymatyczną z użyciem zestawu UniCAP 100 (Phadia, Uppsala, Szwecja).

4.2.2.3.1. Metodyka oznaczania swoistych przeciwciał klasy E (sIgE)

Badaną surowicę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut ze swoistym alergenem Ag_1 , związanym kowalencyjnie z UniCAP (monoklonalne mysie przeciwciało). Podczas inkubacji tworzył się kompleks antygen–przeciwciało (Ag_1 –Ab). Nadmiar surowicy i niespecyficznych przeciwciał IgE odpłukiwano buforem. W celu wyznaczenia powstałego kompleksu (Ag_1 –Ab) dodawano mysie przeciwciała IgE (Ab_2) znakowane enzymem (β -galaktozydazą) i inkubowano przez 150 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji niezwiązany kompleks enzym–anty-IgE odpłukiwano buforem, a powstały kompleks Ag – Ab_1 – Ab_2 poddawano kolejnej inkubacji w środowisku rozwijającym przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie reakcję zatrzymywano przez dodanie odczynnika stopującego (*stop solution* – 4% roztwór węglańku sodu). Po zatrzymaniu reakcji dokonywano pomiaru fluorescencji otrzymanego eluatu. Fluorescencja była wprost proporcjonalna do stężenia sIgE w badanej surowicy. Z użyciem krzywej kalibracyjnej dokonywano przeliczenia fluorescencji na stężenie sIgE w kU/l. Liniowość oznaczenia swoistych IgE mieściła się w zakresie 0,35–100 kU/l. Czulość metody wynosiła $< 0,35$ kU/l. Otrzymane wyniki przyporządkowano do 6 klas:

- klasa 0 < 0,35 kU/l;
- klasa 1 0,35–0,7 kU/l;
- klasa 2 0,7–3,5 kU/l;
- klasa 3 3,5–17,5 kU/l;
- klasa 4 17,5–50,0 kU/l;
- klasa 5 50,0–100,0 kU/l;
- klasa 6 > 100 kU/l.

4.2.2.3.2. Metodyka oznaczania całkowitych przeciwciał klasy E (cIgE)

W badanej próbce całkowite IgE podczas inkubacji (30 min w temperaturze pokojowej) reagowało ze związanym kowalencyjnie ImmunoCAP (monoklonalne mysie przeciwciałem). W wyniku tej reakcji tworzył się kompleks Ag–Ab₁. Po odpłukaniu nadmiaru surowicy buforem w celu wyznakowania powstałego kompleksu Ag–Ab₁ dodawano znakowane przeciwciała IgE (Ab₂). Powstały kompleks inkubowano przez 150 minut w temperaturze pokojowej, a następnie niezwiązany kompleks enzym–anty-IgE (Ab₂) odpłukiwano buforem. Kompleks Ag–Ab₁–Ab₂ inkubowano w środowisku rozwijającym przez 30 minut. Następnie reakcję zatrzymywano przez dodanie odczynnika stopującego (*stop solution* – 4% roztwór węglańcu sodu) i dokonywano pomiaru fluorescencji powstałego eluatu. Fluorescencja była wprost proporcjonalna do stężenia IgE w badanej surowicy. Z użyciem krzywej kalibracyjnej dokonywano przeliczenia fluorescencji na stężenie całkowitych IgE w kU/l. Liniowość oznaczenia całkowitych IgE mieściła się w zakresie 2–5000 kU/l. Czułość metody wynosiła < 2 kU/l. W obliczeniach wykorzystano dodatkowo wskaźnik stanowiący proporcję stężenia IgE swoistych do całkowitych.

4.2.3. Metody laboratoryjne oznaczania wskaźników aktywacji mastocytów

4.2.3.1. Metodyka oznaczania tryptazy

Oznaczenie stężenia tryptazy w surowicy krwi wykonywano metodą fluoroenzymatyczną za pomocą zestawu UniCAP Tryptase (Phadia, Uppsala, Szwecja). Zasada pobierania krwi, wstępnej obróbki i przechowania materiału była taka sama, jak w przypadku próbki krwi do oznaczenia IgE swoistych i całkowitych. Badaną próbkę inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej z Anti-tryptase ImmunoCAP (przeciwciała monoklonalne mysie). Podczas inkubacji tworzył się kompleks tryptaza–antytryptaza. Nadmiar surowicy odpłukiwano buforem, a powstałe kompleksy tryptaza–antytryptaza inkubowano w temperaturze pokojowej przez 150 minut z monoklonalnymi przeciwciałami myszy znakowanymi enzymem (β-galaktozydazą). Niezwiązane kompleksy enzym–antytryptaza odpłukiwano buforem. Związane kompleksy enzym–antytryptaza inkubowano w obecności środka rozwijającego reakcję i substratu barwnego (4-metyloumbeliferyl-β-D-galaktozyd z dodatkiem azydku sodu) w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Następnie zatrzymywano reakcję przez dodanie odczynnika stopującego (4% roztwór węglańcu sodu) i dokonywano pomiarów fluorescencji otrzymanego eluatu. Fluorescencja była wprost proporcjonalna do stężenia tryptazy w badanej próbce surowicy. Z użyciem krzywej kalibracyjnej dokonywano przeliczenia fluorescencji na stężenia tryptazy w μg/l w badanych próbkach. Czułość metody wynosiła poniżej < 1 μg/l.

4.2.3.2. Metodyka oznaczania metabolitów PGD₂ w osoczu i w moczu

Oznaczenia wykonywano metodą chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas techniką ujemnej jonizacji chemicznej (*gas chromatography-mass spectrometry-negative ion chemical ionisation* – GC-MS-NICI [Hewlett Packard, Palo Alto, USA]) zgodnie z metodyką podaną przez T. Obata [98].

4.2.3.2.1. Metodyka oznaczania 9 α ,11 β -PGF₂ w osoczu i moczu

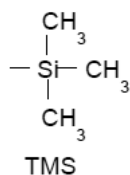
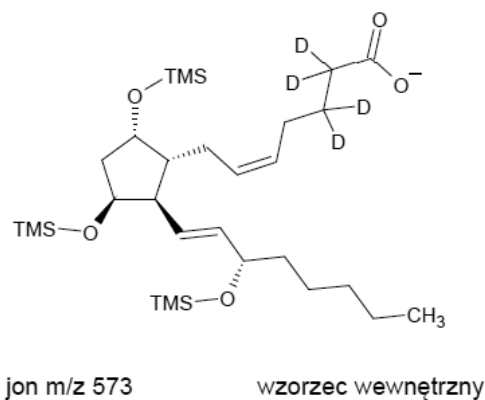
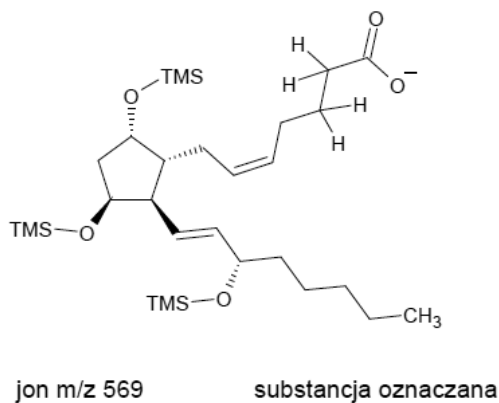
2,5 ml krwi żyłnej pobierano do próbki zawierającej cytrynian sodu. Pobrania dokonywano rano (godz. 9.00–10.00), na czczo, u młodszych dzieci po wcześniejszym znieczuleniu skóry preparatem EMLA. Natychmiast po pobraniu krew wirowano (3500 obrotów/min) przez 10 minut. Otrzymane po odwirowaniu osocze (w dokładnie odmierzonej ilości 1 ml) umieszczano w próbce zawierającej tzw. standard wewnętrzny w ilości 0,5 ng. Pod względem chemicznym jest to substancja identyczna z 9 α ,11 β -PGF₂, w której kilka atomów wodoru zostało zastąpionych atomami deuteru (np. ²H₄9 α ,11 β -PGF₂, ryc. 5). Tak przygotowane próbki zamrażano w temperaturze –80°C do czasu analizy. Okres zamrożenia nie przekraczał 3 miesięcy. Mocz (0,5 ml) do oznaczania pobierano z pierwszej porannej porcji lub po 2-godzinnej kolekcji w pęcherzu (godz. 8.00–10.00) do próbki zawierającej standard wewnętrzny w ilości 2 ng ²H₄9 α ,11 β -PGF₂. Podobnie jak osocze próbki zamrażano do czasu wykonania analizy. Przed analizą próbki rozmrażano, zakwaszono 1N kwasem solnym do pH 3, mieszano (vortex) i ekstrahowano octanem etylu. Po odebraniu fazy organicznej (górną warstwę) octan etylu odparowywano (w atmosferze azotu) do suchości.

Pozostałość poddano w kolejności:

- 1) reakcji polegającej na przemianie grup karboksylowych w estrowe za pomocą reakcji z bromkiem pentafluorobenzylowym (PFBBr) w obecności diizopropylotyloaminy (DIPE) (derywatywacja 1);
- 2) rozdzieleniu produktów reakcji za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (*thin layer chromatography* – TLC) na żelu krzemionkowym, fazą rozwijającą była mieszanina: octan etylu/n-heptan w proporcji 9/1 (v/v); po zebraniu adsorbentu z miejsca odpowiadającego badanej substancji ekstrahowano ją octanem etylu i poddano:
 - a) reakcji wymiany atomów wodoru w grupach hydroksylowych na trimetylosilylowe (TMS; derywatywacja 2) za pomocą trifluoro-N,O-bis-(trimetylosilylo)-acetamidu (BSTFA) w obecności pirydyny (ryc. 6);
 - b) po odparowaniu (w atmosferze azotu) pozostałość po rozpuszczeniu w toluenie poddawano analizie, pomiary wykonywano techniką GC-MS-NICI, rejestrując wybrane jony (*selected ion monitoring* – SIM) – dla 9 α ,11 β -PGF₂ jon m/z 569, a dla standardu wewnętrznego jon m/z 573; stosowano 30-metrową kolumnę HP-5ms (o średnicy wewnętrznej 0,25 mm, o grubości filmu 0,25 μ m), próg detekcji w osoczu wynosił 1 pg/ml, a w moczu 0,5 ng/mg kreatyniny (ryc. 7).

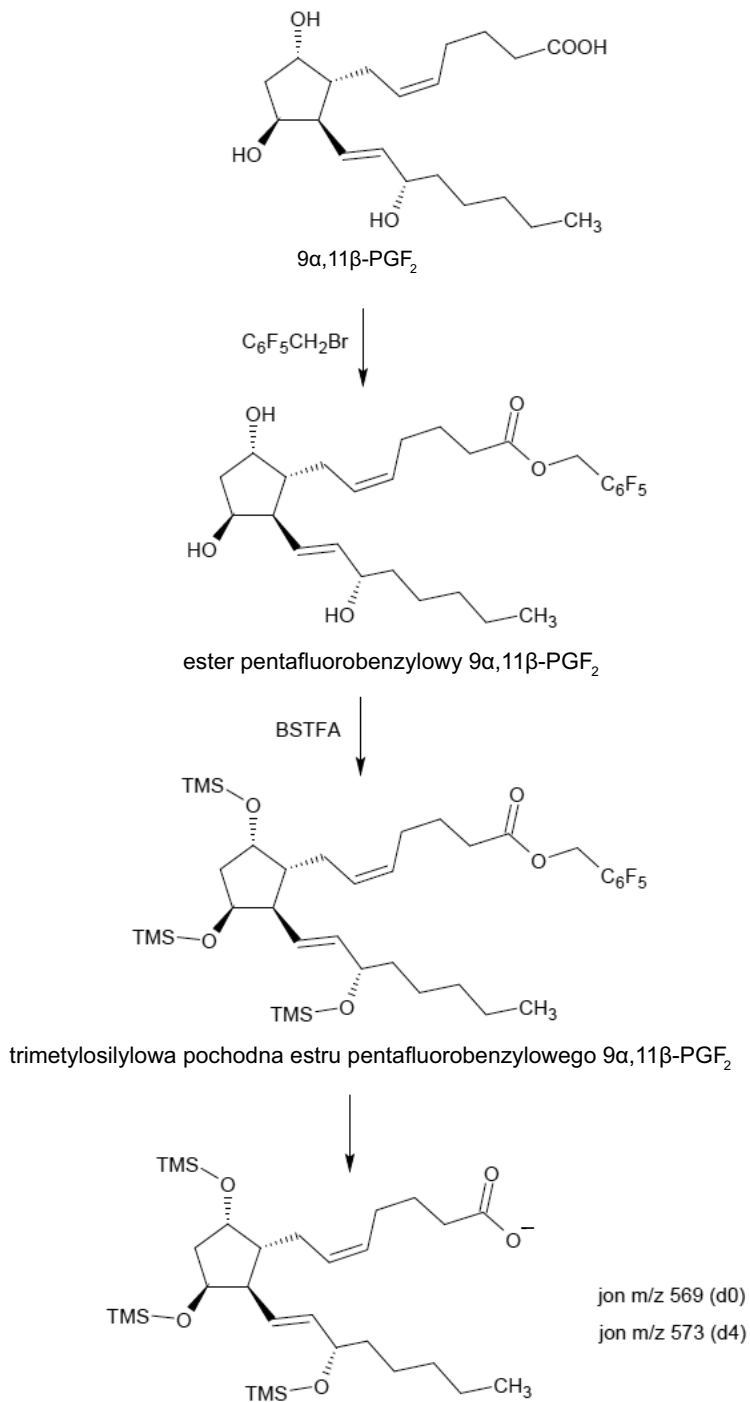
4.2.3.2.2. Metodyka oznaczania tetranor-PGD-M w moczu

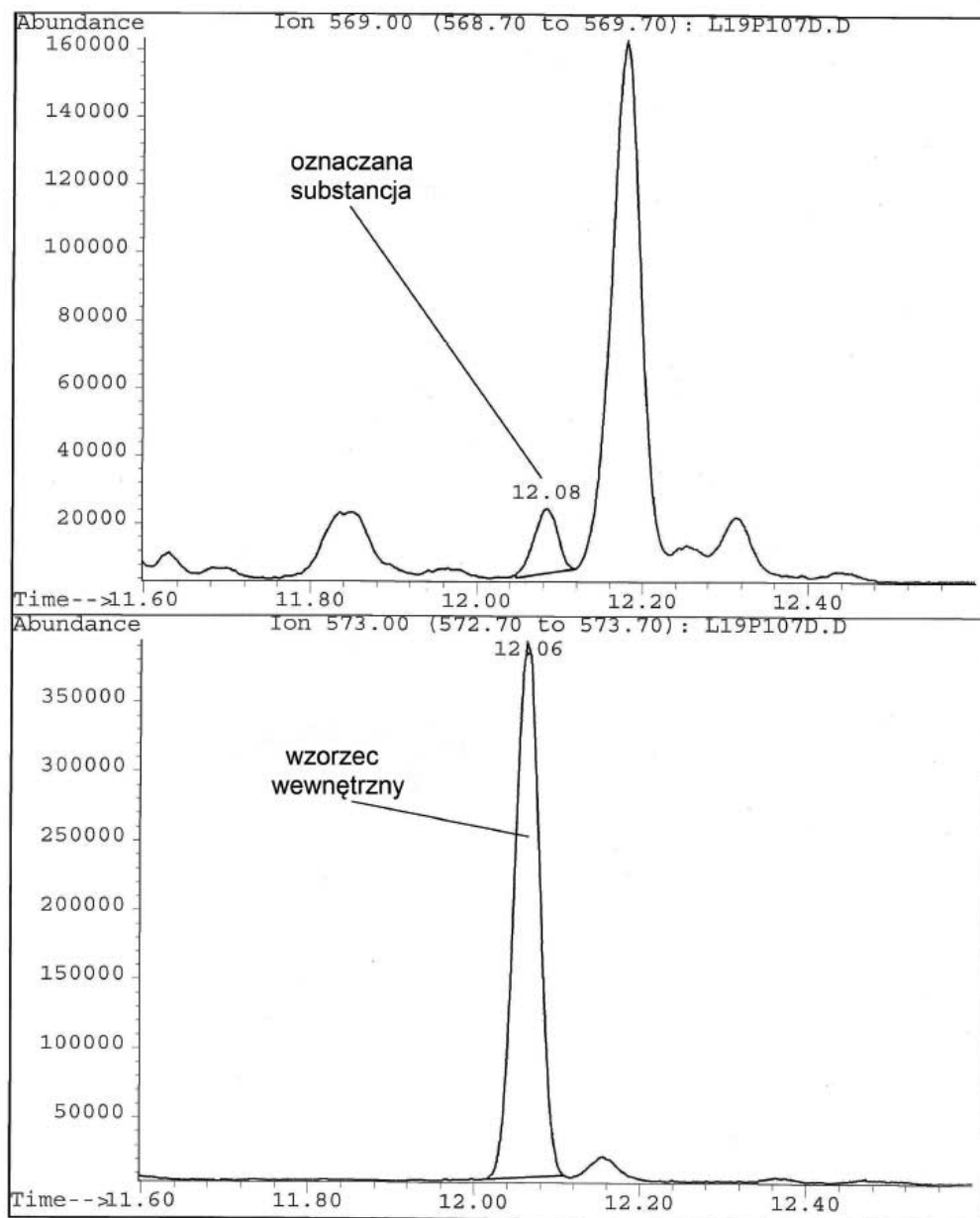
Tetranor-PGD-M zawiera dwie grupy karboksylowe -COOH, dwie karbonylowe (ketonowe) >CO i hydroksylową -OH. Zazwyczaj w celu oznaczenia tego typu związków (po ekstrakcji z badanej próbki) kolejno przeprowadza się estryfikację grup karboksy-



Ryc. 5. Wzory chemiczne jonów użytych do oznaczania 9 α ,11 β -PGF₂

lowych do estru dipentafluorobenzylowego i rozdziela na TLC. Po zebraniu adsorbentu z miejsca występowania analizowanej substancji ekstrahuje się ją, zamienia grupy karbonylowe w metoksymowe >C=N-O-CH₃, a hydroksylową w eter TMS. Następnie poddaje się analizie GC-MS-NICI. Ponieważ początkowo wyniki otrzymane dla tetranor-PGD-M nie były wystarczająco przejrzyste, aby można było na ich podstawie precy-

Ryc. 6. Schemat reakcji derywatywacji 9 α ,11 β -PGF₂



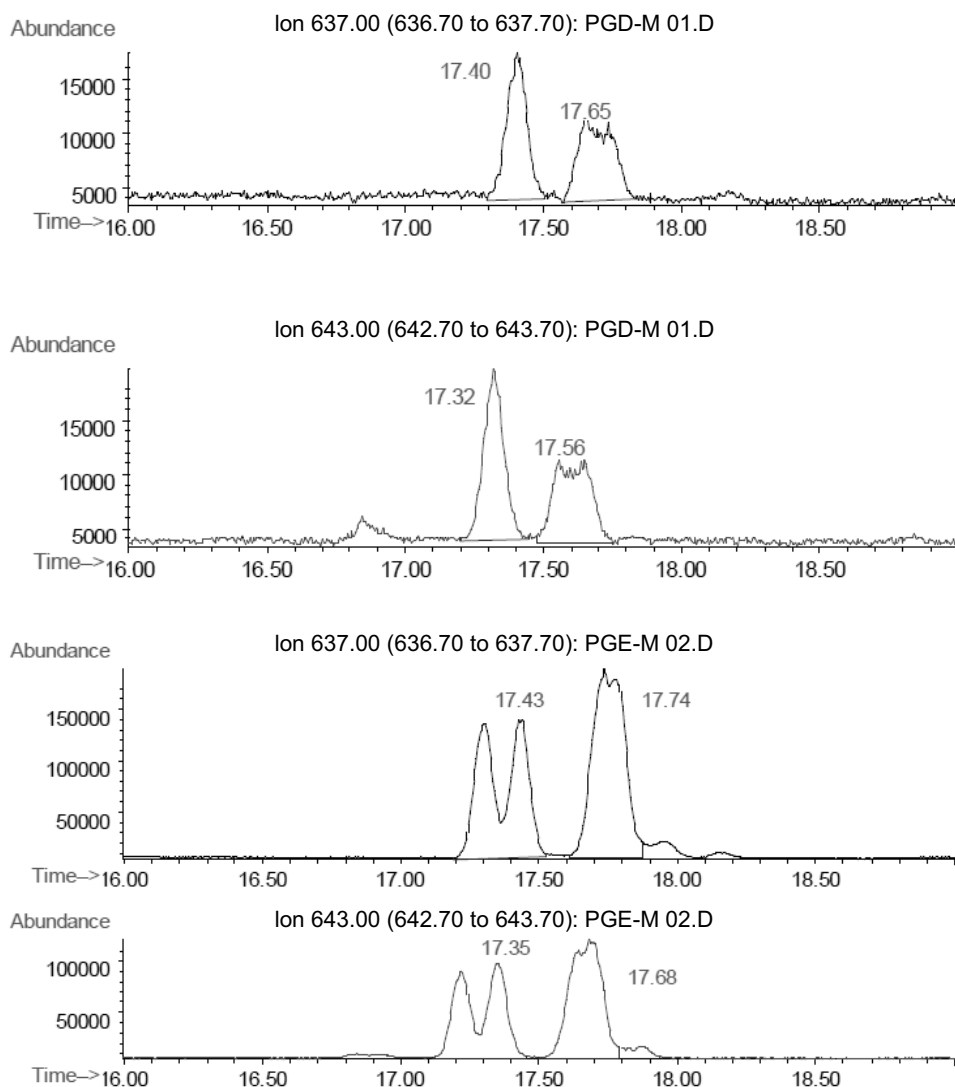
Ryc. 7. Przykład chromatogramów jonowych dla oznaczenia 9 α ,11 β -PGF₂

zyjnie wyliczyć jego stężenie w badanych próbkach, podjęto próbę ustalenia przyczyny; wykryto dwie:

- 1) derywatyżacja do metoksywu prowadzi do powstania czterech izomerów, co zmniejsza czułość odczytu;

2) nakładanie się na wykresie GC pików pochodzących od tetranor-PGE-M na piki od tetranor-PGD-M.

Na rycinie 8 pokazano wykresy GC SIM obu związków (tetranor-PGD-M d0 i d6 oraz tetranor-PGE-M d0 i d6) oraz ich czasy retencji. W tej sytuacji podjęto próbę znalezienia innych substancji powstających w procesie derywatywacji. Synteza, a następnie analiza GC-MS-NICI pochodnej dipentafluorobenzylowej tetranor-PGD-M doprowadziły do wykrycia dwóch substancji o tej samej masie jonów (m/z 489). Takie same analizy wykonano w odniesieniu do dipentafluorobenzylowej pochodnej tetranor-PGE-M i również



Ryc. 8. Tetranor-PGD-M d0 i d6 (dwa wykresy górne) i tetranor-PGE-M d0 i d6 (dwa wykresy dolne)

wykryto substancję o identycznej masie jonów (m/z 489). Tym razem piki pochodzące od tetranor-PGD-M i tetranor-PGE-M były od siebie dobrze oddzielone i nadawały się do pomiaru ilościowego.

W ostatecznej analizie moczu (0,5 ml) do oznaczania tetranor-PGD-M pobierano z pierwszej porannej porcji (godz. 8.00–10.00) do próbki zawierającej standard wewnętrzny w ilości 10 ng tetranor- $^2\text{H}_6$ PGD-M. Przechowanie próbek oraz ich bezpośrednie przygotowanie do wykonania oznaczeń przebiegały podobnie jak w przypadku metabolitów $9\alpha,11\beta$ -PGF₂. Produkt poddano następującym przemianom:

- 1) ekstrakcji octanem etylu;
- 2) po odparowaniu rozpuszczalnika (w atmosferze azotu) i syntezie estru dipentafluorobenzylowego;
- 3) rozdzieleniu na płytce do TLC;
- 4) po zebraniu adsorbentu z miejsca występowania tetranor-PGD-M i deuterowanego wzorca ekstrahowano je octanem etylu;
- 5) pozostałość po odparowaniu octanu etylu (w atmosferze azotu) i rozpuszczeniu w toluenie analizowano w układzie GC-MS-NICI.

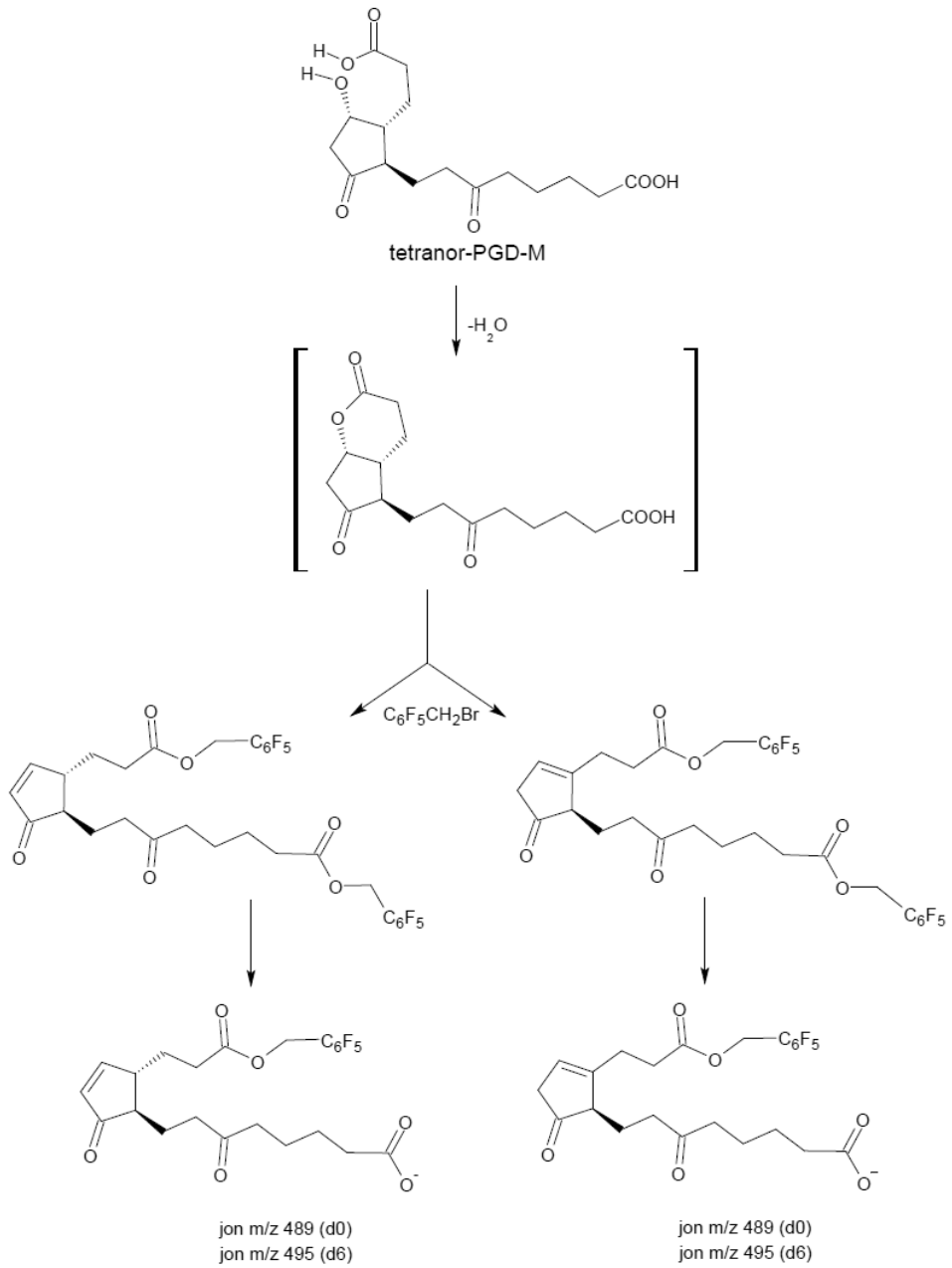
Kolumna chromatograficzna i warunki rozdziału były takie same, jak w przypadku $9\alpha,11\beta$ -PGF₂. Dla estru di-pentafluorobenzylowego tetranor-PGD-M i jego standardu wewnętrznego rejestrowano odpowiednio jony m/z 489 i m/z 495. Próg detekcji wynosił 0,5 ng/mg kreatyniny. Schemat reakcji derywatywacji oraz wzory jonów wykorzystanych do rejestracji SIM pokazano na rycinie 9, a przykładowy wykres chromatograficzny SIM dla próbki moczu na rycinie 10.

Proponowany schemat reakcji derywatywacji przedstawiony na rycinie 9 zakłada powstawanie produktu pośredniego w postaci cyklicznej (po oderwaniu cząsteczki wody), tzw. δ -laktonu (ryc. 9 – wzór chemiczny objęty klamrą). Obecność tej substancji udało się potwierdzić. W tym celu przeprowadzono cały proces ekstrakcji, derywatywacji i analizy GC-MS-NICI z użyciem czystych substancji tetranor-PGD-M i tetranor- $^2\text{H}_6$ PGD-M. Po zakwaszeniu, ekstrakcji z wodnego roztworu i odparowaniu octanu etylu pozostałość poddano reakcji metylacji wolnej grupy karboksylowej diazometanem (CH_2N_2), a następnie derywatywowano za pomocą PFBBr (w obecności DIPE [ryc. 11]). Gdyby po zakwaszeniu próbki nie tworzył się produkt cykliczny w reakcjach z diazometanem, a następnie z PFBBr, nie mógłby powstać mieszany ester metylowo-pentafluorobenzylowy tetranor-PGD-M (ryc. 9); utworzyłyby się ester dimetylowy. W efekcie nie byłoby jonów m/z 323 i m/z 329. Wykres SIM dla tych jonów pokazano na rycinie 12.

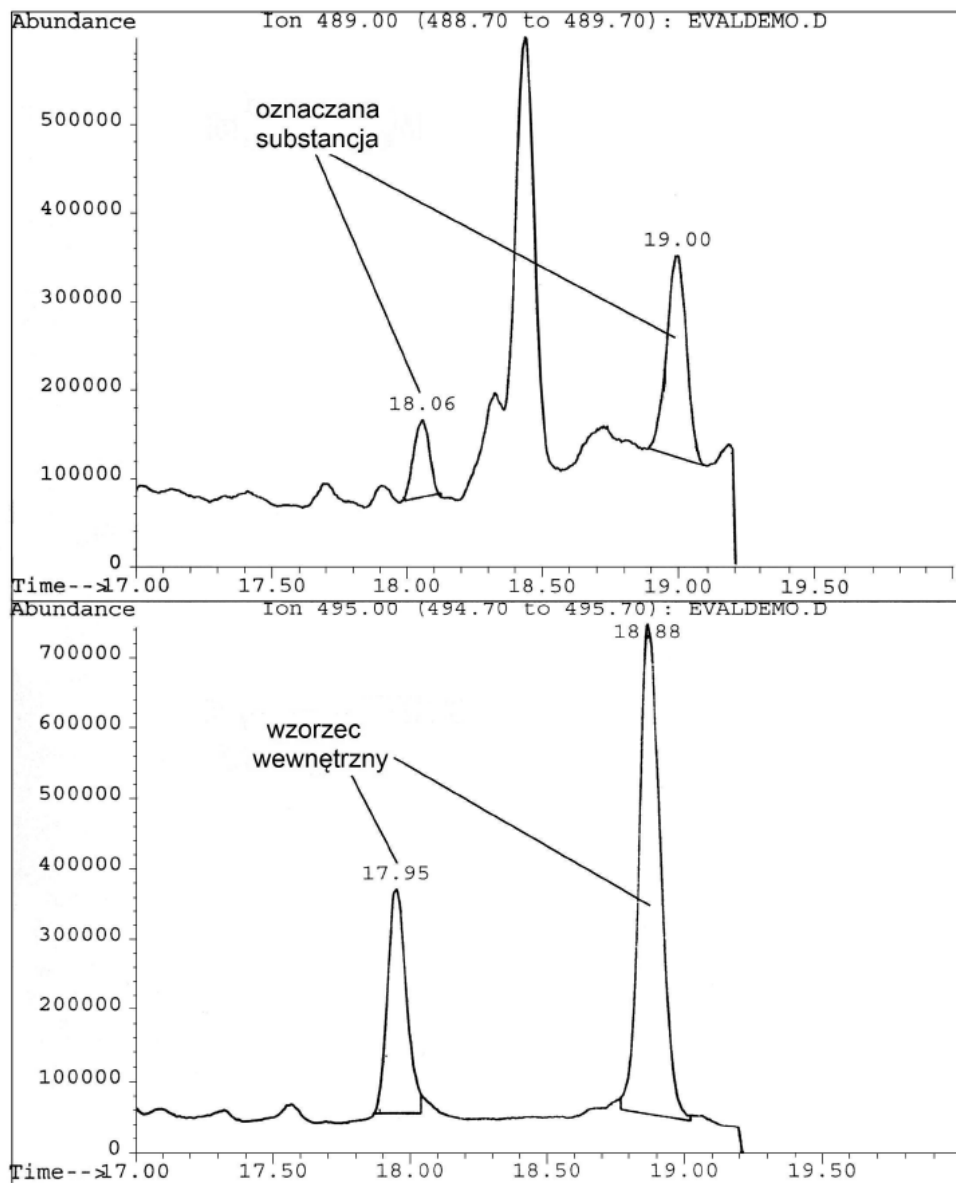
Tetranor-PGD-M jest związkiem zawierającym grupy: karboksylową $-\text{COOH}$ i hydroksylową $-\text{OH}$ w takim wzajemnym położeniu, które ułatwia oderwanie cząsteczki wody (δ -hydroksykwasy). Takie odszczepienie wody jest katalizowane kwasami i zachodzi bardzo łatwo. Otrzymane wyniki uzasadniają wniosek, że tetranor-PGD-M może istnieć (w moczu) w postaci dynamicznej równowagi między dwiema formami – otwartą i cykliczną, co przedstawiono na rycinie 13. To, która postać przeważa, zależy od pH środowiska.

4.2.4. Metoda immunoterapii swoistej

W leczeniu stosowano ekstrakt jadu od tego samego producenta, co w diagnostyce. Odczulanie dawką wstępną prowadzono na podstawie 5-dniowego protokołu *rush*

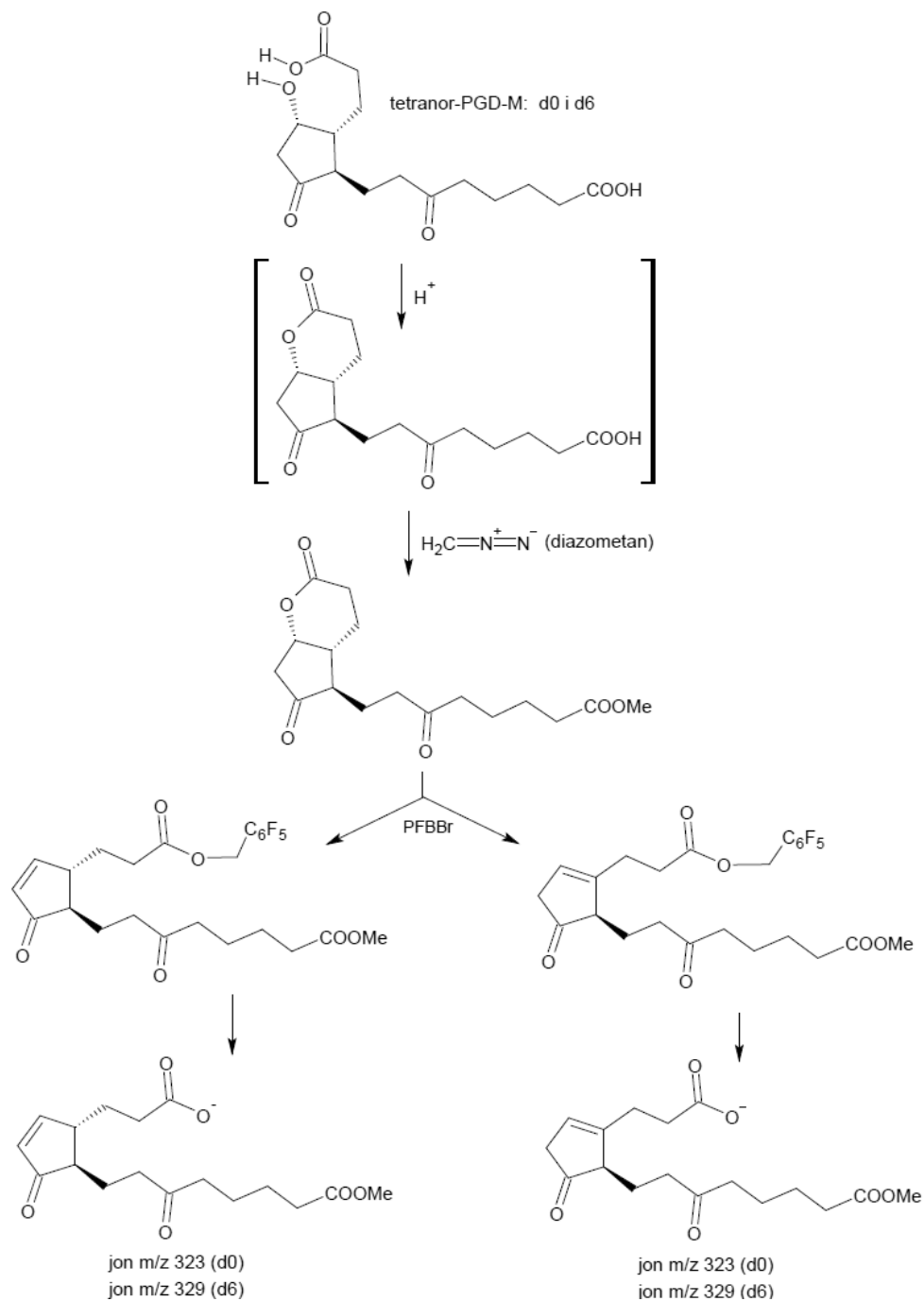


Ryc. 9. Schemat reakcji derywatywacji tetranor-PGD-M oraz wzory jonów i ich masy

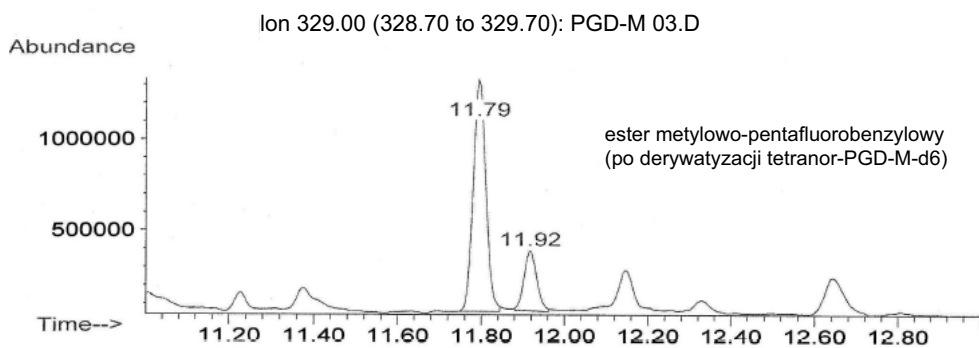
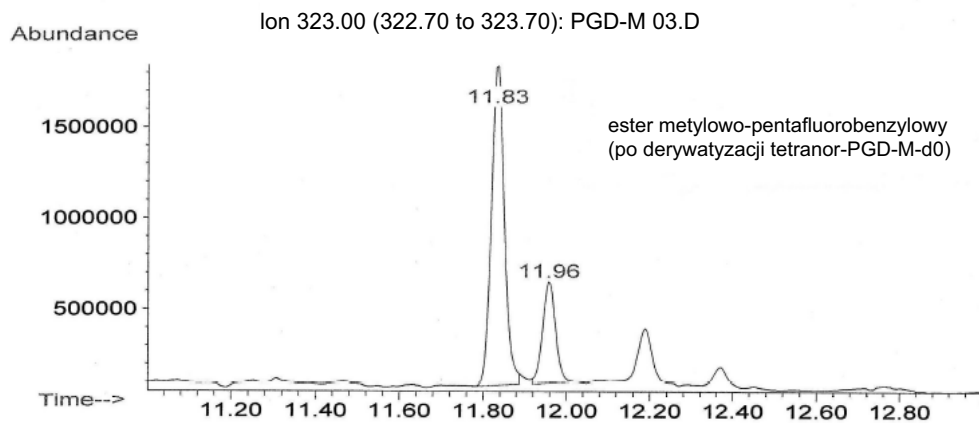


Ryc. 10. Przykład chromatogramów jonowych dla oznaczania tetranor-PGD-M

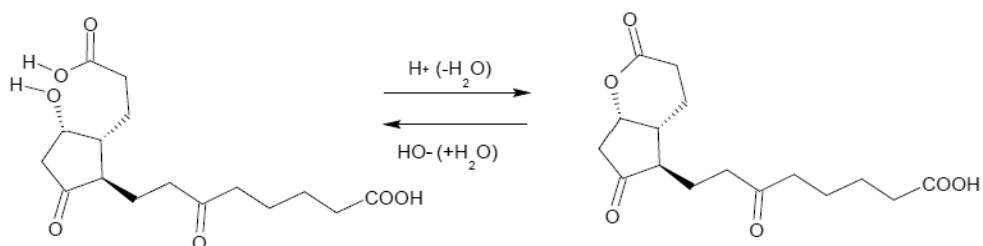
wodnymi ekstraktami jadu Venomenhal HALAllergy (dawka skumulowana 216,46 μg) i Pharmalgen ALKabello (dawka skumulowana 223,32 μg [różnica między dawkami ekstraktów stosowanych w terapii *rush* była do pominięcia]) lub 3,5-godzinny protokół *ultra-rush* preparatem Pharmalgen ALKabello (dawka skumulowana 101,11 μg).



Ryc. 11. Schemat reakcji derywatywacji z zastosowaniem diazometanu i wzory jonów



Ryc. 12. Chromatogramy jonowe estru metylo-pentafluorobenzylowego tetranor-PGD-M



Ryc. 13. Równowaga między formą otwartą i cykliczną zależną od pH

Protokoły szybki (*rush*) i bardzo szybki (*ultra-rush*) odczulania dawką wstępną dwoma równoważnymi ekstraktami jadu

Dzień VIT	Protokół szybki (<i>rush</i>)				Protokół bardzo szybki (<i>ultra-rush</i>)			
	Ekstrakt jadu Venomenhal HALAllergy		Ekstrakt jadu Pharmalgen ALKAbello		Ekstrakt jadu Pharmalgen ALKAbello		Ekstrakt jadu Pharmalgen ALKAbello	
	stężenie (µg/ml)	dawka dzienna (µg)	stężenie (µg/ml)	dawka dzienna (µg)	stężenie (µg/ml)	dawka dzienna (µg)	stężenie (µg/ml)	dawka dzienna (µg)
1	0,0001	0,00001	0,1	0,01+0,02+0,04	0,1	0,01	0,1	0,01
	0,001	0,0001					1,0	0,1
	0,01	0,001	1,0	0,05	10,0	10,0	1,0	
	0,1	0,01					100,0	10,0
2	1,0	0,05+0,2+0,4+0,8	1,0	0,1+0,2+0,4	10,1	100,0	100,0	
			10,0				0,5	
3	10,0	1,0+2,0+4,0+8,0	10,0	1,0+2,0+4,0	100,0	100,0	5,0	
			100,0				5,0	
4	100,0	10,0+20,0+40,0	100,0	10,0+20,0+30,0+40,0	100,0	100,0	30,0	
			100,0				40,0	
5		60,0+70,0	100,0	50,0+60,0				
	dawka skumulowana 216,46 µg		dawka skumulowana 223,32 µg		dawka skumulowana 101,11 µg			

Pierwszą dawkę podtrzymującą podawano po 2 tygodniach od zakończenia protokołu szybkiego lub bardzo szybkiego. Kolejne dawki podtrzymujące w ciągu pierwszego roku leczenia podawano co 4 tygodnie, a w trakcie leczenia 2–5-letniego co 6 tygodni. Dawka podtrzymująca wynosiła 100 μg . W pierwszym roku leczenia stosowano ją w dawkach dzielonych po 50 μg w odstępie jednej godziny, w kolejnych latach podawano jako dawkę jednorazową. Wielkość dawki modyfikowano w przypadku poszczepiennych objawów ubocznych. Leczenie prowadzono w warunkach szpitalnych z pełnym zabezpieczeniem resuscytacyjnym. Dla lepszego porównania systemowe odczyny poszczepienne (SSR) oceniano zgodnie z czterostopniową skalą Muellera, analogicznie jak ciężkość reakcji po użądleniu. Postępowanie było zgodne z obowiązującymi wytycznymi [2, 51–54]. Wielkość dawki skumulowanej w odstępach kontroli rocznych przedstawiono na rycinie 4.

4.2.5. Metody analizy statystycznej

Wyniki badań wyrażono w postaci średniej arytmetycznej i błędu standardowego średniej z podaniem 95% przedziału ufności (95% PU) i przeanalizowano z użyciem regresji liniowej.

Wszystkie wyniki przedstawione w pracy – zarówno dotyczące parametrów położenia, jak i regresji liniowej – otrzymano metodą nazywaną w piśmiennictwie angielskim wymiennie: *random effects*, *hierarchical* lub *multilevel analysis*, uwzględniającą panele (1 panel obejmuje wyniki 1 pacjenta) lub grupowy charakter danych. Takie podejście uwzględnia powtarzający się charakter danych w przypadku tego samego pacjenta, które pozostają naturalnie skorelowane wewnątrz panelu. Pozwala to na uniknięcie systematycznego błędu estymacji [99].

Zastosowanie klasycznej analizy statystycznej (*fixed effects analysis*) wpływałoby na traktowanie wszystkich pomiarów jako niezależnych, bez uwzględnienia ich panelowego charakteru. Taka analiza prowadziłaby do systematycznego błędu estymacji i wyników.

Za graniczny poziom istotności statystycznej we wszystkich analizach przyjęto $\alpha = 0,05$. Hipotezę zerową odrzucano przy wartości $p < \alpha$.

Analizę przeprowadzono za pomocą pakietu komputerowego Stata [100].

5. WYNIKI

5.1. Porównanie zależności pomiędzy reakcją kliniczną po użądleniu a podłożem zależnym od IgE i markerami aktywacji mastocytów w grupie dzieci leczonych metodą immunoterapii

Analizę wyników rozpoczęto od ustalenia zależności pomiędzy stopniem ciężkości reakcji klinicznej po użądleniu a stopniem uczulenia, mierzonym poprzez ocenę sIgE i testów śródskórnych, odpowiednio z jadem pszczoły i jadem osy.

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w stężeniu sIgE w obrębie dzieci uczulonych na jad pszczoły, w zależności od stopnia ciężkości objawów po użądleniu, przy czym najwyższą wartość stwierdzono u dzieci z III stopniem Muellera (tab. 5). Stwierdzono także znamienne różnice w stężeniu sIgE pomiędzy dziećmi uczulonymi na jad pszczoły vs na jad osy w stopniu III i IV reakcji klinicznej. Nie było istotnych różnic w porównaniu testów skórnych.

Tabela 5

Zależność pomiędzy stopniem reakcji po użądleniu wg klasyfikacji Muellera a sIgE i testami skórnymi dla jadu pszczoły i jadu osy

Badany parametr	Swoiste IgE (kU/l) śr. (95%PU)		p*	Dodatknie testy skórne n (%)		p*
	jad pszczoły	jad osy		jad pszczoły	jad osy	
II ^o wg Muellera	16,26 (7,79–24,73)	20,96 (10,54–52,46)	NS	11 (78,6)	6 (100)	NS
III ^o wg Muellera	43,89 (28,35–59,43)	10,16 (1,25–21,57)	0,000	18 (100)	8 (80)	NS
IV ^o wg Muellera	38,68 (18,65–58,71)	5,35 (2,30–8,42)	0,003	8 (80)	7 (70)	NS
p**	0,016	NS				

* porównanie pomiędzy uczulonymi na jad pszczoły vs jad osy o tym samym stopniu ciężkości wg Muellera

** porównanie w grupie dzieci uczulonych na ten sam gatunek owada

NS – nieznamienne statystycznie

Boldem wyróżniono wartości, między którymi wystąpiły różnice istotne statystycznie

W ocenie zależności pomiędzy stopniem ciężkości objawów po użądleniu a markerami aktywacji mastocytów we krwi istotnie wyższe stężenie tryptazy stwierdzono u dzieci uczulonych na jad pszczoły o reakcji III° Muellera w porównaniu z dziećmi z reakcją III° uczulonymi na jad osy (tab. 6).

Tabela 6

Zależność pomiędzy stopniem reakcji po użądleniu wg klasyfikacji Muellera a markerami aktywacji mastocytów badanymi we krwi w grupie uczulonych na jad pszczoły i jad osy

Badany parametr	Tryptaza		p	9 α ,11 β -PGF ₂ we krwi		p
	jad pszczoły śr. (95% PU)	jad osy śr. (95% PU)		jad pszczoły śr. (95% PU)	jad osy śr. (95% PU)	
II° wg Muellera	3,31 (2,51–4,11)	4,80 (1,92–7,68)	NS	29,75 (19,79–39,71)	14,45 (7,79–21,11)	NS
III° wg Muellera	4,69 (3,26–6,12)	2,81 (1,58–4,05)	0,021	32,42 (17,09–47,75)	32,80 (10,84–54,75)	NS
IV° wg Muellera	3,53 (2,55–4,51)	3,18 (2,53–3,83)	NS	31,52 (13,06–49,98)	14,44 (7,29–21,59)	NS

p – poziom istotności statystycznej

NS – nieznamienne statystycznie

W ocenie zależności pomiędzy stopniem ciężkości objawów po użądleniu a markerami aktywacji mastocytów w moczu nie stwierdzono istotnych różnic (tab. 7).

Tabela 7

Zależność pomiędzy stopniem reakcji po użądleniu wg klasyfikacji Muellera a markerami aktywacji mastocytów badanymi w moczu w grupie uczulonych na jad pszczoły i jad osy

Badany parametr	9 α ,11 β -PGF ₂ w moczu		p	Tetranor-PGD-M w moczu		p
	jad pszczoły śr. (95% PU)	jad osy śr. (95% PU)		jad pszczoły śr. (95% PU)	jad osy śr. (95% PU)	
II° wg Muellera	1,67 (0,89–2,45)	0,95 (0,54–1,36)	NS	5,74 (3,56–7,92)	6,16 (2,34–9,98)	NS
III° wg Muellera	1,30 (0,89–1,71)	1,65 (0,51–2,79)	NS	5,49 (3,93–7,59)	5,71 (3,03–8,40)	NS
IV° wg Muellera	1,04 (0,82–1,26)	1,15 (0,72–1,58)	NS	5,23 (0,10–0,37)	3,30 (4,58–5,03)	NS

p – poziom istotności statystycznej

NS – nieznamienne statystycznie

W grupie dzieci niezakwalifikowanych do immunoterapii nie stwierdzono zależności pomiędzy reakcją kliniczną a stężeniem sIgE ani pomiędzy reakcją kliniczną a stężeniem markerów aktywacji komórek tucznych.

5.2. Porównanie podstawowych wartości markerów aktywacji mastocytów pomiędzy grupami badanych

Analizę rozpoczęto od zbadania zależności badanych markerów aktywacji mastocytów od płci i wieku odpowiednio w grupie uczulonych na jad owadów i w grupie kontrolnej. W grupie dzieci uczulonych zakwalifikowanych do immunoterapii, bez względu na gatunek uczulającego owada, stwierdzono istotną ujemną korelację pomiędzy wiekiem i stężeniem tetranor-PGD-M ($\tau\text{-}b = -0,28$, $p = 0,002$) oraz wyższe stężenie $9\alpha,11\beta\text{-PGF}_2$ w moczu u dziewczynek (1,59; SEM 0,28 vs 1,23; SEM 0,15, $p = 0,041$). Zależność pomiędzy podstawowymi stężeniami markerów aktywacji mastocytów z wiekiem i płcią w grupie dzieci niezakwalifikowanych i w grupie kontrolnej przedstawiała się podobnie, ale nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych.

Średnie wartości stężeń podstawowych tryptazy w surowicy krwi, $9\alpha,11\beta\text{-PGF}_2$ w osoczu oraz tetranor-PGD-M w moczu w grupach dzieci zakwalifikowanych do immunoterapii swoistej w porównaniu z grupą kontrolną nie wykazywały pomiędzy sobą różnic istotnych statystycznie. Średnie stężenie $9\alpha,11\beta\text{-PGF}_2$ w moczu było istotnie wyższe w grupie kontrolnej ($p = 0,005$). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi wartościami wszystkich analizowanych parametrów w grupie dzieci uczulonych zakwalifikowanych do immunoterapii swoistej w porównaniu z grupą dzieci niespełniających kryteriów kwalifikacji do immunoterapii (tab. 8).

Średnie wartości podstawowych stężeń badanych parametrów u dzieci leczonych immunoterapią z powodu alergii na jad osy vs alergii na jad pszczoły z uwzględnieniem podziału na płeć nie wykazały istotnych statystycznie różnic (tab. 9).

Tabela 8

Średnie wartości parametrów w grupie dzieci uczulonych zakwalifikowanych do immunoterapii swoistej i dzieci niespełniających kryteriów kwalifikacji do immunoterapii

Badany parametr	Dzieci uczulone na jad owadów				Dzieci zdrowe (n = 10)		p**	
	zakwalifikowane do VIT (n = 68)		p*	niezakwalifikowane do VIT (n = 26)		śr.		95% PU
	śr.	95% PU		śr.	95% PU			
Tryptaza w surowicy ($\mu\text{g/l}$)	3,75	3,18–4,31	NS	3,77	2,85–4,69	2,52	1,73–3,31	NS
$9\alpha,11\beta\text{-PGF}_2$ w osoczu (pg/ml)	27,76	21,21–34,31	NS	26,51	19,59–33,43	16,90	7,49–26,31	NS
$9\alpha,11\beta\text{-PGF}_2$ w moczu (ng/mg kreatyniny)	1,33	1,06–1,60	NS	1,66	1,05–2,28	2,59	1,83–3,36	0,005
Tetranor-PGD-M w moczu (ng/mg kreatyniny)	5,36	4,25–6,47	NS	9,05	6,08–12,02	6,66	4,80–8,51	NS

* porównanie pomiędzy dziećmi zakwalifikowanymi i niezakwalifikowanymi do immunoterapii swoistej

** porównanie pomiędzy grupą dzieci zakwalifikowanych do immunoterapii na jad owadów z grupą kontrolną

NS – nieznamienne statystycznie

VIT – immunoterapia swoista na jad owadów

Średnie wartości parametrów dzieci przed leczeniem immunoterapią swoistą z uwzględnieniem gatunku uczulającego owada i płci dziecka

Badany parametr	Uczulenie na jad osy śr. (95% PU)		p	Uczulenie na jad pszczoły śr. (95% PU)		p
	♂ (n = 22)	♀ (n = 4)		♂ (n = 27)	♀ (n = 15)	
Tryptaza w surowicy (µg/l)	3,45 (2,43–4,47)	3,18 (2,67–3,69)	NS	3,96 (2,90–5,02)	3,94 (3,22–4,67)	NS
9α,11β-PGF ₂ w osoczu (pg/ml)	23,31 (11,92–34,70)	13,8 (4,41–23,19)	NS	34,17 (22,65–45,70)	26,18 (15,24–37,12)	NS
9α,11β-PGF ₂ w moczu (ng/mg kreatyniny)	1,32 (0,75–1,89)	1,18 (0,83–1,53)	NS	1,16 (0,89–1,43)	1,7 (1,01–2,39)	NS
Tetranor-PGD-M w moczu (ng/mg kreatyniny)	4,67 (3,06–6,28)	7,53 (1,26–13,80)	NS	5,42 (3,73–7,11)	5,79 (2,89–8,69)	NS

p – poziom istotności statystycznej

NS – nieznamiennie statystycznie

Fakt występowania atopii nie różnicował pacjentów zarówno w grupie uczulonych na jad osy, jak i uczulonych na jad pszczoły w zakresie podstawowego stężenia badanych markerów aktywacji mastocytów (tab. 10). Również po uwzględnieniu rozpoznania astmy nie obserwowano różnic.

Tabela 10

Średnie wartości parametrów dzieci przed leczeniem immunoterapią swoistą z uwzględnieniem współwystępowania atopii

Badany parametr	Uczulenie na jad osy śr. (95% PU)		p	Uczulenie na jad pszczoły śr. (95% PU)		p
	atopia – n = 20	atopia + n = 6		atopia – n = 30	atopia + n = 12	
Tryptaza w surowicy (µg/l)	3,19 (2,35–4,03)	4,14 (1,53–6,75)	NS	3,91 (3,03–4,79)	4,06 (2,81–5,31)	NS
9α,11β-PGF ₂ w osoczu (pg/ml)	20,37 (8,36–32,39)	26,27 (11,47–41,07)	NS	26,97 (18,86–35,09)	42,19 (21,02–63,36)	NS
9α,11β-PGF ₂ w moczu (ng/mg kreatyniny)	1,37 (0,76–1,98)	1,04 (0,45–1,63)	NS	1,47 (1,04–1,90)	1,08 (0,83–1,34)	NS
PGD-M w moczu (ng/mg kreatyniny)	5,01 (3,05–6,97)	5,25 (2,49–8,01)	NS	5,27 (3,58–6,96)	6,16 (3,18–9,14)	NS

p – poziom istotności statystycznej

NS – nieznamiennie statystycznie

5.3. Model opisujący immunoterapię swoistą na jad owadów dawką wstępną podaną metodą szybką (*rush*) vs bardzo szybką (*ultra-rush*)

Pięćdziesiąt sześć dzieci (40 chłopców, 16 dziewczynek) miało podaną dawkę wstępną immunoterapii swoistej metodą *rush*, w tym 33 dzieci (21 chłopców, 12 dziewczynek) było odczulanych ekstraktem jadu pszczoły, a 23 (19 chłopców, 4 dziewczynki) ekstraktem jadu osy. Dwanaścioro dzieci (9 chłopców, 3 dziewczynki) miało podaną dawkę wstępną immunoterapii swoistej metodą *ultra-rush*, w tym 9 dzieci (6 chłopców, 3 dziewczynki) rozpoczęło leczenie ekstraktem jadu pszczoły, a 3 chłopców ekstraktem jadu osy. U 7 chłopców spośród 56 dzieci (12,5%) odczulanych metodą *rush* (w tym u 5 [10%] odczulanych ekstraktem jadu pszczoły, i u 2 [2,5%] odczulanych ekstraktem jadu osy) obserwowano objawy uboczne w trakcie wstępnej fazy leczenia. Szczegółową charakterystykę kliniczną tych dzieci podano w tabeli 11.

Analiza porównawcza w grupie uczulonych na jad pszczoły pomiędzy dziećmi, u których wystąpiły objawy systemowe, a dziećmi dobrze tolerującymi szczepionkę podaną metodą *rush*, wskazała na istotnie statystycznie niższe wartości średnie podstawowego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu i surowicy u dzieci z SSR (tab. 12). Nie stwierdzono różnic w średnich wartościach podstawowego stężenia tryptazy, tetranor-PGD-M oraz swoistych IgE dla jadu pszczoły.

W grupie dzieci z SSR przyrost średniej wartości tryptazy po podaniu szczepionki w porównaniu z poziomem przed jej podaniem był istotnie statystycznie wyższy ($p = 0,001$) niż w grupie dobrze tolerującej dawkę. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zmianie wartości pozostałych parametrów. Dla porównania istotny przyrost stężenia tryptazy dotyczył całej grupy ($p = 0,018$), a także dzieci bez SSR ($p = 0,000$).

Oceny wpływu leczenia dawką wstępną podaną metodą *rush vs ultra-rush* dokonano odrębnie dla grupy dzieci uczulonych na jad osy i uczulonych na jad pszczoły z uwzględnieniem podziału na płeć. Posłużono się analizą statystyczną panelową opartą na teoretycznych modelach stworzonych i wyestymowanych w celu najdokładniejszego określenia kierunku i wartości zmiany czterech analizowanych markerów aktywacji mastocytów (tryptazy, $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu, $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu, tetranor-PGD-M w moczu) po okresie leczenia dawką wstępną w porównaniu z okresem przed leczeniem, z uwzględnieniem metody jej podania i przy jednoczesnej standaryzacji wyniku względem wszystkich pozostałych potencjalnych czynników rokowniczych (model pełny). Wśród czynników rokowniczych były zmienne ilościowe opisujące chorego: wiek pierwszego uządlenia, liczba uządleń przed kwalifikacją do immunoterapii, wiek kwalifikacji do immunoterapii, oraz parametry diagnostyczne przed rozpoczęciem immunoterapii: wartość bezwzględna stężenia swoistych IgE (sIgE) oraz dodatnie testy skórne (TS) z gatunkiem uczulającego owada przed rozpoczęciem leczenia, oraz zmienne jakościowe: stopień ciężkości objawów systemowych po uządleniu wg skali Muellera, współistnienie atopii, wystąpienie SSR w fazie leczenia dawką wstępną immunoterapii. Uwzględnienie dodatkowych zmiennych rokowniczych miało na celu podzielenie zbioru danych na bardziej homogenne podzbiory, tak aby uzyskać bardziej precyzyjną odpowiedź na pytanie problemowe. Służyło to poszukaniu i opisaniu tendencji, które należy uwzględnić przy podejmowaniu decyzji diagnostyczno-terapeutycznych u dzieci uczulonych na jad owadów. Wybrana metoda statystyczna pozwoliła na wyeliminowanie

Charakterystyka kliniczna chłopców z systemowymi objawami ubocznymi (SSR) w trakcie immunoterapii dawką wstępną w metodzie szybkiej *rush*

Pacjent	Uczulenie na jad									
	Pszczoly					Osy				
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.			
Wiek chłopców (lata)	5	9	11	14	17	12	9			
Dawka wywołująca SSR* (µg)	10	50	60	50	40	30	50			
Stopień SSR*	I	III	II	III	II	II	II			
Stopień reakcji Muellera po użądleniu przed VIT	III	III	III	III	III	III	II			
Atopia	+	-	-	+	-	-	-			
Całkowite IgE (kU/l)	79,8	262	489	54,7	243	113	91,8			
sigE dla jadu pszczoły (kU/l)	10,4	66,3	101	10	56,9	0	0			
sigE dla jadu osy (kU/l)	0,34	0,64	1,92	0	0,43	4,54	11			
Stężenie podstawowe tryptazy (µg/l)	9,85	7,87	13,90	1,88	3,20	2,65	8,03			
Stężenie tryptazy po <i>rush</i> VIT (µg/l)	29,90	10,3	16,7	3,07	6,85	2,79	10,4			
Stężenie podstawowe 9α,11β-PGF ₂ w osoczu (pg/ml)	2,30	3,10	6,95	75,44	2,35	7,75	23,57			
Stężenie 9α,11β-PGF ₂ w osoczu po <i>rush</i> VIT (pg/ml)	9,7	11,8	24,9	12,9	7,3	2,5	9,44			
Stężenie podstawowe 9α,11β-PGF ₂ w moczu (ng/mg kreatyniny)	0,91	0,37	0,55	0,78	0,31	5,90	0,90			
Stężenie 9α,11β-PGF ₂ w moczu po <i>rush</i> VIT (ng/mg kreatyniny)	0,4	0,24	0,59	0,42	0,29	0,96	0,23			
Stężenie podstawowe PGD-M w moczu (ng/mg kreatyniny)	2,53	1,03	b.d.	6,49	b.d.	4,98	9,72			
Stężenie PGD-M w moczu po <i>rush</i> VIT (ng/mg kreatyniny)	4,52	0,56	b.d.	0,48	b.d.	1,15	3,53			

b.d. – brak danych

SSR* – reakcja systemowa w trakcie leczenia dawką wstępną

VIT – immunoterapia swoista na jad owadów

Tabela 12

Porównanie średnich podstawowych stężeń $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu i surowicy w grupie dzieci z SSR w trakcie immunoterapii *rush* ekstraktem jadu pszczoły

	9 $\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w osoczu śr. (95% PU)	9 $\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w moczu śr. (95% PU)
Bez objawów systemowych	37,74 (26,78–48,70)	1,44 (0,99–1,89)
Objawy systemowe (SSR)	18,03 (10,16–46,22)	0,58 (0,35–0,82)
p	p = 0,045	p = 0,012

wanie systematycznego błędu estymacji, ponieważ dane od tego samego pacjenta były skorelowane. Podany współczynnik korelacji po oszacowaniu pozwolił na interpretację zachowania danej zmiennej w modelu.

Model ostateczny, teoretycznie optymalnie opisujący dane, zawierał wszystkie istotne statystycznie czynniki rokownicze wyłonione z modelu pełnego oraz dodatkowo zmienną opisującą metodę odczulania (*ultra-rush vs rush*) dawką początkową oraz stopień ciężkości objawów klinicznych po uządleniu wg klasyfikacji Muellera. Model ten pozwalał na uzyskanie odpowiedzi na pytanie badawcze, jak metoda bardzo szybka immunoterapii różni się od metody szybkiej pod względem wpływu na badany marker aktywacji mastocytów, przy uwzględnieniu stopnia ciężkości objawów po uządleniu. Istotne statystycznie dodatkowe czynniki rokownicze wskazywały na ich potencjalny wpływ na efekt metody leczenia. Dla lepszego zobrazowania odpowiedzi na hipotezę badawczą w prezentacji modelu ostatecznego przedstawiono jedynie wyniki porównania wpływu metody bardzo szybkiej *vs* szybkiej immunoterapii na zmianę stężenia badanego markera.

5.3.1. Ocena markerów aktywacji mastocytów w grupie dzieci odczulanych ekstraktem jadu pszczoły

5.3.1.1. Ocena dynamiki stężenia tryptazy w surowicy krwi

W grupie dzieci rozpoczynających odczulanie ekstraktem jadu pszczoły średnie stężenie tryptazy przed leczeniem nie różniło się istotnie statystycznie po podaniu dawki wstępnej bez względu na jej metodę. Po uwzględnieniu kategorii płci także nie obserwowano istotnej zmiany (tab. 13).

Pełny model analizy panelowej dla tryptazy przedstawia tabela 14. Po usunięciu z pełnego modelu zmiennych niewywierających istotnego statystycznie wpływu na zmianę średniej wartości stężenia tryptazy (liczba uządleń, atopia, testy skórne z jadem pszczoły) stworzono model ostateczny, w którym istotność wcześniej znamienne oddziałujących zmiennych została zachowana (wiek uządlenia, wiek kwalifikacji, sIgE dla jadu pszczoły, płeć, wystąpienie systemowych objawów ubocznych w trakcie leczenia dawką wstępną). Model ostateczny potwierdził związek immunoterapii wstępnej metodą *rush* ze znamienne wyższą średnią wartością tryptazy po leczeniu (tab. 15). Tym niemniej pomiędzy obydwoimi protokołami nie było istotnej statystycznie różnicy. W żadnym z analizowanych modeli nie stwierdzono statystycznie istotnego wpływu ciężkości objawów po uządleniu na zmianę średniej wartości stężenia tryptazy.

Tabela 13

Średnie wartości stężenia tryptazy ($\mu\text{g/l}$) przed i po leczeniu dawką wstępną *ultra-rush* vs *rush* u dzieci uczulonych na jad pszczoły

	Przed VIT <i>ultra-rush</i> śr. (95% PU)	Po VIT <i>ultra-rush</i> śr. (95% PU)	p	Przed VIT <i>rush</i> śr. (95% PU)	Po VIT <i>rush</i> śr. (95% PU)	p
Ogółem	3,142 (2,416–3,868)	4,419 (3,348–5,490)	NS	4,173 (3,305–5,042)	5,600 (3,793–7,407)	NS
Dziewczynki	3,347 (2,571–4,123)	5,073 (3,872–6,274)	NS	4,091 (3,219–4,963)	4,770 (3,637–5,903)	NS
Chłopcy	3,040 (1,909–4,171)	4,091 (2,492–5,690)	NS	4,291 (2,921–5,661)	6,097 (3,230–8,964)	NS

Tabela 14

Zmienna opisywana: tryptaza. Model pełny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95%PU	
III ^o Muellera przed VIT	-0,679	0,307	-1,877	0,673
IV ^o Muellera przed VIT	-0,306	0,634	-1,542	0,993
<i>Ultra-rush</i>	1,151	0,102	-0,278	2,475
<i>Rush</i>	1,445	0,000	0,680	2,210
Liczba użądleń	-0,145	0,402	-0,484	0,194
Wiek użądlenia	0,370	0,002	0,140	0,600
Wiek kwalifikacji do VIT	-0,291	0,004	-0,489	-0,092
Atopia	0,270	0,635	-0,842	1,382
slgE dla jadu pszczoły	0,027	0,004	0,008	0,045
SSR I^o	14,003	0,000	10,581	17,425
SSR II^o	6,363	0,000	3,912	8,813
SSR III^o	4,065	0,001	1,598	6,531
(+) TS z jadem pszczoły	-0,686	0,385	-2,235	0,862
Płeć (chł. vs dz.)	-1,130	0,039	-2,204	-0,057
Stała	4,794	0,000	2,492	7,097

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną, TS – testy skórne, VIT – immunoterapia swoista jadem owada

Tabela 15

Zmienna opisywana: tryptaza. Model ostateczny

Tryptaza	Współczynnik	p	95% PU		p
<i>Ultra-rush</i>	1,071	0,128	-0,307	2,449	NS
<i>Rush</i>	1,455	0,000	0,689	2,220	

5.3.1.2. Ocena dynamiki stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu

Dla ogółu dzieci rozpoczynających immunoterapię ekstraktem jadu pszczoły nie stwierdzono istotnych różnic w średnim stężeniu $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu bez względu na metodę leczenia. Po uwzględnieniu kategorii płci także nie obserwowano istotnej różnicy (tab. 16).

Tabela 16

Średnie wartości stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu (pg/ml) przed i po leczeniu dawką wstępną *ultra-rush* vs *rush* u dzieci uczulonych na jad pszczoły

	Przed VIT <i>ultra-rush</i> śr. (95% PU)	Po VIT <i>ultra-rush</i> śr. (95% PU)	p	Przed VIT <i>rush</i> śr. (95% PU)	Po VIT <i>rush</i> śr. (95% PU)	p
Ogółem	18,729 (15,058–2,400)	23,792 (17,251–0,333)	NS	34,750 (24,409–45,091)	31,687 (19,537–43,837)	NS
Dziewczynki	15,237 (8,644–21,830)	19,533 (16,918–2,148)	NS	28,913 (15,609–42,157)	21,762 (14,006–29,518)	NS
Chłopcy	20,475 (16,396–4,554)	27,595 (21,186–4,004)	NS	38,085 (24,016–2,155)	26,844 (16,722–36,955)	NS

Model pełny opisujący zachowanie średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu wobec innych zmiennych rokowniczych nie ujawnił istotnych statystycznie zależności bez względu na metodę leczenia dawką wstępną (tab. 17). Z tego względu w modelu

Tabela 17

Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu. Model pełny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III ^o wg Muellera przed VIT	-6,610	0,513	-26,419	13,199
IV ^o wg Muellera przed VIT	-3,344	0,736	-22,785	16,096
<i>Ultra-rush</i>	-0,397	0,964	-17,640	16,847
<i>Rush</i>	-1,254	0,792	-10,583	8,076
Liczba użądleń	-0,856	0,747	-6,057	4,346
Wiek użądlenia	-0,795	0,645	-4,178	2,588
Wiek kwalifikacji do VIT	1,074	0,480	-1,904	4,051
Atopia	12,381	0,155	-4,668	29,430
slgE dla jadu pszczoły	0,176	0,215	-0,102	0,454
SSR I ^o	-30,174	0,260	-82,709	22,361
SSR II ^o	-29,709	0,124	-67,540	8,121
SSR III ^o	-7,931	0,681	-45,690	29,828
(+) TS z jadem pszczoły	-0,923	0,545	-2,875	0,962
Płeć (chł. vs dz.)	6,474	0,444	-10,097	23,044
Stała	20,572	0,197	-10,676	51,819

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną, TS – testy skórne

ostatecznym zamieszczono jako zmienne najlepiej opisujące stopień ciężkości reakcji po użądleniu oraz metodę odczulania dawką wstępną, pomimo braku istnienia pomiędzy nimi istotnych zależności (tab. 18).

Tabela 18

Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF₂. Model ostateczny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
<i>Ultra-rush</i>	0,531	0,951	-16,511	17,574
<i>Rush</i>	-1,538	0,746	-10,839	7,764

5.3.1.3. Ocena dynamiki stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu

W grupie dzieci odczulanych na jad pszczoły nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi stężeniami $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu przed leczeniem w porównaniu z poziomem po leczeniu bez względu na metodę leczenia. Różnice także nie wystąpiły po uwzględnieniu kategorii płci (tab. 19).

Tabela 19

Średnie wartości stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu (ng/mg kreatyniny) przed i po leczeniu dawką wstępną *ultra-rush* vs *rush* u dzieci uczulonych na jad pszczoły

	Przed VIT <i>ultra-rush</i> śr. (95% PU)	Po VIT <i>ultra-rush</i> śr. (95% PU)	p	Przed VIT <i>rush</i> śr. (95% PU)	Po VIT <i>rush</i> śr. (95% PU)	p
Ogółem	1,536 (1,177–1,895)	1,530 (1,130–1,930)	NS	1,307 (0,915–1,699)	1,540 (1,344–1,736)	NS
Dziewczynki	1,875 (1,032–2,718)	1,740 (0,495–2,985)	NS	1,658 (0,809–2,507)	1,161 (0,869–1,453)	NS
Chłopcy	1,366 (1,048–1,684)	1,461 (1,069–1,853)	NS	1,097 (0,742–1,452)	1,652 (1,415–1,889)	NS

Model pełny opisujący zachowanie średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu wobec innych zmiennych rokowniczych nie ujawnił istotnych statystycznie zależności bez względu na metodę leczenia dawką wstępną (tab. 20). Z tego względu w modelu ostatecznym zamieszczono zmienne najlepiej opisujące stopień ciężkości reakcji po użądleniu oraz metodę odczulania dawką wstępną, pomimo braku istnienia pomiędzy nimi istotnych zależności (tab. 21).

Tabela 20

Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu. Model pełny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III° wg Muellera przed VIT	0,007	0,983	-0,663	0,677
IV° wg Muellera przed VIT	-0,407	0,221	-1,059	0,244
<i>Ultra-rush</i>	-0,067	0,869	-0,867	0,733
<i>Rush</i>	-0,130	0,573	-0,580	0,321
Liczba użądleń	0,148	0,095	-0,026	0,322
Wiek użądlenia	0,049	0,390	-0,063	0,162
Wiek kwalifikacji do VIT	-0,082	0,107	-0,181	0,018
Atopia	-0,291	0,772	-0,860	0,278
sIgE dla jadu pszczoły	-0,001	0,772	-0,011	0,008
SSR I°	-0,650	0,468	-2,404	1,104
SSR II°	-1,010	0,117	-2,274	0,255
SSR III°	-0,828	0,198	-0,866	0,431
(+) TS z jadem pszczoły	0,686	0,485	-1,235	0,962
Płeć (chl. vs. dz.)	-0,312	0,268	-0,866	0,240
Stała	1,943	0,000	0,898	2,989

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną, TS – testy skórne

Tabela 21

Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu. Model ostateczny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
<i>Ultra-rush</i>	0,139	0,734	-0,662	0,939
<i>Rush</i>	-0,188	0,415	-0,639	0,264

5.3.1.4. Ocena dynamiki stężenia tetranor-PGD-M w moczu

W grupie dzieci odczulanych na jad pszczoły średnie stężenie tetranor-PGD-M w moczu przed leczeniem w porównaniu ze średnim stężeniem po leczeniu nie różniło się istotnie statystycznie bez względu na metodę podania dawki początkowej. Po uwzględnieniu kategorii płci także nie wystąpiła istotnie statystyczna różnica (tab. 22).

Model pełny opisujący zachowanie średniego stężenia tetranor-PGD-M w moczu przedstawia tabela 23. Po usunięciu z pełnego modelu zmiennych niewywierających istotnego statystycznie wpływu na średnie stężenie tetranor-PGD-M w moczu (liczba użądleń, wiek pierwszego użądlenia, atopia, sIgE dla jadu pszczoły) stworzono model ostateczny, w którym istotność wcześniej znamienne oddziałujących zmiennych została zachowana (wiek kwalifikacji i SSR w trakcie leczenia dawką wstępną). Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy wartościami badanego parametru u dzieci odczulanych metodą *ultra-rush* vs *rush* przy zachowaniu w modelu stopnia ciężkości objawów po użądleniu (tab. 24).

Tabela 22

Średnie wartości stężenia tetranor-PGD-M w moczu (ng/mg kreatyniny) przed i po leczeniu dawką wstępną *ultra-rush* vs *rush* u dzieci uczulonych na jad pszczoły

	Przed VIT <i>ultra-rush</i> śr. (95%PU)	Po VIT <i>ultra-rush</i> śr. (95%PU)	p	Przed VIT <i>rush</i> śr. (95%PU)	Po VIT <i>rush</i> śr. (95%PU)	p
Ogółem	9,583 (6,059–13,107)	9,225 (6,005–12,445)	NS	4,201 (2,974–5,428)	4,601 (3,772–5,430)	NS
Dziewczynki	9,508 (3,238–15,778)	9,970 (3,090–16,850)	NS	4,549 (1,509–7,589)	5,142 (2,314–7,970)	NS
Chłopcy	9,621 (4,939–14,303)	8,977 (5,110–12,844)	NS	4,026 (2,903–5,149)	4,444 (3,750–5,138)	NS

Tabela 23

Zmienna opisywana: tetranor-PGD-M w moczu. Model pełny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III° wg Muellera przed VIT	-0,387	0,761	-2,880	2,106
IV° wg Muellera przed VIT	0,703	0,627	-2,131	3,537
<i>Ultra-rush</i>	3,372	0,051	-0,012	6,755
<i>Rush</i>	-0,525	0,625	-2,631	1,581
Liczba użądleń	0,544	0,149	-0,195	1,282
Wiek użądlenia	0,297	0,241	-0,199	0,792
Wiek kwalifikacji do VIT	-0,857	0,000	-1,317	-0,397
Atopia	1,449	0,194	-0,737	3,635
slgE dla jadu pszczoły	0,021	0,276	-0,017	0,058
SSR* I°	-7,079	0,033	-13,583	-0,574
SSR II°	-5,659	0,110	-9,455	1,342
SSR III°	-2,413	0,318	-7,154	2,327
(+) TS z jadem pszczoły	-0,677	0,455	-2,345	0,871
Płeć (chł. vs dz.)	0,339	0,748	-1,729	2,407
Stała	10,016	0,000	5,635	14,398

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną, TS – testy skórne

Tabela 24

Zmienna opisywana: tetranor-PGD-M w moczu. Model ostateczny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
<i>Ultra-rush</i>	2,688	0,137	-0,852	6,227
<i>Rush</i>	-0,135	0,898	-2,210	1,940

5.3.2. Ocena parametrów aktywacji mastocytów w grupie dzieci odczulanych ekstraktem jadu osy

5.3.2.1. Ocena dynamiki stężenia tryptazy w surowicy krwi

W grupie dzieci odczulanych na jad osy średnie stężenie tryptazy przed leczeniem i po leczeniu dawką wstępną immunoterapii nie wykazywały istotnych statystycznie różnic. Różnice nie ujawniły się także po uwzględnieniu w modelu kategorii płci (tab. 25).

Tabela 25

Średnie wartości stężenia tryptazy ($\mu\text{g/l}$) przed i po leczeniu dawką wstępną *ultra-rush* vs *rush* u dzieci uczulonych na jad osy

	Przed VIT <i>ultra-rush</i> n = 3 śr. (95% PU)	Po VIT <i>ultra-rush</i> śr. (95% PU)	p	Przed VIT <i>rush</i> n = 23 śr. (95% PU)	Po VIT <i>rush</i> śr. (95% PU)	p
Ogółem	1,540 (0,985–2,095)	4,091 (2,492–5,690)	NS	3,655 (2,724–4,586)	3,844 (2,872–4,816)	NS
Dziewczynki	nie dotyczy	nie dotyczy		3,175 (2,665–3,685)	3,270 (2,235–4,305)	NS
Chłopcy	1,540 (0,985–2,095)	4,091 (2,492–5,690)	NS	3,756 (2,635–4,877)	6,097 (3,230–8,964)	NS

Model pełny opisujący zachowanie średniego stężenia tryptazy u dzieci leczonych ekstraktem jadu osy przedstawia tabela 26.

Tabela 26

Zmienna opisywana: tryptaza. Model pełny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III ^o wg Muellera przed VIT	0,267	0,810	-1,914	2,449
IV ^o wg Muellera przed VIT	0,409	0,716	-1,794	2,612
<i>Ultra-rush</i>	0,402	0,584	-1,035	1,839
<i>Rush</i>	0,230	0,394	-0,299	0,758
Liczba użądleń	-0,634	0,164	-1,527	0,259
Wiek użądlenia	-0,429	0,008	-0,746	-0,112
Wiek kwalifikacji do VIT	0,247	0,122	-0,066	0,561
Atopia	1,025	0,188	-0,500	2,550
slgE dla jadu osy	0,023	0,164	-0,009	0,056
SSR II^o	4,745	0,006	1,344	8,146
(+) TS z jadem osy	-0,532	0,586	-2,446	1,382
Płeć (chł. vs dz.)	0,185	0,849	-1,721	2,091
Stała	4,872	0,010	1,155	8,588

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną, TS – testy skórne

Po usunięciu z powyższego modelu zmiennych niewywierających istotnego statystycznie wpływu na zmianę średniej wartości stężenia tryptazy (liczba uządleń, wiek kwalifikacji, sIgE dla jadu osy, testy skórne z jadem osy, płeć) w modelu ostatecznym istotność wcześniej znamiennej parametrów (wiek uządlenia, SSR II^o) się utrzymała. Dodatkowo w ostatecznym modelu istotny statystycznie wpływ na zmianę średniego stężenia tryptazy wykazał III stopień reakcji po uządleniu wg klasyfikacji Muellera, bez względu na metodę podania dawki wstępnej VIT (tab. 27).

Tabela 27

Zmienna opisywana: tryptaza. Model ostateczny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III ^o wg Muellera przed VIT	-2,170	0,038	-4,220	-0,120
IV ^o wg Muellera przed VIT	-1,935	0,064	-3,986	0,115
<i>Ultra-rush</i>	0,669	0,071	-0,058	1,395
<i>Rush</i>	0,195	0,147	-0,068	0,458

5.3.2.2. Ocena dynamiki stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu

W grupie dzieci odczulanych na jad osy średnie stężenie $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu przed leczeniem i po dawce wstępnej immunoterapii bez względu na metodę jej podania nie różniły się między sobą. Po uwzględnieniu płci leczonych dzieci w żadnej z kategorii nie pojawiła się istotna różnica (tab. 28).

Tabela 28

Średnie wartości stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu (pg/ml) przed i po leczeniu dawką wstępną *ultra-rush* vs *rush* u dzieci uczulonych na jad osy

	Przed VIT <i>ultra-rush</i> śr. (95% PU)	Po VIT <i>ultra-rush</i> śr. (95% PU)	p	Przed VIT <i>rush</i> śr. (95% PU)	Po VIT <i>rush</i> śr. (95% PU)	p
Ogółem	24,248 (11,308–37,188)	30,943 (28,397–33,489)	NS	21,450 (10,486–32,414)	21,307 (11,783–30,831)	NS
Dziewczynki	nie dotyczy	nie dotyczy	NS	13,801 (4,417–23,185)	23,193 (7,348–39,038)	NS
Chłopcy	24,248 (11,308–37,188)	30,943 (28,397–33,489)	NS	23,15 (9,942–36,358)	20,888 (9,624–32,152)	NS

Model pełny opisujący zachowanie średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu u dzieci leczonych ekstraktem jadu osy przedstawia tabela 29. Po usunięciu z tego modelu zmiennych nieistotnych statystycznie (liczba uządleń, wiek pierwszego uządlenia, wiek kwalifikacji do immunoterapii, atopia, sIgE i testy skórne z jadem osy, oraz płeć) wpływ stopnia ciężkości objawów po uządleniu na zmianę średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu stał się graniczny, a różnica pomiędzy działaniem *ultra-rush* i *rush* pozostała nieistotna (tab. 30).

Tabela 29

Zmienna opisywana: $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ w osoczu. Model pełny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III° wg Muellera przed VIT	34,060	0,004	11,187	56,933
IV° wg Muellera przed VIT	15,335	0,194	-7,796	38,466
<i>Ultra-rush</i>	5,939	0,591	-15,721	27,560
<i>Rush</i>	0,060	0,989	-8,219	8,338
Liczba użądleń	-7,957	0,091	-17,189	1,275
Wiek użądlenia	-1,085	0,517	-4,365	2,195
Wiek kwalifikacji do VIT	0,975	0,556	-2,268	4,218
Atopia	5,522	0,491	-10,197	21,242
sIgE dla jadu pszczoły	0,145	0,397	-0,191	0,481
SSR II°	19,782	0,270	-15,404	54,969
(+) TS z jadem osy	-2,062	0,838	-21,817	17,693
Płeć (chł. vs dz.)	4,233	0,673	-15,435	23,901
Stała	13,530	0,492	-25,052	52,112

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną, TS – testy skórne

Tabela 30

Zmienna opisywana: $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ w osoczu. Model ostateczny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
<i>Ultra-rush</i>	7,823	0,482	-13,967	-13,967
<i>Rush</i>	-0,284	0,947	-8,573	8,005

5.3.2.3. Ocena dynamiki stężenia $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ w moczu

W grupie dzieci odczulanych na jad osy nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy średnim stężeniem $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ w moczu przed i po podaniu dawki wstępnej immunoterapii, bez względu na metodę *ultra-rush* vs *rush*. Uwzględnienie kategorii płci nie spowodowało pojawienia się istotności (tab. 31).

Model pełny opisujący zachowanie średniego stężenia $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ w moczu u dzieci leczonych ekstraktem jadu osy przedstawia tabela 32. Po usunięciu z modelu zmiennej niewywierających istotnego statystycznie wpływu na zmianę średniej wartości stężenia $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ w moczu (liczba użądleń, wiek pierwszego użądlenia, wiek kwalifikacji, atopia, testy skórne z jadem osy, płeć) istotność reakcji systemowej po szczepieniu utrzymała się ($p = 0,000$), a stężenie sIgE dla jadu osy stało się statystycznie istotne ($p = 0,040$) (model ostateczny). Nie obserwowano istotnej różnicy pomiędzy działaniem *ultra-rush* i *rush* (tab. 33).

Tabela 31

Średnie wartości stężenia $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ w moczu (ng/mg kreatyniny) przed i po leczeniu dawką wstępną *ultra-rush* vs *rush* u dzieci uczulonych na jad osy

	Przed VIT <i>ultra-rush</i> n = 3 śr. (95% PU)	Po VIT <i>ultra-rush</i> śr. (95% PU)	p	Przed VIT <i>rush</i> śr. (95% PU)	Po VIT <i>rush</i> śr. (95% PU)	P
Ogółem	1,620 (0,748–2,492)	1,450 (0,454–2,446)	NS	1,254 (0,723–1,785)	0,970 (0,472–1,468)	NS
Dziewczynki	nie dotyczy	nie dotyczy		1,883 (0,826–1,540)	2,105 (–0,318–1,540)	NS
Chłopcy	1,620 (0,748–2,492)	1,450 (0,454–2,446)	NS	1,268 (0,627–1,909)	0,731 (0,429–1,033)	NS

Tabela 32

Zmienna opisywana: $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ w moczu. Model pełny

Zmienna opisująca	Współczynnik	p	95% PU	
III° wg Muellera przed VIT	0,546	0,267	–0,418	1,510
IV° wg Muellera przed VIT	0,386	0,439	–0,592	1,364
<i>Ultra-rush</i>	0,191	0,782	–1,161	1,543
<i>Rush</i>	–0,331	0,239	–0,881	0,219
Liczba użądleń	0,088	0,661	–0,304	0,479
Wiek użądlenia	–0,069	0,331	–0,208	0,070
Wiek kwalifikacji do VIT	0,079	0,264	–0,060	0,218
Atopia	0,036	0,915	–0,632	0,705
slgE dla jadu osy	0,014	0,057	–0,000	0,028
SSR II°	2,587	0,001	0,994	4,179
(+) TS z jadem osy	0,467	0,277	–0,376	1,310
Płeć (ch. vs dz.)	–0,470	0,264	–1,314	0,360
Stała	0,216	0,800	–1,450	1,882

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną, TS – testy skórne

Tabela 33

Zmienna opisywana: $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ w moczu. Model ostateczny

Zmienna opisująca	Współczynnik	p	95% PU	
<i>Ultra-rush</i>	0,502	0,304	–0,454	1,457
<i>Rush</i>	0,059	0,903	–0,896	1,015

5.3.2.4. Ocena dynamiki stężenia tetranor-PGD-M w moczu

W grupie dzieci odczulanych ekstraktem jadu osy średnie stężenie tetranor-PGD-M w moczu przed leczeniem w porównaniu z jego średnim stężeniem po podaniu dawki wstępnej immunoterapii, bez względu na zastosowaną metodę, nie różniło się istotnie statystycznie. Istotność statystyczna nie zaistniała także po uwzględnieniu kategorii płci (tab. 34).

Tabela 34

Średnie wartości stężenia tetranor-PGD-M w moczu (ng/mg kreatyniny) przed i po leczeniu dawką wstępną *ultra-rush* vs *rush* u dzieci uczulonych na jad osy

	Przed VIT <i>ultra-rush</i> śr. (95% PU)	Po VIT <i>ultra-rush</i> śr. (95% PU)	p	Przed VIT <i>rush</i> śr. (95% PU)	Po VIT <i>rush</i> śr. (95% PU)	p
Ogółem	4,650 (3,919–5,381)	6,380 (3,575–9,185)	NS	5,130 (3,256–7,004)	9,136 (3,817–14,455)	NS
Dziewczynki	nie dotyczy	nie dotyczy	NS	7,533 (1,251–3,815)	22,550 (–2,609–47,709)	NS
Chłopcy	4,650 (3,919–5,381)	6,380 (3,575–9,185)	NS	4,680 (2,759–6,601)	6,621 (2,846–10,396)	NS

Model pełny opisujący zachowanie średniego stężenia tetranor-PGD-M w moczu u dzieci leczonych ekstraktem jadu osy przedstawia tabela 35. Po usunięciu z modelu

Tabela 35

Zmienna opisywana: tetranor-PGD-M w moczu. Model pełny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III ^o wg Muellera przed VIT	1,292	0,603	–3,571	6,156
IV ^o wg Muellera przed VIT	–1,278	0,602	–6,085	3,529
<i>Ultra-rush</i>	3,387	0,304	–3,079	9,848
<i>Rush</i>	3,744	0,010	0,878	6,610
Liczba użądleń	–1,078	0,283	–3,047	0,890
Wiek użądlenia	–0,242	0,500	–0,947	0,462
Wiek kwalifikacji do VIT	0,067	0,854	–0,643	0,776
Atopia	–0,499	0,784	–4,072	3,074
slgE dla jadu osy	0,124	0,002	0,046	0,203
SSR II ^o	1,763	0,626	–5,325	8,852
(+) TS z jadem osy	0,567	0,377	–0,276	1,510
Płeć (ch. vs dz.)	–4,868	0,058	–9,906	0,169
Stała	11,331	0,022	1,624	21,039

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną, TS – testy skórne

zmiennych nieistotnych statystycznie (liczba użądleń, wiek pierwszego użądlenia, wiek kwalifikacji do immunoterapii, atopia, SSR) utrzymała się istotność sIgE dla jadu osy oraz protokołu *rush*. W modelu ostatecznym immunoterapia dawką wstępną podaną metodą *rush* istotnie wpływała na wzrost stężenia tetranor-PGD-M w moczu po leczeniu. Nie było istotnej statystycznie różnicy w stężeniu PGD-M po leczeniu metodą *rush* vs *ultra-rush* (tab. 36).

Tabela 36

Zmienna opisywana: tetranor-PGD-M w moczu. Model ostateczny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU		p
<i>Ultra-rush</i>	1,521	0,683	-5,772	8,815	NS
<i>Rush</i>	4,038	0,011	0,941	7,136	

5.4. Model opisujący zmianę markerów aktywacji mastocytów w przebiegu immunoterapii swoistej na jad owadów dawką podtrzymującą i czynniki warunkujące tę zmianę

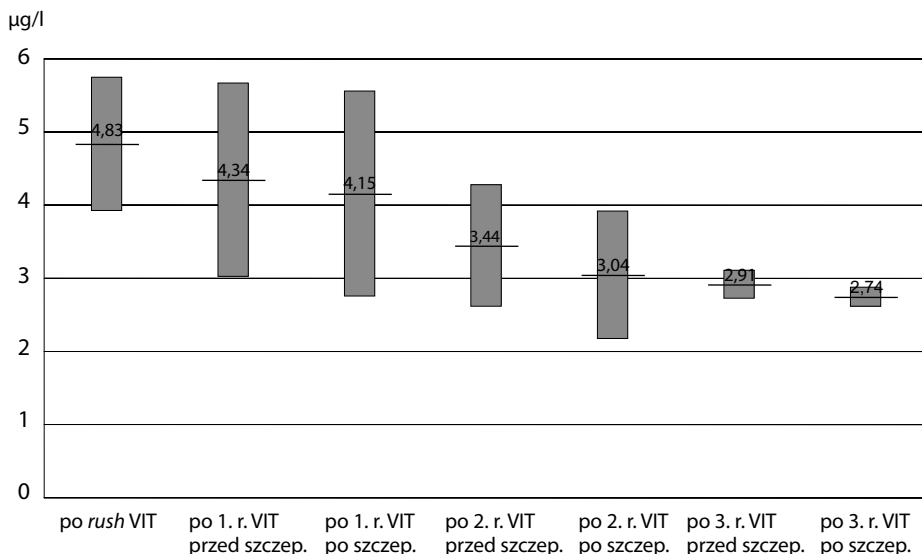
U 56 dzieci dawkę początkową podano protokołem *rush*, u 12 dzieci protokołem *ultra-rush*. Spośród 56 dzieci, które zostały zakwalifikowane do immunoterapii swoistej metodą *rush*, 40 dzieci było leczonych przez co najmniej 1 rok, 28 dzieci przez 2 lata, 9 dzieci przez 3 lata. U dzieci, które rozpoczęły leczenie dawką wstępną metodą *ultra-rush*, okres obserwacji nie przekroczył jednego roku (ryc. 4). W trakcie okresu leczenia dawką podtrzymującą u 5 dzieci (19% spośród odczulanych ekstraktem jadu osy) doszło do użądlenia pełnego przez osę. U żadnego z nich nie wystąpiła reakcja systemowa, u 4 obserwowano miejscową reakcję fizjologiczną, u jednego dużą reakcję miejscową w miejscu użądlenia. Chłopiec ten był żądłony przez osę łącznie trzykrotnie w okresie leczenia, tj. po 2 miesiącach od rozpoczęcia leczenia (duża reakcja miejscowa), następnie po 4 miesiącach (duża reakcja miejscowa) i ponownie po 2 latach (reakcja fizjologiczna). Oceny wpływu leczenia dawką podtrzymującą dokonano odrębnie dla grupy dzieci uczulonych na jad pszczoły i uczulonych na jad osy z uwzględnieniem podziału na płeć. Panelową analizę statystyczną przeprowadzono, rozpoczynając ją od estymacji modelu zawierającego wszystkie czynniki rokownicze (model pełny), a następnie tworzonego modelu ostatecznego, najprecyzyjniej opisującego badany proces, w którym pozostawiono tylko istotne statystycznie czynniki rokownicze. Były to zmienne ilościowe opisujące chorego, takie jak: wiek pierwszego użądlenia, liczba użądleń przed kwalifikacją do immunoterapii, wiek kwalifikacji do immunoterapii, wysokość dawki skumulowanej ekstraktu jadu w poszczególnych punktach pomiarowych badanych markerów aktywacji mastocytów (ryc. 4) oraz wskaźniki diagnostyczne przed rozpoczęciem immunoterapii: wartość bezwzględna stężenia swoistych IgE (sIgE) i dodatnie testy skórne (TS) z gatunkiem uczulającego owada przed rozpoczęciem leczenia, a także zmienne jakościowe, takie jak płeć, stopień ciężkości objawów systemowych po użądleniu wg skali Muellera, współ-

istnienie atopii, wystąpienie SSR w fazie leczenia dawką wstępną immunoterapii, fakt uządlenia polnego w okresie leczenia. Model ostateczny, optymalnie opisujący dane, zawierał wszystkie istotne statystycznie czynniki rokownicze wyłonione z modelu pełnego oraz dodatkowo dawkę skumulowaną, jako najlepiej opisującą kryterium czasu leczenia. Każdy z tych czynników niezależnie wpływał na wzrost lub obniżenie stężenia danego markera aktywacji komórek tucznych. Służyło to poszukaniu i opisaniu tendencji, które należy uwzględnić przy podejmowaniu decyzji diagnostyczno-terapeutycznych u dzieci uczulonych na jad owadów. Wybrana metoda statystyczna pozwoliła na wyeliminowanie systematycznego błędu estymacji, ponieważ dane od tego samego pacjenta były skorelowane. Podany współczynnik po oszacowaniu pozwolił na interpretację zachowania danej zmiennej w modelu. W badaniach testu na trend, jeśli w rozkładzie pojawiły się wartości odstające, powodowały one, że wyestymowany na podstawie takiego rozkładu przedział ufności nie odzwierciedlał dokładnie mierzonej cechy.

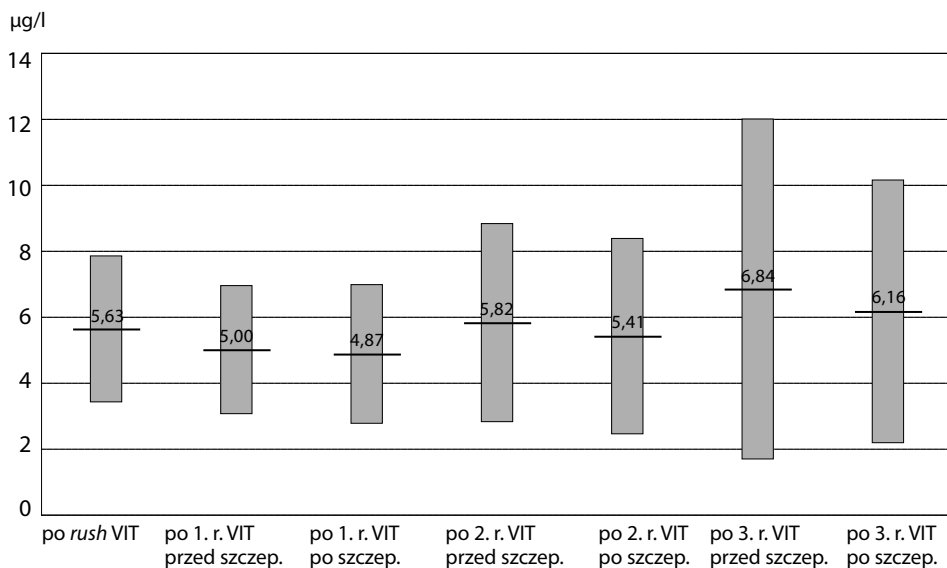
5.4.1. Immunoterapia swoista ekstraktem jadu pszczoły

5.4.1.1. Ocena dynamiki stężenia tryptazy

Średnie wartości tryptazy oznaczone bezpośrednio po podaniu dawki wstępnej metodą *rush* oraz w kolejnych kontrolach rocznych (każdorazowo przed i po podaniu dawki podtrzymującej szczepionki) u dziewczynek leczonych immunoterapią swoistą na jad pszczoły wykazały istotną statystycznie systematyczną tendencję spadkową (**test na trend $p = 0,004$**) (ryc. 14). Tendencji takiej nie wykazała dynamika średniego stężenia tryptazy u chłopców (test na trend $p = 0,775$) (ryc. 15).



Ryc. 14. Dynamika zmian średniego stężenia tryptazy w kolejnych punktach badania u dziewczynek (test na trend $p = 0,004$)



Ryc. 15. Dynamika zmian średniego stężenia tryptazy w kolejnych punktach badania u chłopców (test na trend $p = 0,775$)

Pełny model analizy panelowej dla tryptazy przedstawia tabela 37.

Tabela 37

Zmienna opisywana: tryptaza. Model pełny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III° wg Muellera przed VIT	-0,738	0,390	-2,420	0,944
IV° wg Muellera przed VIT	0,073	0,922	-1,385	1,532
Liczba uządleń	-0,422	0,048	-0,841	-0,003
Wiek uządlenia	0,452	0,001	0,179	0,725
Wiek kwalifikacji	-0,425	0,000	-0,655	-0,194
Atopia	0,135	0,840	-1,179	1,448
slgE dla jadu pszcz. przed VIT	0,030	0,007	0,008	0,053
SSR I°	12,618	0,000	8,816	16,420
SSR II°	8,411	0,000	5,711	11,112
SSR III°	5,424	0,000	2,585	8,264
Dawka skumulowana	-0,001	0,000	-0,001	-0,000
(+) TS z jadem pszczoły	-1,534	0,075	-3,225	0,156
Płeć (ch. vs dz.)	-1,231	0,063	-2,529	0,068
Stała	8,467	0,000	5,354	11,580

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną, TS – testy skórne

Po wyeliminowaniu z analizy nieistotnych statystycznie zmiennych (stopień ciężkości objawów po użądleniu, atopia) pozostałe zmienne utrzymały swoją istotność, a wpływ testów skórnych z jadem pszczoły stał się statystycznie istotny (tab. 38). Oznaczało to, że większa liczba użądleń przed leczeniem skutkowało szybszym tempem obniżania się średniego stężenia tryptazy w procesie leczenia. Im starszy wiek podczas pierwszego użądlenia, tym jej stężenie było wyższe. Natomiast im starszy wiek podczas kwalifikacji do odczulania, tym wartość ta była niższa. Wywiad SSR w trakcie leczenia dawką początkową, odwrotnie do stopnia jej ciężkości, wpływał na istotne zwiększenie średniego stężenia tryptazy w procesie leczenia. Dawka skumulowana wykazała ujemną korelację z opisywaną zmienną.

Tabela 38

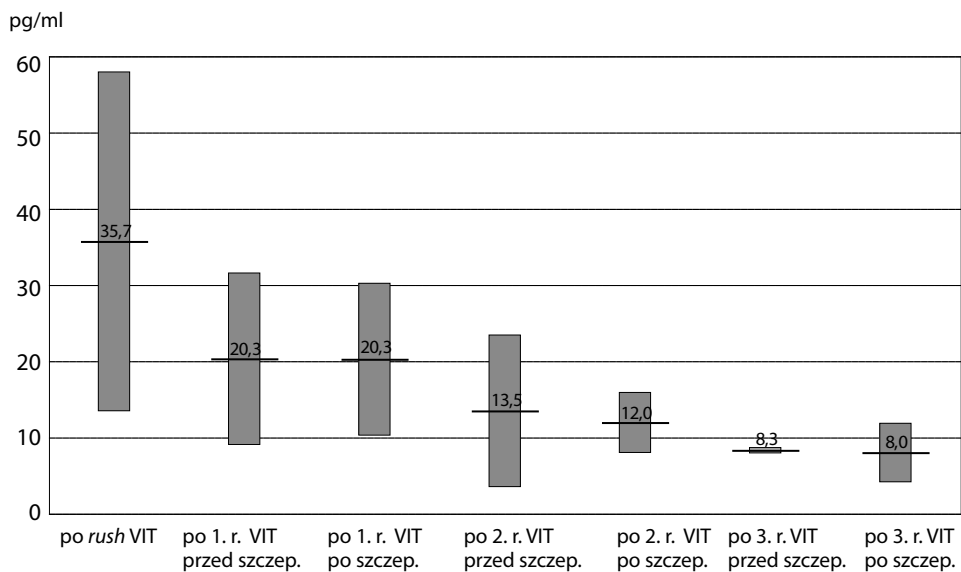
Zmienna opisywana: tryptaza. Model ostateczny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
Liczba użądleń	-0,423	0,046	-0,838	-0,008
Wiek użądlenia	0,423	0,002	0,155	0,690
Wiek kwalifikacji	-0,422	0,000	-0,649	-0,195
slgE dla jadu pszcz. przed VIT	0,028	0,008	0,007	0,048
SSR I°	12,010	0,000	8,533	15,487
SSR II°	8,006	0,000	5,513	10,499
SSR III°	4,885	0,000	2,321	7,448
Dawka skumulowana	-0,001	0,000	-0,001	-0,000
(+) TS z jadem pszczoły	-1,710	0,045	-3,381	-0,038
Płeć (ch. vs dz.)	-1,234	0,063	-2,536	0,068

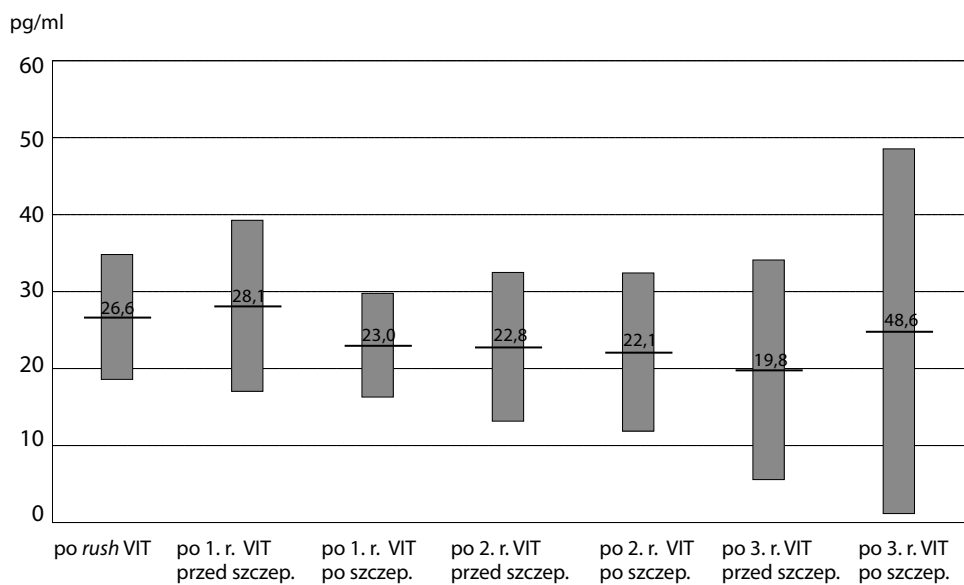
SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną, TS – testy skórne

5.4.1.2. Ocena dynamiki stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu

Średnie wartości $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu oznaczone bezpośrednio po podaniu dawki wstępnej metodą *rush* oraz w kolejnych kontrolach rocznych (każdorazowo przed i po podaniu dawki podtrzymującej szczepionki) u dziewczynek leczonych immunoterapią swoistą na jad pszczoły wykazywały istotną statystycznie tendencję spadkową (**test na trend p = 0,041**) (ryc. 16). Nie obserwowano tego typu tendencji u chłopców (test na trend p = 0,355) (ryc. 17). Pełny model analizy panelowej dla $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu przedstawia tabela 39.



Ryc. 16. Dynamika zmian średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu w kolejnych punktach badania u dziewczynek (test na trend $p = 0,041$)



Ryc. 17. Dynamika zmian średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu w kolejnych punktach badania u chłopców (test na trend $p = 0,355$)

Tabela 39

Zmienna opisywana: $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ w osoczu. Model pełny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III° wg Muellera przed VIT	-4,535	0,567	-20,055	10,984
IV° wg Muellera przed VIT	1,796	0,793	-11,606	15,199
Metoda <i>rush</i> VIT	9,995	0,248	-6,956	26,946
Liczba użądleń	-0,741	0,704	-4,564	3,083
Wiek użądlenia	-0,737	0,563	-3,237	1,762
Wiek kwalifikacji	0,157	0,883	-1,938	2,252
Atopia	4,595	0,460	-7,600	16,790
slgE dla jadu pszcz. przed VIT	0,195	0,068	-0,014	0,404
SSR I°	-27,867	0,114	-62,382	6,647
SSR II°	-12,590	0,312	-36,990	11,809
SSR III°	-13,299	0,313	-39,137	12,538
Dawka skumulowana	-0,004	0,070	-0,008	0,000
(+) TS z jadem pszczoły	6,747	0,388	-8,557	22,052
Płeć (ch. vs dz.)	8,455	0,165	-3,492	20,402
Stała	12,251	0,402	-16,393	40,895

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną, TS – testy skórne

Po przeanalizowaniu wszystkich możliwych układów zmiennych w modelu nie znaleziono istotnych statystycznie zależności. Wobec tego jako ostateczny wybrano model ze zmienną opisującą w postaci dawki skumulowanej, pomimo faktu że nie była ona znamienne statystycznie (tab. 40).

Tabela 40

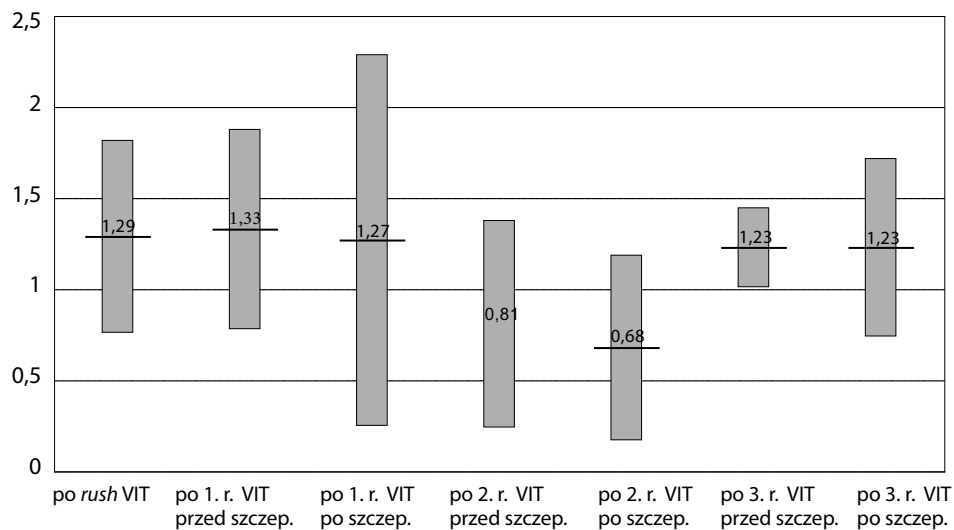
Zmienna opisywana: $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ w osoczu. Model ostateczny

Zmienna opisująca	Współczynnik	p	95% PU	
Dawka skumulowana	-0,0036	0,076	-0,009	0,000

5.4.1.3. Ocena dynamiki stężenia $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ w moczu

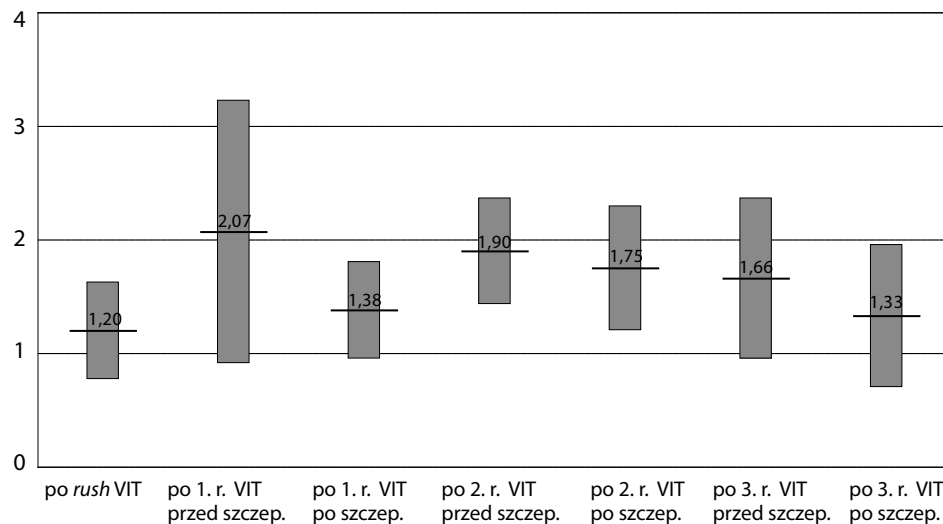
Średnie wartości $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ w moczu oznaczone bezpośrednio po podaniu dawki wstępnej metodą *rush* oraz w kolejnych kontrolach rocznych (każdorazowo przed i po podaniu dawki podtrzymującej szczepionki) u dziewczynek leczonych immunoterapią swoistą na jad pszczoły wykazywały tendencję spadkową (ryc. 18). Test na trend nie wykazał istotnej statystycznie zmiany ($p = 0,386$). Nie obserwowano tego typu tendencji u chłopców (test na trend $p = 0,485$) (ryc. 19).

ng/mg kreatyniny



Ryc. 18. Dynamika zmian średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu w kolejnych punktach badania u dziewczynek (test na trend $p = 0,386$)

ng/mg kreatyniny



Ryc. 19. Dynamika zmian średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu w kolejnych punktach badania u chłopców (test na trend $p = 0,485$)

Pełny model analizy panelowej dla $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu przedstawia tabela 41.

Tabela 41

Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu. Model pełny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III° wg Muellera przed VIT	-0,411	0,288	-1,170	0,348
IV° wg Muellera przed VIT	-0,325	0,294	-0,932	0,282
Liczba użądleń	0,041	0,651	-0,138	0,221
Wiek użądlenia	0,010	0,864	-0,108	0,128
Wiek kwalifikacji	-0,002	0,967	-0,096	0,092
Atopia	-0,045	0,875	-0,613	0,523
sIgE dla jadu pszczy. przed VIT	0,005	0,369	-0,005	0,014
SSR I°	-0,058	0,943	-1,645	1,530
SSR II°	-1,254	0,023	-2,339	-0,170
SSR III°	-1,237	0,043	-2,434	-0,040
Dawka skumulowana	0,000	0,054	-4,460	0,001
(+) TS z jadem pszczoły	0,422	0,225	-0,259	1,104
Płeć (ch. vs dz.)	0,647	0,030	0,064	1,230
Stała	0,612	0,400	-0,811	2,034

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną, TS – testy skórne

Po wyeliminowaniu z analizy nieistotnych statystycznie zmiennych (stopień ciężkości objawów po użądleniu, wiek pierwszego użądlenia, wiek kwalifikacji do immunoterapii, liczba użądleń przed leczeniem, atopia, sIgE dla jadu pszczoły) w modelu ostatecznym istotny wpływ na obniżenie średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu w przebiegu procesu leczenia miała jedynie reakcja systemowa III° w trakcie leczenia dawką wstępną, a płeć utraciła istotność (tab. 42).

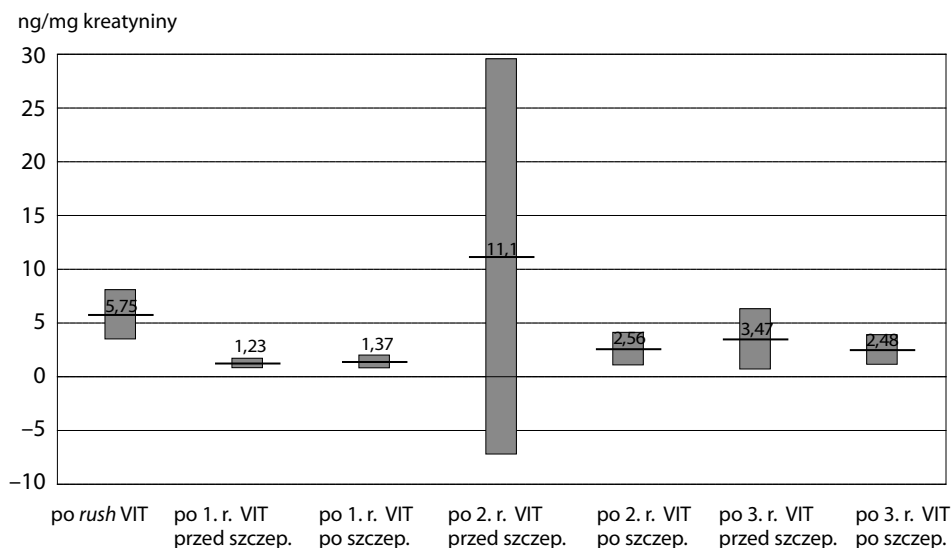
Tabela 42

Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu. Model ostateczny

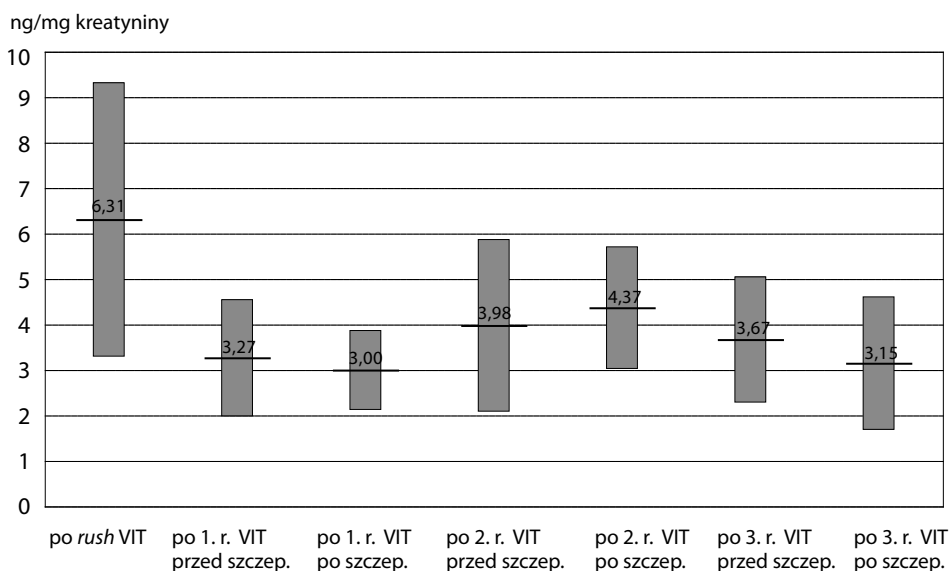
Zmienna opisująca	Współczynnik	p	95% PU	
SSR I°	-0,349	0,642	-1,819	1,121
SSR II°	-0,992	0,058	-2,017	0,032
SSR III°	-1,201	0,038	-2,335	-0,066
Dawka skumulowana	0,000	0,088	0,000	0,000
Płeć (ch. vs dz.)	0,560	0,072	-0,049	1,169

5.4.1.4. Ocena dynamiki stężenia tetranor-PGD-M w moczu

Średnie wartości stężenia tetranor-PGD-M w moczu oznaczone bezpośrednio po podaniu dawki wstępnej metodą *rush* oraz w kolejnych kontrolach rocznych (każdorazowo przed i po podaniu dawki podtrzymującej szczepionki) u dzieci leczonych immunoterapią swoistą na jad pszczoły z uwzględnieniem płci przedstawiają ryciny 20 i 21. W obu grupach występowała tendencja do wzrostu średnich wartości po 2. roku leczenia.



Ryc. 20. Dynamika zmian średniego stężenia tetranor-PGD-M w moczu w kolejnych punktach badania u dziewczynek (test na trend $p = 0,741$)



Ryc. 21. Dynamika zmian średniego stężenia tetranor-PGD-M w moczu w kolejnych punktach badania u chłopców (test na trend $p = 0,166$)

U chłopców najwyższą wartość średnią obserwowano bezpośrednio po leczeniu dawką początkową. Test na trend nie wykazał w żadnej z grup (odpowiednio dla dziewczynek $p = 0,741$ i dla chłopców $p = 0,166$) istotnej statystycznie zmiany średniego stężenia tetranor-PGD-M w moczu podczas procesu leczenia.

Pełny model analizy panelowej dla tetranor-PGD-M w moczu przedstawia tabela 43.

Tabela 43

Zmienna opisywana: tetranor-PGD-M w moczu. Model pełny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III ^o wg Muellera przed VIT	-0,918	0,509	-3,642	1,807
IV^o wg Muellera przed VIT	2,651	0,018	0,463	4,839
Liczba użądleń	0,055	0,868	-0,596	0,707
Wiek użądlenia	0,110	0,614	-0,316	0,536
Wiek kwalifikacji	-0,535	0,002	-0,876	-0,193
Atopia	-0,351	0,736	-2,390	1,689
slgE dla jadu pszczy. przed VIT	0,003	0,877	-0,033	0,038
SSR I ^o	-2,718	0,345	-8,359	2,922
SSR II ^o	0,940	0,630	-2,878	4,757
SSR III ^o	-1,724	0,426	-5,965	2,518
(+) TS z jadem pszczoły	3,038	0,013	0,635	5,441
Dawka skumulowana	-0,001	0,358	-0,002	0,000
Płeć (ch. vs dz.)	0,868	0,810	-1,233	2,970
Stała	11,171	0,000	6,051	16,291

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną, TS – testy skórne

Po wyeliminowaniu z analizy nieistotnych statystycznie zmiennych (liczba użądleń przed leczeniem, wiek pierwszego użądlenia, atopia, slgE dla jadu pszczoły, SSR) w modelu ostatecznym obserwowano istotny statystycznie wpływ reakcji systemowej IV stopnia i dodatnich testów skórnych z jadem pszczoły na wzrost średniej wartości tetranor-PGD-M w moczu w procesie leczenia. Także wiek kwalifikacji do immunoterapii wykazał istotny wpływ, co oznaczało, że im wiek kwalifikacji był starszy, tym średnia wartość PGD-M w moczu w procesie leczenia była niższa (tab. 44).

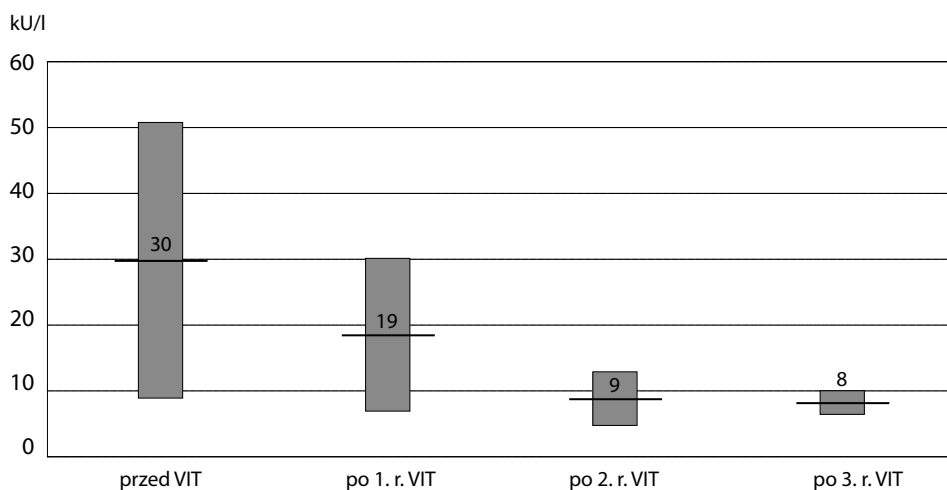
Tabela 44

Zmienna opisywana: tetranor-PGD-M w moczu. Model ostateczny

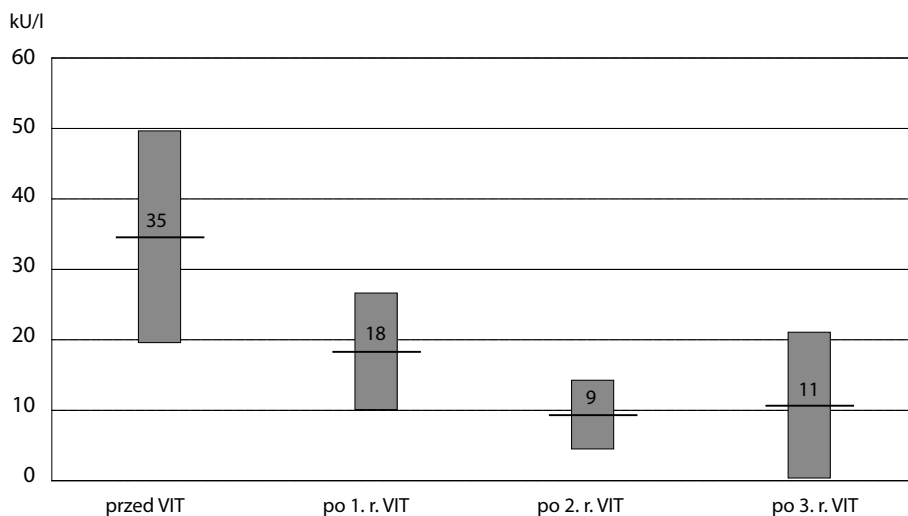
Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III ^o wg Muellera przed VIT	-0,861	0,415	-2,933	1,210
IV^o wg Muellera przed VIT	2,540	0,026	0,308	4,772
Wiek kwalifikacji	-0,393	0,000	-0,611	-0,175
Dawka skumulowana	-0,001	0,248	-0,002	0,000
(+) TS z jadem pszczoły	3,423	0,004	1,071	5,775

5.4.1.5. Ocena dynamiki stężenia sIgE dla jadu pszczoły

Analizę dynamiki badanych markerów aktywacji mastocytów poszerzono o ocenę stężenia swoistych IgE dla jadu pszczoły przed leczeniem i w kolejnych rocznych okresach obserwacji z uwzględnieniem płci. Jakkolwiek średnie stężenie swoistych IgE dla jadu pszczoły wykazało w obu grupach tendencję do obniżania się wraz z czasem leczenia (ryc. 22 i 23), nie stwierdzono istotnego statystycznie systematycznego liniowego obniżenia wartości (test na trend odpowiednio u dziewczynek $p = 0,165$, u chłopców $p = 0,180$).



Ryc. 22. Dynamika zmian średniego stężenia sIgE dla jadu pszczoły przed leczeniem i w kolejnych kontrolach rocznych u dziewczynek (test na trend $p = 0,165$)



Ryc. 23. Dynamika zmian średniego stężenia sIgE dla jadu pszczoły przed leczeniem i w kolejnych kontrolach rocznych u chłopców (test na trend $p = 0,180$)

W analizie panelowej stworzono i wyestymowano model pełny służący ocenie kierunku i wartości zmiany średniego stężenia sIgE dla jadu pszczoły w okresie 3-letniego procesu leczenia VIT (tab. 45).

Tabela 45

Zmienna opisywana: sIgE dla jadu pszczoły przed VIT. Model pełny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III° wg Muellera przed VIT	0,579	0,323	-0,570	1,728
IV° wg Muellera przed VIT	0,724	0,254	-0,520	1,967
sIgE dla jadu pszczoły po 1 roku VIT	-0,359	0,038	-0,698	-0,019
sIgE dla jadu pszczoły po 2 latach VIT	-0,753	0,000	-1,163	-0,342
sIgE dla jadu pszczoły po 3 latach VIT	-0,761	0,017	-1,388	-0,134
Liczba uządleń	-0,557	0,004	-0,939	-0,175
Wiek uządlenia	-0,288	0,005	-0,491	-0,086
Wiek kwalifikacji	0,279	0,004	0,090	0,469
Atopia	-1,063	0,043	-2,094	-0,032
Płeć (ch. vs dz.)	-0,377	0,517	-1,520	0,765
Stała	1,934	0,114	-0,464	4,332

W modelu pełnym stwierdzono istotną statystycznie zależność obniżenia wartości IgE wraz z czasem leczenia. Im była wyższa liczba uządleń przed leczeniem i starszy wiek w chwili uządlenia, tym wartość IgE była niższa. Im starszy wiek podczas kwalifikacji do immunoterapii, tym wartość IgE była wyższa. Dzieci z atopią miały niższą wartość sIgE dla jadu pszczoły niż dzieci bez atopii.

Po usunięciu z modelu zmiennych nieistotnych statystycznie (reakcja po uządleniu wg klasyfikacji Muellera) i pozostawieniu wyłącznie zmiennych istotnych, podjęto próbę wystandaryzowania zależności sIgE dla jadu pszczoły i czterech analizowanych wskaźników aktywności mastocytów (tryptaza, $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu, $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu, tetranor-PGD-M w moczu). W opisywanym modelu nie stwierdzono wzajemnych istotnych statystycznie zależności pomiędzy badanymi parametrami (tab. 46).

Tabela 46

Zmienna opisywana: sIgE dla jadu pszczoły. Model ostateczny

Zmienne opisujące	współczynnik	p	95% PU	
Atopia	-13,199	0,028	-24,943	-1,455
Tryptaza w surowicy krwi	0,725	0,233	-0,466	1,916
$9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w moczu	0,321	0,768	-1,809	2,451
$9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w osoczu	0,038	0,720	-0,170	0,245
Tetranor-PGD-M w moczu	-0,373	0,154	-0,885	0,140
Płeć (ch. vs dz.)	3,390	0,485	-6,127	12,908

5.4.2. Immunoterapia ekstraktem jadu osy

5.4.2.1. Ocena dynamiki stężenia tryptazy w surowicy krwi

Średnie wartości tryptazy oznaczone bezpośrednio po podaniu dawki wstępnej metodą *rush* oraz w kolejnych kontrolach rocznych (każdorazowo przed i po podaniu dawki podtrzymującej ekstraktu jadu) u dziewczynek leczonych immunoterapią swoistą na jad osy wykazały nieistotną statystycznie tendencję spadkową (test na trend $p = 0,415$) (ryc. 24). Tendencja ta nie występowała u chłopców (test na trend $p = 0,555$) (ryc. 25).

Pełny model analizy panelowej dla średniego stężenia tryptazy u dzieci leczonych immunoterapią swoistą z powodu alergii na jad osy przedstawia tabela 47.

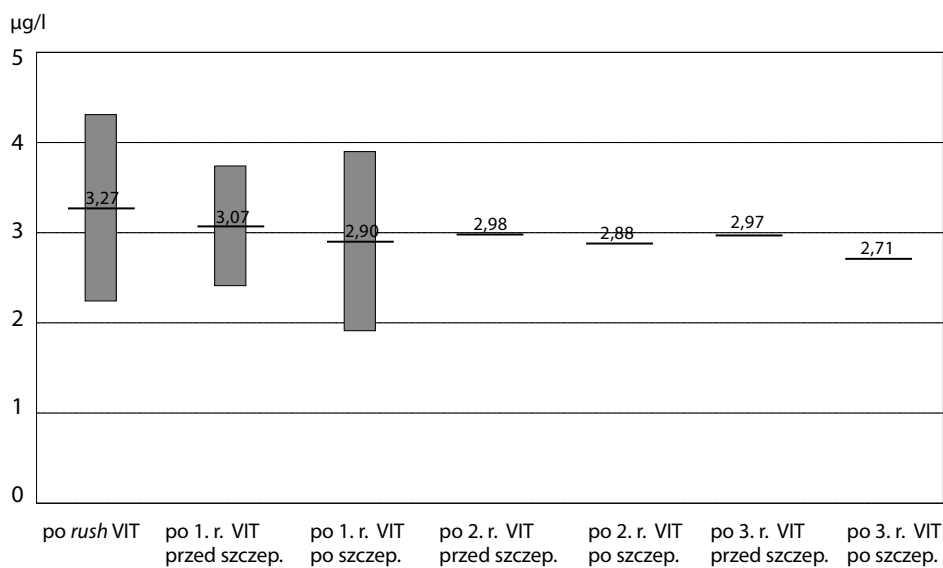
Tabela 47

Zmienna opisywana: tryptaza. Model pełny

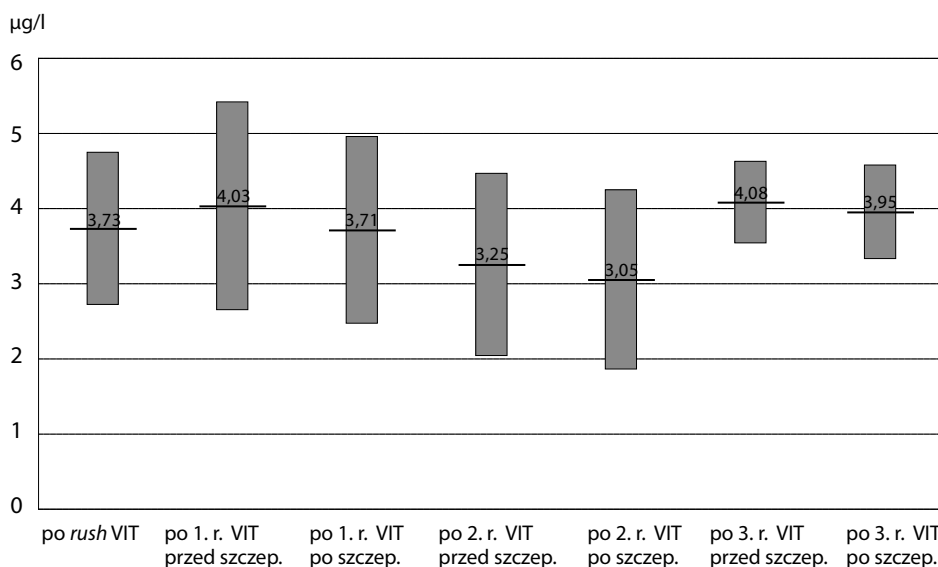
Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III° wg Muellera przed VIT	-0,010	0,992	-2,019	1,998
IV° wg Muellera przed VIT	0,039	0,970	-2,013	2,090
Liczba użądleń	-0,535	0,196	-1,346	0,277
Wiek użądlenia	-0,370	0,011	-0,655	-0,085
Wiek kwalifikacji	0,193	0,181	-0,090	0,476
Atopia	1,497	0,034	0,110	2,884
slgE dla jadu osy przed VIT	0,030	0,058	-0,001	0,061
SSR II°	4,612	0,003	1,574	7,650
Dawka skumulowana	0,000	0,293	0,000	0,000
(+) TS z jadem osy	-0,371	0,670	-2,076	1,335
Płeć (ch. vs dz.)	0,407	0,649	-1,346	2,159
Stała	4,855	0,004	1,511	8,199

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną, TS – testy skórne

Po wyeliminowaniu z analizy nieistotnych statystycznie zmiennych (stopień ciężkości objawów po użądleniu, liczba użądleń, wiek kwalifikacji, płeć, testy skórne z jadem osy) pozostałe zmienne utrzymały swoją istotność. Oznaczało to, że u dzieci z atopią, przy dodatnich testach skórnych i w przypadku SSR II° wartość tryptazy była istotnie wyższa. Odmrotnie, im starszy wiek w chwili użądlenia, tym jej stężenie statystycznie istotnie się obniżało. Stwierdzono także istotny wpływ dawki skumulowanej – im wyższa, tym stężenie tryptazy było niższe (tab. 48).



Ryc. 24. Dynamika zmian średniego stężenia tryptazy w kolejnych punktach badania u dziewczynek (test na trend $p = 0,415$)



Ryc. 25. Dynamika zmian średniego stężenia tryptazy w kolejnych punktach badania u chłopców (test na trend $p = 0,555$)

Zmienna opisywana: tryptaza. Model ostateczny

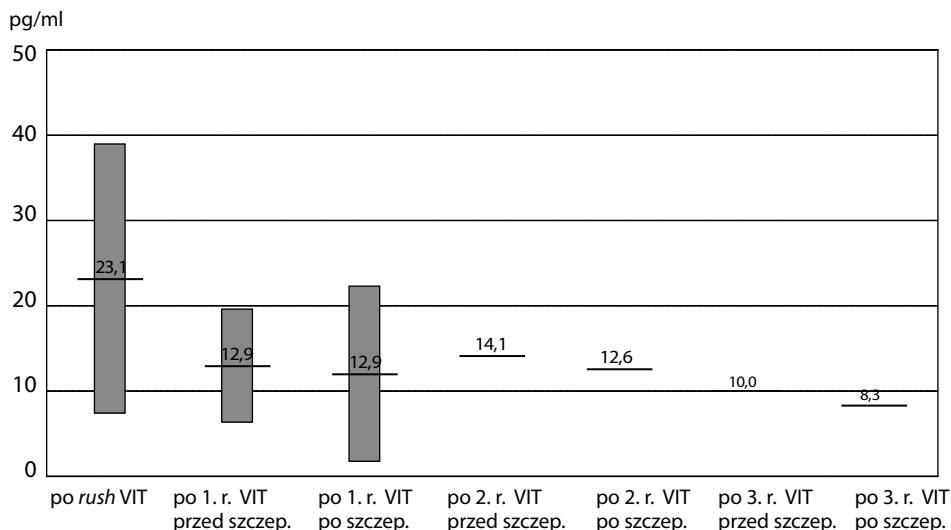
Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
Wiek uządlenia	-0,216	0,005	-0,368	-0,064
Atopia	1,768	0,010	0,425	3,112
sigE dla jadu osy	0,030	0,025	0,004	0,057
SSR II ^o	4,677	0,002	1,669	7,685
Dawka skumulowana	0,000	0,014	0,000	0,000

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie immunoterapii wstępnej

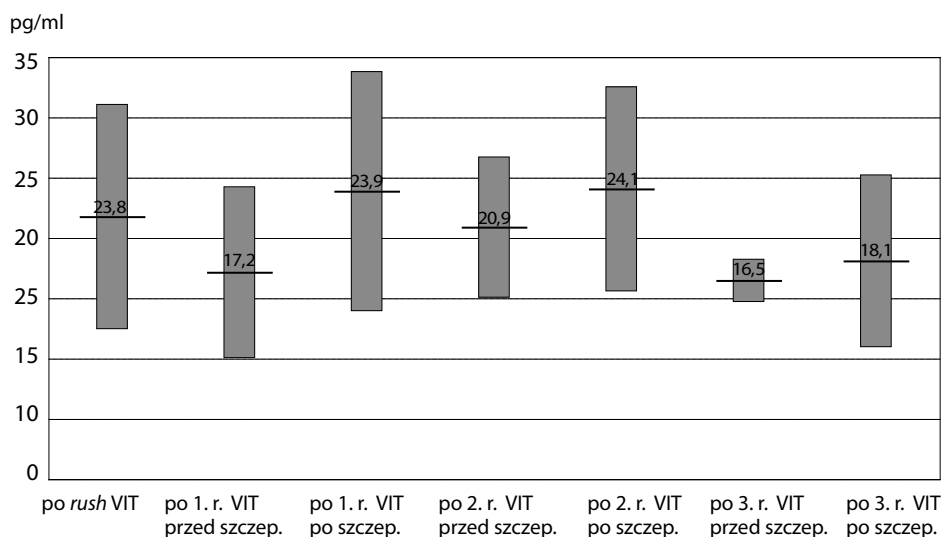
5.4.2.2. Ocena dynamiki stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu

Średnie wartości $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu oznaczone bezpośrednio po podaniu dawki wstępnej metodą *rush* oraz w kolejnych kontrolach rocznych (każdorazowo przed i po podaniu dawki podtrzymującej szczepionki) u dziewczynek leczonych immunoterapią swoistą na jad osy wykazały istotną statystycznie tendencję spadkową (**test na trend p = 0,000**) (ryc. 26). U chłopców badany parametr nie wykazał podobnej tendencji (test na trend p = 0,689) (ryc. 27).

Pełny model analizy panelowej dla średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu u dzieci leczonych immunoterapią swoistą z powodu alergii na jad osy przedstawia tabela 49.



Ryc. 26. Dynamika zmian średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu w kolejnych punktach badania u dziewczynek (test na trend p = 0,000)



Ryc. 27. Dynamika zmian średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu w kolejnych punktach badania u chłopców (test na trend $p = 0,689$)

Tabela 49

Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu. Model pełny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III° wg Muellera przed VIT	27,873	0,004	8,950	46,796
IV° wg Muellera przed VIT	22,110	0,026	2,705	0,123
Liczba użądleń	-7,440	0,054	-15,004	0,123
Wiek użądlenia	-1,122	0,406	-3,766	1,523
Wiek kwalifikacji	2,614	0,052	-0,020	5,249
Atopia	-5,472	0,407	-18,421	7,476
sIgE dla jadu osy przed VIT	0,255	0,094	-0,043	0,552
SSR II°	10,770	0,453	-17,338	38,878
Dawka skumulowana	0,000	0,825	-0,003	0,002
(+) TS z jadem osy	-2,418	0,763	-18,150	13,314
Płeć (ch. vs dz.)	5,698	0,497	-10,733	22,128
Stała	-3,243	0,838	-34,344	27,857

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną, TS – testy skórne

Po wyeliminowaniu z analizy nieistotnych statystycznie zmiennych (liczba użądleń, wiek pierwszego użądlenia, wiek kwalifikacji, atopia, sIgE z jadem osy, testy skórne z jadem osy, SSR) wcześniej istotny statystycznie parametr – stopień ciężkości objawów po użądleniu – stracił swą istotność (tab. 50).

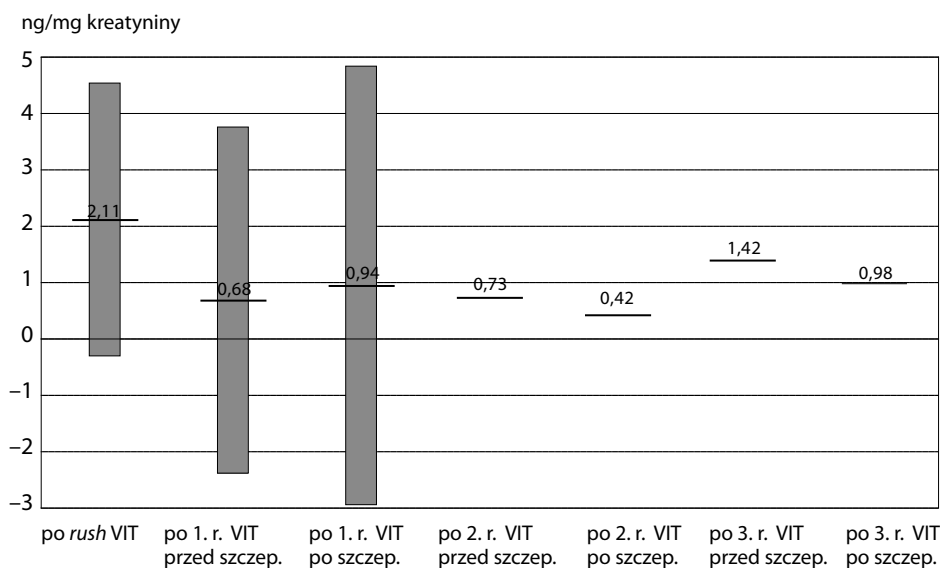
Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu. Model ostateczny

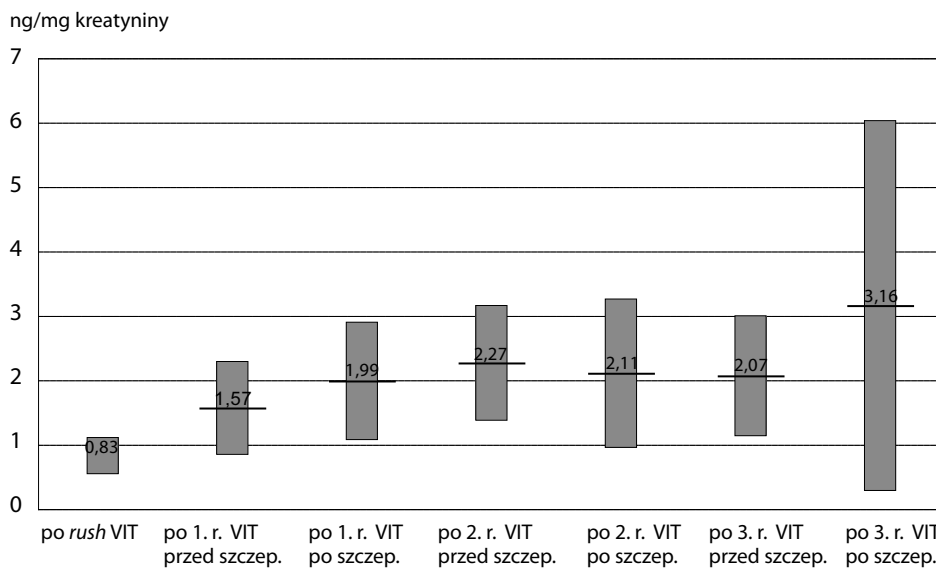
Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III° wg Muellera przed VIT	14,633	0,061	-0,704	29,970
IV° wg Muellera przed VIT	8,156	0,300	-7,277	23,588
Dawka skumulowana	-0,001	0,584	-0,003	0,002

5.4.2.3. Ocena dynamiki stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu

Średnie wartości $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu oznaczone bezpośrednio po podaniu dawki wstępnej metodą *rush* oraz w kolejnych kontrolach rocznych (każdorazowo przed i po podaniu dawki podtrzymującej szczepionki) u dziewczynek leczonych immunoterapią swoistą na jad osy wykazały nieistotną statystycznie tendencję spadkową (test na trend $p = 0,432$) (ryc. 28). U chłopców wartości te wykazały istotną statystycznie tendencję do wzrostu (**test na trend $p = 0,001$**) (ryc. 29).

Pełny model analizy panelowej dla średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu u dzieci leczonych immunoterapią swoistą z powodu alergii na jad osy przedstawia tabela 51.

Ryc. 28. Dynamika zmian średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu w kolejnych punktach badania u dziewczynek (test na trend $p = 0,432$)



Ryc. 29. Dynamika zmian średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu w kolejnych punktach badania u chłopców (test na trend $p = 0,001$)

Tabela 51

Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu. Model pełny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III° wg Muellera przed VIT	0,275	0,644	-0,892	1,442
IV° wg Muellera przed VIT	-0,495	0,452	-1,785	0,795
Liczba użądleń	-0,167	0,463	-0,612	0,278
Wiek użądlenia	0,055	0,473	-0,095	0,204
Wiek kwalifikacji	0,083	0,316	-0,079	0,245
Atopia	0,107	0,783	-0,656	0,870
slgE dla jadu osy przed VIT	0,002	0,879	-0,022	0,026
SSR II°	1,902	0,017	0,333	3,471
Dawka skumulowana	0,000	0,001	0,000	0,001
(+) TS z jadem osy	0,043	0,920	-0,798	0,884
Płeć (ch. vs dz.)	-0,054	0,916	-1,068	0,960
Stała	-0,003	0,997	-1,752	1,746

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną, TS – testy skórne

Po wyeliminowaniu z analizy nieistotnych statystycznie zmiennych (stopień reakcji po użądleniu, atopia, wiek pierwszego użądlenia, sIgE i testy skórne z jadem osy) w modelu ostatecznym obserwowano istotny statystycznie wpływ liczby użądleń (im wyższa, tym stężenie $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu w przebiegu procesu leczenia niższe), wieku kwalifikacji, SSR oraz dawki skumulowanej (im wyższa, tym stężenie markera w moczu było wyższe) (tab. 52).

Tabela 52

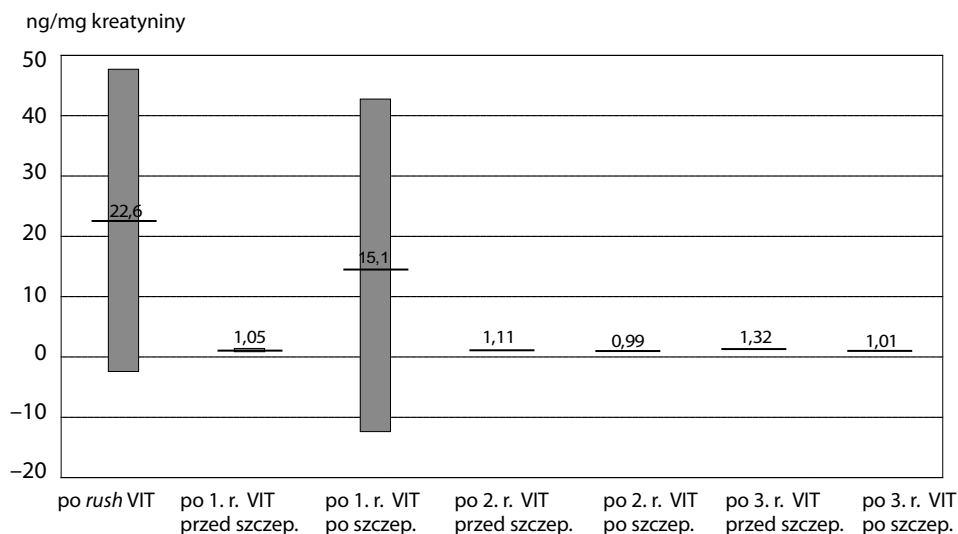
Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu. Model ostateczny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
Liczba użądleń	-0,349	0,015	-0,629	-0,069
Wiek kwalifikacji	0,137	0,005	0,042	0,232
SSR II°	0,183	0,000	1,096	1,462
Dawka skumulowana	0,001	0,001	0,000	0,001

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną

5.4.2.4. Ocena dynamiki stężenia tetranor-PGD-M w moczu

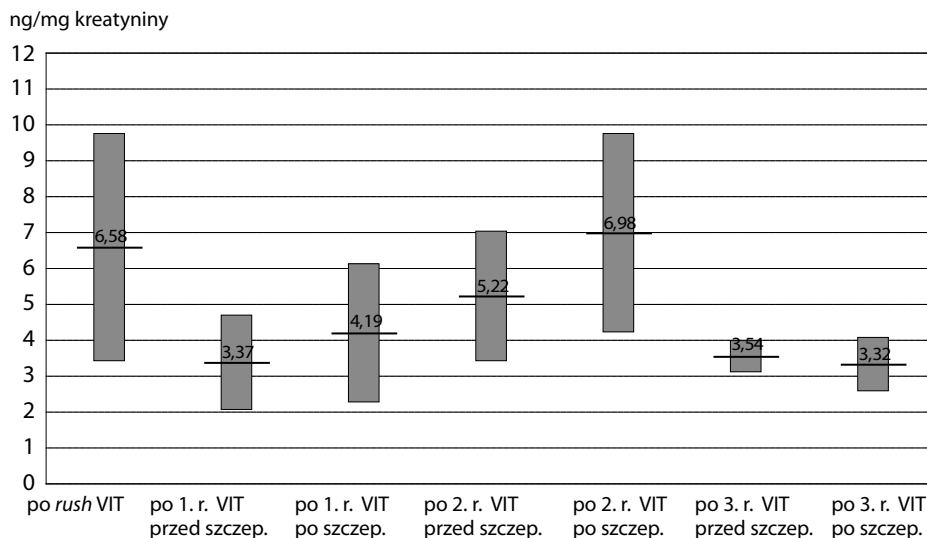
Średnie wartości tetranor-PGD-M w moczu oznaczone bezpośrednio po podaniu dawki wstępnej metodą *rush* oraz w kolejnych kontrolach rocznych (każdorazowo przed i po podaniu dawki podtrzymującej szczepionki) u dziewczynek leczonych immunoterapią swoistą na jad osy po pierwszym roku od rozpoczęcia leczenia miały nieistotną statystycznie tendencję spadkową (test na trend $p = 0,164$) (ryc. 30). Nie obserwowano



Ryc. 30. Dynamika zmian średniego stężenia tetranor-PGD-M w moczu w kolejnych punktach badania u dziewczynek (test na trend $p = 0,164$)

takiej tendencji u chłopców (ryc. 31), u których test na trend także nie wykazał istotnej statystycznie zmiany średniej wartości $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu w przebiegu procesu leczenia ($p = 0,768$).

Pełny model analizy panelowej dla średniego stężenia tetranor-PGD-M w moczu u dzieci leczonych immunoterapią swoistą z powodu alergii na jad osy przedstawia tabela 53.



Ryc. 31. Dynamika zmian średniego stężenia tetranor-PGD-M w moczu w kolejnych punktach badania u chłopców (test na trend $p = 0,768$)

Tabela 53

Zmienna opisywana: tetranor-PGD-M w moczu. Model pełny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III ^o wg Muellera przed VIT	-6,372	0,075	-13,399	0,654
IV^o wg Muellera przed VIT	-10,061	0,005	-17,152	-2,970
Liczba użądleń	2,169	0,079	-0,254	4,591
Wiek użądlenia	0,625	0,155	-0,235	1,486
Wiek kwalifikacji	-0,353	0,433	-1,235	0,530
Atopia	0,175	0,938	-4,215	4,564
slgE dla jadu osy przed VIT	0,277	0,000	0,169	0,385
SSR II ^o	-7,291	0,125	-16,608	2,027
(+) TS z jadem osy	-0,353	0,155	-0,235	1,686
Dawka skumulowana	0,000	0,952	-0,001	0,001
Płeć (ch. vs dz.)	-0,353	0,155	-0,235	1,586
Stała	5,132	0,203	-2,775	13,039

SSR – systemowe objawy uboczne w trakcie leczenia dawką wstępną, TS – testy skórne

Po wyeliminowaniu z analizy nieistotnych statystycznie zmiennych (liczba uządleń, wiek pierwszego uządlenia, wiek kwalifikacji do leczenia, atopia, SSR) w modelu ostatecznym znamiennej wpływ na zmianę średniego stężenia tetranor-PGD-M w procesie leczenia miały ciężkość objawów po uządleniu (im wyższa, tym wartość markera w moczu była niższa) oraz sIgE dla jadu osy przed leczeniem – im wyższa, tym średnia wartość tetranor-PGD-M w procesie leczenia była wyższa (tab. 54).

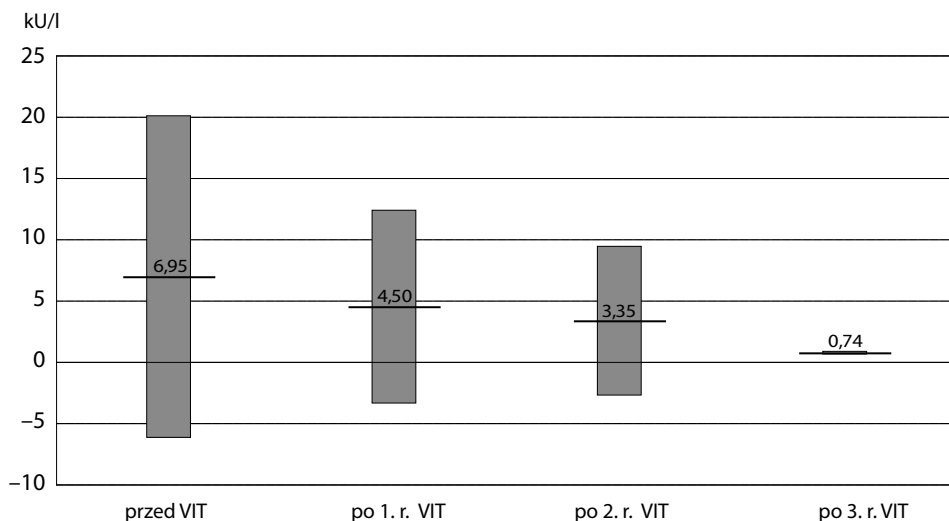
Tabela 54

Zmienna opisywana: tetranor-PGD-M w moczu. Model ostateczny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III ^o wg Muellera przed VIT	-2,804	0,324	-8,378	2,769
IV^o wg Muellera przed VIT	-5,596	0,049	-11,175	-0,017
sIgE dla jadu osy przed VIT	0,262	0,000	0,149	0,374
Dawka skumulowana	0,000	0,925	-0,001	0,001

5.4.2.5. Ocena dynamiki stężenia sIgE dla jadu osy

Analizę dynamiki badanych markerów aktywacji mastocytów poszerzono o ocenę stężenia swoistych IgE dla jadu osy przed leczeniem oraz w kolejnych rocznych okresach obserwacji z uwzględnieniem płci. Średnie stężenie swoistych IgE dla jadu osy wykazywało u chłopców tendencję do obniżania się wraz z czasem leczenia (ryc. 32). Test na trend nie wykazał istotnej statystycznie ($p = 0,346$) zmiany stężenia sIgE dla jadu osy w przebiegu procesu leczenia. U dziewczynek nie przeprowadzono analizy ze względu na niską liczebność grupy.



Ryc. 32. Dynamika zmian średniego stężenia sIgE dla jadu osy przed leczeniem i w kolejnych kontrolach rocznych u chłopców (test na trend $p = 0,346$)

W modelu standaryzującym zmianę stężenia sIgE dla jadu osy w kolejnych punktach obserwacyjnych istotne obniżenie średniej wartości badanego parametru stwierdzono po 3. roku leczenia (tab. 55).

Tabela 55

Zmienna opisywana: sIgE dla jadu osy. Model pełny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
III° wg Muellera przed VIT	-1,848	0,647	-9,758	6,062
IV° wg Muellera przed VIT	-5,476	0,219	-14,211	3,259
sIgE dla jadu osy po 1. roku VIT	-0,795	0,220	-3,146	1,557
sIgE dla jadu osy po 2. roku VIT	-1,277	0,105	-3,872	1,318
sIgE dla jadu osy po 3. roku VIT	-2,618	0,012	-5,781	-0,628
Liczba użądleń	0,588	0,701	-2,413	3,589
Wiek użądlenia	-0,093	0,868	-1,186	1,000
Wiek kwalifikacji	-0,692	0,253	-1,878	0,495
Atopia	3,561	0,225	-2,189	9,310
Płeć (ch. vs dz.)	1,805	0,608	-5,089	8,698
Stała	10,927	0,063	-0,610	22,465

Podjęto próbę wystandaryzowania zależności sIgE dla jadu osy i czterech analizowanych markerów aktywacji mastocytów (tryptaza, $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu, $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu, tetranor-PGD-M w moczu) z uwzględnieniem atopii i kategorii płci, tak aby opisywany model odpowiadał temu, który służył do opisanego sIgE dla jadu pszczoły. Poza istotnym obniżeniem stężenia sIgE po trzech latach leczenia nie stwierdzono wzajemnych istotnych statystycznie zależności pomiędzy badanymi parametrami. W opisywanym modelu atopia straciła swoją istotność, a tryptaza i $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu okazały się istotne. Zależność pomiędzy każdą z tych zmiennych niezależnych a badaną zmienną zależną miała kierunek odwrotny. Im stężenie tryptazy było wyższe, tym wartość sIgE w trakcie leczenia była wyższa. Wraz ze wzrostem $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu stężenie sIgE dla jadu osy się zmniejszało (tab. 56).

Tabela 56

Zmienna opisywana: sIgE dla jadu osy. Model ostateczny

Zmienne opisujące	Współczynnik	p	95% PU	
Atopia	3,561	0,225	-2,189	9,310
Tryptaza w surowicy krwi	0,833	0,032	0,071	0,071
$9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w osoczu	-0,035	0,313	-0,103	0,033
$9\alpha,11\beta$-PGF₂ w moczu	-0,869	0,001	-1,397	-0,342
Tetranor-PGD-M w moczu	-0,155	0,273	-0,431	0,122
Płeć (chl. vs dz.)	1,805	0,608	-5,089	8,698

5.5. Ocena poczucia lęku przed użądleniem

Jako dodatkowy aspekt przed rozpoczęciem immunoterapii swoistej oceniono u dzieci lęk związany z ryzykiem kolejnego użądlenia. Oceny dokonywano w skali 1–3. Wyniki oceny lęku przedstawiono z uwzględnieniem stopnia ciężkości objawów po użądleniu (tab. 57). Większość dzieci po przebyciu reakcji w stopniu II i IV wg Muellera zgłaszało średni poziom lęku, podczas gdy największy odsetek dzieci zgłaszał silne poczucie lęku po przebyciu reakcji w stopniu III. Tylko jedno dziecko z rozpoznaną astmą i II stopniem reakcji Muellera po użądleniu wykazywało silne poczucie lęku przed kolejnym użądleniem. Powyższe różnice nie były istotne statystycznie.

Tabela 57

Ocena poczucia lęku przed kolejnym użądleniem z uwzględnieniem stopnia ciężkości objawów po wcześniejszych użądleniach

Stopień Muellera przed VIT	Lęk			Ogółem
	mały	średni	duży	
II	3 (15%)	11 (55%) w tym 1 a.o.	6 (30%) w tym 1 a.o.	20
III	6 (21%) w tym 2 a.o.	10 (32%)	12 (43%)	28
IV	4 (20%)	13 (65%) w tym 2 a.o.	3 (15%)	20
Ogółem	13 (19%)	34 (50%)	21 (31%)	68

a.o. – dzieci z rozpoznaną astmą

Podobnie nie stwierdzono znamienych różnic pomiędzy chłopcami a dziewczynkami. Nie wykazano istotnej różnicy w poczuciu lęku pomiędzy grupą uczulonych na jad pszczoły a grupą uczulonych na jad osy. Lęk korelował ($p = 0,036$) z wiekiem, przyjmując odpowiednio wartości średnie dla grup wiekowych: dzieci z niskim poziomem lęku miały średnio 11 lat (95% PU 7,3–14,7), dzieci ze średnim poziomem lęku miały średnio 12,4 lat (95% PU 10,4–14,4), a z wysokim poziomem lęku średnio 7,9 lat (95% PU 6,1–9,7).

6. OMÓWIENIE

W pracy oceniano wpływ leczenia dwoma protokołami dawki wstępnej i dawką podtrzymującą immunoterapii swoistej na markery aktywacji mastocytów we krwi (tryptaza, $9\alpha,11\beta$ -PGF₂) oraz moczu ($9\alpha,11\beta$ -PGF₂, tetranor-PGD-M) u dzieci uczulonych na jad owadów. Czas pobrania materiału do badań był dobrany w taki sposób, by uwzględnić największe stężenia badanych markerów. Dzięki zastosowanej metodzie analizy statystycznej uwzględniającej panelowy charakter danych wyniki z większą dokładnością oddają rzeczywiste zależności. Wyniki analizowano osobno dla grupy dzieci uczulonych na jad pszczoły, osobno dla uczulonych na jad osy, co jest związane z różną specyfiką tych odczynów obserwowaną w materiale własnym i opisywaną w pracach innych autorów [101].

6.1. Charakterystyka grupy i zachowania się stężeń podstawowych badanych markerów aktywacji komórek tucznych w grupie dzieci uczulonych zakwalifikowanych do immunoterapii (przed leczeniem), uczulonych niezakwalifikowanych i dzieci zdrowych

W prezentowanym materiale potwierdzono przewagę liczebną płci męskiej nad żeńską w stosunku 2,5:1, co odbiega od częstości 3:2 podawanej przez Schuberta dla wybranej populacji osób dorosłych z terenów Hiszpanii [102], ale jest całkowicie zgodne z częstością 3:1 u dzieci [103]. Liczniej (proporcja ok. 3:2) reprezentowana była grupa dzieci uczulonych na jad pszczoły, co odzwierciedla tendencję obserwowaną w innych krajach europejskich [104]. Większość (69%) dzieci uczulonych na jad pszczoły zamieszkiwała na terenach wiejskich, co pokrywa się z częstością 66% podaną przez Carballadę, a zdecydowanie odbiega od przytaczanych przez Fernandezę danych dotyczących osób dorosłych (91% uczulonych na jad osy) [104, 105]. Do rozwoju alergii na składniki jadu pszczoły dochodzi najczęściej w wyniku wielokrotnych użądleń, z postępującym nasileniem odczynu po kolejnych użądleniach. Problem ten dotyczy przede wszystkim osób o dużej ekspozycji na użądlenia pszczół, czyli osób z rodzin pszczelarzy lub zamieszkujących w bezpośrednim sąsiedztwie pasiek [106]. Prawidłowość tę obserwowaliśmy również w naszym materiale. Spośród 42 dzieci odczulanych ekstraktem jadu pszczoły

32 (76%) mieszkało w bezpośrednim sąsiedztwie uli, a średnia liczba użądleń w tej grupie była większa niż u dzieci mniej eksponowanych (3,4 vs 2,2). Średnia liczba użądleń w grupie dzieci uczulonych na jad pszczoły była większa niż u dzieci uczulonych na jad osy (3,2 vs 2,3). Koresponduje to z danymi, które przytacza Martinez-Canavate, wskazującymi, że 70% dzieci z rodzin pszczelarzy było żądłone więcej niż raz [103]. W przypadku alergii na jad osy ryzyko wystąpienia systemowej reakcji po użądleniu u osób, u których podczas poprzedniego użądlenia nie wystąpiła duża reakcja miejscowa, zwiększa się wielokrotnie w porównaniu z osobami z dużą reakcją miejscową po wcześniejszym użądleniu, co może wskazywać na jej ochronne działanie przed reakcją systemową, choć duża reakcja miejscowa wynika przede wszystkim z toksycznego działania składników jadu [105]. Również przebieg historii naturalnej alergii na jad osy jest odmienny niż w przypadku alergii na jad pszczoły. Już pierwsze użądlenie osy może wywołać reakcję systemową, co w naszym materiale dotyczyło 31% dzieci uczulonych na jad osy vs 14% uczulonych na jad pszczoły. Także odpowiedź immunologiczna typu swoistych IgE jest różna dla obu tych grup. U 82% dzieci alergię zależną od IgE potwierdzono na podstawie wyników testów skórnych, u 100% na podstawie oznaczeń swoistych IgE we krwi. Jest to zgodne z danymi z piśmiennictwa, gdzie częstość uzyskiwania dodatnich odczynów w testach śródskórnych u osób z reakcją systemową po użądleniu określa się na 65–85% [107]. Mimo że testy śródskórne stanowią bardziej adekwatne badanie diagnostyczne w alergii na jad owadów, to stwierdzenie wyłącznie dodatnich swoistych IgE w surowicy stanowi podstawę do rozpoczęcia immunoterapii zarówno u dorosłych, jak i dzieci z umiarkowaną i ciężką reakcją systemową w wywiadzie [52]. Obserwowane w niniejszej pracy istotnie większe średnie stężenia sIgE w grupie uczulonych na jad pszczoły niż u uczulonych na jad osy oraz brak związku między ciężkością reakcji klinicznej po użądleniu a stopniem uczulenia w wynikach tych badań całkowicie pokrywają się z pracami innych autorów [101, 102, 104]. W niniejszej pracy również nie stwierdzono związku między stężeniem tryptazy a stopniem ciężkości objawów występujących po użądleniu. Największe jej stężenie obserwowano u dzieci z reakcją III stopnia, a stężenie u uczulonych na jad pszczoły było istotnie większe niż u uczulonych na jad osy. Odmiennie są wyniki obserwacji Bluma, który zakłada związek między stężeniem tryptazy a stopniem ciężkości reakcji po użądleniu u chorych dorosłych [101].

W naszym materiale u 5 dzieci (7%), w tym u 2 uczulonych na jad osy i 3 na jad pszczoły, po użądleniu wystąpiła reakcja dwufazowa (u 1 dziecka II stopnia, u 2 dzieci III stopnia i u kolejnych 2 IV stopnia wg Muellera), która z reguły kojarzy się z cięższym przebiegiem anafilaksji, choć w przypadku odczynów po użądleniach występuje sporadycznie [6]. U żadnego z badanych dzieci nie stwierdzono dodatniego odczynu w punktowych testach skórnych ze stężeniem ekstraktu jadu 100 µg/ml, choć niektóre prace powołują się na przydatność tego badania w diagnostyce alergii na jad owadów u dzieci [5]. Odsetek dzieci z atopią był zbliżony do odsetka w populacji ogólnej – 25%, w tym u 5 dzieci (7%) rozpoznano astmę oskrzelową. Rozpoznanie to zwiększa ryzyko zgonu w przebiegu anafilaksji, także u dzieci [108, 109]. Nie ma bezpośrednich dowodów na to, że sama atopia zwiększa ryzyko poużądleniowej reakcji systemowej, choć u pszczelarzy może stanowić czynnik ryzyka wystąpienia odczynów alergicznych po użądleniu pszczoły [106]; według niektórych autorów istnieje korelacja między sIgE dla jadu pszczoły a sIgE dla pyłku traw, brzozy i roztoczy kurzu domowego [110]. U żadnego dziecka w omawianym materiale nie stwierdzono choroby układu sercowo-naczyniowego ani żadne z dzieci nie przyjmowało leków z grupy β-adrenolityków lub

inhibitorów ACE, zwiększających ryzyko wystąpienia cięższych odczynów poszczeniennych [51, 111, 112].

Stężenia podstawowych markerów aktywacji mastocytów w prezentowanym materiale nie różniły się między dziećmi zakwalifikowanymi do immunoterapii a tymi, które nie spełniały kryteriów kwalifikacji. Porównanie dzieci leczonych z grupą kontrolną wykazało jedynie istotnie większe stężenie $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu u dzieci z grupy kontrolnej, bez istotnych różnic w stężeniu pozostałych parametrów. Fakt ten, choć trudny do uzasadnienia, pokrywa się z wcześniejszymi obserwacjami autorki na mniej liczny materiał, gdzie w grupie kontrolnej stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu były istotnie większe niż stwierdzane u dzieci uczulonych na jad owadów, przy czym po uwzględnieniu kategorii płci większe stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu stwierdzano u dziewczynek. Chociaż nie ma badań wykorzystujących markery mastocytów u pacjentów z alergią na jad owadów, obie te obserwacje dobrze korespondują z wynikami badań Misso, który stwierdził podobne zmiany u dorosłych chorych na astmę, również po uwzględnieniu płci [46]. Wskazuje to na potencjalny związek profilu wydzielania metabolitów prostaglandyn z aktywnością hormonalną. Natomiast opisana w tej pracy ujemna korelacja między wiekiem a stężeniem tetranor-PGD-M nie znajduje odnośników w piśmiennictwie.

W niniejszym materiale stężenia podstawowych markerów aktywacji mastocytów nie różniły się między uczulonymi na jad osy i uczulonymi na jad pszczoły, również po uwzględnieniu płci. Brak różnic w stężeniach podstawowych u dzieci z anafilaksją w wywiadzie w porównaniu z dziećmi zdrowymi jest uzasadniony tym, że do gwałtownej przejściowej aktywacji komórek tucznych dochodzi jedynie w czasie ostrej reakcji.

Odmierna patofizjologia dotyczy chorych na astmę lub atopowe zapalenie skóry, u których choroba ma charakter ciągły, a wiążąc się z przewlekłym stanem zapalnym, w którym uczestniczą także komórki tuczne, może powodować wzmożone endogenne wydzielanie ich mediatorów. W niniejszej pracy atopia i astma nie stanowiły czynnika dyskryminującego w zakresie stężeń podstawowych badanych markerów w obrębie grupy dzieci odczulanych, a żadne z dzieci nie wykazywało objawów atopowego zapalenia skóry. Autorzy prac dotyczących dzieci z innymi niż anafilaksja chorobami zależnymi od IgE, takimi jak astma oskrzelowa i atopowe zapalenie skóry, również nie obserwowali znamiennych różnic między stężeniami podstawowymi metabolitów PGD₂ u dzieci chorych w porównaniu z dziećmi z grupy kontrolnej. Kiełbasa nie stwierdziła istotnej różnicy w stężeniu eikozanoidów w kondensacie powietrza wydechowego między dziećmi chorymi na astmę, bez względu na ciężkość choroby i sposób jej leczenia, a dziećmi zdrowymi [47]. Oymar [113] u 88 dzieci z atopowym zapaleniem skóry o różnym stopniu ciężkości obserwował istotnie zwiększone stężenie $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu tylko w przypadku atopowego zapalenia skóry o ciężkim przebiegu, podczas gdy w łagodniejszych postaciach choroby metabolit nie miał charakteru różnicującego między dziećmi z atopią i bez niej. Pomiar metodą ELISA, którą posługiwali się autorzy, zapewnia jednak znacznie mniejszą dokładność oznaczeń niż metoda GC-MS-NICI, uznawana za złoty standard w oznaczeniach stężeń eikozanoidów i stosowana w niniejszej pracy [114]. Również Bochenek nie stwierdziła istotnych różnic w wartościach podstawowych stężeń metabolitów PGD₂ mierzonych we krwi i moczu oraz tryptazy między chorymi na astmę a grupą kontrolną [44]. U dorosłych chorych na astmę zakresy stężeń markerów aktywności mastocytów w osoczu i moczu nie różniły się od prezentowanych w niniejszym materiale. Również różnice uwarunkowane płcią w pracy Bochenek i w naszym materiale są zbieżne [44]. Zachowanie tego samego reżimu badań umożliwia porów-

nianie wartości wyników z wynikami pracy Bochenek: uzyskane w tej pracy stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ we krwi są większe, w moczu porównywalne, a stężenie tryptazy mniejsze, zarówno w grupie leczonej, jak i w grupie kontrolnej. Natomiast zależności między grupą chorych a grupą kontrolną kształtowały się podobnie [44]. Element ten ma istotny wpływ na możliwość porównania wyników różnych prac. Większość autorów prac poświęconych eikozanoidom podaje czas pobrania materiału na godziny 8.00–10.00 rano [115]. Reżim ten ma także znaczenie w przypadku tryptazy, która wykazuje rytm dobowy stężenia podstawowego [116]. W niniejszej pracy reżim ten był ściśle przestrzegany. Prace poświęcone monitorowaniu alergii na jad owadów za pomocą tryptazy są liczniejsze niż te dotyczące metabolitów PGD₂, choć również i w tym przypadku znacznie mniej liczne u dzieci niż u dorosłych [62, 63, 101, 117]. Oznaczenie stężenia tryptazy w trakcie epizodu ciężkiej anafilaksji powinno być standardem, podobnie jak oznaczenie jej stężenia podstawowego u wszystkich osób z ciężką reakcją systemową po użądleniu w wywiadzie [35, 54, 73, 118]. Tym niemniej dostępność tego oznaczenia, zarówno dla dorosłych, jak i dla dzieci, nawet w ośrodkach wysokospecjalistycznych, jest w Polsce nadal mała [82]. Obserwacje te dotyczą także innych wysoko rozwiniętych krajów [119]. W piśmiennictwie polskim Kucharewicz już wcześniej zwróciła uwagę na korelację zwiększonego podstawowego stężenia tryptazy z wiekiem i ciężkością reakcji po użądleniu [120]. Klasycznie zwiększone podstawowe stężenie tryptazy jest wynikiem chorób z kręgu zaburzeń klonalnych mastocytów, które polegają na zwiększeniu puli ogólnoustrojowej komórek tucznych [64], a tym samym zwiększają ryzyko wystąpienia ciężkiej, zagrażającej życiu anafilaksji. Przykładem zaburzeń klonalnych mastocytów jest mastocytoza [121–123]. Choroba ta u dzieci występuje kazuistycznie, a jej postacią najczęściej stwierdzaną w tej grupie wiekowej jest pokrzywka barwnikowa [32]. Dlatego też ważnym elementem badania przedmiotowego jest szczegółowa ocena skóry. W niniejszym materiale u żadnego pacjenta nie stwierdzono takich objawów. W omawianej grupie średnie stężenie oraz zakres stężeń tryptazy (3,73; 95% PU: 3,18–4,31) pokrywają się z danymi podawanymi przez Komorowa dotyczącymi grupy dzieci atopowych i bez atopii w wieku od 6 miesięcy do 18 lat (odpowiednio $3,7 \pm 1,5$ i $3,8 \pm 2,3$) i są mniejsze niż u chorych dorosłych poddawanych immunoterapii z powodu alergii na jad owadów (6,8 $\mu\text{g/l}$; 95% PU: 1,14–177 $\mu\text{g/l}$) [124]. Może to wynikać właśnie z faktu, że u osób dorosłych z alergią na jad owadów znacznie częściej współistnieje układowa mastocytoza. Dodatkowo wydaje się, że wiek niewątpliwie wpływa na dynamikę stężenia tryptazy; w starszej wiekowo populacji obserwuje się fizjologiczne zwiększenie jej podstawowego stężenia [125]. W prezentowanym materiale większe podstawowe stężenie tryptazy obserwowano u chłopców i u dzieci z atopią, choć różnice nie były istotne. Podobne wyniki uzyskał Komarow, aczkolwiek w jego materiale różnica w stężeniu tryptazy pomiędzy dziećmi atopowymi i nieatopowymi była istotna statystycznie [117]. Mimo że średnie stężenie tryptazy w grupie dzieci z VIT nie różniło się istotnie od stężenia w grupie dzieci zdrowych, u 3% dzieci odczulanych wartość podstawowa przekraczała próg 11,4 $\mu\text{g/l}$, przyjęty obecnie za granicę typową dla zaburzeń klonalnych komórek tucznych [64]. Opublikowane ostatnio wyniki prac wieloośrodkowych [62, 63] wskazują na konieczność oznaczenia podstawowego stężenia tryptazy jako predyktora wystąpienia ciężkich odczynów poszczepiennych w przebiegu immunoterapii dawką wstępną, przyjmując za punkt odcięcia stężenie 5,4 $\mu\text{g/l}$. Wnioski z tych badań wskazują, że nawet nieznaczne zwiększenie stężenia podstawowego tryptazy u osób leczonych VIT istotnie zwiększa ryzyko wystąpienia ciężkiej systemowej reakcji ubocznej

w fazie stosowania dawki wstępnej. Uzasadnia to konieczność włączenia jej oznaczeń do panelu badań diagnostycznych w alergii na jad owadów. We wcześniejszej pracy autorki dotyczącej dzieci odczulanych na jad owadów stwierdzono, że stężenie tryptazy $> 7,5 \mu\text{g/l}$ może stanowić czynnik ryzyka wystąpienia systemowej reakcji poszczepiennej [126]. Ponieważ pokrywa się to z wynikami badań Komorowa (na innym niż alergina na jad owadów materiale), który za wartość odbiegającą od 95% PU wyników dla populacji przyjął stężenie tryptazy $> 8 \mu\text{g/l}$, to można uznać, że granica ta stanowi również próg w przypadku alergii na jad owadów. Pojawiły się publikacje wskazujące na możliwość uzyskania fałszywie zawyżonych wyników oznaczeń stężenia tryptazy w wyniku interferencji z przeciwciałami heterofilnymi, takimi jak czynnik reumatoidalny [127]. W omawianym materiale jeden chłopiec był leczony z powodu choroby Leśniowskiego i Crohna, a podstawowe stężenie tryptazy utrzymywało się u niego w dolnym zakresie wartości dla badanego materiału. Chociaż poglądy na temat potencjalnie niekorzystnego działania immunoterapii swoistej w stabilnych chorobach autoimmunologicznych oraz na temat jej przeciwwskazań ulegają zmianie [55], w każdym przypadku decyzję o leczeniu należy podjąć po uwzględnieniu wskaźnika korzyść/ryzyko i specyfiki indywidualnego chorego.

6.2. Wpływ leczenia wstępnego według protokołu szybkiego (*rush*) vs bardzo szybkiego (*ultra-rush*) na stężenie markerów aktywacji mastocytów i czynniki modyfikujące ten proces

Punktem wyjścia do podjęcia badań była próba ustalenia, który protokół (szybki [*rush*] vs bardzo szybki [*ultra-rush*]) immunoterapii wstępnej ekstraktem jadu uczulającego owada jest optymalny ze względu na bezpieczeństwo dziecka, z uwzględnieniem stopnia ciężkości reakcji układowej po użądleniu, oraz czy istnieją między nimi różnice w oddziaływaniu na uwalnianie markerów aktywacji mastocytów. Oba stosowane w niniejszej pracy protokoły zostały zaakceptowane w wytycznych międzynarodowych oraz przez grono ekspertów Polskiego Towarzystwa Alergologicznego [51, 52, 97]. Te same wytyczne dotyczą dzieci po 5. roku życia i dorosłych, choć badania u dzieci, jakkolwiek nieliczne, wskazują na pewne różnice w reakcji na wprowadzony antygen, przy czym ciężkie reakcje systemowe po użądleniu występują u dzieci rzadziej niż u dorosłych [107]. Nie stosowano premedykacji lekiem przeciwhistaminowym, choć zapobiega to wystąpieniu miejscowego odczynu poszczepiennego, ale nie chroni przed systemową reakcją poszczepienną [128]. Niektóre dane z piśmiennictwa wskazują na szybsze wytworzenie tolerancji immunologicznej w przypadku stosowania premedykacji lekiem przeciwhistaminowym [129]. W prezentowanym materiale w przebiegu protokołu bardzo szybkiego u żadnego dziecka nie obserwowano systemowej reakcji ubocznej, a odczyny miejscowe po podaniu ekstraktu były mniejsze niż w przypadku metody szybkiej. Natomiast w przebiegu protokołu szybkiego u 12,5% (w tym u 5 chłopców [10%]) odczulanych ekstraktem jadu pszczoły i 2 [2,5%] odczulanych ekstraktem jadu osy) po osiągnięciu stężenia ekstraktu jadu $100 \mu\text{g/ml}$ obserwowano SSR I–III stopnia wg klasyfikacji Muellera. Skala oceny SSR została dobrana w taki sposób, by umożliwić

liwić lepsze porównanie z odczynem po użądleniu. Dlatego też w sposób zamierzony w niniejszym materiale nie posługiwano się skalą wg Ringa i Messmera [2] ani skalą AAAAI, zaproponowaną przez L. Cox [55], ale skalą wg Muellera. U dzieci z SSR konieczne było podanie leku przeciwhistaminowego, jednorazowej dawki glikokortykosteroidu, a u 3 dzieci z obturacją oskrzeli dodatkowo krótko działającego β_2 -mimetyku. W żadnym przypadku nie było konieczne podanie adrenaliny ani wlewu kroplowego. Niemal u wszystkich dzieci ciężkość odczynu poszczepiennego odzwierciedlała ciężkość odczynu po użądleniu polnym. Poza najmłodszym, 5-letnim chłopcem, u którego konieczna była indywidualna modyfikacja dawki podtrzymującej, u pozostałych chłopców w kolejnym dniu kontynuowano immunoterapię, rozpoczynając od ostatniego dobrze tolerowanego stężenia. Stężenie i dawka (10–60 μg), przy której wystąpiły objawy uboczne w 4. dobie immunoterapii 5-dniowym schematem *rush*, są zgodne z obserwacjami innych autorów [130]. Wystąpienie w badanym materiale objawów ubocznych w fazie dawki wstępnej wskazuje, że jest to najbardziej krytyczny okres w przebiegu immunoterapii na jad owadów, co pokrywa się z obserwacjami innych autorów [131]. Dane z tej pracy pokrywają się również z wynikami 8-letnich obserwacji Sturma, zgodnie z którymi częstość występowania odczynów systemowych w protokole szybkim wynosi 12% u chorych dorosłych odczulanych ekstraktem jadu pszczoły i 2% u odczulanych ekstraktem jadu osy; płeć nie wpływała na uzyskane wyniki [132]. Spostrzeżenia z niniejszej pracy są również w pewnym stopniu zbieżne z wnioskami pochodzącymi z najlepiej udokumentowanego wieloośrodkowego badania dotyczącego monitorowania efektów ubocznych, występujących w przebiegu immunoterapii przeprowadzonej pod patronatem EAACI. W grupie 840 pacjentów stwierdzono 20% SSR wyrażonych w skali Muellera, a wśród czynników ryzyka najistotniejsze były: szybki protokół odczulania, odczulanie ekstraktem jadu pszczoły i płeć żeńska [133]. W innym materiale u dorosłych odnotowano większą częstość występowania SSR w przypadku odczulania ekstraktem jadu pszczoły i w przebiegu protokołu szybkiego przy stosowaniu takiej samej dawki skumulowanej, jak w niniejszej pracy [134]. Najprawdopodobniej czynnikiem krytycznym, warunkującym różnice w tolerancji obu protokołów, pozostaje dwukrotnie większa dawka skumulowana w protokole szybkim niż w protokole bardzo szybkim. Zgodnie z innymi danymi z piśmiennictwa częstość występowania odczynów systemowych w trakcie leczenia dawką wstępną jest różna i waha się od 7,5–39% w przypadku protokołów wolnych (konwencjonalny i klasterowy), w których dawkę podtrzymującą osiąga się po okresie kilku do kilkunastu tygodni [135, 136], do 11–38% dla protokołu szybkiego [137, 138] i 10–28% w przypadku protokołu bardzo szybkiego (*ultra-rush*) [134, 139]. Protokoły podlegają systematycznej modyfikacji. Ostatni okres zaowocował danymi na temat bezpieczeństwa innego – 2-dniowego 6-dawkowego – schematu, w którym SSR obserwowano tylko w 1,2% przypadków [140].

W prezentowanych badaniach ustalono, że protokół odczulania *rush* w grupie leczonej ekstraktem jadu pszczoły znamienne zwiększał stężenie tryptazy we krwi, natomiast w grupie leczonej ekstraktem jadu osy znamienne zwiększało się stężenie tetranor-PGD-M w moczu w porównaniu ze stężeniami przed leczeniem. Po podaniu dawki początkowej w grupie dzieci z SSR w porównaniu z dziećmi dobrze tolerującymi immunoterapię stwierdzono znamienne zwiększenie stężenia tryptazy. Największe – trzykrotne – zwiększenie dotyczyło najmłodszego chłopca z najłagodniejszym odczynem systemowym. Ponadto u dzieci, które dobrze tolerowały dawkę wstępną podaną metodą *rush*, przed leczeniem stwierdzano istotnie większe stężenie $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ zarówno w osoczu, jak

i w moczu w porównaniu z osobami z SSR. Ten wyższy poziom cechował także dzieci z grupy kontrolnej. Mimo że oba związki są metabolitami PGD₂, ich stężenia w moczu zachowują się odmiennie. Trudno to wyjaśnić; jedyne znane badanie porównawcze polegające na podaniu PGD₂ we wlewie i określeniu stężenia jej pochodnych w moczu przeprowadził Song na ochotnikach i w modelu zwierzęcym [40]. Prace, w których badano stężenie tetranor-PGD-M są nieliczne, co może być wynikiem trudności metodologicznych, na które natrafiono również w tej pracy, a które sygnalizują także inni autorzy [40]. Jako końcowy produkt eikozanoidów o pierścieniu D tetranor-PGD-M wydaje się bardziej stabilny i osiąga w moczu większe stężenia niż 9 α ,11 β -PGF₂. Song [40] podaje zakres jego stężenia podstawowego 1,5 \pm 0,3 ng/mg kreatyniny, a średnie stężenie po prowokacji – 4,34 ng/mg kreatyniny, co utrzymuje się w dolnym zakresie stężeń stwierdzonych w prezentowanym materiale. Mimo że stężenia obu parametrów – tryptazy i tetranor-PGD-M – znamienne się zwiększyły po leczeniu protokołem *rush* w stosunku do okresu przed podaniem dawki, nie stwierdzono istotnej różnicy w stężeniu tryptazy i tetranor-PGD-M po leczeniu między protokołem *rush* i *ultra-rush*, co wskazuje, że oba protokoły są bezpieczne. Wydaje się jednak, że u dzieci z większym podstawowym stężeniem tryptazy, zwłaszcza odczulanych ekstraktem jadu pszczoły, korzystniejszy może być protokół bardzo szybki. Przy podejmowaniu decyzji dotyczącej wyboru protokołu leczenia dawką wstępną należy uwzględnić także inne, dodatkowe czynniki rokownicze, o potencjalnym wpływie modulującym sposób podania dawki wstępnej na stężenie markerów aktywacji mastocytów. Analiza wyników tej pracy wskazuje, że czynniki te różnią się w zależności od gatunku uczulającego owada.

Na zmianę stężenia tryptazy wywołaną podaniem dawki wstępnej dzieciom uczulonym na jad pszczoły wpływa kilka czynników równocześnie. I tak, wiek w chwili pierwszego użądlenia korelował dodatnio ze stężeniem tryptazy (im dziecko było starsze, tym wzrost stężenia tryptazy był większy); inaczej było w przypadku wieku kwalifikacji do immunoterapii, kiedy występowała korelacja ujemna (młodszy wiek korelował ze zmniejszeniem stężenia tryptazy). Także stężenie sIgE dla jadu pszczoły przed leczeniem korelowało dodatnio ze zwiększeniem stężenia tryptazy, przy czym u chłopców zwiększenie to było mniejsze niż u dziewczynek. Wystąpienie systemowej reakcji poszczepiennej w każdym stopniu ciężkości korelowało ze zwiększeniem stężenia tryptazy. Oznacza to, że u młodszych dzieci płci męskiej z niższymi wartościami sIgE dla jadu pszczoły ryzyko zwiększenia stężenia tryptazy w trakcie leczenia dawką wstępną podaną metodą szybką jest mniejsze i u nich może nie występować różnica w tolerancji dawki wstępnej immunoterapii bez względu na sposób jej podania (metodą *rush* lub *ultra-rush*). Natomiast u dzieci starszych, u których do pierwszego użądlenia doszło w późniejszym wieku (zwłaszcza dziewczynek), z dużym stężeniem sIgE dla jadu pszczoły przed leczeniem, ryzyko znamiennego zwiększenia stężenia tryptazy w trakcie leczenia metodą szybką jest większe. W ich przypadku korzystniejsze może być podanie dawki wstępnej metodą *ultra-rush*.

U dzieci odczulanych ekstraktem jadu osy metodą szybką sIgE było jedynym czynnikiem, który korelował z dużym stężeniem tetranor-PGD-M. Tym niemniej wartości początkowe stężenia tetranor PGD-M nie różniły się między dziećmi dobrze tolerującymi odczulanie a dziećmi z reakcją uboczną po podaniu wstępnej dawki. Może to odzwierciedlać wzmożony metabolizm pochodnych PGD₂ we krwi do metabolitów wydzielanych z moczem. Interpretacja tego zjawiska jest trudna i wymaga dalszej obserwacji, choć wydaje się, że stężenie tetranor-PGD-M w moczu jest bardziej zbliżone do stężenia tryptazy

w opisywaniu zjawisk związanych z immunoterapią na jad owadów niż stężenie metabolitów $9\alpha,11\beta$ -PGF₂. Obserwowane różnice potwierdzają zasadność uwzględnienia w tej grupie chorych płci dziecka oraz gatunku uczulającego owada, a w mniejszym stopniu ciężkości objawów występujących po użądleniu. Natomiast stopień ciężkości objawów po użądleniu polnym, na podstawie którego dzieci były kwalifikowane do leczenia, nie miał istotnego wpływu na przebieg immunoterapii dawką wstępną w obu kategoriach uczulenia. Nie stwierdzono także korelacji z wynikiem testów skórnych i atopią.

Jeśli potraktować podanie wstępnej dawki immunoterapii jako formę zbliżoną do próby prowokacji, to dynamika zachowania eikozanoidów w tym materiale odbiega od dynamiki zachowania eikozanoidów w próbach prowokacyjnych, w przebiegu których autorzy obserwowali zwiększenie stężenia pochodnych PGD₂ zarówno u dzieci, jak i dorosłych chorych na astmę, w tym także astmę wysiłkową i aspirynową [44, 45, 47, 141, 142]. Na wynik tych obserwacji nie wpływała farmakoterapia. Jedyne u 5 dzieci ze stabilną astmą oskrzelową stosowano małą do umiarkowanej dawkę glikokortykosteroidu wziewnego. U dzieci tych podstawowe stężenia metabolitów eikozanoidów nie różniły się od stwierdzanych u dzieci niechorujących na astmę. Autorzy prac dotyczących astmy podkreślają możliwe różnice w odpowiedzi eikozanoidów na prowokację u chorych leczonych glikokortykosteroidami wziewnymi [46, 47]. Pierwszą pracą, w której zastosowano oznaczenie stężeń metabolitów PGD₂ do diagnostyki anafilaksji, była praca Ono [48]. Autor dokonał w niej oceny stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu oraz tryptazy w surowicy u chorych w trakcie ostrego epizodu anafilaksji oraz u osób zdrowych. Czynniki wyzwalającymi były: żywność, leki, wysiłek fizyczny, roztwory alergenów do testów skórnych i preparat do immunoterapii swoistej [48]. W przypadku chorych z anafilaksją w wywiadzie dokonano próby prowokacji z czynnikiem, który wcześniej wywołał objawy. Odnotowano nawet 10-krotne zwiększenie średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu w porównaniu z wartościami sprzed prowokacji, podczas gdy zwiększenie stężenia tryptazy nie było istotne. Jest to o tyle zastanawiające, że u pacjentów występowały pełne objawy anafilaksji, w tym wstrząsu anafilaktycznego. Najprawdopodobniej brak istotnego zwiększenia stężenia tryptazy wynika z faktu, że różne bodźce pobudzają różne szlaki aktywacji mastocytów. Przykładowo w przebiegu anafilaksji na pokarmy nie obserwuje się zwiększenia stężenia tryptazy, a główny szlak przemian jest zależny od czynnika aktywującego płytki (PAF – *platelet activating factor*) [143]. W podjętych pierwszych próbach wykorzystania oznaczeń prostanoidów w moczu do monitorowania odpowiedzi na swoisty bodziec u dzieci z alergią pokarmową stwierdzono dodatnią korelację ich stężenia z działaniem bodźca, ale także rozchwianie objawów klinicznych i wyników oznaczeń stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu, przejawiające się utrzymaniem się dużego stężenia metabolitu przy normalizacji objawów klinicznych [144]. Ostatnio także autorzy japońscy przedstawili po raz pierwszy wyniki badań z innym metabolitem PGD₂ – 2,3-dinor- $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ – wykrywalnym w moczu, stwarzającym nadzieje na lepsze poznanie zjawisk towarzyszących ostremu epizodowi anafilaksji spowodowanej żywnością lub immunoterapią swoistą [49]. Autorzy podkreślają potencjalną praktyczną przydatność tego oznaczenia, argumentując, że 2,3-dinor- $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ wydaje się bardziej czułym i adekwatnym markerem syntezy PGD₂ niż stężenie $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu, a dzięki połączeniu metody EIA do oznaczania stężeń $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu i HPLC koszt oraz pracochłonność oznaczeń byłyby mniejsze niż w przypadku metody GC-MS-NICI. Dotychczas nie prowadzono badań oceniających, jaki rodzaj odpowiedzi eikozanoidów wywołują alergeny jadu owadów.

Należy również pamiętać, że ekstrakt jadu jest dobrze wystandaryzowanym preparatem o zmniejszonej alergogenności przy zachowaniu jego potencjału immunogennego, dlatego nie odwzorowuje procedury prowokacji. Brak zwiększenia stężenia badanych parametrów wskazuje przede wszystkim na duże bezpieczeństwo leczenia.

Po ustaleniu indywidualnych czynników medycznych, jeśli nie stanowią one przeszkody w wyborze protokołu leczenia dawką wstępną, należy rozważyć również aspekt ekonomiczny. Protokół szybki wymaga dłuższej hospitalizacji i zwiększa jej koszt, podczas gdy protokół bardzo szybki pozwala na skrócenie leczenia i zmniejszenie jego kosztów. Dodatkowym korzystnym aspektem w przypadku protokołów szybkich i bardzo szybkich jest lepsza dyscyplina pacjenta, wynikająca z faktu, że podanie dawki ma miejsce w ramach hospitalizacji. Taka organizacja chroni także pacjenta przed ekspozycją na użądlenia polne, zanim osiągnie etap leczenia dawką podtrzymującą.

6.3. Wpływ leczenia dawką podtrzymującą na stężenie markerów aktywacji mastocytów i czynniki modyfikujące ten proces

Obserwacja dotyczy 3-letniej immunoterapii dawką podtrzymującą dzieci, u których dawkę początkową podano metodą *rush*. Trzyletni okres leczenia jest uznawany za wystarczający do osiągnięcia u większości leczonych ochronnego działania immunoterapii [145], a wiele prac wskazuje na większą u dzieci niż u dorosłych (98% vs. 94%) skuteczność leczenia trwającego 3–6 lat [104, 146]. Prawdziwym miernikiem skuteczności leczenia jest stopień ograniczenia reakcji na użądlenie. W związku z tym w ocenie skuteczności stosuje się monitorowanie odpowiedzi na użądlenia polne [147], a także ocenę odpowiedzi IgE w testach skórnych i sIgE w surowicy (podobnie jak w przypadku immunoterapii innymi alergenami) [76, 148], ocenę IgG₄ [149], a w warunkach kontrolowanych próbę prowokacyjną z żywym owadem [150, 151]. W praktyce obserwacje dotyczą najczęściej odpowiedzi na użądlenia polne.

W prezentowanym materiale protokół leczenia dawką podtrzymującą był ujednolicony dla wszystkich leczonych i zgodny z obowiązującymi wytycznymi [51, 97]. U żadnego dziecka nie obserwowano SSR w trakcie leczenia dawką podtrzymującą 100 µg, co świadczy o bezpieczeństwie tej fazy leczenia i znajduje potwierdzenie w pracach dotyczących zarówno dzieci, jak i dorosłych [133, 152]. W cytowanym wielośrodkowym badaniu realizowanym w ramach inicjatyw EAACI wskaźnik występowania SSR w fazie dawki podtrzymującej wynosił 0,5%. Częstość występowania niepożądanych działań w przebiegu immunoterapii na jad owadów jest podobna do częstości ich występowania w przebiegu immunoterapii na inny rodzaj alergenów, np. roztoczy kurzu domowego [55]. Dodatkowo należy podkreślić, że epizody zgonów opisywanych w przebiegu swoistej immunoterapii najczęściej wynikają nie z działań niepożądanych leczenia, ale z błędów popełnionych przez personel medyczny [153].

W omawianych badaniach w trakcie obserwacji doszło do 7 użądleń polnych u pięciorga dzieci (19% spośród leczonych ekstraktem jadu osy); jedno dziecko zostało użądłone trzykrotnie. W żadnym przypadku nie obserwowano reakcji systemowej. U dziecka użądłonego trzykrotnie początkowo duży odczyn miejscowy systematycznie się zmniejszał. Potwierdza to podawane przez innych autorów dane dotyczące dobrej tolerancji

użądleń polnych u osób poddawanych immunoterapii ekstraktem jadu osy [154]. Jest to także zgodne z obserwacjami mówiącymi o szybkim wytwarzaniu tolerancji i działaniu ochronnym przed kolejnymi odczynami systemowymi po użądleniu w przypadku chorych odczulanych dawką początkową podaną według protokołu szybkiego i bardzo szybkiego [93, 155–157]. Ze względu na dobrą tolerancję użądleń polnych u dzieci tych nie było wskazań do zwiększania dawki podtrzymującej, co jest zalecane zarówno w przypadku złej tolerancji użądleń polnych w trakcie leczenia dawką podtrzymującą, jak i systemowych odczynów po podaniu dawki podtrzymującej [158]. Po użądleniu polnym nie dokonano dodatkowej oceny markerów aktywacji mastocytów, ale fakt użądlenia został uwzględniony w analizie statystycznej.

Rezultaty kliniczne obserwowane w niniejszej pracy korespondują z wynikami prac potwierdzających dużą skuteczność immunoterapii w porównaniu z osobami nieodczulonymi i uzasadniają stosowanie tej metody leczenia u dzieci [147, 159, 160]. Kontrowersje wzbudza propozycja protokołu dla dzieci [161, 162] z dawką podtrzymującą 50 µg, co prowadzi w efekcie do stosowania mniejszej dawki skumulowanej w procesie leczenia. Autorzy podkreślają dobrą tolerancję protokołu i brak SSR w przebiegu użądleń polnych w trakcie stosowania immunoterapii swoistej i po jej zakończeniu, dlatego w celu zapewnienia większej skuteczności leczenia wydłużono je do 5 lat.

Stwierdzone w badanym materiale różnice w dynamice markerów aktywacji mastocytów były uzależnione od płci, co może wynikać z rozpoczynającej się u dzieci aktywności hormonalnej w trakcie 3-letniej immunoterapii dawką podtrzymującą. Zjawisko modulowania alergicznej odpowiedzi immunologicznej jest opisywane w piśmiennictwie [163]. Obserwowana w niniejszej pracy znamienna tendencja spadkowa stężeń tryptazy i $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu u dziewczynek odczulanych ekstraktem jadu pszczoły oraz stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu dziewczynek odczulanych jadem osy odzwierciedla przypuszczalnie stan tolerancji immunologicznej obwodowych limfocytów T, zainicjowany autokrynnym działaniem IL-10 wytwarzanej przez swoiste antygenowo limfocyty T w przebiegu immunoterapii swoistej. Prawdopodobnym efektem tego działania jest zmniejszenie gęstości i reaktywności komórek tucznych w przebiegu VIT lub nawet zmniejszenie ich puli ustrojowej [164]. U chłopców znamienna była jedynie tendencja wzrostowa stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu, co koresponduje i odzwierciedla odmienną niż u dziewczynek dynamikę markerów aktywności mastocytów. Obserwowana w tej pracy tendencja spadkowa stężenia tryptazy w przebiegu immunoterapii oraz jego większe wartości u płci męskiej są zbieżne z wynikami pracy Dugas-Breit [124].

W niniejszej pracy poszukiwano dodatkowych czynników modulujących zachowanie markerów aktywacji mastocytów w procesie leczenia dawką podtrzymującą, podobnie jak przy ocenie odpowiedzi na leczenie dawką początkową. Najwięcej czynników wywierało niezależny wpływ na dynamikę stężenia tryptazy. Na podstawie uzyskanych wyników podjęto próbę określenia profilu dziecka uczulonego na jad pszczoły, u którego można się spodziewać szybkiego zmniejszenia stężenia tryptazy w przebiegu leczenia dawką podtrzymującą, a także profilu dziecka, u którego zmniejszenie to będzie powolne. Najszybsze tempo spadkowe będzie dotyczyło dzieci zakwalifikowanych do leczenia w późniejszym dzieciństwie, wielokrotnie żądzonych przed rozpoczęciem leczenia, u których do pierwszego użądlenia doszło w młodszym wieku, stężenie sIgE dla jadu pszczoły przed leczeniem nie jest znacznie zwiększone, a odczyn w testach skórnych jest duży oraz które dobrze tolerowały podanie dawki początkowej. Odwrotnie – stężenie tryptazy będzie się zmniejszało najwolniej u dzieci zakwalifikowanych do leczenia

ekstraktem jadu pszczoły w młodszym wieku, po pojedynczym użądleniu, u których stężenie sIgE jest wysokie, a odczyn w testach skórnych mało nasilony, oraz które zareagowały SSR na podanie dawki wstępnej. Opublikowane ostatnio prace poświęcone immunoterapii uczulenia na jad owadów u dzieci nie pozwalają na omówienie tego zjawiska, ponieważ opierają się wyłącznie na ocenie sIgE i reakcji w testach skórnych [161, 165].

U dzieci uczulonych na jad osy, mimo że nie stwierdzono u nich znamiennego spadku stężenia tryptazy w procesie leczenia, zmiana kierunku jej stężenia była kształtowana przez te same czynniki rokownicze jak w przypadku tryptazy u odczulanych ekstraktem jadu pszczoły. Dziecko uczulone na jad osy, u którego można się spodziewać szybszego zmniejszenia stężenia tryptazy, to dziecko użądłone po raz pierwszy w późnym dzieciństwie, nieatopowe, z niższymi stężeniami sIgE dla jadu osy przed leczeniem, u którego dawka skumulowana w procesie leczenia jest wysoka i które dobrze tolerowało dawkę początkową. I odwrotnie – powolne zmniejszanie się stężenia tryptazy będzie dotyczyło dzieci odczulanych ekstraktem jadu osy, u których do pierwszego użądlenia doszło we wczesnym dzieciństwie, atopowych, z wysokim wyjściowym stężeniem sIgE dla jadu osy, leczonych niską dawką skumulowaną, które zareagowały systemowo na leczenie początkowe. Z modelem tego badania najlepiej koresponduje praca Dugas-Brait, w której monitorowano stężenie tryptazy w trakcie trwającej średnio 4,2 roku immunoterapii; autorzy nie uwzględnili w niej jednak typu żądającego owada [124].

Mimo znamiennej tendencji spadkowej stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w osoczu dziewczynek leczonych zarówno ekstraktem jadu pszczoły, jak i ekstraktem jadu osy nie udało się ustalić dodatkowych czynników wpływających na tę dynamikę. Natomiast tendencja wzrostowa stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu u chłopców odczulanych ekstraktem jadu osy pozwoliła na określenie profilu dziecka, u którego można się spodziewać zmniejszenia stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu. Jest to dziecko po wielokrotnych użądleniach przed leczeniem, zakwalifikowane do immunoterapii we wczesnym dzieciństwie, dobrze tolerujące dawkę początkową immunoterapii, u którego dawka skumulowana nie jest wysoka. Odwrotnie – metabolit osiągnie większe stężenia w procesie leczenia dziecka po pojedynczym użądleniu, zakwalifikowanego do immunoterapii w późniejszym dzieciństwie, które przebyło SSR w okresie podawania dawki wstępnej i jest leczone wysoką dawką skumulowaną.

Tetranor-PGD-M był jedynym markerem, którego zmiana w okresie leczenia dawką podtrzymującą znamienne korelowała ze wstrząsem anafilaktycznym po użądleniu w wywiadzie. Profil dziecka, u którego stężenie tetranor-PGD-M w okresie leczenia dawką podtrzymującą pozostawało niskie, określono następująco: dziecko odczulane jadem pszczoły, zakwalifikowane do immunoterapii w późniejszym dzieciństwie, z łagodniejszą (II–III stopień) reakcją systemową po użądleniu i ze słabo dodatnim odczynem w testach skórnych przez leczeniem. Odmiennie – u dzieci zakwalifikowanych do leczenia we wczesnym dzieciństwie, ze wstrząsem anafilaktycznym po użądleniu i silnie dodatnim odczynem w testach skórnych z jadem pszczoły stężenie tetranor-PGD-M było wysokie. U dzieci odczulanych jadem osy wstrząs anafilaktyczny po użądleniu i niska wartość swoistych IgE dla jadu osy przed leczeniem utrzymywały stężenia tetranor-PGD-M w dolnym zakresie wartości w okresie leczenia dawką podtrzymującą. Tymczasem łagodniejsze odczyny systemowe (II–III stopnia) po użądleniu i wysokie stężenie sIgE dla jadu osy przed leczeniem istotnie korelowały z jego wysokim stężeniem w przebiegu immunoterapii dawką podtrzymującą. Nie stwierdzono zależności między użądleniem polnym w trakcie leczenia dawką podtrzymującą i stężeniem któregośkolwiek z badanych

markerów. Wynika to z faktu, że poza warunkami kontrolowanymi nie ma możliwości pobrania materiału bezpośrednio po użądleniu – ocena oparta jest na obserwacjach klinicznych, co jest powszechnie stosowaną praktyką [103, 104].

Obserwowana w niniejszej pracy tendencja spadkowa stężenia sIgE w okresie kilkuletniej immunoterapii dawką podtrzymującą, choć nie wykazywała prostej zależności liniowej, jest zgodna z wcześniejszymi obserwacjami u dzieci [166] i nie różni się od obserwacji poczynionych u chorych dorosłych [104]. Monitorowanie dynamiki IgE w przebiegu immunoterapii podtrzymującej wskazuje, że szybciej dochodzi do negatywizacji stężeń IgE we krwi niż przy ocenie za pomocą testów skórnych [167]. Podobnie jak w przypadku pomiaru markerów aktywacji mastocytów w odpowiedzi u uczulonych na jad pszczoły również stwierdzono odmienną dynamikę niż u uczulonych na jad osy. W przypadku stężenia sIgE dla jadu pszczoły istotne zmniejszenie w stosunku do wartości sprzed leczenia obserwowano już podczas pierwszej kontroli rocznej, a największy spadek dotyczył okresu po 2 latach leczenia. Dziecko, u którego najszybciej zmniejszało się stężenie sIgE, to dziecko z atopią, po wielokrotnych użądleniach, u którego do pierwszego użądlenia doszło w późniejszym dzieciństwie, które zostało szybko zakwalifikowane do immunoterapii i było odczulane co najmniej 2 lata. Profil dziecka, u którego zmniejszenie było wolniejsze, określono następująco: dziecko nieatopowe, po pojedynczym użądleniu, u którego do pierwszego użądlenia doszło we wczesnym dzieciństwie i u którego leczenie rozpoczęto w późniejszym okresie. Nieco odmiennie w przypadku sIgE dla jadu osy istotne zmniejszenie stężenia obserwowano dopiero po 3 latach immunoterapii. Nie udało się określić profilu pacjenta ściśle korespondującego ze zmniejszeniem wartości sIgE w czasie leczenia. Dynamika stężenia sIgE dla jadu pszczoły nie korelowała ze stężeniem żadnego z parametrów aktywacji mastocytów; w przypadku sIgE dla jadu osy stwierdzono dodatnią korelację ze stężeniem tryptazy, podczas gdy w przypadku stężenia $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ w moczu zależność ta była ujemna.

Ponieważ 3 lata stanowią najkrótszy okres leczenia, na podstawie zgromadzonych w tym czasie danych (u dzieci, które kontynuują immunoterapię) podjęto próbę modelowania matematycznego, służącego określeniu profilu pacjenta o danych cechach, tak aby jak najlepiej przewidzieć jego odpowiedź na leczenie. Byłoby to pomocne w podejmowaniu właściwych decyzji diagnostyczno-terapeutycznych. Do modelowania można wykorzystać stosunkowo mniej liczne grupy chorych, pod warunkiem zastosowania wyników istotnych statystycznie.

Uzupełnieniem badania klinicznego i badań laboratoryjnych w tej pracy była także próba oceny strony emocjonalnej, związanej z lękiem przed użądleniem u dzieci z alergią, której objawy potencjalnie zagrażają życiu. Wyniki wskazały na brak bezpośredniego związku zarówno ze stopniem ciężkości wcześniejszej reakcji, jak i z rozpoznaniem astmy. Płeć badanych dzieci oraz gatunek uczulającego owada nie różnicowały uzyskanych odpowiedzi. Pokrywa się to z wynikami uzyskanymi przez Oude-Elberink u chorych dorosłych; autorka ta również nie stwierdziła zależności udzielonych odpowiedzi od ciężkości objawów występujących po użądleniu, a różnica w odpowiedzi między mężczyznami a kobietami była nieistotna statystycznie [168]. Inaczej niż w pracach Oude-Elberink w naszym materiale wiek silnie różnicował poczucie lęku, który był największy u dzieci najmłodszych. Prace Oude-Elberink zaowocowały opracowaniem odrębnego kwestionariusza jakości życia, ściśle adresowanego do grupy chorych dorosłych uczulonych na jad osy [169]. Stanowiło to także inspirację dla autorki tej pracy do

stworzenia podobnego narzędzia służącego poszerzeniu diagnostyki u dzieci z alergią na jad owadów [170, 171]. Uzyskane wyniki uzasadniają potrzebę jednoczesnej diagnostyki medycznej i psychoemocjonalnej tych dzieci i mogą być dodatkową wskazówką do kwalifikacji do immunoterapii nawet w przypadku łagodnych, ograniczonych do skóry odczynów systemowych, jeśli jakość życia dziecka jest znacznie upośledzona.

7. WNIOSKI

Uzyskane wyniki badań pozwoliły na zweryfikowanie hipotez zerowych i sformułowanie następujących wniosków:

1. Protokoły szybki (*rush*) i bardzo szybki (*ultra-rush*) nie różnią się bezpieczeństwem mierzonym częstością występowania systemowych objawów ubocznych w ich przebiegu, choć obserwowane nieistotne różnice wymagają weryfikacji w badaniach obejmujących większą grupę pacjentów. Stopień ciężkości objawów po użądleniu nie wykazuje wpływu na przebieg immunoterapii dawką początkową bez względu na rodzaj protokołu.
2. W leczeniu dawką początkową protokół *rush* wiąże się z istotnym zwiększeniem stężeń wybranych markerów aktywacji mastocytów, choć oba protokoły nie różnią się w zakresie ich stężeń końcowych. Wydaje się zatem, że u dzieci z podwyższonym podstawowym stężeniem tryptazy korzystniejszy może być protokół *ultra-rush*.
3. W leczeniu dawką podtrzymującą dochodzi do istotnych zmian w dynamice wybranych markerów aktywacji komórek tucznych, zmiany te pozostają w związku z czasem leczenia i płcią dziecka.
4. Przy podejmowaniu decyzji terapeutycznych dotyczących wyboru protokołu początkowego i czasu leczenia dawką podtrzymującą powinno się uwzględniać dodatkowe czynniki rokownicze, takie jak wiek, w którym doszło do pierwszego użądlenia, wiek kwalifikacji do immunoterapii oraz liczba użądleń, gdyż w procesie leczenia wykazują one silniejszy związek z zachowaniem niektórych markerów aktywacji mastocytów niż uznane badania diagnostyczne, jak swoiste IgE w surowicy i testach skórnych.
5. Głównym markerem reagującym w procesie leczenia na dodatkowe czynniki rokownicze jest tryptaza, co uzasadnia wprowadzenie oznaczenia jej stężenia do obowiązującego panelu badań.
6. Podanie dawki początkowej według protokołu *rush* prowadzi do szybkiego zwiększenia tolerancji na alergen po użądleniu polnym w fazie leczenia dawką podtrzymującą.
7. Dzieci uczulone (łącznie – te wymagające immunoterapii, przed jej rozpoczęciem oraz te niewymagające leczenia) nie różnią się od dzieci zdrowych w zakresie podstawowych stężeń markerów aktywacji mastocytów (z wyjątkiem stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu). Podobnie dzieci wymagające immunoterapii, przed jej rozpoczęciem, nie różnią się istotnie pod względem podstawowych stężeń tych markerów od dzieci niewymagających leczenia.

8. STRESZCZENIE

Praca ma na celu ocenę odpowiedzi biologicznej na ekstrakt alergenu jadu pszczoły i jadu osy zarówno w fazie leczenia dawką wstępną podaną według protokołu szybkiego *rush* (dawka skumulowana 216,46–223,32 μg) lub bardzo szybkiego *ultra-rush* (dawka skumulowana 101,11 μg), jak i 3-letniego okresu leczenia dawką podtrzymującą u dzieci spełniających kryteria kwalifikacji do immunoterapii swoistej (w wywiadzie reakcja systemowa II^o-IV^o po uządleniu z potwierdzonym podłożem zależnym od IgE). Leczenie prowadzono w warunkach klinicznych. W badaniach laboratoryjnych określano stężenie tryptazy i metabolitów PGD₂ w osoczu (9 α ,11 β -PGF₂) i moczu (9 α ,11 β -PGF₂ i tetranor-PGD-M) jako najbardziej swoistych dla aktywacji komórki tucznej. Oceny dokonano przed leczeniem, porównując wartości grupy badanych z dziećmi niezakwalifikowanymi do immunoterapii i z grupą kontrolną. Czas pobrania materiału do badań był tak dobrany, aby uchwycić najwyższe stężenia badanych związków, czyli bezpośrednio po zakończeniu protokołu dawki wstępnej oraz w kolejnych, rocznych interwałach każdorazowo przed i po podaniu dawki podtrzymującej. Tryptazę oznaczano metodą fluoroenzymatyczną za pomocą zestawu ImmunoCAP, a metabolity PGD₂ metodą chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas, techniką ujemnej jonizacji chemicznej (GC-MS-NICI) uznaną za złoty standard tych oznaczeń. Wyniki opracowano statystycznie za pomocą regresji liniowej, w oparciu o metodę *random effects models* uwzględniającą panelowy charakter danych, co pozwala na uniknięcie systematycznego błędu estymacji.

Wartości podstawowe markerów nie różniły leczonej immunoterapią od grupy niespełniających kryteriów kwalifikacji do leczenia, a wyższe stężenie 9 α ,11 β -PGF₂ w grupie kontrolnej stanowiło jedyną istotną różnicę.

U 7 dzieci wystąpiły systemowe objawy uboczne I^o-III^o w trakcie podania dawki wstępnej według protokołu *rush*. U żadnego z dzieci leczonych protokołem *ultra-rush* nie obserwowano systemowych objawów ubocznych, a odczyny w miejscu podania ekstraktu były mniejsze niż w metodzie *rush*. Nie były to różnice istotne statystycznie. W badaniach laboratoryjnych istotny wzrost stężenia po podaniu dawki początkowej w porównaniu z wartościami przed jej podaniem dotyczył tryptazy i tetranor-PGD-M u dzieci leczonych protokołem *rush*. Wzrost stężenia tryptazy odnosił się do całej grupy leczonych tą metodą, grupy z systemowymi objawami ubocznymi (SSR) przy stężeniu ekstraktu 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oraz grupy bez SSR, a po uwzględnieniu dodatkowych czynników rokowniczych także grupy uczulonych na jad pszczoły. Wzrost stężenia tetranor-PGD-M dotyczył wyłącznie dzieci leczonych ekstraktem jadu osy. Metoda

ultra-rush nie wpłynęła na istotną zmianę stężeń któregokolwiek z badanych markerów. Stężenia obu markerów po podaniu dawki wstępnej protokołami *rush* i *ultra-rush* nie różniły się istotnie.

Po przeanalizowaniu *ex post* parametrów odróżniających grupę dzieci, u których wystąpiła SSR po szczepieniu, od tych dobrze tolerujących szczepienie, istotnie wyższe wartości $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ zarówno w osoczu, jak i w moczu obserwowano u dzieci dobrze tolerujących leczenie.

Tryptaza była jedynym markerem, na którego wzrost w przebiegu immunoterapii protokołem *rush* oddziaływały dodatkowe czynniki rokownicze, odzwierciedlające stan pacjenta.

Tolerancja biologiczna ekstraktu alergenu jadu w fazie leczenia dawką podtrzymującą była dobra, u żadnego z dzieci nie obserwowano SSR. U 5 dzieci (19% spośród odczulanych ekstraktem jadu osy) doszło do 7 użądleń polnych przez osę, każde z nich o słabszym nasileniu niż reakcja kwalifikująca dziecko do leczenia. U jednego z tych dzieci użądlenie miało miejsce 3-krotnie (po 2, 4 i 24 miesiącach od rozpoczęcia leczenia dawką podtrzymującą), kolejne odczyny miejscowe były coraz mniejsze. Czas leczenia dawką podtrzymującą podawaną w odstępach co 4–6 tygodni przez okres 3 lat u dzieci, które rozpoczęły immunoterapię od protokołu *rush*, miał istotny wpływ na zmianę poziomu markerów aktywacji mastocytów. Istotne liniowe obniżenie stężenia dotyczyło tryptazy i $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ w osoczu u dziewczynek odczulanych ekstraktem jadu pszczoły oraz $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ w osoczu u dziewczynek odczulanych ekstraktem jadu osy. Przymuszczalnie odzwierciedla to spadek reaktywności lub nawet zmniejszenie puli komórek tucznych w procesie leczenia. U chłopców odczulanych jadem osy stwierdzono odwrotną reakcję – istotnego wzrostu stężenia $9\alpha, 11\beta$ -PGF₂ w moczu, co nawiązuje do obserwacji wyższych stężeń metabolitu w grupie kontrolnej i u dzieci bez SSR w trakcie protokołu dawki szybkiej i możliwości działania „protekcynowego” podwyższonych stężeń tych metabolitów. Różnice w zachowaniu markerów wynikające z płci mogą być związane z aktywnością hormonalną. Tetranor-PGD-M nie wykazywał dynamiki w czasie leczenia dawką podtrzymującą, ale był jedynym markerem, który korelował z wywiadem wstrząsu anafilaktycznego po użądleniu.

Dodatkowo wiele czynników, jak wiek pierwszego użądlenia, wiek kwalifikacji do leczenia, liczba użądleń przed leczeniem oddziaływało, każdy z nich niezależnie, na zachowanie markerów aktywacji mastocytów w odpowiedzi na leczenie dawką podtrzymującą. Najwięcej z nich miało wpływ modulujący na dynamikę stężeń tryptazy w obu grupach uczulonych. Nie było jednolitego wzorca ich oddziaływań.

Dodatkowym czynnikiem, który należy wziąć pod uwagę, jest jakość życia dzieci mających alergię z objawami potencjalnie zagrażającymi życiu. Najwyższy poziom lęku, obserwowany w grupie dzieci najmłodszych, może uzasadniać ich leczenie, nawet jeśli systemowa reakcja jest ograniczona tylko do skóry.

Wnioski:

1. Protokoły szybki (*rush*) i bardzo szybki (*ultra-rush*) nie różnią się bezpieczeństwem mierzonym częstością występowania systemowych objawów ubocznych w ich przebiegu, choć obserwowane nieistotne różnice wymagają weryfikacji w badaniach obejmujących większą grupę pacjentów. Stopień ciężkości objawów po użądleniu nie wykazuje wpływu na przebieg immunoterapii dawką początkową bez względu na rodzaj protokołu.

2. W leczeniu dawką początkową protokół *rush* wiąże się z istotnym zwiększeniem stężeń wybranych markerów aktywacji mastocytów, choć oba protokoły nie różnią się w zakresie ich stężeń końcowych. Wydaje się zatem, że u dzieci z podwyższonym podstawowym stężeniem tryptazy korzystniejszy może być protokół *ultra-rush*.
3. W leczeniu dawką podtrzymującą dochodzi do istotnych zmian w dynamice wybranych markerów aktywacji komórek tucznych, zmiany te pozostają w związku z czasem leczenia i płcią dziecka.
4. Przy podejmowaniu decyzji terapeutycznych dotyczących wyboru protokołu początkowego i czasu leczenia dawką podtrzymującą powinno się uwzględnić dodatkowe czynniki rokownicze, takie jak wiek, w którym doszło do pierwszego użądlenia, wiek kwalifikacji do immunoterapii oraz liczba użądleń, gdyż w procesie leczenia wykazują one silniejszy związek z zachowaniem niektórych markerów aktywacji mastocytów niż uznane badania diagnostyczne, jak swoiste IgE w surowicy i testach skórnych.
5. Głównym markerem reagującym w procesie leczenia na dodatkowe czynniki rokownicze jest tryptaza, co uzasadnia wprowadzenie oznaczenia jej stężenia do obowiązującego panelu badań.
6. Podanie dawki początkowej według protokołu *rush* prowadzi do szybkiego zwiększenia tolerancji na alergen po użądleniu polnym w fazie leczenia dawką podtrzymującą.
7. Dzieci uczulone (łącznie – te wymagające immunoterapii, przed jej rozpoczęciem oraz te niewymagające leczenia) nie różnią się od dzieci zdrowych w zakresie podstawowych stężeń markerów aktywacji mastocytów (z wyjątkiem stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ w moczu). Podobnie dzieci wymagające immunoterapii, przed jej rozpoczęciem, nie różnią się istotnie pod względem podstawowych stężeń tych markerów od dzieci niewymagających leczenia.

9. ABSTRACT

The objective of the report is the assessment of biological response to allergen extract of bee venom and *Vespula* venom, employing both incremental dose of venom immunotherapy administered following the *rush* protocol (the cumulative dose of 216.46–223.32 µg) or the *ultra-rush* protocol (the cumulative dose of 101.11 µg) and during a 3-year maintenance dose therapy in children fulfilling the qualification criteria to venom immunotherapy (a II°-IV° systemic reaction following a sting in medical history with IgE-dependent background). The treatment was carried out in a clinical setting.

Laboratory tests were carried out to determine tryptase and PGD₂ metabolites levels in the plasma (9α,11β-PGF₂) and urine (9α,11β-PGF₂ and tetranor-PGD-M) as the most specific markers of mast cell activation. The assessment was carried out prior to treatment, comparing the values achieved in the experimental group, children not qualified for immunotherapy, and the controls. During the treatment, the timing of material collection was selected in such a way as to capture the highest concentration of the studied compounds, or in other words immediately after completion of the incremental dose protocol and in yearly intervals prior to and after maintenance dose administration. Tryptase was determined by the fluoroenzymatic method using an ImmunoCAP kit, while PGD₂ metabolites were assessed by gas chromatography-mass spectrometry-negative ion chemical ionization (GC-MS-NICI) recognized as the golden standard of such determinations. The results were statistically analyzed by linear regression based on the *random effects models* method that takes into consideration the panel character of the data, what allows for avoiding systematic estimation errors.

The baseline values of the markers did not discriminate between children on immunotherapy and children that did not meet the qualification criteria; the only significant difference consisted in a higher concentration value of 9α,11β-PGF₂ in the controls.

Seven children (12.5%) manifested systemic side effects while receiving incremental dose of venom therapy in keeping with the *rush* protocol. None of the children treated according to the *ultra-rush* protocol showed any systemic adverse effects and the local reactions at the site of extract administration were smaller as compared to those occurring while employing the *rush* method. The differences were not statistically significant. Laboratory tests demonstrated a significant increase of tryptase and tetranor-PGD-M concentration values after incremental dose administration as compared to pre-administration levels in children treated using the *rush* protocol. The increase of tryptase levels was seen in the entire group of patients treated using this protocol, in the group manifesting systemic side reactions (SSR) at the extract concentration of 100 µg/ml and in

the non-SSR group; when additional prognostic factors were taken into consideration, the above increase was observed in particular in children allergic to bee venom. The increase of tetranor-PGD-M level was noted solely in children treated with *Vespula* venom extract. The *ultra-rush* method was not associated with a significant change in the concentration of any of the investigated markers. The levels of both markers following incremental dose venom therapy administered in keeping with either the *rush* or *ultra-rush* protocols showed no significant differences.

Having analyzed „ex post” the parameters that discriminated between the group of children that developed SSR and patients who tolerated the therapy well, the author noted significantly higher $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ values both in the plasma and urine of children with good toleration of the treatment.

Tryptase was the only marker the increase of which was affected during the *rush* protocol immunotherapy by additional prognostic factors that reflected the condition of the patient.

Biological tolerance of venom allergen extract in patients treated by maintenance doses was good; none of the children manifested systemic side effects. Five children (19%) undergoing desensitization employing *Vespula* venom extract were subject to seven field wasp stings, each of the stings being lower in intensity as compared to the reaction that qualified the child for therapy. One of these patients was stung three times (after 2, 4 and 24 months following the initiation of maintenance dose therapy); the subsequent local reactions were increasingly weaker. The duration of maintenance therapy with the doses administered every 4–6 weeks for 3 years in children that started immunotherapy in keeping with the *rush* protocol significantly affected the level of mast cell activation markers. A significant linear concentration decrease was noted in tryptase and $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ levels in girls desensitized with bee venom extract and in serum $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ values of girls desensitized with *Vespula* venom extract. Most likely, this phenomenon reflects a decrease of reactivity or even a decrease of the pool of mast cells in the course of the therapeutic process. In boys desensitized with *Vespula* venom, a reverse reaction was observed, i.e. a significant increase of urinary $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ concentration levels, what corresponds to the observation of higher levels of the metabolite in the controls and in non-SSR children in the course of treatment in keeping with the *rush* protocol and to the possibility of a “protective” action of elevated concentration values of the metabolites and their “waking” status. Gender-associated differences in marker behavior may be related to hormonal activity. Tetranor-PGD-M did not demonstrate any dynamics in the course of maintenance dose therapy, but was the only marker that correlated with the history of anaphylactic shock following a sting.

In addition, numerous factors, such as age at the first sting, age at qualification for treatment and number of stings prior to treatment independently affected the behavior of mast cell activation markers in response to maintenance dose therapy. The highest number of factors exerted a modulatory effect on the dynamics of tryptase concentration levels in both groups of venom-allergic children. There was no uniform pattern of their effects.

An additional factor that should be taken into consideration is the quality of life of children who are potentially venom-allergic what potentially poses a risk to their lives. The highest anxiety level observed in the group of youngest children may justify their being subjected to treatment even when the systemic reaction is limited to skin only.

Conclusions:

1. Both *rush* and *ultra-rush* protocols don't differ in safety measured by the number of systemic side effects, though the statistically insignificant differences, which were observed, require to be confirmed in larger group of patients. The degree of severity of post-sting reaction is not a predictor of outcome regardless the kind of protocol.
2. The *rush* protocol is associated with a significant increase in concentration values of mast cell activation markers, in spite of the fact that both protocols do not differ in their end-point concentrations of the markers. In case of children with elevated baseline serum tryptase the *ultra-rush* protocol might be more convenient.
3. Maintenance dose therapy results in dynamic changes of some mast cell markers. The time of treatment and gender play an important role in changing the reactivity of mast cells in the course of treatment.
4. At making therapeutic decisions on the selection of incremental therapy protocol and the duration of maintenance dose therapy, the additional prognostic factors, such as age at the first sting, age at qualification for immunotherapy and number of stings, should be taken into consideration, as in the course of therapy they demonstrate a more potent association with the behavior of the certain markers than well-recognized diagnostic tests, such as sIgE in serum and intradermal tests.
5. The principal marker that reacts in the course of therapy to additional prognostic factors is tryptase, what justifies introducing tryptase determinations to the obligatory panel of tests.
6. If the incremental dose was administered in keeping with the *rush* protocol, it results in a prompt increase of tolerance after field stings.
7. Sensitized children (both treated and non-treated with immunotherapy) do not differ from the controls in the baseline concentration values of mast cell activation markers apart from urinary $9\alpha,11\beta$ -PGF₂. Neither do these that require immunotherapy and those that do not meet its criteria.

PIŚMIENNICTWO

1. Bilo B.M., Bonifazi F.: Epidemiology of insect-venom anaphylaxis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2008; 8: 330–337.
2. Bilo B.M., Ruëff F., Mosbech H., Bonifazi F., Oude-Elberink J.N.G., Birnbaum J., Bucher C., Forster J., Hemmer W., Incorvaia C., Kontou Fili K., Gawlik R., Müller U., Fernandez J., Jarish R., Jutel M., Wüthrich B.: Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. EAACI Position Paper. *Allergy* 2005; 60: 1330–1349.
3. Bilo B., Bonifazi F.: The natural history and epidemiology of insect venom allergy: clinical implications. *Clin. Exp. Allergy* 2009; 39: 1467–1476.
4. Schafer T.: Epidemiologie der Insektengiftallergie. *Allergo J.* 2009; 18: 353–358.
5. Novembre E., Cianferoni A., Bernardini R., Veltroni M., Ingargiola A., Lombardi E., Vicerucci A.: Epidemiology of insect venom sensitivity in children and its correlation to clinical and atopic features. *Clin. Exp. Allergy* 1998; 28: 834–838.
6. de Svert L.F.A., Bullens D., Raes M., Dermaux A.M.: Anaphylaxis in referred pediatric patients: demographic and clinical features, triggers and therapeutic approach. *Eur. J. Pediatr.* 2008; 167: 1251–1261.
7. Mehl A., Wahn U., Niggemann B.: Anaphylactic reactions in children – a questionnaire-based survey in Germany. *Allergy* 2005; 60: 1440–1445.
8. de Silva I.L., Mehr S.S., Tey D., Tang M.L.K.: Paediatric anaphylaxis: a 5 year retrospective review. *Allergy* 2008; 63: 1071–1076.
9. Soar J., Pumphrey R., Cant A., Clarke S. Corbett A., Dawson P., Ewan P., Foex B., Gabbott D., Griffiths M., Hall J., Harper N., Jewkes F., Maconochie I., Mitchell S., Nasser S., Nolan J., Rylance G., Sheikh A., Unsworth D.J., Warrell D., Working Group of the Resuscitation Council (UK): Emergency treatment of anaphylactic reactions – guidelines for healthcare providers. *Resuscitation* 2008; 77: 157–169.
10. Nittner-Marszalska M., Liebhart J., Małolepszy J.: Results of research on the prevalence of allergic reaction to hymenoptera venom in south-west Poland. *Pol. Arch. Wew.* 1998; 100: 245–251.
11. Nittner-Marszalska M., Liebhart J., Obojski A.: Comparison of prevalence of clinical symptoms of Hymenoptera allergy and its current immunological markers in the adults in Poland. *Med. Sci. Moni.* 2004; 10: 324–329.
12. Tomaszewska B.: Błonkoskrzydłe: ujęcie entomologa [w:] *Alergia na jad owadów błonkoskrzydłych*. [Red.] Nittner-Marszalska M., Oficyna wydawnicza Mediton, Łódź 2003.
13. Gawlik R.: Jad owadów błonkoskrzydłych i jego alergeny [w:] *Alergia na jad owadów błonkoskrzydłych*. [Red.] Nittner-Marszalska M., Oficyna wydawnicza Mediton, Łódź 2003.
14. Rybak M.: Pozyskiwanie jadu pszczelego poprzez stymulację elektryczną pszczół. *Praca doktorska* 2006. Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa. Oddział Pszczelnictwa w Puławach.
15. Brewczyński P.Z.: *Alergia na jad owadów błonkoskrzydłych*. Wyd. Silesia, Katowice 1994.

16. Hoffman D.R.: Structural biology of allergens from stinging and biting insects. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2008; 8: 338–342.
17. Chapman M., Pomes A., Breiteneder H., Ferreira F.: Nomenclature and structural biology of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 119: 414–420.
18. Alvarez-Cuesta E., Bousquet J., Canonica G.W., Durham S.R., Malling H.-J., Volovirta E.: Standards for practical allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 2006; 61 (suppl. 82): 1–20.
19. Hamilton R.G.: Diagnosis and treatment of allergy to hymenoptera venoms. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 10: 323–329.
20. Tome R., Somri M., Teszler C.B., Fradis M., Gaitini L.A.: Bee stings of children: when to perform endotracheal intubation? *Am. J. Otolaryng. – Head Neck Med. Surg.* 2005; 26: 272–274.
21. Sampson H.A., Munoz-Furlong A., Campbell R.L., Adkinson N.F. i wsp. : Second Symposium of a definition and management of anaphylaxis: summary report – Second National Institute of Allergy and Infectious Diseases/Food Allergy and Anaphylaxis Network Symposium. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117: 391–397.
22. Kounis NG.: Kounis syndrome (allergic angina and allergic myocardial infarction): a natural paradigm? *Int. J. Cardiol.* 2006; 110: 7–14.
23. Biteker M., Duran N.E., Biteker F.S., Civan H.A., Kaya H., Gokdeniz T., Yildiz M., Ozkan M.: Allergic myocardial infarction in childhood: Kounis syndrome. *Eur. J. Pediatr.* 2010; 169: 27–29.
24. Waldeyer W.: Ueber Bindegewebszellen. *Arch. Micros. Anat.* 1875; 11: 176.
25. Ehrlich P.: Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Thesis. University of Lipzig 1878.
26. Pajler G., Ronnberg E., Waern I., Wernersson S.: Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood* 2010; 115: 4981–4990.
27. Metcalfe D.D., Peavy R.D., Gilfillan A.M.: Mechanisms of mast cell signaling in anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 124: 639–646.
28. Berent-Maoz B., Piliponsky A.M., Daigle I., Simon H.-U., Levi-Schaffer F.: Human mast cells undergo TRAIL-induced apoptosis. *J. Immunol.* 2006; 176: 2272–2278.
29. Hsu F.I., Boyce J.A.: Biology of mast cells and their mediators [w:] *Allergy tom I. wyd. Middleton's Allergy principles and practice. Wydanie siódme. Mosby Elseviere* 2009.
30. Hakim-Rad K., Metz M., Mauer M.: Mast cells: makers and breakers of allergic inflammation. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 9: 427–430.
31. Frossi B., Gri G., Tripodo C., Pucillo C.: Exploring a regulatory role for mast cells: „MCregs”? *Trends Immunol.* 2010; 31: 97–102.
32. Silva I., Carvalho S., Pinto PL., Machado S., Rosado Pinto J.: Mastocytosis: a rare case of anaphylaxis in paediatric age and literature review. *Allergol. Immunopathol.* 2008; 36: 154–163.
33. Hofmann A.M., Abraham S.N.: New roles for mast cells in modulating allergic reactions and immunity against pathogens. *Curr. Opinion Immunol.* 2009; 21: 679–686.
34. Trivedi N.N., Caughey G.H.: Mast cell peptidases. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2010; 42: 257–267.
35. Simons F.E.R.: Anaphylaxis: recent advances in assessment and treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 124: 625–636.
36. Pejler G., Knight S.D., Henningsson F., Wernersson S.: Novel insight into the biological function of mast cell carboxypeptidase A. *Trends Immunol.* 2009; 30: 401–408.
37. Pawliczak R., Han C., Huang X.L., Demetris A.J., Shelhamer J.H., Wu T.: 85-kDa cytosolic phospholipase A2 mediates peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation in human lung epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 33153–33163.
38. Peebles R.S., Boyce J.A.: Lipid mediators of hypersensitivity and inflammation [w:] *Allergy tom I. wyd. Middleton's Allergy principles and practice. Wydanie siódme. Mosby Elseviere* 2009.

39. Bochenek G., Nagraba K., Gielicz A., Szczeklik A.: Prostaglandyna D₂: biosynteza, właściwości biologiczne i udział w astmie oskrzelowej. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2001; 1: 601–609.
40. Song W.L., Wang M., Ricciotti M., Freis S., Yu Y., Grosser T., Really M., Lawson J.A., Fitzgerald G.A.: Tetranor PGDM, an abundant urinary metabolite reflects biosynthesis of prostaglandin D₂ in mice and humans. *J. Biol. Chemistry* 2008; 283: 1179–1185.
41. Haegsstrom J.Z., Rinaldo-Matthis A., Wheelock C.E., Wettreholm A.: Advances in eicosanoids research, novel therapeutic implications. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2010; 396: 135–139.
42. Gilroy D.W.: Eicosanoids and endogenous control of acute inflammation resolution. *Int. J. Bioch. Cell Biol.* 2010; 42: 524–528.
43. Awad J.A., Morrow J.D., Roberts J.: Detection of the major urinary metabolite prostaglandin D₂ in the circulation. Demonstration of elevated levels in patients with disorders of systemic mast cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994; 93: 817–824.
44. Bochenek G., Niżankowska E., Gielicz A., Świerczyńska M., Szczeklik A.: Plasma 9alpha,11beta-PGF₂, a PGD₂ metabolite, as a sensitive marker of mast cell activation by allergen in bronchial asthma. *Thorax* 2004; 59: 459–464.
45. Nagakura T., Obata T., Shichijo K., Matsuda S., Sigimoto H., Yamashita K., Masaki T., Maekawa K.: GC/MS analysis of urinary excretion of 9alpha,11beta-PGF₂ in acute and exercise-induced asthma in children. *Clin. Exp. Allergy* 1998; 28: 129–133.
46. Misso N.L.A., Aggarwal S., Phelps S., Beard R., Thompson P.J.: Urinary leukotriene E₄ and 9alpha,11beta-PGF₂ concentrations in mild, moderate and severe asthma, and in healthy subjects. *Clin. Exp. Allergy* 2004; 34: 624–631.
47. Kiełbasa B., Moeller A., Sanak M., Hamacher J., Hutterli M., Ćmiel A., Szczeklik A., Wildhaber J.H.: Eicosanoids in exhaled breath condensates in the assessment of childhood asthma. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2008; 19: 660–669.
48. Ono E., Taniguchi M., Mita H., Fukutomi Y., Higashi N., Miyazaki M., Kumamoto T., Akiyama K.: Increased production of cysteinyl leukotriens and prostaglandin D₂ during human anaphylaxis. *Clin. Exp. Allergy* 2008; 39: 72–80.
49. Higashi N., Mita H., Ono E., Fukutomi Y., Yamaguchi H., Kajiwara K., Tanimoto H., Sakiya K., Akiyama K., Taniguchi M.: Profile of eicosanoids generation in aspirin-intolerant asthma and anaphylaxis assessed by new biomarkers. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 125: 1084–1091.
50. Hsu C.L., Neilsen C.V., Bryce P.J.: IL-33 is produced by mast cells and regulates IgE-dependent inflammation. *PLoS. One.* 2010; 5: 1–9.
51. Bonifazi F., Jutel M., Bilo B.M., Birnbaum J., Müller U. and the EAACI Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity: Prevention and treatment of Hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. *Allergy* 2005; 60: 1459–1470.
52. Moffitt J.E., Golden D.B., Reisman R.E., Lee R., Nicklas R.: Stinging insect hypersensitivity: a practice parameter update. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 114: 869–886.
53. Lieberman P., Nicklas R.A., Oppenheimer J., Kemp S.F., Lang D.M.: The diagnosis and management of anaphylaxis practice parameter: 2010 update. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 126: 477–480.
54. Muraro A., Roberts G., Clark A., Eigenmann P. A., Halken S., Lack G., Moneret-Vautrin A., Niggemann B., Rancé F., EAACI Task Force on Anaphylaxis in Children.: The management of anaphylaxis in childhood: position paper of the European academy of allergology and clinical immunology. *Allergy* 2007; 62: 857–871.
55. Cox L., Nelson H., Lockey R.: Allergen immunotherapy: a practice parameter third update. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 127 (suppl.): S1–S55.
56. Goldberg A., Confino-Cohen R.: Timing of venom skin tests and IgE determinations after insect sting anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997; 100: 182–184.
57. Smorawska-Sabanty E., Kowalski M.L.: Stopniowane postępowanie diagnostyczne dla potwierdzenia alergii na jad owadów błonkoskrzydłych. *Alergia Astma Immunologia* 2008; 13: 227–241.

58. Przybilla B., Ruëff F.: Hymenoptera venom allergy. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 2010; 8: 114–127.
59. Williams P., Sewell W.A.C., Bunn C., Pumphrey R., Read G., Jolles S.: Clinical immunology review series: an approach to the use of the immunology laboratory in the diagnosis of clinical allergy. *Clin. Exp. Immunol.* 2008; 153: 10–18.
60. Straumann F., Buchar C., Wüthrich B.: Double sensitization to honeybee and wasp venom: immunotherapy with one or with both venoms? Value of FEIA inhibition for the identification of the cross-reacting IgE antibodies in double-sensitized patients to honeybee and wasp venom. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2000; 123: 268–274.
61. Müller U.R., Johansen N., Petersen A.B., Fromberg-Nielsen J., Haeberli G.: Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and vespula venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy* 2009; 64: 543–548.
62. Ruëff F., Przybilla B., Bilo M.B., Müller U., Scheipl F., Aberer W., Birnbaum J., Bodzenta-Lukaszyk A., Bonifazi F., Bucher C., Campi P., Darsow U., Egger C., Haeberli G., Hawranek T., Kucharewicz I., Kuchenhoff H., Lang R., Quercia O., Reider N., Severino M., Sticherling M., Sturm G.J., Wüthrich B.: Predictors of severe systemic anaphylactic reactions to patients with hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase – a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 124: 1047–1054.
63. Ruëff F., Przybilla B., Bilo M.B., Müller U., Scheipl F., Aberer W., Birnbaum J., Bodzenta-Lukaszyk A., Bonifazi F., Bucher C., Campi P., Darsow U., Egger C., Haeberli G., Hawranek T., Kucharewicz I., Kuchenhoff H., Lang R., Quercia O., Reider N., Severino M., Sticherling M., Sturm G.J., Wüthrich B.: 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: 105–111.
64. 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: 680–686.
65. Akin C.: Anaphylaxis and mast cell disease: what is the risk. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2010; 10: 34–38.
66. Ahmad N., Evans P., Lloyd-Thomas A.R.: Anesthesia in children with mastocytosis – a case based review. *Paediatr. Anaesth.* 2009; 19: 97–107.
67. Anafilaksja. Stanowisko Panelu Ekspertów Polskiego Towarzystwa Alergologicznego. [Red.] Kruszewski J. Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, Warszawa 2009.
68. Kemp S.F., Lockey R.F., Simons F.E.R.: Epinephrine: the drug of choice for anaphylaxis. A statement of the World Health Organization. Position paper. *Allergy* 2008; 63: 1061–1070.
69. Sheikh A., Shehata Y.A., Brown S.G.A., Simons F.E.R.: Adrenaline for treatment of anaphylaxis: Cochrane systemic review. *Allergy* 2009; 64: 204–212.
70. Ross R.N., Nelson H.S., Finegold I.: Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of Hymenoptera venom hypersensitivity: a meta-analysis. *Clin. Therapeutics* 2000; 22: 351–357.
71. Tse Y., Rylance G.: Emergency management of anaphylaxis in children and young people: new guidance from the Resuscitation Council (UK). *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* 2009; 94: 97–107.
72. Simons F.E.R., Arduso L.R.F., Bilo M.B., El-Gamal Y.M., Ledford D.K., Ring J., Sanchez-Borges M., Senna G.E., Sheikh A., Thong B.Y.: World Allergy Organization Guidelines for the assessment and management of anaphylaxis. *World Allergy Organization J.* 2011; 4: 13–37.
73. Barg W.: Postępowanie w reakcjach na jad owadów błonkoskrzydłych [w:] *Alergia na jad owadów błonkoskrzydłych.* [Red.] Nittner-Marszalska M., Oficyna Wydawnicza Mediton, Łódź 2003.

74. Graaf D.C., Aerts M., Danneels E., Devreese B.: Bee, wasp and ant venomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy. *J. Proteom.* 2009; 72:145–154.
75. Gawlik R.: Długofalowa skuteczność swoistej immunoterapii na jad owadów. *Pol. Merkur. Lekarski* 2003; 14: 703–704.
76. Watanabe A., Fonseca L., Galvao C., Kalil J., Castro F.: Specific immunotherapy using Hymenoptera venom: systemic review. *Sao Paulo Med. J.* 2010; 128: 30–37.
77. Golden D.B.K., Kagey-Sobotka A., Lichtenstein L.: Survey of patients after discontinuing venom immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000; 105: 385–390.
78. Oude-Elberink J.N.G., de Monchy J.G.R., van der Heide S., Guyatt G.H., Dubois A.E.J.: Venom immunotherapy improves health-related quality of life in patients allergic to yellow jacket venom. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 110: 174–182.
79. Golden D.B.K., Kelly D., Hamilton R.G., Craig T.J.: Venom immunotherapy reduces large local reactions to insect stings. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 123: 1386–1390.
80. Severino M.G., Cortellini G., Bonadonna P., Francescato E., Panzini I., Macchia D., Campi P., Spadolini I., Canonica W.G., Passalacqua G.: Sublingual immunotherapy for large local reactions caused by honeybee sting: a double-blind, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008; 122: 44–48.
81. Ruëff F., Bilò M.B., 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: 272–273.
82. Cichočka-Jarosz E., Brzyski P., Bręborowicz A., Bodzenta-Łukaszyk A., Chełmińska M., Dąbrowski A., Gawlik R., Gąszczyk G., Grycmacher-Łatwo V., Jahnz-Różyk K., Jedynek-Wąsowicz U., Jutel M., Klajna-Kraluk B., Kowalski M. L., Kruszewski J., Kuna P., Kwaśniewski A., Kycler Z., Lange J., Lis G., Małaczyńska T., Nittner-Marszalska M., Pałgan K., Pietraszek-Mamcarz J., Pietrzyk J. J., Poszwiński A., Pulka G., Stobiecki M., Świebocka E., Trębas-Pietras E., Zakrzewska M., Zaryczański J.: Porównanie praktyki w postępowaniu z dorosłymi i dziećmi uczulonymi na jad owadów błonkoskrzydłych w Polsce. *Alergia Astma Immunologia* 2010; 15: 86–91.
83. Akdis C.A., Blaser K.: IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. *FASEB* 1999; 13: 603–609.
84. Jutel M., Akdis M., Budak F., Aebischer-Casaulta C., Wrzyszczyk M., Blaser A., Akdis C.A.: IL-10 i TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* 2003; 33: 1205–1214.
85. Wu K., Bi Y., Sun K., Xia J., Wang Y., Wang C.: Suppression of allergic inflammation by allergen-DNA-modified dendritic cells depends on the induction of Foxp3+ regulatory T cells. *Scand. J. Immunol.* 2008; 67: 140–151.
86. Gri G., Piconese S., Frossi B., Manfroi V., Merluzzi S., Tripodo C., Viola A., Odorn S., Rivera J., Colombo M.P., Pucillo C.E.: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity* 2008; 29: 771–781.
87. James L.K., Durham S.R.: Update on mechanisms of allergen injection immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy* 2008; 38: 1074–1088.
88. Pilette C., Nouri-Aria K.T., Jacobson M.R., Wilcock L.K., Detry B., Walker S.M., Francis J.N., Durham S.R.: Grass pollen immunotherapy induces an allergen specific IgA2 response associated with mucosal TGF-beta expression. *J. Immunol.* 2007; 178: 4658–4666.
89. Akkoc T., Akdis M., Akdis C.A.: Update in the mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2011; 3: 11–20.
90. Jutel M., Akdis C.A.: T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy. *Chem. Immunol. Allergy* 2008; 94: 158–177.
91. Pereira-Santos M.C., Baptista A.P., Melo A., Alves R.R., Soares R.S., Pedro E., Pereira-Barbosa M., Victorino R.M.M., Sousa A.E.: Expansion of circulating Foxp3+CD25^{bright}CD4+ T cells during specific venom immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy* 2007; 38: 291–297.

92. Akdis C.P., Akdis M.: Mechanism and treatment of allergic diseases in the big picture of regulatory cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 123: 735–746.
93. Bussmann C., Xia J., Allam J.-P., Maintz L., Novak N.: Early markers for protective mechanisms during rush venom immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy* 2010; 65: 1558–1565.
94. Ruëff F., Przybilla B., Müller U., Mosbech H.: The sting challenge test in hymenoptera venom allergy. Position paper of the Subcommittee on insect venom allergy of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1996; 51: 216–225.
95. 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. *Allergy* 2010; 125:1269–1278.
96. Nittner-Marszalska M., Bant A., Bodzenta-Lukaszyk A., Bręborowicz A., Cichocka-Jarosz E., Jassem E., Kuna P., Kruszewski J., Rogala B., Szymański W., Tworek D., Wilde J., Zakrzewska M., Zakrzewski A.: Próba prowokacyjna żywym owadem w alergii na jad owadów błonkoskrzydłych. Stanowisko Grupy Ekspertów Polskiego Towarzystwa Alergologicznego. *Alergia Astma Immunologia* 2010; 15: 70–74.
97. Standardy w alergologii. Stanowiska Panelów Ekspertkich Polskiego Towarzystwa Alergologicznego. [Red.] Kruszewski J., Kowalski M.L., Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, Kraków 2010.
98. Obata T., Nagakura T., Kammuri M., Masaki T., Maekawa K., Yamashita K.: Determination of $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ in human urine and plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1994; 655: 173–178.
99. Lindsey, J.K.: Models for Repeated Measurements. Oxford University Press, Oxford, UK, 1999.
100. StataCorp. 2011. Statistical Software: Release 11. College Station, TX: Stata Corporation.
101. 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* 2011; 66: 222–228.
102. Schubert K.C., Lichtenstein L.M., Kagey-Sobotka A., Szklo M., Kwitrovich K.A., Valentine M.D.: An epidemiologic study of insect allergy in children. I. Characteristics of a disease. *J. Pediatrics* 1982; 100: 546–551.
103. Martinez-Canavate A., Tabar A.I., Eserverri J.L., Martin F., Pedemonte-Marco C.: An epidemiological survey of hymenoptera venom allergy in the Spanish paediatric population. *Allergol. Immunopathol. (Madr)* 2010; doi: 38; 263–265.
104. Carballada F., Boquete M., Nunez R., Lombardero M., de la Torre F.: Follow-up of venom immunotherapy (VIT) based on conventional techniques and monitoring of immunoglobulin E to individual venom allergens. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2010; 20: 506–513.
105. Fernandez J., Blanca M., Soriano V., Sanchez J., Juarez C.: Epidemiological study of the prevalence of allergic reactions to Hymenoptera in a rural population in the Mediterranean area. *Clin. Exp. Allergy* 1999; 29: 1069–1074.
106. Müller U.R.: Bee venom allergy in beekeepers and their family members. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 5: 343–347.
107. Golden D.B., Marsch D.G., Kagey-Sobotka A., Freidhoff L., Szklo M., Valentine M.D., Lichtenstein L.M.: Epidemiology of insect venom sensitivity. *JAMA* 1989; 262: 240–244.
108. Liew W.K., Williamson E., Tang M.L.K.: Anaphylaxis fatalities and admissions in Australia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 123: 434–442.
109. Pumphrey R.S.H., Gowland M.H.: Further fatal allergic reactions to food in the United Kingdom 1999–2006. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 119: 1018–1019.
110. Schafer T., Przybilla B.: IgE antibodies to hymenoptera venoms in the serum are common in the general population and are related to indications of atopy. *Allergy* 1996; 51: 372–377.
111. Müller U.R.: Cardiovascular disease and anaphylaxis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 7: 337–341.

112. Bilo M.B., Bonifazi F.: Advances in hymenoptera venom immunotherapy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol* 2007; 7: 567–573.
113. Øymar K., Aksnes L.: Urinary 9alpha,11beta-prostaglandin F (2) in children with atopic eczema/dermatitis syndrome: an indicator of mast cell activation? *Acta Derm. Venerol.* 2004; 84: 359–362.
114. Tsikas D.: Application of gas chromatography mass spectrometry and gas chromatography tandem mass spectrometry to assess *in vivo* synthesis of prostaglandins, thromboxane, leukotrienes, isoprostanes and related compounds in humans. *J. Chromatogr. B* 1998; 717: 201–245.
115. Siuzdak G.: An introduction to mass spectrometry ionization: an excerpt from the expanding role of mass spectrometry in biotechnology, 2nd ed, MCC Pres: San Diego 2005. *JALA* 2004; 9: 50–63.
116. Dugas-Breit S., Przybilla B., Schopf P., Ruëff F.: Possible circadian variation of serum mast cell tryptase concentration. *Allergy* 2005; 60: 689–692.
117. Komarow H.D., Hu Z., Brittain E., Uzzman A., Gaskins D., Metcalfe D.: Serum tryptase levels in atopic and nonatopic children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 124: 845–847.
118. Potier A., Lavigne C., Chappard D., Verret J.L., Chevailler A., Nicolie B., Drouet M.: Cutaneous manifestation in Hymenoptera and Diptera anaphylaxis: relationship with basal serum tryptase. *Clin. Exp. Allergy* 2009; 39: 717–725.
119. Simons F.E.R.: Anaphylaxis, killer allergy: long-term management in the community. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 117: 367–377.
120. Kucharewicz I., Bodzenta-Łukaszyk A., Szymański W., Mroczo B., Szmitkowski M.: Basal serum tryptase level correlates with severity of hymenoptera sting and age. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2007; 17: 65–69.
121. Amon U., Hartmann K., Horny H.P., Nowak A.: Mastocytosis – an update. *J. Dtschc. Dermatol. S.* 2010; 8: 695–711.
122. Niedoszytko B., Niedoszytko M., Lange M., van Doormaal J., Gleń J., Zabłotna M., Renke V., 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: 287–294.
123. Pettigrew H.D., Teuber S.S., Kong J.S., Gershwin M.E.: Contemporary challenges in mastocytosis. *Clin. Rev. Allerg. Immunol.* 2010; 38: 125–134.
124. Dugas-Breit S., Przybilla B., Dugas M., Arnold A., Pfundstein G., Kuchenhoff H., Ruëff F.: Serum concentration of baseline mast cell tryptase: evidence for decline during long-term immunotherapy for Hymenoptera venom allergy. *Clin. Exp. Allergy* 2009; 40: 643–649.
125. Guenova E., Volz T., Eichner M., Hoetzenecker W., Caroli U., Griesinger G., Burow G., Mitev V., Biedermann T.: Basal serum tryptase as risk assessment for severe Hymenoptera sting reaction in elderly. *Allergy* 2010; 65: 919–923.
126. Cichočka-Jarosz E., Sanak M., Szczeklik A., Brzyski P., Gielicz A., Pietrzyk J.J.: Serum tryptase level is better predictor of systemic side effects during venom specific immunotherapy in children than PGD₂ metabolites. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2011; 21 (4): 260–269.
127. Sargur R., Cowley D., Murg S., Wild G., Green K., Shrimpton A., Egner W.: Raised tryptase without anaphylaxis or mastocytosis: heterophilic antibody interference in the serum tryptase assay. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 163: 339–345.
128. Müller U.R., Jutel M., Reimers A., Zumkehr J., Huber C., Kriegel C., Steiner U., Haerberli G., Akdis M., Helbling A., Schnyder B., Blaser K., Akdis C.: Clinical and immunological effects of H1 antihistamine preventive medication during honeybee venom immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008; 122: 1001–1007.
129. Müller U., Hari Y., Berchtold E.: Premedication with antihistamines may enhance efficacy of specific-allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 107: 81–86.

130. Górska L., Chełminska M., Kuziemski K., Skrzypski M., Niedoszytko M., Damps-Konstańska 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: 241–245.
131. Pasaoglu G., Sin B.A., Misirligil Z.: Rush hymenoptera venom immunotherapy is efficacious and safe. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2006; 16: 232–238.
132. Sturm G., Kraanke B., Rudolph C., Aberer W.: Rush Hymenoptera venom immunotherapy: a safe and practical protocol for high-risk patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 110: 928–933.
133. Mosbech H., Müller U.: Side-effects of insect venom immunotherapy: results from an EAACI multicenter study. *Allergy* 2000; 55: 1005–1010.
134. Birnbaum J., Charpin D., Vervloet D.: Rapid hymenoptera venom immunotherapy: comparative safety of three protocols. *Clin. Exp. Allergy* 1993; 23: 226–230.
135. Youlten L.J., Atkinson B.A., Lee T.H.L The incidence and nature of adverse reactions to injection immunotherapy in bee and wasp venom allergy. *Clin. Exp. Allergy* 1995; 25: 159–165.
136. Reimers A., Hari Y., Müller U.: Reduction of side-effects from ultrarush immunotherapy with honeybee venom by pretreatment with fexofenadine: a double-blind, placebo-controlled trial. *Allergy* 2000; 55: 484–488.
137. Brockow K., Kiehn M., Riethmuller C., Vieluf D., Berger J., Ring J.: Efficacy of antihistamine pretreatment in the prevention of adverse reactions to Hymenoptera immunotherapy: a prospective, randomized, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997; 100: 458–463.
138. Westall G.P., Thien F.C., Czarny D., O'Hehir R.E., Douglas J.A.: Adverse events associated with rush hymenoptera venom immunotherapy. *Med. J. Aust.* 2001; 174: 227–230
139. Steiss J.O., Huls G., Gortner L., Lindermann H.: A modified ultra-rush-protocol of allergen immunotherapy in children and adolescents with insect venom allergy. *Klin. Padiatr.* 2004; 216: 79–82.
140. Sanchez-Machin I., Moreno C., Gonzales R., Iglesias-Souto J., Perez E., Matheu V.: Safety of a 2-visit cluster schedule of venom immunotherapy in outpatients at risk of life-threatening anaphylaxis. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2010; 20: 89–92.
141. O'Sullivan S., Mueller M.J., Dahlen S-E., Kumlin M.: Analyses of prostaglandin D₂ metabolites in urine: comparison between enzyme assay and negative ion chemical ionization gas chromatography mass-spectrometry. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 1999; 57: 149–465.
142. Mastalerz L., Sanak M., Gawlewicz-Mroccka M., Gielicz A., Ćmiel A., Szczeklik A.: Prostaglandin E2 systemic production in patients with asthma with and without aspirin hypersensitivity. *Thorax* 2008; 63: 27–34.
143. Vadas P., Gold M., Perelman B., Liss G.M., Lack G., Blyth T., Simons F.E., Simons K.J., Cass D., Yeung J.: Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358: 28–35.
144. Zanonato S., Carrao G., Gottardi G., Rusalen F., Alinovi R., Corradi M., Baraldi E.: Dissociation between biological and clinical response to oral challenge in children with food allergy. *Allergy Net* 2008; 63: 1405–1410.
145. Graft D.F., Golden D.B.K., Reisman R.E., Valentine M.D., Younginger J.W.: Position statement: the discontinuation of Hymenoptera venom immunotherapy. Report from Committee on Insects. *J. Allergy Clin. Immunol* 1998; 101: 573–575.
146. Graft D.F., Schuberth K.C., Kagey-Sobotka A., Kwiterovich K.A., Niv Y., Lichtenstein L.M., Valentine M.D.: Assessment of prolonged venom immunotherapy in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1987; 80: 162–166.
147. Lang R., Hawranek T.: Hymenoptera venom immunotherapy and field stings. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2006; 16: 224–231.

148. Modrzyński M., Mazurek H., Zawisza E.: Wyniki dodatkowych badań diagnostycznych u pacjentów uczulonych na roztocza kurzu domowego leczonych immunoterapią swoistą. *Przegl. Lek.* 2005; 62: 1337–1342.
149. Durham S.R., Emminger W., Kapp A., Colombo G., de Monchy J.G.R., Rak S., Scadding G.K., Andersen J.S., Riis B., Dahl R.: Long-term clinical efficacy in grass pollen-induced rhinoconjunctivitis after treatment with SQ-standardized grass allergy immunotherapy tablet. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 125: 131–138.
150. Schultze-Werninghaus C., Wahn U., Niggemann B.: Evaluation of the risk of anaphylactic reactions by wasp venom-extract challenges in children. *Pediatr. Allergy Immunol.* 1999; 10: 133–137.
151. Hauk P., Friedl K., Kaufmehl K., Urbanek R., Forster J.: Subsequent insect stings in children with hypersensitivity to hymenoptera. *J. Pediatr.* 1995; 126: 185–190.
152. Carballada-Gonzales F. J., Almirall M. C., Herrero A.M., De la Torre F., Boquet Paris M.: Hymenoptera venom allergy: characteristics, tolerance and efficacy of immunotherapy in the paediatric population. *Allergol. Immunopathol. (Madr)* 2009; 37: 111–115.
153. Borchers A.T., Keen C.L., Gershwin M.E.: Fatalities following allergen immunotherapy. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2004; 27: 147–158.
154. van der Linden P.G., Hack C.E., Struyvenberg A., van der Zwan J.K.: Insect-sting challenge in 324 subjects with a previous anaphylactic reaction: current criteria for insect-venom hypersensitivity do not predict the occurrence and the severity of anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994; 94: 151–191.
155. Horst M., Hejjaoui A., Horst V., Michel F.B., Bousquet J.: Double-blind, placebo-controlled rush immunotherapy with a standardized *Alternaria* extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1990; 85: 460–472.
156. Kohno Y., Minoguchi K., Oda N., Yokoe T., Yamashita N., Sakane T., Adachi M.: Effect of rush immunotherapy on airways inflammation and airways hyperresponsiveness after bronchoprovocation with allergen in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1998; 102: 927–934.
157. Mitsias D.I., Savvatinos S., Papadopoulos N.G.: An insight into the early mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Immunotherapy* 2011; 3: 333–336.
158. Ruëff F., Wenderoth A., Przybilla B.: Patients still reacting to a sting challenge while receiving conventional Hymenoptera venom immunotherapy are protected by increased doses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 108: 1027–1032.
159. 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. Eng. J. Med.* 2004; 351: 668–674.
160. Elremeli M., Bulsara M.K., Daniels M., Boyle R.J.: Venom immunotherapy for preventing allergic reactions to insect stings. *Cochrane database of systemic reviews* 2010, Issue 11, DOI: 10.1002/14651858.CD008838.
161. Konstantinou G.N., Manoussakis E., Douladiris N., Hatzioannou A., Giavi S., Saxoni-Papageorgiou P., Papadopoulos N.G.: A 5-year venom immunotherapy protocol with 50 µg maintenance dose: safety and efficacy in school children. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2011; DOI: 22(4): 393–397.
162. Houlston L., Nolan R., Noble V., Pascoe E., Hobday J., Loh R., Mallon D.: Honey bee venom immunotherapy in children using a 50 µg maintenance dose. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127: 98–99.
163. Chen W., Mempel M., Schober W., Behrendt H., Ring J.: Gender difference, sex hormones, and immediate type hypersensitivity reactions. *Allergy* 2008; 63: 1418–1427.
164. Speiran K., Bailey D.P., Fernando J., Macey M., Barnstein B., Kolawole M., Curley D., Watowich S.S., Murray P.J., Oskeritzian C., Ryan J.J.: Endogenous suppression of mast cell development and survival by IL-4 and IL-10. *J. Leukocyte Biol.* 2009; 85: 826–836.

165. Gonzales F.J., Almirall M.C., Herrero A.M., De la Torre F., Paris M.B.: Hymenoptera venom allergy: characteristics, tolerance and efficacy of immunotherapy in the pediatric population. *Allergol. Immunopathol. (Madr.)* 2009; 37: 111–115.
166. Urbanek R., Forster J., Kuhn W.: Discontinuation of bee venom immunotherapy in children and adolescents. *J. Pediatr.* 1985; 107: 367–371.
167. Graft D.F., Schuberth K.C., Kagey-Sobotka A., Kwitnerovich K.A., Niv Y., Lichtenstein L.M., Valentine M.D.: The development of negative venom skin tests in children treated with venom immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1984; 73: 61–68.
168. Oude-Elberink J.N.G., Dubois A.E.J.: Quality of life in insect venom allergic patients. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 3: 287–293.
169. Oude-Elberink J.N.G., de Monchy J.G.R., Golden D.B.K., Brouwer J.L.P., Guyatt G.H., Dubois A.E.J.: Development and validation of a health-related quality-of-life questionnaire in patients with yellow jacket allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 109: 162–170.
170. Brzyski P., Cichočka-Jarosz E., Tobiasz-Adamczyk B., Lis G., Jedynek-Wąsowicz U., Pietrzyk J.J., Ordyk B., Profus K., Lange J., Zagórska W., Kulus M., Świebocka E., Kaczmarowski M., Małaczyńska T., Klajna-Kraluk B., Bręborowicz A., Kycler Z.: Adaptacja kwestionariuszy jakości życia dla dzieci z alergią na jad owadów oraz dla ich rodziców. *Przegl. Lek.* 2010; 67, 12: 1237–1242.
171. Cichočka-Jarosz E., Tobiasz-Adamczyk B., Brzyski P., Lis G., Jedynek-Wąsowicz U., Pietrzyk J.J., Ordyk B., Profus K., Lange J., Zagórska W., Kulus M., Świebocka E., Kaczmarowski M., Małaczyńska T., Świdzicka O., Bręborowicz A., Kycler Z.: Jakość życia warunkowana stanem zdrowia dzieci z alergią na jad owadów błonkoskrzydłych leczonych immunoterapią swoistą oraz jakość życia ich rodziców. *Przegl. Lek.* 2010; 67, 12: 1243–1248.

SPIS TABEL

Tabela 1.	Znane alergeny jadu pszczoły (<i>Apis mellifera</i>) i jadu osy (<i>Vespula vulgaris</i>).....	19
Tabela 2.	Protokół badania.....	38
Tabela 3.	Klasyfikacja reakcji ogólnoustrojowych po użądleniu przez owady według L.H. Muellera.....	40
Tabela 4.	Protokoły szybki (<i>rush</i>) i bardzo szybki (<i>ultra-rush</i>) odczulania dawką wstępną dwoma równoważnymi ekstraktami jadu	58
Tabela 5.	Zależność pomiędzy stopniem reakcji po użądleniu wg klasyfikacji Muellera a sIgE i testami skórnymi dla jadu pszczoły i jadu osy	61
Tabela 6.	Zależność pomiędzy stopniem reakcji po użądleniu wg klasyfikacji Muellera a markerami aktywacji mastocytów badanymi we krwi w grupie uczulonych na jad pszczoły i jad osy	62
Tabela 7.	Zależność pomiędzy stopniem reakcji po użądleniu wg klasyfikacji Muellera a markerami aktywacji mastocytów badanymi w moczu w grupie uczulonych na jad pszczoły i jad osy	62
Tabela 8.	Średnie wartości parametrów w grupie dzieci uczulonych zakwalifikowanych do immunoterapii swoistej i dzieci niespełniających kryteriów kwalifikacji do immunoterapii	63
Tabela 9.	Średnie wartości parametrów dzieci przed leczeniem immunoterapią swoistą z uwzględnieniem gatunku uczulającego owada i płci dziecka	64
Tabela 10.	Średnie wartości parametrów dzieci przed leczeniem immunoterapią swoistą z uwzględnieniem współwystępowania atopii	64
Tabela 11.	Charakterystyka kliniczna chłopców z systemowymi objawami ubocznymi (SSR) w trakcie immunoterapii dawką wstępną w metodzie szybkiej <i>rush</i>	66
Tabela 12.	Porównanie średnich podstawowych stężeń $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w moczu i surowicy w grupie dzieci z SSR w trakcie immunoterapii <i>rush</i> ekstraktem jadu pszczoły.....	67
Tabela 13.	Średnie wartości stężenia tryptazy ($\mu\text{g/l}$) przed i po leczeniu dawką wstępną <i>ultra-rush</i> vs <i>rush</i> u dzieci uczulonych na jad pszczoły.....	68

Tabela 14.	Zmienna opisywana: tryptaza. Model pełny	68
Tabela 15.	Zmienna opisywana: tryptaza. Model ostateczny	68
Tabela 16.	Średnie wartości stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w osoczu (pg/ml) przed i po leczeniu dawką wstępną <i>ultra-rush vs rush</i> u dzieci uczulonych na jad pszczoły	69
Tabela 17.	Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w osoczu. Model pełny.....	69
Tabela 18.	Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ . Model ostateczny.....	70
Tabela 19.	Średnie wartości stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w moczu (ng/mg kreatyniny) przed i po leczeniu dawką wstępną <i>ultra-rush vs rush</i> u dzieci uczulonych na jad pszczoły	70
Tabela 20.	Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w moczu. Model pełny	71
Tabela 21.	Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w moczu. Model ostateczny	71
Tabela 22.	Średnie wartości stężenia tetranor-PGD-M w moczu (ng/mg kreatyniny) przed i po leczeniu dawką wstępną <i>ultra-rush vs rush</i> u dzieci uczulonych na jad pszczoły	72
Tabela 23.	Zmienna opisywana: tetranor-PGD-M w moczu. Model pełny	72
Tabela 24.	Zmienna opisywana: tetranor-PGD-M w moczu. Model ostateczny.....	72
Tabela 25.	Średnie wartości stężenia tryptazy (μg/l) przed i po leczeniu dawką wstępną <i>ultra-rush vs rush</i> u dzieci uczulonych na jad osy	73
Tabela 26.	Zmienna opisywana: tryptaza. Model pełny	73
Tabela 27.	Zmienna opisywana: tryptaza. Model ostateczny	74
Tabela 28.	Średnie wartości stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w osoczu (pg/ml) przed i po leczeniu dawką wstępną <i>ultra-rush vs rush</i> u dzieci uczulonych na jad osy	74
Tabela 29.	Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w osoczu. Model pełny.....	75
Tabela 30.	Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w osoczu. Model ostateczny.....	75
Tabela 31.	Średnie wartości stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w moczu (ng/mg kreatyniny) przed i po leczeniu dawką wstępną <i>ultra-rush vs rush</i> u dzieci uczulonych na jad osy	76
Tabela 32.	Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w moczu. Model pełny	76
Tabela 33.	Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w moczu. Model ostateczny	76
Tabela 34.	Średnie wartości stężenia tetranor-PGD-M w moczu (ng/mg kreatyniny) przed i po leczeniu dawką wstępną <i>ultra-rush vs rush</i> u dzieci uczulonych na jad osy	77
Tabela 35.	Zmienna opisywana: tetranor-PGD-M w moczu. Model pełny	77
Tabela 36.	Zmienna opisywana: tetranor-PGD-M w moczu. Model ostateczny ...	78
Tabela 37.	Zmienna opisywana: tryptaza. Model pełny	80
Tabela 38.	Zmienna opisywana: tryptaza. Model ostateczny	81
Tabela 39.	Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w osoczu. Model pełny.....	83
Tabela 40.	Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w osoczu. Model ostateczny.....	83

Tabela 41. Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w moczu. Model pełny	85
Tabela 42. Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w moczu. Model ostateczny	85
Tabela 43. Zmienna opisywana: tetranor-PGD-M w moczu. Model pełny	87
Tabela 44. Zmienna opisywana: tetranor-PGD-M w moczu. Model ostateczny.....	87
Tabela 45. Zmienna opisywana: sIgE dla jadu pszczoły przed VIT. Model pełny	89
Tabela 46. Zmienna opisywana: sIgE dla jadu pszczoły. Model ostateczny.....	89
Tabela 47. Zmienna opisywana: tryptaza. Model pełny	90
Tabela 48. Zmienna opisywana: tryptaza. Model ostateczny	92
Tabela 49. Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w osoczu. Model pełny.....	93
Tabela 50. Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w osoczu. Model ostateczny.....	94
Tabela 51. Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w moczu. Model pełny	95
Tabela 52. Zmienna opisywana: $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w moczu. Model ostateczny	96
Tabela 53. Zmienna opisywana: tetranor-PGD-M w moczu. Model pełny	97
Tabela 54. Zmienna opisywana: tetranor-PGD-M w moczu. Model ostateczny.....	98
Tabela 55. Zmienna opisywana: sIgE dla jadu osy. Model pełny	99
Tabela 56. Zmienna opisywana: sIgE dla jadu osy. Model ostateczny	99
Tabela 57. Ocena poczucia lęku przed kolejnym użądleniem z uwzględnieniem stopnia ciężkości objawów po wcześniejszych użądleniach	100

SPIS RYCIN

Ryc. 1. Taksonomia owadów błonkoskrzydłych (<i>Hymenoptera</i>) według Chinery'ego (Bilo B.M., <i>Allergy</i> 2005; 60: 1339–1349. Przedruk: <i>Med. Prak.</i> , Wydanie specjalne 3/2006 <i>Rozpoznanie, profilaktyka i leczenie alergii na jad owadów błonkoskrzydłych</i>)	18
Ryc. 2. Pięć zasadniczych typów prostaglandyn powstających w wyniku metabolizmu kwasu arachidonowego	26
Ryc. 3. Metabolity prostaglandyny D ₂	28
Ryc. 4. Schemat badania	41
Ryc. 5. Wzory chemiczne jonów użytych do oznaczania 9 α ,11 β -PGF ₂	49
Ryc. 6. Schemat reakcji derywatywacji 9 α ,11 β -PGF ₂	50
Ryc. 7. Przykład chromatogramów jonowych dla oznaczania 9 α ,11 β -PGF ₂	51
Ryc. 8. Tetranor-PGD-M d0 i d6 (dwa wykresy górne) i tetranor-PGE-M d0 i d6 (dwa wykresy dolne)	52
Ryc. 9. Schemat reakcji derywatywacji tetranor-PGD-M oraz wzory jonów i ich masy	54
Ryc. 10. Przykład chromatogramów jonowych dla oznaczania tetranor-PGD-M ...	55
Ryc. 11. Schemat reakcji derywatywacji z zastosowaniem diazometanu i wzory jonów	56
Ryc. 12. Chromatogramy jonowe estru metylowo-pentafluorobenzylowego tetranor-PGD-M	57
Ryc. 13. Równowaga między formą otwartą i cykliczną zależną od pH	57
Ryc. 14. Dynamika zmian średniego stężenia tryptazy w kolejnych punktach badania u dziewczynek	79
Ryc. 15. Dynamika zmian średniego stężenia tryptazy w kolejnych punktach badania u chłopców	80
Ryc. 16. Dynamika zmian średniego stężenia 9 α ,11 β -PGF ₂ w osoczu w kolejnych punktach badania u dziewczynek	82
Ryc. 17. Dynamika zmian średniego stężenia 9 α ,11 β -PGF ₂ w osoczu w kolejnych punktach badania u chłopców	82

Ryc. 18. Dynamika zmian średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w moczu w kolejnych punktach badania u dziewczynek	84
Ryc. 19. Dynamika zmian średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w moczu w kolejnych punktach badania u chłopców.....	84
Ryc. 20. Dynamika zmian średniego stężenia tetranor-PGD-M w moczu w kolejnych punktach badania u dziewczynek.....	86
Ryc. 21. Dynamika zmian średniego stężenia tetranor-PGD-M w moczu w kolejnych punktach badania u chłopców	86
Ryc. 22. Dynamika zmian średniego stężenia sIgE dla jadu pszczoły przed leczeniem i w kolejnych kontrolach rocznych u dziewczynek.....	88
Ryc. 23. Dynamika zmian średniego stężenia sIgE dla jadu pszczoły przed leczeniem i w kolejnych kontrolach rocznych u chłopców	88
Ryc. 24. Dynamika zmian średniego stężenia tryptazy w kolejnych punktach badania u dziewczynek	91
Ryc. 25. Dynamika zmian średniego stężenia tryptazy w kolejnych punktach badania u chłopców	91
Ryc. 26. Dynamika zmian średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w osoczu w kolejnych punktach badania u dziewczynek.....	92
Ryc. 27. Dynamika zmian średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w osoczu w kolejnych punktach badania u chłopców	93
Ryc. 28. Dynamika zmian średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w moczu w kolejnych punktach badania u dziewczynek.....	94
Ryc. 29. Dynamika zmian średniego stężenia $9\alpha,11\beta$ -PGF ₂ w moczu w kolejnych punktach badania u chłopców	95
Ryc. 30. Dynamika zmian średniego stężenia tetranor-PGD-M w moczu w kolejnych punktach badania u dziewczynek.....	96
Ryc. 31. Dynamika zmian średniego stężenia tetranor-PGD-M w moczu w kolejnych punktach badania u chłopców	97
Ryc. 32. Dynamika zmian średniego stężenia sIgE dla jadu osy przed leczeniem i w kolejnych kontrolach rocznych u chłopców	98

ZAŁĄCZNIK

DATA:

KARTA KWALIFIKACJI DO IMMUNOTERAPII SWOISTEJ NA JAD OWADÓW

Nazwisko LEKARZA odpowiedzialnego za proces diagnostyczno-kwalifikacyjny:

.....

Nr Ks. Głównej pacjenta	
Nazwisko i imię	
Data urodzenia/ Wiek /liczba lat/	
Tel. kontaktowy	

	Odczyny po użądleniu przez <u>OSE</u>	liczba użądleń wywołujących te objawy
Miejscowe (średnica w cm)		
Ogólne stopień wg L.H. Muellera:	Wymienić wraz z datą (okoliczności, objawy, terapia) objawy:	

	Odczyny po użądleniu przez <u>PSZCZOŁĘ</u> <u>(obecność żądła)</u>	liczba użądleń wywołujących te objawy
Miejscowe (średnica w cm)		
Ogólne stopień wg L.H. Muellera:	Wymienić wraz z datą (okoliczności, objawy, terapia):	

	Odczyny po użądleniu przez OWADA NIEZIDENTYFIKOWANEGO (osę lub pszczołę)	liczba użądleń wywołujących te objawy
Miejscowe (średnica w cm)		
Ogólne stopień wg L.H. Muellera:	Wymienić wraz z datą (okoliczności, objawy, terapia):	

Data ostatniego użądlenia:	W porównaniu z poprzednim użądleniem		
osy	Nasilenie odczynu	TAK	NIE
pszczoły	Nasilenie odczynu	TAK	NIE
osy lub pszczoły	Nasilenie odczynu	TAK	NIE

Poziom IgE swoistych

	Data 1 badanie	Stężenie	Klasa	Data 2 badanie	Stężenie	Klasa
osa						
pszczoła						
szerszeń						
IgE całk.						

Testy skórne

Osa Data	Prick Histamina kontrola ujemna Stężenie jadu 100 µg/ml	Śródskórne Histamina Kontrola ujemna Stężenia jadu.....
Pszczoła Data	Prick Histamina Kontrola ujemna Stężenie jadu 100 µg/ml	Śródskórne Histamina Kontrola ujemna Stężenia jadu.....

Preparat jadu stosowany przy testowaniu

PHARMALGEN/VENOMENHAL

Choroby współistniejące (astma, nadciśnienie, inne):

Stopień narażenia na alergen owada • os • pszczoł	mały mały	średni średni	duży duży
Odległość od ośrodka zdrowia	km		
Odległość od stacji PR	km		
Lęk przed kolejnymi użądleniami	mały	średni	duży
Czy posiada adrenalinę w ampułkostrzykawce?	tak		nie
Czy posiada leki p-histaminowe?	tak		nie
Czy posiada glikokortykosteroid (np. tabletki Encorton)?	tak		nie
Czy przeprowadzono szkolenie posługiwania się adrenaliną w auto-/ampułkostrzykawce?	tak /data/		nie
Czy wydano pisemne zalecenia odnośnie do profilaktyki użądleń i sposobu postępowania w razie użądlenia?	tak /data/		nie
Stan uodpornienia przeciw WZW B			

Ocena reakcji poużądleniowej przez pacjenta i lekarza udzielającego pierwszej pomocy		
Gatunek i liczba owadów	Ocena objawów	
	Pacjent/opiekunowie	Lekarz
Osa	<p>I° – uogólniona pokrzywka, świąd, nudności, poczucie lęku</p> <p>II° – obrzęk naczyńnioruchowy, uczucie ciasnoty w klatce piersiowej, wymioty, biegunka, ból brzucha, zawroty głowy</p> <p>III° – duszność, świst krtańniowy, wydłużony wydech, dysfagia, dyzartria, chrypka, osłabienie, oszołomienie, lęk przed śmiercią</p> <p>IV° – spadek ciśnienia tętniczego, zapaść, utrata przytomności, nietrzymanie moczu i stolca, sinica</p>	<p>I° – uogólniona pokrzywka, świąd, nudności, poczucie lęku</p> <p>II° – obrzęk naczyńnioruchowy, uczucie ciasnoty w klatce piersiowej, wymioty, biegunka, ból brzucha, zawroty głowy</p> <p>III° – duszność, świst krtańniowy, wydłużony wydech, dysfagia, dyzartria, chrypka, osłabienie, oszołomienie, lęk przed śmiercią</p> <p>IV° – spadek ciśnienia tętniczego, zapaść, utrata przytomności, nietrzymanie moczu i stolca, sinica</p>
Pszczola	<p>I° – uogólniona pokrzywka, świąd, nudności, poczucie lęku</p> <p>II° – obrzęk naczyńnioruchowy, uczucie ciasnoty w klatce piersiowej, wymioty, biegunka, ból brzucha, zawroty głowy</p> <p>III° – duszność, świst krtańniowy, wydłużony wydech, dysfagia, dyzartria, chrypka, osłabienie, oszołomienie, lęk przed śmiercią</p> <p>IV° – spadek ciśnienia tętniczego, zapaść, utrata przytomności, nietrzymanie moczu i stolca, sinica</p>	<p>I° – uogólniona pokrzywka, świąd, nudności, poczucie lęku</p> <p>II° – obrzęk naczyńnioruchowy, uczucie ciasnoty w klatce piersiowej, wymioty, biegunka, ból brzucha, zawroty głowy</p> <p>III° – duszność, świst krtańniowy, wydłużony wydech, dysfagia, dyzartria, chrypka, osłabienie, oszołomienie, lęk przed śmiercią</p> <p>IV° – spadek ciśnienia tętniczego, zapaść, utrata przytomności, nietrzymanie moczu i stolca, sinica</p>
Owad niezidentyfikowany	<p>I° – uogólniona pokrzywka, świąd, nudności, poczucie lęku</p> <p>II° – obrzęk naczyńnioruchowy, uczucie ciasnoty w klatce piersiowej, wymioty, biegunka, ból brzucha, zawroty głowy</p> <p>III° – duszność, świst krtańniowy, wydłużony wydech, dysfagia, dyzartria, chrypka, osłabienie, oszołomienie, lęk przed śmiercią</p> <p>IV° – spadek ciśnienia tętniczego, zapaść, utrata przytomności, nietrzymanie moczu i stolca, sinica</p>	<p>I° – uogólniona pokrzywka, świąd, nudności, poczucie lęku</p> <p>II° – obrzęk naczyńnioruchowy, uczucie ciasnoty w klatce piersiowej, wymioty, biegunka, ból brzucha, zawroty głowy</p> <p>III° – duszność, świst krtańniowy, wydłużony wydech, dysfagia, dyzartria, chrypka, osłabienie, oszołomienie, lęk przed śmiercią</p> <p>IV° – spadek ciśnienia tętniczego, zapaść, utrata przytomności, nietrzymanie moczu i stolca, sinica</p>

Kwalifikacja do immunoterapii swoistej

TAK Data kwalifikacji		NIE
Jadem osy	Jadem pszczoły	
Czy wysłano list z orzeczeniem odnośnie kwalifikacji do swoistej immunoterapii?		
TAK		NIE