

Uwalnianie granzymu B z leukocytów krwi obwodowej pacjentów z alergią na jad osy – wpływ swoistej immunoterapii

Release of granzyme B (GzmB) from peripheral blood leukocytes in patients with hymenoptera venom allergy – effect of rush venom immunotherapy

ZUZANNA KŁOS¹, MAGDALENA KUJAWIAK¹, MACIEJ CHAŁUBIŃSKI², SŁAWOMIR KOSIŃSKI³, MAŁGORZATA CIEŚLAK³, EWA SMORAWSKA³, ANETA GRZELAK¹, MAREK L. KOWALSKI², JANINA GRZEGORCZYK¹

¹ Zakład Laboratoryjnej Immunologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

² Klinika Immunologii, Reumatologii i Alergii, Uniwersytet Medyczny, Łódź

³ Centralny Szpital Kliniczny, Uniwersytet Medyczny, Łódź

Streszczenie

Wprowadzenie. Granzym B (GzmB) jest syntetyzowany głównie przez limfocyty cytotoksyczne (CTL) oraz komórki Natural Killer (NK), a także komórki tuczne.

Cel pracy. Celem pracy była ocena uwalniania Granzymu B przez leukocyty krwi obwodowej pacjentów uczulonych na jad osy, po stymulacji alergenami jądów w przebiegu pierwszej fazy immunoterapii swoistej jadem osy.

Materiał i metody. Badaniem objęto 9 pacjentów uczulonych na jad osy, z których 8 podjęło swoistą immunoterapię metodą ultra-rush. Leukocyty izolowano z krwi obwodowej i stymulowano jadem osy, jadem pszczoły i fMLP. GzmB w nadsączach po stymulacji komórek oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA).

Wyniki. W godzinę po uzyskaniu klinicznej tolerancji dawki 100 µg jadu/ml, w procedurze odczulania metodą ultra-rush, obserwowano ponad o 50% spadek średnich wartości GzmB (nie istotny statystycznie). Nie stwierdzono wpływu stymulacji komórek jadem osy na średnie stężenie GzmB w nadsączach, jednakże u pojedynczych osób obserwowano kilkakrotny wzrost stężenia GzmB po stymulacji alergenem osy w stężeniu 1 µg. Stymulacja komórek jadem pszczoły (alergen nieswoisty) istotnie zwiększała średnie stężenie GzmB zarówno przed, jak i w trakcie odczulania.

Wniosek. Granzym B jest uwalniany z leukocytów krwi obwodowej pacjentów z alergią na jad osy. Jad osy i pszczoły mogą nasilać uwalnianie granzymu B prawdopodobnie na drodze nieswoistej.

Słowa kluczowe: cytotoksyczność, inhibitor PI-9, proteazy serynowe, zapalenie alergiczne, nadwrażliwość na jad owadów

Summary

Introduction. Granzyme B (GzmB) is mainly synthesized by cytotoxic T cells (CTL) and Natural Killer cells (NK), as well as by mast cells.

Aim of the study. The aim of the study was to investigate granzyme B release from peripheral blood leukocytes in patients with hymenoptera venom allergy before and after ultra-rush immunotherapy.

Material and methods. 9 patients allergic to wasp venom were recruited to the study, out of which 8 patients qualified for ultra-rush specific immunotherapy. Leukocytes were isolated from blood and stimulated with wasp venom allergen, bee venom allergen and fMLP. GzmB in supernatants after cell stimulation was determined by the immunoenzymatic method, ELISA.

Results. One hour after clinical tolerance to the venom dose of 100 µg/ml was induced during rush immunotherapy, more than a 50% decrease in GzmB release was observed (non-significant). Stimulation with wasp venom did not change the mean GzmB concentration in supernatants. However, in some patients remarkable enhancement of GzmB release was noticed after stimulation with bee venom allergen at the concentration of 1 µg. Bee venom stimulation (non-specific allergen) increased the mean GzmB concentration both before and after immunotherapy.

Conclusion. Granzyme B is released from peripheral blood leukocytes of patients with wasp venom allergy. Wasp venom and bee venom allergens may stimulate GzmB release in a non-specific way.

Key words: cytotoxicity, PI-9 inhibitor, serine proteases, allergic inflammation, hymenoptera venom hypersensitivity

© *Alergia Astma Immunologia* 2009, 14(1): ????

www.alergia-astma-immunologia.eu

Nadesłano: 27.02.2009

Zakwalifikowano do druku: 16.03.2009

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Zuzanna Kłos
Zakład Laboratoryjnej Immunologii Medycznej,
Uniwersytet Medyczny
ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź
tel (42) 675 73 09, fax (42) 678 22 92
e-mail: zuzannaklos@gmail.com

Wykaz skrótów:

GzmB – granzym B
 PI-9 – protease inhibitor 9, SERPIN B9
 fMLP – formylometionylfenyloalanina
 CTL – limfocyty cytotoksyczne
 NK – komórki Natural Killer
 tBid – truncated Bid
 Apaf-1 – apoptotic protease activating factor-1
 TNF – tumor necrosis factor

WSTĘP

Granzymy (*granule-associated enzymes*) są proteazami serynowymi, które mogą indukować śmierć komórek zakażonych patogenami wewnątrzkomórkowymi oraz komórek zmienionych nowotworowo. Grupa tych białek, występująca w granulach cytoplazmatycznych, została dobrze opisana u gryzoni oraz ludzi, gdzie została podzielona na trzy podrodziny w zależności od swoistości substratu [1]. Granzym B jest białkiem (32kDa) należącym do rodziny chymotrypsyn, zaangażowanym w patogenezę infekcji wirusowych, reakcje odrzucenia przeszczepów (*GVHD – graft versus host disease*), patogenezę reumatoidalnego zapalenia stawów, a także odpowiedź przeciwnowotworową [2]. Dla efektywnej katalizy GzmB wymaga substratu zawierającego resztę asparginową, a główna specyficzność GzmB wyraża się poprzez interakcję pomiędzy substratem a arginina w pozycji 226 [3].

Gen dla GzmB zlokalizowany jest na chromosomie 14. Jego polimorfizm jest najczęściej reprezentowany przez potrójnie zmutowany allel, w którym 3 aminokwasy dojrzalego białka glutamina (Q)48, prolina (P)88 i tyrozyna (Y)245 są podstawione do argininy (R)48, alaniny (A)88 i histydyny (H)245 w pobliżu c-końca α -helisy białka. W limfocytach CD8+ GzmB ulega ekspresji na jednakowym poziomie, zarówno jako homozygota QPY/QPY i RAH/RAH, jak i heterozygota QPY/RAH. Homozygota RAH jest białkiem stabilnym, jednakże najprawdopodobniej nie indukuje apoptozy *in vivo*, wskazując że zmiana aminokwasowa w c-końcu białka determinuje jego funkcje (badania McIlroy i wsp.) [4].

GzmB jest syntetyzowany głównie przez limfocyty cytotoksyczne i komórki NK, jednak ostatnie badania wskazują, że może być syntetyzowany również przez inne typy komórek m.in. limfocyty CD4+, bazofile, neutrofile, niektóre komórki nowotworowe oraz chondrocyty [5,6,7,8,9]. Jedynym ludzkim białkiem mogącym zahamować aktywność GzmB jest inhibitor PI-9 (*protease inhibitor 9, SERPIN B9*) syntetyzowany przede wszystkim przez komórki cytotoksyczne, aczkolwiek jego obecność wykryto również w komórkach dendrytycznych czy komórkach śródbłonna [10].

Hipoteza, że GzmB może uczestniczyć w chorobach zapalnych jest relatywnie nowa. Wykazano jego udział w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów, atopowego zapalenia skóry czy łuszczycy [11,12,13]. Bratke i wsp [14] wykazali obecność GzmB w popłuczynach oskrzelowych pacjentów z astmą uzyskanych po prowoka-

Abbreviations:

GzmB – granzyme B
 PI-9 – protease inhibitor 9, SERPIN B9
 fMLP – formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
 CTL – cytotoxic T-lymphocytes
 NK – Natural Killer cells
 tBid – truncated Bid
 Apaf-1 – apoptotic protease activating factor-1
 TNF – tumor necrosis factor

INTRODUCTION

Granzymes (*granule-associated enzymes*) are serine proteases that may induce necrosis of cells infected with intracellular pathogens and cells with neoplastic changes. This group of proteins, which occur in cytoplasmic granules, has been well described in rodents and humans, and has been divided into three subfamilies depending on the substrate specificity [1]. Granzyme B is a protein (32kDa) belonging to the chymotrypsin family and involved in the pathogenesis of viral infection, graft-versus-host disease (GVHD), pathogenesis of rheumatoid arthritis and antitumour immunity [2]. For effective catalase, GzmB requires a substrate containing aspartate residue. The main GzmB specificity is expressed by interaction between the substrate and arginine at position 226 [3].

The GzmB gene is located on chromosome 14. Its polymorphism is usually represented by a triple-mutated allele, in which 3 amino acids of the mature protein, i.e. glutamine (Q)48, prolina (P)88 and thyrrosine (Y)245, are mutated to arginine (R)48, alanine (A)88 and histidine (H)245 near the C-terminal α -helix of the protein. In CD8+ lymphocytes, GzmB is expressed at similar levels in QPY/QPY and RAH/RAH homozygous and QPY/RAH heterozygous individuals. RAH homozygote is a stable protein but it probably does not induce apoptosis *in vivo*, which indicates that the amino acid change at the C-terminal of the protein determines its functions (McIlroy et al.) [4].

GzmB is mainly synthesized by cytotoxic T cells and Natural Killer cells. However, recent studies reveal that it may also be synthesized by CD4+ lymphocytes, basophils, neutrophils, certain neoplastic cells and chondrocytes [5,6,7,8,9]. The only human protein able to inhibit GzmB activity is the protease inhibitor 9 SERPIN B9, which is mainly synthesized by cytotoxic cells, although its presence has also been detected in dendritic or endothelial cells [10].

The hypothesis that GzmB may be involved in inflammatory diseases is relatively new. GzmB has been found to participate in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, atopic dermatitis and psoriasis [11,12,13]. Bratke et al. [14] have detected the presence of GzmB in bronchoalveolar lavage of allergen challenged patients with asthma.

cji swoistym alergenem. Ponadto komórki cytotoksyczne również gromadzące się w drogach oddechowych na skutek swoistej stymulacji, wykazują ekspresję GzmB. Reakcja nadwrażliwości na jady owadów błonkoskrzydłych związana jest z aktywacją wielu komórek układu odpornościowego, w tym także leukocytów krwi obwodowej. Komórki te mogą syntetyzować GzmB.

Celem pracy była ocena uwalniania granzymu B przez leukocyty krwi obwodowej pacjentów uczulonych na jad osy po swoistej i nieswoistej stymulacji oraz zbadanie wpływu immunoterapii metodą ultra-rush.

MATERIAŁ I METODY

Pacjenci

Badaniem objęto 9 pacjentów uczulonych na jad osy, spośród których 8 osób (3 kobiety i 5 mężczyzn) w wieku 25-53 lat podjęło immunoterapię metodą ultra-rush. Chorzy na co najmniej 72 godziny przed pobraniem krwi nie przyjmowali wziewnych glikokortykosteroidów, agonistów receptora β 2-adrenergicznego oraz leków przeciwhistaminowych. Kwalifikację pacjentów przeprowadzili lekarze Ośrodka Diagnostyki i Leczenia Astmy i Alergii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi na podstawie dodatniego wywiadu (reakcja ciężka, od stopnia drugiego w skali Mullera) oraz obecności sIgE wobec jadu owadów w surowicy. Badania przeprowadzono w 3 punktach czasowych: T0 – na dwa dni przed odczulaniem, T1 – po przeprowadzeniu ultra-rush, w godzinę po uzyskaniu tolerancji dawki $100\mu\text{g}$ jadu/ml, T2 – 10 dni po ultra-rush.

Materiał

Krew na EDTA pobierano od pacjentów z żyły w zgięciu łokciowym. Wyizolowane z kożuszka leukocyty stabilizowano, a następnie inkubowano przez 1 godz. z jadem osy w stężeniach: $1\mu\text{g}/\text{ml}$; $0,1\mu\text{g}/\text{ml}$; $0,01\mu\text{g}/\text{ml}$; oraz jadem pszczoły w stężeniu $1\mu\text{g}/\text{ml}$. Pozytywną kontrolę stanowiły komórki inkubowane z 10^{-7}M fMLP. Po inkubacji próby wirowano w 'Eppendorf-short spin' w temp. pokojowej. Pozyskany nadsącz rozdzielano do probówek typu Eppendorf i zamrażano w temp. -20°C do czasu przeprowadzenia analizy oznaczania GzmB metodą ELISA.

Ocena stężenia GzmB w nadsączach po stymulacji komórek

W pozyskanych nadsączach z komórek niestymulowanych i stymulowanych oznaczano stężenie GzmB metodą immunoenzymatyczną stosując komercyjnie dostępny zestaw ELISA (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria).

Analiza statystyczna

Próby porównywano testem nieparametrycznym Wilcoxon dla prób zależnych. Istotność statystyczną oceniano przy $p < 0,05$. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SEM.

Moreover, cytotoxic cells accumulating in the airways following specific stimulation also reveal GzmB expression. Hypersensitivity reactions to hymenoptera venom are related to the activation of numerous immune cells, including peripheral blood leukocytes. These cells may synthesize GzmB.

The aim of the study was to investigate granzyme B release from peripheral blood leukocytes in from patients with hymenoptera venom allergy after specific and non-specific stimulation and to investigate the effect of ultra-rush immunotherapy.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

9 patients allergic to wasp venom were recruited to the study, out of which 8 patients (3 women and 5 men) aged 25-53 qualified for ultra-rush specific immunotherapy. At least 72 hours prior to blood sampling, the patients did not receive inhaled glycocorticoids, β 2-adrenergic receptor agonists or oral antihistamine drugs. Patients were qualified for the study by physicians of the Centre of Asthma and Allergy Diagnostics and Treatment at the Medical University of Łódź on the basis of a positive medical history (from grade II reactions according to the Mueller severity scale) and the presence of sIgE to insect venom in serum. The studies were conducted in three time points: T0 – two days before immunotherapy, T1 – after ultra-rush, one hour after tolerance to the venom dose of $100\mu\text{g}/\text{ml}$ was induced, T2 – 10 days after ultra-rush.

Material

Blood samples were taken from the patients' ulnar vein into EDTA. Isolated leukocytes were stabilised and then incubated for 1 hour with wasp venom at the concentrations of $1\mu\text{g}/\text{ml}$, $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ and $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ and with bee venom at the concentration of $1\mu\text{g}/\text{ml}$. Positive control was provided by cells incubated with 10^{-7}M fMLP. After incubation, the samples were centrifuged in the 'Eppendorf-short spin' in room temperature. The obtained supernatant was distributed to Eppendorf tubes and frozen at -20°C until the GzmB analysis with ELISA was conducted.

Assessment of GzmB concentration in supernatants after cell stimulation

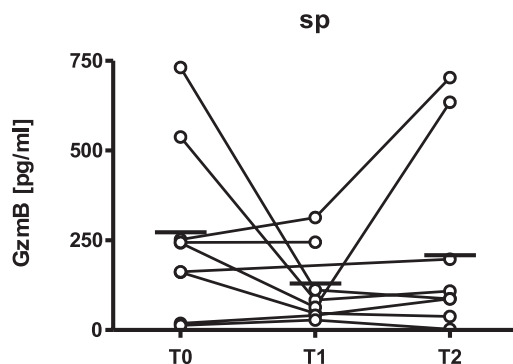
In the supernatants obtained from stimulated and unstimulated cells, the GzmB concentration was assessed with a commercial ELISA kit (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria).

Statistical analysis

Dependant samples were compared with the use of the non-parametric Wilcoxon test. Statistical significance was set at $p < 0.05$ and the results were presented as mean \pm SEM.

WYNIKI

Obecność GzmB stwierdzono w nadsączach komórek niestymulowanych, jak i stymulowanych (swoistym i nieswoistym alergenem) we wszystkich badanych punktach czasowych. W czasie T1, czyli w godzinę po uzyskaniu klinicznej tolerancji dawki 100 µg/jadu/ml, w procedurze odczulania metoda ultra-rush, obserwowano ponad 50%, nieznamiennej statystycznie spadek spontanicznego uwalniania GzmB (odpowiednio 262,58±78,09 wobec 116,46±37,24; $p>0.05$) (ryc.1).



Ryc. 1. Spontaniczne uwalnianie granzymu B (GzmB) przed i po immunoterapii ultra-rush

Wpływ alergenów jadów na uwalnianie GzmB z leukocytów przed rozpoczęciem immunoterapii swoistej

W czasie T0, na 48h przed rozpoczęciem leczenia, nie stwierdzono wpływu stymulacji komórek jadem osy na średnie stężenia GzmB w nadsączach w odniesieniu do próby spontanicznej niestymulowanej. Jednakże u 4 osób obserwowano kilkakrotny wzrost stężenia GzmB w nadsączach po stymulacji alergenem osy w stężeniu 1 µg/ml.

Stymulacja komórek jadem pszczoły (alergen nieswoisty) zwiększyła średnie stężenie GzmB. Wartości średnie przed stymulacją wynosiły 262,58±78,09 (zakres od 64,45 do 972,68) i wzrosły do 550,77±149,99 (zakres od 92,14 do 1444,34) po stymulacji ($p=0,01$). Natomiast istotny statystycznie wyższy poziom GzmB stwierdzono po stymulacji komórek jadem pszczoły (ryc. 2). Stymulacja fMLP nie wywołała zmian w stężeniu GzmB.

Uwalnianie GzmB przez leukocyty krwi obwodowej w przebiegu immunoterapii swoistej

W czasie T1, czyli w godzinę po uzyskaniu klinicznej tolerancji dawki 100 µg/jadu/ml, nie stwierdzono wpływu jadu osy in vitro uwalnianie granzymu z leukocytów. Podobnie jak przed odczulaniem, stymulacja jadem pszczoły istotnie statystycznie podwyższyła średni poziom granzymu w nadsączach. Wartości średnie wynosiły: 268,82±128,26 (zakres od 40,01 do 1013,39) po stymulacji wobec 116,46±37,24 (zakres od 27,52 do 313,62) przed stymulacją ($p=0,028$). Stężenia GzmB po stymulacji komórek jadem pszczoły były wyższe również w porównaniu do

RESULTS

GzmB was detected in supernatants of unstimulated and stimulated (with specific and non-specific allergen) cells in all the time points. In time point T1, i.e. one hour after clinical tolerance to the venom dose of 100 µg/ml was induced during rush immunotherapy, a more than 50% decrease (statistically non-significant) in GzmB release was observed (262.58±78.09 versus 116.46±37.24; $p>0.05$) (fig.1).

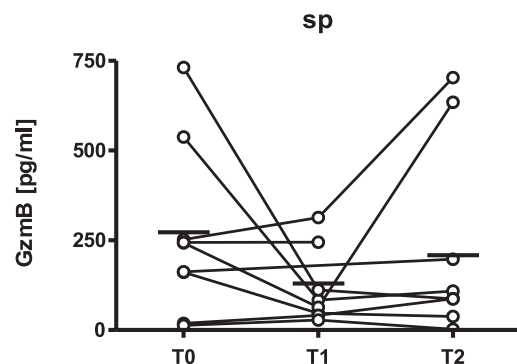


Fig. 1. Spontaneous release of granzyme B (GzmB) before and after ultra-rush immunotherapy

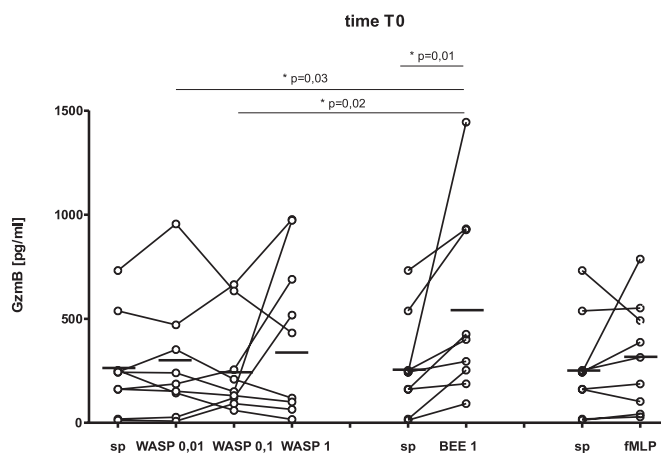
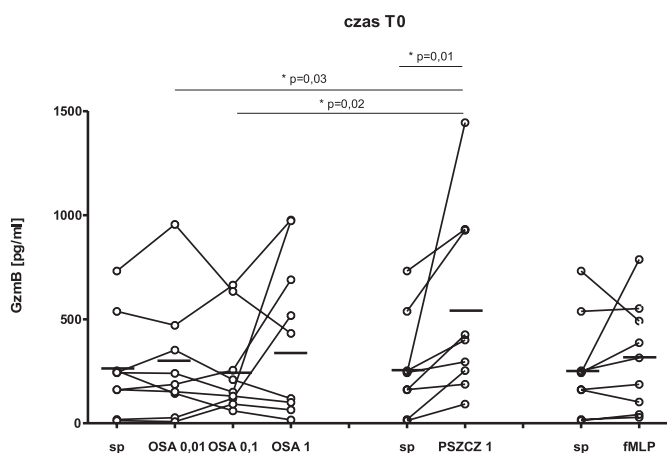
Effect of venom allergens on GzmB release from leukocytes prior to specific immunotherapy

In time point T0, i.e. 48h prior to therapy, no effect of cell stimulation by wasp venom on the mean GzmB concentration in supernatants was observed with regard to a spontaneous unstimulated sample. However, a significant increase in GzmB concentration in supernatants was observed in 4 patients following stimulation with wasp venom at 1 µg/ml.

Cell stimulation with bee venom (non-specific allergen) resulted in an increase in mean GzmB concentration. The mean values before stimulation were 262.58±78.09 (ranking from 64.45 to 972.68) and they increased to 550.77±149.99 (ranging from 92.14 to 1444.34) after stimulation ($p=0.01$). On the other hand, a statistically significant increase in GzmB concentration was observed after cell stimulation with bee venom (fig. 2). fMLP stimulation did not result in GzmB changes.

GzmB release from peripheral blood leukocytes in the course of specific immunotherapy

In time point T1, i.e. one hour after clinical tolerance to the venom dose of 100 µg/ml was induced, no effect of wasp venom in vitro on the granzyme release from leukocytes was observed. As was the case prior to immunotherapy, bee venom stimulation significantly increased the mean granzyme concentration in supernatants. The mean values were 268.82±128.26 (ranging from 40.01 to 1013.39) after stimulation versus 116.46±37.24 (ranging from 27.52 to 313.62) before stimulation ($p=0.028$). GzmB concentrations following cell stimulation with bee

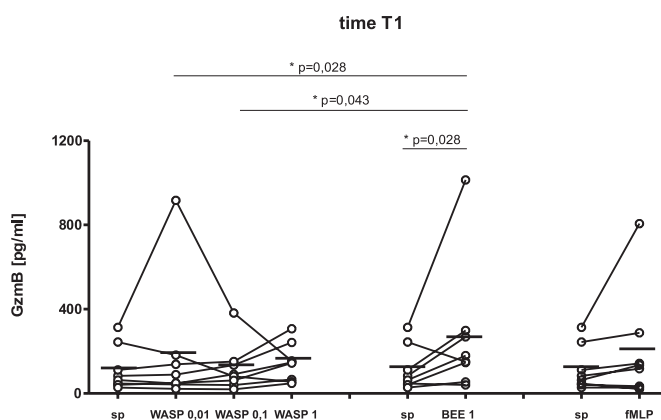
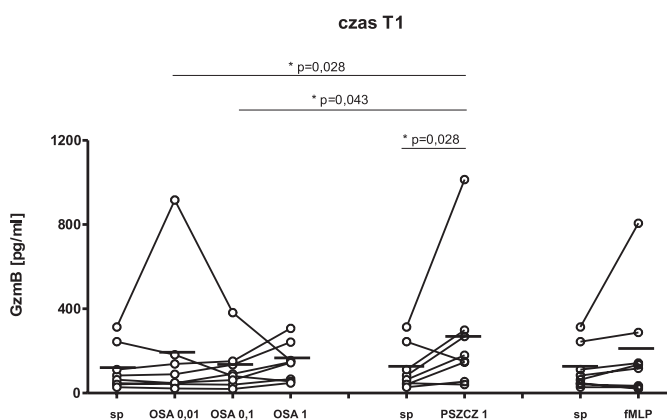


Ryc. 2. Wpływ swoistej i nieswoistej stymulacji na uwalnianie granzymy B (GzmB) przez leukocyty krwi obwodowej przed rozpoczęciem immunoterapii (T0)

Fig. 2. Effect of specific and non-specific stimulation on granzyme B (GzmB) release from peripheral blood lymphocytes prior to immunotherapy (T0)

prób stymulowanych jadem osy w stężeniu 0,01µg/ml oraz 0,1µg/ml. Wartości średnie wynosiły: 268,82±128,26 (zakres od 40,01 do 1013,39) wobec 185,82±106,19 (zakres od 22,16 do 916,88), p=0,028 dla jadu osy 0,01µg/ml oraz 268,82±128,26 (zakres od 40,01 do 1013,39) wobec 119,97±40,55 (zakres od 19,49 do 381,74), p=0,043 dla jadu osy 0,1µg/ml (ryc. 3).

venom were also higher, compared to samples stimulated with wasp venom at the concentrations of 0.01µg/ml and 0.1µg/ml. The mean values were 268.82±128.26 (ranging from 40.01 to 1013.39) versus 185.82±106.19 (ranging from 22.16 to 916.88), p=0.028 for wasp venom at 0.01µg/ml and 268.82±128.26 (ranging from 40.01 to 1013.39) versus 119.97±40.55 (ranging from 19.49 to 381.74), p=0.043 for wasp venom at 0.1µg/ml (fig. 3).



Ryc. 3. Wpływ swoistej i nieswoistej stymulacji na uwalnianie granzymy B (GzmB) przez leukocyty krwi obwodowej w godzinę po uzyskaniu tolerancji dawki 100µg jadu/ml (T1)

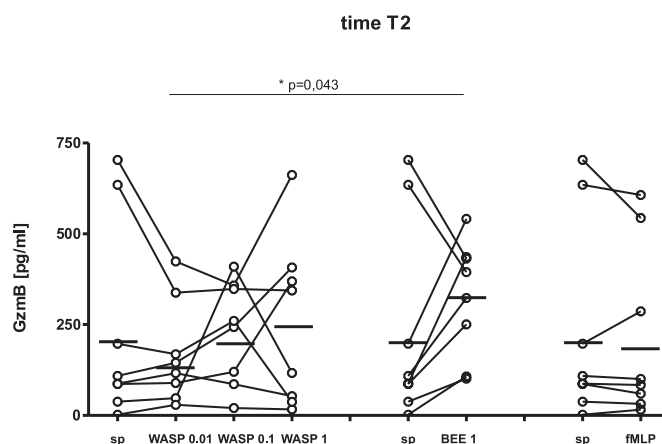
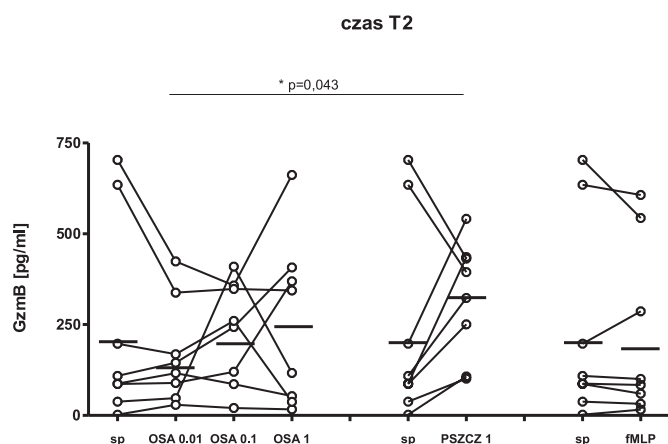
Fig. 3. Effect of specific and non-specific stimulation on granzyme B (GzmB) release from peripheral blood lymphocytes one hour after tolerance to the venom dose of 100 µg/ml was induced (T1)

W czasie T2, tj. w 10 dni po procedurze odczulania metodą ultra-rush, nie stwierdzono wpływu alergenu osy na średnie stężenie granzymy w nadsączach, choć w pojedynczych próbach najwyższe stężenie jadu osy wywoływało wyraźny wzrost uwalniania GzmB. Jad pszczoły choć nie wpłynęła na średnie stężenie granzymy w komórkach od 6 chorych wywołał istotny wzrost uwalniania granzymy.

In time point T2, i.e. 10 days after ultra-rush immunotherapy, stimulation with wasp venom did not change the mean GzmB concentration in supernatants. However, in single samples remarkable enhancement of GzmB release was noticed after stimulation with wasp venom. Although bee venom did not change the mean granzyme concentration in cells from 6 patients, it induced a significant increase in granzyme release.

Poziom GzmB był istotnie statystycznie wyższy w próbach stymulowanych jadem pszczoły w porównaniu do prób inkubowanych jadem osy w stężeniu 0,01µg/ml. Wartości średnie wynosiły: 323,23±65,10 (zakres od 101,47 do 541,17) wobec 169,79±49,57 (zakres od 2,1 do 703,29), p=0,043 (ryc. 4).

GzmB concentration was statistically higher in samples stimulated with bee venom compared to samples incubated with wasp venom at 0.01µg/ml. Mean values were 323.23±65.10 (ranging from 101.47 to 541.17) versus 169.79±49.57 (ranging from 2.1 to 703.29), p=0.043 (fig. 4).



Ryc. 4. Wpływ swoistej i nieswoistej stymulacji na uwalnianie granzymu B (GzmB) przez leukocyty krwi obwodowej w 10 dni po zakończeniu ultra-rush (T2)

Fig. 4. Effect of specific and non-specific stimulation on granzyme B (GzmB) release from peripheral blood lymphocytes 10 days after ultra-rush immunotherapy (T2)

DYSKUSJA

Alergia na jad owadów błonkoskrzydłych jest przykładem reakcji natychmiastowej przebiegającej z udziałem przeciwciał klasy IgE. Natychmiastowa reakcja alergiczna związana jest z aktywacją przede wszystkim komórek tucznych i bazofili, które mogą być źródłem granzymu B [15,16].

Wyniki naszych badań wskazują, że GzmB jest wydzielany przez leukocyty krwi obwodowej pacjentów uczulonych na jad osy spontanicznie, bez stymulacji. Natomiast symulacja swoistym alergenem (jad osy) tylko u niektórych chorych wywołuje wzrost uwalniania przy zastosowaniu najwyższego stężenia alergenu – średnie wartości uwalniania pozostają bez zmian, a nawet wykazują tendencję do spadku wraz ze wzrostem stężenia alergenu. Zaskakującą jest obserwacja, że stymulacja alergenem pszczoły, na który pacjenci nie wykazywali uczulenia prowadziła do istotnego wzrostu uwalniania granzymu B z leukocytów zarówno w punkcie T0, jak i T1 – czyli bezpośrednio po zakończeniu procedury ultra-rush. U pacjentów zakwalifikowanych do badania stwierdzono w surowicy obecność jedynie sIgE przeciwko osie. Żadna z osób nie wytwarzała sIgE przeciwko pszczole. Obserwacje te mogą wskazywać na nieswoisty charakter reakcji uwalniania granzymu B, tak po jądzie osy, jak i pszczoły. Szereg substancji zawartych w jadach osy i pszczoły, w tym również białka antygenowe wykazują właściwości nieswoistej aktywacji komórek szczególnie w wyższych stężeniach. Nie możemy jednak całkowicie wykluczyć swoistości reakcji i możliwości krzyżowej reakcji pomiędzy jadem osy i pszczoły. Głównymi alergenami jadu osy są: fosfolipaza A1, hialuronidaza oraz antygen 5. Natomiast w skład jadu pszczoły wchodzi przede wszystkim fosfolipaza A2, hialuronidaza oraz kwaśna fosfataza [17,18]. Ponad 50% pacjentów z nadwrażliwością na jad owadów wykazuje rzeczywiste podwójne uczulenie na jad osy i pszczoły, jednak często występują reakcje krzyżowe. Przyczyną reakcji krzyżowych może być strukturalne (około 55% identyczności sekwencji) i serologiczne podobieństwo obu hialuronidaz [17,19,20].

DISCUSSION

Hymenoptera venom allergy is an example of an immediate reaction occurring with IgE class antibodies. Immediate allergic reaction is mainly related to the activation of mast cells and basophils that may be the source of granzyme B [15,16].

The results of our studies show that GzmB is released from peripheral blood leukocytes of patients with hymenoptera venom allergy spontaneously and without stimulation. Only in a few patients does stimulation with a specific allergen (wasp venom) enhance release when the highest allergen concentration is used. Mean release values remain unchanged or even have a tendency to decrease when the allergen concentration increases. It is surprising that stimulation with wasp venom, to which the patients were not allergic, led to a significant increase in granzyme B release from leukocytes both in time point T0 and T1, i.e. directly after discontinuation of ultra-rush procedure. In patients qualified for the study, the presence of only sIgE to wasp was detected in serum. None of the patients produced sIgE to bee. These findings may indicate a non-specific character of granzyme B release, both after wasp and bee venom. Numerous substances contained in wasp and bee venom, including antigen proteins, reveal properties of non-specific cell activation, especially at higher concentrations. However, we cannot completely exclude reaction specificity and the possibility of cross-reaction between wasp and bee venom. The major allergens of wasp venom are phospholipase A1, hialuronidase and antigen 5. Bee venom contains mainly phospholipase A2, hialuronidase and acidic phosphatase [17,18]. Over 50% of patients hypersensitive to insect venom reveal actual double allergy to wasp and bee venom, but very often cross-reactivity may be observed. The cause of cross-reactivity may be structural (about 55% sequence identity) and serological similarity of both hialuronidases [17,19,20].

Wyniki naszych badań wskazują również na dynamikę spontanicznego uwalniania GzmB w przebiegu swoistej immunoterapii. Już po zakończeniu fazy ultra-rush spontaniczne uwalnianie granzymu B zmniejszyło się, poziom GzmB był również obniżony po kolejnych 10 dniach. Wskazuje to na stabilizujący wpływ tolerancji immunologicznej na aktywność leukocytów będących źródłem granzymu B. Skuteczność immunoterapii w rozwoju tolerancji immunologicznej na jad owadów jest dobrze udokumentowana [21]. Zmniejszenie stężenia GzmB w toku prowadzonej immunoterapii może być związane z nabyciem przez komórki tolerancji na czynniki stymulujące lub wynikać z uwolnienia granzymu w trakcie fazy rush podawania szczepionki.

Rola GranzymówB w patogenezie reakcji alergicznej nie jest dobrze poznana. GzmB prowadzi do apoptozy komórki docelowej poprzez aktywację kaspazy-3 lub na drodze kaspazo-niezależnej angażując białka z rodziny Bcl-2: Bid i Bax. GzmB generuje 14kDa fragment tBid (*turcated Bid*), który wnika do mitochondrium i rekrutuje białko Bax. W wyniku zmian konformacyjnych zachodzących w Bax dochodzi do indukcji uwalniania cytochromu c, który łączy się z cytoplazmatycznym czynnikiem Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) oraz nieaktywną kaspazą-9. Powstaje kompleks zwany apoptosomem, który aktywuje kaspazę-3 prowadząc do śmierci komórki [22,23,24]. Szybkość ustępowania zapalenia alergicznego zależy od efektywnego usuwania komórek akumulujących się w miejscu reakcji zapalnej. Z wcześniejszych badań wynika, że u chorych z alergią IgE-zależną występuje nasilenie apoptozy limfocytów krwi obwodowej badanych pacjentów [25]. Proces ten może zachodzić na drodze apoptozy związanej z receptorami nadrodziny TNF (tumor necrosis factor), a także z udziałem GzmB [26,27].

Podsumowując, nasze badania wykazały, że granzymu B jest uwalniany z leukocytów krwi obwodowej pacjentów z alergią na jad osy, a jego uwalnianie zmniejsza się wraz z przebiegiem swoistej immunoterapii. Ocena swoistości i mechanizmu nasilonego uwalniania granzymu pod wpływem alergenów jadu osy i pszczoły wymaga dalszych badań.

The results of our studies also indicate dynamics of spontaneous GzmB release in the course of specific immunotherapy. Directly after completion of the ultra-rush stage, spontaneous release of granzyme B decreased with a subsequent decrease after 10 days. This indicates a stabilizing effect of immunological tolerance on the activity of leukocytes that are the source of granzyme B. Effectiveness of immunotherapy in the development of immunological tolerance to insect venom is well documented [21]. A decrease in GzmB concentration in the course of immunotherapy may be related to acquired tolerance of cells to stimulating factors or may result from granzyme release during the ultra rush phase of vaccination.

The granzyme B role in pathogenesis of allergic reactions is not very well known. GzmB is known to induce apoptosis in target cells through activation of caspase-3 or independently of caspase through the involvement of the Bcl-2 family proteins Bid and Bax. GzmB generates the 14kDa fragment of tBid (*turcated Bid*), which penetrates into the mitochondrion and recruits Bax protein. Bax conformational changes result in the induction of cytochrome c release, which binds to the cytoplasmic factor Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) and inactive caspase-9. A complex called the apoptosome is formed and it activates caspase-3 leading to cell necrosis [22,23,24]. The rate of allergic inflammation regression depends on the effective removal of cells accumulating in the site of the inflammatory reaction. Earlier studies revealed intensification of apoptosis in peripheral blood lymphocytes in patients with IgE-dependent allergy [25]. The process may involve apoptosis related to receptors of the TNF (tumor necrosis factor) superfamily and also GzmB [26,27].

In conclusion, our studies have revealed that granzyme B is released from peripheral blood lymphocytes of patients with wasp venom allergy and the release is reduced in the course of specific immunotherapy. The assessment of the specificity and mechanism of enhanced granzyme release caused by wasp and bee allergens requires further studies.

Piśmiennictwo

1. Trapani JA. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biology* 2001; 2: 3014.1-3014.7.
2. McIlroyD, Cartron P-F, Tuffery P, Dudoit Y, Samri A, Autran B, Vallette FM, Debré P, Theodorou I. A triple-mutated allele of granzyme B incapable of inducing apoptosis. *PNAS* 2003; 100: 2562-2567.
3. Waugh SM, Harris JL, Fletterick R, Craick CS. The structure of the pro-apoptotic protease granzyme B reveals the molecular determinants of its specificity. *Nature Structural Biology* 2000; 7: 762-765.
4. McIlroyD, Cartron P-F, Tuffery P, Dudoit Y, Samri A, Autran B, Vallette FM, Debré P, Theodorou I. A triple-mutated allele of granzyme B incapable of inducing apoptosis. *PNAS* 2003; 100: 2562-2567.
5. Hiroaki I, Utz PJ, Anderson P, Eguchci K. Granzyme B and natural killer cell death. *Mod Rheumatol* 2005; 15: 315-322.
6. Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 2004; 104: 2840-2848.
7. Horiuchi K, Saito S, Sasaki R, Tomatsu T, Toyama Y. Expression of granzyme B in human articular chondrocytes. *J Rheumatol* 2003; 30: 1799-1810.
8. Wagner C, Iking-Konert C, Deneffle B, Stegmaier S, Hug F, Hänsch GM. Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 2004; 103: 1099-1104.
9. Hu SX, Wang S, Wang JP, Mills GB, Zhou Y, Xu HJ. Expression of endogenous granzyme B in a subset of human primary breast carcinomas. *Br J Cancer* 2003; 89: 135-139.
10. Bladergroen BA, Trick MCM, Bovenschen N, Berkum O, Scheffer GL, Meijer CJLM, Hack CE, Kummer JA. The Granzyme B Inhibitor, Protease Inhibitor 9, Is Mainly Expressed by Dendritic Cells and at Immune-Privileged Sites. *J Immunol* 2001; 166: 3218-3225.

11. Tak PP, Spaeny-Dekking L, Kraan MC, Bredveld FC, Froelich CJ, Hack CE. The levels of soluble granzyme A nad B are elevated in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 366-370.
12. Spaeny-Dekking EH, Hanna WL, Wolbink AM, Wever PC, Kummer AJ, Swaak AJ, Middeldorp JM, Huisman HG, Froelich CJ, Hack CE. Extracellular granzymes A and B in humans: detection of native species during CTL responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 1998; 160: 3610-3616.
13. Yawalkar N, Schmid S, Braathen LR, Pichler WJ. Perforin and granzyme B may contribute to skin inflammation in atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Dermatol* 2001; 144: 1133-1139.
14. Bratke K, Böttcher B, Leeder K, Schmidt S, Küpper M, Virchow JC Jr, Luttmann W. Increase in granzyme B+ lymphocytes and soluble granzyme B in bronchoalveolar lavage of allergen challenged patients with atopic asthma. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 542-548.
15. Tschopp CM, Spiegl N, Didichenko S, Luttmann W, Julius P, Virchow JCh, Hack CE, Dahinden CA. Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma. *Blood* 2006; 108: 2290-2298.
16. Strik MC, de Koning PJ, Kleijmeer MJ, Bladergroen BA, Wolbink AM, Griffith JM, Wouters D, Fukuoka Y, Schwartz LB, Hack CE, van Ham SM, Kummer JA. Human mast cells produce and release the cytotoxic lymphocyte associated protease granzyme B upon activation. *Mol Immunol* 2007; 44: 3462-72.
17. Bilo BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JNG. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy *Allergy* 2005; 60: 1339-1349.
18. Nitter-Marszalska M. Alergia na jad owadów błonkoskrzydłych. *Mediton*, Łódź 2003.
19. Hamilton RG. Diagnostic Methods for Insect Sting Allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4: 297-306.
20. King TP, Spangfort MD. Structure and Biology of Stinging Insect Venom Allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123: 99-106.
21. Szymański W, Złotnik I, Kucharewicz I, Bodzenta-Łukaszyk A. Skuteczność immunoterapii swoistej u chorych z alergią na jad owadów błonkoskrzydłych – ocena na podstawie metod in vivo i in vitro. *Alergia Astma Immunologia* 2002; 7: 216-222.
22. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 929-935.
23. Heibin JA, Goping IS, Barry M, Pinkoski MJ, Shore GC, Green DR, Bleackley RC. Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J Exp Med* 2000; 192: 1391-1402.
24. Stepien A, Izdebska M, Grzanka A. The types of cell death. *Postepy Hig Med Dosw* 2007; 61: 420-428.
25. Grzegorzczak J, Kowalski ML, Pilat A, Iwaskiewicz J. Increased apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with perennial allergic asthma/rhinitis: relation to serum markers of apoptosis. *Med Inflamm* 2002; 11: 225-233.
26. Patkowski J, Wytrychowski K. Patofizjologia apoptozy i jej znaczenie w rozwoju zapalenia alergicznego i chorób alergicznych. *Adv Clin Exp Med* 2006; 15: 321-328.
27. Ohta K, Yamashita N. Apoptosis of eosinophils and lymphocytes in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 14-21.