

Uwalnianie sulfidoleukotrienów (sLT) z leukocytów pod wpływem stymulacji jadem pszczoły, jego głównym alergenem fosfolipazą A₂ oraz inaktywowaną fosfolipazą A₂ u pacjentów z alergią na jad pszczoły

MARITA NITTNER-MARSZALSKA, JÓZEF MAŁOLEPSZY, WOJCIECH MĘDRALA, IRENA KUSTRZEBA-WÓJCICKA

Klinika Chorób Wewnętrznych i Alergologii i Zakład Biochemii Akademii Medycznej, 50-417 Wrocław, ul. Traugutta 57

Jad pszczoł zawiera składniki o właściwościach alergenowych, z których głównym jest fosfolipaza A₂ (PLA₂). Wobec właściwości cytotoksycznych wieloskładnikowego jadu, w diagnostyce alergii na owady wykorzystuje się PLA₂, która u osób uczulonych wyzwała silną odpowiedź immunologiczną. Sama fosfolipaza jest enzymem o cechach cytotoksycznych dlatego wymaga stosowania w określonym przedziale stężeń i stąd postulat wykorzystania jej inaktywowanej postaci w procedurach diagnostycznych.

Badanie przeprowadzono u 11 osób wykazujących po użądleniu reakcję systemową III i IV stopnia z dodatnim wynikiem testu skórniego z jadem i obecnością jadospecyficznych przeciwciał IgE. Grupę kontrolną stanowiło 10 zdrowych osób.

U wszystkich badanych przeprowadzono test CAST z zastosowaniem pełnego jadu, fosfolipazy A₂ i jej nieaktywnej enzymatycznie postaci. W każdej z badanych grup uzyskano wyniki różnicujące w sposób znamieny statystycznie osoby zdrowe od uczulonych na jad pszczoły. Wersja testu z zastosowaniem inaktywowanej fosfolipazy A₂ cechowała się największą swoistością spośród analizowanych metod.

Wyniki badania wskazują na możliwość zwiększenia precyzji badań diagnostycznych z jadem pszczoły przy zastosowaniu poszczególnych jego składników alergenowych lub ich zmodyfikowanych form.

W poprzedniej pracy wykazano, że w badanej przez nas grupie chorych z alergiczną reakcją systemową na jad pszczoły, pod wpływem stymulacji swoistym alergenem, leukocyty uwalniają znamienne wyższe ilości sLT niż osoby zdrowe [1]. Można przypuszczać, że pozwoli to na użycie testu uwalniania sLT (CAST-ELISA) do diagnostyki tej postaci alergii. Wykorzystanie jadu pszczoł w rozpoznawaniu alergii na owady, czy to w procedurach *in vitro* czy *in vivo*, ograniczają jego cytotoksyczne właściwości wymagające precyzyjnego ustalenia stężeń diagnostycznych.

Głównym alergenem jadu pszczoł jest fosfolipaza A₂ (PLA₂), która jak udokumentowano wielokrotnie, wyzwała u osób uczulonych na jad odpowiedź immunologiczną [2,3]. Wykazano, że 95-100% pacjentów uczulonych na jad pszczoły i mających dodatni wynik testu skórniego z jadem w stężeniu 10⁻⁴ g/l, ma również dodatnie testy skórne z izolowaną z jadu fosfolipazą A₂ [4,5]. Zastosowanie PLA₂ w badaniach diagnostycznych pozwala więc na uniknięcie wywieranego przez wieloskładnikowy jad efektu toksycznego przy zachowaniu właściwości głównego alergenu.

Fosfolipaza A₂ jest enzymem katalizującym hydrolizę wiązania estrowego w pozycji 2-glicerolofosfo-

lipidów z wytworzeniem wolnego kwasu tłuszczowego i lizofosfolipidu, który może być ponownie acylowany przez acetylo-CoA w obecności acylotransferazy. W odpowiednich stężeniach enzym ten może wywierać silne działanie cytotoksyczne wobec błon i organelli komórkowych. Zahamowanie aktywności fosfolipazowej białka bez zmiany jego konformacji redukuje właściwości toksyczne tego związku, bez zmian strukturalnych cząsteczki białka.

W przyrodzie fosfolipaza A₂ występuje również m.in. jako nietotny składnik jadu kobry (*Naja naja*) i jadu szerszenia (*Vespa crabro*). Podobieństwo strukturalne fosfolipazy A₂ jadu pszczoły do fosfolipaz kręgowców nie jest duże, ale funkcjonalnie są to enzymy bardzo zbliżone. Różni je wielkość cząsteczki, ilość reszt histydyny w centrum katalitycznym oraz niektóre inne właściwości fizykochemiczne. Znane inhibitory fosfolipaz znoszące ich aktywność enzymatyczną, są to w odniesieniu do formy enzymu z jadu kobry Sr+2, Ba+2, p-bromo-phenylbromek, a dla enzymu jadu pszczoły D-phosphatydylcholina oraz bezwodnik maleinowy [6].

Celem pracy było ocena wydzielania sLT przez leukocyty po stymulacji jadem pszczoły, jego głównym składnikiem alergenowym - PLA₂ oraz inaktywowaną PLA₂ tj. fosfolipazą pozbawioną aktywności enzymatycznej.

MATERIAŁ I METODY

Badanie przeprowadzono w grupie 11 osób, 6 kobiet i 5 mężczyzn, w wieku od 18 do 40 lat, uczulonych na jad pszczoły. Każda z osób badanych miała wywiad reakcji systemowej III lub IV stopnia na jad pszczoły potwierdzony dodatnim wynikiem testu skórniego z jadem w stężeniu 10^{-4} g/l. Osoby badane nie były żądłone w okresie 6 miesięcy poprzedzających badanie.

Grupę kontrolną stanowiło 10 osób bez historii odczynów alergicznych po użądleniach przez owady i z ujemnymi testami skórnymi z jadem w stężeniu 10^{-3} g/l.

Metoda

Procedura wykonania testu CAST-ELISA

Test stymulacji komórek (CAST)

Krew żylną pobierano na 0,2 M wersenian sodowy w stosunku objętościowym 20:1. Następnie mieszano ją z dekstranem będącym składnikiem zestawów firmy Buhlmann Laboratories A.G. w stosunku objętościowym 4:1 i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 90 minut. W kolejnym etapie zbierano górną fazę i odwirowywano przez 15 minut przy 130 g w temperaturze 20°C . Po odwirowaniu odlewano supernatant, a do osadów dodawano bufor stymulacyjny, zawierający interleukinę 3 w ilości dokładnie tej samej, ile wynosiła objętość krwi. Do oznaczonych próbek dodawano 200 mikrolitrowe porcje zawiesiny komórkowej oraz swoisty alergen w stężeniu 100 ng/ml w objętości 50 mikrolitrów, a do próbek oznaczonych jako spontaniczne generowanie leukotrienów dodawano 50 mikrolitrów buforu stymulacyjnego. Alergen rozcieńczano w dniu badania w buforze stymulacyjnym tak aby końcowe jego stężenie wynosiło 100 ng/ml.

Próbki inkubowano w temperaturze 37°C przez 40 minut i odwirowywano w temperaturze 4°C przez 3 minuty przy 1000 g. Z każdej próbki pobierano supernatanty celem oceny stężenia leukotrienów przy użyciu procedury ELISA. Supernatanty po przeniesieniu do osobnych próbek zamrażano w temperaturze minus 20 stopni na okres do 14 dni.

Test ELISA

Do kolejnych mikrodołków opłaszczonych przeciwciałami przeciw leukotrienom C4, D4, E4 dodawano 100 mikrolitrowe porcje: wzorca niespecyficznego wiązania, standardu zerowego, standardowych roztworów leukotrienu w czterech stężeniach, supernatantów po stymulacji komórek. Następnie do wszystkich mikrodołków dodawano 50 mikrolitrów roztworu leukotrienu skoniugowanego z alkaliczną fosfatazą oraz 50 mikrolitrów roztworu przeciwciała przeciwko leukotrienom.

Po krótkim wymieszaniu inkubowano płytkę przez 24 godziny w temperaturze 4°C , a następnie po

opróżnieniu wszystkich dołków i dwukrotnym przepłukaniu dodawano 200 mikrolitrów świeżo przygotowanego roztworu substratu i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 20°C . Następnie dodawano 50 mikrolitrów roztworu stopującego, mieszano i odczytywano adsorbancję przy 405 nm (aparat Stat-Fax-2000 produkcji USA).

Po wykreśleniu krzywej stardandowej odczytywano w stosunku do niej stężenia leukotrienów. Wyniki wyrażano w pg/ml. Czułość metody wynosi 45 pg/ml. Do testu używano jadu pszczoły.

Alergeny:

Jad pszczoły - Pharmalgen, firma Alk Denmark,

Fosfolipaza A_2 jadu pszczoły (*Apis mellifera*) - firma Sigma numer katalogowy P-9279.

Inaktywowana fosfolipaza A_2 : PLA₂ jadu pszczoły rozpuszczono w PBS do stężenia 1 M/L i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę w obecności równoważnej ilości bezwodnika maleinowego. Następnie roztwór enzymu poddano dializie przez noc wobec PBS w temperaturze 4°C . Aktywność enzymu badano według metody Haas w modyfikacji Cottrella [7]. Jako substratu używano syntetycznej diacylo-L-alfa-phosphatydilocholiny. Mieszanina redukcyjna zawierała 500 mikroM CaCl₂, 50 mikroM EDTA w stosunku 3:1. Końcowe stężenie substratu w próbie wynosiło 10 mg/ml, enzymu 2 mikrogram/próbkę, objętość próby wynosiła 2 ml. Badanie przeprowadzono w temperaturze 25°C . Miara aktywności roztworu jest ilość roztworu NaOH (0,01 N) w roztworze propanolu użytego do miareczkowania próby do wyjściowego pH 8,0.

Dla wyników uzyskanych w poszczególnych grupach obliczono średnie arytmetyczne (\bar{x}) i odchylenia standartowe (SD). Ocenę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu t-Studenta.

WYNIKI

Ilość sLT uwalnianych pod wpływem stymulacji jadem pszczoły u osób z alergią na jad pszczoły wynosiła średnio ($\bar{x} \pm \text{SD}$) $\bar{x} = 342,72 \pm 219,79$ i różniła się w sposób istotny statystycznie ($p = 0,013$) od wyniku tego testu u osób zdrowych ($\bar{x} = 110,82 \pm 82,99$).

Wyniki testu CAST z użyciem natywnej fosfolipazy A_2 jadu pszczoły dla osób uczulonych na jad ($\bar{x} = 561,81 \pm 409,32$) różniły się w sposób istotny statystycznie ($p = 0,009$) od tych wartości w grupie kontrolnej ($\bar{x} = 146,66 \pm 63,24$).

Po zastosowaniu do stymulacji nieaktywnej formy fosfolipazy A_2 uzyskano niższe wartości testu ($\bar{x} = 305,45 \pm 154,88$) z wysoką znamiennością statystyczną różnicy ($p = 0,005$) wobec grupy osób zdrowych ($\bar{x} = 120 \pm 49,21$).

Pomiędzy wartościami wariantu testu uwalniania mediatorów lipidowych z zastosowaniem aktywnej i nieaktywnej enzymatycznie formy fosfolipazy u osób uczulonych na jad nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie. Zestawienie wyników "fałszywie ujemne" i "fałszywie dodatnie" każdej z wersji testu zawiera tabela I.

Tabela I. Występowanie wyników fałszywie ujemnych i fałszywie dodatnich w teście CAST z użyciem całego jadu, fosfolipazy (PLA₂) i fosfolipazy inaktywowanej (PLA₂ NA)

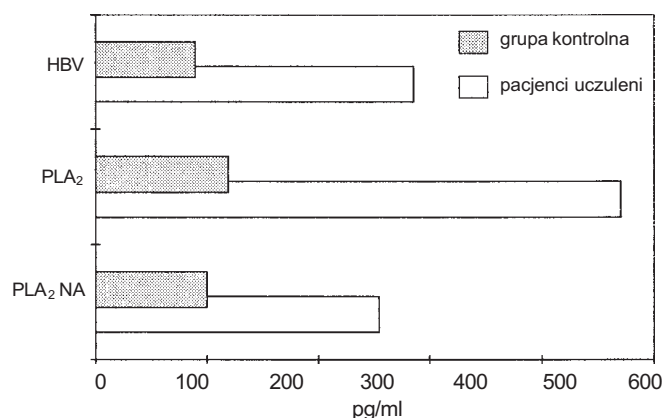
HBV	(-) 2/11	(+) 1/10
PLA ₂	1/11	1/10
PLA ₂ NA	2/11	0/10

DYSKUSJA

W grupie pacjentów uczulonych na jad pszczoł, pod wpływem stymulacji ich leukocytów jadem, izolowaną z jadu fosfolipazą A₂ lub jej nieaktywną enzymatycznie formą, produkcja sLT różniła się w sposób istotny statystycznie od tej wartości dla osób zdrowych. Tak więc w grupie osób z ciężką reakcją anafilaktyczną po użądleniu pszczoły zastosowanie zarówno jadu, jego głównego alergenu jak i nieaktywnej enzymatycznie postaci tego alergenu, może mieć wartość diagnostyczną. Analiza wyników każdej z wersji testu, wykazała, że u jednego chorego test CAST z pełnym jadem potwierdzał ustalone, na podstawie obrazu klinicznego i testu skórniego, rozpoznanie i był dodatni, podczas gdy wersja testu z zastosowaniem PLA₂ miała wynik ujemny. Teoretycznie może to być wyrazem udziału innych niż fosfolipaza A₂ alergenów jadu (hialuronidaza, alergen C, kwaśna fosfataza) w patogenezie reakcji alergicznej obserwowanej u niektórych chorych.

Pomiędzy wynikami trzech wersji testu u poszczególnych osób uczulonych na jad występowały znaczne różnice, w szczególności pomiędzy wartościami testu stymulacji z PLA₂ i nieaktywną PLA₂, jednak nie stwierdzono między nimi znamienych, istotnych statystycznie różnic. Różnice wartości testu stymulacji z identycznymi stężeniami PLA₂ i nieaktywnej PLA₂ mogą wyrażać udział właściwości cytotoksycznych fosfolipazy wyrażające się niższą średnią produkcją leukotrienów w warunkach stymulacji nieaktywną PLA₂. Należy podkreślić, że w teście z inaktywowaną PLA₂ w grupie kontrolnej nie stwierdzono żadnego wyniku dodatniego, co dowodziłoby dużej swoistości wersji testu z nieaktywną fosfolipazą A₂.

Jad pszczoł zawiera wiele substancji o charakterze alergenów. Głównym, stanowiącym 10-15% wagi suchego jadu jest PLA₂, ale aktywność alergenową wykazują również hialuronidaza, melittyna, kwaśna fosfataza i alergen C. Nasuwa się więc pytanie czy pojedynczy alergen jadu może być przydatny do diagnostyki tego schorzenia?



Ryc. 1. Produkcja sulfidoleukotrienów przez leukocyty osób uczulonych na jad pszczoły pod wpływem całego jadu (HBV), fosfolipazy A₂ (PLA₂) oraz fosfolipazy inaktywowanej (PLA₂ NA)

Fosfolipaza A₂ jadu pszczoły, szczególnie w świetle ostatnich badań krystalograficznych Scotta i Otwinowskiego, jest białkiem o doskonale poznanej budowie i funkcji [8]. Równocześnie Müller i wsp. potwierdzili jej główną rolę wśród alergenowych składników jadu wykazując m.in., że u 58 pacjentów z dodatnim testem skórny na jad pszczoły występuje dodatni test śródskórny z PLA₂ [5]. W badanej przez nich 22 osobowej grupie osób zdrowych wszyscy pacjenci z ujemnym testem skórny na jad mieli równocześnie ujemny wynik testu z PLA₂, co wyraża co najmniej taką samą swoistość testu skórniego z PLA₂ jak z całym jadem pszczoły. Podobnie u ponad 90% osób uczulonych na jad pszczoły stwierdza się w surowicy specyficzne przeciwciała IgE skierowane przeciwko PLA₂ [9,10]. U osób uczulonych na jad pszczoł bazofile krwi obwodowej stymulowane PLA₂ wydzielają histaminę. Analiza wyników testu śródskórniego z jadem i PLA₂, oparta o logarytmiczny wskaźnik zależności wyniku testu (pole w mm²) od stężenia substancji testowanej (g/l) wykazała, że relatywna siła biologiczna PLA₂ jest 10,5 razy większa niż jadu. Powyższe obserwacje usprawiedliwiają próby wykorzystania izolowanej z jadu PLA₂ w badaniach diagnostycznych. Co więcej obecnie trwają badania porównawcze nad właściwościami wzbudzania reakcji immunologicznej i odpowiedzią klonów limfocytów T indukowaną przez różne postaci fosfolipazy A₂ (izolowana z jadu, rekombinowana metodami inżynierii genetycznej). Wyniki tych badań mogą mieć implikacje terapeutyczne [11,12].

Kontynuowanie badań z pełnym jadem pszczoły, izolowanymi z biologicznego źródła poszczególnymi alergenami lub ich rekombinowanymi i modyfikowanymi postaciami może ułatwić diagnostykę tej choroby i zrozumienie jej przebiegu.

Reasumując, test CAST przeprowadzony z jadem pszczoły, fosfolipazą A₂ jadu oraz nieaktywną enzymatycznie fosfolipazą A₂ różnicuje osoby zdrowe od osób z alergią na jad pszczół.

Wśród wymienionych trzech wariantów testu największą czułość wykazywał test z fosfolipazą A₂, największą swoistość test z jej nieaktywną enzymatycznie formą.

Piśmiennictwo

1. Nittner-Marszalska M., Małolepszy J., Mędrala M., Gietkiewicz K.: Zastosowanie testu ilościowej oceny sulfidoleukotrienów produkowanych przez leukocyty stymulowane jadem owadów (CAST-ELISA) w diagnostyce alergii na jad os i pszczół. *Alergia, Astma, Immunologia*, 1997; 2(4): 235-238.
2. Muller U.R.: Insect sting allergy: clinical picture, diagnosis and treatment. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1990.
3. Muller U.R.: Comparison of whole honey bee venom, native bee venom-phospholipase A₂ and recombinant bee venom phospholipase A₂ for i.c. skin testing in bee venom allergy. *Allergy* 1996; 42: 26-50.
4. Sobotka A.K., Franklin R.M., Adkinson N.F., i wsp.: Allergy to insect stings. II Phospholipase A: the major allergen in honey bee venom. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996; 57: 29-40.
5. Muller U., Dudler T., Schneider T. i wsp.: Type I skin reactivity to native and recombinant phospholipase A₂ from honey bee venom is similar. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995; 96: 395-402.
6. Yuan W., Quinn D.M., Sigler P.B., Gelb M.H.: Kinetic studies of phospholipase A₂ with short-chain substrates and inhibitors. *Biochemistry* 1990; 29: 6082-94.
7. Cottrell G.H.: Phospholipase A₂ from bee venom E.C.3.1.1.4. phosphatidacylhydrolase. *Meth. Enzymol.* 1981; 71: 698-702.
8. Scott D.L., Otwinowski Z., Gelb M.H., Sigler P.B.: Crystal structure of bee venom phospholipase A₂ in a complex with a transition state analogue. *Science* 1990; 250: 1563-1566.
9. Forster E., Muller U., Dudler T., Suter M., Aberer W., Urbanek R.: Recombinant bee venom phospholipase A₂ releases histamin from basophils and elicits positive skin reactions in allergic individuals. w: Kraft D. ed. *Molecular biology and immunology of allergen*. Boca Raton, Fla: CRC Press 1993: 307-309.
10. Dudler T., Schneider T., Annand R.R., Gelb H.M., Suter M.: The antigenic surface of the bee allergen phospholipase A₂ structural and functional analysis of human IgG4 antibodies reveals potential role in protection. *I. Immunol.* 1994; 152: 5514-22.
11. Carballido J.M., Carballido-Perring N., Kagi M. i wsp.: T-cell epitope specificity in human allergic and nonallergic individuals to bee venom phospholipase A₂. *J. Immunol.* 1993; 150: 3582-91.
12. Schneider T., Lang A.B., Carballido J.M. i wsp.: Human monoclonal and polyclonal antibodies recognize predominantly discontinuous epitopes on bee venom fosfolipase A₂. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994; 94: 61-70.

Sulphidoleukotrienes (sLT) release from leukocytes after stimulation with bee venom, bee venom's major allergen phospholipase A₂ and inactivated phospholipase A₂ in bee venom sensitive patients

MARITA NITTNER-MARSZALSKA, JÓZEF MAŁOLEPSZY, WOJCIECH MĘDRALA, IRENA KUSTRZEBA-WÓJCICKA

Summary

Phospholipase A₂ is the major allergen in bee venom. Bee venom, native PLA₂ and inactivated PLA₂ were used in the CAST test in 11 bee venom sensitive patients and 10 control subjects. Compared with the control group, sLT₄ production in the bee venom sensitive group was significantly higher after stimulation with bee venom (p=0.013), native PLA₂ (p=0.009) and inactivated PLA₂ (p=0.005). The CAST tests performed with bee venom, native PLA₂ and inactivated PLA₂ showed approximately similar specificity and sensibility. The results of CAST test in the study group point out to usefulness of PLA₂ in the diagnosis of bee venom allergy.