

**Lek. med. Hanna Walkowiak**

**Znaczenie interleukiny 31 w patomechanizmie  
atopowego zapalenia skóry**

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

Katedra i Klinika Dermatologii  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu

Promotor: prof. dr hab. Wojciech Silny  
Kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. Wojciech Silny

Poznań 2012

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania **Panu prof. dr hab. Wojciechowi Silnemu** – za wszechstronną pomoc, cierpliwość oraz wyrozumiałość podczas realizacji projektu badawczego.*

*Wyrażam wdzięczność personelowi **Pracowni Chorób Przenoszonych Drogą Płciową** oraz **Pracowni Alergologii Ośrodka Diagnostyki Chorób Alergicznych UM** w Poznaniu za pomoc w przeprowadzeniu badań.*

*Serdecznie dziękuję moim Najbliższym: **Rodzicom, Przemkowi i Mai** za wsparcie, wyrozumiałość i cierpliwość.*

*Niniejszą rozprawę doktorską dedykuję **Rodzicom**.*

## Spis treści

<b>1. WSTĘP .....</b>	<b>9</b>
1.1. Wprowadzenie .....	9
1.2. Współczesne poglądy na patomechanizm atopowego zapalenia skóry .....	9
1.3. Patomechanizm świądu u chorych na atopowe zapalenie skóry .....	17
1.4. Interleukina 31 .....	21
1.4.1. Budowa interleukiny 31 i jej receptora .....	22
1.4.1.1. Podjednostka IL-31RA .....	23
1.4.1.2. Podjednostka OSMR .....	28
1.4.2. Ekspresja receptora interleukiny 31 .....	29
1.4.3. Interleukina 6 .....	31
1.4.4. Mechanizm działania interleukiny 31 .....	34
1.4.5. Biologiczna rola interleukiny 31 .....	36
1.4.5.1. Wpływ interleukiny 31 na indukcję cytokin i chemokin .....	37
1.4.5.2. Znaczenie interleukiny 31 w procesie hematopoezy .....	38
1.4.5.3. Znaczenie interleukiny 31 w chorobach układu oddechowego .....	39
1.4.5.4. Znaczenie interleukiny 31 w nieswoistych zapaleniach jelit .....	40
1.4.6. Znaczenie interleukiny 31 w chorobach skóry .....	42
1.4.6.1. Znaczenie interleukiny 31 w różnych dermatozach przebiegających ze świądem .....	42
1.4.6.2. Znaczenie interleukiny 31 w atopowym zapaleniu skóry .....	43
1.4.6.2.1. Znaczenie interleukiny 31 w atopowym zapaleniu skóry w badaniach przeprowadzonych na modelu zwierzęcym .....	45
1.4.6.2.2. Znaczenie interleukiny 31 w atopowym zapaleniu skóry w badaniach przeprowadzonych u ludzi .....	46
<b>2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY .....</b>	<b>48</b>
<b>3. MATERIAŁ I METODYKA .....</b>	<b>49</b>
3.1. Grupy badane .....	49
3.2. Metodyka .....	50
3.2.1. Badanie podmiotowe .....	50
3.2.2. Badanie przedmiotowe .....	51
3.2.3. Badania dodatkowe .....	55
3.2.3.1. Skórne testy punktowe .....	55
3.2.3.2. Oznaczenie w surowicy krwi całkowitego stężenia IgE metodą CAP SYSTEM FEIA firmy Pharmacia .....	56
3.2.3.3. Oznaczenie w surowicy krwi stężenia antygenowo swoistych przeciwciał klasy IgE metodą UniCAP SYSTEM RAST FEIA firmy Pharmacia .....	57

3.2.3.4. Oznaczenie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i w tkankach metodą Real-Time PCR .....	58
3.2.3.4.1. Pozyskanie jednojądrzastych komórek krwi obwodowej i osocza .....	58
3.2.3.4.2. Pozyskanie wycinków skóry .....	58
3.2.3.4.3. Izolacja RNA .....	59
3.2.3.4.4. Odwrotna transkrypcja .....	59
3.2.3.4.5. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym .....	59
3.2.3.4.6. Przygotowywanie krzywych standardowych .....	62
3.2.4. Analiza statystyczna .....	70
<b>4. WYNIKI .....</b>	<b>71</b>
4.1. Wyniki badania podmiotowego i przedmiotowego .....	71
4.1.1. Analiza wyników badania podmiotowego i przedmiotowego w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry .....	71
4.1.2. Analiza wyników badania podmiotowego i przedmiotowego w grupach kontrolnych ..	78
4.1.2.1. Wyniki badania podmiotowego i przedmiotowego w grupie chorych na liszaj płaski .....	78
4.1.2.2. Wyniki badania podmiotowego i przedmiotowego w grupie osób zdrowych .....	79
4.2. Wyniki badań dodatkowych .....	79
4.2.1. Wyniki oznaczeń cIgE w surowicy .....	79
4.2.2. Wyniki skórnych testów punktowych (STP) oraz oznaczeń stężenia asIgE w surowicy .....	82
4.2.3. Wyniki oznaczeń poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) w grupie badanej i w grupach kontrolnych .....	83
4.2.4. Wyniki oznaczeń poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR w tkankach grupie badanej i w grupach kontrolnych .....	86
4.2.5. Analiza poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR w grupie chorych na AZS w zależności od wskaźników nasilenia stanu zapalnego i świądu: W-AZS i EASI z podziałem na kategorie A i B w zależności od ciężkości stanu klinicznego .....	90
4.2.5.1. Analiza poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) w grupie chorych na AZS w zależności od wskaźników nasilenia stanu zapalnego i świądu: W-AZS, W-AZS I, W-AZS II i EASI z uwzględnieniem podziału na kategorie A i B w zależności od ciężkości stanu klinicznego .....	90
4.2.5.2. Analiza poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR dla oznaczeń wykonanych w tkankach w grupie chorych na AZS w zależności od wskaźników nasilenia stanu zapalnego i świądu: W-AZS, W-AZS I, W-AZS II i EASI z uwzględnieniem podziału na kategorie A i B w zależności od ciężkości stanu klinicznego .....	94
4.2.6. Analiza poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR w grupie chorych na AZS w zależności od stężenia cIgE w surowicy z podziałem na kategorie A i B z uwzględnieniem stanu klinicznego .....	98

4.2.6.1. Analiza poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) w grupie chorych na AZS w zależności od stężenia cIgE w surowicy z podziałem na kategorie A i B z uwzględnieniem stanu klinicznego.....	98
4.2.6.2. Analiza poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR dla oznaczeń wykonanych w tkankach w grupie chorych na AZS w zależności od surowiczego stężenia cIgE z uwzględnieniem podziału na kategorie A i B w zależności od stanu klinicznego .	100
4.2.7. Korelacje.....	103
4.2.7.1. Korelacje dla badanych parametrów* dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) .....	103
4.2.7.2. Korelacje dla badanych parametrów* dla oznaczeń wykonanych w tkankach .....	104
4.2.8. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR między oznaczeniami wykonanymi w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) i w tkankach .....	105
<b>5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA.....</b>	<b>108</b>
5.1. Ocena stanu klinicznego chorych na atopowe zapalenie skóry.....	108
5.2. Omówienie wyników badań alergologicznych w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry .....	114
5.3. Omówienie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) i w tkankach w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry, liszaj płaski i w grupie osób zdrowych oraz ocena różnic pomiędzy populacjami.....	117
5.4. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry.....	130
5.4.1. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w wycinkach skóry z obecnością zmian klinicznych (AZS-CH) i w wycinkach skóry pozornie zdrowej (AZS-Z) w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry .....	130
5.4.2. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry w wycinkach skóry z obecnością zmian klinicznych (AZS-CH) oraz w wycinkach skóry pozornie zdrowej (AZS-Z) z poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) .....	131
5.5. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w wycinkach skóry i w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) w grupie chorych na liszaj płaski .....	133
5.6. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w wycinkach skóry i w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) w grupie osób zdrowych...	133
5.7. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) oraz w wycinkach skóry z obecnością zmian klinicznych (AZS-CH) i w wycinkach skóry pozornie zdrowej w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry (AZS-Z) i wskaźników nasilenia stanu zapalnego i świądu: W-AZS, W-AZS I, W-AZS II oraz EASI.....	134
5.8. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) i w wycinkach skóry w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry z niektórymi parametrami alergologicznymi .....	138

5.8.1. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej ( PBMC) i w wycinkach skóry w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry ze stężeniem cIgE w surowicy .....	138
5.8.2. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) i w wycinkach skóry w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry z wynikami skórnych testów punktowych i/lub stężeniem asIgE z uwzględnieniem podziału na wewnątrzpochodną i zewnątrzpochodną postać atopowego zapalenia skóry .....	139
<b>6. WNIOSKI.....</b>	<b>143</b>
<b>7. STRESZCZENIE.....</b>	<b>144</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>148</b>
<b>9. PIŚMIENNICTWO .....</b>	<b>151</b>

## **Objaśnienia najczęściej używanych skrótów**

**AKT** – kinazy serynowo-treoninowe AKT (*the serine-threonine kinase*)

**asIgE** – antygenowo swoiste immunoglobuliny E (*allergen-specific Immunoglobulin E*)

**AZS** – atopowe zapalenie skóry (*atopic dermatitis*)

**AZS-CH** – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych

**AZS-Z** – grupa chorych na AZS, u których wycinki pobrane zostały ze skóry pozornie zdrowej

**CBD** – domena wiążąca cytokinę (*cytokine binding domain*)

**CBM** – moduł wiążący cytokinę (*cytokine binding module*)

**cIgE** – stężenie całkowite immunoglobuliny E w surowicy

**CLA** – antygen związany ze skórnymi limfocytami (*cutaneous lymphocyte associated antigen*)

**DCs** – komórki dendrytyczne (*dendritic cells*)

**DRG** – zwoje korzeni grzbietowych rdzenia kręgowego (*dorsal root ganglia*)

**EASI** – punktowy wskaźnik rozległości i nasilenia stanu zapalnego skóry u chorych na atopowe zapalenie skóry (*eczema area and severity index*)

**ERK** – kinazy regulowane zewnątrzkomórkowo (*extracellular-signal regulated kinase*)

**FcεR1** – receptor o wysokim powinowactwie do IgE (*high-affinity Immunoglobulin E receptor*)

**Fn III domain** – domena fibronektyny typu III (*fibronectin type III domain*)

**GAPD** – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

**HDMEC** – komórki śródbłonna naczyń skórnych (*human dermal microvascular endothelial cells*)

**ICAM-1** – cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1 (*intercellular adhesion molecule-1*)

**IDEC** – zapalne komórki dendrytyczne naskórka (*inflammatory dendritic epidermal cells*)

**IFN-γ** – interferon gamma; cytokina układu Th1 (*interferon gamma*)

**IgE** – immunoglobulina E (*immunoglobulin E*)

**IL** – interleukina (*interleukin*)

**IL-31** – interleukina 31 (*interleukin-31*)

**IL-31R** – receptor interleukiny 31 (*interleukin 31 receptor*)

**IL-31RA** – podjednostka α receptora interleukiny 31 (*interleukin 31 receptor A*)

**JAK** – kinazy tyrozynowe, które są fragmentami przewodzenia sygnału w komórce (*Janus kinase*)

**JNK** – kinaza fosforylująca N-terminalną część białka Jun (*c-Jun N-terminal kinase*)

**KL** – komórki Langerhansa (*Langerhans cells*)

**LIF** – czynnik hamujący białaczkę (*leukemia inhibitory factor*)

**LIFR** – receptor czynnika hamującego białaczkę (*leukemia inhibitory factor receptor alpha*)

**LP** – liszaj płaski (*lichen planus*)

**MAPK** – kinazy aktywowane mitogenami (*mitogen activated protein kinases*)

**MMP** – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (*protein matrix metalloproteinases*)

**mRNA** – informacyjny RNA (*messenger RNA*)

**NHEK** – keratynocyty ludzkiego naskórka (*normal human epidermal keratinocytes*)

**OSM** – onkostatyna M (*oncostatin M*)

**OSMR** – podjednostka  $\beta$  receptora onkostatyny M (*oncostatin M receptor beta*)

**PBMC** – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (*peripheral blood mononuclear cell*)

**PIAS** – białka inhibitora aktywowanego STAT (*protein inhibitors of activated Stats*)

**PI3K** – kinaza-3-fosfatydyloinozytolu (*phosphatidyl-3-inositol kinase*)

**Real-Time PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (*real-time polymerase chain reaction*)

**SCORAD** – wskaźnik służący do oceny ciężkości przebiegu atopowego zapalenia skóry (*severity score of atopic dermatitis*)

**SD** – odchylenie standardowe (*standard deviation*)

**sOSMR** – rozpuszczalna forma OSMR (*soluble OSMR*)

**STAT** – układ białek błonowych odpowiedzialnych za przesłanie sygnału, aktywację i tempo transkrypcji w jądrze komórkowym (*signal transducers and activators of transcriptions*)

**STP** – skórne testy punktowe

**TEWL** – przeznaskórkowa utraty wody (*transepidermal water loss*)

**W-AZS** – punktowy wskaźnik nasilenia i rozległości świądu i stanu zapalnego skóry u chorych na atopowe zapalenie skóry

**W-AZS I** – punktowy wskaźnik nasilenia świądu i zaburzeń snu u chorych na atopowe zapalenie skóry

**W-AZS II** – punktowy wskaźnik rozległości i nasilenia stanu zapalnego skóry u chorych na atopowe zapalenie skóry



## 1. WSTĘP

### 1.1. Wprowadzenie

Atopowe zapalenie skóry (AZS, ang. *atopic dermatitis*) jest przewlekłą, nawrotową dermatozą zapalną, dotyczącą naskórka i skóry właściwej, która charakteryzuje się nasilonym świądem, typowymi wykwitami oraz lokalizacją zmian w miejscach predylekcyjnych (1-9). W patomechanizmie AZS znaczącą rolę odgrywają czynniki genetyczne, środowiskowe, immunologiczne oraz infekcyjne, a w szczególności powiązania pomiędzy nimi (10-12). Czynniki genetyczne związane są z nadprodukcją immunoglobuliny E (IgE, ang. *immunoglobulin E*), antygenowo swoistych immunoglobulin E (asIgE, ang. *allergen-specific Immunoglobulin E*), a także z zaburzeniami w zakresie bariery skórno-naskórkowej i warunkują one rozwój choroby. Z kolei ujawnienie się pierwszych objawów i przebieg schorzenia uzależnione są od czynników środowiskowych (4,11,13,14). Charakter dziedziczenia AZS jest wielogenowy, a u około 60-70% ogółu chorych wywiad rodzinny w kierunku atopii jest dodatni (1,2,10,11,15,16). W przypadku, gdy oboje rodzice obciążeni są atopią, ryzyko wystąpienia jej u dzieci wynosi 75%, natomiast, gdy atopia dotyczy tylko jednego z rodziców, to spada ono do 50% (10,11). Jest to jedna z najczęściej spotykanych chorób skóry i obserwuje się ją u 10-20% dzieci i 1-3% dorosłych (17,18). AZS najczęściej rozpoczyna się w wieku dziecięcym, a u mniej niż 20% chorych początek występuje w okresie dorosłego życia (7). Istotny jest fakt, że aż u 40-60% populacji chorych na AZS mogą wystąpić objawy innych chorób atopowych w przyszłości (4,11). W ostatnich dekadach obserwuje się wzrost częstości występowania AZS (19).

### 1.2. Współczesne poglądy na patomechanizm atopowego zapalenia skóry

Patomechanizm AZS jest złożony i nie został on dotychczas w pełni poznany. Jak wspomniano wcześniej, podnosi się rolę takich czynników jak: czynniki genetyczne, zaburzenia immunologiczne, w tym znaczenie autoantygenów, dysfunkcja bariery naskórkowej, czynniki infekcyjne, czynniki środowiskowe, w tym działanie substancji drażniących, zmiany klimatyczne i czynniki psychiczne, ze szczególnym uwzględnieniem stresu emocjonalnego oraz cyklu świąd-drapanie (3,7-9,12,20-31). Niezwykle istotne wydają się być interakcje pomiędzy tymi czynnikami (12). W etiopatogenezie AZS biorą udział zarówno mechanizmy immunologiczne, jak i nieimmunologiczne. W mechanizmie immunologicznym uczestniczą komórki dendrytyczne (DCs, ang. *dendritic cells*), wśród których szczególne znaczenie mają komórki Langerhansa (KL, ang. *Langerhans cells*),

limfocyty T (LT, ang. *lymphocytes T*) i immunoglobuliny E (32,33,34). Z kolei mechanizm nieimmunologiczny związany jest z zaburzeniami procesów biochemicznych zachodzących w naskórku oraz z zaburzeniami wydzielania neuropeptydów (35,36,37). W etiopatogenezie AZS istotne znaczenie mają również, stanowiące źródło cytokin i chemokin prozapalnych, limfocyty i keratynocyty oraz monocyty (38). Szczególną uwagę w patomechanizmie zapalenia występującego w przebiegu AZS przypisuje się keratynocytom, eozynofilom oraz komórkom dendrytycznym (12). W obrazie histopatologicznym zmian chorobowych w AZS widoczne są nacieki zawierające aktywowane limfocyty T, eozynofile, mastocyty i komórki Langerhansa (5,39,40).

Jak wspomniano wcześniej, sposób dziedziczenia AZS jest wielogenowy, a geny podatności na tę chorobę znajdują się na chromosomach: 2q, 4q, 5q, 6q, 11q, 12q, 13q, 14q, 16q, 17q i 19q (41,42). W dziedziczeniu AZS uczestniczą antygeny zgodności tkankowej MHC (ang. *major histocompatibility complex*), geny kodujące receptory dla IgE, geny receptorów limfocytów T oraz geny kodujące syntezę cytokin zapalnych (43). Powszechnie wiadomo, że choroby z kręgu atopii dotyczą w głównej mierze mieszkańców dużych miast dobrze rozwiniętych zamożnych krajów, co potwierdza słuszność obserwacji Gregga i wsp. (1983), a wzrost częstości występowania chorób alergicznych po 1960 roku może być ściśle związany z tzw. „zachodnim stylem życia” (44). Z kolei według hipotezy higienicznych zależności Strachana, rozwojowi AZS mogą zapobiec niektóre przebyte we wczesnym dzieciństwie infekcje. Wykazał on, że w rodzinach wielodzietnych ryzyko wystąpienia chorób alergicznych jest mniejsze. Przystosowanie organizmu ludzkiego do nieustannej obrony przed drobnoustrojami i pasożytami może być wynikiem, częściej występujących w rodzinach wielodzietnych o niskim statusie ekonomicznym, transmisji zakażeń. Z kolei zwiększona ilość chorób infekcyjnych przebytych w okresie dziecięcym może mieć ochronny wpływ na rozwój alergii w przyszłości (17,45). W atopowym zapaleniu skóry wykazano genetycznie uwarunkowaną skłonność do nadprodukcji immunoglobuliny E w odpowiedzi na alergeny powietrzno pochodne i pokarmowe lub/i związaną ze współistnieniem astmy, alergicznego nieżytu nosa i spojówek (3,18). Mechanizmy immunologiczne uczestniczące w etiopatogenezie AZS są związane zarówno z I, jak i z IV mechanizmem reakcji alergicznej (wg Gella i Coombsa). Obserwowane jest zwiększone stężenie cIgE w surowicy krwi oraz wzmożona ekspresja receptorów o wysokim powinowactwie do IgE (FcεR1, ang. *high-affinity Immunoglobulin E receptor*) na powierzchni komórek Langerhansa (4,11,43,46,47).

KL są to komórki dendrytyczne mające istotne znaczenie w patomechanizmie AZS. Zostały one podzielone na mieloidalne komórki dendrytyczne (mDCs, ang. *myeloid dendritic*

*cells*) i plazmocytoidalne (pDCs, ang. *plasmacytoid dendritic cells*) komórki dendrytyczne (48). Wśród odmian mDCs obecnych w obrębie zmian skórnych u chorych na AZS można wyróżnić komórki Langerhansa, uczestniczące w ostrej fazie odpowiedzi immunologicznej oraz zapalne dendrytyczne komórki naskórkowe (IDECs, ang. *inflammatory dendritic epidermal cells*), które biorą udział głównie w przewlekłej fazie choroby (49,50,51). Szczególne znaczenie w AZS odgrywają KL, które w ostrej fazie odpowiedzi immunologicznej ukierunkowują fenotyp limfocytów T w stronę fenotypu Th2 (50). W obrębie naskórka w odpowiedzi na wielkocząsteczkowe powietrzno pochodne i pokarmowe alergeny białkowe dochodzi do związania się tych alergenów z antygenowo swoistymi IgE, które poprzez receptor FcεR1, są połączone z powierzchnią KL (4,11,43,47). W węzłach chłonnych ma miejsce prezentacja alergenu przez komórki Langerhansa limfocytom T i w rezultacie dochodzi do powstania swoiście uczulonych limfocytów Th2 CD4+ (46). Po przeniknięciu ich do skóry wzmożeniu ulega synteza cytokin prozapalnych, czego następstwem jest rozwój stanu zapalnego (4,11,43,47,51). Istotny jest także udział KL w podtrzymaniu stanu zapalnego skóry, poprzez wpływ m.in. na wzrost syntezy IgE i eozynofilów (38). Z kolei komórki IDECs wpływają na syntezę i uwalnianie cytokin o profilu Th1. Interesujący jest fakt, że w AZS stwierdza się obniżoną liczbę pDCs w obrębie zmian chorobowych (52). W związku z udziałem pDCs w produkcji interferonu, który wykazuje działanie przeciwwirusowe, być może wybitna skłonność do rozwoju zakażeń wirusowych skóry w przebiegu AZS jest związana właśnie z ich niedoborem (12,52).

Wzrost IgE stwierdza się u 70-80% chorych na AZS. W zależności od wyników badań, a mianowicie wyników skórnych testów punktowych (STP) oraz antygenowo specyficznych immunoglobulin E, AZS można podzielić na wewnątrzpochodne, określane jako typ niealergicznego AZS, z ujemnymi wynikami STP i prawidłowym stężeniem asIgE, oraz zewnątrzpochodne, czyli typ alergicznego AZS, w którym STP są dodatnie, a stężenie asIgE jest podwyższone (10,11,16,18,20,53,54). Uwagę zwraca fakt, że ekspresja cytokin: interleukiny 5 (IL-5), interleukiny 13 (IL-13), interleukiny 1β (IL-1β), liczba eozynofilów naciekających skórę, eozynofilia obwodowa oraz ekspresja FcεR1 na powierzchni komórek dendrytycznych jest większa w przypadku AZS zewnątrzpochodnego, niż AZS wewnątrzpochodnego (5,39,49,54-59). Z faktu, że objawy kliniczne w obu postaciach są identyczne, można wnioskować, że ich rozwój przebiega niezależnie od stężenia IgE, choć całkowity poziom przeciwciał IgE może mieć znaczenie prognostyczne. AZS zewnątrzpochodne charakteryzuje się cięższym przebiegiem oraz wyższym ryzykiem rozwoju chorób układu oddechowego (60,61). Natomiast w przypadku AZS wewnątrzpochodnego

zaobserwowano tendencję do późniejszego początku i łagodniejszego przebiegu choroby (39,62-64).

Istotę AZS stanowią zaburzenia w równowadze pomiędzy limfocytami Th1 i Th2 (11,65-67). W zmianach ostrozapalnych dominują limfocyty Th2, następnie dochodzi do progresji w kierunku profilu mieszanego, z kolei w zmianach przewlekłych stwierdza się przewagę limfocytów Th1 (10,11). Duże znaczenie ma profil wydzielanych cytokin, który jest odmienny w ostrym i przewlekłym okresie choroby. W fazie ostrej AZS, czyli w tzw. wczesnej fazie odpowiedzi immunologicznej IgE-zależnej, w której dominują limfocyty Th2, obserwowany jest wzrost syntezy interleukiny 2 (IL-2), interleukiny 4 (IL-4), interleukiny 5 (IL-5), interleukiny 6 (IL-6), interleukiny 10 (IL-10), interleukiny 13 (IL-13), interleukiny 21 (IL-21) i interleukiny 31 (IL-31), z kolei w fazie przewlekłej, czyli w tzw. późnej fazie odpowiedzi immunologicznej IgE-zależnej, w której stwierdza się dominację limfocytów Th1, ma miejsce wzrost wytwarzania takich cytokin, jak: interferon gamma (IFN- $\gamma$ , ang. *interferon gamma*), czynnik martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ , ang. *tumor necrosis factor*), interleukina 2 (IL-2), interleukina 8 (IL-8) i interleukina 12 (IL-12) (10,11,18,35,38,40,54,68-72). Kluczową rolę w patomechanizmie AZS wydają się odgrywać złożone mechanizmy immunologiczne. Wykazano, że obserwowany w fazie ostrej wzrost IL-4, IL-13 i IL-31 jest znacząco wyższy niż w populacji osób zdrowych (55,69). Ponadto stwierdzono, że w okresie ostrym dochodzi do obniżenia stężenia IL-12 (55), zwiększenia liczby KL, wzrostu ekspresji receptora Fc $\epsilon$ R1 oraz do wzmożonej produkcji IgE przez limfocyty B (40), która ulega jeszcze większemu nasileniu pod wpływem IL-4 i IL-13 (40,73-75). IL-4 i IL-13 mają wpływ nie tylko na wzmożone wytwarzanie IgE, ale również, przy obniżonym jednocześnie poziomie IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , mogą stanowić istotny czynnik odpowiedzialny za znaczną podatność na występujące w przebiegu AZS infekcje m. in. *Staphylococcus aureus* (76,77). Cytokiny te wpływają ponadto na wzrost ekspresji receptora Fc $\epsilon$ R1 na powierzchni KL (38). IL-4 ma także pośredni wpływ na utrzymywanie się stanu zapalnego. Mianowicie uczestniczy ona w indukcji naiwnych komórek CD4<sup>+</sup> do różnicowania się w kierunku limfocytów Th2, które to, jak wspomniano powyżej, stanowią źródło cytokin i chemokin prozapalnych (6,8,9,12,78). Wzrost ekspresji IL-5 wpływa natomiast na zwiększenie chemotaksji eozynofików, wydłuża okres ich przeżycia i prowadzi do rozwoju stanu zapalnego skóry (12,38,79). Jak wiadomo, w AZS występuje eozynofilia obwodowa oraz tkankowa, a w obrazie histopatologicznym, ocenionym przy pomocy technik immunohistochemicznych, można uwidocznić złogi białek pochodzących z uległych degranulacji granulocytów kwasochłonnych (54,59,79-82).

Z kolei IL-10 uczestniczy w pobudzeniu produkcji przeciwciał i zahamowaniu wydzielania cytokin przez limfocyty Th (38). Natomiast IL-13 ma udział w różnicowaniu i wydłużeniu czasu przeżycia mastocytów oraz eozynofili oraz wpływa na syntezę IgE i IgG4 przez limfocyty B (12,40). Niski poziom immunoglobuliny E w AZS wewnątrzpochodnym może być spowodowany nie tylko obniżoną ekspresją IL-5 i IL-13 w limfocytach T, ale także brakiem pobudzenia limfocytów B do jej syntezy (5,58,83). Za przełączenie dominacji komórkowej z profilu Th2 na profil Th1 odpowiedzialne są m.in. IL-12, IL-23, interleukina 27 (IL-27) i interleukina 18 (IL-18) (84), a utrzymywanie się przewlekłego stanu zapalnego jest związane z czynnikiem stymulującym kolonie granulocytów i makrofagów (GM-CSF, ang. *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*), IL-12, IL-18, IL-11 oraz z transformującym czynnikiem wzrostowym  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1, ang. *transforming growth factor-beta1*) (55,85). W AZS dochodzi do nagromadzenia komórek zapalnych, między innymi makrofagów, które wydzielają cytokiny prozapalne, takie jak IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-18 oraz monocytów, i ma to miejsce zarówno w ostrym, jak i w przewlekłym stanie zapalnym (86-91). Jak wiadomo, makrofagi pełnią istotną rolę także w procesie fagocytozy i w wydzielaniu enzymów litycznych (91). W AZS wykazano podwyższone stężenie chemokin, takich jak CCL2 (MCP-1, ang. *monocyte chemoattractant protein-1*), CCL5 (RANTES, ang. *regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*), CCL17 (TARC, ang. *thymus and activation-regulated chemokine*), CCL18 (PARC, ang. *pulmonary and activation-regulated chemokine*), CCL29 (LARC), CCL22 (MDC, ang. *macrophage-derived chemokine*) i CCL27 (CTACK, ang. *cutaneous T-cell-attracting chemokine*), które wpływają na rekrutację leukocytów. Wykazano, że CCL17 i CCL22 uczestniczą w selektywnej rekrutacji komórek Th2 wykazujących ekspresję CCR4. Ponadto zaobserwowano pozytywną korelację zachodzącą pomiędzy stężeniami CCL17, CCL22 i CCL27 a aktywnością AZS (86,92).

Jak już wspomniano, w patomechanizmie AZS podnosi się znaczenie zaburzeń równowagi w zakresie limfocytów T (11). W warunkach *in vivo* dochodzi do wzrostu i wzmożenia aktywności limfocytów T oraz do skrócenia tzw. okresu *turnover* (93). Zmianie ulega stosunek krążących limfocytów pomocniczych CD4<sup>+</sup> do limfocytów regulatorowych CD8<sup>+</sup> na korzyść tych pierwszych i właśnie z tego wynika wzrost liczby limfocytów T (11). Zaobserwowano, że limfocyty CD4<sup>+</sup> dominują także w obrębie zmian chorobowych (94) i co ciekawe, zauważono, że na wzrost ilości komórek CD4<sup>+</sup> wpływają w istotny sposób czynniki psychiczne, a w szczególności stres (95). Na wcześniejszy kontakt z alergenem lub antygenem wskazuje obecność markera komórek T pamięci CD45RO na pochodzących ze zmian chorobowych aktywowanych limfocytach T (12,96). Z kolei antygen związany

ze skórnymi limfocytami (CLA, ang. *cutaneous lymphocyte associated antigen*), poprzez wiązanie się z E-selektyną na komórkach endotelialnych w obrębie tkanek zmienionych zapalnie, warunkuje skórne zasiedlenie limfocytów T (11,12,96,97). Czynnikiem, który wydaje się pełnić istotną rolę w regulacji CLA jest IL-12 (12).

Stosunkowo niedawno zostały wyodrębnione limfocyty Th 17, które stanowią podtyp limfocytów CD4+ (CD+Th17) i są one źródłem interleukiny 17 (IL-17). Przypisuje się im udział w patomechanizmie chorób zapalnych, tzw. chorób mediowanych przez limfocyty T, a także znaczenie w obronie przed patogenami bakteryjnymi (98). Dalszych badań wymaga jednak ich rola w patomechanizmie ostrych zmian zapalnych w AZS. Podnosi się także prawdopodobne znaczenie w patogenezie AZS komórek T regulatorowych (*Treg*) (99). Postuluje się wpływ CD4+Foxp3+Treg na rozwój objawów AZS, jednak te doniesienia wymagają dalszych badań (12).

Wykazano, że keratynocyty, poprzez produkcję białek przeciwdrobnoustrojowych, biorą udział w pierwotnej odpowiedzi immunologicznej, a poprzez uwalnianie cytokin i chemokin prozapalnych odgrywają istotną rolę w patomechanizmie AZS (92,100-103). Wśród chemokin uwalnianych przez keratynocyty i wpływających na proces zapalny należy wymienić: CXCL10, CCL22, CCL17, CCL2 (104,105). Keratynocyty są źródłem cytokin prozapalnych, a wśród nich: IL-15, IL-1, TNF- $\alpha$  oraz IL-4 (105,106). Ważną rolę w obronie organizmu przed drobnoustrojami pełnią białka przeciwdrobnoustrojowe, takie jak dermicydyna, katherlicydyna (LL-37, ang. *cathelicidin*) i ludzka  $\beta$ -defensyna (HBD-2, ang. *human beta-defensin-2* i HBD-3, ang. *human beta-defensin-3*), które uczestniczą w zwalczaniu infekcji bakteryjnych i grzybiczych, a LL-37 wykazuje również działanie przeciwwirusowe (107). Podnosi się znaczenie niedoboru tych białek w występującej w przebiegu AZS zwiększonej podatności na infekcje (76,100,108). Obniżony poziom  $\beta$ -defensyn może być rezultatem między innymi wpływu cytokin, w szczególności IL-4 i IL-13, a nie pierwotnego defektu keratynocytów (108,109). Ponadto wykazano, że upośledzenie pierwotnej odpowiedzi immunologicznej u chorych na AZS może wynikać także z polimorfizmu pojedynczego nukleotydu dla głównego receptora dla rozpoznania endotoksyny bakteryjnej, czyli Toll-like 2 (TLR-2, ang. *toll like receptor 2*) (110). Rezultatem tego jest zmieniona reaktywność komórek w stosunku do kwasu lipoteichowego i peptydoglikanów ściany komórkowej gronkowca złocistego (ang. *Staphylococcus aureus*) (110,111). Dochodzi także do zaburzeń produkcji cytokin prozapalnych przez monocyty, która wynika z ich nieprawidłowej odpowiedzi na stymulację receptora TLR-2 (112,113). Powszechnie wiadomo, że infekcje bakteryjne, grzybicze i wirusowe prowadzą do rozwoju

i zaostrzenia zmian chorobowych w przebiegu AZS (3,7-9). Wśród czynników infekcyjnych duże znaczenie mają alergeny drobnoustrojów, takich jak: *Staphylococcus aureus*, *Pityrosporum ovale*, *Candida albicans*, *Cladosporium herbarium* i *Alternaria alternata* (38,101,114). Pod wpływem superantygenów produkowanych przez *Staphylococcus aureus*, którymi są enterotoksyny gronkowcowe A-D i toksyna zespołu wstrząsu toksycznego (TSST-1, ang. *toxic shock syndrome toxin 1*) (115) dochodzi do nasilenia procesu zapalnego na drodze aktywacji limfocytów T i makrofagów, które w konsekwencji wydzielają m.in. IL-2, IL-5, IL-13 i IFN- $\gamma$  (58,68). Superantygeny mogą oddziaływać z komórkami prezentującymi antygen w sposób pośredni przez limfokiny lub bezpośredni przez enterotoksyny (68). To właśnie w wyniku działania superantygenów gronkowcowych na indukcję receptora glikokortykosteroidowego, może dojść do, obserwowanej w przebiegu AZS, niewrażliwości na leczenie glikokortykosteroidami (116).

Znaczący wpływ na etiopatogenezę AZS ma uszkodzenie bariery naskórkowej. Od wielu lat funkcjonuje hipoteza, określona jako „*outside-inside hypothesis*”, dotycząca znaczenia zaburzeń struktury i funkcji bariery naskórkowej, jako czynnika prowadzącego do rozwoju objawów choroby (12,117,118). Ułatwione wnikanie alergenów środowiskowych, prowadzi z kolei do rozwoju alergii atopowej i kontaktowej oraz do zmiany charakteru AZS z niealergicznego na alergiczny (9,119). Przeciwwagą dla tej hipotezy stanowi hipoteza „*inside-outside*”, według której uszkodzenie bariery naskórkowej jest zjawiskiem wtórnym do przewlekłego stanu zapalnego (120).

Występujące w przebiegu AZS zaburzenia w zakresie dystrybucji nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz zmniejszenie ilości ceramidów w warstwie rogowej naskórka prowadzą do wzrostu przeznaskórkowej utraty wody (TEWL, ang. *transepidermal water loss*) i w rezultacie do suchości skóry (121,122). Z kolei zaburzenia podziałów komórkowych w naskórku są wynikiem zmniejszenia aktywności delta-6-desaturazy i zahamowania przemiany kwasu linolenowego do kwasu gamma-linolenowego (12,37). W AZS zaobserwowano ponadto zaburzenia w zakresie naturalnego czynnika nawilżającego (NMF, ang. *natural moisturizing factor*) oraz metabolizmu jego składników, a wśród nich wolnych kwasów tłuszczowych (FFA, ang. *free fatty acids*) i pyrrolidonowego kwasu karboksylowego (PCA, ang. *pyrrolidone carboxylic acid*), których prekursorem jest białko występujące w warstwie rogowej naskórka, filagryna (37). Istnieją doniesienia literaturowe, w których podaje się, że mutacje genu filagryny występują co najmniej u 30% chorych na AZS i to właśnie one wpływają na różnice pomiędzy skórą pozornie zdrową i skórą prawidłową (123,124,125). Rezultatem zaburzeń w zakresie filagryny jest nie tylko

obniżenie ilości NMF, powstanie nieprawidłowości bariery naskórkowej wraz ze zwiększoną TEWL, ale również wzrost pH skóry, który to sprzyja wzrostowi jej kolonizacji przez gronkowca złocistego oraz podnosi ryzyko wystąpienia zakażeń wirusowych i grzybiczych (40,126,127,128). Defekt filagryny i zmniejszenie ekspresji białek przeciwbakteryjnych w skórze u chorych na AZS prowadzą do utworzenia nowych powiązań pomiędzy limfocytami Th1 i Th2. Pod wpływem witaminy D3 oraz inhibitorów kalcyneuryny dochodzi prawdopodobnie do wzrostu ich wytwarzania nawet przy fenotypie skierowanym w stronę dominacji limfocytów Th2 (129). Zarówno zaburzenia w zakresie filagryny, obniżenie aktywności delta-6-desaturazy, jak i, wynikająca z zaburzeń czynnościowych oraz biochemicznych skóry, a ponadto z zaburzeń ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych, zwiększona przeznaskórkowa utrata wody, prowadzą do suchości skóry i jej nadwrażliwości na działanie czynników środowiskowych (10,12.37,43,130,131).

Jak wcześniej wspomniano, na ujawnienia się choroby u osób genetycznie predysponowanych, mają wpływ czynniki środowiskowe, a w szczególności alergen powietrzno pochodne i pokarmowe, klimat, zanieczyszczenia środowiska, czynniki psychiczne i sytuacje stresowe. Podnosi się także znaczenie takich czynników, jak cykl miesięczkowy, ciąża, menopauza i gospodarka hormonalna oraz związków drażniących, a wśród nich dymu tytoniowego i wełny. Spośród alergenów powietrzno pochodnych największe znaczenie przypisuje się roztoczom kurzu domowego, alergenom pyłku roślin, alergenom pochodzenia zwierzęcego oraz alergenom pochodzenia bakteryjnego i grzybiczego (3,7,8,9,114,132). Alergia pokarmowa najczęściej występuje w populacji dziecięcej. U tych pacjentów istotne jest zarówno uczulenie na alergen pokarmowe, jak i nietolerancje pokarmowe oraz ich wpływ na nasilenie stanu zapalnego (133). Wraz z wiekiem objawy alergii pokarmowej wykazują skłonność do ustępowania, co wynika nie tylko z dojrzewania układu pokarmowego, ale również z wytworzenia się tolerancji na uczulające alergen (12). Interesujący jest także udział autoalergenów w patomechanizmie AZS, których to obecność można wykazać już we wczesnym okresie choroby (134,135). Uczestniczą one w pobudzeniu komórek dendrytycznych oraz w zapoczątkowaniu reakcji immunologicznej typu natychmiastowego, a za ich pośrednictwem dochodzi w skórze do powstania klonów limfocytów swoistych dla autoalergenów. Biorą one także udział w proliferacji CLA+ autoreaktywnych limfocytów T na obwodzie (134,136).



### 1.3. Patomechanizm świądu u chorych na atopowe zapalenie skóry

W AZS dominującym objawem jest nasilony świąd skóry, który stanowi jedno z głównych kryteriów diagnostycznych tej choroby (1,137,138,139). Co istotne, zaobserwowano, że świąd bywa obecny nawet przy braku zmian skórnych (140). To właśnie świąd i drapanie są istotnymi czynnikami inicjującymi i podtrzymującymi proces zapalny, leżący u podstaw tej dermatozy. Prowadzą one również do znacznego pogorszenia jakości życia u chorych na AZS (139,141). Świąd, który ulega nasileniu w porze nocnej, prowadzi często do zaburzeń snu (142,143). W wyniku drapania dochodzi do uszkodzenia bariery ochronnej, a w konsekwencji do łatwiejszego wnikania alergenów ze środowiska, które z kolei wpływają na nasilenie stanu zapalnego, a następstwem tego procesu jest właśnie świąd skóry. W rezultacie dochodzi do powstania tzw. „błędnego koła” (86,138,144,145). Często to właśnie świąd jest pierwszym objawem następowego nasilenia AZS (142,143). Interakcje zachodzące pomiędzy układem immunologicznym i układem nerwowym oraz udział licznych cytokin i neuropeptydów w etiopatogenezie świądu w AZS sprawiają, że pomimo przeprowadzenia licznych badań, nie została ona do końca wyjaśniona (53,138,146,146,148). W patomechanizmie świądu występującego w przebiegu AZS znaczenie mają także zaburzenia unerwienia obwodowego, ośrodkowy układ nerwowy, układ cholinergiczny, neuropeptydy, mastocyty, histamina, proteazy oraz cytokiny, a wśród nich szczególną rolę przypisuje się IL-2 i IL-31 (147,149).

Jak wspomniano powyżej, w etiopatogenezie świądu w przebiegu AZS istotny udział mają pierwotne czuciowe i autonomiczne włókna nerwowe. W wielu badaniach wykazano wzrost ilości włókien czuciowych i obniżenie liczby adrenergicznych autonomicznych włókien nerwowych (150,151). Powyższe zmiany mogą w efekcie wpływać na obniżenia progu świądowego u chorych na AZS. Przyczyniają się do tego także zaburzenia unerwienia w obrębie zmienionej chorobowo skóry, w której obserwuje się wzrost ilości czuciowych włókien nerwowych i neurofilamentów, substancji P (SP, ang. *substance P*), neuropeptydu Y oraz peptydu związanego z genem dla kalcytoniny (CGRP, ang. *calcitonin gene-related peptide*) (151). Powyższe zjawiska mają miejsce zarówno w warstwie brodawkowej skóry, jak i w obrębie połączeń skórno-naskórkowych, w naskórku oraz w otoczeniu gruczołów potowych (151,152,153). Z kolei obserwowany w przebiegu AZS wzrost wydzielania nerwowego czynnika wzrostu (NGF, ang. *nerve growth factor*), prowadzi nie tylko do przerostu zakończeń nerwowych, ale także przyczynia się do wzrostu ilości hiperplastycznych zakończeń nerwowych (149,153,154,155). Ponadto NGF ułatwia indukcję świądu poprzez wpływ na zwiększenie wrażliwości obwodowych zakończeń nerwowych, a podanie

antagonistów NGF powoduje zmniejszenie nasilenia świądu (152,156). Co ciekawe, zaobserwowano pozytywną korelację surowiczego stężenia NGF i SP ze stopniem ciężkości AZS (154,156).

Na istotną rolę ośrodkowego układu nerwowego w indukcji świądu skóry u chorych na AZS wskazuje zmniejszenie gęstości odpowiedzialnych za zahamowanie świądu receptorów  $\kappa$ -opiodowych w naskórku. Ponadto wykazano, że antagoniści receptorów opiodowych  $\mu$ , np. nalokson i naltreokson silniej obniżały świąd, niż leki przeciwhistaminowe (149). Jak wspomniano powyżej, w patomechanizmie świądu podnosi się udział licznych mediatorów, takich jak: histamina, neuropeptydy, a wśród nich substancja P, wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP, ang. *vasoactive intestinal peptide*), somatostatyna i neurotensyna, neurotransmitery, pochodne kwasu arachidonowego, cytokiny: IL-4, IL-7, IL-18, IL-2, interleukina 6 (IL-6), interleukina 8 (IL-8) i IL-31, ligazy białkowe, proteazy serynowe, antagoniści receptorów muskarynowych, acetylocholina, serotonina oraz tryptaza (40,137,138,139,148,149,157-168). Rola histaminy w patomechanizmie świądu występującego w przebiegu AZS wydaje się być kontrowersyjna. W 1938 roku Williams DH dowiódł, że podanie domięśniowe histaminy indukuje świąd skóry (169). Chociaż u chorych na AZS, zarówno w zmianach chorobowych, jak i w skórze pozornie nie zmienionej stwierdzono podwyższony poziom histaminy (170,171), to jednak często obserwuje się znikomy wpływ leków przeciwhistaminowych na uśmierzanie świądu występującego w przebiegu tej jednostki chorobowej (138,139,159,162,172,173). Co więcej, próby podania śródskórnego histaminy u myszy nie wywołały indukcji świądu (174), a w kolejnych badaniach wykazano, że zachowania świądowe mogą być w pewnym stopniu hamowane przez deksametazon, takrolimus i inhibitory receptorów opiodowych, ale nie przez, podawane w konwencjonalnych dawkach, leki przeciwhistaminowe (175-178). Ponadto, Wahlgren i wsp. (1990) wykazali, że leki przeciwhistaminowe wywierają podobny wpływ na zahamowanie świądu u chorych na AZS, jak placebo (159). Co ciekawe, według innych badaczy, podanie histaminy chorym na AZS prowadzi do zmniejszenia uczucia świądu (179). Być może powyższe rozbieżności wynikają ze zwiększonego rozpadu histaminy u chorych na AZS lub są rezultatem zaburzeń regulacji i gęstości receptora H1 (178). Dotychczas zidentyfikowane zostały cztery rodzaje receptorów dla histaminy, a mianowicie receptory: H1, H2, H3 i H4. W odbieraniu bodźców główną rolę odgrywają receptory H1, natomiast receptory H2 mają działanie modulujące. Receptory H1 i H3 znajdują się na komórkach nerwowych, a receptory H1 zlokalizowane są ponadto w obrębie śródbłonna ścian naczyń. Wykazano, że w wyniku stymulacji receptora H3 dochodzi do zmniejszenia uczucia świądu,

poprzez wpływ na zahamowanie wydzielania neuropeptydów. Do zahamowania uwalniania histaminy prowadzi ponadto pobudzenie receptorów H2 na bazofilach (180). Z kolei w komórkach zapalnych, takich jak mastocyty, eozynofile i limfocyty T został zidentyfikowany receptor H4 (181), którego stymulacja prowadzi do zwiększenia ekspresji IL-31 (182,183). Co ciekawe, ekspresję receptora H4 wykazują limfocyty Th2 chorych na AZS (183). Powyższe dane mogą stanowić wyjaśnienie szybkiego nasilenia się świądu u chorych na AZS, jako odpowiedzi na pobudzenie komórek zapalnych (148,182). Być może antagoniści receptora H4 znajdują się wśród leków wpływających na redukcję świądu u chorych na AZS, na co mogą wskazywać wyniki badań przeprowadzonych na modelu zwierzęcym. Mianowicie wykazano w nich wpływ antagonistów receptora H4 właśnie na zahamowanie świądu, przy jednoczesnym braku odpowiedzi na ograniczenie stanu zapalnego (182). Wobec powyższych doniesień, można wystosować stwierdzenie, że histamina jest istotnym, ale nie wydaje się być głównym czynnikiem świądotwórczym w AZS (139,148,149,159,162,184,185).

W zmianach chorobowych u chorych na AZS obserwuje się zwiększoną tkankową koncentrację SP oraz zmniejszoną koncentrację VIP (186). Substancja P ma wpływ na degranulację mastocytów, uwalnianie z nich histaminy i TNF- $\alpha$ , a także bierze udział w uruchomieniu kaskady kwasu arachidonowego w keratynocytach, co z kolei prowadzi do syntezy prostaglandyn (PG, ang. *prostaglandin*) i leukotrienów, w tym mającego największe znaczenie w patomechanizmie świądu, LTB4 (ang. *leukotriene B4*) (35,36,158). Co ciekawe, w wyniku iniekcji SP, u osób zdrowych dochodzi do znacznego nasilenia świądu, podczas gdy u chorych na AZS jest ono znikome (148,187). Na udział prostaglandyn w rozwoju zmian zapalnych i w indukcji świądu wskazuje redukcja zachowań świądowych uzyskana w wyniku miejscowego zastosowania prostaglandyny D2 (PGD2, ang. *prostaglandin D2*) i ich nasilenie pod wpływem inhibitora PG (188,189,190). Wykazano ponadto, że niedobór produkcji PGD2 u szczepu myszy NC/Nga prowadzi do nasilenia świądu, następowego drapania i rozwoju zmian zapalnych (188,189). Receptory dla PG znajdują się także, w obecnych w skórze, zakończeniach aferentnych włókien nerwowych (191). Prostaglandyna E2 (PGE2, ang. *prostaglandin E2*) oraz IFN- $\gamma$  wpływają na indukcję wytwarzania neurotrofiny 4 (NT-4, ang. *neurotrophin 4*), która, według najnowszych doniesień, może pełnić istotną rolę w patomechanizmie świądu w przebiegu AZS (192,193). Wykazano, że jej stężenie jest zwiększone w zmianach skórnych u chorych na AZS, a w szczególności w zmianach o morfologii świerzbiączki (ang. *prurigo lesions*) (193). Także proteazy, poprzez oddziaływanie z włóknami nerwowymi, mogą mieć udział w transmisji

świądu, a ponadto mogą one wpływać na stan zapalny skóry. Proteazy oddziałują przez receptory aktywowane proteazami (PAR2, ang. *protease-activated receptors*), których pobudzenie prowadzi do stymulacji i regulacji rozwoju neurogennego stanu zapalnego (149,191,194,195). Receptory PAR2 zlokalizowane są m. in. na keratynocytach, komórkach śródbłonna oraz na zakończeniach skórnych włókien nerwowych. Do ich pobudzenia dochodzi pod wpływem uwolnionej z mastocytów tryptazy, co w rezultacie skutkuje uwolnieniem neuropeptydów ze skórnych włókien nerwowych. Szczególne znaczenie ma substancja P, która nie tylko indukuje wynacznienie komórek zapalnych i obrzęk, ale również, jak wspomniano wcześniej, wpływa na nasilenie degranulacji mastocytów i uwolnienie z nich histaminy (138,191,194,195). Przewlekły świąd może być wynikiem m.in. nieodwracalnych zmian, do których doszło w receptorach PAR-2. W skórze chorych na AZS obserwuje się wzrost stężenia acetylocholiny. Co ciekawe, wykazano, że u chorych na AZS podanie jej do zmian chorobowych wpływało na indukcję świądu, podczas gdy w skórze pozornie zdrowej obserwowano zarówno uczucie świądu, jak i bólu, z kolei w grupie osób zdrowych wystąpiły wyłącznie dolegliwości bólowe (149).

Jak wiadomo, AZS należy do chorób, mediowanych przez limfocyty T, których obecność stwierdza się także w nacieku zapalnym (18,138). Jak wcześniej wspomniano, limfocyty wydzielają cytokiny pozapalne: limfocyty Th1 wytwarzają przede wszystkim IL-2 i IFN- $\gamma$ , natomiast limfocyty Th2 produkują głównie IL-4, IL-5, IL-13 oraz IL-31 (5,69,76,86,88,196,197). Powyższe dane mogą wskazywać na prawdopodobną rolę cytokin w indukcji świądu (138,159,162). Cytokiny są rozpuszczalnymi białkami lub glikoproteinami wytwarzanymi przez leukocyty oraz inne komórki układu odpornościowego. Ich wpływ na wywoływanie świądu znalazł potwierdzenie w badaniach przeprowadzonych na modelu myszy transgenicznym NC/Nga, z których wynika, że to właśnie cytokiny, a nie histamina i serotonina są najbardziej istotnymi czynnikami prowokującymi i podtrzymującymi świąd skóry (88,198-201). W patomechanizmie świądu w AZS największe znaczenie wśród nich mają IL-2 i IL-31, a nieco mniejsza rola jest przypisywana IL-6 i IL-8. W badaniach wykazano, że podanie śródskórne IL-2 chorym na AZS prowadzi do indukcji świądu oraz, że występuje ona u nich szybciej, niż u ludzi zdrowych i dodatkowo może ulec nasileniu przez bradykininę (202,203). W ostatnich latach podnoszona jest rola interleukiny 31 w etiopatogenezie świądu. Zwiększony poziom mRNA IL-31 (mRNA, ang. *messenger RNA*) stwierdzono w badaniach na modelu zwierzęcym, a mianowicie u myszy wykazujących zachowania świądowe (78,168). Także u chorych na AZS stężenie IL-31 lub/i poziom mRNA IL-31 jest wyższe, niż u chorych na dermatozy, którym świąd nie towarzyszy (78,88).

Znaczenie IL-6 w patomechanizmie świądu występującego w przebiegu AZS jest prawdopodobnie związane z zaburzeniami snu, wynikającymi właśnie z nasilonego świądu. Wykazano bowiem, że mogą one być spowodowane zarówno nasileniem zmian chorobowych oraz drapania, jak i wzrostem stężenia IL-6 (166). Nadal wyjaśnienia wymaga znaczenie IL-8 w patomechanizmie świądu, której zwiększone stężenie zostało wykazane u chorych na AZS zarówno w zmianach chorobowych, jak i we krwi oraz w komórkach jednojądrzastych, a w szczególności w eozynofiltrach (167). Jednak, co ciekawe, w grupie chorych, u których wykonano skórne testy punktowe z IL-8 nie stwierdzono nasilenia świądu (148).

Ponadto podnosi się udział eozynofiltrów w patomechanizmie świądu w AZS, jednak ich rola nie została dotychczas w pełni poznana. Mogą one wpływać na nasilenie świądu zarówno w sposób bezpośredni, poprzez uwolnienie takich czynników, jak: neurotoksyna pochodzenia eozynofilowego (EDN, ang. *eosinophil-derived neurotoxin*), NGF, czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF, ang. *brain-derived neurotrophic factor*), nerotrofina 3 (NT-3, ang. *neurotrophin-3*), czynnik aktywujący płytki (PAF, ang. *platelet-activating factor*), cytokiny, kinazy, prostanoidy, leukotrieny i proteazy, jak i w sposób pośredni, poprzez aktywację mastocytów, w wyniku której dochodzi do uwolnienia histaminy i proteinaz (148,199).

Do nasilenia świądu prowadzi także, występująca w przebiegu AZS, suchość skóry (37,38).

#### **1.4. Interleukina 31**

Interleukina 31 jest stosunkowo niedawno odkrytą cytokiną, która wydaje się mieć wpływ na nasilenie procesu zapalnego i świądu skóry u chorych na AZS.

Cytokiny działają poprzez obecne na komórkach receptory, które zbudowane są z części zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych, połączonych fragmentami transbłonowymi. Fragmenty zewnątrzkomórkowe składają się z domen, które są odpowiedzialne za swoistość wiązania ligandów i mają wpływ na sposób przekazywania sygnału już po związaniu danej cytokiny. Z kolei inicjowanie sygnałów w komórce odbywa się poprzez domeny wewnątrzkomórkowe. Do przekazania sygnałów niezbędna jest di- lub trimeryzacja receptorów, a do wzajemnej fosforylacji ich cytoplazmatycznych odcinków lub białek z nimi związanych dochodzi w wyniku zbliżenia się do siebie odcinków receptorów. W procesie przekazywania sygnałów cytokin biorą udział kinazy tyrozynowe JAK (JAK, ang. *Janus kinases*) oraz białka STAT (STAT, ang. *signal transducers and activators of transcription*),

które po aktywacji komórki przemieszczają się do jej jądra i działają jako czynniki transkrypcyjne. Swój udział w przekazywaniu sygnału mają również szlaki fosfataz guanozyno-5'-trifosforanu (GTPaz, ang. *guanosine triphosphate (GTP) hydrolase*) i kinaz białkowych aktywowanych przez mitogeny (MAPK, ang. *mitogen activated protein kinases*), kinazy tyrozynowe z rodziny Src- (ang. *proto-oncogene tyrosine-protein kinase*) i Tec-podobnych (ang. *tyrosine-protein kinase*) oraz kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K, ang. *phosphatidyl-3-inositol kinase*) (204).

Interleukiny (IL), a w szczególności: interleukina 1 (IL-1), interleukina 6 (IL-6), interleukina 15 (IL-15), interleukina 17 (IL-17), interleukina 18 (IL-18), interleukina 21 (IL-21), interleukina 25 (IL-25), interleukina 31 (IL-31) i interleukina 32 (IL-32), charakteryzują się możliwością stymulowania komórek różnych linii, będących na różnych etapach różnicowania. Uczestniczą one w apoptozie, reakcjach zapalnych, alergicznych i autoimmunologicznych (205).

#### **1.4.1. Budowa interleukiny 31 i jej receptora**

IL-31 jest zbudowana z czterech spiralnych alfa helis (86,140). Została ona zidentyfikowana w 2004 roku, po odkryciu podjednostki alfa jej receptora (IL-31RA, ang. *interleukin 31 receptor A*), nazywanego w literaturze również GLM-R (ang. *GP130-like monocyte receptor*), GPL-130, GPL lub receptorem gp130 (ang. *gp130-like receptor*) (86,206,207,208). Heterodimeryczny receptor IL-31 (IL-31R), składa się z kompleksu receptora A dla IL-31 (IL-31RA) oraz z receptora onkostatyny M - OSMR $\beta$  (OSMR, ang. *oncostatin M receptor*) (86,204,206,207,208). IL-31RA należy do podrodziny receptorów gp130, jest on homologiem gp130 (86,206,207,208) i jest on specyficzny dla szlaku działania receptora IL-31 (86). IL-31RA wraz z OSMR tworzy funkcjonalny kompleks receptora dla IL-31 i pośredniczy on w przekazywaniu sygnału właśnie w połączeniu z podjednostką OSMR (86,140,206,207). Jak wiadomo, połączenie składników receptorów różnych cytokin skutkuje wysokim powinowactwem kompleksu receptora (209).

Na podstawie ogólnej długości i struktury sugeruje się przynależność IL-31 do grupy cytokin krótkołańcuchowych (86,209,210). IL-31 składa się początkowo ze 164 aminokwasów (aa), natomiast dojrzały region zawiera 141 aminokwasów (86,140). Choć geny *IL31* dojrzałych myszy są w 31% identyczne z jej ludzkim odpowiednikiem, to już białka wykazują homologię na poziomie 61% (86) (rycina 1). Białka te nie wykazują aktywności krzyżowej (211).

Gen kodujący ludzką IL-31 jest zlokalizowany na chromosomie 12q24.3, natomiast gen *IL31RA* znajduje się na chromosomie 5q11.2 (86,206,207). Z kolei u myszy gen *IL31* znajduje się na chromosomie 5 i posiada dwa warianty splicingowe (207). Pierwszy z nich wykazuje homologię w stosunku do ludzkiej IL-31RAv4, natomiast drugi, to postać rozpuszczalna, która składa się z domeny wiążącej cytokiny (CBD, ang. *cytokine binding domain*) i domen typu fibronektyny III. Pełnej długości IL-31RA myszy wykazuje w 61% identyczność w sekwencji aminokwasów z ludzką IL-31RA (86).

```

hIL-31 ----SHTLPVRLLRPSDDVQKIVEELQSLSKMLLKD--VEEEKGV      39
mIL-31 ----TCSLSFGAPI SKEDLRTTI DLLKQESQDLYNNYSIKQASGM      42

LVSQNYTLPCLSPPAQPPNNIHSPAIRAYLKTIRQLDNKSVIDEI      84
SADESIQLPCFSLDREALTNI SVII IAHLEKVKVLSE-NTVDTSWV      86

IEHLDKLIFQDAPETNISVPTDTHE---CKRFILTISQQFSECMD      127
IRWLTNISCFNPLNLNISVPGNTDESYDCKVFVLTVLKQFSNCMA      131

LALKSLTSGAQQATT      141
RLQAKDNTTC           141

```

Rycina 1. Sekwencje aminokwasów ludzkiej(h) i mysiej(m) IL-31 (86)

**Legenda:**

**hIL-31**-ludzka IL-31

**mIL-31**-mysia IL-31

#### 1.4.1.1. Podjednostka IL-31RA

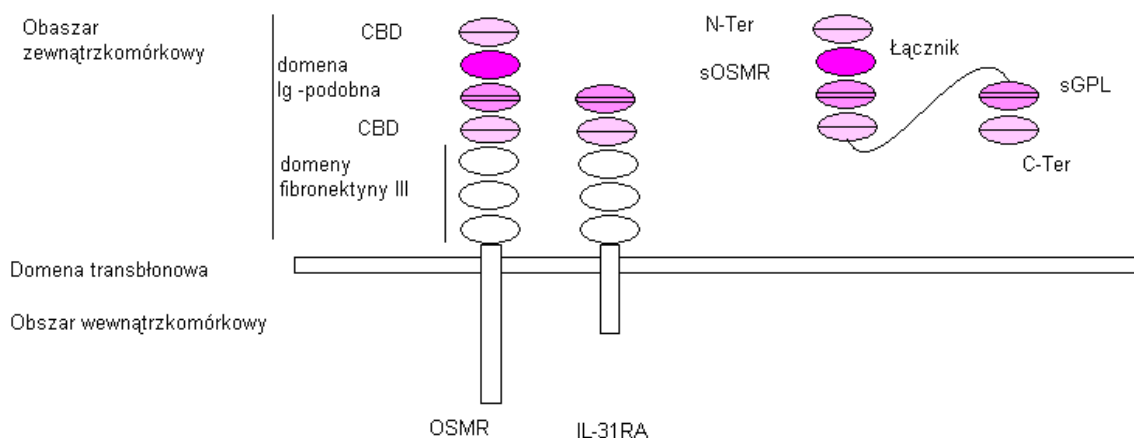
Podjednostka IL-31RA została odkryta przez trzy niezależne grupy badawcze. Ghilardi i wsp. (2002) poszukiwali domniemanych receptorów cytokin i cDNA kodującego pełnej długości ludzki receptor monocytów GLM-R (206). Z kolei Diveu i wsp. (2003) wyizolowali DNA komplementarny do mRNA (cDNA, ang. *complementary DNA*), kodujący receptor cytokin GPL z linii mielomonocytów U937 i linii komórek glejaka GO-G-UVM (207). W kolejnym badaniu Dillon i wsp. (2004) zidentyfikowali egzon kodujący część receptora czynnika hamującego białaczkę (LIFR, ang. *leukemia inhibitory factor receptor alpha*). Badacze klonowali geny *IL31* i badali, w oparciu o proliferację komórek łożyska, receptory członków rodziny gp130, w tym IL-31RA. Następnie w aktywowanych jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC, ang. *peripheral blood mononuclear cell*) zostały odkryte cztery warianty receptora cytokin typu 1, które później oznaczono jako

IL-31RAv1-v4, natomiast z jąder myszy zostały wyizolowane dwa warianty cDNA kodujące IL-31RA (86).

Dillon i wsp. wyizolowali linię komórek BaF3 (ang. *a lymphoid cell line dependent on interleukin-3 (IL-3) for survival and proliferation*) produkujących IL-31RA, samodzielnie lub w skojarzeniu z gp130, podjednostką  $\beta 1$  receptora interleukiny 12 (IL-12R $\beta 1$ ), podjednostką  $\beta 2$  receptora interleukiny 12 (IL-12R $\beta 2$ ), receptorem A interleukiny 27 (IL-27RA), receptorem interleukiny 23 (IL-23R) lub OSMR (86). Potwierdzeniem faktu, że funkcjonalny kompleks receptora dla IL-31 składa się z IL-31RA i OSMR jest zahamowanie proliferacji komórek BaF3 w odpowiedzi na IL-31, do której dochodzi w wyniku działania przeciwciał anty-OSMR. Odpowiedź na czynnik, który został określony jako IL-31, uzyskano wyłącznie w komórkach wyrażających ekspresję zarówno *IL31RA*, jak i *OSMR* (86,209).

W ostatnio przeprowadzonych badaniach podnosi się prawdopodobne znaczenie w procesie leczenia AZS białek, będących inhibitorami cytokin. W badaniu Metz i wsp. (2008) zaprezentowany został prototyp inhibitora dla czynnika hamującego białaczkę (LIF, ang. *leukemia inhibitory factor*), działającego przez receptor gp130. Okazało się, że formy obcięte mysiego receptora LIF są silnym inhibitorem dla ludzkiego LIF. Poprzez połączenie modułu wiążącego cytokinę (CBM, ang. *cytokine binding module*) mysiego gp130 z pierwszymi pięcioma domenami zewnątrzkomórkowymi powstaje białko fuzyjne LIFR (LIF-RFP, ang. *leukemia inhibitory factor receptor fusion protein*), które hamuje fosforylase tyrozynową STAT3 (212). Z kolei w badaniu Venereau i wsp. (2010) został wygenerowany silny antagonist IL-31, OSMR-L-IL-31RA, który składa się z 720 aminokwasów. To białko fuzyjne jest zbudowane z zewnętrznych części OSMR i IL-31RA, połączonych łącznikiem i wykazuje znaczne zdolności neutralizujące w stosunku do IL-31, jednak nie wpływa ono na onkostatynę M (OSM, ang. *oncostatin M*). Mechanizm jego działania związany jest z zahamowaniem wiązania IL-31 z kompleksem receptora błonowego, przez co dochodzi do zahamowania szlaków sygnałowych STAT i MAPK (72) (rycina 2).





**Rycina 2. Budowa receptora IL-31 i podjednostek receptora IL-31 (72)**

**Legenda:**

**CBD** - domena wiążąca cytokinę

**IL-31RA** - podjednostka A receptora IL-31

**OSMR** - podjednostka  $\beta$  receptora IL-31

**sOSMR** - rozpuszczalna forma OSMR

**sIL-31RA** - rozpuszczalna forma IL-31RA

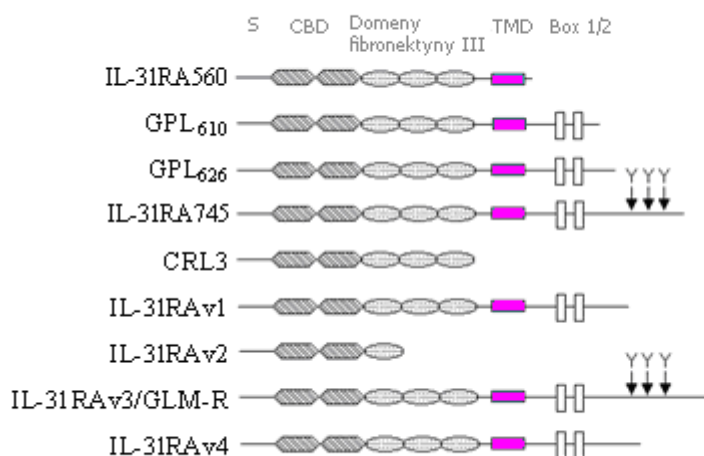
**N-Ter** - koniec N-terminalny

**C-Ter** - koniec C – terminalny

W zależności od długości łańcucha aminokwasów, możemy wyróżnić kilka izoform IL-31RA. Izofорма długa IL-31RA zbudowana jest z 745 aminokwasów (aa) i zawiera 3 wewnątrzkomórkowe motywy tyrozynowe, a krótka składa się z 560 aa (87,207). Badania przeprowadzone przez Diveu i wsp. (2004) wykazały, że u ludzi, w zależności od ekspresji krótkiej lub długiej izoformy receptora IL-31RA, obserwowano różne reakcje w badanych liniach komórkowych. Pełną zdolność sygnalizacji wykazuje tylko długa izofорма (IL-31RA745), podczas gdy pozbawiona konserwatywnych sekwencji bogatych w prolinę *box1*, czyli motywu wiążącego kinazy tyrozynowe JAK, izofорма krótka (IL-31RA560), wywiera głęboki hamujący wpływ na działanie IL-31 i zachowuje się jak receptor negatywnie dominujący. Nieznaczny, choćby dwukrotny, wzrost ekspresji izoformy krótkiej *IL31RA560* silnie neutralizuje sygnały IL-31RA745 i może spowodować znaczny antagonizm kaskady sygnału IL-31 (87).

Oprócz izoform IL-31RA560 i IL-31RA745 w literaturze opisano także warianty GPL610, GPL626, CrL3, GLM-R oraz jak wspomniano wcześniej, IL-31RAv1-v4. IL-31RA560, GPL610, GPL626 i IL-31RA745 składają się odpowiednio z 560 aa, 610 aa, 626 aa i 745 aa, natomiast IL-31RAv1, v2, v3, v4 i zawierają odpowiednio 649 aa, 324 aa, 764 aa i 662 aa. GLM-R składa się z 764 aa i jest on w 100% identyczny z IL-31RAv3.

Poszczególne izoformy różnią się długością peptydu sygnałowego. Mianowicie hydrofobowy peptyd sygnałowy IL-31RAv1 i IL-31RAv2 składa się z 19 aa, z kolei peptyd sygnałowy izoform IL-31RA560, GPL626 i IL-31RA745 zbudowany jest z 33 aa. Peptydy sygnałowe GLM-P/IL-31RAv3 i IL-31RAv4 składają się odpowiednio z 51 aa i 32 aa. Podobnie jak peptydy sygnałowe, GLM-R/IL-31RAv3, IL-31RA745, IL-31RAv1 i IL-31RAv4 wykazują charakterystyczne cechy receptora cytokin typu 1. Z kolei GLM-R/IL-31RAv3 i IL-31RA745 zawierają trzy dodatkowe reszty tyrozynowe w części cytoplazmatycznej, które służą jako miejsca przyłączania dalszych cząsteczek sygnałowych z domeną SH2 (SH2, ang. *Src homology 2*). IL-31RA560 posiada tylko domeny: pozakomórkową i transbłonową, natomiast CRL3 i IL-31RAv2 są dwoma rozpuszczalnymi receptorami pozbawionymi regionu transbłonowego. Wykazano, że transdukcja sygnału wewnątrzkomórkowego jest możliwa tylko poprzez GLM-R/IL-31RAv3, IL-31RA745 i IL-31RAv4 (86,206,207). Izoformy receptora IL-31RA zostały przedstawione na rycinie 3.



**Rycina 3. Izoformy podjednostki IL-31RA u ludzi (78)**

**Legenda:**

**S** – białko sygnałowe

**CBD** – domena wiążąca cytokinę

**TMD** (*transmembrane domain*) – domena transbłonowa

**Box1/2** (*cytoplasmic signaling motifs box 1 i box 2*) – krótkie konserwatywne cytoplazmatyczne motywy receptora

**Y**- tyrozyna

**IL-31RA560, GPL 610, GPL 626,IL-31RA745, CRL3, GLM-R, IL-31RAv1-4** – izoformy receptora IL-31RA

Poszczególne cytokiny łączą się zwykle z jedną podjednostką multimericznego receptora (213). W przypadku cytokin rodziny IL-6, LIFR preferencyjnie wiąże LIF, natomiast gp130 zachowuje się jak konwerter podjednostki, który pozwala na dimeryzację

receptora i wysłanie sygnału (214). W porównaniu z innymi cytokinami typu IL-6, IL-31 sygnalizuje poprzez unikalny kompleks receptorów. Inne potrzebują przynajmniej jednego gp130, natomiast IL-31, wg dzisiejszej wiedzy, nie potrzebuje gp130. Jak wspomniano wcześniej, heterodimer receptora IL-31 składa się z IL-31RA i OSMR (206,207), natomiast IL-31 wiąże się bezpośrednio z IL-31RA (87,215).

Podnosi się znaczenie zależności poziomu ekspresji *IL31RA* od stopnia zróżnicowania komórek. Mianowicie w badaniach *in vitro* wykazano, że zmiana ekspresji *IL31RA* zależy od stanu zróżnicowania komórek i wpływu cytokin prozapalnych. Jak wcześniej wspomniano, w wyniku indukcji monocytów i keratynocytów ludzkiego naskórka (NHEK, ang. *normal human epidermal keratinocytes*) przez IFN- $\gamma$  dochodzi do znacznego wzrostu ekspresji *IL31RA* (86,210). Co istotne, nie obserwuje się wpływu IFN- $\gamma$  na ekspresję *IL31RA* w NHEK pod koniec fazy różnicowania. Tak więc proliferujące keratynocyty wykazują wyższe poziomy mRNA IL-31RA i pozostają wrażliwe na stymulację IL-31, podczas gdy keratynocyty zróżnicowane przestają na nią odpowiadać. Powyższe wyniki wskazują na większą wrażliwość na działanie IL-31 keratynocytów będących na wczesnych etapach różnicowania oraz na obniżenie poziomu mRNA IL-31RA w terminalnie zróżnicowanych keratynocytach ludzkiego naskórka (210), co w konsekwencji prowadzi do utraty odpowiedzi na cytokiny. W zróżnicowanych keratynocytach nie udało się wykryć jakiegokolwiek aktywacji STAT. Z kolei nie zaobserwowano wpływu stopnia zróżnicowania keratynocytów na stymulację wydzielania OSMR, w wyniku której dochodzi do fosforylacji tyrozyny STAT3, co oznacza, że zróżnicowane keratynocyty ogólnie reagują na leczenie cytokinami lub przynajmniej na OSM (86).

IL-31RA posiada domenę zewnątrzkomórkową, domenę transbłonową oraz domenę wewnątrzkomórkową. Domena zewnątrzkomórkowa IL-31RA składa się z pięciu poddomen typu fibronektyny III podobnych (ang. *Fn-III likes domain*) (rycina 3). Pierwsze dwie, wraz z czterema konserwatywnymi resztami cysteiny i motywem WSxWS tworzą CBD. Choć budowa IL-31RA i innych receptorów z tej rodziny jest podobna, to ta strukturalna homologia nie znajduje odzwierciedlenia w pierwszorzędowej sekwencji aminokwasowej (216). Domena wewnątrzkomórkowa posiada motyw bogaty w prolinę (*box1*) oraz zawiera trzy reszty tyrozynowe (Y652, Y683, Y721). *Box1*, poprzez przyłączanie kinaz z rodziny JAK, pełni kluczową rolę w przekazywaniu sygnału. Z kolei reszty tyrozynowe są konserwatywne pomiędzy człowiekiem a myszą, a ich fosforylacja pozwala na interakcję z białkami przekazującymi sygnał do komórki (206,207). Wszystkie trzy reszty tyrozynowe biorą udział

w aktywacji STAT1 (222). Tyrozyna Y721 rekrutuje STAT3, podczas gdy Y652 jest niezbędna do aktywacji STAT5 (86,207,208).

Interesująca wydaje się być analiza cDNA IL-31RA uzyskanych z PBMC, promielocytów U937 i komórek glioblastomy GO-GUVM, która wskazuje na możliwość istnienia wariantów splicingowych, czyli kodujących kilka różnych izoform IL-31RA. Dwa z tych wariantów, które zbudowane są wyłącznie z domen pozakomórkowych mogą być rozpuszczalne, a więc pełnić rolę antagonistów (86,207). Należy jednak zauważyć, iż dotychczas nie zostało stwierdzone, czy te warianty w ogóle podlegają ekspresji.

#### **1.4.1.2. Podjednostka OSMR**

Jak wspomniano wcześniej, OSMR odgrywa istotną rolę konwertera w kompleksie receptora IL-31. Istotność OSMR w przekazywaniu sygnału podkreśla wspomniany już fakt, że przeciwciała neutralizujące anty-OSMR są w stanie całkowicie zablokować funkcjonalną odpowiedź na IL-31. Na znaczenie OSMR w transdukcji sygnału transbłonowego (nazywanego w literaturze także przezbłonowym) w odpowiedzi na IL-31 wskazuje jedynie nieznaczny wpływ substytucji wszystkich reszt tyrozynowych w regionie międzykomórkowym IL-31RA na zdolność przekazywania sygnału przez kompleks receptora IL-31 na drodze STAT (87,217).

Domena zewnątrzkomórkowa OSMR składa się z 6 poddomen typu FnIII- podobnych oraz z domeny Ig- podobnej (ang. *Ig-like domain*) (rycina 3). Poddomeny druga i trzecia FnIII- podobna i Ig- podobna tworzą CBD. Poprzez motywy *box1* i *box2* dochodzi do połączenia domeny wewnątrzkomórkowej z białkami JAK1 i JAK2 i w rezultacie do fosforylacji reszt tyrozynowych STAT3 i STAT5 w ich obrębie (217,218). Poza białkami STAT, rekrutowana jest także PI3K, która uczestniczy w stymulacji szlaku PI3K/AKT (kinaz serynowo-treoninowych AKT, ang. *the serine-threonine kinase*) (217).

Dzięki interakcji OSMR, poprzez fosforylowaną tyrozinę Y861-P, z białkiem adaptorowym Shc, ma miejsce aktywacja szlaku RAS/RAF (RAF, ang. *proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*) i MEK (ang. *ERK activator kinase*) /ERK (220). Dalszych badań wymaga wysoce prawdopodobna stymulacja szlaku p38 i kinaz fosforyzujących N-terminalną część białka Jun (JNK, ang. *c-Jun N-terminal kinase*), także poprzez białko Shc (221-223). Ze względu na to, że powyższe wnioski zostały wysunięte na podstawie badań przeprowadzonych na OSMR jako na dimerze z gp130, dalszej analizy wymaga zachowanie OSMR zdimeryzowanego z IL-31RA (216). OSMR, w odróżnieniu od IL-31RA, może rekrutować SHP-2 oraz Shc i dzięki temu uczestniczy on w aktywacji kaskad MAPK.

Wyjaśnienia wymaga jednak kwestia, czy opisane powyżej ścieżki aktywowane są we wszystkich komórkach posiadających receptor dla IL-31, czy też istnieją jakieś nieznanne różnice tkankowo specyficzne (216,217).

OSMR odgrywa istotną rolę w sytuacjach patologicznych, wykazując aktywność cytotatyczną w stosunku do linii komórkowych pochodzących z guzów litych, a także uczestnicząc w proliferacji i aktywacji komórek śródbłonna, w indukcji odpowiedzi prozapalnej oraz w syntezie białek ostrej fazy przez wątrobę. Myszy pozbawione OSMR charakteryzują się normalnym fenotypem i wykazują jedynie obniżoną liczbę płytek krwi (224).

Rozpuszczalna forma OSMR (sOSMR, ang. *soluble OSMR*) jest wydzielana przez komórki nowotworowe glejaka, raka wątroby i czerniaka, a jej obecność stwierdzono ponadto w surowicy osób zdrowych z podwyższonym poziomem białka szpiczaka mnogiego. Tkankowa dystrybucja rozpuszczalnego receptora sOSMR wykazuje preferencyjną ekspresję w płucach, wątrobie, trzustce i łożysku. Wykazano, że OSM może pozytywnie regulować syntezę własnych rozpuszczalnych receptorów w komórkach nowotworowych (225).

#### **1.4.2. Ekspresja receptora interleukiny 31**

Ekspresja ludzkich i mysich *IL31RA* została stwierdzona w skórze, płucach, tchawicy, mózgu, jądrach, jajnikach, prostaty, łożysku, śledzionie, grasicy, mięśniach szkieletowych, szpiku kostnym i leukocytach krwi obwodowej (86,138,205,206). Ponadto, niektóre linie komórek ludzkich również wykazują ekspresję *IL31RA*, na przykład komórki glejowe pochodzenia linii komórkowych GO-G-UVM i U87MG, linia komórek czerniaka A375, linia komórek mielomonocytowych U937 i linia komórkowa ostrej białaczki monocytowej (THP1, ang. *a human acute monocytic leukemia cell line*) (206). Komórki krwi i szpiku kostnego wykazują ekspresję *IL31RA* we wszystkich komórkach linii mielomonocytowej, począwszy od hematopoetycznej komórki szpikowej, na aktywowanej komórce dendrytycznej skończywszy (208,209). Obecność mRNA IL-31RA stwierdzono w aktywowanych monocytach, makrofagach, szpikowych komórkach progenitorowych, keratynocytach, eozynofilach, komórkach nabłonka i mastocytach (86,87,887,90,208,226,227). Z kolei wysoki poziom mRNA IL-31RA wykazano w skórze, grasicy, prostaty i szpiku kostnym (138,206).

Interesujący jest fakt, że ekspresja *IL31RA* jest silnie wyrażona w tkankach biorących udział w reprodukcji, w szczególności w jądrach, ale także w jajnikach, prostaty i łożysku (86,206,207). W świetle tego faktu, szczególnie ciekawa wydaje się być homologia białka IL-31RA czy też genu *IL31RA* z receptorem *Dome* u *Drosophila*, przy czym podobieństwo

*Dome* z domeną CBD i FnIII IL-31RA sięga 29,7% (207). Receptor *Dome* odgrywa ważną funkcję u *Drosophila* w segmentacji zarodka i utrzymaniu niszy dla linii płciowej komórek macierzystych w mieszkach i jądrach (125,228,229). W świetle powyższych danych, można przypuszczać, że IL-31/IL-31R może pełnić ważną rolę w reprodukcji (78).

Ekspresję *IL31RA* stwierdzono zarówno w dojrzałych, jak i w rozwijających się zwojach korzeni grzbietowych rdzenia kręgowego (DRG, ang. *dorsal root ganglia*) oraz w zwojach czuciowych nerwu trójdzielnego, a ponadto w aferentnych włóknach w rdzeniu kręgowym i w skórze właściwej. Stwierdzono także, że ekspresja *IL31RA* pojawia się później niż ekspresja *OSMR*. Nie wykazano jej dotychczas w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) (230).

Z kolei ekspresję *OSMR* wykazano w większej ilości tkanek, z najwyższym poziomem w skórze, tchawicy i grasicy (86). Stwierdzono ją także w podgrupie małych nocycyptywnych neuronów w zwojach korzeni grzbietowych rdzenia kręgowego (231).

Ekspresja obu podjednostek *IL31R* została stwierdzona na aktywowanych przez IL-31 monocytach, makrofagach, eozynofilach, keratynocytach, komórkach nabłonka oraz mieloidalnych komórkach preogeneratorowych, które występują w skórze, jądrach, szpiku kostnym, mięśniach szkieletowych, nerkach, jelicie grubym, grasicy, jelicie cienkim, tchawicy i oskrzelach (86,87,88,90,208,211,232). Z kolei najwyższą ekspresję *IL31* wykazano w obwodowym układzie nerwowym w zwojach nerwowych korzeni grzbietowych rdzenia kręgowego (86,88,90,230). U chorych na AZS ekspresja *IL31* została wykazana przede wszystkim, ale nie wyłącznie, na aktywowanych komórkach Th2 CD4+ i CD45RO skórnych CLA+ dodatnich limfocytach pamięci (89).

Wpływ stymulacji IFN- $\gamma$  na wzrost poziomu mRNA IL-31RA i *OSMR* w monocytach i komórkach dendrytycznych może wskazywać na prawdopodobny udział IL-31RA w odpowiedzi immunologicznej typu Th1 (86,87,90). Do wzrostu regulacji i aktywacji obydwu podjednostek IL-31R przez IFN- $\gamma$  dochodzi również w komórkach śródbłonki naczyń skórnych (HDMEC, ang. *human dermal microvascular endothelial cell*) (233). Ponadto ekspresję *OSMR* można wzbudzić w HDMEC także w obecności lipopolisacharydu (LPS, ang. *lipopolysaccharide*). Natomiast w monocytach obserwuje się jej wzrost zarówno w obecności lipopolisacharydu, jak i IFN- $\gamma$  (86,235).

Ekspresję *IL31*, *IL-31RA* i *OSMR*, jak wspomniano wcześniej, mogą zwiększać nie tylko LPS oraz IFN- $\gamma$ , ale także cytokiny prozapalne, takie jak TNF- $\alpha$  i interleukina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (90). Cornelissen i wsp. (2011) udowodnili wpływ UVB (290-320nm) i reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*, np. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na wzrost poziomu mRNA IL-31

w PBMC i w skórze, a w szczególności w komórkach T, monocytach i komórkach dendrytycznych oraz w makrofagach. Stymulacja przez  $H_2O_2$  prowadzi do umiarkowanego wzrostu ekspresji *IL31* w keratynocytach naskórkowych i fibroblastach skórnych (234).

Jak wspomniano wcześniej, IL-31 wydzielana jest przede wszystkim przez limfocyty Th2, w mniejszym stopniu przez limfocyty Th1 (86) i przez mastocyty (235). Co ciekawe, pod wpływem promieniowania UV i nadtlenku wodoru dochodzi do syntezy IL-31 również przez monocyty, makrofagi, niedojrzałe i dojrzałe komórki dendrytyczne (234).

### 1.4.3. Interleukina 6

IL-31 należy do cytokin rodziny interleukiny 6. W skład rodziny IL-6, poza IL-6, wchodzi: interleukina 11 (IL-11), podjednostka p28 interleukiny 27 (IL-27), czynnik hamujący białaczkę, onkostatyna M, rzęskowy czynnik neurotropowy (CNTF lub CNF, ang. *ciliary neurotrophic factor*), kardiotropina 1 (CT-1, ang. *cardiotrophin 1*), neurotrofina 1/BSF3 (CLC, ang. *cardiotrophin – like cytokine*), określana w literaturze również jako neurotrofina-1 (NNT-1, ang. *neurotrophin 1*) oraz neuropoetyna (NP, ang. *neuropoetin*) (204,236-242).

Cytokiny wchodzące w skład rodziny IL-6 charakteryzują się podobnym działaniem oraz podobną strukturą receptora. Zbudowany jest on z łańcuchów alfa wiążących ligand, które są specyficzne dla każdej interleukiny oraz z identycznego łańcucha beta (gp130, CD130), którego rola polega na przenoszeniu sygnału do wnętrza komórki (89,204,207,236,240). W zależności od ilości miejsc wiążących receptor, cytokiny rodziny IL-6 można podzielić na 2 grupy. Mianowicie mogą to być trzy (I, II i III) lub dwa (II i III) miejsca wiążące receptor. Miejsce I określa specyfikę wiązania receptora alfa, miejsce II jest uniwersalne dla gp130 całej rodziny cytokin typu IL-6, natomiast miejsce III warunkuje rekrutację LIFR, OSMR i innych cząstek gp130 (242). Przedstawicielem pierwszej grupy jest IL-6, natomiast LIF, IL-27, IL-11, IL-23, OSM, lektyna i IL-31 należą do grupy drugiej (209). Inhibitor fuzyjnego receptora IL-6 (IL-6-REP, ang. *IL-6 receptor fusion protein*) wpływa hamująco na cytokiny zawierające wszystkie trzy miejsca wiążące receptor, czyli właściwie wyłącznie na IL-6 (243,244).

**Tabela nr I. Podział cytokin rodziny interleukiny 6 w zależności od ilości miejsc wiążących receptor (204)**

Interleukiny rodziny interleukiny 6 wiążące receptor poprzez miejsca I, II i III		Interleukiny rodziny interleukiny 6 wiążące receptor poprzez miejsca II i III	
Interleukina	Podstawowe działanie	Interleukina	Podstawowe działanie
<b>IL-6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- stymulacja różnicowania limfocytów B do komórek plazmatycznych</li> <li>- aktywacja limfocytów T wraz z IL-1</li> <li>- pobudzenie krwiotworzenia</li> <li>- stymulacja produkcji białek ostrej fazy- czynnik pirogeny</li> <li>- wzrost komórek białaczkowych</li> <li>- wzrost komórek śródbłónka</li> <li>- resorpcja kości</li> <li>- kacheksja</li> </ul>	<b>LIF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- stymulacja produkcji białek ostrej fazy- czynnik pirogeny</li> <li>- udział w krwiotworzeniu</li> <li>- hamowanie proliferacji komórek białaczkowych</li> <li>- wzrost komórek śródbłónka</li> </ul>
		<b>IL-27</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- aktywacja limfocytów T CD4+, CD8+ i naturalnych komórek cytotoksycznych (NK, ang. <i>natural killer</i>) do syntezy IFN-<math>\gamma</math>, cytotoksyczności i proliferacji</li> <li>- hamowanie uwalniania IL-2</li> <li>- hamowanie aktywności limfocytów Th17</li> </ul>
		<b>IL-11</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- różnicowanie limfocytów T w kierunku komórek typu Th1 i hamowanie aktywności limfocytów Th2</li> <li>- aktywacja komórek NK, monocytów i makrofagów, zwłaszcza pobudzanie tych komórek do produkcji IFN-<math>\gamma</math></li> <li>- synergistyczny z IL-2 wpływ na cytotoksyczność limfocytów</li> <li>- często antagonistyczny wpływ na efekty wywierane przez IL-10</li> <li>- stymulacja produkcji białek ostrej fazy- czynnik pirogeny</li> <li>- udział w krwiotworzeniu</li> <li>- wzrost komórek białaczkowych</li> <li>- wpływ na różnicowanie neuronów</li> <li>- wzrost wchłaniania żelaza w przewodzie pokarmowym</li> </ul>



Interleukiny rodziny interleukiny 6 wiążące receptor poprzez miejsca I, II i III		Interleukiny rodziny interleukiny 6 wiążące receptor poprzez miejsca II i III	
Interleukina	Podstawowe działanie	Interleukina	Podstawowe działanie
		<b>IL-23</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- wpływ na proliferację i cytotoksyczność limfocytów T</li> <li>- udział w krwiotworzeniu</li> <li>- stymulacja produkcji białek ostrej fazy- czynnik pirogeny</li> <li>- czynnik wzrostu dla limfocytów Th17</li> <li>- udział w zwalczaniu infekcji bakteryjnych, grzybiczych i pasożytniczych</li> </ul>
		<b>OSM</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- stymulacja produkcji białek ostrej fazy- czynnik pirogeny</li> <li>- udział w krwiotworzeniu</li> <li>- hamowanie proliferacji komórek białaczkowych</li> <li>- wzrost komórek śródbłonna</li> </ul>
		<b>LEKTYNA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- aktywacja dopełniacza</li> <li>- udział w fagocytozie</li> <li>- udział w odpowiedzi przeciwwzakaźnej</li> </ul>
		<b>IL-31</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- funkcje plejotropowe</li> <li>- udział w odpowiedzi Th2-zależnej</li> <li>- udział w AZS</li> <li>- udział w nadwrażliwości dróg oddechowych</li> <li>- udział w nieswoistych zapaleniach jelit</li> <li>- udział w hematopoezie</li> </ul>

IL-31, w przeciwieństwie do wszystkich innych członków rodziny IL-6, nie działa poprzez gp130, ale wykorzystuje IL-31RA przy udziale OSMR (78,86,87). Co ciekawe, jak wspomniano wcześniej, *IL31RA* położony jest na chromosomie 5q11.2, 24kb telomerowo od genu *IL6ST*, kodującego gp130 i wykazuje 28% homologii z gp130 (207), co może wskazywać na to, że obydwa te geny mogą być pozostałością duplikacji tego samego genu. IL-31RA wykazuje także pewien stopień homologii z LIFR, OSMR i receptorem członków rodziny IL-12 (209).

IL-6 wykazuje działanie wielokierunkowe i jest jednym z istotnych czynników wpływających na mechanizmy obronne. Uczestniczy ona w odpowiedzi immunologicznej,

reakcji zapalnej i krwiotworzeniu. Ponadto interleukiny wchodzące w skład rodziny IL-6 biorą udział w wielu podstawowych procesach fizjologicznych, takich jak wzrost neuronów, metabolizm kości, rozwój serca, proliferacja limfocytów T i B, a ich działanie immunomodulujące jest szczególnie istotne w ostrej fazie odpowiedzi immunologicznej (204,242,245). Rodzina IL-6 działa na receptory typu I i posiada kilka wspólnych motywów strukturalnych (78). Łącuchy receptora rodziny IL-6 mają budowę modułową. W ich części zewnątrzkomórkowej znajdują się: co najmniej jedna domena przypominająca immunoglobulinę, co najmniej jedna domena wiążąca cytokinę z dwoma parami konserwatywnych reszt cysteiny i motywem WSxWS oraz domeną FnIII (86,246-249). Wiązanie CBD pierwszej podjednostki receptora i domeny Ig- podobnej drugiego składnika receptora wpływa na wysokie powinowactwo wiązania cytokin do kompleksu receptora (248-252). Co ciekawe, podjednostka IL-31RA pozbawiona jest istotnego dla wiązania wielu cytokin, w tym także IL-31, modułu domeny Ig- podobnej na końcu N-terminalnym (206,207,213,248). Spośród pięciu domen podobnych do fibronektyny III (D1-D5) fragmentu zewnątrzkomórkowego IL-31RA, dwie z nich (D1 i D2) zawierają moduł wiążący cytokinę (206,207). IL-31RA posiada pojedynczą domenę transbłonową i region wewnątrzkomórkowy pozbawiony wewnętrznej aktywności enzymatycznej. Połączenia transbłonowe zawierają konserwatywne sekwencje bogate w prolinę, które uczestniczą w wiązaniu kinaz tyrozynowych JAK (207,253,254,255).

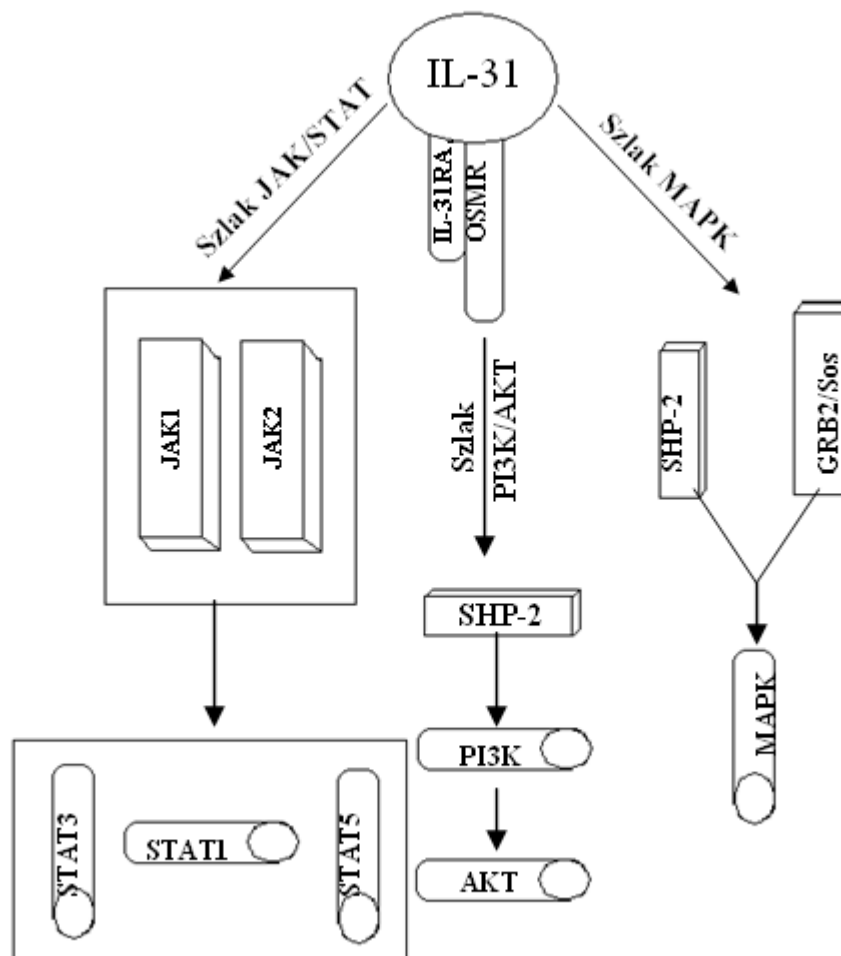
#### **1.4.4. Mechanizm działania interleukiny 31**

Jak wspomniano wcześniej, IL-31 działa na drodze trzech szlaków sygnałowych, a mianowicie: MAPK, PI3K/AKT i JAK/STAT, co zostało wykazane w badaniach przeprowadzonych na komórkach nowotworowych glioblastoma, czerniaka złośliwego, komórkach nabłonka jelit i płuc (78,86,87,90,208,225,232). Istotną rolę w przekazywaniu efektu działania członków rodziny IL-6 odgrywają kinazy ERK1/ERK2 (ERK1/ERK2, ang. *extracellular-signal regulated kinases*) oraz kinazy MAPK, które wpływają na regulację sygnału zewnątrzkomórkowego (256).

Aktywacja ERK1/2 ma miejsce wyłącznie przy obecności obydwu podjednostek receptora IL-31 (207). Po związaniu IL-31 z kompleksem receptora dochodzi do aktywacji szlaku kinaz JAK1 i w mniejszym stopniu JAK2, które następnie stymulują fosforylację dalszych cząsteczek czynników transkrypcyjnych, takich jak: STAT-3, STAT-5 i w mniejszym stopniu STAT-1 (86,205,207,208).

Chociaż wykazano, że stymulacja linii komórek glejaka wyrażających ekspresję zarówno *IL31RA*, jak i *OSMR*, poprzez IL-31 wywołała szybki wzrost fosforylacji MAPK, to jednak najistotniejsza rola w indukcji aktywacji MAPK przypisana jest sygnałowi transdukcji receptora *OSMR*, a udział *IL-31RA* jest tylko pośredni (207). Wykazano, że IL-31 wpływa na aktywację szlaku MAPK poprzez rekrutację białek adaptorowych SHP-2 (ang. *Src homology protein 2 tyrosine phosphatase 2 (SHP-2)*) i Shc (217).

Ponadto IL-31 uczestniczy w aktywacji czynnika transkrypcyjnego STAT-3 w keratynocytach, która ulega wzmocnieniu przez nasilenie regulacji *IL-31R* przez analog naturalnie występujących lipoprotein używany do aktywacji receptorów TLR2/1 (Pam3Cys, ang. *N-palmitoyl-5-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-L-cysteine*) lub, jak wspomniano wcześniej, przez IFN- $\gamma$  (257). Z kolei do negatywnej regulacji sygnalizacji STAT może dojść na drodze defosforylacji JAK lub STAT przez różne białka fosfatazy tyrozynowej, poprzez inaktywację JAK przez białka supresorowe sygnalizacji cytokin (SOCS, ang. *suppressor of cytokine signaling*) oraz przez zahamowanie aktywności transkrypcyjnej STAT przez białka inhibitora aktywowanego STAT (PIAS, ang. *protein inhibitors of activated Stats*) (258). Zaobserwowano, że PIAS1 wywiera hamujący wpływ na wiązanie DNA STAT-1, PIAS3 hamuje STAT-3, natomiast PIAS4 hamuje aktywność transkrypcyjną STAT-1, nie zakłócając przy tym zdolności wiązania DNA (259,260,261). Znalazło to potwierdzenie w badaniu przeprowadzonym u myszy, w którym okazało się, że zarówno IL-31, jak i LIF są regulowane przez charakterystyczne zestawy białek PIAS w naiwnych limfocytach T CD4 +, różnicujących się w kierunku komórek Th1 i Th17. IL-31 indukuje PIAS4 w komórkach Th1 i to nawet ponad 2-krotnie (78).



Rycina 4. Szlaki sygnałowe IL-31 (78)

**Legenda:**

**IL-31** – interleukina 31

**IL-31RA** – podjednostka  $\alpha$  receptora IL-31

**OSMR** – podjednostka  $\beta$  receptora IL-31

**JAK** (ang. *Janus kinase*) – kinazy tyrozynowe

**STAT** – białka błonowe odpowiedzialne za przekazywanie sygnału, aktywację i tempo transkrypcji w jądrze komórkowym

**MAPK** – aktywowane przez mitogen kinazy białkowe

**PI3K** – kinazy 3-fosfatydyloinozytolu

**SHP-2** – fosfataza tyrozynowa, zawierająca dwie domeny Scr homologiczne SH2

**GRB2** (ang. *Growth factor receptor-bound protein 2*) – typ białka adaptorowego związanego z receptorem czynnika (hormonu) wzrostu

**SOS** (ang. *Son of Sevenless*) – czynnik powodujący wymianę nukleozydów GDP/GTP w białkach z rodziny Ras

#### 1.4.5. Biologiczna rola interleukiny 31

Jak wspomniano powyżej, IL-31 jest wytwarzana przede wszystkim przez limfocyty Th2 i w mniejszym stopniu przez limfocyty Th1 (69,86,89). Produkcja IL-31 głównie przez

komórki Th CD4+ i szerokie spektrum ekspresji jej receptorów na komórkach układu odpornościowego oraz poza nimi sugerują, że ta stosunkowo niedawno odkryta cytokina może posiadać wielokierunkowe, plejotropowe funkcje fizjologiczne.

Badania wskazują na rolę interleukiny 31 w patologii chorób skóry i nabłonka. Co ciekawe, uczestniczy ona w rozwoju stanu zapalnego i odpowiedzi immunologicznej zarówno w schorzeniach o podłożu alergicznym, jak i w tych nie związanych z alergią (69,86,88,89,168,235,261-264). Ponadto IL-31 bierze udział w regulacji hematopoezy i odpowiedzi immunologicznej oraz odgrywa rolę w chorobach zapalnych jelit, a także w nadwrażliwości dróg oddechowych (69,78). IL-31 wpływa na aktywację szlaku JAK1, JAK2, STAT-1, STAT-3, STAT-5 i PI3K (235,265), uczestniczy w stymulacji odpowiedzi zapalnej przez miofibroblasty, indukcji wydzielania chemokin, a także ma wpływ na metaloproteinazy macierzy (MMP, ang. *protein matrix metalloproteinase*), takie jak: MMP-1, MMP-3, MMP-25 i MMP-7 (266). Ponadto, IL-31 może aktywować p38, MAPK, ERK i JNK oraz wpływać na wzrost ekspresji naskórkowego czynnika wzrostu (EGF, ang. *epidermal growth factor*), czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) i białka chemotaktycznego dla monocytów (MCP-1, ang. *monocyte chemotactic protein-1*) w komórkach nabłonka oskrzeli (BEAS-2B, ang. *immortalized human bronchial epithelial cell line*) (265). Zaobserwowano, że w przypadku hodowli BEAS-2B w obecności eozynofików, przy udziale IL-31 dochodzi do wzrostu uwalniania EGF, VEGF, CCL2, IL-6 i IL-8 (226). IL-31, obok innych cytokin, których źródłem są limfocyty Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-21), uczestniczy ponadto w reakcjach obronnych w chorobach pasożytniczych (70,71,72,267,268).

Potencjalny udział IL-31 w regulacji odpowiedzi immunologicznej może odbywać się na drodze bezpośredniej, poprzez modulowanie limfocytów T lub pośredniej, poprzez modulowanie komórek prezentujących antygen (APC, ang. *antigen presenting cells*). Ponadto IL-31 uczestniczy w reakcji ostrej fazy oraz bierze udział w proliferacji limfocytów B i T (78).

#### **1.4.5.1. Wpływ interleukiny 31 na indukcję cytokin i chemokin**

Interleukina 31 stymuluje wydzielanie licznych cytokin prozapalnych, chemokin oraz metaloproteinaz (226,268,269). Zostało to wykazane zarówno w badaniach przeprowadzonych na keratynocytach ludzkiego naskórka, jak i na podnabłonkowych miofibroblastach ludzkiej okężnicy (SEMF, ang. *subepithelial myofibroblasts*) oraz komórkach nabłonka oskrzeli (86,226,268,269). Mianowicie w wyniku stymulacji IL-31

dochodzi do wzrostu ekspresji genów wielu chemokin (od 3- do 9,5-krotnej), w tym kodujących GRO1 $\alpha$  (CXCL1) (ang. *growth-related oncogene-alpha*), TARC (CCL17), MIP-3 $\beta$  (CCL19), MDC (CCL22), MIP-3 (CCL23), MIP-1 $\beta$  (CCL4) i I-309 (86). Wskazywać to może na udział IL-31 w rekrutacji komórek wielojądrzastych, monocytów i limfocytów T do miejsc zapalnych *in vivo* (78).

#### **1.4.5.2. Znaczenie interleukiny 31 w procesie hematopoezy**

Podnosi się znaczenie interleukiny 31 w procesie hematopoezy poprzez wpływ na hematopoetyczną komórkę prekursorową (HPC, ang. *hematopoietic progenitor cell*) (211). Na udział IL-31 w procesie hematopoezy wskazuje fakt, że u zwierząt pozbawionych OSMR, dochodzi do redukcji HPC i zmniejszenia częstotliwości prekursorów erytroidalnych i megakariocytów w szpiku kostnym (216,229). Także onkostatyna M jest cytokiną, która wykazuje aktywność w stosunku do komórek hematopoetycznych i bierze udział w homeostazie komórek progenitorowych szpiku (270,271).

Co ciekawe, u myszy pozbawionych OSMR brak jest odpowiedzi zarówno na IL-31, jak i na OSM, a ponadto dochodzi u nich do zaburzeń hematologicznych, takich jak niedobór erytrocytów i trombocytów (211,224).

Z kolei u myszy, które nie wykazują ekspresji *IL31RA*, ilość hematopoetycznych komórek progenitorowych we krwi krążącej jest niezmienną, ale dochodzi do znaczącego spadku liczby bezwzględnych i niedojrzałych linii krwiotwórczych komórek progenitorowych w szpiku kostnym i śledzionie (211).

W badaniach przeprowadzonych na modelu zwierzęcym wykazano, że w warunkach *in vivo* IL-31 ma wpływ na pozytywną regulację liczby niedojrzałych subpopulacji HPC (211). Z kolei w warunkach *in vitro*, IL-31 nie wpływa na proliferację HPC, ale zwiększa ich przeżywalność przy nieobecności czynnika wzrostu. Może to mieć wpływ zarówno na krążące HPC, jak i na ich liczbę w warunkach *in vivo*. Ponadto IL-31 oddziałuje przez STAT-3 i STAT-5, których aktywacja przez wiele cytokin już okazała się niezbędna do hematopoezy (211,272).

Można przypuszczać, że interleukina 31 i podjednostki jej receptora są pozytywnie zaangażowane w regulację homeostazy HPC. Wiadomym jest, że odpowiedź immunologiczna mediowana przez limfocyty Th2, przy jednoczesnej nieobecności IFN- $\gamma$ , prowadzi do wzrostu aktywności HPC i to właśnie IL-31 może być hipotetycznym mediatorem tej reakcji (211,273). Cytokiny, takie jak OSM i IL-31, mogą wzmacniać

produkcję szpikowych komórek immunologicznych, a powyższe wyniki wskazują na prawdopodobny udział IL-31 w procesie regulacji hematopozy (211,272).

#### **1.4.5.3. Znaczenie interleukiny 31 w chorobach układu oddechowego**

Istotny wydaje się także udział IL-31 w procesach zapalnych oskrzeli i płuc oraz w astmie alergicznej. Na podstawie dotychczasowych wyników badań, w których wykazano znacznie podwyższone stężenie IL-31 u pacjentów chorujących na astmę alergiczną, wpływ IL-31 na indukcję wytwarzania cytokin i chemokin prozapalnych oraz udział IL-31 w aktywacji szlaku MAPK, wysunięto przypuszczenie, że IL-31 może odgrywać istotną rolę w patogenezie nadwrażliwości dróg oddechowych (226,232,261,274,275).

Komórkami docelowymi dla IL-31 w płucach są: komórki nabłonka oskrzeli i pęcherzyków płucnych, płucne fibroblasty oraz makrofagi (275). Na udział IL-31 w rozwoju astmy wskazuje zwiększona ekspresja *IL31RA* w populacji myszy będących modelem nadmiernej odpowiedzi dróg oddechowych (86). Obserwując częstszą zapadalność na astmę w grupie chorych na AZS, można przypuszczać, że to właśnie zapoczątkowanie odpowiedzi alergicznej w skórze prowadzi do wzmożonej odpowiedzi na alergeny wziewne w przyszłości. Przypuszczenia te może potwierdzać, wspomniany już wcześniej, cięższy przebieg choroby i większe ryzyko wystąpienia astmy u chorych na zewnątrzpochodną postać AZS, w porównaniu do chorych na wewnątrzpochodną postać tej jednostki chorobowej (276). IL-31 uczestniczy w procesach zapalnych w oskrzelach i w płucach, a ponadto wpływa na zahamowanie proliferacji komórek nabłonka płuc (232). Zaobserwowano, że u myszy transgenicznych, które są pozbawione ekspresji podjednostki *IL31RA*, w komórkach nabłonka płuc dochodzi do nasilenia procesu zapalnego mediowanego przez limfocyty Th2 i wydzielane przez nie cytokiny (262). Na tej podstawie można wysunąć przypuszczenie, że wzmożona ekspresja *IL31* u myszy transgenicznych może wpływać na ograniczenie procesu zapalnego mediowanego przez limfocyty Th2, przy jednoczesnym wzmożeniu odpowiedzi Th1-zależnej (86). Warto jednak podkreślić, że powyższe obserwacje zostały poczynione w oparciu o model zwierzęcy i specyfika tego zjawiska wymaga dalszych badań w warunkach przewlekłe trwającego stanu zapalnego z obecnością włóknienia i remodelingu tkanek (262). W warunkach *in vitro*, działanie IL-31 na proliferację komórek jest zależne od typu komórek, ich gęstości oraz od stężenia samej cytokiny. Komórki nabłonka płuc są głównymi komórkami docelowymi przede wszystkim dla onkostatyny M oraz, w mniejszym stopniu, interleukiny IL-6 i IL-31 (226,232,262). Ponadto stwierdzono, że w komórkach nabłonka oskrzeli poziom mRNA OSMR jest wyższy niż mRNA *IL-31RA*. Od kiedy udało

się wykazać, że komórki nabłonka oskrzeli, podobnie jak keratynocyty, wykazują ekspresję obydwu podjednostek receptora IL-31, postuluje się rolę IL-31 jako czynnika indukującego aktywację komórek nabłonka oskrzeli i mającego wpływ na proces zapalny zarówno w oskrzelach, jak i w płucach, a także uczestniczącego w procesach remodelingu (226).

Chociaż w ostatniej dekadzie obserwuje się dynamiczny wzrost zachorowań na astmę alergiczną, to kryteria diagnostyczne jej rozpoznania nie zostały dotychczas ustalone (277,278,279). U chorych na astmę wykazano zwiększone stężenia cytokin w tkance oskrzeli oraz w popłuczynach oskrzelowych (280,281). Na udział IL-31 w procesach zapalnych w astmie wskazuje wzrost stężenia tej cytokiny w surowicy chorych na astmę i jego korelacja z mRNA IL-31 w PBMC. Warto podkreślić, że zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem IL-31 a stopniem ciężkości astmy (274). Co ciekawe, niektóre z badań wskazują również na znaczenie IL-31 jako potencjalnego wskaźnika w astmie alergiczej (226,274). Wydaje się mianowicie, że wartościowym parametrem diagnostycznym w astmie może być oznaczenie ekspresji czynnika wzrostowego komórek pnia (SCF, ang. *human stem cell factor*) i *IL31*. Wykazano bowiem, że ich stężenie w surowicy oraz poziom mRNA w PBMC są podwyższone (274). IL-31 samodzielnie lub współdziałając z IL-4, IL-13 i eozynofilami uczestniczy w modulacji funkcji komórek nabłonka oskrzeli i poprzez aktywację szlaku MAPK przyczynia się do wzrostu produkcji czynników zapalnych. Chociaż nie wykazano bezpośredniego wpływu IL-31 na wytwarzanie CCL17 i CCL22, które są markerami astmy alergiczej, to na drodze stymulacji komórek nabłonka oskrzeli dochodzi do wytwarzania CCL2, VEGF i EGF (226). W taki właśnie sposób, czyli poprzez regulację wydzielania CCL2 i VEGF, IL-31 wywiera pośredni wpływ na nadwrażliwość dróg oddechowych i remodeling w astmie alergiczej (280,281). Powyższe doniesienia literaturowe wskazują na istotną rolę IL-31 w rozwoju i przebiegu procesów zapalnych w drogach oddechowych (226).

Podnosi się także znaczenie IL-31 w etiopatogenezie alergicznego nieżytu nosa. Mianowicie w grupie chorych z alergicznym nieżytem nosa wykazano wzrost stężenia IL-31 w PBMC stymulowanych alergenami powietrzno pochodnymi. Jednocześnie u tych pacjentów obserwowano zwiększoną ekspresję *IL5* i *IL13* (282).

#### **1.4.5.4. Znaczenie interleukiny 31 w nieswoistych zapaleniach jelit**

Ekspresja *IL31* została stwierdzona także w przewodzie pokarmowym (88,90,268,269). W chorobach zapalnych jelit (IBD, ang. *inflammatory bowel disease*), wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego (UC, ang. *colitis ulcerosa*) i chorobie Leśniowskiego-Crohna (CD, ang. *Crohn's disease*) przewlekły proces zapalny prowadzi do patologicznych



reakcji immunologicznych. Ostatnie badania wskazują na znaczenie stosunkowo niedawno odkrytych cytokin, a wśród nich interleukiny 17, IL-31 i interleukiny 32 w patomechanizmie IBD na drodze interakcji z TNF- $\alpha$  (283).

Jak już wcześniej wspomniano, cytokiny prozapalne, takie jak TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IFN- $\gamma$  oraz LPS mają zdolność wywoływania wzrostu poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że linie komórek nabłonka jelit (IEC, ang. *intestinal epithelial cells*) uzyskane od chorych na raka jelita grubego wyrażają ekspresję obydwu podjednostek receptora IL-31 (90). IL-31, pośrednicząc w aktywacji ERK-1/2, AKT, STAT-1 i STAT-3 oraz, zwiększając ekspresję *IL8* w IEC, odgrywa rolę w procesie proliferacji i migracji IEC (90,268,269,284).

Ponadto IL-31 stymuluje sekrecję cytokin prozapalnych, chemokin oraz MMP przez podnabłonkowe miofibroblasty ludzkiej okrężnicy, a także może ona mieć wpływ na wytwarzanie cytokin prozapalnych przez komórki Th2. IL-31 indukuje metaloproteinazy macierzy (MMP-1, MMP-3, MMP-25 i MMP-7) oraz, jak wspomniano wcześniej, chemokiny, takie jak IL-8, GRO1 $\alpha$ , MCP-3 (ang. *monocyte chemoattractant protein-3*), CXCL3, CCL13 i CCL15, a także cytokiny prozapalne (IL-6, IL-16 i IL-32) (269). Wpływ IL-31 na sekrecję IL-6, IL-8, GRO1 $\alpha$ , MCP-3, MMP-1 i MMP-3 jest porównywalny do działania IL-17A (90,269).

Powyższe dane wskazują na udział interleukiny 31 w patomechanizmie IBD poprzez promowanie ekspresji genów cytokin prozapalnych i modulowanie funkcji bariery IEC (90).

Ponadto podjęta została próba wykazania związku pomiędzy genami wyprysku *COL29A1* a IL-31 w nieswoistych zapaleniach jelit. Powszechnie wiadomo, że indywidualna predyspozycja do schorzeń zapalnych, takich jak astma, wyprysk, łuszczyca, choroby zapalne jelit, choroba Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego jest związana z czynnikami genetycznymi, a dysfunkcja bariery nabłonkowej występująca w przebiegu tych schorzeń prowadzi do zwiększonej podatności na działanie czynników zewnętrznych i w rezultacie do zaburzeń odpowiedzi immunologicznej (285). Co ciekawe, u chorych na AZS zostały również zidentyfikowane mutacje genetyczne w obrębie loci kolagenu II (*COL29A1*) i *IL31* (286). Ekspresja *IL31* została wykazana nie tylko w skórze chorych na AZS, ale również w zapalnie zmienionej błonie śluzowej jelita grubego u chorych na CD i UC (89,90). Z uwagi na to, że największą ekspresję *COL29A1*, poza skórą i płucami, wykazano właśnie w jelicie cienkim i w okrężnicy, podejrzewano związek polimorfizmu *COL29A1* i *IL31* z patomechanizmem IBD (292). Jednak w przeprowadzonych badaniach,

nie zaobserwowano wpływu genetycznych wariacji w tych loci na zwiększone ryzyko zachorowania na IBD w populacji (287).

#### **1.4.6. Znaczenie interleukiny 31 w chorobach skóry**

##### **1.4.6.1. Znaczenie interleukiny 31 w różnych dermatozach przebiegających ze świądem**

Poza AZS, podwyższoną ekspresję *IL31* początkowo wykazano w wycinkach ze zmian skórnych w przypadku dermatoz przebiegających z nasilonym świądem, takich jak: alergiczne kontaktowe zapalenie skóry (ACD, ang. *allergic contact dermatitis*) i świerzbiączka guzkowa (*prurigo nodularis*), a ostatnio podnosi się jej znaczenie także w patomechanizmie pokrzywki przewlekłej (*urticaria chronica*) (69,88,288).

W przebiegającej bez świądu łuszczycy (*psoriasis vulgaris*) poziom mRNA IL-31 i IL-31RA jest prawidłowy (69,88,289). Z kolei zwiększony poziom mRNA OSMR wykazano zarówno w łuszczycy, alergicznym kontaktowym zapaleniu skóry, jak i w atopowym zapaleniu skóry (69).

Świerzbiączka guzkowa jest chorobą zapalną, mającą często związek z fenotypem atopowym i co istotne, towarzyszy jej nasilony świąd (290). To właśnie u chorych na świerzbiączkę guzkową obserwuje się najwyższe poziomy mRNA IL-31 (88). Wzrost poziomu mRNA IL-31 zaobserwowano również u pacjentów ze świerzbiączką podostrą i przewlekłą, a ponadto wykazano u nich korelację pomiędzy poziomem mRNA IL-31 oraz IL-4, podobnie jak to zostało opisane w badaniu Neis i wsp. (2006) u chorych na AZS (69,289).

W związku z wykazaną zwiększoną względną liczbą transkryptów genu *IL31* w niektórych schorzeniach przebiegających z nasilonym świądem skóry, kolejne badanie nad IL-31 przeprowadzono także w grupie chorych na pokrzywkę przewlekłą, której to jednostce chorobowej zwykle towarzyszy nasilony świąd. Okazało się, że u chorych na pokrzywkę, stężenie IL-31 było wyższe niż w grupie osób zdrowych. Jak wiadomo, nie wszyscy chorzy na pokrzywkę przewlekłą odpowiadają na leki przeciwhistaminowe, ale u części pacjentów dobry efekt daje leczenie immunosupresyjne (288). Fakt ten może wskazywać na prawdopodobny udział IL-31 w patofizjologii pokrzywki przewlekłej.

Badano także poziom mRNA IL-31 w innej jednostce chorobowej przebiegającej ze świądem, jaką jest *Epidermolysis bullosa pruriginosa* (EBP), której etiopatogeneza nie jest w pełni wyjaśniona (291). Stanowi ona wariant dziedziczonej w sposób autosomalny dominujący, a sporadycznie recesywny, postaci dystroficznej *epidermolysis bullosa*

*dystrophica* (DEB). Schorzenie to przebiega z nasilonym świądem i drapaniem, co jest związane z fenotypem, a zmiany chorobowe mają typową morfologię dla dermatoz świądowych (292). Choroba ta ma związek z mutacją genu kolagenu VII (*COL7A1*), która jest wspólna zarówno dla postaci DEB przebiegającej ze świądem, jak i dla postaci, którym świąd nie towarzyszy (292,293). Nagy i wsp. (2010) badali związek pomiędzy patofizjologią DEB i polimorfizmem pojedynczego nukleotydu IL-31, jak ma to miejsce w przypadku wyprysku nieatopowego (140,291). Nie stwierdzili oni jednak zależności pomiędzy haplotypem *IL31* i EBP (291).

Kolejne badanie zostało przeprowadzone w grupie pacjentów chorych na rodzinną podstawową amyloidozę (FPLCA, ang. *familiar primary localized cutaneous amyloidosis*), której także towarzyszy przewlekły świąd skóry (294). Co ciekawe, jest ona związana z chromosomem 1q23 lub 5p13.1-q11.2, a jak wspomniano wcześniej, na chromosomie 5 znajdują się także geny innych receptorów cytokin rodziny interleukiny 6, w tym *IL31RA*. FPLCA jest genetycznie heterogeniczną chorobą, a ostatnio przeprowadzone badania wskazują na to, że może być ona spowodowana przez mutacje w genach dwóch biologicznie związanych receptorów cytokin, zlokalizowanych właśnie na chromosomie 5, a mianowicie *OSMR* i *IL31RA*. Wadliwa sekwencja aminokwasów występuje w zewnątrzkomórkowej domenie przypominającej FnIII, czyli w istotnym regionie dla dimeryzacji i działania receptora (295).

Co ciekawe, poczyniono także obserwacje w leczeniu łysienia plackowatego przy udziale przeciwciał przeciwko IL-31 (296).

#### **1.4.6.2. Znaczenie interleukiny 31 w atopowym zapaleniu skóry**

Jak wspomniano wcześniej, zarówno w ostrej, jak i w przewlekłej fazie AZS obserwowana jest eozynofilia tkankowa i obwodowa, a ponadto wykazano pozytywną korelację pomiędzy eozynofilią a stopniem nasilenia choroby (57,297). To właśnie interakcje pomiędzy eozynofilami i keratynocytami stanowią istotny mechanizm w zapoczątkowaniu lokalnej odpowiedzi zapalnej (18,266). IL-31 wpływa na stymulację eozynofilów do wydzielania znacznych ilości cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 $\beta$  i IL-6 oraz chemokin związanych z AZS, wśród których są: CXCL1, CXCL8, CCL2 i CCL18 (ponad 1000-krotnie). Działanie to ulega wzmocnieniu przez współhodowlę keratynocytów i eozynofilów, przy czym to właśnie eozynofile stanowią główne źródło uwalniania cytokin i chemokin prozapalnych (266).

Istotne znaczenie dla patogenezy AZS ma także rekrutacja eozynofiliów do miejsc zapalnych w skórze przy udziale czynników chemotaktycznych i utrzymanie ich przy udziale cząstek adhezyjnych (298). Cząstka ICAM-1 (ICAM-1, ang. *intercellular adhesion molecule 1*) pełni kluczową rolę w adherencji komórek i wykazuje interakcje z integryną LFA-1 (LFA-1, ang. *lymphocyte function-associated antigen 1*) (CD11a/CD18) (31). W warunkach współhodowli, pod wpływem IL-31 dochodzi do wzrostu ekspresji cząsteczek adhezyjnych CD18 na powierzchni eozynofiliów i cząsteczek adhezji międzykomórkowej ICAM-1 na keratynocytach oraz do interakcji pomiędzy nimi. W interakcji pomiędzy eozynofilami i keratynocytami pośredniczą: MAPK, jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) i PK3I/AKT.

Zaobserwowano, że we współhodowli eozynofiliów i keratynocytów poddanej stymulacji IL-31 może dojść do zahamowania produkcji cytokin i chemokin oraz ekspresji cząstek adhezyjnych pod wpływem swoistych inhibitorów PI3K-AKT, ERK, p38MAPK i NF- $\kappa$ B (266).

Również stymulacja *Dermatophagoides pteronissimus* wpływa na aktywowane eozynofile w kokulturze z komórkami nabłonka na szlaku p38MAPK i NF- $\kappa$ B (299). MAPK i NF- $\kappa$ B stanowią główną kaskadę uwalniania cytokin i chemokin z keratynocytów oraz regulują ekspresję komórek adhezyjnych na keratynocytach ludzkiego naskórka. Może to być punktem wyjścia w poszukiwaniu nowych leków dla pacjentów chorych na AZS (266).

Zarówno w eozynofilach, jak i w keratynocytach poddanych stymulacji IL-31 dochodzi do wzrostu fosforylacji STAT-3 oraz do zwiększenia wydzielania IL-1 $\beta$  i IL-6, co sprzyja rozwojowi miejscowej odpowiedzi zapalnej (266). IL-6 indukuje syntezę białek ostrej fazy i pośredniczy w odpowiedzi zapalnej, natomiast IL-1 $\beta$ , poprzez aktywację makrofagów, ułatwia lokalne nagromadzenie neutrofilów (300,301). Chociaż nie wykazano bezpośredniego wpływu IL-31 na eozynofile, to powyższe dane wskazują na kluczową rolę tej cytokiny w mechanizmach immunologicznych AZS właśnie na drodze aktywacji układu eozynofiliów i keratynocytów. IL-31 wpływa ponadto na opóźnienie apoptozy eozynofiliów, natomiast apoptoza keratynocytów nie ulega zmianie. Na opóźnienie apoptozy eozynofiliów może wpływać aktywacja ERK poprzez IL-31 (266).

Jak wspomniano wcześniej, w patomechanizmie AZS istotne znaczenie mają zaburzenia dotyczące filagryny. Cornelissen i wsp. (2011) wykazali, że obniżona ekspresja filagryny u chorych na AZS wynika nie tylko z mutacji genu filagryny, ale może ona być także skutkiem działania właśnie IL-31 (216).

Wiadomym jest, że ludzkie keratynocyty wykazują wysoki poziom ekspresji zarówno *IL31RA*, jak i *OSMR*. Podczas procesu różnicowania keratynocytów, dochodzi do obniżenia ekspresji *IL31RA*, a z kolei wiadomym jest, że w wyniku działania IFN- $\gamma$  ma miejsce indukcja ekspresji *IL31RA* w keratynocytach i to niezależnie od stopnia ich zróżnicowania (210). Ponadto, jak wspomniano wcześniej, poziom mRNA *IL-31RA* u chorych na AZS jest wyższy i być może wpływa to na zwiększenie wrażliwości tych komórek na działanie *IL-31* (217).

#### **1.4.6.2.1. Znaczenie interleukiny 31 w atopowym zapaleniu skóry w badaniach przeprowadzonych na modelu zwierzęcym**

Liczne badania wskazują na prawdopodobny udział *IL-31* w patomechanizmie atopowego zapalenia skóry, poprzez jej wpływ na indukcję świądu i stanu zapalnego. Badania na modelu zwierzęcym dotyczące zjawiska indukcji świądu przez drapanie rozpoczęli już w 1995 roku Kuraishi i wsp. (302). Pierwsze z badań nad znaczeniem *IL-31* zostały przeprowadzone na modelu myszy transgenicznych NC/Nga, u których występuje nadmierna ekspresja *IL31* oraz u myszy typu dzikiego, którym podano rekombinowane białka *IL-31* (NC/Nga) (86).

Myszy transgeniczne NC/Nga po raz pierwszy wyhodowano w Japonii w 1955 roku (303,304). W warunkach sterylnych, przy braku specyficznych antygenów (SPF, ang. *specific pathogen-free conditions*) nie występowały u nich zmiany chorobowe, natomiast w warunkach konwencjonalnych, począwszy od około 7-8 tygodnia życia obserwowano zmiany kliniczne typowe dla AZS. Występowały one spontanicznie i były zlokalizowane na skórze głowy, szyi, uszu oraz na grzbiecie (305,306,307). Pierwszymi objawami klinicznymi były świąd i suchość skóry. Następnie, pod wpływem drapania paznokciami, dochodziło do powstawania zmian rumieniowych, wypryskowatych i strupów. Obserwowano także zmiany o charakterze obrzękowym, krwotocznym, nadżerkowym oraz łysienie uszu, pleców, szyi i głowy. W badaniach immunohistochemicznych zmian skórnych wykazano zwiększoną liczbę eozynofiliów, mastocytów i limfocytów CD4+ (305,306). Stężenie cIgE w surowicy było podwyższone (305,306), a ponadto zaobserwowano współzależność pomiędzy stężeniem cIgE a nasileniem zmian chorobowych (305,308) i stężeniem *IL-13* (307). Stwierdzono także obecność zaburzeń dotyczących bariery naskórkowej, takich jak: zmniejszenie przewodności powierzchni, obniżenie poziomu ceramidów w warstwie rogowej i zwiększenie przeznaskórkowej utraty wody (306). Objawy kliniczne, wykładniki laboratoryjne oraz zmiany w obrazie histopatologicznym u szczepu myszy NC/Nga wykazują podobieństwo do tych, które występują u chorych na atopowe zapalenie skóry i stanowią one podstawę

do uznania szczepu myszy NC/Nga za wzorzec atopowego zapalenia skóry występującego u ludzi (175,176,305,306,307,309).

W 2004 roku Dillon i wsp. wykazali, że IL-31 jest czynnikiem, który odgrywa kluczową rolę w indukcji silnego świądu i stanu zapalnego skóry u myszy (86). W kolejnych badaniach udowodniono wpływ zachowań świądowych na rozwój zapalenia skóry (175,176,201,310,311).

Rolę drapania paznokciami u szczepu myszy transgenicznego NC/Nga, jako czynnika inicjującego rozwój zmian zapalnych, przypominających te, które występują u chorych na AZS, potwierdzili w swoich badaniach Hashimoto i wsp. (2004) (180,181). Także Takaoka i wsp. (2005,2006) dowiedli, że ekspresja *IL31* u szczepu myszy NC/Nga wykazujących zachowania świądowe jest istotnie wyższa, niż u myszy nie wykazujących takich zachowań. Zaobserwowano również korelację pomiędzy poziomem mRNA IL-31 w zmianach chorobowych i świądem skóry (168,200). Ponadto został wykazany związek poziomu mRNA IL-31 ze stopniem drapania i długotrwałymi zachowaniami świądowymi (168,175,200). Potwierdzenie udziału IL-31 w patomechanizmie świądu stanowi również fakt zmniejszenia dolegliwości świądowych u myszy po podaniu przeciwciał przeciw IL-31 (201).

Badania nad IL-31 zostały przeprowadzone także na modelu psim. Występująca u psów IL-31 jest zbudowana z 4 helis typowych dla IL-31 i składa się z aminokwasów spójnych z aminokwasami ludzkimi w 54% i mysimi w 28%. Co ciekawe, obecność receptora IL-31 została stwierdzona u psów chorych na AZS w grasicy, jądrach, śledzionie i w nerkach, ale nie stwierdzono jej w skórze. Prawdopodobnie może to wynikać to z innego mechanizmu indukcji AZS u psów. Poza tym różnice w działaniu IL-31 mogą być spowodowane relatywnie niską homologią sekwencji aminokwasów (312).

#### **1.4.6.2.2. Znaczenie interleukiny 31 w atopowym zapaleniu skóry w badaniach przeprowadzonych u ludzi**

Kolejne badania nad rolą IL-31 w AZS zostały przeprowadzone u ludzi. Choć w aktualnie dostępnej literaturze istnieją sprzeczne doniesienia odnośnie znaczenia IL-31 w etiopatogenezie atopowego zapalenia skóry, to w większości wskazują one na udział tej cytokiny w patomechanizmie tej jednostki chorobowej.

U chorych na AZS zaobserwowano podwyższone stężenie IL-31 w surowicy (313-316), a zwiększoną ekspresję mRNA IL-31 wykazano zarówno w PBMC (86,89), jak i w skórze zmienionej chorobowo (69,88,316,317,318). Co ciekawe, wzrost poziomu

mRNA IL-31 stwierdzono zarówno w zmianach chorobowych, jak i w skórze pozornie nie zmienionej (88).

Z kolei w innych badaniach nie wykazano istotnego statystycznie podwyższonego poziomu mRNA IL-31 u chorych na AZS, jednakże zaobserwowano jego tendencję wzrostową w limfocytach T CD4+ (89). Co ciekawe, nie wykazano różnicy w stężeniach IL-31 w AZS wewnątrz- i zewnątrzpochodnym (313,316), co wskazuje na to, że niezależnie od fenotypu, surowicze stężenie IL-31 ma związek ciężkością AZS.

Ponadto ekspresja *IL31* na keratynocytach, makrofagach, monocytach, mastocytach i eozynofilach jest większa w przypadku chorych na AZS niż u ludzi zdrowych (89,91,227,266).

Wyniki niektórych badań wskazują na korelację stężenia IL-31 w surowicy z nasileniem zmian chorobowych w przebiegu AZS (313-316), z kolei w innych nie wykazano związku między podwyższonym tkankowym poziomem mRNA IL-31, a stopniem nasilenia choroby (69,317). Neis i wsp. (2006) oraz Ezzat i wsp. (2011) nie zaobserwowali związku IL-31 z podwyższonym stężeniem cIgE u chorych na AZS (69,315), z kolei wyniki Kim i wsp. (2011) wskazują na współzależność stężenia surowiczego cIgE i stężenia IL-31 (316). W badaniu Neis i wsp. (2006) oraz Gambichler i wsp. (2008) nie znaleziono korelacji pomiędzy subiektywnie nasilonym świądem a szczególnie wysokim tkankowym poziomem mRNA IL-31, co jest z kolei sprzeczne z doniesieniami innych badaczy (313-316). Co ciekawe, Ezzat i wsp. (2011) podają, że stężenie IL-31 w surowicy może być uznane nawet za marker nasilenia objawów chorobowych u dzieci chorych na AZS (315).

Ponadto zaobserwowano wyraźny wzrost wydzielania IL-31 przez PBMC pod wpływem toksyn produkowanych przez *Staphylococcus aureus*, a mianowicie alfa toksyny oraz enterotoksyny gronkowcowej B (SEB, ang. *Staphylococcal Enterotoxin B*) i to zarówno u chorych na AZS, jak i u osób zdrowych, przy czym w grupie chorych na AZS wzrost syntezy IL-31 był bardziej wyraźny (319).

Wyniki powyżej przedstawionych badań wskazują na wysoce prawdopodobną rolę IL-31 w patomechanizmie świądu oraz w indukcji i utrzymywaniu się stanu zapalnego skóry u myszy wykazujących zwiększony poziom mRNA IL-31 oraz w indukcji świądu i stanu zapalnego u chorych na AZS, jednak dotychczas nie wykazano na jakiej drodze IL-31 wpływa na ich rozwój.

## 2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Coraz więcej doniesień literaturowych wskazuje na istotną rolę interleukiny 31 w patomechanizmie atopowego zapalenia skóry. W badaniach wykazano prawdopodobny związek IL-31 ze świądem oraz indukcją stanu zapalnego, występującymi w przebiegu AZS. Wyniki badań dotyczących poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR u chorych na AZS oraz ich wpływu na nasilenie zmian chorobowych i świądu w przebiegu tej jednostki chorobowej nie są jednak jednoznaczne. Ponadto zwiększoną względną liczbę transkryptów genu *IL31* obserwuje się także w innych dermatozach przebiegających ze świądem, takich jak: alergiczne kontaktowe zapalenie skóry, świerzbieżka guzkowa, pokrzywka przewlekła i amyloidoza. Co ciekawe, badania wskazują na wysoce prawdopodobny udział IL-31 w patomechanizmie astmy i alergicznego nieżytu nosa. IL-31 ogrywa istotną rolę w procesach zapalnych w płucach oraz jelitach, a także ma wpływ na proces hematopoezy. Wobec powyższych danych, w pracy podjęto próbę oceny wpływu IL-31, IL-31RA i OSMR na patomechanizm atopowego zapalenia skóry.

Głównym celem pracy było:

1. Oznaczenie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) u chorych na AZS oraz porównanie wyników z grupami kontrolnymi, które stanowili chorzy na liszaj płaski i osoby zdrowe.
2. Oznaczenie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w wycinkach skóry chorobowo zmienionej oraz pozornie zdrowej u chorych na atopowe zapalenie skóry oraz porównanie wyników z grupami kontrolnymi.
3. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) oraz w tkankach w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry.
4. Ocena zależności pomiędzy poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) i w tkankach a nasileniem stanu zapalnego i świądu u chorych na AZS.
5. Analiza zależności pomiędzy poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) oraz w tkankach a niektórymi parametrami alergologicznymi u chorych na AZS.



### 3. MATERIAŁ I METODYKA

#### 3.1. Grupy badane

Badaniem objęto 35 chorych na AZS w przedziale wiekowym od 21 do 60 lat, leczonych w warunkach szpitalnych i ambulatoryjnych w Klinice Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz w Przyklinicznej Poradni Dermatologicznej. Średnia wieku w tej grupie wynosiła 32,5 lat. W badanej grupie chorych 27 osób (77 %) było płci męskiej, a 8 osób (23%) płci żeńskiej. U 22 chorych (62,90%), obok objawów AZS, występowały także objawy innych chorób atopowych: astmy atopowej u 6 chorych (17,10%), alergicznego nieżytu nosa u 17 chorych (48,60%) oraz alergicznego nieżytu spojówek u 10 pacjentów (28,60%). W badanej grupie chorych na AZS 18 pacjentów (51,40%) pozostawało bez leczenia ogólnego przez okres od około 2 tygodni do 5 dni poprzedzających wykonanie badań, natomiast 17 chorych (48,6%) stosowało leki przeciwhistaminowe I i II generacji w dniu badania. Spośród 6 chorych cierpiących na astmę, 3 pacjentów stosowało nieregularnie, w razie duszności, preparaty wziewne o działaniu beta-mimetycznym, natomiast 3 pozostałych, ze względu na ciężkość schorzenia było zmuszonych do stosowania wziewnych preparatów glikokortykosteroidowych na stałe. U 6 chorych prowadzono swoistą immunoterapię alergenową (SITA) przez okres od 3 do 5 lat i terapia ta została zakończona na 4-7 lat przed włączeniem do badania.

Do badań wybrano dwie grupy kontrolne:

- grupa kontrolna chorych na liszaj płaski: złożona z 16 dorosłych osób z rozpoznaniem liszajem płaskim (na podstawie badania histopatologicznego) w wieku od 23 do 65 lat, leczonych w warunkach ambulatoryjnych i szpitalnych w Klinice Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz w Przyklinicznej Poradni Dermatologicznej. Średnia wieku w tej grupie wynosiła 42,0 lata. 50% chorych (8 osób) było płci żeńskiej i 50% chorych (8 osób) było płci męskiej. Średni czas trwania choroby w tej grupie wynosił 17 miesięcy. Grupa ta w dalszej części przewodu została oznaczona jako **LP**. W grupie chorych na liszaj płaski 87,50% chorych (14 osób) pozostawało bez leczenia ogólnego przez okres 2-4 tygodni przed wykonaniem badań, natomiast pozostałych 2 pacjentów (12,50%) stosowało nieregularnie leki przeciwhistaminowe I i II generacji.
- grupa kontrolna osób zdrowych: złożona z 16 dorosłych osób w wieku od 25 do 60 lat zakwalifikowanych do usunięcia dermatochirurgicznego zmian skórnych

z marginesem skóry zdrowej, leczonych w warunkach ambulatoryjnych i szpitalnych w Klinice Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz w Przyklinicznej Poradni Dermatologicznej. Średnia wieku w tej grupie wynosiła 40 lat. 6 osób (37,50%) było płci żeńskiej, natomiast 10 osób (62,50%) było płci męskiej. Grupa ta w dalszej części przewodu została oznaczona jako **Z**.

Z grup kontrolnych zostali wykluczeni pacjenci z obciążonym wywiadem osobniczym lub/i rodzinnym w kierunku chorób alergicznych.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu- uchwała nr 643/09.

*Tabela nr II. Charakterystyka liczebności poszczególnych grup badanych*

Grupa pacjentów	Liczebność grupy	Płeć		Średnia wieku (lata)	Liczba oznaczeń w PBMC	Liczba oznaczeń w tkankach
		Kobiety	Mężczyźni			
AZS	35	8	27	32,5	30	70
Liszaj płaski (LP)	16	8	8	42,0	14	15
Zdrowi ochotnicy (Z)	16	6	10	40,0	14	14

## 3.2. Metodyka

### 3.2.1. Badanie podmiotowe

U wszystkich chorych przeprowadzono dokładny wywiad, a rozpoznanie AZS postawiono w oparciu o kryteria Hanifina i Rajki (1). Uwzględniono w nim w szczególności:

- obecność i stopień nasilenia świądu
- obecność, morfologię i stopień nasilenia objawów skórnych
- obecność innych schorzeń z kręgu atopii

### 3.2.2. Badanie przedmiotowe

#### Grupa chorych na atopowe zapalenie skóry

Podstawę do oceny stanu klinicznego chorych na AZS stanowiły: punktowy wskaźnik **W-AZS** zaproponowany przez Silnego i wsp. oraz wskaźnik **EASI** (320,321).

#### **Wskaźnik W-AZS**

Wskaźnik **W-AZS** stanowi sumę punktów uzyskanych z oceny objawów podmiotowych i przedmiotowych i obliczany jest on według wzoru:

$$\mathbf{W-AZS=W-AZS\ I+W-AZS\ II}$$

**W-AZS I**-świad i zaburzenia snu u chorych na AZS

**W-AZS II**-rozległość i nasilenie stanu zapalnego u chorych na AZS

Objawy podmiotowe oceniane są na podstawie świad i zaburzeń snu występujących u chorych (tabela nr III). Skala punktowa oceny objawów podmiotowych waha się od 0 do 34 punktów. W zależności od stopnia nasilenia dolegliwości świadowych chory może otrzymać od 0 do 22 punktów, natomiast zaburzenia snu określane są także w skali punktowej od 0 do 12 punktów. W ocenie przedmiotowej uwzględnia się stopień nasilenia stanu zapalnego skóry i rozległość zmian chorobowych. Ocena nasilenia stanu zapalnego dokonywana jest przy zastosowaniu 4-stopniowej skali: 0-bez zmian, 1-słabe nasilenie, 2-średnie nasilenie, 3-znaczne nasilenie zmian. Ocenie poddaje się takie wykwity chorobowe, takie jak: rumień/grudki obrzękowe, pęcherzyki/nadżerki, strupy/złuszczenie oraz lichenizacja/przebarwienia. Wskaźnik **W-AZS** umożliwia różnicowanie zmian chorobowych charakterystycznych dla ostrego i przewlekłego stanu zapalnego skóry. Poszczególne wykwity nie są jednak równoznaczne w określeniu stanu zapalnego, i tak, dla rumienia, grudek obrzękowych oraz pęcherzyków/nadżerek stosuje się mnożnik 3, natomiast przy ocenie strupów/złuszczenia mnożnikiem tym jest 2. Zmiany chorobowe podlegają ocenie w skali czterostopniowej: 0-bez zmian, 1-słabe nasilenie zmian, 2-średnie nasilenie zmian i 3-znaczne nasilenie zmian. Do oceny rozległości zmian skórnych stosuje się „regułę dziewiątek”. Badaniu poddaje się całą powierzchnię skóry podzieloną na 12 okolic. Stopień zajęcia przez zmiany skórne poszczególnych okolic określa się odsetkowo. Jeden punkt to od 1 do 10%, 2 punkty to od 11 do 30%, natomiast 3 punkty to 31-100% zajętej procesem chorobowym badanej powierzchni ciała. Punktowy wskaźnik rozległości zmian skórnych uzyskuje się przy użyciu mnożnika 1, 2 lub 4, które odpowiadają odpowiednio 4,50%, 9% i 18% całej powierzchni skóry. Wykładnik nasilenia stanu zapalnego uzyskuje się poprzez zsumowanie liczby punktów uzyskanych na podstawie występowania wcześniej

wymienionych wykwitów. Dla obliczenia wskaźnika W-AZS należy powyższy wynik pomnożyć przez punkty określające zajęcie powierzchni badanej okolicy i następnie podzielić przez 10. Ten punktowy wskaźnik rozległości i nasilenia stanu zapalnego skóry u chorych na AZS może osiągnąć maksymalną wartość 178 punktów.

*Tabela nr III. Ocena świądu i zaburzeń snu u chorych na atopowe zapalenie skóry*

<b>A. OCENA ŚWIAĐU</b>	<b>Skala punktów</b>
I. Brak świądu	0
II. Świąd obecny	
<b>ROZLEGŁOŚĆ:</b>	
1. Świąd o pojedynczej lub o kilku lokalizacjach	2
2. Świąd skóry całego ciała	6
<b>CZĘSTOTLIWOŚĆ:</b>	
1. Napady świądu krótkotrwałe-do 30 minut	2
2. Napady świądu długotrwałe	4
3. Świąd obecny stale	8
<b>NASILENIE:</b>	
1. Świąd nie wymagający drapania	2
2. Świąd wymagający drapania	4
3. Niepokój i rozdrażnienie wywołane świądem	8
<b>B. OCENA ZABURZEŃ SNU</b>	
1. Brak zaburzeń snu	0
2. Trudności w zasypianiu	3
3. Przebudzenia w nocy wywołane świądem	6
4. Bezsenność	12
<b>Razem (A+B)=</b>	<b>Wynik:</b>

**Tabela nr IV. Punktowy wskaźnik nasilenia i rozległości stanu zapalnego skóry u chorych na atopowe zapalenie skóry**

A Rozległość zmian skórnych		B Nasilenie stanu zapalnego skóry				
		Rumień Grudki obrzękowe	Pęcherzyki Nadżerki	Strupy Złuszczenie	Lichenizacja Przebarwienia	AxB/10
1. Twarz z szyją	( )x1=	( )x3+	( )x3+	( )x2+	( )=	
2. Głowa owłosiona z karkiem	( )x1=	( )x3+	( )x3+	( )x2+	( )=	
3. Przednia powierzchnia tułowia	( )x4=	( )x3+	( )x3+	( )x2+	( )=	
4. Tylna powierzchnia tułowia	( )x4=	( )x3+	( )x3+	( )x2+	( )=	
5. Prawe ramię	( )x1=	( )x3+	( )x3+	( )x2+	( )=	
6. Prawe przedramię z dłonią	( )x1=	( )x3+	( )x3+	( )x2+	( )=	
7. Lewe ramię	( )x1=	( )x3+	( )x3+	( )x2+	( )=	
8. Lewe przedramię z dłonią	( )x1=	( )x3+	( )x3+	( )x2+	( )=	
9. Prawe udo	( )x2=	( )x3+	( )x3+	( )x2+	( )=	
10. Prawe podudzie ze stopą	( )x2=	( )x3+	( )x3+	( )x2+	( )=	
11. Lewe udo	( )x2=	( )x3+	( )x3+	( )x2+	( )=	
12. Lewe podudzie ze stopą	( )x2=	( )x3+	( )x3+	( )x2+	( )=	
						<b>Razem:</b>

**Skala ocen rozległości zmian:**

**0**-brak zmian

**1**-1-10% zajętej powierzchni

**2**-11-30% zajętej powierzchni

**3**-31-100% zajętej powierzchni

**Skala ocen nasilenia zmian:**

**0**-brak zmian

**1**-słabo nasilone

**2**-średnio nasilone

**3**-znacznie nasilone

**Wskaźnik EASI (eczema area and severity index)**

Wskaźnik ten został zaproponowany przez Hanifina i wsp. i jest on wykorzystywany do oceny objawów przedmiotowych u chorych na AZS (321,322). Podobnie, jak to ma miejsce w przypadku wskaźnika W-AZS, powierzchnię zmienioną chorobowo skóry określa

się z wykorzystaniem „reguły dziewiątek”. Wskaźnik ten obejmuje ocenę stanu zapalnego, jednak nie uwzględnia on badania podmiotowego, a więc nasilenia świądu i zaburzeń snu. Do oceny nasilenia stanu zapalnego stosuje się skalę od 0 do 3, przy czym 0 oznacza brak objawów, 1-delikatne nasilenie, 2-średnie nasilenie, 3-duże nasilenie. Uwzględnia się cztery rodzaje zmian chorobowych: rumień (E), naciek/grudki (I), nadżerki/przeczosy (Ex) i lichenizację (L). Dla poszczególnych części ciała wykorzystuje się różne mnożniki: głowa/szyja-0,1, kończyny górne-0,2, kończyny dolne-0,4 i tułów-0,3.

AS (*area square*) określa się w skali 7-punktowej i jest on uzależniony od odsetka powierzchni zajętej przez zmiany chorobowe, co zostało przedstawione w tabeli nr V.

**Tabela nr V. Skala Area square wskaźnika EASI**

	Area square						
	0	1	2	3	4	5	6
% powierzchni	Brak zmian	1-9%	10-29%	30-49%	50-69%	70-89%	90-100%

Wskaźnik **EASI** stanowi sumę wartości 4 obszarów:

Głowa/szyja  $(E+I+Ex+L) \times AS \times 0,1=$

Tułów  $(E+I+Ex+L) \times AS \times 0,3=$

Kończyny górne  $(E+I+Ex+L) \times AS \times 0,2=$

Kończyny dolne  $(E+I+Ex+L) \times AS \times 0,4=$

Wskaźniki W-AZS, W-AZS I, W-AZS-II i EASI zostały do celów niniejszego badania podzielone na 2 kategorie, a mianowicie: kategorię A, do której zakwalifikowano chorych ze słabym i umiarkowanym nasileniem zmian/świądu oraz kategorię B, w której znaleźli się pacjenci z dużym i bardzo dużym nasileniem zmian/świądu, co zostało przedstawione w tabeli nr VI.

**Tabela nr VI. Podział wskaźników W-AZS, W-AZS I, W-AZS II i EASI na kategorie A i B w zależności od stopnia nasilenia objawów zapalenia i świądu**

Wskaźnik	Kategoria A (pkt.)	Kategoria B (pkt.)
<b>W-AZS</b>	do 69	70 i powyżej
<b>W-AZS I</b>	do 14	15 i powyżej
<b>W-AZS II</b>	do 69	70 i powyżej
<b>EASI</b>	do 49	50 i powyżej

### 3.2.3. Badania dodatkowe

#### 3.2.3.1. Skórne testy punktowe

W badanej grupie u 29 chorych na AZS przeprowadzone zostały skórne testy punktowe z zestawem alergenów powietrzno pochodnych firmy Nexter/Allergopharma. Stan kliniczny 6 pacjentów nie pozwolił na wykonanie STP. U tych chorych, u których dotychczas nie wykonywano STP, a ze względu na stałe nasilenie objawów chorobowych i konieczność stosowania leków przeciwhistaminowych nie było możliwe ich założenie, oznaczono stężenie antygenowo specyficznych immunoglobulin E (asIgE). Rodzaje użytych wyciągów alergenowych do STP przedstawiono w tabeli nr VII.

*Tabela nr VII. Charakterystyka alergenów zastosowanych w skórnych testach punktowych*

Numer	Rodzaj alergenu	Moc wyciągu alergenowego w standaryzowanych jednostkach biologicznych
015	Trawy/Zboża	100 000 BU/ml
006	Trawy	50 000 SBU/ml
012	Drzewa I	100 000 BU/ml
013	Drzewa II	100 000 BU/ml
014	Chwasty	100 000 BU/ml
033	Sierść I	20 000 BU/ml
044	Pleśnie I	20 000 BU/ml
045	Pleśnie II	20 000 BU/ml
708	D. farinae	50 000 SBU/ml
725	D. pteronyssinus	50 000 SBU/ml
106	Bylica	50 000 SBU/ml
108	Brzoza	50 000 SBU/ml
115	Olcha	50 000 BU/ml
129	Leszczyna	50 000 BU/ml
133	Kłósówka	50 000 BU/ml
140	Kupkówka	50 000 BU/ml
157	Rajgras	50 000 BU/ml
158	Żyto	50 000 SBU/ml
169	Babka	50 000 SBU/ml
177	Tymotka	50 000 BU/ml
306	Sierść psa	10 000 BU/ml
309	Sierść kota	50 000 SBU/ml
400	Alternaria	10 000 SBU/ml
405	Cladosporium	10 000 BU/ml

Jeden ml roztworu, oprócz alergenu, zawierał substancje pomocnicze: chlorek sodu 9 mg, fenol 2 mg, glicerol 563 mg oraz wodę do iniekcji. Kontrolę dodatnią stanowił roztwór histaminy w stężeniu 1:1000. W jego skład wchodził: chlorowodorek histaminy 1,7 mg, chlorek sodu 9 mg, fenol 2 mg, glicerol 563 mg oraz woda do iniekcji. Do kontroli ujemnej został zastosowany roztwór soli fizjologicznej, który zawierał w 1 ml: chlorek sodu 9 mg, fenol 4 mg, glicerol 563 mg i wodę do iniekcji do 1 ml. Skórne testy punktowe zostały nałożone na skórę zgięciowej części przedramienia, w odległości około 3-5 cm od dołu łokciowego i 5 cm od nadgarstka. Do każdego nakłucia został użyty osobny lancet Morrow-Browna o ostrzu długości 1mm. Wyniki zostały odczytane po 20 minutach od nałożenia testów. Wynik stanowiły średnica rumienia i bąbla pokrzywkowego i podawany był on w milimetrach oraz w pięciopunktowej skali od zera do czterech plusów (323). Za wynik dodatni uznawano odczyn od trzech do czterech plusów. Odczyn oceniany jako zero lub jeden plus traktowano jako wynik ujemny, natomiast odczyn oceniany na dwa plusy uznawany był za wątpliwy.

**Tabela nr VIII. Interpretacja wyników skórných testów punktowych**

Wynik	Opis
0	Odczyn na alergen równy odczynowi na płyn kontroli ujemnej
+	Średnia średnica bąbla alergenowego większa od odczynu na płyn kontroli negatywnej, ale mniejsza od połowy średniej średnicy kontroli dodatniej
++	Średnia średnica bąbla alergenowego większa od połowy lub prawie równa średniej średnicy kontroli dodatniej
+++	Średnia średnica bąbla alergenowego równa lub nieco większa od średniej średnicy kontroli dodatniej
++++	Średnia średnica bąbla alergenowego co najmniej dwukrotnie większa od średniej średnicy kontroli dodatniej, lub każdy odczyn z nibynózkami

### **3.2.3.2. Oznaczenie w surowicy krwi całkowitego stężenia IgE metodą CAP SYSTEM FEIA firmy Pharmacia**

Do oznaczenia całkowitej puli przeciwciał klasy IgE (cIgE) w surowicy krwi chorych na AZS została zastosowana metoda fluoroimmunoenzymatyczna CAP System FEIA (ang. *fluoroenzyme immunoassay*) firmy Pharmacia. Badanie zostało wykonane według procedury producenta, a wyniki przedstawiono w kU/l. Uzyskane wyniki stężenia cIgE w surowicy chorych zostały zinterpretowane zgodnie z normami odnoszonymi do wieku badanych podanymi przez producenta, które zostały przedstawione w tabeli nr IX.



**Tabela nr IX. Prawidłowe surowicze stężenie cIgE w zależności od wieku**

<b>Wiek</b>	<b>Całkowite stężenie IgE (kU IgE/l)</b>
Tygodnie życia 6	2,3
Miesiące życia 3	4,1
6	7,3
9	10
12	13
Lata 2	23
3	32
4	40
5	48
6	56
7	63
8	71
9	78
10	85
Powyżej 10 roku życia	100

Grupa chorych na AZS do celów niniejszego badania została podzielona na 2 kategorie, mianowicie: kategorię A, do której zakwalifikowano chorych, u których stężenie cIgE było niższe lub równe 500 kU/l oraz kategorię B, w której znaleźli się pacjenci, u których stężenie cIgE było wyższe niż 500 kU/l, co zostało przedstawione w tabeli nr X.

**Tabela nr X. Podział chorych na AZS w zależności od surowiczego stężenia cIgE na kategorie A i B**

	<b>Kategoria A (kU/l)</b>	<b>Kategoria B (kU/l)</b>
<b>cIgE</b>	do 500	501 i powyżej

### **3.2.3.3. Oznaczenie w surowicy krwi stężenia antygenowo swoistych przeciwciał klasy IgE metodą UniCAP SYSTEM RAST FEIA firmy Pharmacia**

Pomiar stężenia antygenowo swoistych przeciwciał klasy IgE przeprowadzono u 6 chorych na AZS. U wszystkich pacjentów, u których, ze względu na rozległość i nasilenie zmian, nie było możliwe wykonanie STP, oznaczono asIgE dla następujących alergenów: *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, brzoza, bylica, tymotka i rajgras. Do oznaczenia stężenia asIgE wykorzystano metodę fluoroimmunoenzymatyczną

UniCAP System RAST FEIA firmy Pharmacia, a postępowanie było zgodne z zaleceniami producenta.

**Tabela nr XI. Interpretacja wyników oceny stężeń asIgE**

Klasa	Stężenie (kU/l)	Poziom asIgE
6	>100	Bardzo wysoki
5	50-100	Bardzo wysoki
4	17,5-50	Bardzo wysoki
3	3,5-17,5	Wysoki
2	0,7-3,5	Średni
1	0,35-0,7	Niski
0	<0,35	Nieobecne lub nieoznaczalne

### **3.2.3.4. Oznaczenie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i w tkankach metodą *Real-Time PCR***

#### **3.2.3.4.1. Pozyskanie jednojądrzastych komórek krwi obwodowej i osocza**

Ok. 5 ml krwi pobierano do jałowych probówek-strzykawek zawierających EDTA (Monovette, Sarstedt). Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC, ang. *periferal blood mononuclear cells*) i osocze pozyskane zostały poprzez wirowanie w gradiencie gęstości Fikolu (Ficoll-Histopaque 1.070 g/cm<sup>3</sup>, Sigma Diagnostics, Inc.St.Louis, USA). Osocze do czasu wykonania badań przechowywane było w temperaturze -80°C. PBMC zostały zdeintegrowane w odczynniku TriPure (Roche Applied Science).

#### **3.2.3.4.2. Pozyskanie wycinków skóry**

Wycinki skóry pobierane były przy użyciu skalpela i igły. W grupie chorych na AZS pobierano 2 wycinki: ze skóry chorobowo zmienionej, które w dalszej części tekstu będą oznaczone jako AZS-CH oraz ze skóry pozornie zdrowej, nazywane dalej AZS-Z. W grupie chorych na liszaj płaski wycinki pobierano ze zmian skórnych, natomiast w grupie osób zakwalifikowanych do leczenia dermatochirurgicznego były one pobierane podczas zabiegu z marginesu skóry zdrowej w otoczeniu zmian chorobowych np. włókniaków, brodawek łojotokowych itp., przy okazji wykonywanego zabiegu. Bezpośrednio po pobraniu materiał zamrażano w ciekłym azocie, po czym do czasu wykonania badań przechowywano go w temperaturze -80°C.

#### **3.2.3.4.3. Izolacja RNA**

Całkowite komórkowe RNA, izolowane z PBMC, uzyskano zgodnie z metodą opisaną przez Chomczyńskiego i Sacchi (324). Procedura została opisana w załączniku nr 1. Następnie 1 µg RNA z każdej próby poddano trawieniu rekombinowaną DNAzą I (Ambion, USA), w celu uniknięcia zanieczyszczeń genomowym DNA. Całkowite RNA z tkanek uzyskano poprzez ich homogenizację na lodzie w odczynniku TriPure metodą rotor-stator. Homogenizowane próby w odczynniku TriPure były zamrażane w -20°C, następnie rozmrażane na wytrząsarce i wirowane (20000g), celem usunięcia osadu z tkanek. Supernatant poddawano ekstrakcji chloroformem, zgodnie z metodą opisaną przez Chomczyńskiego i Sacchi. Ze względu na znaczącą liczbę zanieczyszczeń, każda próba była doczyszczana przy użyciu zestawu do oczyszczania RNA, wykorzystującego kolumnienki z włóknem szklanym (Roche Applied Science). Następnie 1 µg RNA (lub mniej) z każdej próby poddano DNA-zowaniu rekombinowaną DNAzą I (Ambion, USA), w celu uniknięcia zanieczyszczeń genomowym DNA. Dla oceny prawidłowego przebiegu reakcji DNA-zowania, z każdą próbą RNA wykonano reakcję *Real-Time PCR* dla genu referencyjnego-reakcja kontrolna typu no-RT (załącznik nr 2)

Szczegółowe protokoły izolacji, doczyszczania i DNA-zowania RNA umieszczono w załączniku nr 3.

#### **3.2.3.4.4. Odwrotna transkrypcja**

Bezpośrednio po zakończeniu trawienia prób RNA przeprowadzono odwrotną transkrypcję z użyciem losowych staterów heksamerowych. Do tego celu wykorzystano zestaw dostępny komercyjnie zgodnie z zaleceniami producenta (Roche Applied Science). Szczegółowy protokół reakcji odwrotnej transkrypcji zamieszczono w załączniku nr 3. Po przeprowadzeniu reakcji odwrotnej transkrypcji, próby cDNA przechowywane były w -80°C do czasu wykonywania łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym.

#### **3.2.3.4.5. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym**

Oznaczenia poziomów mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR zostały wykonane metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR, ang. *Real-Time PCR*), oznaczanej w dalszej części tekstu, jako *Real-Time PCR*. Założono, że oznaczenie poziomu transkryptów genu referencyjnego *GAPD* zostanie przeprowadzone przy użyciu sond hydrolizujących, natomiast mRNA IL-31RA oraz OSMR z użyciem barwnika SYBR Green Zaplanowano wykorzystanie w reakcjach z użyciem sond systemu Universal Probe Library

(UPL) (Roche Applied Science). System ten korzysta z kilkudziesięciu krótkich sond hydrolizujących LNA (*locked nucleic acid*), które równomiernie pokrywają cały genom. Odpowiednia sonda oraz startery są dobierane przez dostępną na stronie producenta aplikację. Sygnał fluorescencyjny z hydrolizującej sondy genu referencyjnego *GAPD* zczytywany jest przy długości fali 560nm. W przypadku reakcji z użyciem barwnika SYBR Green sygnał fluorescencyjny zczytywany jest przy długości fali 530nm.

Ze względu na to, że startery zaprojektowane przez UPL mogą być stosowane oddzielnie bez sondy, np. z barwnikiem SYBR Green, postanowiono użyć jej do zaprojektowania również pozostałych starterów (325). Do zaprojektowania starterów i sond zostały wykorzystane następujące pliki bazy danych GenBank:

- NM\_139017.4 Homo sapiens interleukin 31 receptor A (IL-31RA), mRNA
- NM\_003999.1 Homo sapiens oncostatin M receptor (OSMR), mRNA

Powyższe startery generują amplikony, które obejmują jeden intron.

W przypadku starterów dla IL-31 postanowiono skorzystać ze starterów i sondy opisanych conajmniej dwukrotnie w literaturze, a mianowicie przez Dillon i wsp. (2004) (86) oraz Neis i wsp. (2006) (69). Amplikon uzyskiwany w reakcji PCR z opisanymi powyżej starterami znajduje się w całości w obrębie jednego egzonu.

**Tabela nr XII. Startery i amplikon interleukiny 31**

<b>Starter przedni</b>	5'-TGGACCTCGCACTAAAATCATTG-3'
<b>Starter wsteczny</b>	5'-CGAAAGGAAGAGATGGCCTTAA-3'
<b>Amplikon 71 pz</b>	5'- TGGACCTCGCACTAAAATCATTGACCTCTGGAGCCCAACAGGCCACCACTTAAG GCCATCTCTCCTTTTCG-3'

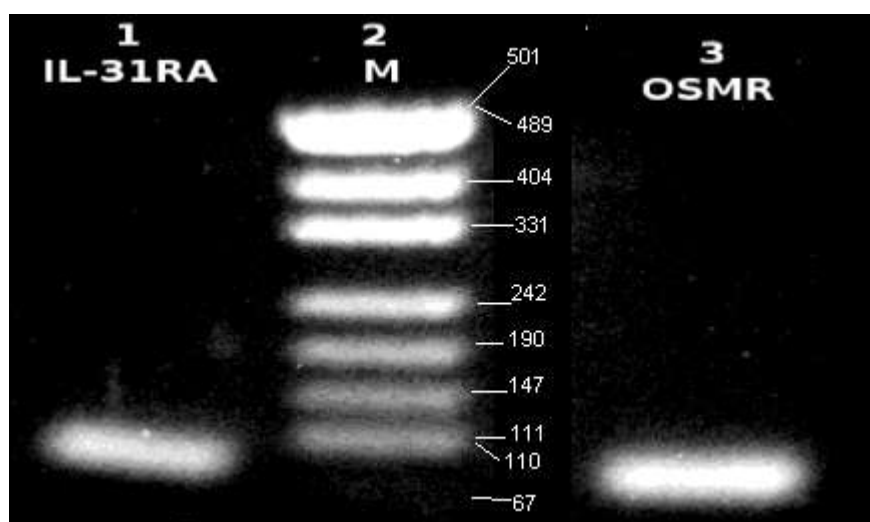
**Tabela nr XIII. Startery i amplikon receptora IL-31RA**

<b>Starter przedni</b>	5'-GAGGCCTTCTTATTCTCATTATCCT-3'
<b>Starter wsteczny</b>	5'-GCCAACACAGATGAGTCAATTT-3'
<b>Amplikon 78 pz</b>	5'- GAGGCCTTCTTATTCTCATTATCCTGACAGTGGCATATGGTCTCAAAAAACCCA ACAAATTGACTCATCTGTGTTGGC-3'

**Tabela nr XIV. Startery i amplikon receptora OSMR**

<b>Starter przedni</b>	5'-CCTGATGTCTGGAGAATTGTGA-3'
<b>Starter wsteczny</b>	5'-TCCATTGGCATGCAGTTTT-3'
<b>Amplikon 90 pz</b>	5'- CCTGATGTCTGGAGAATTGTGAGCTTGGAGCCAGGAAATCATACTGTGACCTT ATTCTGGAAGCCATTATCAAAACTGCATGCCAATGGA-3'

Wszystkie amplikony poddano reakcjom sekwencjonowania, a ich wyniki wskazywały na prawidłowe produkty. Reakcje sekwencjonowania wykonano w Wydziałowej Pracowni Technik Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Ze względu na to, że w reakcjach PCR powielających amplikon IL-31 produkt pojawiał się późno lub wcale, co wskazywało na bardzo niewielką ilość właściwych matryc w mieszaninie, reakcje zostały zoptymalizowane na próbkach cDNA, do których dodawano około 1000 kopii właściwego, oczyszczonego wcześniej, amplikonu IL-31. Dzięki temu udało się wyeliminować problem bardzo późnej amplifikacji w procesie optymalizacji. Dla wszystkich par starterów przeprowadzono optymalizację reakcji PCR pod kątem programu termocyklera i składu mieszaniny reakcyjnej, a przede wszystkim stężenia chlorku magnezu. W przypadku reakcji z barwnikiem SYBR Green wynik analizy temperatury topnienia amplikonu wskazywał na homogenny produkt. W rozdziale elektroforetycznym, wyniki wskazywały na jednolite prążki, odpowiadające teoretycznym wielkościom (rycina 5 i 6).

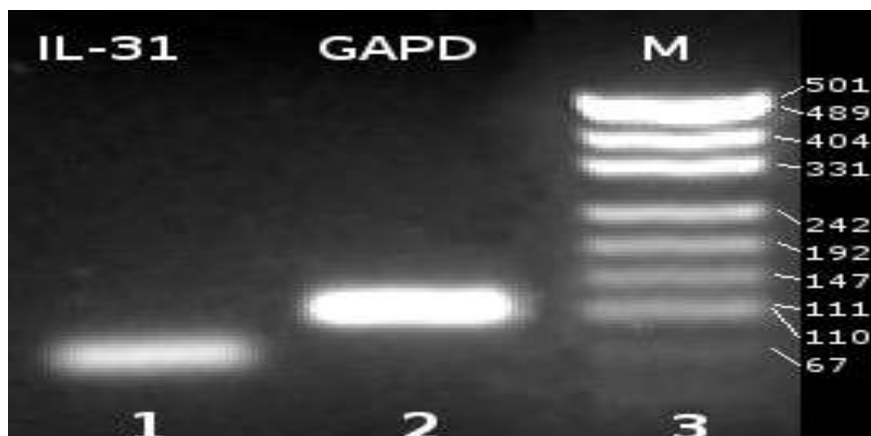


**Rycina 5. Obraz elektroforezy dla IL-31RA i OSMR**

**Ścieżka 1:** IL-31RA - 78 pz

**Ścieżka 2:** Marker pUC19 DNA/MspI

**Ścieżka 3:** OSMR - 90pz



**Rycina 6. Obraz elektroforezy dla IL-31 i GAPD**

**Ścieżka 1:** IL-31 - 71 pz

**Ścieżka 2:** GAPD - 119 pz, reakcja z sondą LNA

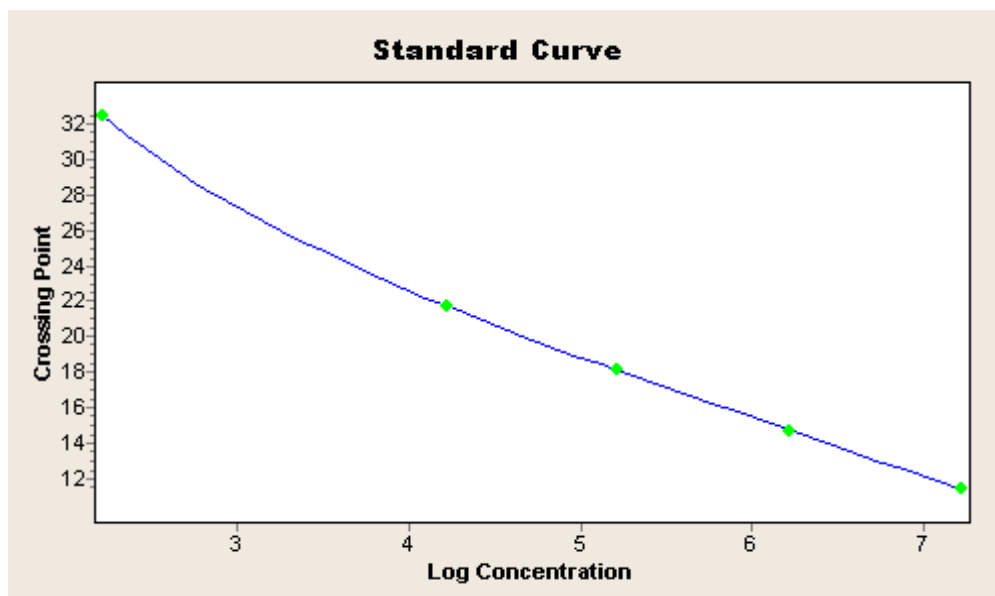
**Ścieżka 3:** Marker pUC19DNA/MspI

### 3.2.3.4.6. Przygotowywanie krzywych standardowych

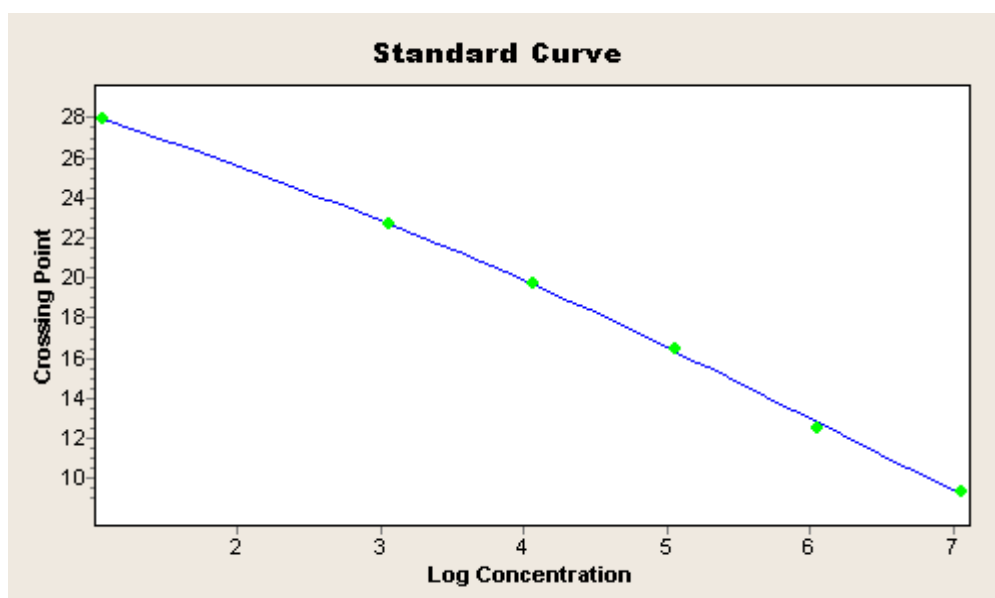
Krzywe standardowe wykonywano poprzez amplifikację w reakcji *Real-Time PCR* amplikonów o znanej liczbie kopii na reakcję w serii dziesięciokrotnych rozcieńczeń. Amplikony te zostały namnożone wcześniej, po procesie optymalizacji reakcji, a następnie oczyszczone przy użyciu kitu do oczyszczania produktów PCR - innuPREP PCRpure Kit (Analytik Jena, Niemcy). Szczegółowy protokół oczyszczania produktów PCR umieszczono w załączniku nr 3. Stężenie oczyszczonych produktów PCR zostało oznaczone przy użyciu systemu Qubit (Invitrogen). Znając stężenie, masę cząsteczkową wybranego amplikonu oraz stałą Avogadra, możliwe jest obliczenie liczby cząsteczek amplikonu w oczyszczonej próbce oraz wykonanie serii rozcieńczeń o znanej liczbie kopii amplikonu. Masę cząsteczkową amplikonu IL-31, IL-31RA oraz OSMR obliczano dokładnie na podstawie ich sekwencji, biorąc pod uwagę obecność uracylu zamiast tyminy w cząsteczkach. Masa cząsteczkowa amplikonu GAPD została obliczona w przybliżeniu, ze względu na to, że producent nie udostępnia dokładnej sekwencji. Znana jest natomiast długość amplikonu (119 par zasad-pz). Każdej parze zasad przypisano 660 Da, co jest powszechnie stosowaną metodą obliczania masy cząsteczkowej amplikonów w reakcjach *Real-Time PCR*.

Otrzymano 4 krzywe standardowe:

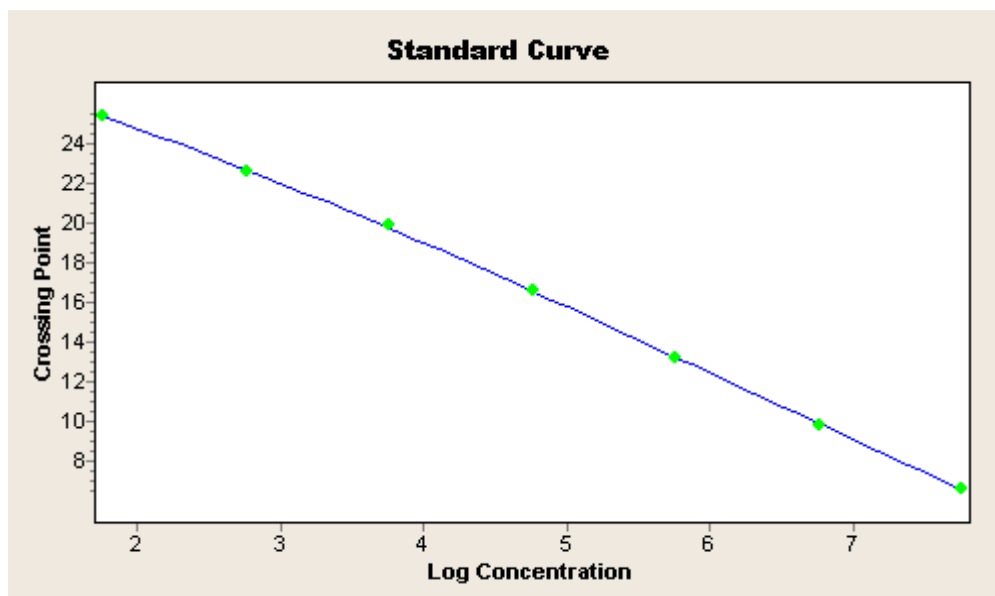
- dla GAPD z sondą hydrolizującą
- dla IL-31 z barwnikiem SYBR Green
- dla IL-31RA z barwnikiem SYBR Green
- dla OSMR z barwnikiem SYBR Green



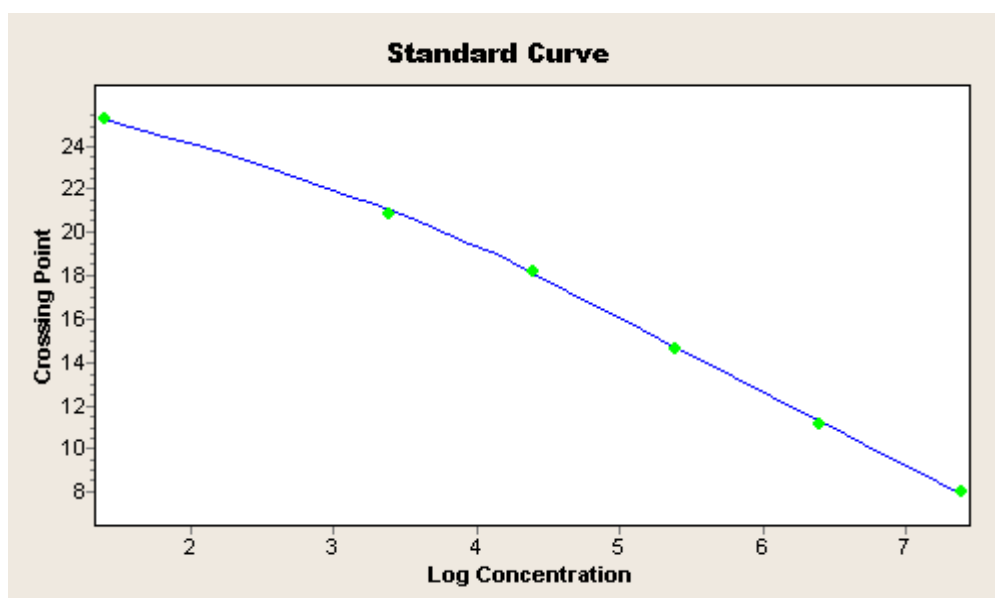
Rycina 7. Krzywa standardowa reakcji Real-Time PCR dla GAPD z sondą



Rycina 8. Krzywa standardowa reakcji Real-Time PCR dla IL-31

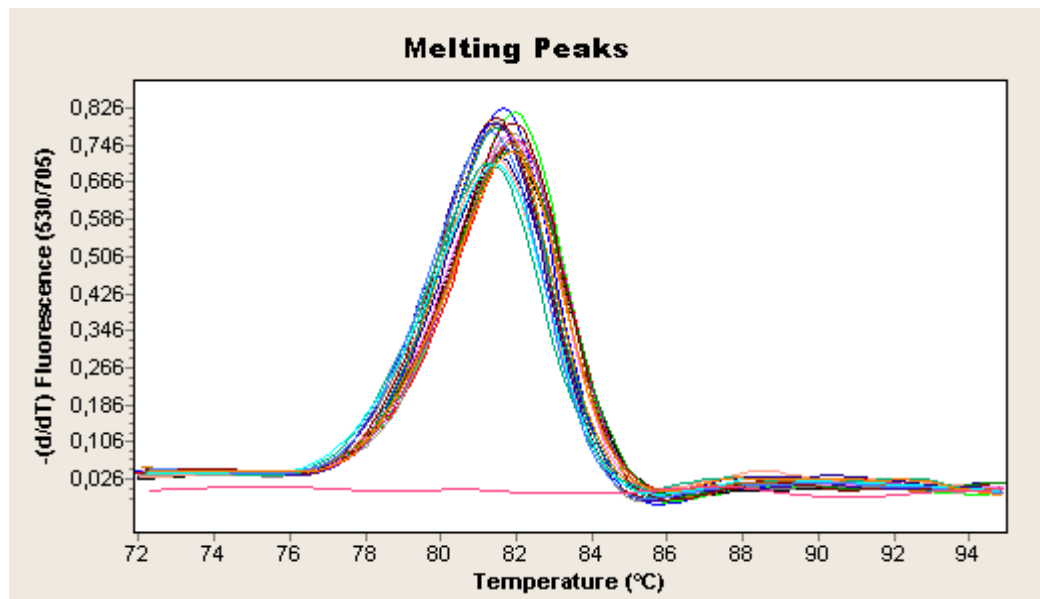


Rycina 9. Krzywa standardowa reakcji Real-Time PCR dla IL-31RA

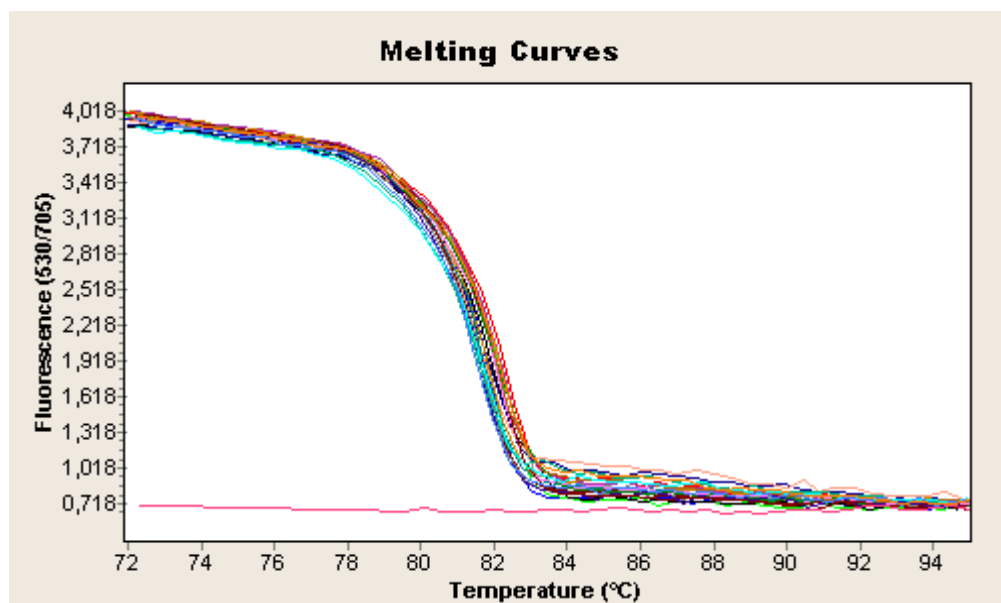


Rycina 10. Krzywa standardowa reakcji Real-Time PCR dla OSMR

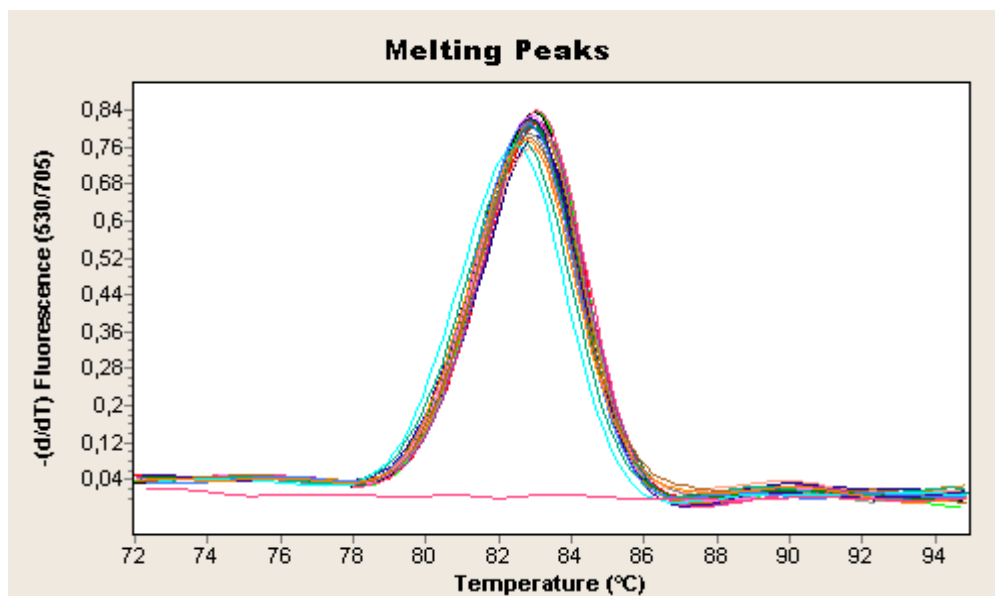




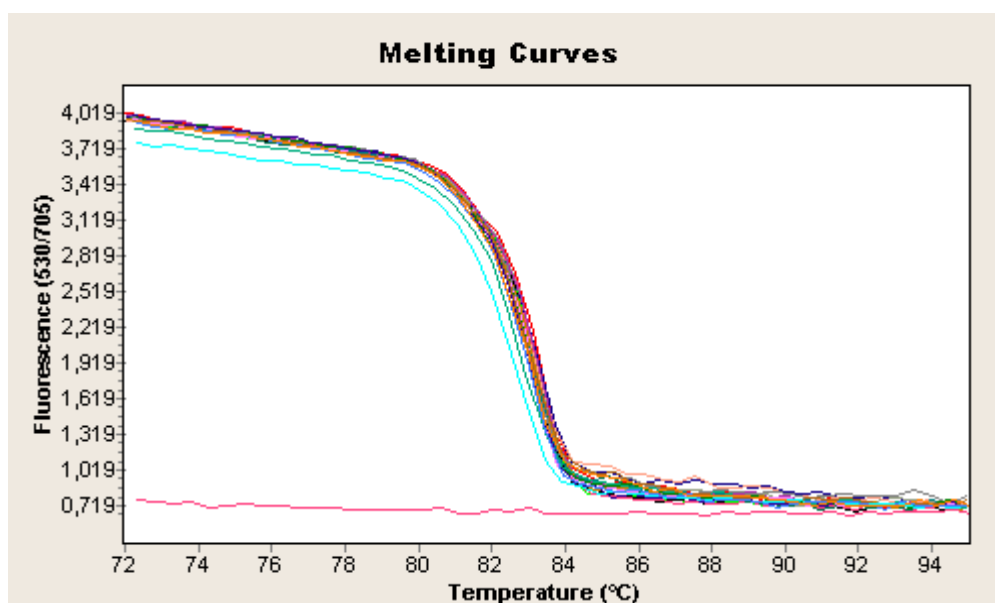
*Rycina 11. Analiza temperatury topnienia dla ampliconu IL-31RA*



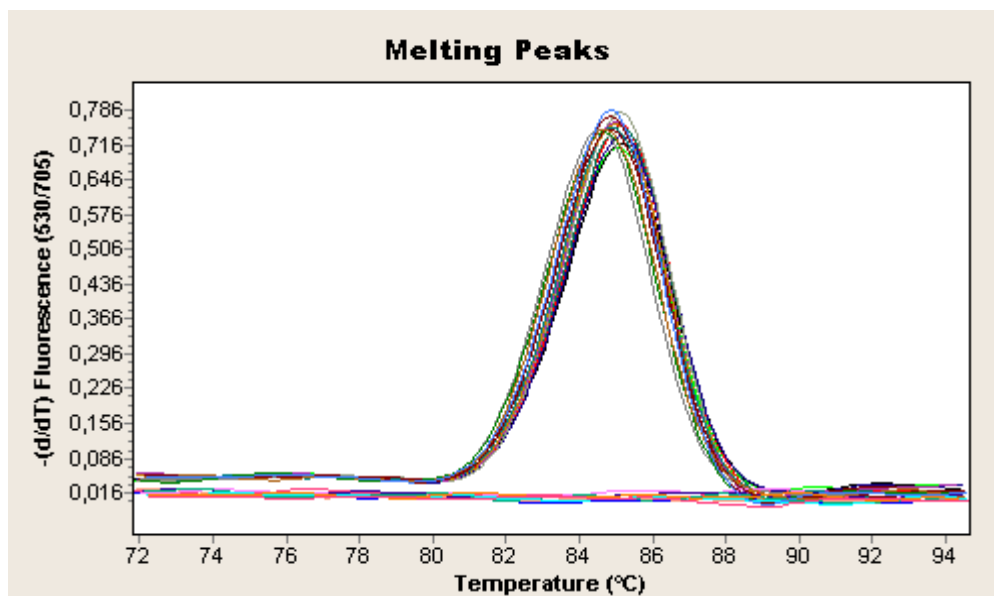
*Rycina 12. Analiza temperatury topnienia dla ampliconu IL-31RA*



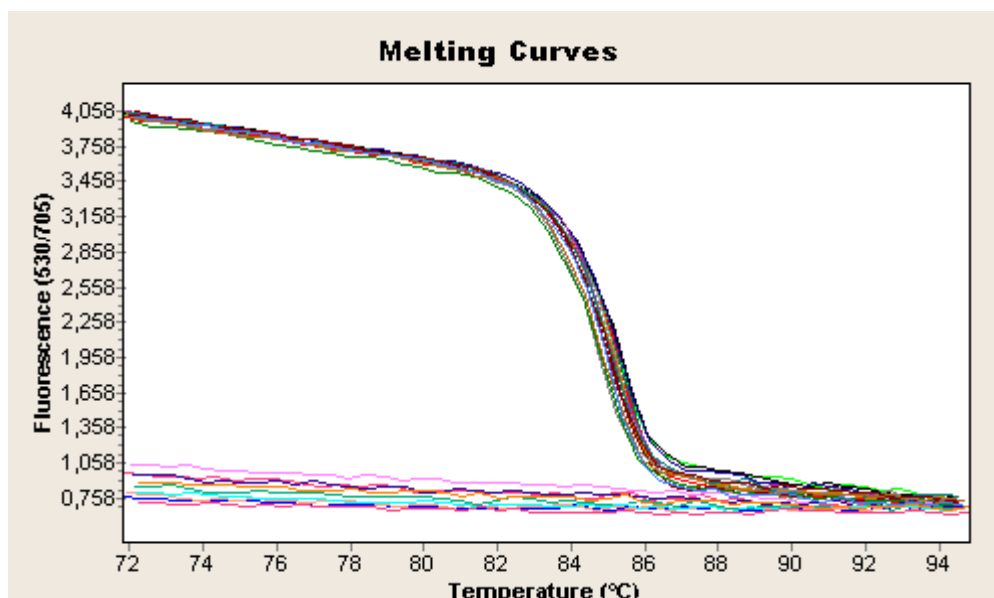
Rycina 13. Analiza temperatury topnienia dla amplikonu OSMR



Rycina 14. Analiza temperatury topnienia dla amplikonu OSMR



Rycina 15. Przykładowa analiza temperatury topnienia dla amplikonu IL-31 wykonana na materiale pobranym od pacjentów; szczyt piku odpowiada połowie kopii w formie jednoniciowej



Rycina 16. Przykładowa analiza temperatury topnienia dla amplikonu IL-31 wykonana na materiale pobranym od pacjentów

W celu usunięcia reszt uracylowych z sekwencji DNA, do każdej reakcji dodano 0,1 jednostki enzymu uracylo-n-glikozylazy (Fermentas). Reszty te znajdują się tylko w matrycy, która pochodzi z niechcianych zanieczyszczeń z poprzednich reakcji PCR, gdyż zamiast deoksytymidyny zastosowano w tych reakcjach deoksyurydynę. Matryce pochodzące z cDNA

nie zostały naruszone, ponieważ nie zostały zsyntetyzowane z użyciem deoksyurydyny. Usunięcie reszt uracylowych z matrycy uniemożliwia namnożenie z niej amplikonu, a amplifikacji zostaje poddana tylko matryca pochodząca z cDNA. Ma to istotne znaczenie w przypadkach genów niskokopijnych, gdzie zanieczyszczenie nawet jedną kopią niechcianego amplikonu może znacząco wpłynąć na wynik. Etap aktywności tego enzymu poprzedza właściwą reakcję PCR (50°C, 4 min). Enzym ten ulega denaturacji na etapie pre-denaturacji i aktywowania polimerazy Taq (95°C, 10min). Warunki reakcji dla poszczególnych badanych genów umieszczono w tabelach nr XV-XVII. Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: woda, startery, MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green, polimeraza, bufor reakcyjny, UNG oraz matryca cDNA.

**Tabela nr XV. Warunki reakcji dla GAPD**

	<b>Etap reakcji</b>	<b>Temperatura (stopnie Celsjusza - °C)</b>	<b>Czas reakcji (sekundy)</b>
1.	Inkubacja z UNG	50	240
2.	Pre-denaturacja	95	600
3.	Amplifikacja (50 cykli)		
a.	Denaturacja	95	10
b.	Przyłączanie starterów	60	30
c.	Elongacja/detekcja	72	1
4.	Chłodzenie	40	30

**Tabela nr XVI. Warunki reakcji dla IL-31**

	<b>Etap reakcji</b>	<b>Temperatura (stopnie Celsjusza - °C)</b>	<b>Czas reakcji (sekundy)</b>
1.	Inkubacja z UNG	50	240
2.	Pre-denaturacja	95	600
3.	Amplifikacja (50 cykli)		
a.	Denaturacja	95	10
b.	Przyłączanie starterów	60	8
c.	Elongacja/detekcja	72	4
4.	Analiza temperatury topnienia amplikonu		
a.		95	1
b.		72	15
5.	Chłodzenie	40	30

**Tabela nr XVII. Warunki reakcji dla IL-31RA i OSMR**

	<b>Etap reakcji</b>	<b>Temperatura (stopnie Celsjusza-°C)</b>	<b>Czas reakcji (sekundy)</b>
1.	Inkubacja z UNG	50	240
2.	Predenaturacja	95	600
3.	Amplifikacja (50 cykli)		
a.	Denaturacja	95	10
b.	Przyłączanie starterów	55	8
c.	Elongacja/detekcja	72	4
4.	Analiza temperatury topnienia amplikonu		
a.		95	1
b.		72	15
5.	Chłodzenie	40	30

Wartości  $C_p$  oraz stężenia w liczbie kopii na reakcję w oznaczanych próbach cDNA były obliczane automatycznie na podstawie przebiegu reakcji i odpowiednich krzywych standardowych przez oprogramowanie termocyklera. Oznaczenie każdego genu było związane z wykonaniem kilku niezależnych reakcji. Wynikało to z faktu, że do termocyklera można załadować jednorazowo jedynie 32 kapilary. Z tego względu konieczna była standaryzacja tych reakcji względem siebie. W każdym cyklu reakcyjnym umieszczano 1 kapilarę zawierającą znaną liczbę kopii amplifikowanego genu, która stanowiła jednocześnie kontrolę dodatnią. Liczba ta była stała w kolejnych cyklach reakcyjnych i na jej podstawie oprogramowanie termocyklera dokonywało poprawek w obliczeniach ilości kopii na reakcję w oznaczanych próbach. Niewielka część reakcji została powtórzona w celu monitorowania błędów pipetowania. W tych przypadkach do dalszej analizy brano średnią z 2 powtórzeń. Poprawność każdej reakcji, wykonanej z barwnikiem SYBR Green, sprawdzano na podstawie analizy temperatury topnienia amplikonu. Barwnik SYBR Green wykazuje zwiększone powinowactwo i właściwości fluorescencyjne tylko w kontakcie z dwuniciowym DNA. Podwyższając stopniowo temperaturę mieszaniny, zaraz po wykonaniu właściwego oznaczenia *Real-Time PCR*, można zaobserwować spadek poziomu fluorescencji w momencie, gdy namnożone DNA przechodzi z układu dwuniciowego do jednoniciowego. Temperatura ta jest stała dla konkretnej reakcji i zależy od długości i sekwencji danego amplikonu.

### 3.2.4. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano przy pomocy programu STATISTICA PL 9.0 firmy StatSoft. Wyniki pomiarów umieszczono w tabelach jako: średnie z odchyleniem standardowym, liczbę przypadków (N), medianę oraz wartość minimalną i maksymalną. W celu oceny różnic pomiędzy badanymi grupami sprawdzono zgodność zmiennych z rozkładem normalnym testem Shapiro–Wilka w każdej grupie. Tylko pojedyncze zmienne posiadały rozkład zgodny z rozkładem normalnym (zazwyczaj tylko w jednej z grup), stąd w pracy wszystkie porównania i korelacje wykonano testami nieparametrycznymi. Do porównań dwóch grup użyto nieparametrycznego testu Manna–Whitneya, natomiast do porównań więcej niż dwóch grup użyto nieparametrycznego testu Kruskala–Wallisa (jeśli test ten wykazał statystycznie istotną różnicę między grupami do dalszych porównań użyto testu post-hoc).

W pracy wyznaczono również współczynniki korelacji rang Spearmana dla parametrów w poszczególnych grupach i przedstawiono w tabelach z zaznaczeniem kolorem fioletowym tych współczynników, które są istotne statystycznie. Wyniki uznano za istotne statystycznie, gdy  $p < 0,05$ .

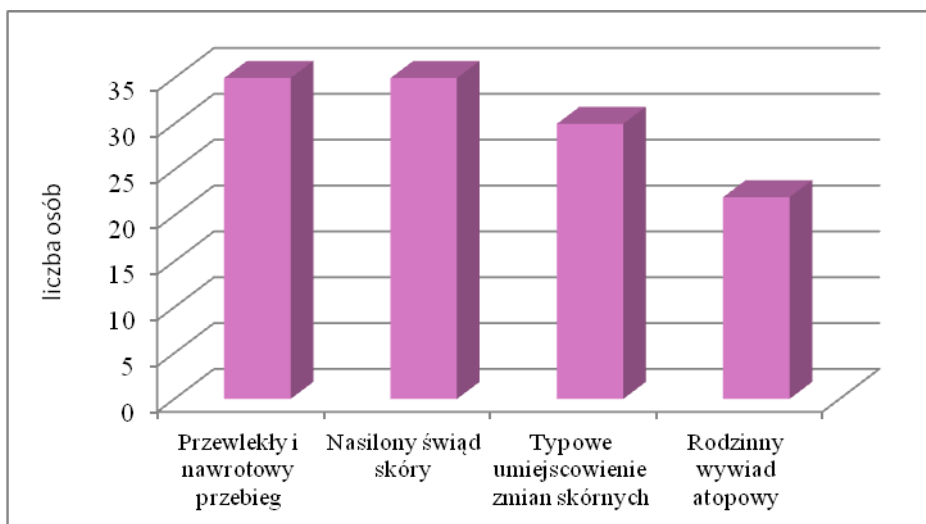
## **4. WYNIKI**

### **4.1. Wyniki badania podmiotowego i przedmiotowego**

#### **4.1.1. Analiza wyników badania podmiotowego i przedmiotowego w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry**

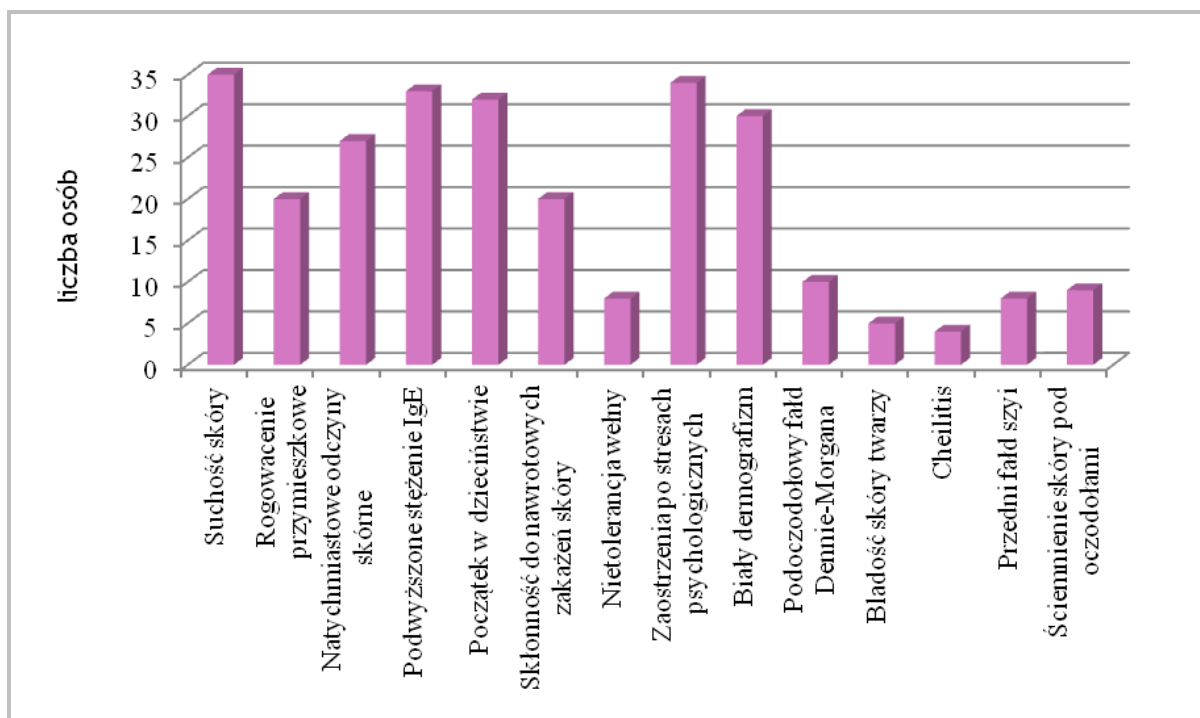
W badanej grupie spośród 35 dorosłych chorych na AZS 23% było płci żeńskiej (8 osób), a 77% było płci męskiej (27 osób). Pacjenci byli w wieku od 21 do 60 lat, a średnia wieku wynosiła 32,5 lat. W badanej grupie chorych na AZS 51,40% pacjentów (18 osób) pozostawało bez leczenia ogólnego przez okres około 4 tygodni poprzedzających wykonanie badań, pozostałych 31,40% chorych (11 osób) stosowało nieregularnie leki przeciwhistaminowe I i II generacji, które odstawiono około 2 tygodnie przed przeprowadzeniem badań, natomiast 17,20% chorych (6 osób) stosowało leki przeciwhistaminowe w dniu badania.

Jak wspomniano wcześniej, rozpoznanie AZS postawiono w oparciu o kryteria Hanifina i Rajki (1). 22 pacjentów (62,90%) spełniało wszystkie 4 kryteria większe, a 13 chorych (37,10%) spełniało 3 kryteria większe konieczne do rozpoznania AZS. Spośród kryteriów większych, u wszystkich badanych chorych na AZS schorzenie miało charakter przewlekły i nawrotowy oraz występował świąd skóry. U 30 chorych (85,70%) lokalizacja zmian chorobowych była typowa, natomiast u 1 pacjenta (2,90%) odbiegała ona od typowego schematu. U 22 chorych (51,40%) rodzinny wywiad atopowy był dodatni, natomiast u 13 pacjentów (37,10%) nie był on obciążony (rycina 17). AZS występowało w rodzinie 10 pacjentów (28,60%), alergiczny nieżyt nosa rozpoznawany był w rodzinie kolejnych 8 chorych (22,90%), natomiast astma dotyczyła członków rodzin 6 badanych (17,10%). W przypadku rodzin 3 chorych (8,60%) występowały zarówno AZS, jak i astma.



Rycina 17. Częstość występowania kryteriów większych wg Hanifina i Rajki w grupie chorych na AZS

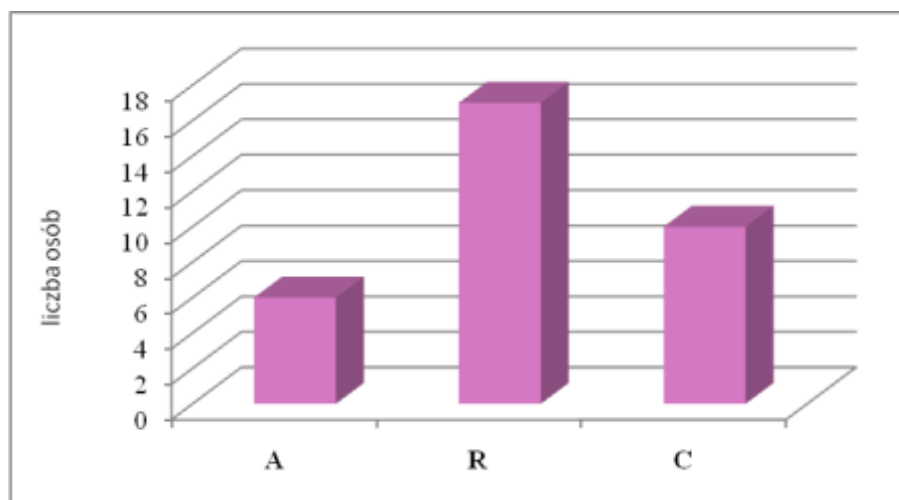
Więcej niż 6 kryteriów mniejszych Hanifina i Rajki spełniało 27 chorych (77,1%), natomiast 8 chorych (22,80%) spełniało od 4 do 6 kryteriów mniejszych (rycina 18). Spośród kryteriów mniejszych Hanifina i Rajki najczęściej występującymi były: suchość skóry (35 chorych), zaostrzenia po stresach psychologicznych (34 chorych), podwyższone stężenie cIgE (33 chorych), początek w dzieciństwie (32 chorych), biały dermografizm (30 chorych), natychmiastowe odczyny skórne (27 chorych), rogowacenie przymieszkowe (20 chorych) oraz skłonność do nawrotowych zakażeń skóry (20 chorych). Najrzadziej stwierdzano błąd skóry twarzy (5 chorych) i *cheilitis* (4 chorych).



Rycina 18. Częstość występowania niektórych kryteriów mniejszych wg Hanifina i Rajki w grupie chorych na AZS



W odniesieniu do osobniczego wywiadu w kierunku chorób atopowych w badanej grupie chorych, u 22 badanych chorych (62,90 %), obok objawów AZS, występowały także objawy innych chorób atopowych: astmy atopowej u 6 chorych (17,10%), alergicznego nieżytu nosa u 17 chorych (48,60%) oraz alergicznego nieżytu spojówek u 10 pacjentów (28,60 %). 6 chorych (17,10%) cierpiało w dzieciństwie na okresową duszność wysiłkową, 2 (5,70%) na alergiczny nieżyt nosa, jednak obecnie nie stwierdzono u nich objawów innych chorób atopowych (rycina 19 i 20).



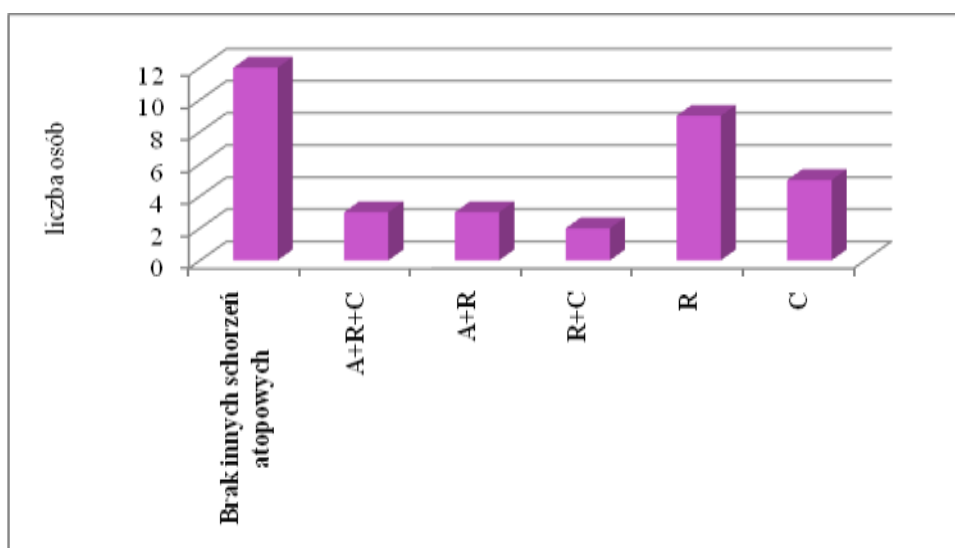
**Rycina 19. Częstość występowania innych chorób atopowych w grupie chorych na AZS**

**Legenda:**

A – astma

R – alergiczny nieżyt nosa

C – alergiczne zapalenie spojówek



**Rycina 20. Współistnienie towarzyszących schorzeń atopowych**

**Legenda:**

R – alergiczny nieżyt nosa

A+R – astma i alergiczny nieżyt nosa

C – alergiczne zapalenie spojówek

R+C – alergiczny nieżyt nosa i alergiczne zapalenie spojówek

A+R+C – astma, alergiczny nieżyt nosa i alergiczne zapalenie spojówek

Spośród 6 chorych (17,10%) cierpiących na astmę, 3 (8,60%) stosowało nieregularnie, w razie duszności, preparaty wziewne o działaniu beta-mimetycznym, natomiast pozostałe 3 osoby (8,60%), ze względu na ciężkość schorzenia, zmuszone były na stałe stosować wziewne preparaty glikokortykosteroidowe.

Podstawę oceny stanu klinicznego w grupie chorych na AZS stanowiły wskaźniki: W-AZS i EASI. Wskaźnik W-AZS analizowany był w całości oraz został on podzielony na W-AZS I i W-AZS II. W W-AZS I oceniano objawy podmiotowe, takie jak świąd skóry i zaburzenia snu, a w W-AZS II objawy przedmiotowe, takie jak rozległość stanu zapalnego oraz jego nasilenie. Szczegółowy schemat i zasady obliczania powyższych wskaźników zostały ujęte i szczegółowo opisane w rozdziale „Materiał i metodyka”. Ponadto powyższe wskaźniki zostały podzielone, w zależności od wartości punktowej, na kategorie A i B, co zostało również przedstawione w rozdziale „Materiał i metodyka”.

**Tabela nr XVIII. Wyniki wskaźników nasilenia stanu zapalnego i świądu w grupie chorych na AZS, u których oznaczenia badanych parametrów\* wykonane zostały w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej**

Wskaźnik	Statystyki opisowe					
	N	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
<b>W-AZS</b>	30	119,39	148,70	9,20	196,60	58,34
<b>W-AZS A</b>	11	42,74	42,90	9,20	67,70	16,20
<b>W-AZS B</b>	19	129,42	133,80	71,20	144,90	16,10
<b>W-AZS I</b>	30	21,13	22,50	6,00	34,00	7,86
<b>W-AZS I A</b>	12	9,00	8,00	6,00	14,00	2,63
<b>W-AZS I B</b>	18	22,22	24,00	17,00	28,00	3,49
<b>W-AZS II</b>	30	98,59	124,20	3,20	162,60	51,01
<b>W-AZS II A</b>	12	36,11	33,55	3,20	59,70	16,45
<b>W-AZS II B</b>	18	110,43	112,40	98,70	120,90	6,59
<b>EASI</b>	30	34,04	40,95	2,20	62,40	20,54
<b>EASI A</b>	20	23,17	14,95	2,20	49,00	16,26
<b>EASI B</b>	10	55,04	54,10	52,00	60,10	2,91

\*mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

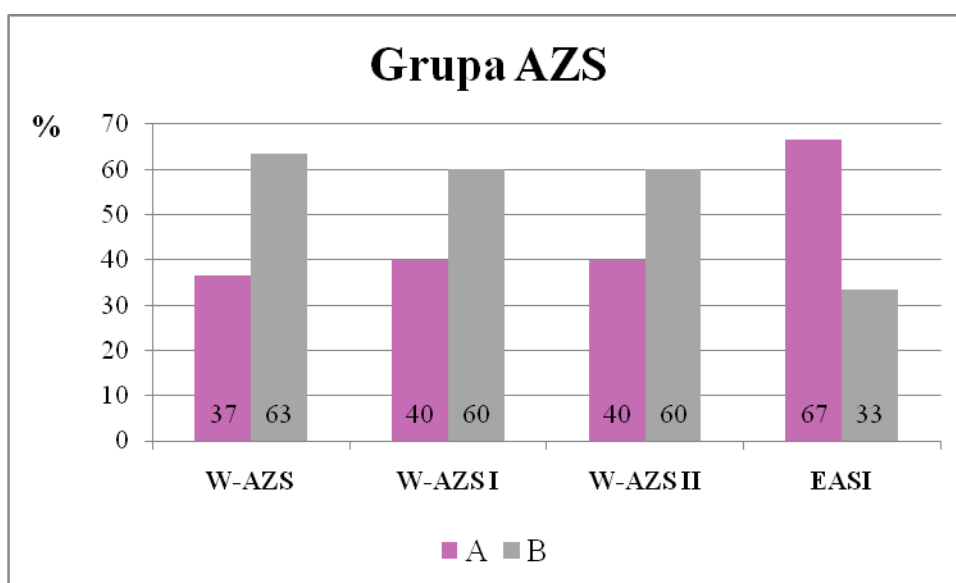
**Legenda:**

**W-AZS A** do 69 pkt.      **W-AZS I A** do 14 pkt.      **W-AZS II A** do 69 pkt.      **EASI A** do 49 pkt.  
**W-AZS B** 70 i powyżej      **W-AZS I B** 15 i powyżej      **W-AZS II B** 70 i powyżej      **EASI B** 50 i powyżej

Statystyki opisowe dla analizowanych zmiennych dla oznaczeń w PBMC w grupie chorych na AZS zostały umieszczone w tabeli nr XVIII.

Dla oznaczeń w PBMC 63% pacjentów zostało zakwalifikowanych do kategorii W-AZS B, a tylko 37% stanowili chorzy należący do kategorii W-AZS A. Dla parametrów W-AZS I i W-AZS II podział był podobny i wynosił on 40% dla kategorii A oraz 60% dla kategorii B. Z kolei dla wskaźnika EASI proporcje były odwrotne. Tutaj więcej pacjentów należało do kategorii A (aż 67%) a mniej do kategorii B (33%) (rycina 21).

Rozkład procentowy dla płci w poszczególnych kategoriach wyglądał podobnie dla każdego parametru. Około 20% stanowiły kobiety, a około 80%, mężczyźni (rycina 22).

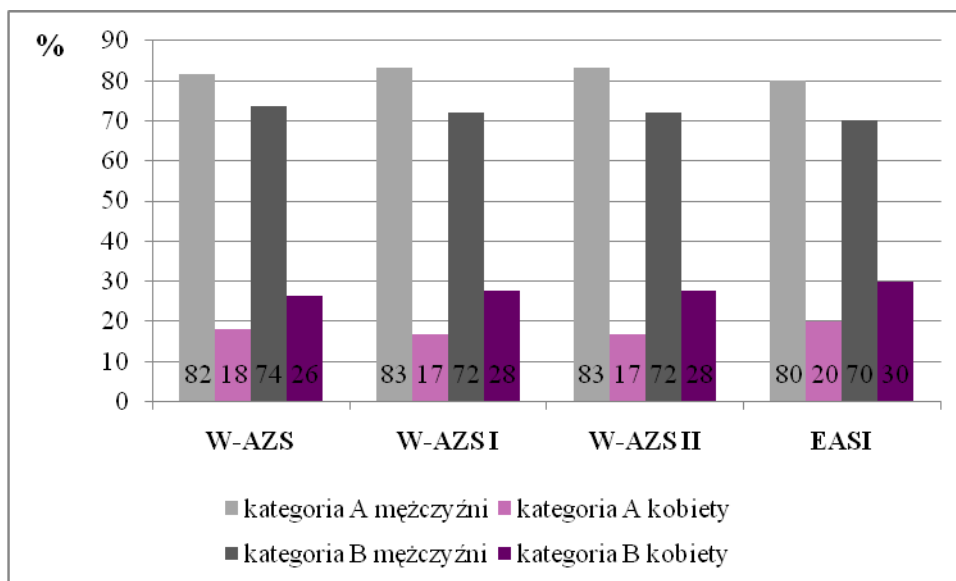


Rycina 21. Rozkład procentowy chorych w poszczególnych kategoriach dla wskaźników: W-AZS, W-AZS-I, W-AZS-II i EASI w grupie chorych na AZS, u których oznaczenia badanych parametrów\* wykonane zostały w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej

\* mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

**Legenda:**

W-AZS A do 69 pkt.      W-AZS I A do 14 pkt.      W-AZS II A do 69 pkt.      EASI A do 49 pkt.  
W-AZS B 70 i powyżej      W-AZS I B 15 i powyżej      W-AZS II B 70 i powyżej      EASI B 50 i powyżej



**Rycina 22. Rozkład procentowy płci w kategoriach A i B wskaźników: W- AZS, W-AZS-I, W-AZS-II i EASI w grupie chorych na AZS, u których oznaczenia badanych parametrów\* wykonane zostały w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej**

\* mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

**Legenda:**

W-AZS A do 69 pkt.      W-AZS I A do 14 pkt.      W-AZS II A do 69 pkt.      EASI A do 49 pkt.  
W-AZS B 70 i powyżej      W-AZS I B 15 i powyżej      W-AZS II B 70 i powyżej      EASI B 50 i powyżej

**Tabela nr XIX. Wyniki wskaźników nasilenia stanu zapalnego i świądu w grupie chorych na AZS, u których oznaczenia badanych parametrów\* wykonane zostały w tkankach**

Wskaźnik	Statystyki opisowe					
	N	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
W-AZS	35	96,59	124,60	9,20	148,60	46,00
W-AZS A	13	41,65	43,20	9,20	67,70	16,63
W-AZS B	22	129,05	133,80	71,20	148,60	17,19
W-AZS I	35	16,83	17,00	6,00	34,00	7,78
W-AZS I A	15	9,00	8,00	6,00	14,00	2,70
W-AZS I B	20	22,70	24,00	17,00	34,00	4,27
W-AZS II	35	79,81	101,70	3,20	120,90	39,03
W-AZS II A	14	35,04	36,65	3,20	59,70	16,64
W-AZS II B	21	109,66	112,50	84,70	120,90	8,47
EASI	35	33,26	39,50	2,20	60,20	20,66
EASI A	23	21,70	14,60	2,20	49,00	15,74
EASI B	12	55,42	55,40	52,00	60,20	2,83

\* mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

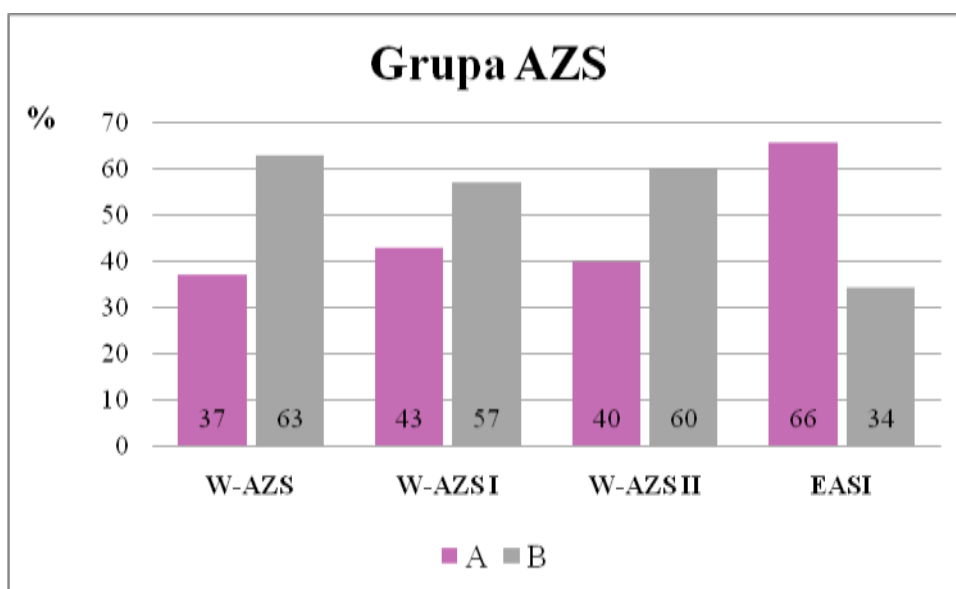
**Legenda:**

W-AZS A do 69 pkt.      W-AZS I A do 14 pkt.      W-AZS II A do 69 pkt.      EASI A do 49 pkt.  
W-AZS B 70 i powyżej      W-AZS I B 15 i powyżej      W-AZS II B 70 i powyżej      EASI B 50 i powyżej

Statystyki opisowe analizowanych zmiennych dla oznaczeń w wycinkach skóry (tkanki) w grupie chorych na AZS zostały umieszczone w tabeli nr XIX.

W grupie chorych na AZS dla oznaczeń w tkankach 63% pacjentów stanowili pacjenci zakwalifikowani do kategorii W-AZS B, a 37% osób należało do kategorii W-AZS A. W przypadku wskaźnika W-AZS I, 57% stanowili chorzy należący do kategorii B, a 43% pacjentów zostało zakwalifikowanych do kategorii A. Z kolei w przypadku wskaźnika W-AZS II 60% chorych należało do kategorii B, a 40% do kategorii A. Dla wskaźnika EASI proporcje, tak jak to miało miejsce w przypadku oznaczeń wykonanych w PBMC, były odwrotne i wynosiły one 34% i 66%, odpowiednio dla kategorii B i A (rycina 23).

Rozkład procentowy dla płci w poszczególnych kategoriach wyglądał podobnie dla każdego parametru. Około 20% stanowiły kobiety, a około 80% mężczyźni (rycina 24).

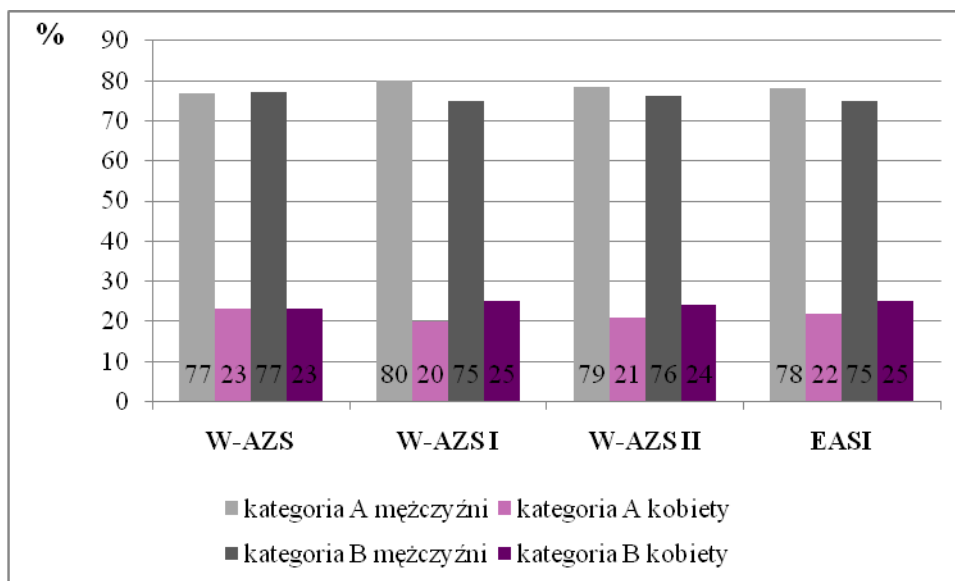


**Rycina 23. Rozkład procentowy chorych w poszczególnych kategoriach wskaźników: W-AZS, W-AZS-I, W-AZS-II i EASI w grupie chorych na AZS, u których oznaczenia badanych parametrów\* wykonane zostały w tkankach**

\*mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

**Legenda:**

W-AZS A do 69 pkt.      W-AZS I A do 14 pkt.      W-AZS II A do 69 pkt.      EASI A do 49 pkt.  
W-AZS B 70 i powyżej      W-AZS I B 15 i powyżej      W-AZS II B 70 i powyżej      EASI B 50 i powyżej



Rycina 24. Rozkład procentowy płci w kategoriach A i B wskaźników: W- AZS, WAZS I, W-AZS II i EASI w grupie chorych na AZS, u których oznaczenia badanych parametrów\* wykonane zostały w tkankach

\*mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

**Legenda:**

W-AZS A do 69 pkt.      W-AZS I A do 14 pkt.      W-AZS II A do 69 pkt.      EASI A do 49 pkt.  
W-AZS B 70 i powyżej      W-AZS I B 15 i powyżej      W-AZS II B 70 i powyżej      EASI B 50 i powyżej

**4.1.2. Analiza wyników badania podmiotowego i przedmiotowego w grupach kontrolnych**

**4.1.2.1. Wyniki badania podmiotowego i przedmiotowego w grupie chorych na liszaj płaski**

Grupa kontrolna chorych z rozpoznaniem na podstawie badania histopatologicznego liszajem płaskim oznaczana w dalszej części tekstu jako LP, złożona była z 16 osób dorosłych w wieku od 23 do 65 lat. 8 osób (50%) było płci żeńskiej i 8 osób (50%) było płci męskiej (rycina 26). Średnia wieku w tej grupie wynosiła 42 lata, a średni czas trwania choroby wynosił 17 miesięcy. Zmiany chorobowe miały charakter rozszany i towarzyszył im świąd o różnym stopniu nasilenia. U 4 pacjentów (25%), poza zmianami chorobowymi zlokalizowanymi w obrębie skóry gładkiej, obecne były ogniska chorobowe w obrębie błon śluzowych jamy ustnej.

W grupie chorych na liszaj płaski 14 osób (87,50%) pozostawało bez leczenia ogólnego przez okres 2-4 tygodni przed wykonaniem badań, natomiast pozostałych 2 pacjentów (12,50%) stosowało nieregularnie leki przeciwhistaminowe I i II generacji. Z chorób współistniejących, 4 chorych było leczonych z powodu nadciśnienia tętniczego

i 1 pacjent z powodu niedoczynności tarczycy. Na podstawie wywiadu oraz badania przedmiotowego, przy uwzględnieniu kryteriów podanych przez Hanifina i Rajkę (1980) wykluczono w tej grupie obecność objawów jakichkolwiek chorób atopowych. Także wywiad rodzinny w kierunku atopii był ujemny.

#### 4.1.2.2. Wyniki badania podmiotowego i przedmiotowego w grupie osób zdrowych

Grupa kontrolna osób zdrowych, oznaczana w dalszej części tekstu jako **Z** złożona była z 16 osób dorosłych w wieku od 25 do 60 lat. 6 pacjentów (37,50%) było płci żeńskiej, natomiast 10 pacjentów (62,50%) było płci męskiej. Średnia wieku w tej grupie wynosiła 40 lat. Z chorób współistniejących, 7 chorych było leczonych z powodu nadciśnienia tętniczego, 1 pacjent z powodu niedoczynności tarczycy i 1 chory z powodu refluksu żołądkowo-przełykowego. Z tej grupy, podobnie jak miało to miejsce w przypadku grupy LP, wykluczeni zostali pacjenci z obciążonym wywiadem osobniczym lub/ i rodzinnym w kierunku chorób atopowych.

## 4.2. Wyniki badań dodatkowych

### 4.2.1. Wyniki oznaczeń cIgE w surowicy

*Tabela nr XX. Średnie wartości cIgE w surowicy z podziałem na kategorie A i B, w grupie chorych na AZS, u których oznaczenia badanych parametrów\* wykonane zostały w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej*

	Stężenie cIgE w surowicy (kU/l)				
	N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD
<b>cIgE</b>	30	10946,60	46,00	31549,00	13924,73
<b>cIgE (grupa A)</b>	13	235,31	46,00	471,00	130,62
<b>cIgE (grupa B)</b>	17	19137,59	665,00	31549,00	13671,96

\*mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

#### Legenda:

**Grupa A:** cIgE - do 500 kU/l

**Grupa B:** cIgE - 501 kU/l i powyżej

Całkowite IgE zostało oznaczone u 30 chorych na AZS, u których określono badane parametry w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej. U 2 pacjentów stężenie cIgE w surowicy mieściło się w granicach normy. Średnie stężenie cIgE w tej grupie wyniosło 10946,60 kU/l (tabela nr XX).

**Tabela nr XXI. Średnie wartości cIgE w surowicy z podziałem na kategorie A i B w grupie chorych na AZS, u których oznaczenia badanych parametrów\* wykonane zostały w tkankach**

	Stężenie cIgE (kU/l)				
	N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD
<b>cIgE</b>	35	11368,64	46,00	31896,00	14061,32
<b>cIgE (grupa A)</b>	14	224,10	46,00	471,00	132,32
<b>cIgE (grupa B)</b>	21	18798,33	665,00	31896,00	13827,98

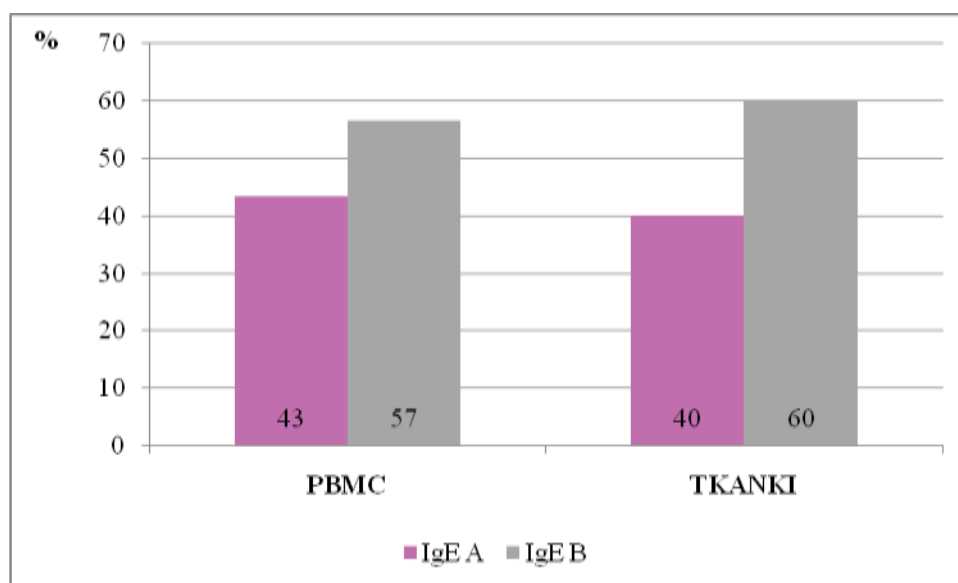
\* mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

**Legenda:**

**Grupa A:** cIgE - do 500 kU/l

**Grupa B:** cIgE - 501 kU/l i powyżej

Całkowite IgE zostało oznaczone w surowicy u wszystkich 35 chorych na AZS, u których określono badane parametry w tkankach. U 2 pacjentów stężenie cIgE w surowicy mieściło się w granicach normy. Średnie stężenie cIgE w tej grupie wyniosło 11368,64 kU/l. Statystyki opisowe dla analizowanych zmiennych zostały umieszczone w tabeli nr XXI.



**Rycina 25. Procentowy rozkład wartości cIgE w surowicy z podziałem na kategorie A i B w grupie chorych na AZS, u których oznaczenia badanych parametrów\* wykonane zostały w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) i w tkankach**

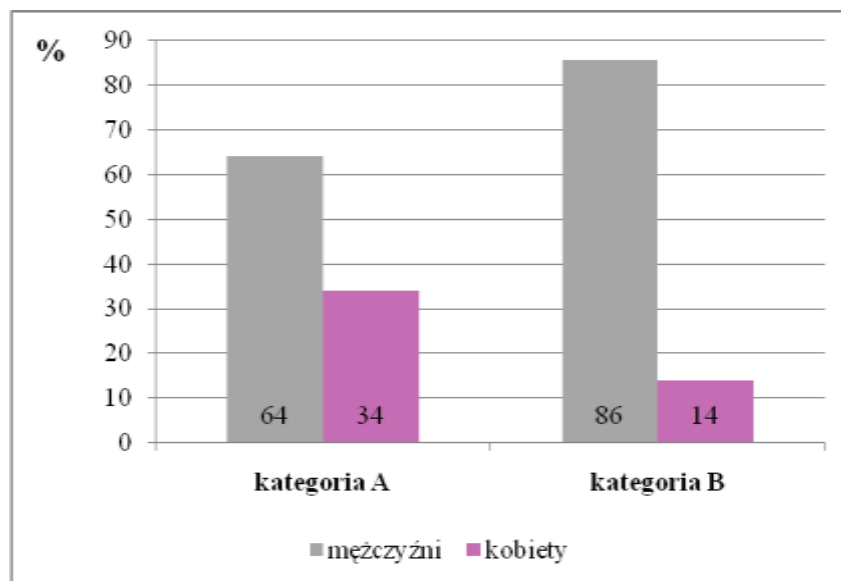
\* mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

**Legenda:**

**Kategoria A (IgE A):** cIgE – do 500 kU/l

**Kategoria B (IgE B):** cIgE – 501 kU/l i powyżej





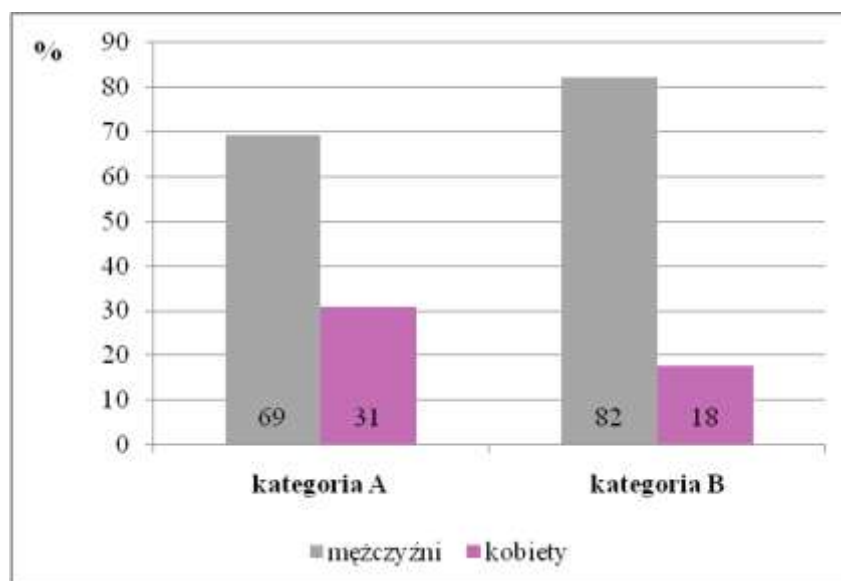
**Rycina 26.** Rozkład procentowy mężczyzn i kobiet w kategoriach A i B surowiczego stężenia cIgE w grupie chorych na AZS, u których oznaczenia badanych parametrów\* wykonane zostały w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej

\* mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

Legenda:

**Kategoria A (IgE A):** cIgE – do 500 kU/l

**Kategoria B (IgE B):** cIgE – 501 kU/l i powyżej



**Rycina 27.** Rozkład procentowy mężczyzn i kobiet w kategoriach A i B surowiczego stężenia cIgE w grupie chorych na AZS, u których oznaczenia badanych parametrów\* wykonane zostały w tkankach

\* mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

Legenda:

**Kategoria A (IgE A):** cIgE - do 500 kU/l

**Kategoria B (IgE B):** cIgE - 501 kU/l i powyżej

Zarówno dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej, jak i w tkankach, stosunek kobiet i mężczyzn w obu kategoriach nieznacznie się różnił. Mianowicie dla kategorii A 31% to kobiety, a 69% to mężczyźni, natomiast dla kategorii B 18% pacjentów było płci żeńskiej, a 82% płci męskiej (rycina 26 i 27).

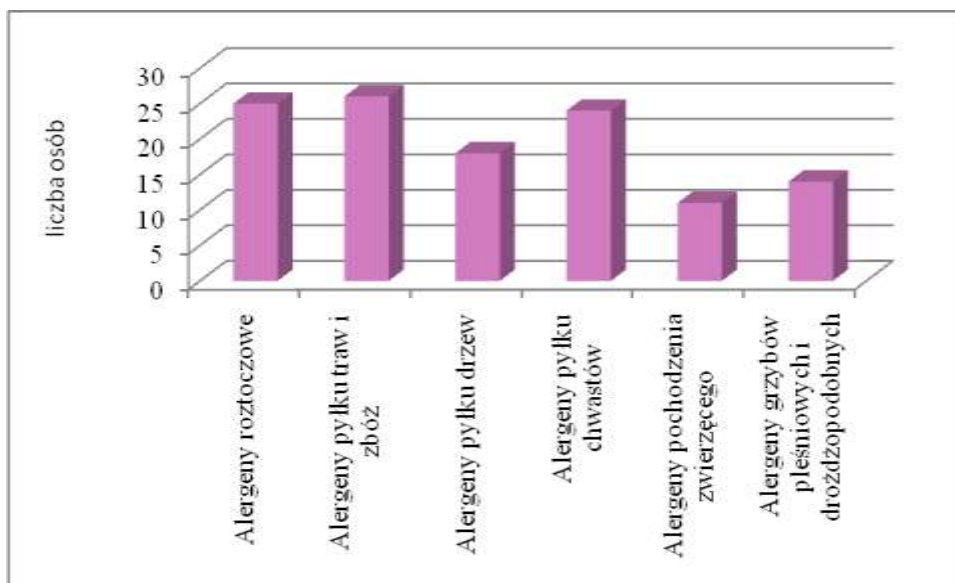
#### 4.2.2. Wyniki skórnych testów punktowych (STP) oraz oznaczeń stężenia asIgE w surowicy

W grupie 29 chorych (82,86%) na AZS, u których wykonano skórne testy punktowe z zestawem alergenów powietrzopochodnych, dodatni wynik testów uzyskano u 27 chorych, co stanowi 77,10% ogółu badanych tej grupy. Z kolei ujemne wyniki STP stwierdzono u 2 chorych, co stanowi 5,70% ogółu chorych na AZS. Jak wspomniano wcześniej, u 6 chorych na AZS (17,20%), w związku ze znacznym nasileniem procesu chorobowego, wykonanie STP nie było możliwe i z tego powodu oznaczono u nich stężenie asIgE skierowanych przeciwko wybranym alergenom w surowicy, takim samym u wszystkich chorych. U wszystkich 6 chorych wykryto obecność przeciwciał skierowanych przeciwko różnym alergenom powietrzopochodnym. Stężenie asIgE skierowanych przeciwko wybranym alergenom w surowicy oznaczono także u 2 chorych z ujemnymi wynikami STP. U jednego z nich wykryto obecność przeciwciał skierowanych przeciwko różnym alergenom powietrzopochodnym. Wyniki tego badania zostały przedstawione w tabeli nr XXII.

*Tabela nr XXII. Wyniki oznaczenia stężenia asIgE u 6 chorych na atopowe zapalenie skóry, u których nie wykonano STP oraz u 2 chorych z ujemnymi wynikami STP*

Wiek	D.pteronissinus		D.farinae		Brzoza		Bylica		Tymotka		Rajgras	
	Klasa	asIgE (kU/l)	Klasa	asIgE (kU/l)	Klasa	asIgE (kU/l)	Klasa	asIgE (kU/l)	Klasa	asIgE (kU/l)	Klasa	asIgE (kU/l)
20 K	0	<0,35	0	<0,35	0	<0,35	0	<0,35	4	23,9	4	27,2
21 M	4	22,9	3	17,0	0	<0,35	0	<0,35	0	<0,35	0	<0,35
26 M	0	<0,35	0	<0,35	2	1,46	2	3,43	4	41,0	5	50,2
22 K	6	>100	6	>100	5	70,00	2	1,77	6	>100	6	>100
34 M	5	91,00	6	>100	5	9,8	5	94,2	6	>100	3	18,00
24 M	5	91,00	5	92,5	0	<0,35	0	<0,35	0	<0,35	0	<0,35
22 K*	0	<0,35	0	<0,35	0	<0,35	0	<0,35	0	<0,35	0	<0,35
39 M*	5	92,7	5	90,6	5	65,7	3	7,17	3	6,90	3	9,19

\*Chorzy na AZS, u których wyniki STP były ujemne



**Rycina 28. Rodzaje alergenów powietrznych pochodzących u 33 chorych na atopowe zapalenie skóry na podstawie STP oraz oznaczeń asIgE w surowicy**

Na podstawie przeprowadzonych STP oraz na podstawie oznaczenia stężenia asIgE w surowicy krwi, u 25 spośród 33 chorych na AZS stwierdzono uczulenie na roztocza kurzu domowego, co stanowi 75,70% ogółu badanych, u 26 chorych (74,30%) stwierdzono alergię powietrzno pochodną w odniesieniu do alergenów pyłków traw i zbóż, u 24 chorych (68,60%) w odniesieniu do alergenów pyłku chwastów, u 11 chorych (31,40%) w odniesieniu do alergenów pochodzenia zwierzęcego, natomiast u 14 chorych (40%) w odniesieniu do alergenów grzybów pleśniowych i drożdżopodobnych (rycina 28). U 2 chorych (5,70%) dodatkowo były wcześniej wykonane asIgE w stosunku do gronkowca złocistego.

#### **4.2.3. Wyniki oznaczeń poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) w grupie badanej i w grupach kontrolnych**

Statystyki opisowe dla badanych zmiennych w grupach AZS, LP i Z zostały umieszczone w tabeli nr XXIII.

Tabela nr XXIII. Statystyki opisowe dla mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR w badanych grupach (AZS, LP, Z) dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC)

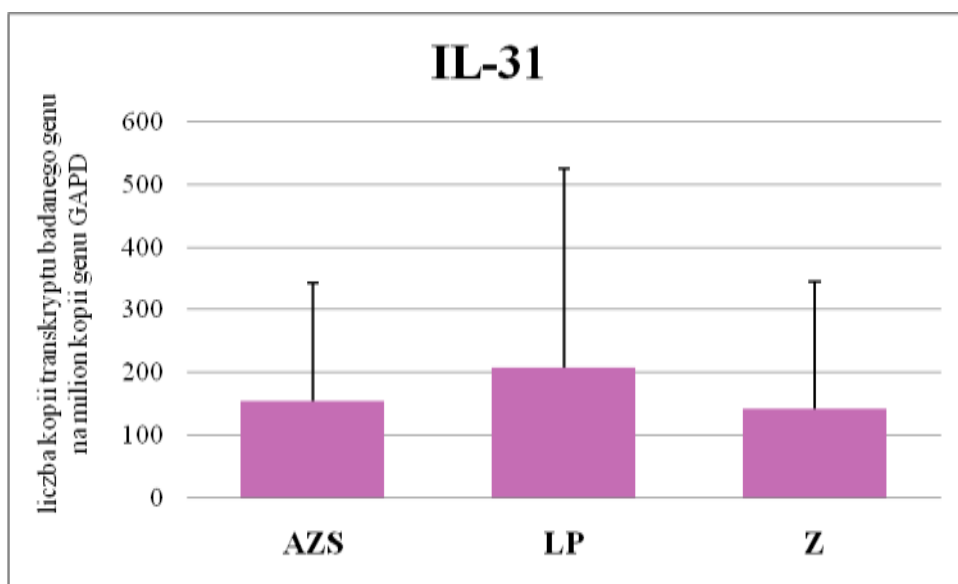
Statystyki opisowe (liczba kopii transkryptu badanego genu w przeliczeniu na milion kopii GAPD)							
Badana grupa	Badany parametr	N	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
AZS	IL-31	30	154,86	116,27	0,00	693,05	188,40
	IL-31RA	30	1298,49	510,35	0,00	6583,33	1654,63
	OSMR	30	7,02	0,55	0,00	121,94	22,87
LP	IL-31	14	207,65	46,84	0,00	947,98	318,08
	IL-31RA	14	2455,18	1159,35	0,00	9974,26	2826,97
	OSMR	14	40,89	0,00	0,00	549,31	146,37
Z	IL-31	14	142,20	30,96	0,00	677,86	202,52
	IL-31RA	14	2776,50	225,72	0,00	32809,77	8663,87
	OSMR	14	17,95	0,00	0,00	251,27	67,16

**Legenda:**

AZS – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry

LP – grupa chorych na liszaj płaski

Z – grupa osób zdrowych



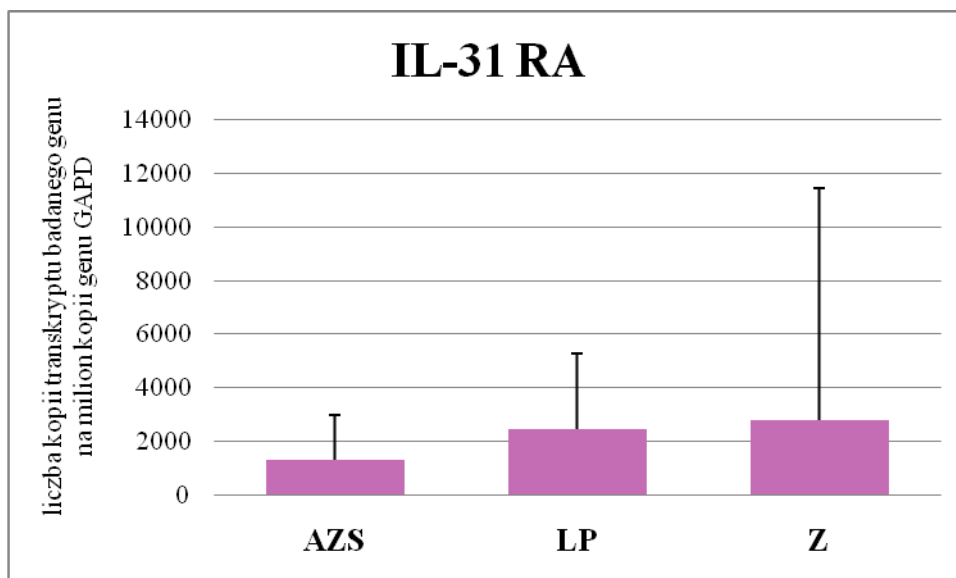
Rycina 29. Średni poziom mRNA IL-31 w grupach badanych (AZS, LP, Z) dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC)

**Legenda:**

AZS – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry

LP – grupa chorych na liszaj płaski

Z – grupa osób zdrowych



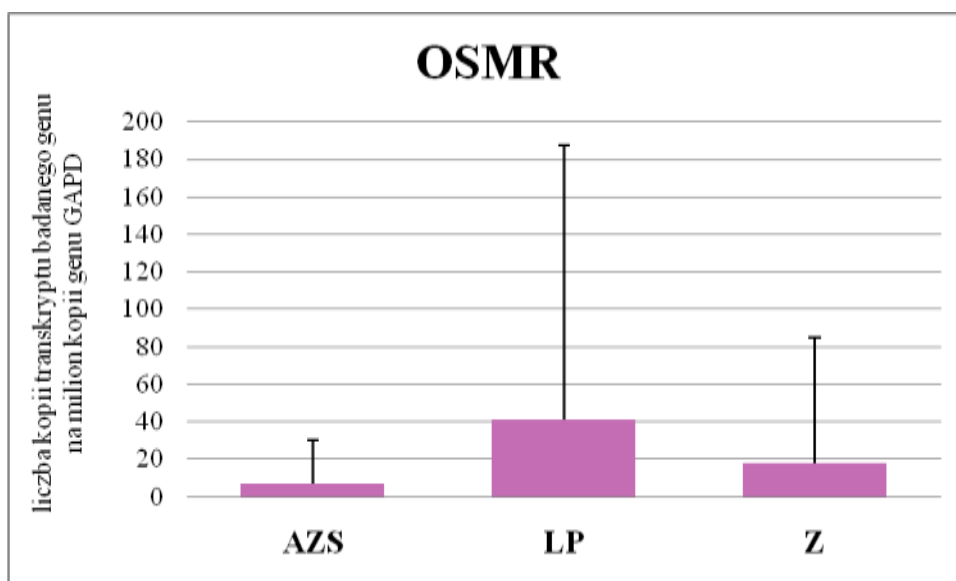
Rycina 30. Średni poziom mRNA IL-31RA w grupach badanych (AZS, LP, Z) dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC)

**Legenda:**

AZS – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry

LP – grupa chorych na liszaj płaski

Z – grupa osób zdrowych



Rycina 31. Średni poziom mRNA OSMR w grupach badanych (AZS, LP, Z) dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC)

**Legenda:**

AZS – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry

LP – grupa chorych na liszaj płaski

Z – grupa osób zdrowych

**Tabela nr XXIV. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) pomiędzy badanymi grupami (AZS, LP, Z) (p testu Manna-Whitney'a dla porównania grup AZS, LP i Z dla badanych parametrów\*)**

Porównywane grupy	p testu Manna-Whitney'a		
	IL-31	IL-31RA	OSMR
<b>AZS&amp; LP</b>	0,8880	0,1457	0,1773
<b>AZS&amp; Z</b>	0,5787	0,2793	<b>0,0001</b>
<b>LP &amp; Z</b>	0,5887	<b>0,0361</b>	<b>0,0235</b>

\* mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

**Legenda:**

**AZS** – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry

**LP** – grupa chorych na liszaj płaski

**Z** – grupa osób zdrowych

Za pomocą testu Manna–Whitney’a wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy poziomem mRNA IL-31RA i OSMR w grupie chorych na liszaj płaski i w grupie osób zdrowych z poziomem istotności wynoszącym odpowiednio  $p=0,0361$  oraz  $p=0,0235$  (tabela nr XXIV).

Ponadto za pomocą testu Manna–Whitney’a wykazana została statystycznie istotna różnica w poziomie mRNA OSMR dla oznaczeń w PBMC pomiędzy grupą badaną chorych na AZS i grupą kontrolną osób zdrowych z poziomem istotności  $p=0,0001$  (tabela nr XXIV).

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic we względnej liczbie transkryptów genów *IL31*, *IL31RA* oraz *OSMR* dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej pomiędzy grupą badaną chorych na AZS i grupą chorych na liszaj płaski. Liczba kopii transkryptu genu badanego wyrażona w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD* była w przypadku wszystkich badanych parametrów wyższa u chorych na AZS niż w grupie pacjentów z liszajem płaskim, jednakże różnice nie były istotne statystycznie.

**4.2.4. Wyniki oznaczeń poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR w tkankach grupie badanej i w grupach kontrolnych**

W tabeli nr XXV przedstawiono wyniki statystyki opisowej dla oznaczeń wykonanych w tkankach dla wszystkich badanych grup z uwzględnieniem podziału grupy chorych na AZS na AZS-Z (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry pozornie zdrowej) i AZS-CH (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych). Wyniki oznaczeń mRNA IL-31 i IL-31RA w grupie AZS-Z i AZS-CH są bardzo zbliżone do siebie i w związku z tym

dla obydwu badanych parametrów nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami (tabela nr XXVI). Wykazano natomiast statystycznie istotną różnicę pomiędzy grupą AZS-Z a AZS-CH ( $p=0,0058$ ) w zakresie poziomu mRNA OSMR, który w przypadku pierwszej grupy wynosi 149274, a w przypadku drugiej 238829 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD* (tabela nr XXVI).

**Tabela nr XXV. Statystyki opisowe dla mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR w badanych grupach (AZS-Z, AZS-CH, LP, Z) dla oznaczeń wykonanych w tkankach**

Statystyki opisowe							
(liczba kopii transkryptu badanego genu w przeliczeniu na milion kopii <i>GAPD</i> )							
Badana grupa	Badany parametr	N	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
AZS-Z	IL-31	35	26,40	0,00	0,00	306,10	62,90
	IL-31RA	35	1488,00	688,79	0,00	6703,30	1715,50
	OSMR	35	149274,30	91160,22	3555,56	809291,00	162930,00
AZS-CH	IL-31	35	34,70	0,00	0,00	521,40	101,20
	IL-31RA	35	1781,50	1010,50	27,52	11832,50	2424,30
	OSMR	35	238828,90	227748,70	26057,91	675590,60	168902,30
LP	IL-31	15	8,10	0,00	0,00	36,90	11,87
	IL-31RA	15	1196,10	1067,80	301,74	2588,60	614,04
	OSMR	15	109522,60	115860,70	25224,49	216037,70	54103,65
Z	IL-31	14	24,90	0,00	0,00	206,70	56,64
	IL-31RA	14	2949,05	1518,07	0,00	11873,60	3902,49
	OSMR	14	44698,31	15568,07	365,43	228690,20	64040,54

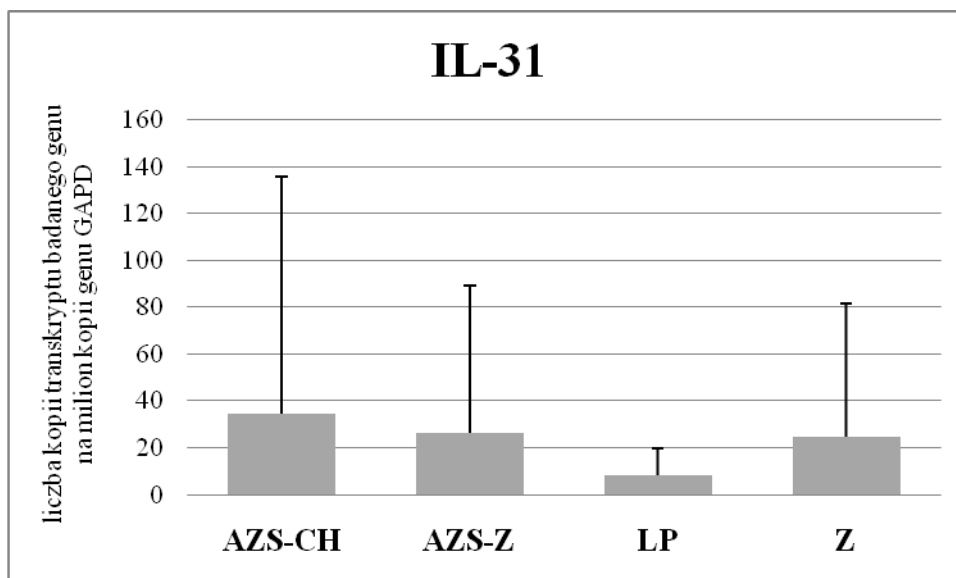
**Legenda:**

**AZS - Z** – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry pozornie zdrowej

**AZS-CH** – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych

**LP** – grupa chorych na liszaj płaski

**Z** – grupa osób zdrowych



**Rycina 32. Średni poziom mRNA IL-31 w poszczególnych grupach badanych (AZS, LP, Z) dla oznaczeń wykonanych w tkankach**

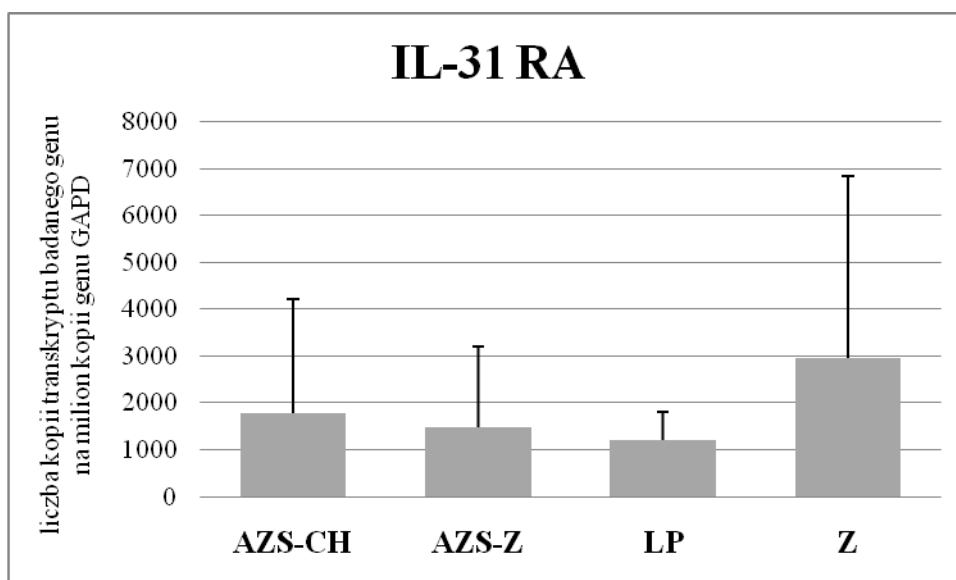
**Legenda:**

**AZS-Z** – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry pozornie zdrowej

**AZS-CH** – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych

**LP** - grupa chorych na liszaj płaski

**Z** – grupa osób zdrowych



**Rycina 33. Średni poziom mRNA IL-31RA w poszczególnych grupach badanych (AZS, LP, Z) dla oznaczeń wykonanych w tkankach**

**Legenda:**

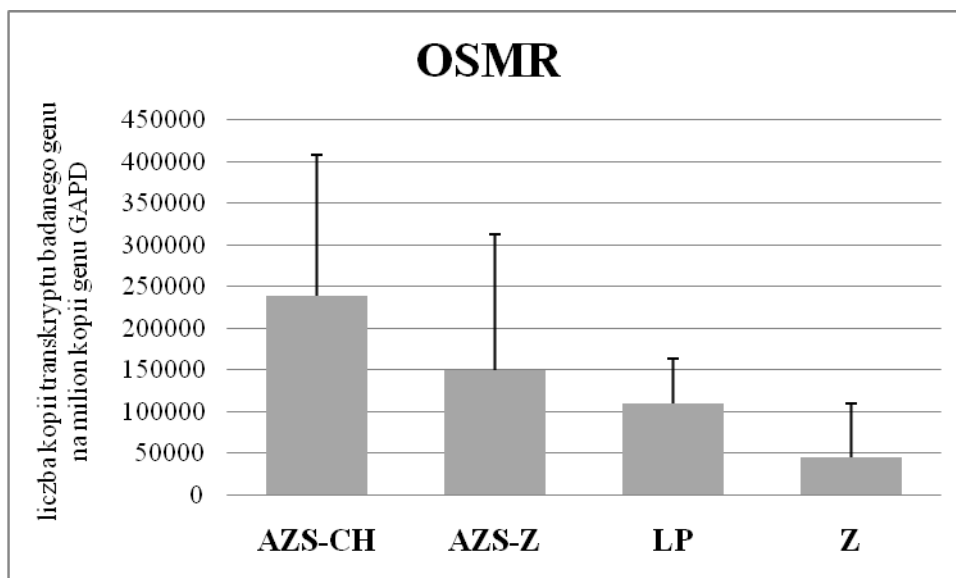
**AZS-Z** – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry pozornie zdrowej

**AZS-CH** – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych

**LP** – grupa chorych na liszaj płaski

**Z** – grupa osób zdrowych





**Rycina 34. Średni poziom mRNA OSMR w poszczególnych grupach badanych (AZS, LP, Z) dla oznaczeń wykonanych w tkankach**

**Legenda:**

- AZS-Z** – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry pozornie zdrowej
- AZS-CH** – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych
- LP** – grupa chorych na liszaj płaski
- Z** – grupa osób zdrowych

**Tabela nr XXVI. Porównanie poziomu badanych parametrów\* dla oznaczeń wykonanych w tkankach pomiędzy grupami chorych na AZS (AZS-CH, AZS-Z) a grupami kontrolnymi (LP, Z) (p testu Manna-Whitney'a dla porównania grup AZS-CH, AZS-Z, LP i Z dla badanych parametrów\*)**

Porównywane grupy	p testu Manna-Whitney'a		
	IL-31	IL-31RA	OSMR
<b>AZS-CH &amp; LP</b>	0,7300	0,6263	<b>0,0067</b>
<b>AZS-Z &amp; LP</b>	0,8409	0,3971	1,0000
<b>AZS-CH &amp; Z</b>	0,7449	0,9207	<b>0,0001</b>
<b>AZS-Z &amp; Z</b>	0,8214	0,7067	<b>0,0015</b>
<b>AZS-Z &amp; AZS-CH</b>	0,8054	0,9532	<b>0,0058</b>
<b>LP &amp; Z</b>	0,9203	0,7107	<b>0,0016</b>

\* mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

**Legenda:**

- AZS-Z** – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry pozornie zdrowej
- AZS-CH** – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych
- LP** – grupa chorych na liszaj płaski
- Z** – grupa osób zdrowych

Za pomocą testu Manna-Whitney'a nie wykazano statystycznie istotnych różnic między grupą AZS-Z (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały

pobrane ze skóry pozornie zdrowej) a grupą LP (grupa chorych na liszaj płaski) dla żadnego z parametrów.

Dla poziomów mRNA IL-31 i IL-31RA nie wykazano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy grupą AZS-Z (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry pozornie zdrowej) a grupą osób zdrowych (tabela nr XXVI). Średnie w obu tych grupach są do siebie zbliżone (tabela nr XXV). Wykazane zostały natomiast statystycznie istotne różnice w poziomie mRNA OSMR pomiędzy wycinkami pobranych ze skóry pozornie zdrowej w grupie chorych na AZS (AZS-Z) a wycinkami pobranymi od osób zdrowych ( $p=0,0015$ ) (tabela nr XXVI).

Wykazana została istotna statystycznie różnica między grupami AZS-CH (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych) i LP dla mRNA OSMR ( $p=0,0067$ ). Nie wykazano z kolei różnicy we względnej ilości transkryptów genu *IL31RA* oraz *IL31*.

Pomiędzy grupą AZS-CH (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych) a grupą osób zdrowych jedynie statystycznie istotnie różnice dla oznaczeń wykonanych w tkankach wykazano w poziomie mRNA OSMR ( $p=0,0001$ ) (tabela nr XXVI).

Ponadto wykazana została statystycznie istotna różnica we względnej liczbie transkryptów genu *OSMR* pomiędzy wycinkami pobranymi od chorych na liszaj płaski a wycinkami uzyskanymi w grupie osób zdrowych ( $p=0,0016$ ) (tabela nr XXVI). Średnia wartość poziomu mRNA OSMR w grupie LP wynosi 109523 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*, natomiast w grupie Z 44698 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD* (tabela nr XXV).

#### **4.2.5. Analiza poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR w grupie chorych na AZS w zależności od wskaźników nasilenia stanu zapalnego i świądu: W-AZS i EASI z podziałem na kategorie A i B w zależności od ciężkości stanu klinicznego**

##### **4.2.5.1. Analiza poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) w grupie chorych na AZS w zależności od wskaźników nasilenia stanu zapalnego i świądu: W-AZS, W-AZS I, W-AZS II i EASI z uwzględnieniem podziału na kategorie A i B w zależności od ciężkości stanu klinicznego**

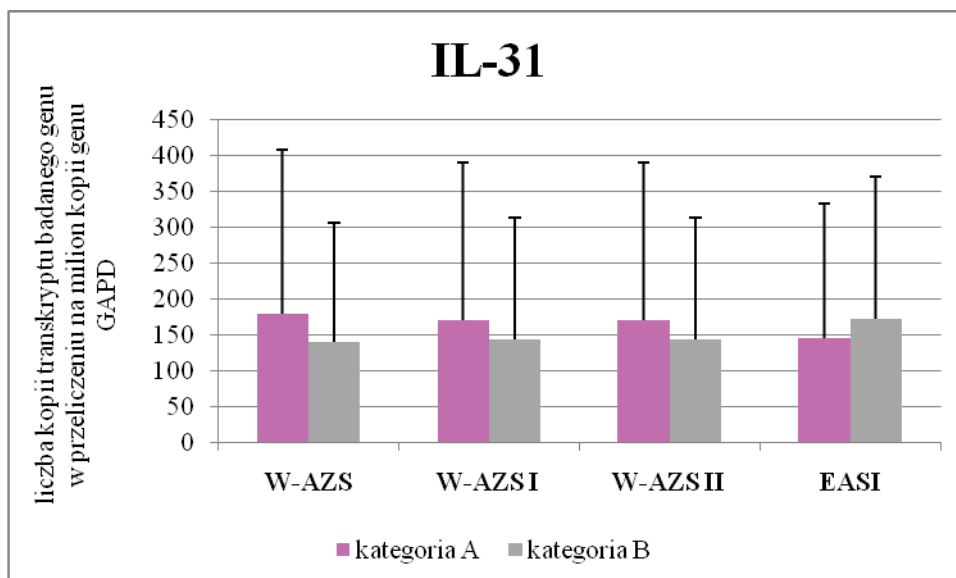
**Tabela nr XXVII. Poziom mRNA badanych parametrów\* w grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) w zależności od kategorii W-AZS, W-AZS I, W-AZS II i EASI**

Wskaźnik	Badany parametr	PBMC (liczba kopii transkryptu badanego genu w przeliczeniu na milion kopii GAPD)					
		N	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
W-AZS A	IL-31	11	180,25	101,12	0,00	693,05	228,49
	IL-31RA	11	854,56	434,92	0,00	3126,69	1209,76
	OSMR	11	13,86	0,88	0,00	121,94	36,13
W-AZS B	IL-31	19	140,16	131,52	0,00	587,41	166,01
	IL-31RA	19	1555,50	1115,70	0,00	6583,33	1845,99
	OSMR	19	3,06	0,36	0,00	37,12	8,47
W-AZS I A	IL-31	12	171,61	89,39	0,00	693,05	219,90
	IL-31RA	12	973,87	454,00	0,00	3126,69	1225,28
	OSMR	12	12,77	0,83	0,00	121,94	34,66
W-AZS I B	IL-31	18	143,69	133,81	0,00	587,41	170,09
	IL-31RA	18	1514,90	831,66	0,00	6583,33	1890,76
	OSMR	18	3,19	0,34	0,00	37,12	8,70
W-AZS II A	IL-31	12	171,61	89,39	0,00	693,05	219,90
	IL-31RA	12	973,87	454,00	0,00	3126,69	1225,28
	OSMR	12	12,77	0,83	0,00	121,94	34,66
W-AZS II B	IL-31	18	143,69	133,81	0,00	587,41	170,09
	IL-31RA	18	1514,90	831,66	0,00	6583,33	1890,76
	OSMR	18	3,19	0,34	0,00	37,12	8,70
EASI A	IL-31	20	145,78	89,39	0,00	693,05	188,21
	IL-31RA	20	869,38	431,00	0,00	3126,69	1017,75
	OSMR	20	8,05	0,58	0,00	121,94	27,04
EASI B	IL-31	10	173,01	133,81	0,00	587,41	197,58
	IL-31RA	10	2156,69	1818,98	0,00	6583,33	2325,42
	OSMR	10	4,97	0,54	0,00	37,12	11,56

\* mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

**Legenda:**

W-AZS A do 69 pkt.      W-AZS I A do 14 pkt.      W-AZS II A do 69 pkt.      EASI A do 49 pkt.  
W-AZS B 70 i powyżej      W-AZS I B 15 i powyżej      W-AZS II B 70 i powyżej      EASI B 50 i powyżej

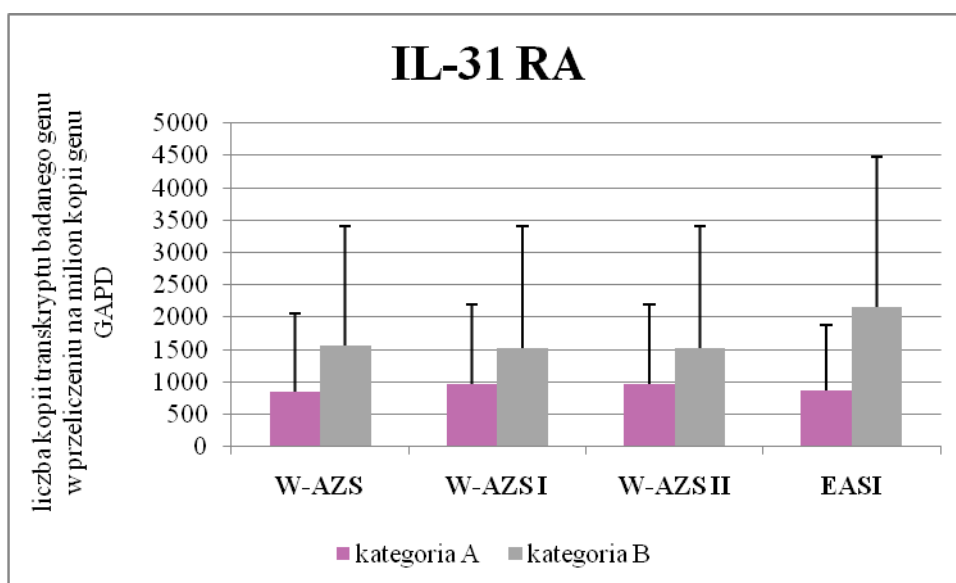


Rycina 35. Średni poziom mRNA IL-31 dla kategorii A i B badanych wskaźników\* w grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC)

\* W-AZS, W-AZS I, W-AZS II, EASI

**Legenda:**

W-AZS A do 69 pkt.      W-AZS I A do 14 pkt.      W-AZS II A do 69 pkt.      EASI A do 49 pkt.  
W-AZS B 70 i powyżej      W-AZS I B 15 i powyżej      W-AZS II B 70 i powyżej      EASI B 50 i powyżej

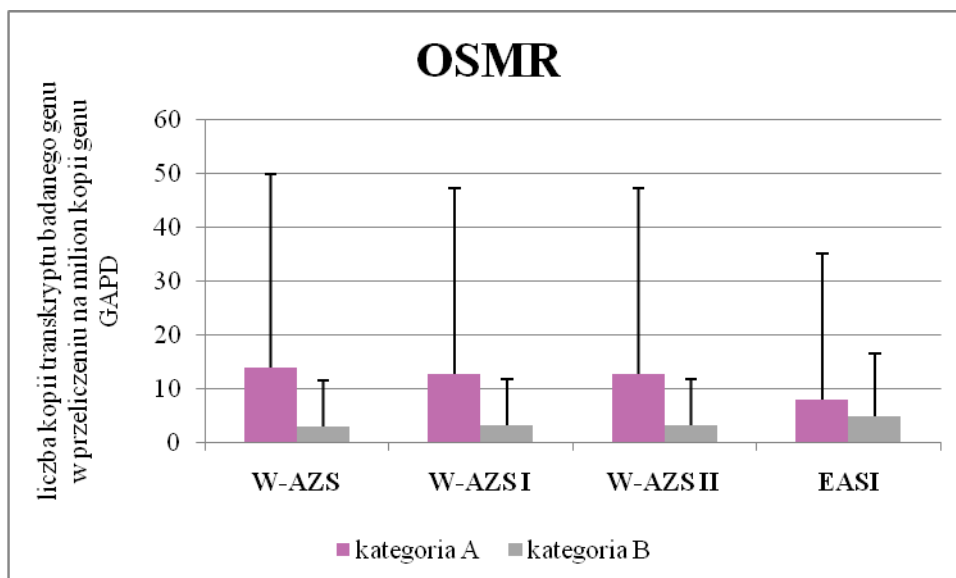


Rycina 36. Średni poziom mRNA IL-31RA dla kategorii A i B badanych wskaźników\* w grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC)

\* W-AZS, W-AZS I, W-AZS II, EASI

**Legenda:**

W-AZS A do 69 pkt.      W-AZS I A do 14 pkt.      W-AZS II A do 69 pkt.      EASI A do 49 pkt.  
W-AZS B 70 i powyżej      W-AZS I B 15 i powyżej      W-AZS II B 70 i powyżej      EASI B 50 i powyżej



Rycina 37. Średni poziom mRNA OSMR dla kategorii A i B badanych wskaźników\* w grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC)

\* W-AZS, W-AZS I, W-AZS II, EASI

**Legenda:**

W-AZS A do 69 pkt.      W-AZS I A do 14 pkt.      W-AZS II A do 69 pkt.      EASI A do 49 pkt.  
W-AZS B 70 i powyżej      W-AZS I B 15 i powyżej      W-AZS II B 70 i powyżej      EASI B 50 i powyżej

Tabela nr XXVIII. Porównanie poziomu badanych parametrów\* dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) pomiędzy kategoriami A i B wskaźników W-AZS, W-AZS I, W-AZS II i EASI u chorych na AZS

Wyniki testu Manna-Whitney'a dla porównań kategorii A i B wskaźników W-AZS, W-AZS I, W-AZS II oraz EASI				
Badany parametr	W-AZS	W-AZS I	W-AZS II	EASI
IL-31	0,7995	0,8841	0,8841	0,8458
IL-31RA	0,268	0,4648	0,4648	0,2307
OSMR	0,6111	0,5732	0,5732	0,7787

\* mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

**Legenda:**

W-AZS A do 69 pkt.      W-AZS I A do 14 pkt.      W-AZS II A do 69 pkt.      EASI A do 49 pkt.  
W-AZS B 70 i powyżej      W-AZS I B 15 i powyżej      W-AZS II B 70 i powyżej      EASI B 50 i powyżej

Po podziale na dwie kategorie (A i B) wskaźników nasilenia stanu zapalnego i świądu (W-AZS, W-AZS I, W-AZS II i EASI) policzono średnią względną liczbę transkryptów wszystkich badanych genów w PBMC. Za pomocą testu Manna-Whitney'a nie zostały wykazane statystycznie istotne różnice pomiędzy kategoriami A i B powyższych wskaźników. Podział na kategorie wszystkich wskaźników nie ma wpływu na różnice

w poziomie mRNA wszystkich badanych parametrów, tj. IL-31, IL-31RA oraz OSMR. Tutaj średnie nie różnią się istotnie między sobą.

Średnie poziomy mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w poszczególnych kategoriach dla każdego wskaźnika nasilenia stanu zapalnego i świądu przedstawiono w tabeli nr XXVII oraz na rycinach 35, 36 i 37, natomiast różnice pomiędzy poziomem mRNA badanych parametrów (IL-31, IL-31RA i OSMR) dla poszczególnych kategorii znajdują się w tabeli nr XXVIII.

**4.2.5.2. Analiza poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR dla oznaczeń wykonanych w tkankach w grupie chorych na AZS w zależności od wskaźników nasilenia stanu zapalnego i świądu: W-AZS, W-AZS I, W-AZS II i EASI z uwzględnieniem podziału na kategorie A i B w zależności od ciężkości stanu klinicznego**

*Tabela nr XXIX. Poziom mRNA badanych parametrów\* w grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w tkankach w zależności od kategorii W-AZS, W-AZS I, W-AZS II i EASI*

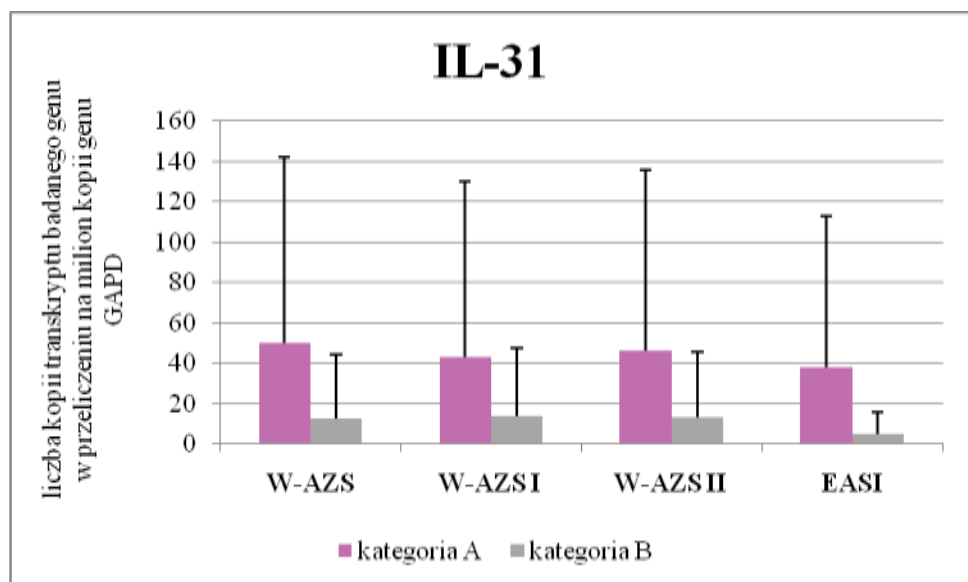
Wskaźnik	Badany parametr	TKANKI (liczba kopii transkryptu badanego genu w przeliczeniu na milion kopii GAPD)					
		N	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
W-AZS A	IL-31	13	49,68	0,00	0,00	306,10	92,29
	IL-31RA	13	1432,89	1085,37	0,36	6413,00	1770,84
	OSMR	13	96547,13	58231,71	4505,88	250467,30	74971,31
W-AZS B	IL-31	22	12,70	0,00	0,00	121,70	31,80
	IL-31RA	22	1520,60	683,00	0,00	6703,30	1723,30
	OSMR	22	180431,30	117601,90	3555,56	809291,00	192431,00
W-AZS I A	IL-31	15	43,05	0,00	0,00	306,10	87,21
	IL-31RA	15	1615,78	1089,55	0,36	6413,00	1719,66
	OSMR	15	96708,14	80952,38	4505,88	250467,30	69701,16
W-AZS I B	IL-31	20	13,90	0,00	0,00	121,70	33,20
	IL-31RA	20	1392,20	649,20	0,00	6703,30	1750,60
	OSMR	20	188698,90	130323,40	3555,56	809291,00	200265,70
W-AZS II A	IL-31	14	46,13	0,00	0,00	306,10	89,66
	IL-31RA	14	1494,80	1087,46	0,36	6413,00	1717,06
	OSMR	14	97833,55	74695,96	4505,88	250467,30	72190,75

Wskaźnik	Badany parametr	TKANKI (liczba kopii transkryptu badanego genu w przeliczeniu na milion kopii GAPD)					
		N	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
		W-AZS IIB	IL-31	21	13,30	0,00	0,00
IL-31RA	21		1483,50	677,30	0,00	6703,30	1756,80
OSMR	21		183568,10	120646,80	3555,56	809291,00	196605,90
EASI A	IL-31	23	37,60	0,00	0,00	306,10	75,40
	IL-31RA	23	1682,00	1085,37	0,36	6703,30	1829,70
	OSMR	23	142636,60	80952,38	3555,56	809291,00	176369,70
EASI B	IL-31	12	4,90	0,00	0,00	35,10	10,60
	IL-31RA	12	1116,20	484,00	0,00	4057,10	1473,40
	OSMR	12	161996,60	130323,40	17741,94	475463,50	139895,10

\* mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

**Legenda:**

W-AZS A do 69 pkt.    W-AZS I A do 14 pkt.    W-AZS II A do 69 pkt.    EASI A do 49 pkt.  
W-AZS B 70 i powyżej    W-AZS I B 15 i powyżej    W-AZS II B 70 i powyżej    EASI B 50 i powyżej

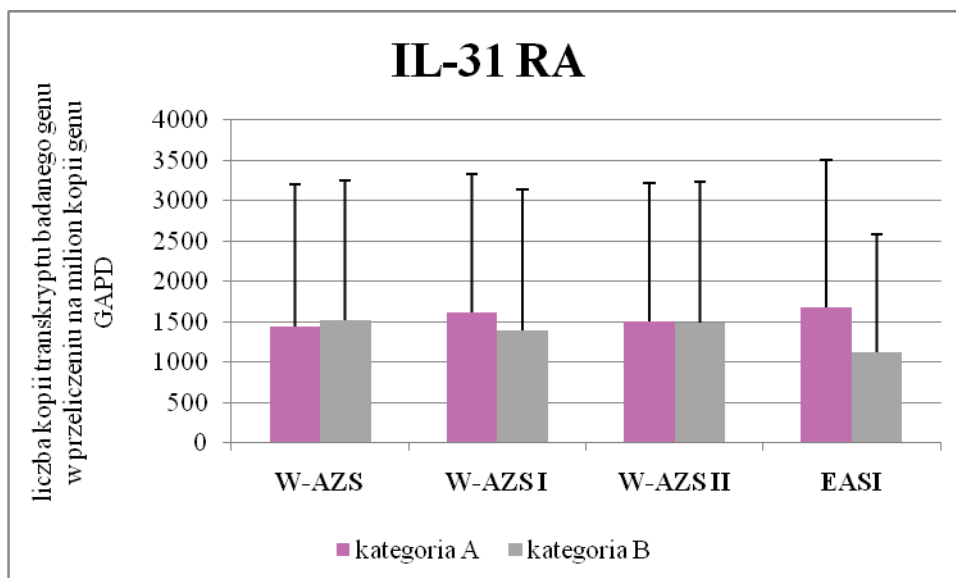


**Rycina 38. Średni poziom mRNA IL-31 dla kategorii A i B badanych wskaźników\* w grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w tkankach**

\* W-AZS, W-AZS I, W-AZS II, EASI

**Legenda:**

W-AZS A do 69 pkt.    W-AZS I A do 14 pkt.    W-AZS II A do 69 pkt.    EASI A do 49 pkt.  
W-AZS B 70 i powyżej    W-AZS I B 15 i powyżej    W-AZS II B 70 i powyżej    EASI B 50 i powyżej

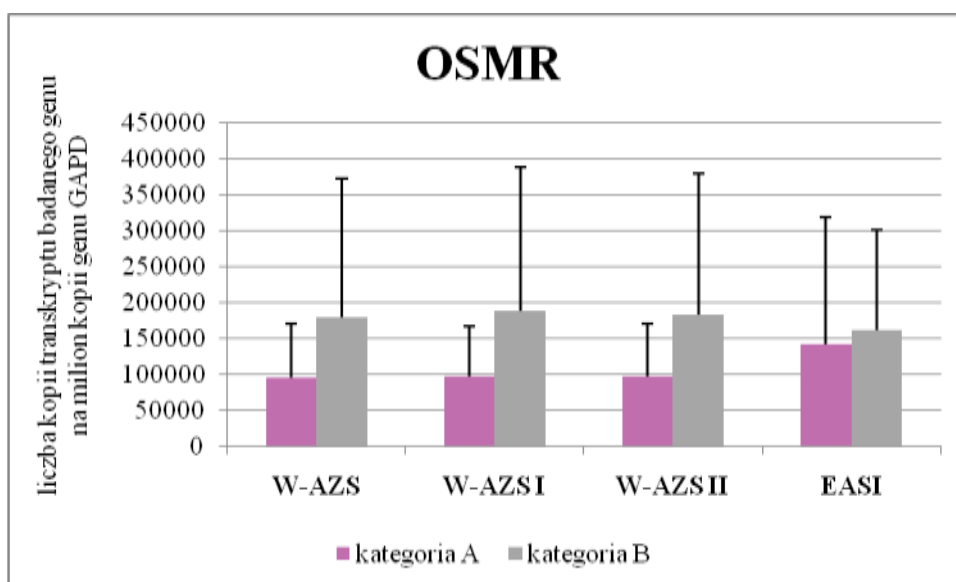


**Rycina 39. Średni poziom mRNA IL-31RA dla kategorii A i B badanych wskaźników\* w grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w tkankach**

\* W-AZS, W-AZS I, W-AZS II, EASI

**Legenda:**

W-AZS A do 69 pkt.      W-AZS I A do 14 pkt.      W-AZS II A do 69 pkt.      EASI A do 49 pkt.  
W-AZS B 70 i powyżej      W-AZS I B 15 i powyżej      W-AZS II B 70 i powyżej      EASI B 50 i powyżej



**Rycina 40. Średni poziom mRNA OSMR dla kategorii A i B badanych wskaźników\* w grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w tkankach**

\* W-AZS, W-AZS I, W-AZS II, EASI

**Legenda:**

W-AZS A do 69 pkt.      W-AZS I A do 14 pkt.      W-AZS II A do 69 pkt.      EASI A do 49 pkt.  
W-AZS B 70 i powyżej      W-AZS I B 15 i powyżej      W-AZS II B 70 i powyżej      EASI B 50 i powyżej



**Tabela nr XXX. Porównanie poziomu badanych parametrów\* dla oznaczeń wykonanych w tkankach pomiędzy kategoriami A i B wskaźników W-AZS, W- AZS I, W-AZS II i EASI u chorych na AZS**

<b>Wyniki testu Manna-Whitney'a dla porównań kategorii A i B dla W-AZS, W-AZS I, W-AZS II oraz EASI</b>				
<b>Badany parametr</b>	<b>W-AZS</b>	<b>W-AZS I</b>	<b>W-AZS II</b>	<b>EASI</b>
<b>IL-31</b>	0,4081	0,6568	0,5165	0,4605
<b>IL-31RA</b>	0,7237	0,7297	0,9603	0,2483
<b>OSMR</b>	0,3528	0,3819	0,3955	0,5257

\* mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

**Legenda:**

**W-AZS A** do 69 pkt.      **W-AZS I A** do 14 pkt.      **W-AZS II A** do 69 pkt.      **EASI A** do 49 pkt.  
**W-AZS B** 70 i powyżej      **W-AZS I B** 15 i powyżej      **W-AZS II B** 70 i powyżej      **EASI B** 50 i powyżej

W przypadku oznaczeń wykonanych w tkankach nie wykazano żadnych różnic pomiędzy wyróżnionymi kategoriami w przypadku wszystkich wskaźników dla poziomu mRNA wszystkich badanych parametrów, czyli: IL-31, IL-31RA oraz OSMR. Średnie poziomy mRNA z podziałem na kategorie A i B wskaźników nasilenia stanu zapalnego i świądu są zbliżone do siebie.

Wszystkie średnie poziomy mRNA badanych parametrów z podziałem na kategorie dla każdego wskaźnika nasilenia stanu zapalnego i świądu przedstawiono w tabeli nr XXIX oraz na rycinach 38, 39 i 40, natomiast różnice pomiędzy poziomami mRNA dla poszczególnych kategorii znajdują się w tabeli nr XXX.

**4.2.6. Analiza poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR w grupie chorych na AZS w zależności od stężenia cIgE w surowicy z podziałem na kategorie A i B z uwzględnieniem stanu klinicznego**

**4.2.6.1. Analiza poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) w grupie chorych na AZS w zależności od stężenia cIgE w surowicy z podziałem na kategorie A i B z uwzględnieniem stanu klinicznego**

*Tabela nr XXXI. Poziom mRNA badanych parametrów\* w grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) w zależności od stężenia cIgE w surowicy z podziałem na kategorie A i B z uwzględnieniem stanu klinicznego*

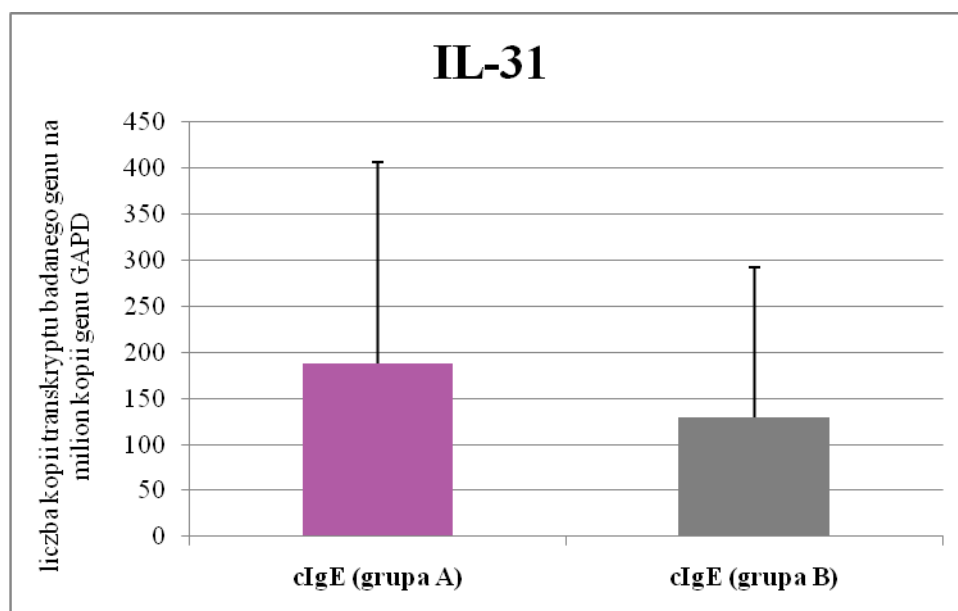
PBMC (liczba kopii transkryptu badanego genu w przeliczeniu na milion kopii GAPD)						
cIgE	Badany parametr	N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD
cIgE (grupa A)	IL-31	13	188,25	0,00	693,05	218,92
	IL-31RA	13	1040,51	0,00	3126,69	1141,02
	OSMR	13	11,98	0,00	121,94	33,31
cIgE (grupa B)	IL-31	17	129,32	0,00	587,41	163,68
	IL-31RA	17	1495,76	0,00	6583,33	1972,41
	OSMR	17	3,23	0,00	37,12	8,95

\* mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

Legenda:

Grupa A: cIgE - do 500 kU/l

Grupa B: cIgE - 501 kU/l i powyżej

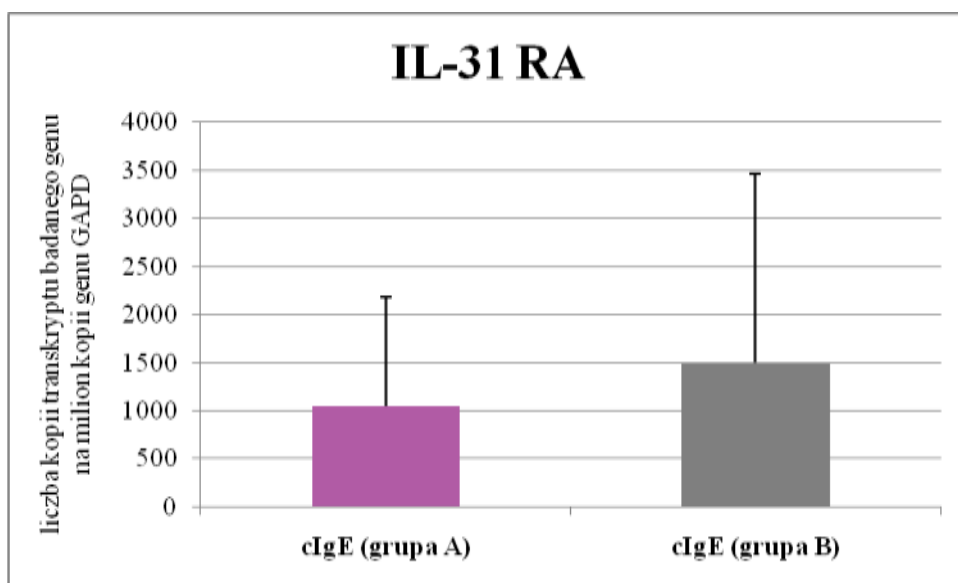


*Rycina 41. Średni poziom mRNA IL-31 dla kategorii A i B surowiczego stężenia cIgE w grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) z uwzględnieniem stanu klinicznego*

Legenda:

Grupa A: cIgE - do 500 kU/l

Grupa B: cIgE - 501 kU/l i powyżej

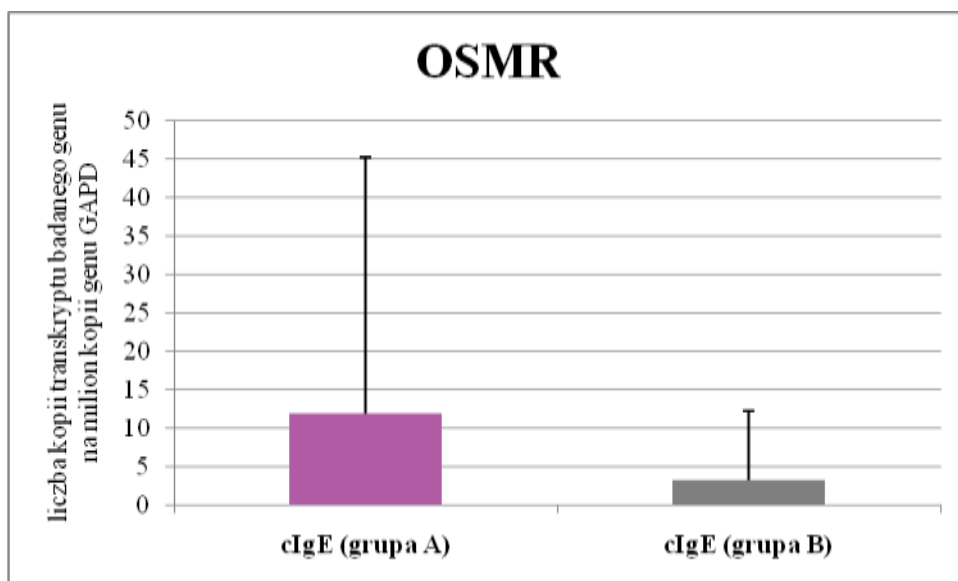


Rycina 42. Średni poziom mRNA IL-31RA dla kategorii A i B surowiczego stężenia cIgE w grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) z uwzględnieniem stanu klinicznego

Legenda:

Grupa A: cIgE - do 500 kU/l

Grupa B: cIgE - 501 kU/l i powyżej



Rycina 43. Średni poziom mRNA OSMR dla kategorii A i B surowiczego stężenia cIgE w grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) z uwzględnieniem stanu klinicznego

Legenda:

Grupa A: cIgE - do 500 kU/l

Grupa B: cIgE - 501 kU/l i powyżej

**Tabela nr XXXII. Porównanie poziomu badanych parametrów\* dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) pomiędzy kategoriami A i B wyróżnionymi ze względu na surowicze stężenie cIgE u chorych na AZS**

Wyniki testu Manna-Whitney'a dla porównań grup A z B dla cIgE	
Badany parametr	cIgE A/ cIgE B
IL-31	0,5357
IL-31RA	0,9016
OSMR	0,5634

\* mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

**Legenda:**

**Grupa A:** cIgE - do 500 kU/l

**Grupa B:** cIgE - 501 kU/l i powyżej

Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR pomiędzy kategorią A a kategorią B wyróżnionymi ze względu na surowicze stężenie cIgE dla oznaczeń wykonanych w PBMC. Średnie poziomy mRNA w obu grupach są bardzo zbliżone do siebie.

Wszystkie średnie poziomy mRNA badanych parametrów z podziałem na kategorie w zależności od stężenia cIgE w surowicy zostały przedstawione w tabeli nr XXXI oraz rycinach 41,42 i 43, natomiast różnice pomiędzy poziomami mRNA dla poszczególnych kategorii znajdują się w tabeli nr XXXII.

#### **4.2.6.2. Analiza poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR dla oznaczeń wykonanych w tkankach w grupie chorych na AZS w zależności od surowiczego stężenia cIgE z uwzględnieniem podziału na kategorie A i B w zależności od stanu klinicznego**

**Tabela nr XXXIII. Poziom mRNA badanych parametrów\* w grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w tkankach w zależności od stężenia cIgE w surowicy z podziałem na kategorie A i B z uwzględnieniem stanu klinicznego**

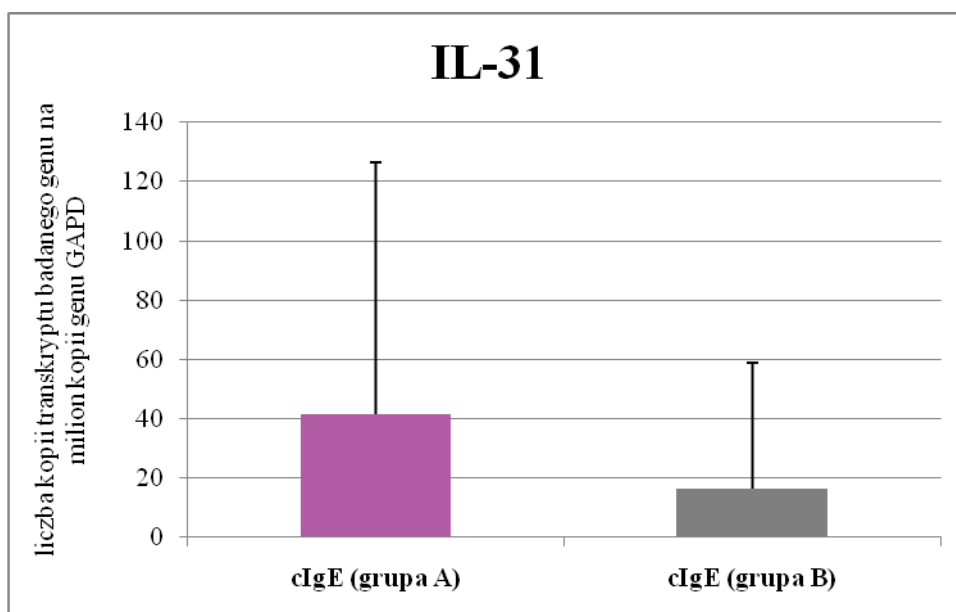
TKANKI (liczba kopii transkryptu badanego genu w przeliczeniu na milion kopii GAPD)						
cIgE	Badany parametr	N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD
cIgE (grupa A)	IL-31	14	41,40	0,00	306,10	84,90
	IL-31RA	14	1817,80	3,15	6703,30	2153,50
	OSMR	14	123839,00	35643,56	409871,20	112626,40
cIgE (grupa B)	IL-31	21	16,40	0,00	158,30	42,30
	IL-31RA	21	1268,20	0,00	4057,10	1364,30
	OSMR	21	166231,20	3555,56	809291,00	190075,40

\* mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR

**Legenda:**

**Grupa A:** cIgE – do 500 kU/l

**Grupa B:** cIgE – 501 kU/l i powyżej

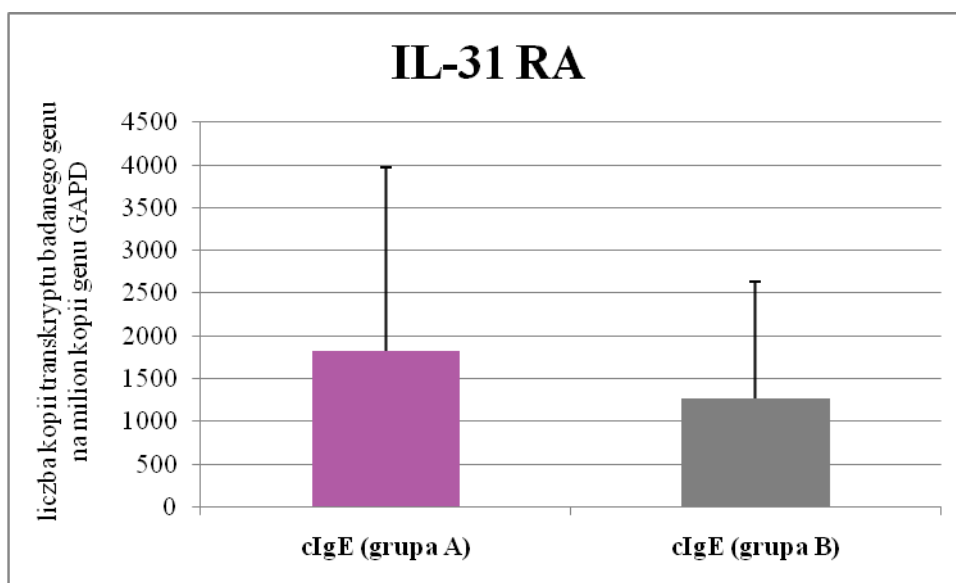


*Rycina 44. Średni poziom mRNA IL-31 dla kategorii A i B surowiczego stężenia cIgE w grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w tkankach z uwzględnieniem stanu klinicznego*

**Legenda:**

**Grupa A:** cIgE – do 500 kU/l

**Grupa B:** cIgE – 501 kU/l i powyżej

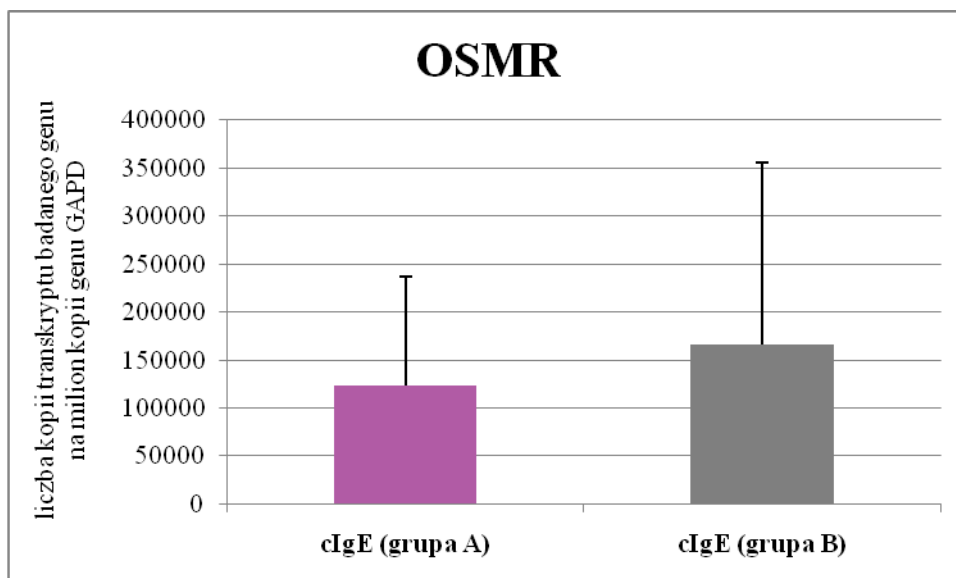


*Rycina 45. Średni poziom mRNA IL-31RA dla kategorii A i B surowiczego stężenia cIgE w grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w tkankach z uwzględnieniem stanu klinicznego*

**Legenda:**

**Grupa A:** cIgE – do 500 kU/l

**Grupa B:** cIgE – 501 kU/l i powyżej



**Rycina 46.** Średni poziom mRNA OSMR dla kategorii A i B surowiczego stężenia cIgE w grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w tkankach z uwzględnieniem stanu klinicznego

**Legenda:**

**Grupa A:** cIgE – do 500 kU/l

**Grupa B:** cIgE – 501 kU/l i powyżej

**Tabela nr XXXIV.** Porównanie poziomu badanych parametrów\* dla oznaczeń wykonanych w tkankach pomiędzy kategoriami A i B wyróżnionymi ze względu na surowicze stężenie cIgE u chorych na AZS

Wyniki testu Manna-Whitney'a dla porównań grup A i B dla cIgE	
Badany parametr	cIgE A/ cIgE B
IL-31	0,5832
IL-31RA	0,4951
OSMR	0,8551

\* mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR

**Legenda:**

**Grupa A:** cIgE – do 500 kU/l

**Grupa B:** cIgE – 501 kU/l i powyżej

W przypadku oznaczeń wykonanych w tkankach również nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w poziomie mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR między kategorią A a kategorią B dla surowiczego stężenia cIgE.

Ze względu na znaczną dysproporcję w liczebności grup chorych na AZS, przy uwzględnieniu podziału na postać zewnątrzpochodną i wewnątrzpochodną, zrezygnowano z przeprowadzenia analizy zależności pomiędzy poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) oraz poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w tkankach.

## 4.2.7. Korelacje

### 4.2.7.1. Korelacje dla badanych parametrów\* dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC)

Tabela nr XXXV. Współczynniki korelacji  $r$  w grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) pomiędzy badanymi parametrami\* oraz pomiędzy badanymi parametrami\* i stanem klinicznym

AZS							
	IL-31	IL-31RA	OSMR	W-AZS	W-AZS I	W-AZS II	EASI
IL-31		0,3007	<b>0,6077</b>	0,0456	0,0806	-0,016	0,0554
IL-31RA	0,3007		<b>0,5439</b>	0,239	0,2979	0,1854	0,2539
OSMR	<b>0,6077</b>	<b>0,5439</b>		0,0579	0,0176	0,0085	0,0902

\* mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR, W-AZS, W-AZS I, W-AZS II, EASI

W grupie chorych na AZS dla oznaczeń wykonanych w PBMC wykazano wysokie korelacje między względną liczbą transkryptów genu *OSMR* i genu *IL31* ( $r=0,6077$ ) oraz względną liczbą transkryptów genu *OSMR* i genu *IL31RA* ( $r=0,5439$ ) (tabela nr XXXV). Nie wykazano natomiast korelacji mRNA badanych parametrów: IL-31, IL-31RA i OSMR ze stanem klinicznym (W-AZS, W-AZS I, W-AZS II, EASI).

Tabela nr XXXVI. Współczynniki korelacji  $r$  w grupie chorych na liszaj płaski (LP) dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC)

LP			
	IL-31	IL-31RA	OSMR
IL-31		0,5023	<b>0,6719</b>
IL-31RA	0,5023		0,253
OSMR	<b>0,6719</b>	0,253	

W grupie chorych na liszaj płaski wykazano tylko jedną wysoką korelację, której współczynnik wynosi  $r=0,6719$ . Korelacja ta istnieje między poziomem mRNA IL-31 a poziomem mRNA OSMR. Pozostałe korelacje pomiędzy mRNA badanych parametrów nie są istotne statystycznie (tabela nr XXXVI).

Tabela nr XXXVII. Współczynniki korelacji  $r$  w grupie osób zdrowych (Z) dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC)

Z			
	IL-31	IL-31RA	OSMR
IL-31		<b>0,8096</b>	<b>0,6376</b>
IL-31RA	<b>0,8096</b>		0,6147
OSMR	<b>0,6376</b>	0,6147	

W grupie osób zdrowych dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej wykazano wysoką korelację pomiędzy poziomem mRNA OSMR i poziomem mRNA IL-31 (współczynnik korelacji  $r=0,6376$ ) oraz poziomem mRNA IL-31RA (współczynnik korelacji  $r=0,6147$ ). Bardzo wysoka korelacja została wykazana dla poziomu mRNA IL-31RA i poziomu mRNA IL-31 ( $r=0,8096$ ). Wyniki dla grupy Z przedstawiono w tabeli nr XXXVII.

#### 4.2.7.2. Korelacje dla badanych parametrów\* dla oznaczeń wykonanych w tkankach

*Tabela nr XXXVIII. Współczynniki korelacji  $r$  w grupie chorych na AZS, u których wycinki pobrane zostały ze skóry pozornie zdrowej (AZS-Z) dla oznaczeń\* wykonanych w tkankach*

AZS-Z							
	IL-31	IL-31RA	OSMR	W-AZS	W-AZS I	W-AZS II	EASI
IL-31		0,3273	0,2089	-0,1744	-0,1771	-0,1771	-0,2037
IL-31RA	0,3273		<b>0,4227</b>	-0,0508	-0,084	-0,0743	-0,1688
OSMR	0,2089	<b>0,4227</b>		0,1542	0,0648	0,1852	0,1083

\* mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR, W-AZS, W-AZS I, W-AZS II, EASI

W grupie AZS-Z (grupa pacjentów chorych na AZS, u których wycinki pobrane zostały ze skóry pozornie zdrowej) wykazano tylko przeciętną korelację między poziomem mRNA OSMR a poziomem mRNA IL-31RA ( $r=0,4227$ ) (tabela nr XXXVIII).

*Tabela nr XXXIX. Współczynniki korelacji  $r$  w grupie chorych na AZS, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych (AZS-CH) dla oznaczeń\* wykonanych w tkankach*

AZS-CH							
	IL-31	IL-31RA	OSMR	W-AZS	W-AZS I	W-AZS II	EASI
IL-31		-0,2522	-0,0418	0,0351	-0,0536	0,0456	0,0924
IL-31RA	-0,2522		<b>0,4104</b>	0,0455	0,0619	0,0504	-0,0242
OSMR	-0,0418	<b>0,4104</b>		0,2618	0,1627	0,2847	0,2479

\* mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR, W-AZS, W-AZS I, W-AZS II, EASI

W grupie chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych wykazano przeciętną korelację między poziomem mRNA OSMR a poziomem mRNA IL-31RA (współczynnik korelacji  $r=0,4104$ ). Współczynniki korelacji dla grupy AZS-CH umieszczono w tabeli nr XXXIX.



**Tabela nr XL. Współczynniki korelacji r w grupie chorych na liszaj płaski (LP) dla oznaczeń\* wykonanych w tkankach**

LP			
	IL-31	IL-31RA	OSMR
IL-31		0,3465	-0,0121
IL-31RA	0,3465		-0,3107
OSMR	-0,0121	-0,3107	

\* mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

**Tabela nr XLI. Współczynniki korelacji r w grupie osób zdrowych (Z) dla oznaczeń\* wykonanych w tkankach**

Z			
	IL-31	IL-31RA	OSMR
IL-31		-0,4021	0,397
IL-31RA	-0,4021		0,389
OSMR	0,397	0,389	

\* mRNA IL-31, IL-31RA, OSMR

Nie wykazano żadnych korelacji pomiędzy poziomami mRNA badanych parametrów w grupie chorych na liszaj płaski i u pacjentów zdrowych (tabela nr XL i XLI).

#### **4.2.8. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR między oznaczeniami wykonanymi w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) i w tkankach**

**Tabela nr XLII. Porównanie poziomu mRNA badanych parametrów\* w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) i w tkankach**

	AZS-Z (tkanki) z AZS (PBMC)	AZS-CH (tkanki) z AZS (PBMC)	LP (tkanki) z LP (PBMC)	Z (tkanki) z Z (PBMC)
IL-31	<b>0,0007</b>	<b>0,0006</b>	<b>0,0059</b>	0,1251
IL-31RA	0,2797	0,3228	0,5613	0,1499
OSMR	<b>0,0001</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0001</b>

\* IL-31, IL-31RA, OSMR

#### **Legenda:**

**AZS-Z** – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry pozornie zdrowej

**AZS-CH** – grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych

**LP** – grupa chorych na liszaj płaski

**Z** – grupa osób zdrowych

Pomiędzy poszczególnymi grupami dokonano porównań dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i w tkankach (tabela XLII). Za pomocą testu

Manna–Whitney’ego wykazano statystycznie istotną różnicę pomiędzy grupą AZS-Z (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry pozornie zdrowej) dla oznaczeń wykonanych w tkankach a grupą AZS dla oznaczeń wykonanych w PBMC dla poziomu mRNA IL-31 ( $p=0,0007$ ) oraz OSMR ( $p=0,0001$ ). Większe wartości poziomu mRNA występują dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej w przypadku IL-31 (średnia dla oznaczeń wykonanych w PBMC wynosi 155 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*; średnia dla oznaczeń wykonanych w tkankach wynosi 26 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*). Z kolei w przypadku mRNA OSMR jest odwrotnie. Jego poziom dla oznaczeń wykonanych w PBMC wynosi 7, natomiast dla oznaczeń wykonanych w tkankach aż 149274 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*.

Identycznie wyniki wykazano porównując oznaczenia dla grupy chorych na AZS dla badań wykonanych w PBMC z grupą AZS-CH (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry w miejscach ze zmianami klinicznymi) dla oznaczeń wykonanych w tkankach. Tutaj również wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy poziomem mRNA IL-31 dla oznaczeń w PBMC a poziomem mRNA IL-31 ( $p=0,0006$ ) oraz poziomem mRNA OSMR ( $p=0,0001$ ) dla oznaczeń w tkankach. Wartości poziomu mRNA tych parametrów układają się tak samo jak w przypadku porównań AZS-Z (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry pozornie zdrowej) dla oznaczeń w tkankach z AZS dla oznaczeń w PBMC. Mianowicie średnia względna liczba transkryptów genu *IL31* dla oznaczeń w tkankach wynosi 35, natomiast dla oznaczeń w PBMC aż 155 kopii. Z kolei w przypadku genu *OSMR* większa średnia względna ilość transkryptów została wykazana dla oznaczeń wykonanych w tkankach, w których wynosi ona 238829 kopii, z kolei dla oznaczeń wykonanych w PBMC jest to tylko 7 kopii.

Dla porównania poziomu mRNA badanych parametrów w grupie LP (grupa chorych na liszaj płaski) w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej z poziomem mRNA w tkankach, wykazano statystycznie istotną różnicę dla poziomu mRNA IL-31 ( $p=0,0059$ ) oraz dla poziomu mRNA OSMR ( $p=0,0001$ ). Średni poziom mRNA IL-31 dla oznaczeń wykonanych w PBMC wynosi 208, a w tkankach tylko 8 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*. Z kolei średni poziom mRNA OSMR dla oznaczeń wykonanych w PBMC wynosi 41, natomiast w tkankach aż 109523 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*.

W przypadku grupy osób zdrowych, średnia względna liczba transkryptów genu *OSMR* dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej jest niższa, niż dla oznaczeń wykonanych w tkankach i wynosi ona odpowiednio 18 i aż 44698 kopii, a ponadto jest to różnica istotna statystycznie ( $p=0,0001$ ).

Tylko poziom mRNA *IL-31RA* nie różni się między oznaczeniami wykonanymi w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i w tkankach dla wszystkich grup, a jego średnie są do siebie bardzo zbliżone.

Wszystkie średnie poziomy mRNA badanych parametrów dla oznaczeń wykonanych w PBMC przedstawione są w tabeli nr XXIII, a dla oznaczeń wykonanych w tkankach w tabeli nr XXV.

## 5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

### 5.1. Ocena stanu klinicznego chorych na atopowe zapalenie skóry

Tematem niniejszej pracy była ocena względnej liczby transkryptów genów *IL31*, *IL31RA* i *OSMR* w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) oraz w skórze chorobowo zmienionej i w skórze pozornie zdrowej u chorych na atopowe zapalenie skóry (AZS), porównanie wyników z grupami kontrolnymi, które stanowili chorzy na liszaj płaski (LP) i osoby zdrowe (Z) oraz ocena porównawcza powyższych parametrów pomiędzy grupą badaną a grupami kontrolnymi. Głównym przedmiotem dyskusji jest znaczenie IL-31 w patomechanizmie AZS, jednak na uwagę zasługują również niektóre aspekty wynikające z oceny stanu klinicznego chorych na AZS. Badana populacja liczyła łącznie 67 osób i była złożona z trzech grup. Mianowicie grupę badaną stanowiło 35 chorych na AZS, pierwszą grupę kontrolną 16 chorych na rozsiany liszaj płaski (LP), natomiast drugą grupę kontrolną 16 osób zdrowych (Z). Średnia wieku w grupie chorych na AZS wynosiła 32,50 lat.

Jak wspomniano w rozdziale „Materiał i metodyka”, rozpoznanie AZS zostało postawione w oparciu o kryteria Hanifina i Rajki, które chociaż opracowane zostały w 1980 roku, nadal są uznawane za „złote” kryteria (1). Warunkiem niezbędnym do rozpoznania AZS jest spełnienie co najmniej 3 kryteriów większych. Ze względu na to, że w badanej populacji u zdecydowanej większości, a mianowicie u 22 chorych (62,90%) zostały spełnione wszystkie 4 kryteria większe, a u 13 chorych (37,10%) spełnione zostały 3 kryteria większe wg Hanifina i Rajki, rozpoznanie AZS nie budziło wątpliwości. Spośród kryteriów większych, u wszystkich badanych chorych na AZS schorzenie miało charakter przewlekły i nawrotowy oraz, co jest bardzo istotne, występował świąd skóry, który wg G.Rajki, stanowi niezbędne kryterium do rozpoznania AZS (326). U 34 chorych (97,10%) lokalizacja zmian chorobowych była typowa, natomiast u 1 pacjenta (2,90%) odbiegała ona od typowego schematu. U tego chorego zmiany chorobowe umiejscowione były w obrębie twarzy i szyi, co może wskazywać na udział reakcji powietrzno pochodnej. Według danych literaturowych taka lokalizacja spotykana jest u osób, u których pierwsze objawy AZS pojawiły się w wieku dorosłym i może występować u 12% chorych na AZS (327).

Z kolei analiza kryteriów mniejszych Hanifina i Rajki (1) wykazała, że spośród nich, u wszystkich chorych występowała suchość skóry, natomiast niemal u wszystkich, bo u 34 osób (97,10%) do zaostrzeń dochodziło w wyniku stresów psychologicznych. Podwyższone stężenie cIgE w surowicy stwierdzono u 33 chorych (94,20%), początek choroby

w dzieciństwie u 32 chorych (91,40%), biały dermografizm u 30 chorych (85,70%), natychmiastowe odczyny skórne u 27 chorych (77,10%), natomiast rogowacenie przymieszkowe, podobnie jak skłonność do nawrotowych zakażeń skóry, występowały u 20 chorych (57,10%). Najrzadziej obserwowano błądź skóry twarzy - u 5 chorych i *cheilitis* - u 4 chorych. Objawów zaćmy nie stwierdzono u żadnego pacjenta. Zgodnie z danymi literaturowymi, osobniczy lub rodzinny wywiad atopowy jest zwykle dodatni u 50-70% chorych na AZS (326), co znalazło odzwierciedlenie także w wynikach uzyskanych w niniejszym badaniu. Mianowicie, u 22 chorych (62,90%) rodzinny wywiad atopowy był dodatni, natomiast u 13 pacjentów (37,10%) nie był on obciążony. Spośród chorób atopowych, w wywiadzie rodzinnym najczęściej występowało AZS, które obserwowano w rodzinach 10 pacjentów (28,60%), nieco rzadziej alergiczny nieżyt nosa, który rozpoznawany był w rodzinach kolejnych 8 chorych (22,90%), natomiast najrzadziej występowała astma, która dotyczyła członków rodzin 6 badanych (17,10%). W przypadku rodzin 3 chorych (8,60%) występowały zarówno AZS, jak i astma. Z kolei wywiad osobniczy w kierunku chorób atopowych był dodatni u 27 chorych (77,10%), natomiast u 8 pacjentów (22,90%) nie występowały objawy innych chorób atopowych. Najczęściej z objawami AZS współistniały objawy alergicznego nieżytu nosa, które występowały u 17 chorych (48,60%) i objawy alergicznego nieżytu spojówek, które stwierdzono u 10 pacjentów (28,60%). Z kolei astma atopowa występowała u 6 chorych (17,10%). Ponadto 6 chorych (17,10%) cierpiało w dzieciństwie na okresową duszność wysiłkową, a 2 (5,70%) na alergiczny nieżyt nosa, jednak w momencie badania nie stwierdzono u nich objawów innych chorób atopowych, poza AZS. Współistnienie wszystkich 3 schorzeń atopowych stwierdzono u 3 pacjentów (8,50%), u kolejnych 3 chorych (8,50%) astmie towarzyszyły objawy alergicznego nieżytu nosa, natomiast u 2 chorych (5,70%) obok objawów astmy występowały objawy alergicznego nieżytu spojówek. Najczęściej, bo u 9 chorych (25,70%), obok AZS występował samodzielnie alergiczny nieżyt nosa, rzadziej alergiczny nieżyt spojówek, którego objawy stwierdzono u 5 osób (14,20%). Nie zaobserwowano samodzielnego występowania astmy, jako jedyne schorzenia z kręgu chorób atopowych, towarzyszących AZS. Dane literaturowe przedstawione na podstawie badań populacji Szwecji są nieco odmienne, ponieważ współistnienie objawów alergicznego nieżytu nosa z AZS obserwowano tam rzadziej, bo u 32% badanej populacji (326).

Wśród chorych na AZS zdecydowaną większość pacjentów stanowili mężczyźni, bo aż 77%, natomiast kobiet było mniej i stanowiły one tylko 23% badanej grupy. Jest to sprzeczne z doniesieniami literaturowymi, według których wśród chorych na AZS częściej

spotykana jest płęć żeńska (327,328). Powszechnie wiadomo także, że to właśnie płęć żeńska stanowi czynnik rokowniczo niekorzystny. Innymi cechami, które nie wpływają korzystnie na rokowanie są: rodzinny wywiad atopowy, współistnienie innych chorób atopowych oraz wczesny początek choroby (329). W grupie badanej niemal u wszystkich chorych rozpoznanie AZS zostało postawione na wiele lat przed włączeniem do badania, a początek choroby zwykle miał miejsce w dzieciństwie. Ze względu na metodykę badania i konieczność pobrania dwóch wycinków, mianowicie zarówno ze skóry zmienionej chorobowo, jak i ze skóry pozornie zdrowej, pewna grupa kobiet nie wyraziła zgody na udział w badaniu i z tego zapewne wynika mniejsza liczebność kobiet w grupie chorych na AZS.

W populacji chorych na AZS 97,10% stanowili chorzy z typem alergicznym AZS, natomiast 2,90% to chorzy, u których rozpoznano typ niealergiczny AZS. Podstawą do kwalifikacji pacjentów do poszczęólnych grup były wyniki badań alergologicznych. Powyższy rozkład procentowy odbiega od danych literaturowych, według których odsetek chorych na AZS, u których występuje niealergiczny typ choroby waha się od 10 do 45% (330-333), przy czym większość badaczy wskazuje na przedział 16-20% (45,63,332). Wśród pacjentów diagnozowanych w Ośrodku Diagnostyki Chorób Alergicznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w latach 2001-2002, chorzy na niealergiczną postać AZS stanowili 38,50% pacjentów (334). Wyższy odsetek chorych z alergicznym typem AZS może wynikać z faktu, że ze względu na cięższy przebieg tej postaci choroby, pacjenci ci częściej podlegają hospitalizacji. W związku z powyższym, zwykle większy odsetek chorych na postać niealergiczną AZS stwierdza się u pacjentów ambulatoryjnych, podczas gdy wśród pacjentów hospitalizowanych, częściej spotyka się typ alergiczny AZS. W grupie chorych na alergiczną postać AZS było 27 mężczyzn, co stanowiło 79,40% i 7 kobiet, które stanowiły 20,60%. W badanej grupie jedyną chorą na postać niealergiczną AZS była kobieta w wieku 22 lat. Ze względu na tak zdecydowanie różną liczebność obu typów AZS, nie przeprowadzono analizy wieku i płci pomiędzy nimi, a także nie analizowano różnic w poziomach mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR oraz ich korelacji z W-AZS i EASI. Niektórzy badacze podają, że chorzy prezentujący niealergiczną postać AZS są nieco młodszy. Ponadto prawdopodobieństwo rozwoju u nich w przyszłości alergicznego typu AZS jest większe, zaś obecna postać może stanowić formę przejściową (36).

Grupa kontrolna osób chorych na rozsiały liszaj płaski liczyła 8 mężczyzn (50%) i 8 kobiet (50%). Z kolei w populacji osób zdrowych 62,50% (10 osób) stanowili mężczyźni, a 37,5% (6 osób) kobiety. W grupach kontrolnych chorych na rozsiały liszaj płaski i osób zdrowych średni wiek dla oznaczeń dokonanych zarówno w PBMC, jak i w tkankach był

podobny i wynosił odpowiednio 42,0 i 40,0 lat. W populacji chorych na AZS średni wiek był niższy niż w populacjach grup kontrolnych, co zapewne spowodowane jest faktem, że choroba ta zwykle rozpoczyna się we wczesnym dzieciństwie lub w pierwszej dekadzie życia (10).

Do badania zostali zakwalifikowani zarówno pacjenci o bardzo nasilonym stanie zapalnym, jak i chorzy będący w momencie badania w okresie remisji. Ocenie poddano nasilenie i rozległość stanu zapalnego oraz nasilenie świądu. Powyższej oceny dokonano przy wykorzystaniu wskaźników W-AZS i EASI, które zostały w sposób dokładny opisane w rozdziale "Materiał i metodyka". Jak wspomniano wcześniej, wskaźnik W-AZS umożliwia precyzyjną i obiektywną ocenę stanu klinicznego chorych na AZS. Mianowicie W-AZS I poddaje ocenie nasilenie świądu i stopień zaburzeń snu, natomiast W-AZS II określa rozległość nasilenia stanu zapalnego w obrębie całego ciała oraz dzięki zastosowaniu różnych mnożników, umożliwia on zróżnicowanie zmian skórnych typowych dla ostrego i przewlekłego stanu zapalnego. Przy zastosowaniu wskaźnika W-AZS, dokładnej ocenie podlegają zatem zarówno objawy podmiotowe, jak i przedmiotowe. W związku z tematyką przewodu doktorskiego, wskaźnik W-AZS rozpatrywano nie tylko jako całość, ale także oddzielnie z wyodrębnieniem W-AZS I i W-AZS II, co umożliwiło dokładną ocenę zarówno objawów podmiotowych, jak i przedmiotowych. Z kolei wskaźnik EASI daje możliwość dokładnej oceny stanu klinicznego pacjenta z uwzględnieniem objawów przedmiotowych, jednak jego wadą jest brak oceny objawów podmiotowych takich, jak świąd i zaburzenia snu (114,320). Dodatkowo chorzy na AZS zostali podzieleni w zależności od wartości punktowej wskaźników W-AZS, W-AZS I, W-AZS II i EASI na dwie kategorie, co zostało szczegółowo przedstawione w rozdziale „Materiał i metodyka”. Ze względu na różną liczebność grup chorych na AZS, u których dokonano oznaczeń badanych parametrów w PBMC (30 osób) i tych, u których dokonano oznaczeń w tkankach (35 osób), średnie wartości wskaźników wykazywały pewne różnice.

W przypadku: W-AZS, W-AZS I oraz W-AZS II ich wartości były wyższe dla oznaczeń wykonanych w PBMC, gdzie średni wskaźnik W-AZS wynosił 119,39 pkt., natomiast dla oznaczeń dokonanych w tkankach wynosił on 96,59 pkt.. Średni wskaźnik W-AZS I wynosił odpowiednio 21,13 i 16,83 pkt., natomiast średni wskaźnik W-AZS II 98,59 i 79,81 pkt.. Średni wskaźnik EASI różnił się tylko nieznacznie w obu grupach i dla oznaczeń w PBMC wynosił on 34,04 pkt., natomiast dla oznaczeń w tkankach 33,26 pkt.. Z kolei wartości wskaźników: W-AZS A, W-AZS B, W-AZS I A, W-AZS I B, W-AZS II A, W-AZS II B, EASI A i EASI B dla oznaczeń w PBMC i w tkankach były do siebie zbliżone.

Rozkład procentowy chorych zakwalifikowanych, w zależności od ciężkości stanu klinicznego, do poszczególnych kategorii (A lub B) dla wskaźnika W-AZS i W-AZS II dla oznaczeń dokonanych w PBMC i w tkankach był identyczny w obu grupach. Mianowicie w przypadku wskaźnika W-AZS większość chorych (63%) zostało zakwalifikowanych do kategorii B, czyli o znacznym nasileniu zmian klinicznych, a tylko 37% stanowili chorzy należący do kategorii A, czyli o mniej nasilonych zmianach klinicznych. W zakresie wskaźnika EASI liczebność poszczególnych kategorii była zbliżona i różniła się tylko o 1% dla oznaczeń w PBMC i w tkankach. Z kolei w przypadku W-AZS I procentowy rozkład chorych należących do kategorii A (o mniej nasilonych zmianach klinicznych) i B (o znacznym nasileniu zmian klinicznych) dla oznaczeń dokonanych w PBMC i w tkankach wynosił odpowiednio 40% i 60% dla oznaczeń w PBMC i 43% i 57% dla oznaczeń w tkankach. Tak więc można uznać, że w przypadku tego wskaźnika rozkład procentowy chorych zakwalifikowanych do obydwu kategorii jest podobny dla oznaczeń dokonanych w PBMC i w tkankach.

Interesujący jest fakt, że rozkład procentowy kategorii A i B w przypadku wskaźników W-AZS, W-AZS I i W-AZS II był taki sam i większość stanowili chorzy zakwalifikowani do kategorii B, czyli tacy, u których nasilenie stanu zapalnego i/lub świądu było duże i bardzo duże, natomiast w przypadku wskaźnika EASI proporcje były odwrotne. Tutaj więcej pacjentów należało do kategorii A, co oznacza, że u większości chorych wykładniki stanu zapalnego i/lub świądu były łagodne lub umiarkowane, a mniej do kategorii B, w której wykładniki stanu zapalnego i/lub świądu były nasilone i było to odpowiednio 67% i 33% dla oznaczeń wykonanych w PBMC oraz 66% i 34% dla oznaczeń wykonanych w tkankach. Według wskaźnika EASI nie ma rozgraniczenia dla zmian chorobowych charakterystycznych dla ostrego i przewlekłego stanu zapalnego, co ma miejsce w przypadku wskaźnika W-AZS. Tak więc pacjenci z wykwitami typowymi dla przewlekłego okresu AZS mogą mieć wysoki wskaźnik EASI, przy stosunkowo niskim wskaźniku W-AZS. Może to stanowić wyjaśnienie różnic procentowych w liczbie chorych o dużym nasileniu stanu zapalnego ocenianego według wskaźnika W-AZS w porównaniu do oceny przeprowadzonej w oparciu o wskaźnik EASI. Wynika z tego, że być może zastosowanie wskaźnika EASI nie pozwala na precyzyjną kwalifikację do odpowiednich przedziałów nasilenia stanu klinicznego, co z kolei może mieć wpływ na poprawność ostatecznego wniosku.

Rozkład procentowy dla płci w poszczególnych kategoriach zarówno dla oznaczeń w PBMC, jak i w tkankach był podobny dla każdego parametru. Około 20% stanowiły kobiety, a około 80% mężczyźni.



W badanej grupie chorych na AZS 18 pacjentów (51,40%) pozostawało bez leczenia ogólnego przez okres około 2 tygodni do 5 dni poprzedzających wykonanie badań, pozostałych 17 chorych (48,60%) stosowało leki przeciwhistaminowe I i II generacji w dniu badania. Tak więc niemal połowa pacjentów zakwalifikowanych do badania, ze względu na nasilenie objawów chorobowych, stosowała w dniu badania doustne leki przeciwhistaminowe. W związku z wysoce prawdopodobnym udziałem interleukiny 31 w patomechanizmie świądu występującego w przebiegu AZS, istotna wydaje się być ocena wpływu tej grupy leków na stężenie IL-31 i poziom mRNA IL-31, a co za tym idzie, na uzyskane wyniki. Wykazano, że przy wzmożonej aktywności limfocytów Th2 obserwuje się zaburzenia regulacji receptora H4, a z kolei jego stymulacja prowadzi do indukcji wytwarzania IL-31. Do wzrostu regulacji IL-31 w PBMC i komórkach Th2 dochodzi także pod wpływem agonistów histaminy (183). Z kolei antagonistą receptora H1, epinastyna, poprzez modulację funkcji komórek dendrytycznych, hamuje rozwój odpowiedzi immunologicznej mediowanej przez limfocyty Th2 i w istotny sposób wpływa na obniżenie stężenia IL-31 oraz redukcję świądu skóry (335,336). Ponadto substancja ta może wykazywać reakcję krzyżową z receptorem H4 na limfocytach T. W świetle powyższych danych, interesujący wydaje się być wpływ nie tylko leków przeciwhistaminowych, ale także pozostałych leków przeciwświądowych na poziom ekspresji lub/i stężenie IL-31 (336). Jak wspomniano we „Wstępie”, na modelu zwierzęcym została wykazana korelacja długotrwałych zachowań świądowych z nasileniem objawów klinicznych AZS (310). Co ciekawe, zaobserwowano, że redukcja zachowań świądowych miała miejsce pod wpływem deksametazonu i takrolimusu, ale nie stwierdzono zmniejszenia świądu pod wpływem leków przeciwhistaminowych, takich jak feniramina i ketotifen (175,176,310). Znalazło to także odzwierciedlenie w wynikach badań przeprowadzonych u ludzi (178). Ponadto zaobserwowano znaczący wpływ inhibitora receptorów opioidowych, naltreksonu na zahamowanie świądu u szczepu myszy NC/Nga (177). Warto podkreślić, że żaden z pacjentów z grupy chorych na AZS nie był leczony cyklosporyną A przynajmniej na 3 miesiące przed włączeniem do badania. Jest to istotne, ze względu na fakt, że cyklosporyna A wpływa na redukcję świądu oraz obniżenie stężenia IL-31 w surowicy chorych na AZS (314).

Ciekawy wydaje się być także wpływ substancji pochodzenia roślinnego na syntezę IL-31. Zaobserwowano wpływ DA-9601 na redukcję zmian skórnych oraz zmniejszenie poziomu mRNA IL-31 u myszy z objawami AZS. DA-9601 jest to alkoholowy roztwór *Artemisia asiatica*, rośliny która cechuje się właściwościami przeciwalergicznymi, przeciwświądowymi i antyoksydacyjnymi oraz zawiera w swoim składzie flawonoidy i olejki

eteryczne (337,338,339). Substancja ta, zastosowana miejscowo, poprzez supresję DFE (ang. *Dermatophagoides farinae extract*) i DNCB (2,4-dinitrochlorobenzen) wpływa na redukcję nasilenia zmian skórnych podobnych do tych, które występują u chorych na AZS, a ponadto, poprzez obniżenie ilości mastocytów w nacieku zapalnym, wywiera działanie hamujące na uwalnianie z nich histaminy oraz ogranicza ekspresję *IL31*, *IL4*, *IL13* i *TNF $\alpha$*  (340). Co ciekawe, w rozwoju zmian zapalnych oraz w indukcji zachowań świądowych u szczepu myszy NC/Nga uczestniczy nie tylko histamina, ale udział mają także inne związki, takie jak np. prostaglandyny (188). Mianowicie stwierdzono, że miejscowe zastosowanie PGD2 prowadzi do redukcji świądu, natomiast w wyniku działania inhibitora PG dochodzi do jego nasilenia (190). Zaobserwowano ponadto, że niedobór produkcji PGD2 u szczepu myszy NC/Nga skutkowało nasileniem świądu, następowym drapaniem i rozwojem zmian zapalnych (189,289). W świetle powyższych danych można wnioskować, że to nie histamina jest głównym czynnikiem wywołującym świąd występujący w przebiegu AZS, tak więc wydaje się, że wcześniejsze stosowanie leków przeciwhistaminowych nie powinno mieć istotnego wpływu na uzyskane przez nas wyniki oznaczeń poziomu mRNA IL-31.

## **5.2. Omówienie wyników badań alergologicznych w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry**

W grupie chorych na AZS, u 33 pacjentów (94,30%) stwierdzono podwyższone stężenie cIgE w surowicy, natomiast u 2 chorych (5,70%) było ono prawidłowe. Średnie stężenie cIgE w surowicy w populacji chorych na AZS dla oznaczeń badanych parametrów dokonanych w PBMC i w tkankach było nieco wyższe dla oznaczeń w tkankach i wynosiło ono odpowiednio 10946,60 kU/l i 11368,64 kU/l. W obydwu grupach wartości minimalne były zbliżone i wynosiły one 46 kU/l (wartość minimalna w PBMC i w tkankach). Także maksymalne poziomy stężenie cIgE były podobne i wynosiły 31549,00 kU/l dla oznaczeń w PBMC i 31896,00 kU/l dla oznaczeń w tkankach. Jak wspomniano w rozdziale "Materiał i metodyka", w zależności od stężenia cIgE w surowicy, chorzy zostali podzieleni na dwie kategorie, podobnie jak to miało miejsce dla wskaźników W-AZS i EASI. Zarówno dla oznaczeń dokonanych w PBMC, jak i w tkankach, większość stanowili chorzy zakwalifikowani do kategorii B (stężenie cIgE w surowicy powyżej 500 kU/l) i było to odpowiednio 57% i 60%. Liczebność grupy A (stężenie cIgE w surowicy poniżej 501 kU/l) była nieznacznie większa w przypadku oznaczeń wykonywanych w PBMC i chorzy ci stanowili 43%, natomiast w grupie oznaczeń wykonywanych w tkankach, chorych należących do tej grupy było nieco mniej i stanowili oni 40%. Dla kategorii A surowicze stężenie cIgE

w grupach, w których dokonywano oznaczeń w PBMC i w tkankach było podobne i wynosiło odpowiednio 235,31 kU/l i 224,10 kU/l. Natomiast dla kategorii B wynosiło ono 19137,59 kU/l w PBMC i nieco mniej, bo 18798,33 kU/l dla grupy, w której oznaczeń parametrów dokonywano w tkankach. Zarówno dla oznaczeń wykonanych w PBMC, jak i w tkankach, stosunek kobiet i mężczyzn w obydwu kategoriach przedstawia się podobnie. Mianowicie w kategorii A kobiety stanowią odpowiednio 31% i 18%, natomiast w kategorii B mężczyźni stanowią odpowiednio 69% i 82%.

Skórne testy punktowe z zestawem alergenów powietrzno pochodnych zostały wykonane u 29 chorych (82,90%) na AZS, spośród których aż u 27 chorych (77,10%) wynik testów był dodatni. Z kolei u 2 chorych (5,70%) wyniki STP były ujemne. Testy zostały wykonane w miejscu zalecanym przez Polskie Towarzystwo Alergologiczne, a mianowicie na niezmienionej chorobowo zgięciowej powierzchni przedramion. Nakłuc dokonywano przy użyciu jednorazowych lancetów Morrow-Browna, dzięki czemu sięgały one 0,4mm głębokości naskórka, a co istotne, poprzez ograniczenie dodatkowej traumatyzacji oraz brak krwawienia, zminimalizowane zostało prawdopodobieństwo wystąpienia odczynów fałszywie dodatnich (341). Skórne testy punktowe dla alergenów były odczytywane po 20 minutach i oceniane na podstawie wielkości bąbla i rumienia w stosunku do roztworów kontrolnych. Wynik był opisywany zarówno jako średnia średnica bąbla i rumienia, jak i przedstawiono go w skali plusowej. Należy nadmienić, że prawidłowy opis STP ma istotne znaczenie dla ich wiarygodności i powtarzalności (14).

Jak wspomniano wcześniej, u 6 chorych na AZS (17,20%), u których ze względu na nasilenie zmian chorobowych nie było możliwości wykonania STP, oznaczono w surowicy stężenie asIgE skierowanych przeciwko wybranym alergenom, takim samym u wszystkich pacjentów i u wszystkich 6 chorych wykryto obecność przeciwciał skierowanych przeciwko różnym alergenom powietrzno pochodnym. Stężenie asIgE skierowanych przeciwko wybranym alergenom w surowicy oznaczono także u 2 chorych z ujemnymi wynikami STP i u jednego z nich także wykryto obecność przeciwciał skierowanych przeciwko różnym alergenom powietrzno pochodnym. W związku z powyższym, pacjent ten został zakwalifikowany do grupy chorych na postać alergiczną AZS. Najczęściej, bo u 26 chorych (78,80%) stwierdzono alergię powietrzno pochodną w odniesieniu do alergenów pyłku roślin, a w szczególności traw, zbóż, drzew i chwastów oraz alergenów roztocza kurzu domowego, którą potwierdzono u 25 chorych (75,70%). Z kolei u 14 chorych (40%) stwierdzono uczulenie w odniesieniu do alergenów grzybów pleśniowych i drożdżopodobnych, a u 11 chorych (31,40%) w odniesieniu do alergenów pochodzenia zwierzęcego. Powyższe wyniki

są zbieżne z danymi literaturowymi (10,342). Jak powszechnie wiadomo, udział roztocza kurzu domowego w etiopatogenezie AZS, astmy i alergicznego nieżytu nosa jest bezsporny (326). Nadwrażliwość na alergeny powietrzno pochodne w atopowym zapaleniu skóry jest związana z mechanizmem IgE-zależnym, a do powstania zmian chorobowych dochodzi w wyniku bezpośredniego kontaktu alergenu ze skórą. Częstość jej występowania mieści się w granicach 50-90% (343). U 2 chorych (5,70%) dodatkowo były wcześniej wykonane asIgE w stosunku do *Staphylococcus aureus*.

W zależności od wyników badań alergologicznych chorzy na AZS zostali podzieleni na dwie grupy. Do dokonania podziału chorych na alergiczną i niealergiczną postać AZS oznaczenie jedynie cIgE w surowicy nie jest wystarczające, ze względu na fakt, że podwyższone stężenie cIgE może występować także w innych chorobach, choćby takich jak np. choroby pasożytnicze, co jest zbieżne z obserwacjami innych badaczy (11). Kryterium podziału populacji chorych na AZS na typ alergiczny i niealergiczny, poza stężeniem cIgE w surowicy, stanowiły wyniki STP i oznaczenie asIgE. Do grupy chorych na postać alergiczną AZS zostali zakwalifikowani pacjenci, u których stężenie cIgE w surowicy było podwyższone i/lub wyniki STP i/lub asIgE były dodatnie. Podwyższone stężenie cIgE w surowicy oraz dodatnie wyniki STP lub asIgE wykazano u 33 chorych (94,30%). Ze względu na powyższe wyniki oraz osobniczy lub/i rodzinny wywiad w kierunku chorób atopowych, zostali oni zakwalifikowani do grupy chorych na alergiczną postać AZS. Z kolei u 2 pacjentów (5,70%) stężenie cIgE w surowicy mieściło się w granicach normy, wyniki STP były u nich ujemne, jednak asIgE u jednego z nich były ujemne, natomiast u drugiej osoby były one dodatnie. Należy pamiętać, że nawet u 20% chorych na AZS z prawidłowym stężeniem cIgE w surowicy występuje alergia IgE-zależna. Dlatego też przy danych klinicznych, które mogłyby wskazywać na atopowe podłoże schorzenia, pomimo prawidłowych wartości stężenia cIgE w surowicy, należy przeprowadzić szczegółową diagnostykę alergologiczną (344). Jak wspomniano powyżej, została ona wykonana u 2 chorych na AZS z prawidłowym stężeniem cIgE w surowicy, przy czym, jak wspomniano wcześniej, u jednego z nich rozpoznano alergiczną postać AZS.

Z uwagi na zakwalifikowanie prawie wszystkich chorych na AZS do grupy alergicznej, odstąpiono od dalszych porównań z uwzględnieniem podziału na alergiczną i niealergiczną postać choroby (STP, asIgE) i odniesiono się tylko do stężenia cIgE w surowicy chorych.

### **5.3. Omówienie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) i w tkankach w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry, liszaj płaski i w grupie osób zdrowych oraz ocena różnic pomiędzy populacjami**

Badaniu poddano PBMC uzyskane od 30 chorych na AZS, 14 chorych na liszaj płaski (LP) i 14 osób zdrowych (Z). Średni poziom mRNA IL-31 w grupie chorych na AZS wynosił 155 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*, jednak najwyższe wartości uzyskano w przypadku grupy chorych na liszaj płaski, w której wynosił on 207 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*. Z kolei wartość uzyskana w grupie osób zdrowych była zbliżona do tej, występującej u chorych na AZS i wynosiła 142 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*. Pomimo uzyskania wyższych wartości poziomu mRNA IL-31 w grupie kontrolnej LP, niż u chorych na AZS, nie wykazano istotnych statystycznie różnic we względnych ilościach transkryptów genu *IL31* w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej pomiędzy powyższymi grupami. Nie wykazano także istotnych statystycznie różnic w poziomach mRNA IL-31 pomiędzy grupą badaną chorych na AZS i grupą osób zdrowych, ze względu na to, że względne liczby transkryptów genu *IL31* w obydwu grupach były do siebie zbliżone. Powyższe wyniki zostały przedstawione w rozdziale "Wyniki" (tabela nr XXII,XXIV, rycina 29).

Badaniu poddano również wycinki skóry uzyskane od 35 chorych na AZS, 14 chorych na liszaj płaski i 14 osób zdrowych. Najwyższą wartość średniej względnej liczby transkryptów genu *IL31* uzyskano w grupie AZS-CH (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych) i wynosiła ona 34,7 kopii, a ponadto maksymalne poziomy mRNA IL-31 także były najwyższe w tej grupie. W grupie AZS-Z (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry pozornie zdrowej) i w grupie osób zdrowych, średnie poziomy mRNA IL-31 były zbliżone do siebie i wynosiły one odpowiednio 26 i 25 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*. Z kolei wartość uzyskana w grupie chorych na liszaj płaski była najniższa i wynosiła 8 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*. Pomimo uzyskania najwyższych wartości poziomu mRNA IL-31 w grupie AZS-CH, za pomocą testu Manna-Whitney'a nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomach mRNA IL-31 pomiędzy powyższymi grupami. Wyniki zostały przedstawione w rozdziale "Wyniki" (tabela nr XXV,XXVI, rycina 32).

Jak wiadomo, źródłem IL-31 są przede wszystkim skórne limfocyty Th2 CLA+ i CD45RO CLA+ limfocyty T krwi obwodowej, ale ponadto niewielkie ilości IL-31 syntezowane są także przez limfocyty Th1, monocyty, komórki dendrytyczne i mastocyty (86,89,234,235,345). Wynika z tego, że najwyższe wartości stężenia IL-31 i/lub poziomu mRNA IL-31 obserwowane są w okresie ostrym AZS, zależnym głównie od limfocytów Th2, natomiast w fazie przewlekłej, w której występuje przewaga limfocytów Th1, są one niższe, co z kolei może wskazywać na większy udział IL-31 w ostrej, a mniejszy w przewlekłej fazie AZS (86). W innych badaniach wykazano, że stężenie IL-31 jest wyższe w limfocytach T CLA+ niż w limfocytach T CLA-, przy czym u chorych na AZS jego wartości są wyższe, niż w populacji ludzi zdrowych (89,313). Ze względu na to, że limfocyty CLA+, które są głównym źródłem IL-31, wykazują znacznie silniejszą odpowiedź na alergen niż limfocyty CLA-, właśnie ta cecha może wskazywać na ich kluczową rolę w zewnątrzpochodnym typie AZS (96). Jak wiadomo, u chorych na AZS liczba komórek Th2 i CD45RO+CLA+ jest większa, niż u ludzi zdrowych (89,346), a ponadto podwyższony poziom mRNA IL-31 w bioptatach skóry chorych na AZS jest zbieżny ze wzrostem ilości CLA+ komórek T w nacieku (89). W AZS tylko około 15% populacji obwodowych limfocytów T stanowią CLA+ limfocyty T, a z kolei aż 90% limfocytów T obecnych w nacieku zapalnym w zmianach chorobowych wykazuje ekspresję CLA (347). Wiadomym jest, że wzrost krążących CLA+ limfocytów T istotnie wpływa na regulację odpowiedzi immunologicznej oraz na procesy zapalne (96,283). Można więc przypuszczać, że poziom mRNA IL-31 będzie wyższy w bioptatach skóry niż w PBMC, a także, że będzie on uzależniony od okresu choroby. Mianowicie w okresie ostrym, przy dominacji limfocytów Th2 będzie on wyższy, niż w okresie przewlekłym. Z pewnością także nie bez znaczenia jest miejsce pobierania biopsji skóry, oraz morfologia zmian chorobowych poddanych badaniu, gdyż, jak wiadomo, większy poziom mRNA IL-31 został wykazany w zmianach ostrych, w których występuje przewaga właśnie limfocytów Th2 (317). Należy zwrócić także uwagę na znaczenie ilości uzyskanej do badania tkanki, która z pewnością jest większa w przypadku wystandaryzowanych biopsji typu „punch”, niż przy technice pobierania wykorzystanej w niniejszym badaniu. Skoro więc zastosowana metoda pobierania wycinków skóry nie była wystarczająco czuła, to może należałoby zwiększyć ilość pobranej tkanki i wystandaryzować ją właśnie poprzez pobieranie wycinków przy użyciu sztancy.

Podkreślenia wymaga niski poziom mRNA IL-31, stwierdzony zarówno w PBMC jak i w tkankach, chociaż, co ciekawe, wyższe wartości osiąga on w PBMC. Interesująca jest przyczyna uzyskania takiego wyniku. Zastosowana procedura przeprowadzenia oznaczeń

wydaje się być w całości prawidłowa. Jakość RNA była wystarczająca, a pomiary stężenia RNA wskazywały na jego wystarczającą ilość dla oznaczeń mRNA w PBMC oraz dla oznaczenia mRNA OSMR w tkankach. Co ciekawe, na tym samym materiale z powodzeniem wykazywano obecność innych oznaczanych transkryptów, a nie ma powodu, by sądzić, że stopień degradacji RNA kodującego IL-31 byłby większy niż innych transkryptów. Ponadto reakcja *Real-Time PCR* została zoptymalizowana przy użyciu matryc cDNA, które uzyskano przy użyciu dokładnie takiej samej procedury, jak oznaczane próby. Do reakcji optymalizacyjnych dodawano około tysiąca namnożonych wcześniej kopii amplikonu. Nie ma zatem możliwości, żeby skład mieszaniny reakcyjnej inhibował reakcję w stopniu wyższym, niż podczas procesu optymalizacji. Ciekawy jest także fakt, że sekwencje starterów zostały z powodzeniem wykorzystane przynajmniej w kilku innych pracach (86,88,89).

Wyjaśnienie tego zjawiska może stanowić fakt, że uzyskany w badaniu przeprowadzonym przez nas poziom mRNA IL-31 był na granicy oznaczalności dla tej reakcji. Niemal we wszystkich przypadkach, ilość kopii transkryptu w przeliczeniu na reakcję była niska (przygotowana krzywa standardowa nie sięgała tych poziomów i była np. mniejsza niż jeden). Tylko w kilku przypadkach, ilość transkryptu *IL31* na reakcję (a nie w przeliczeniu na milion kopii GAPD) była wyższa niż jeden, nigdy jednak nie była wyższa niż 10, a należy podkreślić, że dokonywanie obliczeń ilości transkryptu przy tak niskich stężeniach jest bardzo niedokładne, pomimo odejmowania poziomu zanieczyszczeń od otrzymywanych wartości. Być może na tak niski wynik mógł mieć wpływ sposób pobierania biopsji. W większości badań wycinki skóry były pobierane sztancą (tzw. „*punch*” *biopsy*) i w związku z tym uzyskiwano standaryzację metody, a u każdego chorego pobrana ilość materiału do badania była taka sama. Zwykle stosowano sztance 3,5 do 6 mm. W niniejszym badaniu wycinki skóry pobierano przy użyciu igły i skalpela, jednak pomimo tego, że były one pobierane przez tą samą osobę, w przypadku takiej metody nie jest możliwe uzyskanie identycznej ilości materiału we wszystkich przypadkach.

Uwagę zwracają pozytywne wyniki uzyskane we wcześniej przeprowadzonych badaniach. Jednak w odróżnieniu od naszego badania, Dillon i wsp. (2004) użyli metody jednoetapowej, w której do reakcji odwrotnej transkrypcji użyto startera specyficznego dla IL-31. Dzięki temu matryca cDNA była niezwykle specyficzna i zawierała znacznie ograniczony zbiór transkryptów. Metoda użyta w powyższej pracy była przeprowadzona przy zastosowaniu starterów heksamerowych, które, ze względu na fakt, że są one najkrótsze (zawierają tylko 6pz), z definicji są najmniej specyficzne. Ponadto należy nadmienić, że w badanych tkankach oznaczane poziomy mRNA IL-31 okazały się również bardzo niskie.

Uwagę zwraca również fakt, że przebadano wyłącznie pobudzone PBMC, natomiast skóra nie została przez tych badaczy przebadana. Dodatkowo, w powyższym badaniu został zastosowany inny gen referencyjny (B-glucoronidaza - GUS), który wykazuje niższy poziom ekspresji w PBMC niż *GAPD* (354), poprzez co uzyskany poziom ekspresji *IL31* będzie w takim przypadku wydał się większy, niż w przypadku użycia jako genu referencyjnego, genu *GAPD*. Ze względu na odmienną metodologię oraz na brak dostępności dokładnej procedury zastosowanej przez Dillon i wsp., dokonanie porównania uzyskanych wyników pomiędzy sobą jest niezmiernie trudne.

Także Neis i wsp. (2006) wykazali bardzo niski poziom ekspresji *IL31* w skórze (69). W badaniu zostały wykorzystane startery heksamerowe oraz zestaw do oznaczenia nietypowego genu referencyjnego, który został sporządzony na specjalne zamówienie. Wyniki badań tej grupy także odbiegają od tych, uzyskanych w niniejszym badaniu, ponieważ poziomy mRNA IL-31 w biopsjach skóry nie były zerowe, a u chorych na AZS został wykazany podwyższony poziom mRNA IL-31.

Co więcej, na uzyskane praktycznie zerowe wyniki poziomu mRNA IL-31, przy bliskim zeru wyniku osiągniętym przez innych badaczy, wpływa fakt, że krzywa standardowa wyrażona jest w liczbie kopii na reakcję, a wyniki końcowe są zaokrąglane do najbliższej liczby całkowitej. W większości innych prac nie zastosowano takiej krzywej, a ekspresja została wyrażona poprzez porównanie punktu przecięcia Cp genu oznaczanego do punktu Cp genu referencyjnego przy znanej wydajności reakcji PCR. W związku z tym, wynik nie będzie wyrażony w liczbie kopii na reakcję, ale będzie on wyrażał stosunek ekspresji, który zawsze będzie większy od zera, z wyłączeniem tych przypadków, w których reakcja nie powiedzie się w ogóle. Nie tłumaczy to jednak braku wzrostu poziomu mRNA IL-31 w grupie chorych na AZS w porównaniu do grupy zdrowych ochotników, który to, powinien być jednak zauważalny, chociażby poprzez wzrost odsetka wyników nieujemnych. Początkowo zakładano wykonanie obliczeń, do których krzywa nie byłaby potrzebna, jednak ze względu na uszkodzenie jednego pliku reakcji w bazie danych, nie udało się go użyć do tej analizy.

Takie same startery, jak te, które zostały wykorzystane w niniejszym badaniu, zostały zastosowane wcześniej przez Bilborough i wsp., tak więc jest to już przynajmniej trzecia praca, w której je zastosowano, jednak dotyczy ona głównie aktywowanych komórek. Ponadto wykorzystano inny gen referencyjny, a mianowicie, fosforybozylotransferazę hipoksantynowo-guaninową (HPRT, ang. *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*), a opis reakcji odwrotnej transkrypcji nie został dokładnie podany. Także metodyka badania



wykazywała pewne różnice, gdyż materiał do badań, czyli wycinki skóry, był uzyskiwany przy pomocy wspomnianych już powyżej biopsji typu "punch". Uwagę zwracają także nieliczne grupy i to zarówno badana, jak i kontrolna, które obejmowały jedynie kilku chorych na AZS. Ponadto w grupie kontrolnej wykonano tylko 3 oznaczenia. Uzyskane wyniki w zakresie poziomu mRNA IL-31 są zbieżne i nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w poziomie mRNA IL-31 pomiędzy obiema grupami chorych, jednak u 6 chorych na AZS zaobserwowano tendencję do wyższego poziomu mRNA IL-31 w CLA+ limfocytach T. Uwagę zwraca fakt, że aż u 5 z 12 chorych na AZS poziom mRNA IL-31 był poniżej wykrywalnego, co może wskazywać na obecność pewnej grupy chorych na AZS, u których IL-31 jest wytwarzana na niskim poziomie, lub też, u których nie dochodzi do jej syntezy. Co więcej, podwyższony poziom mRNA IL-31 został wykazany tylko u chorych po poprzedniej indukcji CLA+ limfocytów T antygenami anty-CD3 i anty-CD28, natomiast bez wcześniejszej stymulacji poziomy mRNA IL-31 były zerowe, co jest zbieżne z wynikami uzyskanymi w niniejszym badaniu. Bilborough (2006) wykazał wzrost poziomu mRNA IL-31 w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej u ok. 50% chorych na AZS, w porównaniu z grupą chorych na łuszczycę i zdrowych ochotników, jednak nie był on istotny statystycznie. Również w biopsjach skóry nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomach mRNA IL-31 pomiędzy chorymi na AZS, a grupą osób zdrowych, niemniej u chorych na AZS obserwowana była tendencja do wyższych poziomów genu tego białka (89).

Zwiększony poziom mRNA IL-31 wykazano w keratynocytach i makrofagach znajdujących się w nacieku chorobowym (89). Jak wspomniano wcześniej, w niniejszym badaniu najwyższy poziom mRNA IL-31 zanotowano w grupie chorych na AZS i wynosił on 521 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*, a z kolei najniższy w grupie osób zdrowych i wynosił on 207 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*. Wynika z tego, że uzyskane w badaniu maksymalne wartości poziomów mRNA IL-31 były wyższe w grupie chorych na AZS, niż w grupie osób zdrowych, jednak różnice nie były istotne statystycznie. Tak więc uzyskane w niniejszym badaniu wyniki są zbieżne z wynikami opublikowanymi przez Bilborough i wsp..

Podobnie, wyniki zerowe lub też bliskie zeru uzyskali w grupie kontrolnej Sonkoly i wsp. (2006), odnosząc się m.in. do pracy Dillon i wsp. (2004). Pozostają one jednak w sprzeczności z wynikami uzyskanymi w niniejszym badaniu, bo chociaż w grupie pacjentów chorych na AZS w większości badanych próbek były one bliskie zeru, to jednak

nie były one zerowe. Mianowicie u 56% chorych na AZS został wykazany zwiększony poziom mRNA IL-31, a ponadto, był on u nich wyższy, niż w grupie osób zdrowych, i to, co ciekawe, zarówno w skórze chorobowo zmienionej, jak i w skórze pozornie zdrowej. W zmianach chorobowych odnotowano wyższą względną liczbę transkryptów genu *IL31*, niż w skórze pozornie niezmięnionej. Należy podkreślić fakt, że w grupie chorych na AZS w skórze pozornie niezmięnionej wykazano 4-krotnie wyższy poziom mRNA IL-31, w porównaniu do grupy osób zdrowych. Co ciekawe, zaobserwowano wyraźną korelację poziomu mRNA IL-31 w wycinkach pobranych ze skóry zmienionej chorobowo z poziomem mRNA CCL2 (88), a jak wiadomo, stężenie tej chemokiny jest podwyższone w surowicy u chorych na AZS. Ponadto wykazana została jej korelacja z aktywnością choroby (349). Można zaobserwować różnice zarówno w samej technice pobierania materiału do badań, jak i w metodyce, co tłumaczy rozbieżności w wynikach badań. Mianowicie materiał do badań był uzyskiwany przy pomocy biopsji "punch", a wycinki skóry poddawano działaniu najpierw ciekłego azotu, a następnie Trizolu, natomiast w metodyce zastosowanej w tym badaniu, do rozdrobnienia tkanek stosowany był Trizol i homogenizator. W badaniu Sonokly i wsp. zastosowany był także inny gen referencyjny, a mianowicie gen *18S RNA*, a powielany fragment był krótszy od powielanego w niniejszym badaniu, ale podobnie jak ten, który został powielony w tym badaniu, nie obejmował on intronu. Z kolei sekwencja ampliconu pochodziła z tego samego pliku w bazie danych. Nie podano jednak dokładnego opisu reakcji odwrotnej transkrypcji.

Także w kolejnym badaniu przeprowadzonym przez Gambichler i wsp. (2008) uzyskano w zasadzie zerowy poziom mRNA IL-31 w grupie osób zdrowych. Jednak metoda izolacji RNA nie została opisana, a ponadto w odróżnieniu od metody zastosowanej w niniejszym badaniu, genem referencyjnym był gen *RPL38*, który koduje jedno z rybosomalnych RNA. Para starterów dla IL-31 obejmowała intron, gdyż starter przedni znajdował się na granicy egzonu drugiego i trzeciego. Z kolei w tym badaniu, jak już wspomniano powyżej, nie udało się uzyskać amplifikacji przy użyciu starterów obejmujących intron (w tym przypadku był to intron rozdzielający egzony pierwszy i drugi) (317).

W opublikowanym w tym samym roku badaniu Raap i wsp., również wykazano podwyższone surowicze stężenie IL-31 w grupie chorych na AZS, co jest zbieżne z wynikami uzyskanymi przez Sonokly i wsp. oraz Neis i wsp.. Kolejne badanie nad rolą IL-31 w patomechanizmie AZS zostało przeprowadzone przez Ezzat i wsp. (2011), a porównania surowiczego stężenia IL-31, oznaczonego metodą ELISA, dokonano w grupie dzieci chorych na AZS w odniesieniu do grupy kontrolnej osób zdrowych. Analizy były wykonywane

zarówno w okresie nasilenia zmian chorobowych, jak i w okresie remisji klinicznej. Uzyskane wyniki potwierdzają, że stężenie IL-31 jest istotnie wyższe u dzieci chorych na AZS, i to nawet podczas remisji klinicznej, a co więcej, zaobserwowano, że im wyższe było ono w okresie zaostrzenia stanu klinicznego, tym wyższe pozostawało w okresie remisji. Jest to więc kolejne badanie, w którym potwierdzono znaczenie IL-31 w patomechanizmie AZS, a co więcej, wg Ezzat i wsp. stężenie IL-31 w surowicy może być uznane nawet za marker nasilenia objawów chorobowych u dzieci chorych na AZS. Jednak, obserwowany w okresie remisji, spadek stężenia IL-31, może wskazywać na udział innych czynników niż IL-31 w patomechanizmie AZS (315).

Podwyższone stężenie IL-31 w surowicy oraz zwiększony poziom mRNA IL-31 w wycinkach skóry chorobowo zmienionej u chorych na AZS w porównaniu z grupą osób zdrowych wykazali Kim i wsp. (2011). Jednak w przypadku oznaczeń mRNA IL-31 uwagę zwraca niewielka liczebność zarówno grupy badanej (13 osób), jak i grupy kontrolnej (4 osoby). Ponadto wyniki uzyskane aż u 7 chorych z grupy badanej są zerowe, natomiast w grupie kontrolnej zerowe wyniki oznaczeń poziomu mRNA IL-31 uzyskano u wszystkich badanych (316). Literatura podaje, że używając do obliczeń statystycznych testu Manna-Whitney'a, przy tak znaczącej liczbie wyników zerowych, uzyskany wynik porównań oznaczanych parametrów pomiędzy obiema grupami może być zafałszowany, pomimo poziomu istotności poniżej 0,05 (350). Ponadto mRNA IL-31 zostało oznaczane metodą analizy żelu agarozowego, która jest metodą przestarzałą i zarazem bardzo nieprecyzyjną. W opublikowanej pracy nie podano informacji o ilości cykli PCR, co jest bardzo istotne, ze względu na fakt, że w przypadku reakcji zakończonej zbyt szybko uzyskane wyniki będą zerowe, natomiast jeśli zostanie ona zakończona zbyt późno, to dla wszystkich prób uzyskamy wyniki dodatnie, ponieważ wszystkie reakcje osiągną do tego czasu poziom *plateau*. Ponadto nie zostały podane istotne informacje na temat wielkości prążka IL-31 w żelu agarozowym. Z powyższej pracy nie wynika czy to jest prążek pochodzący z cDNA (213 pz), czy też z genomowego DNA (1315 pz.). Nie podano także informacji, czy próbowano zapobiec uzyskaniu fałszywie dodatniego prążka o wielkości 1315 pz, np. poprzez skrócenie czasu wydłużania w reakcji PCR, czy też, że na fotografii żelu widoczny jest właśnie prawidłowy prążek o wielkości 213pz. W przeciwieństwie do zastosowanych przez nas starterów te, które zostały wykorzystane w powyższym badaniu obejmują intron. Jednak należy pamiętać, zgodnie z informacjami podanymi wcześniej, że analiza korelacji wyników oznaczeń mRNA IL-31 w tkankach jest przy tak znaczącej liczbie wyników zerowych mało wiarygodna.

Potwierdzeniem udziału IL-31 w patomechanizmie AZS jest także najnowsze badanie Nobbe i wsp. (2011), które zostało przeprowadzone na poziomie białka. Jest ono zgodne z wcześniejszymi badaniami Sonkoly i wsp. (2006), Billsborough i wsp. (2006) oraz Neis i wsp. (2006), w których oceniano poziom mRNA IL-31. Nobbe i wsp. wykazali zwiększoną immunoreaktywność IL-31 w nacieku zapalnym u chorych na atopowe zapalenie skóry. Co ciekawe, immunoreaktywność IL-31 wykazano u 87% chorych w skórze właściwej, podczas gdy w naskórku jej nie potwierdzono (318).

W niniejszym badaniu niemal we wszystkich wycinkach skórnych u chorych na AZS i w grupie osób zdrowych, a ponadto we wszystkich wycinkach skóry w grupie chorych na liszaj płaski została wykazana obecność mRNA IL-31RA i OSMR. Na tej podstawie można wnioskować, że receptory IL-31RA i OSMR znajdują się na komórkach wchodzących w skład naskórka i skóry właściwej. Wyniki badań wskazują na obecność receptorów IL-31RA i OSMR na keratynocytach (86,89). Także Nobbe i wsp. wykazali u wszystkich badanych immunoreaktywność IL-31RA i OSMR w naskórku (318).

W zakresie poziomu mRNA IL-31RA jedyne istotne statystycznie różnice zostały wykazane dla oznaczeń w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej pomiędzy grupą chorych na liszaj płaski i grupą osób zdrowych. Najwyższy poziom mRNA IL-31RA w PBMC uzyskano w grupie osób zdrowych, w której wynosił on 2777 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*, nieco niższy był on w grupie chorych na LP, w której osiągnął liczbę 2455 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*, podczas gdy najniższy poziom mRNA tego parametru uzyskano u chorych na AZS, u których wynosił on 1298 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*, czyli był on o około 50% niższy niż w grupach kontrolnych (tabela nr XXIII. XXIV, rycina 30). Dla oznaczeń mRNA IL-31RA w tkankach nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy poszczególnymi grupami (tabela nr XXV, XXVI, rycina 33).

Warto podkreślić, że zarówno w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej, jak i w tkankach wykazano istotne statystycznie różnice jedynie dla poziomu mRNA OSMR. Interesujące wyniki dla oznaczeń uzyskano w PBMC, gdzie najwyższy średni poziom mRNA OSMR stwierdzono w grupie chorych na liszaj płaski i wynosił on 41 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*, z kolei w dwóch pozostałych grupach: osób zdrowych i chorych na AZS jego wartości były znacznie niższe i wynosiły odpowiednio 18 i 7 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*. Za pomocą testu Manna–Whitney’a wykazana została statystycznie istotna różnica w poziomie

mRNA OSMR w PBMC pomiędzy grupą badaną chorych na AZS i grupą kontrolną osób zdrowych, z poziomem istotności  $p=0,0001$ , przy czym wyższe wartości uzyskano w grupie Z oraz pomiędzy grupami LP i Z ( $p=0,0235$ ). Z kolei nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomach mRNA OSMR w PBMC pomiędzy grupą badaną chorych na AZS i grupą LP, chociaż wyższe wartości uzyskano w grupie chorych na liszaj płaski, niż u chorych na AZS. Powyższe dane zostały przedstawione rozdziale „Wyniki” (tabela nr XXIII, XXIV, rycina 31).

Szczególnie interesujące wyniki uzyskano dla oznaczeń wykonanych w tkankach. Wykazano mianowicie statystycznie istotną różnicę we względnej liczbie transkryptów genu *OSMR* pomiędzy grupą AZS-CH (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych) a AZS-Z (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry pozornie zdrowej) ( $p=0,0058$ ), przy czym poziom mRNA OSMR był wyższy w przypadku pierwszej grupy, w której wynosił on 238829 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*, natomiast w przypadku drugiej okazał się niższy i wynosił 149274 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*. Powyższe dane wskazują na prawdopodobny udział podjednostki OSMR receptora IL-31 w patomechanizmie atopowego zapalenia skóry. Co ciekawe, wykazane zostały statystycznie istotne różnice w poziomie mRNA OSMR zarówno pomiędzy grupą AZS-CH i grupą osób zdrowych ( $p=0,0001$ ), jak i pomiędzy AZS-Z i Z ( $p=0,0015$ ). Średnia wartość mRNA OSMR w grupie chorych na liszaj płaski wynosiła 109523, natomiast w grupie osób zdrowych była ona najniższa i wynosiła 44698 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*. Ponadto, wykazana została statystycznie istotna różnica w poziomie mRNA OSMR w grupach chorych na liszaj płaski i osób zdrowych ( $p=0,0016$ ). Jedynie dla grup AZS-Z i LP nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomie mRNA OSMR w tkankach. Być może istnieje związek pomiędzy poziomem mRNA OSMR w tkankach a patomechanizmem AZS oraz liszaja płaskiego, w których to jednostkach chorobowych dominującym objawem podmiotowym jest świąd skóry.

Należy podkreślić, że wyższe poziomy mRNA badanych parametrów w tkankach, w porównaniu z wynikami uzyskanymi w przypadku PBMC, stwierdzono we wszystkich badanych grupach jedynie dla OSMR. Natomiast poziom mRNA IL-31RA zarówno w PBMC, jak i w tkankach był we wszystkich badanych grupach zbliżony. Jak wspomniano wcześniej, w AZS keratynocyty wykazują ekspresję obydwu podjednostek receptora IL-31 i prawdopodobnie zwiększony może być zarówno poziom mRNA IL-31RA, jak i mRNA

OSMR (89). Poziom mRNA IL-31RA i OSMR w różnych rodzajach tkanek u 8 dawców: 4 kobiet i 4 mężczyzn, został poddany ocenie przez Sonkoly i wsp. (2006). Okazało się, że mRNA IL-31RA wykazuje największy poziom w korzeniach grzbietowych rdzenia kręgowego, natomiast w pozostałych tkankach liczba transkryptów genu *IL31RA* pozostaje na niskim poziomie. Z kolei, jak wspomniano wcześniej, mRNA OSMR wykazuje relatywnie wysoki poziom we wszystkich tkankach (88). Jak dotychczas, badań dotyczących oznaczeń poziomu mRNA obydwu podjednostek receptora IL-31 w AZS jest stosunkowo niewiele. Bilsborough i wsp. (2006) wykazali zwiększony poziom mRNA IL-31RA w keratynocytach i makrofagach u chorych na AZS w porównaniu z grupą zdrowych ochotników, co pozostaje w sprzeczności z wynikami uzyskanymi w niniejszym badaniu. Należy jednak zauważyć, że w badaniu Bilsborough oznaczenia zostały wykonane przy zastosowaniu metody immunohistochemicznej. Z kolei Nobbe i wsp. (2012) nie wykazali u chorych na AZS istotnej statystycznie różnicy poziomów mRNA zarówno IL-31RA, jak i OSMR w stosunku do grupy osób zdrowych, co jest zbieżne z wynikami uzyskanymi w tym badaniu dla IL-31RA. Z kolei jest to sprzeczne z wykazaną istotną statystycznie różnicą w poziomie mRNA OSMR u chorych na AZS, i to zarówno w wycinkach pobranych ze zmian chorobowych, jak i ze skóry pozornie niezmięnionej w porównaniu do grupy osób zdrowych. Ponadto w badaniu Nobbe i wsp. (2012) nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w poziomach mRNA IL-31RA i OSMR u chorych na AZS, również w stosunku do grup chorych na jednostki chorobowe przebiegające zarówno z towarzyszącym świądem, jak i na schorzenia Th2-zależne, którym świąd nie towarzyszy. Z kolei w niniejszym badaniu poziom mRNA OSMR różnił się w sposób istotny statystycznie w grupach chorych na AZS-CH (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych) i w grupie chorych na LP ( $p=0,0067$ ), w której to, jak wspomniano wcześniej, był on niższy. Z kolei podobnie, jak u nas, Neis i wsp. (2006) wykazali statystycznie istotną różnicę w poziomie mRNA OSMR, i to zarówno w grupie chorych na AZS, jak i w grupach chorych na łuszczycę oraz wyprysk kontaktowy alergiczny (ACD, ang. *allergic contact dermatitis*) w porównaniu do grupy zdrowych ochotników, przy czym najwyższy jej poziom uzyskano w grupie chorych na łuszczycę. Podobieństwo dotyczy także braku uwidocznienia różnicy w poziomie mRNA IL-31RA. Mianowicie we wszystkich trzech grupach chorych na: AZS, ACD i łuszczycę, nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie mRNA IL-31RA w porównaniu z grupą osób zdrowych (69).

Interesujący wydaje się być udział IL-31 w patomechanizmie świądu, jednak dane dotyczące związku tej cytokiny z etiopatogenezą świądu są sprzeczne. Co ciekawe, przez

niektórych badaczy został on potwierdzony nie tylko w Th-2 zależnych chorobach skóry przebiegających ze świądem, ale także w innych schorzeniach Th2-niezależnych (69,86,88,288,289). Interesujące wyniki uzyskali Sonkoly i wsp., którzy wykazali związek IL-31 z innymi schorzeniami Th2-zależnymi, przebiegającymi z towarzyszącym świądem skóry, przy czym najwyższy poziom mRNA IL-31 stwierdzono u pacjentów chorych na świerzbiączkę guzkową. Okazało się, że był on aż 50-krotnie większy niż u pacjentów z grupy zdrowych ochotników oraz 4,5-krotnie wyższy niż w grupie chorych na AZS (88).

W badaniach Neis i wsp. (2006) i Sonkoly i wsp. (2006) grupę kontrolną stanowili chorzy na łuszczycę. W obydwu pracach nie wykazano podwyższonego poziomu mRNA IL-31 u chorych na łuszczycę, przy uwidocznionym zwiększonym poziomie mRNA IL-31 u chorych na AZS (69,88). Ponadto u chorych na łuszczycę, także w PBMC poddanych stymulacji przeciwciałami anty CD-3 i anty CD-28 poziom mRNA IL-31 był niższy, i to zarówno w porównaniu z chorymi na AZS, jak i z osobami zdrowymi (89). Chociaż Neis i wsp. nie zaobserwowali podwyższonego poziomu mRNA IL-31 u chorych na łuszczycę, to wykazali oni jego wzrost u chorych na ACD (69).

Jak wspomniano wcześniej, wzrost poziomu mRNA IL-31 obserwowany był także w innych dermatozach przebiegających ze świądem, takich jak świerzbiączka podostra i przewlekła (289), a zwiększone stężenie IL-31 wykazano ponadto w pokrzywce przewlekłej. Co ciekawe stężenie IL-31 w grupie chorych na pokrzywkę przewlekłą było wyższe nie tylko w stosunku do grupy osób zdrowych, ale także w porównaniu z chorymi na AZS (288).

W całkowitej sprzeczności z powyższymi badaniami pozostają wyniki uzyskane przez Nobbe i wsp. (2012), którzy nie wykazali zwiększonego poziomu mRNA IL-31, i to zarówno w chorobach przebiegających ze świądem bez towarzyszącego stanu zapalnego, takich jak *pruritus sine materia* i *notalgia parestetica*, chorobach zapalnych Th1-zależnych, takich jak łuszczycy odwrócona, świerzbiączka guzkowa, jak i w schorzeniach zapalnych Th2-zależnych, takich jak łysienie plackowate, zespół Sezary'ego czy ziarniniak grzybiasty. Należy jednak podkreślić, że metodyka badań była inna, a ponadto badane grupy chorych nie były liczne (318). Także w innej jednostce chorobowej, której towarzyszy świąd skóry, jaką jest *epidermolysis bullosa pruriginosa*, nie wykazano związku z IL-31 (290).

Jak wspomniano wcześniej, badania wskazują na większy udział IL-31 w fazie ostrej AZS, natomiast w okresie przewlekłym, wpływ IL-31 na świąd i stan zapalny u chorych na AZS jest znacznie mniejszy (86). Powszechnie wiadomo, że w fazie ostrej AZS, występuje dominacja limfocytów Th2, a w fazie przewlekłej charakterystyczna jest dominacja limfocytów Th1.

Jak wspomniano wcześniej, głównym źródłem IL-31 są limfocyty Th2, a mniej istotnym limfocyty Th1. Badania wskazują na to, że początkowa redukcja świądu u myszy po podaniu przeciwciał przeciwko IL-31 uzasadniona była przejściem stanu klinicznego z fazy ostrej, przebiegającej z dominacją limfocytów Th2 w fazę przewlekłą. Niemniej dalszego wyjaśnienia wymaga wpływ IL-31 na dynamikę przebiegu AZS. Nie jest wykluczone, że także inne komórki, niż limfocyty Th2, jak to wykazał Dillon i wsp. (2004), mogą stanowić główne źródło IL-31 (86).

Jak nadmieniono wcześniej IL-31 może być wydzielana także przez mastocyty, a jak wiadomo, są one także źródłem takich substancji świądotwórczych, jak histamina i prostaglandyny (235,351), do uwalniania których dochodzi pod wpływem defensyn (HBD) i kathelicyn (LL-37) (235,352). HBD i LL-37 uczestniczą także w uwalnianiu szeregu cytokin biorących udział w indukcji świądu, takich jak: IL-2, IL-4, IL-6, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) i czynnik nekrozy nowotworów (351,353), substancji świądotwórczych, takich jak: NGF, PGE2, LTC4 (ang. *leukotriene C4*) oraz zwiększając poziom mRNA dla substancji P (351). Co ciekawe, wykazano, że w wyniku działania HBD i LL-37 dochodzi do wzrostu ekspresji genu *IL31* i białka oraz do uwalniania IL-31 z mastocytów, zarówno linii izolowanej ze szpiku kostnego pacjentów z białaczką monocytową LAD2 (ang. *leukocyte adhesion deficiency-2*), jak i z krwi obwodowej. Receptor funkcjonalny HBD i LL-37 na mastocytach nie został dotychczas zidentyfikowany. HBD i LL-37 aktywują fosforylację MAPK (p38, ERK i JNK), co jest niezbędne do produkcji i wydzielania IL-31 (235). Fakt, że w przypadku AZS mamy do czynienia z obniżoną regulacją HBD i LL-37 wskazuje na to, że muszą istnieć także inne czynniki, pod wpływem których mastocyty uwalniają IL-31, jak choćby kompleksy IgE/antyIgE, które to na drodze aktywacji szlaku MAPK, wpływają na ekspresję *IL31* (108). Jak wiadomo, białka mikrobowe odgrywają istotną rolę w reakcjach zapalnych i alergicznych właśnie poprzez aktywację mastocytów. Tak więc komórki tuczne, obok limfocytów T stanowią dodatkowe źródło uwalniania IL-31 (235). Doniesienia literaturowe podają, że u około 70-90% chorych na łuszczycę występuje świąd skóry (351), któremu towarzyszy wzrost HBD i LL-37 (235,351). Co ciekawe, u chorych na łuszczycę, u których wcześniej nie stwierdzono zwiększonego poziomu mRNA IL-31 w keratynocytach, zaobserwowano zwiększone jej wydzielanie pod wpływem HBD2-4 i LL-37 właśnie przez mastocyty (227,351).

Chociaż związek IL-31 z etiopatogenezą świądu stanowił już temat badań, w żadnej z dotychczasowych publikacji nie poddano ocenie znaczenia IL-31 w patomechanizmie



świądu w przypadku chorych na liszaj płaski, a jak wiadomo nasilony świąd stanowi częsty objaw podmiotowy w tej jednostce chorobowej.

W niniejszej pracy nie zostały wykazane istotne statystycznie różnice w poziomie mRNA IL-31 dla oznaczeń w PBMC pomiędzy grupą chorych na liszaj płaski i grupą osób zdrowych oraz pomiędzy grupą chorych na liszaj płaski i grupą chorych na AZS, co zapewne wynika ze zbliżonych średnich poziomów mRNA IL-31. Wykazano natomiast istotną statystycznie różnicę w poziomach mRNA IL-31RA ( $p=0,0361$ ) i OSMR ( $p=0,0235$ ) pomiędzy grupami LP i Z, które osiągnęły wyższe wartości w grupie chorych na liszaj płaski.

Dla oznaczeń wykonanych w tkankach w zakresie porównania poziomu mRNA IL-31 pomiędzy grupą chorych na liszaj płaski a grupami AZS-Z (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry pozornie zdrowej), AZS-CH (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych) i grupą osób zdrowych uzyskano podobne wyniki, jak w przypadku PBMC i różnice nie były istotne statystycznie. Z kolei w odróżnieniu od wyników uzyskanych w PBMC, nie wykazano istotnych statystycznie różnic poziomu mRNA IL-31RA pomiędzy grupami LP a AZS i Z.

Natomiast podobnie, jak w przypadku oznaczeń wykonanych w PBMC, istotne statystycznie różnice wykazano w tkankach w zakresie poziomu mRNA OSMR pomiędzy grupami LP i AZS-CH ( $p=0,0067$ ) oraz pomiędzy LP i Z ( $p=0,0016$ ). Poziom mRNA OSMR był niższy u chorych na LP w porównaniu z grupą AZS-CH, ale wyższy niż w grupie Z. Za pomocą testu Manna–Whitney'a nie wykazano jednak statystycznie istotnych różnic w poziomach mRNA OSMR w grupach LP i AZS-Z.

Jak wiadomo, w patogenezie liszaja płaskiego mają znaczenie komórki tuczne, które zgodnie z tym, o czym wspomniano powyżej, stanowią źródło IL-31. W badaniu histopatologicznym w liszaju płaskim stwierdza się obfity naciek złożony z aktywowanych limfocytów T, makrofagów, komórek tucznych i plazmocytów (354). Wśród limfocytów T obserwuje się zarówno subpopulację limfocytów T pomocniczych (CD4+), a wśród nich w szczególności skórnych limfocytów CD45RO+CLA+, jak i cytotoksycznych (CD8+) (355,356,357). Co ciekawe, w liszaju płaskim występuje zwiększona koncentracja peptydów antymikrobowych (AMP), a w wyniku uszkodzenia błony podstawnej dochodzi do bezpośredniego kontaktu AMP z mastocytami, co z kolei prowadzi do ich aktywacji (235,358). Wykazano, że rozkład limfocytów T w obrębie zmian koreluje ze stanem błony podstawnej. Mianowicie w okolicy uszkodzeń błony podstawnej obserwowano obecność przede wszystkim dużej liczby limfocytów T cytotoksycznych (CD8+), podczas gdy

liczebność limfocytów T pomocniczych (CD4+) nie wykazywała związku z ciągłością błony podstawnej (359). W świetle dotychczasowych badań, które wskazują na udział subpopulacji limfocytów CD45RO+CLA+, monocytów i makrofagów w syntezie interleukiny 31 można wysunąć przypuszczenie, że u chorych na liszaj płaski poziom mRNA IL-31 może być podwyższony. Powyższe przesłanki skłoniły nas do wyboru jako grupy kontrolnej właśnie chorych na liszaj płaski.

Jak wspomniano wcześniej, w literaturze istnieją sprzeczne doniesienia odnośnie udziału IL-31 i podjednostek jej receptora w dermatozach, którym towarzyszy świąd skóry. W pewnym stopniu potwierdzeniem wykazanego braku związku IL-31 oraz podjednostki IL-31RA jej receptora ze schorzeniami skóry przebiegającymi z towarzyszącym świądem jest najnowsze badanie Nobbe i wsp. (2012). Nie wykazano w nim zwiększonego poziomu białka IL-31, IL-31RA i OSMR w żadnym innym schorzeniu Th2-zależnym, czy też świądowym, z wyjątkiem AZS (318). W sprzeczności z badaniem Nobbe i wsp. pozostaje jednak uzyskany przez nas wynik dla podjednostki OSMR, zarówno dla oznaczeń w PBMC, jak i w tkankach oraz wynik IL-31RA dla oznaczeń wykonanych w PBMC.

### **Podsumowanie**

Chociaż na podstawie oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC), nie wykazano znaczenia IL-31 i obydwu podjednostek jej receptora w patomechanizmie AZS, to jednak badania przeprowadzone w tkankach wykazały statystycznie istotne różnice we względnej liczbie transkryptów genu *OSMR* zarówno w skórze zmienionej chorobowo, jak i w skórze pozornie zdrowej w porównaniu do grupy osób zdrowych. Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu oraz doniesienia literaturowe wskazują na prawdopodobny udział podjednostki OSMR w patomechanizmie atopowego zapalenia skóry. Co więcej, być może uczestniczy ona także w etiopatogenezie liszaja płaskiego.

## **5.4. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry**

### **5.4.1. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w wycinkach skóry z obecnością zmian klinicznych (AZS-CH) i w wycinkach skóry pozornie zdrowej (AZS-Z) w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry**

W przypadku oznaczeń wykonanych w tkankach wykazano statystycznie istotną różnicę w poziomie mRNA OSMR pomiędzy grupą AZS-CH (grupa chorych na atopowe

zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych) a AZS-Z (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry pozornie zdrowej) ( $p=0,0058$ ), przy czym wyższe wartości względnej liczby transkryptów genu *OSMR* uzyskano w wycinkach, które zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych i wynosiły one 238829, natomiast w przypadku wycinków pobranych ze skóry pozornie zdrowej poziom mRNA *OSMR* okazał się niższy i wyniósł 149274 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*.

Warto zaznaczyć, że dotychczas nie przeprowadzono podobnej analizy. Co prawda Sonkoly i wsp. wykazali wyższy poziom mRNA IL-31 w wycinkach skóry chorobowo zmienionej i pozornie zdrowej u chorych na AZS, jednak analiza porównawcza była przeprowadzona w stosunku do grupy osób zdrowych (88). Jak wspomniano wcześniej, poziom mRNA IL-31 był niższy w grupie kontrolnej osób zdrowych, w porównaniu do wyników uzyskanych u chorych na AZS i to zarówno w wycinkach pobranych ze skóry z obecnością zmian klinicznych, jak i w porównaniu z oznaczeniami wykonanymi w skórze pozornie niezmienionej, jednak nie ma danych dotyczących ewentualnych różnic w obrębie grupy chorych na AZS.

### **Podsumowanie**

W grupie chorych na AZS odnotowano większą względną liczbę transkryptów genu *OSMR* w wycinkach skóry z obecnością zmian klinicznych niż w skórze pozornie zdrowej, a wykazane różnice są istotne statystycznie. Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu wskazują na prawdopodobną rolę podjednostki *OSMR* receptora IL-31 w patomechanizmie atopowego zapalenia skóry.

#### **5.4.2. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry w wycinkach skóry z obecnością zmian klinicznych (AZS-CH) oraz w wycinkach skóry pozornie zdrowej (AZS-Z) z poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC)**

W niniejszym badaniu, w przypadku mRNA IL-31 wyższe wartości uzyskano dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej, niż w tkankach. Mianowicie średnia dla oznaczeń wykonanych w PBMC wynosi 155 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*, a średnia dla oznaczeń wykonanych w tkankach w grupach AZS-CH i AZS-Z wynosi odpowiednio 35 i 26 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD* (tabela nr XXIII, XXV). Różnica

pomiędzy grupą AZS-Z (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry pozornie zdrowej) dla oznaczeń wykonanych w tkankach a grupą AZS dla oznaczeń wykonanych w PBMC dla poziomu mRNA IL-31 jest istotna statystycznie ( $p=0,0007$ ) (tabela nr XLII). Podobne wyniki uzyskano dla porównań badań wykonanych w PBMC dla grupy AZS-CH (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry w miejscach ze zmianami klinicznymi) dla oznaczeń wykonanych w tkankach. Tutaj również wykazano statystycznie istotne różnice między poziomem mRNA IL-31 dla oznaczeń w PBMC a poziomem mRNA IL-31 w tkankach ( $p=0,0006$ ) (tabela nr XLII).

Z kolei w przypadku mRNA OSMR jest odwrotnie. Jego poziom jest niższy dla oznaczeń wykonanych w PBMC, w których wynosi on 7, natomiast w przypadku oznaczeń wykonanych w tkankach osiąga on znacznie wyższe wartości i w grupach AZS-CH oraz AZS-Z wynosi odpowiednio 238829 i 149274 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*. Różnica pomiędzy grupą AZS-Z (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry pozornie zdrowej) oraz grupą AZS-CH (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry w miejscach ze zmianami klinicznymi) dla oznaczeń wykonanych w tkankach a grupą AZS dla oznaczeń wykonanych w PBMC w zakresie poziomu mRNA OSMR jest istotna statystycznie, a poziom istotności jest taki sam i wynosi on 0,0001 (tabela nr XLII).

W dotychczas przeprowadzanych badaniach nie dokonywano porównań pomiędzy poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej a ich poziomem w tkankach. Jak wspomniano wcześniej, Bilsborough i wsp. badaniu poddali pobudzone PBMC, a wykazany wzrost poziomu mRNA IL-31 u chorych na AZS, w porównaniu z grupą osób zdrowych nie był istotny statystycznie. Również w biopsjach skóry nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomach mRNA IL-31 pomiędzy chorymi na AZS, a grupą osób zdrowych, niemniej u chorych na AZS obserwowana była tendencja do wyższych poziomów genu tego białka (89). Nie ma jednak danych dotyczących różnic w zakresie poziomu mRNA IL-31 i obydwu podjednostek jej receptora w PBMC i w tkankach.

### **Podsumowanie**

W niniejszym badaniu uzyskano znacznie wyższe poziomy mRNA OSMR u chorych na AZS w wycinkach skóry, niż w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i co istotne, najwyższe wartości stwierdzono w wycinkach ze skóry chorobowo zmienionej. Powyższe

wyniki oraz uzyskane statystycznie istotne różnice, zarówno w poziomach mRNA OSMR oznaczonych w wycinkach pobranych ze skóry z obecnością zmian klinicznych, jak i ze skóry pozornie zdrowej, mogą stanowić potwierdzenie znaczenia podjednostki OSMR w etiopatogenezie AZS.

#### **5.5. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w wycinkach skóry i w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) w grupie chorych na liszaj płaski**

W niniejszym badaniu średni poziom mRNA IL-31 osiąga wyższe wartości dla oznaczeń wykonanych w PBMC, w których wynosi on 208, natomiast w tkankach jest on znacznie niższy i wynosi tylko 8 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*. Różnica ta jest istotna statystycznie ( $p=0,0059$ ).

Z kolei średni poziom mRNA OSMR, podobnie jak miało to miejsce w grupie chorych na AZS, jest niższy w przypadku oznaczeń wykonanych w PBMC, w których wynosi 41, natomiast osiąga on znacznie wyższe wartości dla oznaczeń w tkankach, gdzie sięga aż 109523 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD* (tabela nr XXIII, XXV). Powyższe różnice są istotne statystycznie ( $p=0,0001$ ) (tabela nr XLII).

Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy poziomem mRNA IL-31RA w PBMC i w tkankach u chorych na liszaj płaski.

Należy zauważyć, że dotychczas nie badano znaczenia IL-31 i podjednostek jej receptora w patomechanizmie świądu u chorych na liszaj płaski.

#### **5.6. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w wycinkach skóry i w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) w grupie osób zdrowych**

Dla oznaczeń wykonanych w grupie osób zdrowych wykazano istotne statystycznie różnice jedynie dla mRNA OSMR. W przypadku grupy osób zdrowych, podobnie, jak miało to miejsce u chorych na AZS i liszaj płaski, średni poziom mRNA OSMR dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej jest niższy, niż dla oznaczeń wykonanych w tkankach i wynosi on odpowiednio 18 i aż 44698 kopii transkryptu genu badanego w przeliczeniu na milion kopii genu *GAPD*, a ponadto jest to różnica istotna statystycznie ( $p=0,0001$ ).

Tylko poziom mRNA IL-31RA nie różni się między oznaczeniami wykonanymi w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i w tkankach dla wszystkich grup, a jego średnie są do siebie bardzo zbliżone.

### **5.7. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) oraz w wycinkach skóry z obecnością zmian klinicznych (AZS-CH) i w wycinkach skóry pozornie zdrowej w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry (AZS-Z) i wskaźników nasilenia stanu zapalnego i świądu: W-AZS, W-AZS I, W-AZS II oraz EASI**

Należy podkreślić fakt, że po raz pierwszy została przeprowadzona analiza zależności poziomów mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w PBMC oraz w tkankach u chorych na atopowe zapalenie skóry przy wykorzystaniu metody *Real-Time PCR* i zastosowaniu wskaźników: W-AZS, W-AZS I, W-AZS II oraz EASI. Ponadto w zależności od wartości punktowych powyższych wskaźników dokonano podziału chorych na dwie kategorie w związku ze stopniem zaawansowania choroby. Powyższe podziały umożliwiły dokonanie próby oceny wpływu IL-31 na nasilenie świądu i stanu zapalnego, i to nie tylko rozpatrywanych jako całość, ale także z uwzględnieniem oddzielnie świądu i oddzielnie stanu zapalnego.

U chorych na AZS nie została wykazana korelacja poziomu mRNA żadnego z badanych parametrów (IL-31, IL-31RA, OSMR), zarówno dla oznaczeń wykonanych w PBMC, jak i w tkankach, z żadnym ze wskaźników nasilenia świądu i stanu zapalnego (W-AZS, W-AZS-I, W-AZS-II i EASI). Nie stwierdzono jej także po dokonaniu podziału, w zależności od nasilenia zmian klinicznych, na kategorie A i B (tabela nr XXVII-XXX, rycina 35-40). Wynika z tego, że nie występuje związek pomiędzy poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w PBMC oraz w tkankach a stopniem nasilenia zmian zapalnych i świądu u chorych na AZS.

Powyższe wyniki pozostają jednak w sprzeczności z badaniami przeprowadzonymi na modelu zwierzęcym. Jak wspomniano wcześniej, korelacja pomiędzy poziomem mRNA IL-31 w zmianach chorobowych i świądem skóry po raz pierwszy została stwierdzona na modelu zwierzęcym AZS (168,200). Takaoka i wsp. (2005,2006) udowodnili wpływ długotrwałych zachowań świądowych na poziom mRNA IL-31, a z przeprowadzonych przez nich badań wynika, że zwiększony poziom mRNA IL-31 prowadzi do indukcji i nasilenia zachowań świądowych u myszy oraz wtórnie do nasilenia stanu zapalnego skóry (168,175,200). Wykazano, że to właśnie drapanie paznokciami istotnie wpływa na pojawienie się zmian zapalnych skóry, śródskórną utratę wody, liczbę mastocytów oraz stężenie cIgE w surowicy (306,312,360,361). Ponadto zaobserwowano związek pomiędzy wzrostem stężenia IL-31 a TEWL, stopniem nasilenia zmian zapalnych i objawów przypominających AZS (200). Znalazło to również odzwierciedlenie w wynikach przeprowadzonych badań histopatologicznych (86,361). Zaobserwowano ponadto, że podskórne iniekcje IL-31

prowadzą do powstania nacieku zapalnego złożonego z komórek zapalnych, neutrofilów, eozynofiliów, limfocytów i makrofagów, powodują akantozę oraz wpływają na ścieńczenie naskórka (86). W związku z tym, że znanym czynnikiem spustowym, wystarczającym do przejścia AZS ze stanu ostrego w przewlekły może być uraz mechaniczny (31), szczególnie istotna wydaje się być rola drapania, w wyniku którego dochodzi właśnie do przełączenia odpowiedzi immunologicznej z profilu Th2 na Th1, co, jak wspomniano powyżej, znajduje potwierdzenie w badaniach przeprowadzonych na modelu zwierzęcym. Interesujący jest również fakt, że wystąpienie zmian skórnych jest poprzedzone nasileniem zachowań świadomych, a wzrost poziomu mRNA IL-31 obserwowany był w chwili wystąpienia zachowań świadomych, ale, co warto podkreślić, jeszcze przed pojawieniem się zmian skórnych (137,168,201,361). Co więcej, wykazano, że unikanie czynników mechanicznych może doprowadzić do ograniczenia stanu zapalnego (361). Mianowicie u myszy, u których obecne są już zmiany typowe dla AZS, po wyeliminowaniu zachowań świadomych, odnotowano spadek stopnia nasilenia ciężkości zmian oraz obniżenie TEWL i liczby mastocytów, jednak nie obserwowano wpływu zmniejszenia świądu na stężenie cIgE (361). Potwierdzeniem tego jest ponadto brak wzrostu poziomu mRNA IL-31 u myszy zdrowych, czy też u uczulonych 2,4,6-trinitrochlorobenzenem, wywołującym kontaktowe zapalenie skóry, u których nie zaobserwowano nasilenia drapania długoterminowego (200). Co ciekawe, odnotowano także, że po podaniu przeciwciał przeciw IL-31 zmniejszenie świądu uzyskiwano w ostrej fazie choroby, z kolei nie obserwowano tego w okresie przewlekłym, a ponadto nie uzyskano redukcji stanu zapalnego. Z kolei podanie przeciwciał przeciwko IL-31 nie wpłynęło na wyniki badania histopatologicznego, badań immunohistochemicznych, ani na stężenie cIgE czy też poziom mRNA IL-13 (201). Można wysunąć wniosek, że wzrost syntezy IL-31 obserwowany jest w ostrym okresie choroby i być może w grupie pacjentów z ciężkimi objawami AZS uzyskano by więcej wyników niezerowych niż w grupie chorych na AZS uczestniczącej w niniejszym badaniu.

Warto zauważyć, że obecność IL-31RA i OSMR wykazano w aferentnych skórnych włóknach nerwowych oraz w korzeniach grzbietowych rdzenia kręgowego. Co więcej, należy pamiętać, że największa ekspresja *IL31RA* i *OSMR* została wykazana właśnie w zwojach nerwowych korzeni grzbietowych rdzenia kręgowego, gdzie znajdują się ciała komórek pierwotnych neuronów czuciowych (88,230), a także ciała komórek bezmielinowych włókien C, co jest szczególnie interesujące, ze względu na fakt, że uczucie świądu jest mediowane bezpośrednio za ich pośrednictwem (139). Słusznym wydaje się więc być przypuszczenie, że IL-31 może pełnić kluczową rolę w rozwoju świądu w AZS.

Wpływ IL-31 na indukcję świądu może być zarówno bezpośredni, jak i pośredni. Być może poprzez działanie IL-31 bezpośrednio dochodzi do modulacji neuronów czuciowych i oddziaływania z zakończeniami nocyceptywnymi w skórze (78,88,201), a jak wiadomo, zwiększoną liczebność wolnych zakończeń nerwowych wykazano właśnie w zmianach chorobowych w badaniu przeprowadzonym na modelu zwierzęcym AZS (175). IL-31 może aktywować bezmielinowe włókna C w skórze także w sposób pośredni. Ponadto podnosi się jej wpływ na aktywowane keratynocyty wykazujące ekspresję obydwu podjednostek receptora IL-31, w wyniku czego może dojść do uwalniania z nich nieznanymi mediatorów, które z kolei działają na niezmielinizowane włókna C (353). Ekspresja genu *IL31* w obwodowym układzie nerwowym nie została jak dotąd ustalona (88). W związku z powyższym, być może to właśnie IL-31 stanowi istotny element łączący system immunologiczny z układem nerwowym (318).

O wysoce prawdopodobnym udziale IL-31 w patomechanizmie świądu, świadczy również fakt, że OSMR, został wykryty w grupie neuronów nocyceptywnych w zwojach nerwowych korzeni grzbietowych rdzenia kręgowego, które projektują do skóry właściwej (362,363). Do hiperalgezji występującej podczas zapalenia może przyczyniać się także obecność receptorów kilku innych, podobnych do IL-31RA, cytokin i chemokin, które zostały wykryte w zwojach nerwowych korzeni grzbietowych rdzenia kręgowego (364,365). Także wg Ikoma i wsp. (2006) badania wskazują na prawdopodobne znaczenie IL-31, obok IL-2 i IL-6 w patomechanizmie świądu (366).

Jak wspomniano wcześniej, nie została wykazana korelacja poziomu mRNA IL-31 i obydwu podjednostek jej receptora z nasileniem stanu zapalnego i świądu u chorych na AZS w PBMC z ich poziomem w tkankach, i to zarówno w chorobowo zmienionych, jak i w pozornie zdrowych.

Podobne wyniki uzyskali Neis i wsp. (2006), którzy nie zaobserwowali korelacji pomiędzy poziomem mRNA IL-31 w wycinkach skórnych uzyskanych od chorych na AZS a stopniem ciężkości stanu klinicznego pacjentów, ocenianym na podstawie wskaźnika SCORAD (ang. *scoring atopic dermatitis index*) (69). Gambichler i wsp. (2008), podobnie jak Neis i wsp., nie wykazali korelacji poziomu mRNA IL-31 ze stopniem ciężkości stanu klinicznego, który z kolei był określany na podstawie wskaźników: SASSAD (ang. *six area, six sign, atopic dermatitis*), oceniającego nasilenie i rozległość stanu zapalnego skóry i VAS (ang. *visual analogue scale*), służącego do oceny stopnia nasilenia świądu określanego w skali od 0 do 10 (317).



W sprzeczności pozostają jednak wyniki badań opublikowane w tym samym roku przez Raap i wsp.. Badacze poddali ocenie zależność pomiędzy surowiczym stężeniem IL-31 a stopniem ciężkości AZS, określanym również na podstawie wskaźnika SCORAD. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych przez Neis i wsp, w tym badaniu została wykazana korelacja pomiędzy stężeniem IL-31 i wskaźnikiem SCORAD. Ponadto powyższe wyniki znalazły potwierdzenie również w badaniu Otsuka i wsp. (2011) (314). Należy jednak zwrócić uwagę na odmienną metodykę badania, a mianowicie Neis i wsp. oraz Gambichler i wsp. oznaczali poziom mRNA IL-31, natomiast Raap i wsp. oraz Otsuka i wsp. badali jej stężenie surowicze. Próba wykazania związku IL-31 z procesem zapalnym i świądem skóry występującymi w przebiegu AZS została podjęta ponownie w 2011r. przez Ezzat i wsp., którzy, podobnie jak wcześniej Raap i wsp. oraz Otsuka i wsp., wykazali korelację surowiczego stężenia IL-31 z nasileniem objawów chorobowych. Do oceny stanu klinicznego chorych na AZS w tym przypadku posłużono się również wskaźnikiem SCORAD, a ponadto wskaźnikami: SSS (ang. *simple scoring system of costa*) i LSS (ang. *Leicester sign score*). Podobnie, jak wskaźnik SCORAD, który określa zarówno nasilenie stanu zapalnego, jak i świądu skóry, wskaźnik SSS łączy zarówno cechy obiektywne, takie jak rozległość i nasilenie zmian oraz objawy subiektywne, takie jak świąd i zaburzenia snu (367). Zaobserwowano pozytywną korelację stężenia IL-31 ze wszystkimi poddanymi ocenie wskaźnikami ciężkości AZS, czyli: LSS, SSS i SCORAD. Co więcej, odnotowano, że wzrost stężenia IL-31, był związany z nasileniem aktywności choroby, przy czym w grupie o największym nasileniu zmian, stężenie IL-31 było najwyższe. Ze względu na to, że świąd i zaburzenia snu są objawami subiektywnymi, ocenie poddano także zależność stężenia IL-31 i wskaźnika *Objective SCORAD* (ang. *objective scoring atopic dermatitis index*), który jest modyfikacją wskaźnika SCORAD i poddaje ocenie wyłącznie kryteria obiektywne, jednak w tym przypadku korelacja nie została wykazana (315). Co ciekawe zależność tą wykazano w przypadku wskaźnika LSS, który został opracowany w oparciu o 6 cech klinicznych w 6 określonych miejscach i także poddaje on ocenie wyłącznie objawy obiektywne. Wyniki zbieżne z uzyskanymi przez Raap i wsp. oraz Ezzat i wsp. opublikowali w 2011r. Kim i wsp., którzy zaobserwowali korelację surowiczego stężenia IL-31 nie tylko ze wskaźnikiem SCORAD, ale również z subiektywnie ocenianym stopniem nasilenia świądu skóry, jednak, co ciekawe, nie wykazana została zależność wzrostu stężenia IL-31 z nasileniem zaburzeń snu. Niemniej badania Raap i wsp., Ezzat i wsp., Kim i wsp. oraz Otsuka i wsp. wskazują na prawdopodobny udział IL-31 w indukcji i utrzymywaniu się świądu, a także na jej znaczenie w rozwoju stanu zapalnego u chorych na AZS. Na podstawie powyżej przedstawionych

wyników badań można przypuszczać, że być może to właśnie zablokowanie syntezy IL-31 może stanowić istotny element w zahamowaniu indukcji i nasilenia zarówno świądu, jak i zmian zapalnych u chorych na AZS.

### **Podsumowanie**

W badaniu tym nie wykazano zależności pomiędzy poziomem mRNA IL-31 ani obydwu podjednostek jej receptora a stopniem nasilenia stanu zapalnego i świądu, ocenianym na podstawie wskaźników: W-AZS, W-AZS I, W-AZS II oraz EASI u chorych na AZS. Korelacji pomiędzy mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR a powyższymi wskaźnikami nie zaobserwowano również przy uwzględnieniu podziału chorych na kategorie A i B, w zależności od stanu klinicznego. W związku z tym, że w niniejszym badaniu nie wykazano zależności pomiędzy względną liczbą transkryptów genów *IL31*, *IL31RA* i *OSMR* w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i w tkankach a świądem u chorych na atopowe zapalenie skóry, a ponadto biorąc pod uwagę dane literaturowe, należy uznać, że udział IL-31, IL-31RA i OSMR w patomechanizmie świądu w atopowym zapaleniu skóry nie jest w pełni udowodniony.

## **5.8. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) i w wycinkach skóry w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry z niektórymi parametrami alergologicznymi**

### **5.8.1. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) i w wycinkach skóry w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry ze stężeniem cIgE w surowicy**

W niniejszym badaniu nie wykazano zależności pomiędzy poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR a stężeniem cIgE w surowicy, i to zarówno dla oznaczeń wykonanych w PBMC, jak i w wycinkach skóry w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry. Nie wykazano także wpływu kategoryzacji chorych ze względu na wysokość stężenia cIgE w surowicy na powyższe wskaźniki (tabela nr XXXI-XXXIV, rycina 41-46).

Jak wspomniano wcześniej, w 2004 roku Dillon i wsp. zaobserwowali, że u myszy transgenicznych z nadreaktywnością dróg oddechowych, które są wzorcem astmy i u których występuje zwiększony poziom mRNA IL-31, dochodzi do rozwoju ciężkiej dermatozy, o obrazie klinicznym i histopatologicznym przypominającym AZS, jednocześnie przy prawidłowym stężeniu cIgE. Na tej podstawie można uznać te zwierzęta za wzorzec występującego u ludzi wewnątrzpochodnego AZS (86). U myszy transgenicznych, u których

występuje zwiększony poziom mRNA IL-31, w wyniku zachowań świądowych, dochodzi do rozwoju zmian o podobnym charakterze, jak te które są spotykane u chorych na AZS (86,168). Z kolei dla szczepu myszy transgenicznych NC/Nga charakterystyczne jest podwyższone stężenie cIgE (305,306), ale, jak wykazali Dillon i wsp, nie jest ono konieczne do indukcji świądu i stanu zapalnego (86,361). Istnieją doniesienia, które podają, że wzrostowi stężenia cIgE towarzyszy nasilenie zmian chorobowych (201,306,308,368). Nie wykazano jednak wpływu redukcji zachowań świądowych na stężenie cIgE (361).

Należy podkreślić, że chociaż wyniki badań przeprowadzonych u ludzi nie są jednoznaczne, to jednak większość z nich jest zgodna z uzyskanymi w niniejszym badaniu. Wyniki zbieżne z uzyskanymi w tym badaniu opublikowali Neis i wsp. oraz Ezzat i wsp. Chociaż Neis i wsp. (2006) wykazali wzrost poziomu mRNA IL-31 u chorych na AZS, to jednak nie zaobserwowali oni jego związku ze stężeniem cIgE (69). Podobnie, w badaniu przeprowadzonym przez Ezzat i wsp. (2011), także nie została stwierdzona korelacja pomiędzy stężeniem IL-31 a stężeniem cIgE. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że badanie to zostało wykonane w grupie dzieci, u których surowicze stężenie cIgE było dość niskie (315). W sprzeczności z powyższymi badaniami pozostają wyniki uzyskane przez Kim i wsp., w których z kolei wykazano korelację stężenia IL-31 ze stężeniem cIgE w surowicy (316).

#### **5.8.2. Porównanie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) i w wycinkach skóry w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry z wynikami skórnych testów punktowych i/lub stężeniem asIgE z uwzględnieniem podziału na wewnątrzpochodną i zewnątrzpochodną postać atopowego zapalenia skóry**

W świetle opisanych na przestrzeni ostatnich lat doniesień, planując pracę nad rolą IL-31 w patomechanizmie atopowego zapalenia skóry postanowiono dokonać analizy poziomów mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w PBMC i w wycinkach skóry w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry, z uwzględnieniem podziału AZS na postać wewnątrzpochodną i zewnątrzpochodną. Niestety, ze względu na znaczną dysproporcję w liczebności podgrupy pacjentów z AZS wewnątrzpochodnym (1 osoba) i zewnątrzpochodnym (34 osoby), odstąpiono od przeprowadzenia zaplanowanej analizy.

Ze względu na podobieństwo objawów klinicznych i to zarówno w postaci wewnątrzpochodnej, jak i w postaci zewnątrzpochodnej AZS, można sądzić, że ich rozwój przebiega niezależnie od stężenia cIgE i asIgE oraz od aktywacji limfocytów T (5).

Jak wspomniano wcześniej, około 20-30% chorych na AZS stanowią pacjenci z postacią wewnątrzpochodną, w której nie stwierdza się podwyższonego stężenia cIgE oraz asIgE (5). Nie ma jednak markerów, oraz klinicznych narzędzi diagnostycznych dla rozróżnienia zewnątrzpochodnego i wewnątrzpochodnego typu AZS (369).

Prowadzono liczne badania mające na celu porównanie profilu cytokin i eozynofilii występujących w obydwu postaciach AZS. Przy pomocy metody *Real-Time PCR* badano ekspresję różnych cytokin, a ponadto poddawano ocenie liczbę eozynofilów w materiale biopsyjnym uzyskanym ze skóry pacjentów z typem wewnątrzpochodnym i zewnątrzpochodnym AZS. Chociaż nie wykazano znaczącej różnicy w komórkowych naciekach w skórze chorobowo zmienionej pomiędzy tymi dwoma typami AZS, to w przypadku zewnątrzpochodnej postaci AZS eozynofilia tkankowa była wyższa. Ponadto poziomy mRNA IL-5, IL-13 i IL-1 $\beta$  okazały się wyższe w obydwu postaciach AZS, w porównaniu z grupą kontrolną, ale należy zauważyć, że u pacjentów z postacią zewnątrzpochodną AZS osiągały one wyższe wartości niż u chorych z typem wewnątrzpochodnym. Z kolei w zakresie poziomu mRNA interferonu gamma, IL-12, czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów i makrofagów, IL-4 i IL-10 uzyskano wyższe wartości w obydwu postaciach AZS niż w grupie kontrolnej, ale nie wykazano różnic pomiędzy nimi. Ponadto nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy obiema postaciami AZS i grupą kontrolną w zakresie poziomów mRNA IL-6 i transformującego czynnika wzrostu-beta, z kolei poziom mRNA czynnika martwicy nowotworów alfa był niższy w obydwu typach AZS w porównaniu z grupą kontrolną. Prawdopodobnie to m.in. właśnie zwiększony poziom mRNA IL-13 i IL-5 stwierdzany w postaci zewnątrzpochodnej AZS, może odpowiadać za wzmożoną produkcję cIgE (5).

Co ciekawe, Neis i wsp. (2006) wykazali zależność zwiększonego poziomu mRNA IL-31 w wycinkach skórnych pobranych od chorych na AZS z poziomem mRNA cytokin wytwarzanych przez limfocyty Th2, a mianowicie: IL-4 i IL-13, a nie stwierdzili związku z poziomem mRNA IFN- $\gamma$  (69). Wynika to zapewne z faktu, że IFN- $\gamma$  jest wytwarzany przez limfocyty Th1, natomiast źródłem IL-4, IL-13 i IL-31 są limfocyty Th2 (55,69,196,197).

Istotna rola cytokin: IL-5, IL-13 i IL-31 w patogenezie zewnątrzpochodnej postaci AZS została potwierdzona także w badaniu przeprowadzonym przez Gambichler i wsp. (2008), w którym zaobserwowano znaczący spadek poziomu mRNA powyższych cytokin w grupie chorych na postać zewnątrzpochodną AZS, którzy zostali poddani leczeniu UVA1, przy uzyskaniu jednocześnie znacznej poprawy stanu klinicznego. Co ciekawe, poziomy mRNA IL-4 i IL-10 nie uległy zmianie (317). Także badanie przeprowadzone przez Nobbe

i wsp. (2012), w którym wykazano unikatowe znaczenie IL-31 w patogenezie AZS, dotyczyło chorych na zewnątrzpochodną postać AZS (318). Powyższe dane mogą sugerować szczególnie związek IL-31 z typem zewnątrzpochodnym AZS.

Jednakże wyniki kolejnych badań wskazują na to, że u chorych na AZS surowicze stężenie IL-31 wrasta istotnie, i to zarówno w AZS zewnątrzpochodnym, jak w AZS wewnątrzpochodnym. W badaniu opublikowanym w 2008 roku przez Raap i wsp., nie wykazano różnicy w surowiczych stężeniach IL-31 pomiędzy grupami pacjentów z typem wewnątrzpochodnym i zewnątrzpochodnym AZS. Co więcej, w przeciwieństwie do wyników uzyskanych przez Neis i wsp., została wykazana korelacja pomiędzy stężeniem IL-31 i wskaźnikiem SCORAD i była ona widoczna zarówno u chorych, u których rozpoznano zewnątrzpochodną postać AZS, jak i w grupie chorych na wewnątrzpochodną postać AZS (313). Szczególnie interesującej analizy stężeń IL-31 dokonano w badaniu Kim i wsp., którym objęto dość liczną grupę chorych i to zarówno na zewnątrzpochodną (34 chorych), jak i wewnątrzpochodną postać AZS (21 chorych). Okazało się, że w obydwu tych grupach chorych stężenie IL-31 w surowicy jest podwyższone w stosunku do grupy kontrolnej, jednak nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniu tej cytokiny pomiędzy chorymi na postać zewnątrzpochodną i wewnątrzpochodną AZS (316). Dane te przemawiają za tym, że surowicze stężenie IL-31 ma związek ciężkością AZS niezależnie od postaci choroby.

Znanym czynnikiem mającym istotne znaczenie w patomechanizmie AZS jest także genetyczna skłonność do wyprysku nieatopowego. Ostatnio został zidentyfikowany haplotyp genu *IL31*, który wykazuje związek właśnie z AZS wewnątrzpochodnym. Mianowicie, w wyniku stymulacji PBMC osób wrażliwych superantygenami lub w wyniku aktywacji poliklonalnej, obserwuje się zwiększoną skłonność do produkcji wyższych stężeń IL-31, co z kolei może przyczynić się do rozwoju świądu. Interesujące także są wyniki badania przeprowadzonego przez Schulz i wsp. (2007), które wskazują właśnie na udział czynników genetycznych w patogenezie wewnątrzpochodnej postaci AZS. Wykazano w nim, że polimorfizm genu *IL31* ma związek z genetycznie uwarunkowaną podatnością na AZS, a zmiana jego ekspresji może być czynnikiem indukującym wystąpienie choroby. Schulz i wsp. wyodrębnili trzy główne haplotypy, które zostały określone jako haplotyp A, B i C, co odpowiada kombinacjom polimorfizmu: GAA, AGA i GGG. Zaobserwowano, że w grupie zdrowych ochotników, po stymulacji PBMC przez przeciwciała anty-CD3 i anty-CD28, dochodzi do 3,8-krotnego wzrostu poziomu mRNA IL-31 u osobników homozygotycznych o haplocie AA, w porównaniu do nosicieli heterozygotycznych (140). Badanie to stanowi potwierdzenie, już wcześniej wykazanego przez Dillon i wsp. na modelu zwierzęcym,

będącym wzorcem wewnątrzpochodnej postaci AZS, znaczenia zwiększonego poziomu mRNA IL-31 (86) i wskazuje na istotną rolę IL-31, jako czynnika spustowego w indukcji świądu u chorych na tę właśnie postać choroby. Tak więc w badaniu Schulza i wsp. wykazano, że zmieniona regulacja ekspresji genu *IL31* prawdopodobnie jest związana ze specyficznym haplotypem genu *IL31*, co z kolei może w rezultacie doprowadzić do zmian funkcjonalnych, i prawdopodobnie obserwuje się to częściej w przypadku wyprysku nieatopowego (140).

### **Podsumowanie**

W niniejszym badaniu nie wykazano związku pomiędzy surowiczym i tkankowym poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR u chorych na AZS a stężeniem cIgE w surowicy, także przy uwzględnieniu podziału chorych na AZS na dwie kategorie w zależności od stężenia cIgE w surowicy.

## 6. WNIOSKI

1. Uzyskane wyniki wykazały statystycznie istotne różnice w poziomie mRNA OSMR pomiędzy skórą zmienioną chorobowo a skórą pozornie zdrową, co sugeruje prawdopodobny udział podjednostki OSMR w patomechanizmie atopowego zapalenia skóry.
2. Wykazano znacznie wyższe poziomy mRNA OSMR u chorych na AZS w wycinkach skóry, niż w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i co istotne, najwyższe wartości stwierdzono w wycinkach ze skóry chorobowo zmienionej, a wykazane różnice są istotne statystycznie.
3. Wydaje się, że IL-31 i składowe jej receptora mogą mieć udział w patomechanizmie atopowego zapalenia skóry.
4. Nie wykazano zależności pomiędzy poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i w tkankach a świądem u chorych na atopowe zapalenie skóry.
5. Biorąc pod uwagę wyniki badań niniejszej pracy oraz dane literaturowe należy uznać, że udział IL-31, IL-31RA i OSMR w patomechanizmie świądu nie jest w pełni udowodniony.
6. Nie stwierdzono zależności pomiędzy poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i w tkankach a stężeniem cIgE w surowicy.

## 7. STRESZCZENIE

Interleukina 31 może przyczyniać się do indukcji stanu zapalnego i świądu skóry u szczepu myszy transgenicznych NC/Nga oraz uczestniczyć w indukcji stanu zapalnego i świądu skóry u ludzi chorych na atopowe zapalenie skóry (AZS), przy czym rozwój zmian skórnych jest prawdopodobnie wynikiem nadmiernych zachowań świądowych. Doniesienia poczynione na przestrzeni ostatnich lat wskazują na wysoce prawdopodobny udział IL-31 w patomechanizmie atopowego zapalenia skóry. Może mieć ona wpływ zarówno na występujący w przebiegu tej jednostki chorobowej świąd skóry, jak i na nasilenie procesu zapalnego, a jak wiadomo, świąd skóry u chorych na AZS występuje nawet przy braku zmian chorobowych. Można zatem przypuszczać, że IL-31 ma swój udział zarówno w inicjacji, jak i w utrzymaniu objawów AZS.

Głównym celem pracy było oznaczenie poziomu mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) i w wycinkach ze skóry chorobowo zmienionej (AZS-CH) oraz pozornie zdrowej (AZS-Z) u chorych na AZS, porównanie wyników z grupami kontrolnymi, które stanowili chorzy na liszaj płaski i osoby zdrowe, a także ocena zależności pomiędzy poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w PBMC i w tkankach a nasileniem stanu zapalnego i świądu u chorych na AZS (W-AZS, EASI). Ponadto zaplanowano dokonanie porównania pomiędzy względną liczbą transkryptów genów *IL31*, *IL31RA* i *OSMR* w PBMC i w tkankach. W celu zbadania różnic pomiędzy postacią zewnątrzpochodną i wewnątrzpochodną AZS zaplanowano przeprowadzenie analizy zależności pomiędzy poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w PBMC oraz w tkankach a parametrami alergologicznymi u chorych na AZS, takimi jak cIgE, asIgE i skórne testy punktowe (STP).

Badaniu poddano 35 chorych na AZS. Pierwszą grupę kontrolną stanowiło 16 chorych na liszaj płaski, natomiast drugą 16 osób zdrowych. Z grup kontrolnych zostali wykluczeni pacjenci z obciążonym wywiadem osobniczym lub/i rodzinnym w kierunku chorób alergicznych.

Ocenę stanu klinicznego w zakresie nasilenia i rozległości stanu zapalnego skóry oraz objawów podmiotowych, takich jak świąd i zaburzenia snu, przeprowadzono przy zastosowaniu dwóch niezależnych wskaźników, a mianowicie wskaźnika W-AZS i wskaźnika EASI. Wskaźnik W-AZS rozpatrywany był także z uwzględnieniem podziału na W-AZS I, który służy do oceny świądu i zaburzeń snu i W-AZS II, który poddaje ocenie nasilenie zmian zapalnych. Ponadto dokonano podziału wszystkich wskaźników na dwie kategorie



w zależności od punktowej oceny nasilenia zmian (A-słabe i umiarkowane nasilenie zmian/świądu i B-duże i bardzo dużym nasileniem zmian/świądu).

Wszyscy chorzy zostali poddani badaniu podmiotowemu i przedmiotowemu, oznaczono u nich poziom mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) i w wycinkach ze skóry chorobowo zmienionej (grupa chorych na AZS i grupa chorych na liszaj płaski), w wycinkach ze skóry pozornie zdrowej (grupa chorych na AZS) oraz w wycinkach ze skóry zdrowej w grupie kontrolnej osób zdrowych. Oznaczenia poziomu mRNA IL-31, IL-31RA oraz OSMR, zarówno w PBMC, jak i w wycinkach ze skóry, zostały wykonane metodą *Real-Time PCR*.

Ponadto w grupie chorych na AZS przeprowadzono diagnostykę alergologiczną, która obejmowała skórne testy punktowe z zestawem wybranych alergenów powietrzno pochodnych i oznaczenie w surowicy krwi stężenia cIgE. U pacjentów, u których, ze względu na rozległość i nasilenie zmian, nie było możliwe wykonanie STP oraz u 2 chorych, u których wyniki STP były ujemne, oznaczono asIgE skierowane przeciwko wybranym alergenom powietrzno pochodnym, a mianowicie: *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, brzoza, bylica, tymotka i rajgras. Stężenie cIgE i asIgE zostało oznaczone metodą fluoroimmunoenzymatyczną.

Niestety, w znaczącej części oznaczeń poziomu mRNA IL-31 we wszystkich badanych grupach i to zarówno dla tych wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej, jak i w wycinkach skóry, uzyskano wyniki zerowe. O ile wyniki względnej ilości transkryptów genu *IL31* w PBMC można uznać za zgodne z oczekiwanymi, to spodziewano się jednak wyższego poziomu mRNA IL-31 w tkankach. Być może jest to związane ze zbyt małą ilością materiału uzyskanego podczas biopsji skóry, a także z brakiem standaryzacji biopsji.

Pomiędzy badaną grupą chorych na atopowe zapalenie skóry a grupami kontrolnymi chorych na liszaj płaski i grupą osób zdrowych nie wykazano statystycznie istotnych różnic w poziomie mRNA IL-31, zarówno dla oznaczeń wykonanych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej, jak i dla oznaczeń wykonanych w tkankach. Ponadto nie wykazano statystycznie istotnych różnic w poziomie mRNA IL-31 dla oznaczeń wykonanych w tkankach w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry pomiędzy wynikami uzyskanymi w wycinkach pobranych ze skóry chorobowo zmienionej i ze skóry pozornie zdrowej.

Co ciekawe, jedyne istotne statystycznie różnice uzyskano w zakresie mRNA OSMR. Wykazano mianowicie, że w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry istnieją statystycznie istotne różnice w poziomie mRNA OSMR w porównaniu z grupą osób zdrowych.

Zaobserwowano je zarówno w wycinkach, które zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych, jak i w wycinkach pobranych ze skóry pozornie zdrowej. Ponadto istotne statystycznie różnice we względnej ilości transkryptów genu *OSMR* zanotowano także pomiędzy grupą chorych na AZS, u których wycinki zostały pobrane ze skóry chorobowo zmienionej, a grupą osób chorych na liszaj płaski. Z kolei poziom mRNA *OSMR* był wyższy w grupie chorych na liszaj płaski, niż w grupie osób zdrowych, a różnica była istotna statystycznie. Co ciekawe, wykazano statystycznie istotną różnicę w poziomie mRNA *OSMR* dla oznaczeń wykonanych w tkankach pomiędzy grupą AZS-CH (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry z obecnością zmian klinicznych), a AZS-Z (grupa chorych na atopowe zapalenie skóry, u których wycinki zostały pobrane ze skóry pozornie zdrowej), przy czym poziom ten był wyższy w przypadku wyników uzyskanych z wycinków pobranych ze skóry chorobowo zmienionej. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na prawdopodobny związek pomiędzy poziomem mRNA *OSMR* w tkankach a patomechanizmem atopowego zapalenia skóry oraz liszaja płaskiego, w których to jednostkach chorobowych dominującym objawem podmiotowym jest świąd skóry. Wyższe wartości mRNA *OSMR* uzyskane u chorych na AZS w skórze chorobowo zmienionej niż w skórze pozornie zdrowej mogą ponadto wskazywać na szczególną rolę właśnie podjednostki *OSMR* receptora dla IL-31 w etiopatogenezie stanu zapalnego u chorych na AZS. Niemniej, biorąc pod uwagę wyniki badań niniejszej pracy i dane literaturowe, udział IL-31, IL-31RA i *OSMR* w patomechanizmie świądu nie został w pełni udowodniony.

W niniejszym badaniu uzyskano znacznie wyższy poziom mRNA *OSMR* u chorych na atopowe zapalenie skóry w wycinkach skóry, niż w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i co istotne, najwyższe wartości stwierdzono w wycinkach ze skóry chorobowo zmienionej. Powyższe wyniki oraz uzyskane statystycznie istotne różnice, zarówno w poziomie mRNA *OSMR* w wycinkach pobranych ze skóry z obecnością zmian klinicznych, jak i ze skóry pozornie zdrowej, mogą stanowić potwierdzenie znaczenia podjednostki *OSMR* w etiopatogenezie AZS.

W niniejszym badaniu nie wykazano zależności pomiędzy poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i *OSMR* w PBMC i w tkankach a świądem skóry u chorych na atopowe zapalenie skóry. Mianowicie, przy zastosowaniu dwóch niezależnych systemów oceny stanu klinicznego chorych na AZS, nie zaobserwowano zależności pomiędzy względną liczbą transkryptów genów *IL31*, *IL31RA* i *OSMR* w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i w tkankach a nasileniem stanu zapalnego i świądu u chorych na AZS, które oceniano

na podstawie wartości wskaźników: W-AZS, W-AZS I, W-AZS II i EASI, także z uwzględnieniem podziału w zależności od stopnia ich nasilenia na kategorie A i B.

W niniejszym badaniu nie wykazano związku pomiędzy poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w PBMC i w tkankach u chorych na AZS a stężeniem cIgE w surowicy, także przy uwzględnieniu podziału grupy chorych na AZS na dwie kategorie, w zależności od stężenia cIgE w surowicy.

Ze względu na znaczną dysproporcję w liczebności grup chorych na AZS przy uwzględnieniu podziału na postać zewnątrzpochodną i wewnątrzpochodną, nie została przeprowadzona analiza zależności pomiędzy poziomem mRNA IL-31, IL-31RA i OSMR w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej oraz w tkankach pomiędzy tymi podgrupami chorych.

Pomimo przeprowadzonych licznych badań nad etiopatogenezą świądu w atopowym zapaleniu skóry, nie udało się dotychczas w pełni poznać wszystkich mechanizmów, które ten objaw wywołują. W celu poprawy stanu klinicznego pacjentów chorych na AZS, słuszne wydaje się być działanie lecznicze, mające na celu redukcję świądu i drapania, a tym samym przerwanie „błędneho koła”. Chociaż wyniki badań wskazują na to, że IL-31 i składowe jej receptora mogą mieć udział w patomechanizmie atopowego zapalenia skóry, to jednak ich wpływ na nasilenie świądu i stanu zapalnego skóry wymaga dalszych badań.

## 8. SUMMARY

Interleukin 31 (IL-31) may contribute to the induction of cutaneous inflammation and pruritus in NC/Nga transgenic mice. It seems to perform likewise in human atopic dermatitis (AD), although the development of skin disorders is more likely caused by excessive pruritic behaviour. Results of recent scientific studies do point to the highly relevant influence of IL-31 in the pathomechanism of AD. It seems to influence the process of development of both pruritus and inflammation in AD patients, who may even suffer from the former without any skin changes. Therefore, it has been suspected that IL-31 takes part in the initiation as well as the preservation of AD.

The main goal of this research was to evaluate the mRNA levels of IL-31, IL-31RA and OSMR in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and in skin biopsies of lesional and apparently healthy skin of AD patients and compare them with two controls: one consisting of lichen planus patients and the other of healthy people. Secondly, it was to evaluate possible correlations between these levels and the intensity of inflammation and pruritus in AD patients (W-AZS, EASI). Thirdly, the expression of *IL31*, *IL31RA* and *OSMR* was to be compared between PBMC and skin biopsies. Finally, the study was aimed at the evaluation of possible interactions between the expression levels of the aforementioned genes and certain allergological parameters in these AD patients, such as cIgE, asIgE concentrations and prick tests.

35 AD patients were enrolled in this study. The control groups consisted of 16 lichen planus patients and 16 healthy volunteers. The control groups did not include allergic people nor ones with positive allergic history of their relatives.

The evaluation of inflammation and disease symptoms, such as pruritus and sleep disorders, was carried out with the use of two independent indexes: W-AZS and EASI. The W-AZS index was calculated taking into consideration its division into W-AZS I, which evaluates pruritus and sleep disorders and W-AZS II, which provides information on the intensity of inflammation. Additionally, scores of all indexes were subdivided into two categories: A - weak or moderate intensity of skin changes/pruritus, B - strong or very strong intensity of skin changes/pruritus.

All patients were subjected to clinical and physical examinations. The expression levels of *IL31*, *IL31RA* and *OSMR* in PBMC, in apparently healthy skin (AD patients) and in

lesional skin (AD and *lichen planus* patients) as well as in skin of the healthy control group were estimated with the use of real-time PCR.

Additionally, AD patients were diagnosed for allergies, with the use of prick tests directed to air allergens; moreover, their cIgE concentration in blood plasma was measured. Patients, whose skin changes were too excessive and intense to carry out prick tests and 2 patients, whose results of these tests were negative, were subjected to the evaluation of the levels of asIgE directed to *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, birch, mugwort, catstail, and oat-grass. The concentrations of cIgE and asIgE were estimated with the use of a fluoro-immunoenzymatic method.

Unfortunately, in many cases the IL-31 mRNA was undetected in all groups and tissue types. Although very low levels of relative *IL31* transcription in PBMC had been anticipated, the expression of this gene in skin turned out to be lower than expected. It is believed to be caused by the insufficient amount of skin, from which mRNA was isolated and by the lack of standardisation of biopsies acquisition.

There were no statistically relevant differences in the IL-31 mRNA levels between the lichen planus and the healthy control groups in both PBMC and skin. Moreover, the difference in the IL-31 mRNA levels between the lesional and apparently healthy skin of AD patients was also found not to be statistically relevant.

Interestingly, the only statistically relevant differences were found in respect to the *OSMR* expression. It was determined that both AD lesional skin and apparently healthy skin show a higher *OSMR* expression than the skin of the healthy control group. Additionally, there was a statistically significant difference between the lesional skin of AD patients and lichen planus patients in *OSMR* expression. Skin of lichen planus patients showed a higher *OSMR* expression than of healthy people and this difference was statistically significant. Lesional skin of AD patients showed a statistically higher expression level of *OSMR* than the apparently healthy skin samples. These results may indicate a probable connection between the level of *OSMR* expression and the pathomechanism of AD and lichen planus, both of which are known to present pruritus as the main symptom. Higher values of *OSMR* expression in lesional than in apparently healthy skin of AD patients may also point to an interesting link between the *OSMR* subunit of the IL-31 receptor and the etiopathogenesis of inflammation in AD. Nonetheless, taking into consideration the results of this and the other

studies, the influence of IL-31, IL-31RA and OSMR on the pathomechanism of pruritus has not been fully proven yet.

It was determined that AD skin produces statistically more OSMR mRNA copies than AD PBMC and, what is more, the highest number of these transcripts was found in lesional skin. The aforementioned results, together with the statistically relevant differences found in both lesional and apparently healthy skin might be the evidence for the importance of the OSMR subunit in the etiopathogenesis of AD.

In this study no statistically relevant correlations were found between the mRNA levels of IL-31, IL-31RA and OSMR and pruritus intensity in AD patients, in both PBMC and skin. None on the evaluated indexes (W-AZS, W-AZS I, W-AZS II and EASI, with their subdivision into A and B categories) scored a statistically relevant correlation in respect to the aforementioned sequences.

There were no statistically relevant correlations between the IL-31, IL-31RA and OSMR mRNA levels in PBMC and skin of AD patients and the concentration of cIgE in blood plasma, also taking into consideration the subdivision into A and B categories.

Due to a significant difference in sample sizes of patients with intrinsic and extrinsic AD, the analysis of possible correlations and interactions concerning the IL-31, IL-31RA and OSMR mRNA levels in PBMC and in skin between these two AD subtypes was not performed.

Despite the vast amount of scientific research concerning the causes of pruritus in AD, the mechanisms of its development have not been fully elucidated. In order to improve the clinical conditions of AD patients, it seems valid to perform treatment targeted to the reduction of pruritus and scratching, thus stopping the AD “vicious circle”. Although many studies seem to acknowledge that IL-31 and its receptor subunits may be important in the pathomechanism of AD, the influence of these proteins on the intensity of pruritus and cutaneous inflammation is yet to be determined.

## 9. PIŚMIENNICTWO

1. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Dermatol Venereol.* 1980; 92:44-47.
2. Japanese Dermatological Association: Criteria for the Diagnosis of Atopic Dermatitis. *J Dermatol.* 1995;22:966-967.
3. Werfel T, Kapp A. Environmental and other major provocation factors in atopic dermatitis. *Allergy.* 1998;53(8):731-739.
4. Silny W, Czarnecka-Operacz M. Ethioopathogenesis of atopic dematitis. *Int Rev Allergol Clin Immunol.* 1999;5:159-162.
5. Jeong CW, Ahn KS, Rho NK i wsp. Differential in vivo cytokine mRNA expression in lesional skin of intrinsic vs. extrinsic atopic dermatitis patients using semiquantitative RT-PCR. *Clin Exp Allergy.* 2003;33(12):1717-1724.
6. Boguniewicz M, Schmid-Grendelmeier P, Leung DY. Atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(1):40-43.
7. Akdis CA, Akdis M, Bieber T i wsp. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *Allergy.* 2006;61(8):969-987.
8. Leung AK, Hon KL, Robson WL. Atopic dermatitis. *Adv Pediatr.* 2007;54:241-273.
9. Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 2008;358(14):1483-1494.
10. Czarnecka-Operacz M. Immunoterapia swoista w leczeniu chorych na atopowe zapalenie skóry. Praca habilitacyjna. Poznań 2000.
11. Czarnecka-Operacz M, Silny W. Atopowe zapalenie skóry – aktualny stan wiedzy. *Post Dermatol Alergol.* 2002;3:152-160.
12. Silny W, Czarnecka-Operacz M, Gliński W i wsp. Atopowe zapalenie skóry–współczesne poglądy na patomechanizm oraz metody postępowania diagnostyczno-leczniczego. Stanowisko grupy specjalistów Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego. *Post Dermatol Alergol.* 2010;5:365–383.
13. Silny W, Czarnecka-Operacz M. Rola alergenów powietrzno pochodnych w patomechanizmie atopowego zapalenia skóry. *Terapia.* 2000;4:28-32.
14. Silny W, Czarnecka-Operacz M. Testy skórne w diagnostyce chorób alergicznych. *Post Dermatol Alergol.* 2001;2:80-84.
15. Larsen FS, Holm NV, Henningsen K. Atopic dermatitis. A genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. *J Am Acad Dermatol.* 1986;15(3):487-494.
16. Küster W, Petersen M, Christophers E i wsp. A family study of atopic dermatitis. Clinical and genetic characteristics of 188 patients and 2,151 family members. *Arch Dermatol Res.* 1990;282(2):98-102.
17. Larsen FS, Hanifin JM. Epidemiology of atopic dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2002;22:1-24.
18. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD i wsp. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 2004;113(5):651-657.
19. Grize L, Gassner M, Wüthrich B i wsp. Swiss Surveillance Programme on Childhood Allergy and Respiratory symptoms with respect to Air Pollution (SCARPOL) team. Trends in prevalence of asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis in 5-7-year old Swiss children from 1992 to 2001. *Allergy.* 2006;61(5):556-562.
20. Leung DYM, Rhodes AR, Geha RS, Schneider L i wsp. Atopic dermatitis (atopic eczema). [In:] *Dermatology in general medicine.* Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF (eds). Mc-Graw Hill, New York 1993:1543-1564.

21. Ogawa H. Fundamental pathogenesis of atopic dermatitis and that of alopecia areata. *J Dermatol Sci.* 1990;1:375.
22. Imokawa G, Abe A, Jin K i wsp. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol.* 1991;96(4):523-526.
23. Watanabe M, Tagami H, Horii I i wsp. Functional analyses of the superficial stratum corneum in atopic xerosis. *Arch Dermatol.* 1991;127(11):1689-1692.
24. Ogawa H, Yoshiike T. A speculative view of atopic dermatitis: barrier dysfunction in pathogenesis. *J Dermatol Sci.* 1993;5(3):197-204.
25. Yoshiike T, Aikawa Y, Sindhvananda J i wsp. Skin barrier defect in atopic dermatitis: increased permeability of the stratum corneum using dimethyl sulfoxide and theophylline. *J Dermatol Sci.* 1993;5(2):92-96.
26. Aikawa Y, Yoshiike T. Studies of stratum corneum permeability in normal individuals and patients with atopic dermatitis utilizing a diffusion chamber system. *Jpn J Dermatol.* 1997;107:1473-1478.
27. Leyden JJ, Marples RR, Kligman AM. *Staphylococcus aureus* in the lesions of atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 1974;90(5):525-530.
28. Agner T. Susceptibility of atopic dermatitis patients to irritant dermatitis caused by sodium lauryl sulphate. *Acta Derm Venereol.* 1991;71(4):296-300.
29. Morren MA, Przybilla B, Bamelis M i wsp. Atopic dermatitis: triggering factors. *J Am Acad Dermatol.* 1994;31:467-473.
30. Koblenzer CS. Psychosomatic concepts in dermatology. A dermatologist-psychoanalyst's viewpoint. *Arch Dermatol.* 1983;119(6):501-512.
31. Nickoloff BJ, Naidu Y. Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *J Am Acad Dermatol.* 1994;30(4):535-546.
32. Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:118-127.
33. Hultsch T, Kapp A, Spergel J. Immunomodulation and safety of topical calcineurin inhibitors for the treatment of atopic dermatitis. *Dermatology.* 2005;211(2):174-187.
34. Dzienis K, Tryniszewska E, Kaczmarek M. Zaburzenia równowagi immunologicznej subpopulacji limfocytów Th1 i Th2 oraz rola ich wybranych cytokin w atopowym zapaleniu skóry. *Post Dermatol Alergol.* 2006;2:88-93.
35. Kang K, Stevens SR. Pathophysiology of atopic dermatitis. *Clin Dermatol.* 2003;21(2):116-121.
36. Teresiak E. Udział wybranych neuropeptydów w rozwoju stanu zapalnego skóry u chorych na atopowe zapalenie skóry. Rozprawa doktorska. Poznań 2008.
37. Czarnecka-Operacz M. Sucha skóra jako aktualny problem kliniczny. *Post Dermatol Alergol.* 2006;2:49-56.
38. Szybejko-Machaj G, Machaj Z. Choroby alergiczne skóry. [W:] Choroby alergiczne wieku rozwojowego. Boznański A (red.). PZWL, Warszawa 2003:161-175.
39. Kägi MK, Wüthrich B, Montano E i wsp. Differential cytokine profiles in peripheral blood lymphocyte supernatants and skin biopsies from patients with different forms of atopic dermatitis, psoriasis and normal individuals. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994;103(4):332-340.
40. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet.* 2003;361:151-160.
41. Celedón JC, Soto-Quiros ME, Palmer LJ i wsp. Lack of association between a polymorphism in the interleukin-13 gene and total serum immunoglobulin E level among nuclear families in Costa Rica. *Clin Exp Allergy.* 2002;32(3):387-390.



42. Kędzierska A, Kapińska-Mrowiecka M, Czubak-Macugowska M i wsp. Produkcja cytokin typu Th1 i Th2 przez aktywowane jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry - związek ze stanem klinicznym i kolonizacją skóry przez *Staphylococcus aureus*. *Post Dermatol Alergol*. 2004;4:180-189.
43. Czarnecka-Operacz M. Atopowe zapalenie skóry-współczesne możliwości lecznicze. *Dermatologica*. 2003;6:69-72.
44. Romański R, Bartuzi Z. *Alergia i nietolerancja pokarmów*. Wyd Śląsk, Katowice 2003.
45. Strachan DP. Allergy and family size: a riddle worth solving. *Clin Exp Allergy*. 1997;27:235-236.
46. Gliński W. Patogeneza atopowego zapalenia skóry. *Post Dermatol Alergol*. 2001;2:75-79.
47. Silny W, Czarnecka-Operacz M. Aktualne poglądy na patomechanizm i leczenie atopowego zapalenia skóry. *Acta Pneumonol Allergol Ped*. 2003;6:67-70.
48. Novak N, Peng W, Yu C. Network of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis. *Adv Exp Med Biol*. 2007;601:97-104.
49. Bieber T. The pro- and anti-inflammatory properties of human antigen-presenting cells expressing the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon RI). *Immunobiology*. 2007;212:499-503.
50. Novak N, Valenta R, Bohle B i wsp. FcepsilonRI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(5):949-957.
51. Maintz L, Novak N. Getting more and more complex: the pathophysiology of atopic eczema. *Eur J Dermatol*. 2007;17(4):267-283.
52. Wollenberg A, Wagner M, Günther S i wsp. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol*. 2002;119(5):1096-1102.
53. Novak N, Bieber T, Leung DY. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:128-139.
54. Abramovits W. Atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53:86-93.
55. Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DY. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest*. 1994;94(2):870-876.
56. Werfel T, Kapp A. What do we know about the etiopathology of the intrinsic type of atopic dermatitis? *Curr Probl Dermatol*. 1999;28:29-36.
57. Kiehl P, Falkenberg K, Vogelbruch M i wsp. Tissue eosinophilia in acute and chronic atopic dermatitis: a morphometric approach using quantitative image analysis of immunostaining. *Br J Dermatol*. 2001;145(5):720-729.
58. Akdis CA, Akdis M, Simon D i wsp. T cells and T cell-derived cytokines as pathogenic factors in the nonallergic form of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 1999;113(4):628-634.
59. Jenerowicz D. Wybrane białka eozynofili jako wskaźnik stanu zapalnego u chorych na atopowe zapalenie skóry. *Rozprawa doktorska*. Poznań. 2004.
60. Wüthrich B, Schmid-Grendelmeier P. The atopic eczema/dermatitis syndrome. Epidemiology, natural course, and immunology of the IgE-associated (extrinsic) and the nonallergic („intrinsic”) AEDS. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2003;13:1-5.
61. Williams H, Flohr C. How epidemiology has challenged 3 prevailing concepts about atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(1):209-213.

62. Walker C, Kägi MK, Ingold P i wsp. Clin Exp Allergy. Atopic dermatitis: correlation of peripheral blood T cell activation, eosinophilia and serum factors with clinical severity. 1993;23(2):145-153.
63. Fabrizi G, Romano A, Vultaggio P i wsp. Heterogeneity of atopic dermatitis defined by the immune response to inhalant and food allergens. Eur J Dermatol. 1999;9:380-384.
64. Novembre E, Cianferoni A, Lombardi E i wsp. Natural history of "intrinsic" atopic dermatitis. Allergy. 2001;56(5):452-453.
65. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. Immunol Today. 1997;18(6):263-266.
66. Brehler R, Luger TA. Atopy: immunodeviation and environment. J Allergy Clin Immunol. 1999;104(6):1128-1130.
67. Strannegård O, Strannegård IL. The causes of the increasing prevalence of allergy: is atopy a microbial deprivation disorder? Allergy. 2001;56(2):91-102.
68. Strickland I, Hauk PJ, Trumble AE i wsp. Evidence for superantigen involvement in skin homing of T cells in atopic dermatitis. J Invest Dermatol. 1999;112(2):249-253.
69. Neis MM, Peters B, Dreuw A i wsp. Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2006;118(4):930-937.
70. Chen Q, Carroll HP, Gadina M. The newest interleukins: recent additions to the ever-growing cytokine family. Vitam Horm. 2006;74:216-219.
71. Incorvaia C, Frati F, Verna N i wsp. Allergy and the skin. Clin Exp Immunol. 2008;153:27-29.
72. Venereau E, Diveu C, Grimaud L i wsp. Definition and characterization of an inhibitor for interleukin-31. J Biol Chem. 2010;285(20):14955-14963.
73. Shirakawa I, Deichmann KA, Izuhara I i wsp. Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. Immunol Today. 2000;21(2):60-64.
74. Meagher LJ, Wines NY, Cooper AJ. Atopic dermatitis: review of immunopathogenesis and advances in immunosuppressive therapy. Australas J Dermatol. 2002;43(4):247-254.
75. Wynn TA. IL-13 effector functions. Annu Rev Immunol. 2003;21:425-456.
76. Nomura I, Goleva E, Howell MD i wsp. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. J Immunol. 2003;171(6):3262-3269.
77. Kedzierska A, Kaszuba-Zwoińska J, Słodowska-Hajduk Z i wsp. SEB-induced T cell apoptosis in atopic patients--correlation to clinical status and skin colonization by Staphylococcus aureus. Arch Immunol Ther Exp. 2005;53(1):63-70.
78. Zhang Q, Putheti P, Zhou Q i wsp. Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. Cytokine Growth Factor Rev. 2008;19(5-6):348-356.
79. Leiferman K. A role of eosinophils in atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol. 2001;45:21-24.
80. Leiferman KM, Ackerman SJ, Sampson HA i wsp. Dermal deposition of eosinophil-granule major basic protein in atopic dermatitis. Comparison with onchocerciasis. N Engl J Med. 1985;313(5):282-285.
81. Leiferman K. Eosinophils in atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 1994;94:1310-1317.
82. Simon D, Braathen LR, Simon HU. Eosinophils and atopic dermatitis. Allergy. 2004;59(6):561-570.
83. Hummelshoj T, Bodtger U, Datta P i wsp. Association between an interleukin-13 promoter polymorphism and atopy. Eur J Immunogenet. 2003;30(5):355-359.

84. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(7):521-531.
85. Toda M, Leung DY, Molet S i wsp. Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(4):875-881.
86. Dillon SR, Sprecher C, Hammond A i wsp. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol.* 2004;5(7):752-760.
87. Diveu C, Lak-Hal AH, Froger J i wsp. Predominant expression of the long isoform of GP130-like (GPL) receptor is required for interleukin-31 signaling. *Eur Cytokine Netw.* 2004;15:291–302.
88. Sonkoly E, Muller A, Lauerma AI i wsp. IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(2):411-417.
89. Bilsborough J, Leung DY, Maurer M i wsp. IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(2): 418-425.
90. Dambacher J, Beigel F, Seiderer J i wsp. Interleukin 31 mediates MAP kinase and STAT1/3 activation in intestinal epithelial cells and its expression is upregulated in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2007;56:1257-1265.
91. Kasraie S, Niebuhr M, Werfel T. Interleukin (IL)-31 induces pro-inflammatory cytokines in human monocytes and macrophages following stimulation with staphylococcal exotoxins. *Allergy.* 2010;65(6):712-721.
92. Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T i wsp. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(1):178-189.
93. Wu K, Higashi N, Hansen ER i wsp. Telomerase activity is increased and telomere length shortened in T cells from blood of patients with atopic dermatitis and psoriasis. *J Immunol.* 2000;165(8):4742-4747.
94. Zachary CB, Allen MH, MacDonald DM. In situ quantification of T-lymphocyte subsets and Langerhans cells in the inflammatory infiltrate of atopic eczema. *Br J Dermatol.* 1985;112(2):149-156.
95. Schmid-Ott G, Jaeger B, Adamek C i wsp. Levels of circulating CD8(+) T lymphocytes, natural killer cells, and eosinophils increase upon acute psychosocial stress in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(1):171-177.
96. Santamaria Babi LF, Picker LJ i wsp. Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J Exp Med.* 1995;181(5):1935-1940.
97. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* 1996;272(5258):60-66.
98. Van Beelen AJ, Teunissen MB , Kapsenberg ML i wsp. Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007;7:374-381.
99. Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116:961-968.
100. McGirt LY, Beck LA. Innate immune defects in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(1):202-208.
101. De Benedetto A, Agnihotri R, McGirt LY i wsp. Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? *J Invest Dermatol.* 2009;129(1):14-30.

102. Soumelis V, Liu YJ. Human thymic stromal lymphopoietin: a novel epithelial cell-derived cytokine and a potential key player in the induction of allergic inflammation. *Springer Semin Immunopathol.* 2004;25(3-4):325-333.
103. Wittmann M, Werfel T. Interaction of keratinocytes with infiltrating lymphocytes in allergic eczematous skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2006;6(5):329-334.
104. Albanesi C, Scarponi C, Sebastiani S i wsp. A cytokine-to-chemokine axis between T lymphocytes and keratinocytes can favor Th1 cell accumulation in chronic inflammatory skin diseases. *J Leukoc Biol.* 2001;70(4):617-623.
105. Han GW, Iwatsuki K, Inoue M i wsp. Interleukin-15 is not a constitutive cytokine in the epidermis, but is inducible in culture or inflammatory conditions. *Acta Derm Venereol.* 1999;79(1):37-40.
106. Robert C, Kupper TS. Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med.* 1999;341(24):1817-1828.
107. Howell MD, Boguniewicz M, Pastore S i wsp. Mechanism of HBD-3 deficiency in atopic dermatitis. *Clin Immunol.* 2006;121(3):332-338.
108. Ong PY, Ohtake T, Brandt C i wsp. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 2002;347(15):1151-1160.
109. Howell MD, Jones JF, Kisich KO i wsp. Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum. *J Immunol.* 2004;172(3):1763-1767.
110. Ahmad-Nejad P, Mrabet-Dahbi S, Breuer K i wsp. The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113(3):565-567.
111. Mrabet-Dahbi S, Dalpke AH, Niebuhr M i wsp. The Toll-like receptor 2 R753Q mutation modifies cytokine production and Toll-like receptor expression in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(4):1013-1019.
112. Hasannejad H, Takahashi R, Kimishima M i wsp. Selective impairment of Toll-like receptor 2-mediated proinflammatory cytokine production by monocytes from patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(1):69-75.
113. Niebuhr M, Lutat C, Sigel S i wsp. Impaired TLR-2 expression and TLR-2-mediated cytokine secretion in macrophages from patients with atopic dermatitis. *Allergy.* 2009;64(11):1580-1587.
114. Gliński W, Kruszewski J, Silny W i wsp. Postępowanie diagnostyczno-profilaktyczne w atopowym zapaleniu skóry. *Pol Merk Lek.* 2004;17:3-15.
115. Breuer K, Wittmann M, Börsche B i wsp. Severe atopic dermatitis is associated with sensitization to staphylococcal enterotoxin B (SEB). *Allergy.* 2000;55(6):551-555.
116. Hauk PJ, Hamid QA, Chrousos GP i wsp. Induction of corticosteroid insensitivity in human PBMCs by microbial superantigens. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(4):782-787.
117. Elias PM, Wood LC, Feingold KR. Epidermal pathogenesis of inflammatory dermatoses. *Am J Contact Dermat.* 1999;10(3):119-126.
118. Taïeb A. Hypothesis: from epidermal barrier dysfunction to atopic disorders. *Contact Dermatitis.* 1999;41(4):177-180.
119. Novak N, Allam JP, Bieber T. Allergic hyperreactivity to microbial components: a trigger factor of "intrinsic" atopic dermatitis? *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(1):215-216.
120. Leung DY. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(5):860-876.
121. Schäfer L, Kragballe K. Abnormalities in epidermal lipid metabolism in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 1991;96(1):10-15.

122. Goldstein M, Abramovits W. Ceramides and the stratum corneum: structure,function, and new methods to promote repair. *J Invest Dermatol.* 2003;42:256-259.
123. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A i wsp. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet.* 2006;38(4):441-446.
124. O'Regan GM, Irvine AD. The role of filaggrin loss-of-function mutations in atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008;8(5):406-410.
125. Brown SJ, McLean WH. Eczema genetics: current state of knowledge and future goals. *J Invest Dermatol.* 2009;129(3):543-552.
126. Kowalewski Cezary. Budowa i czynność bariery naskórkowej i jej zaburzenia w atopowym zapaleniu skóry. III Zimowe Warsztaty Sekcji Dermatologicznej PTA.
127. Elias P. Skin barrier function. *Curr Allergy and Asthma Rep.* 2008;8:299-305.
128. Brattsand M, Stefansson K, Lundh C i wsp. A proteolytic cascade of kallikreinsin the stratum corneum. *J Invest Dermatol.* 2005;124:198- 400.
129. Jung T, Stingl G. Atopic dermatitis: therapeutic concepts evolving from new pathophysiologic insights. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(6):1074-1081.
130. Silny W, Czarnecka-Operacz M. Alergeny powietrzno pochodne i ich znaczenie w powstawaniu zmian skórnych u chorych na atopowe zapalenie skóry. *Alergia Asthma Immunol.* 2001;6:81-85.
131. Cork MJ, Robinson DA, Vasilopoulos Y i wsp. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(1):3-21.
132. Balińska-Miśliwicz W. Atopowe zapalenie skóry-obraz kliniczny, patomechanizm i postępowanie terapeutyczne. *Farmacja Polska.* 2008;10:443-452.
133. Werfel T, Breuer K. Role of food allergy in atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004;4(5):379-385.
134. Valenta R, Mittermann I, Werfel T i wsp. Linking allergy to autoimmune disease. *Trends Immunol.* 2009;30(3):109-116.
135. Mothes N, Niggemann B, Jenneck C i wsp. The cradle of IgE autoreactivity in atopic eczema lies in early infancy. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116(3):706-709.
136. Heratizadeh A, Mittermann I, Balaji H i wsp. The role of T-cell reactivity towards the autoantigen  $\alpha$ -NAC in atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2011;164(2):316-324.
137. Wahlgren CF. Itch and atopic dermatitis: an overview. *J Dermatol.* 1999;26(11):770-779.
138. Stander S, Steinhof M. Pathophysiology of pruritus In atopic dermatitis: an overview. *Exp Dermatol.* 2002;11:12-24.
139. Yosipovitch G, Greaves MW, Schmelz M. Itch. *Lancet.* 2003;361(9358):690-694.
140. Schulz F, Marenholz I, Fölster-Holst R i wsp. A common haplotype of the IL-31 gene influencing gene expression is associated with nonatopic eczema. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(5):1097-1102.
141. Finlay AY. Quality of life in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45:64-66.
142. Ring J. Allergy in practice. Springer. Berlin 2005.
143. Darsow U, Pfab F, Valet M i wsp. Pruritus and atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011;41(3):237-244.
144. Kimura T, Miyazawa H. The 'butterfly' sign in patients with atopic dermatitis: evidence for the role of scratching in the development of skin manifestations. *J Am Acad Dermatol.* 1989;21:579-580.
145. Koblenzer CS. Itching and the atopic skin. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104:109-113.

146. Konishi H, Tsutsui H, Murakami T i wsp. IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(17):11340-11345.
147. Czarnecka-Operacz M. Atopowe zapalenie skóry-aktualna wiedza w zakresie zjawisk immunologicznych i możliwości terapeutycznych. *Przeegl Dermatol*. 2009;96:145.
148. Ständer S, Luger TA. Itch in atopic dermatitis - pathophysiology and treatment. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2010;18(4):289-296.
149. Szepietowski J, Reich A. Świąd. Patomechanizm, klinika, leczenie. Termedia Wydawnictwa Medyczne, Poznań 2010:45-69.
150. Tobin D, Nabarro G, Baart de la Faille H i wsp. Increased number of immunoreactive nerve fibers in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1992;90:613-622.
151. Sugiura H, Omoto M, Hirota Y i wsp. Density and fine structure of peripheral nerves in various skin lesions of atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res*. 1997;289(3):125-131.
152. Urashima R, Mihara M. Cutaneous nerves in atopic dermatitis. A histological, immunohistochemical and electron microscopic study. *Virchows Arch*. 1998;432(4):363-370.
153. Takano N, Sakurai T, Kurachi M. Effects of anti-nerve growth factor antibody on symptoms in the NC/Nga mouse, an atopic dermatitis model. *J Pharmacol Sci*. 2005;99(3):277-286.
154. Dou YC, Hagströmer L, Emtestam L i wsp. Increased nerve growth factor and its receptors in atopic dermatitis: an immunohistochemical study. *Arch Dermatol Res*. 2006;298(1):31-37.
155. Pincelli C, Fantini F, Massimi P i wsp. Neuropeptides in skin from patients with atopic dermatitis: an immunohistochemical study. *Br J Dermatol*. 1990; 129:2901-2905.
156. Toyoda M, Nakamura M, Makino T i wsp. Nerve growth factor and substance P are useful plasma markers of disease activity in atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2002;147(1):71-79.
157. Andoh T, Nagasawa T, Satoh M i wsp. Substance P induction of itch-associated response mediated by cutaneous NK1 tachykinin receptors in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;286(3):1140-1145.
158. Andoh T, Katsube N, Maruyama M i wsp. Involvement of leukotriene B(4) in substance P-induced itch-associated response in mice. *J Invest Dermatol*. 2001;117(6):1621-1626.
159. Wahlgren CF, Hägermark O, Bergström R. The antipruritic effect of a sedative and a non-sedative antihistamine in atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 1990;122(4):545-551.
160. Chan LS, Robinson N, Xu L. Expression of interleukin-4 in the epidermis of transgenic mice results in a pruritic inflammatory skin disease: an experimental animal model to study atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2001;117(4):977-983.
161. Konishi H, Tsutsui H, Murakami T i wsp. IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(17):11340-11345.
162. Greaves MW, Khalifa N. Itch: more than skin deep. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;135(2):166-172.
163. Gaspari AA, Lotze MT, Rosenberg SA i wsp. Dermatologic changes associated with interleukin 2 administration. *JAMA*. 1987;258(12):1624-1629.
164. Cremer B, Heimann A, Dippel E, Czarnetzki BM. Pruritogenic effects of mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells in atopic eczema. *Acta Derm Venereol*. 1995;75(6):426-428.

165. Nordlind K, Chin LB, Ahmed AA i wsp. Immunohistochemical localization of interleukin-6-like immunoreactivity to peripheral nerve-like structures in normal and inflamed human skin. *Arch Dermatol Res.* 1996;288(8):431-435.
166. Bender BG, Ballard R, Canono B i wsp. Disease severity, scratching, and sleep quality in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2008;58(3):415-420.
167. Kimata H, Lindley I. Detection of plasma interleukin-8 in atopic dermatitis. *Arch Dis Child.* 1994;70(2):119-122.
168. Takaoka A, Arai I, Sugimoto M i wsp. Expression of IL-31 gene transcripts in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *Eur J Pharmacol.* 2005;516(2):180-181.
169. Williams DH. Skin temperature reaction to histamine in atopic dermatitis (disseminated neurodermatitis). *J Invest Dermatol.* 1938;1:119-129.
170. Johnson HH, DeOreo GA, Laschied WP i wsp. Skin histamine levels in chronic atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 1960;34:237-238.
171. Juhlin L. Localization and content of histamine in normal and diseased skin. *Acta Derm Venereol.* 1967; 47:383-391.
172. Hanifin JM. The role of antihistamines in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1990;86:666-669.
173. Langeland T, Fagertun HE, Larsen S. Therapeutic effect of loratadine on pruritus in patients with atopic dermatitis. A multi-crossover-designed study. *Allergy.* 1994;49(1):22-26.
174. Inagaki N, Nagao M, Igeta K i wsp. Scratching behavior in various strains of mice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2001;14(2):87-96.
175. Takano N, Arai I, Hashimoto Y i wsp. Evaluation of antipruritic effects of several agents on scratching behavior by NC/Nga mice. *Eur J Pharmacol.* 2004;495(2-3):159-165.
176. Hashimoto Y, Takano N, Nakamura A i wsp. Scratching behaviour in NC/Nga mice with dermatitis: involvement of histamine-induced itching. *Allergy International.* 2004;53:349-358.
177. Maekawa T, Yamaguchi-Miyamoto, Nojima H i wsp. Effects of Naltrexone on Spontaneous Itch-Associated Responses in NC Mice with chronic dermatitis. *Jpn. J. Pharmacol.* 2002;90:193-196.
178. Klein PA, Clark RA. An evidence-based review of the efficacy of antihistamines in relieving pruritus in atopic dermatitis. *Arch Dermatol.* 1999;135(12):1522-1525.
179. Heyer G, Koppert W, Martus P i wsp. Histamine and cutaneous nociception: histamine-induced responses in patients with atopic eczema, psoriasis and urticaria. *Acta Derm Venereol.* 1998;78(2):123-126.
180. Silny W, Gliński W, Czarnecka-Operacz M i wsp. Leki przeciwhistaminowe w terapii dermatologicznej. [W:] *Leki przeciwhistaminowe. Zastosowanie w praktyce medycznej.* Górski P, Grzelewska-Rzymowska I, Kruszewski J (red.). Wydanie II. The UCB Institute of Allergy, Bruksela 2005:101-121.
181. Dijkstra D, Stark H, Chazot PL i wsp. Human inflammatory dendritic epidermal cells express a functional histamine H4 receptor. *J Invest Dermatol.* 2008;128(7):1696-1703.
182. Rossbach K, Wendorff S, Sander K i wsp. Histamine H4 receptor antagonism reduces hapten-induced scratching behaviour but not inflammation. *Exp Dermatol.* 2009;18(1):57-63.
183. Gutzmer R, Mommert S, Gschwandtner M i wsp. The histamine H4 receptor is functionally expressed on T(H)2 cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(3):619-625.
184. Wahlgren CF. Itch and atopic dermatitis: clinical and experimental studies. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh).* 1991;165:1-53.

185. Hägermark O, Wahlgren CF. Some methods for evaluating clinical itch and their application for studying pathophysiological mechanisms. *J Dermatol Sci.* 1992;4(2):55-62.
186. Fantini F, Pincelli C, Romualdi P i wsp. Substance P levels are decreased in lesional skin of atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* 1992;1(3):127-128.
187. Heyer G, Hornstein OP, Handwerker HO. Reactions to intradermally injected substance P and topically applied mustard oil in atopic dermatitis patients. *Acta Derm Venereol.* 1991;71(4):291-295.
188. Sugimoto M, Arai I, Futaki N i wsp. Increased scratching counts depend on a decrease in ability of cutaneous prostaglandin D2 biosynthesis in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* 2005;14(12):898-905.
189. Takaoka A, Arai I, Sugimoto M i wsp. Role of scratch-induced cutaneous prostaglandin D production on atopic-like scratching behaviour in mice. *Exp Dermatol.* 2007;16:331-339.
190. Arai I, Takano N, Hashimoto Y i wsp. Prostanoid DP1 receptor agonist inhibits the pruritic activity in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *Eur J Pharmacol.* 2004;505(1-3):229-235.
191. Steinhoff M, Ständer S, Seliger S i wsp. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol.* 2003;139:1479-1488.
192. Kanda N, Koike S, Watanabe S. Prostaglandin E2 enhances neurotrophin-4 production via EP3 receptor in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;315(2):796-804.
193. Grewe M, Vogelsang K, Ruzicka T i wsp. Neurotrophin-4 production by human epidermal keratinocytes: increased expression in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2000;114(6):1108-1112.
194. Zegarska B, Lelińska A, Tyrakowski T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Pharmacol Rep.* 2006;58:13-21.
195. Ständer S, Steinhoff M, Schmelz M i wsp. Neurophysiology of pruritus: cutaneous elicitation of itch. *Arch Dermatol.* 2003;139(11):1463-1470.
196. Hamid Q, Naseer T, Minshall EM i wsp. In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98(1):225-231.
197. Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CA, Schöpf E i wsp. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today.* 1998;19(8):359-361.
198. Stante M, Hanna D, Lotti T. Itch, pain, and metaesthetic sensation. *Dermatol Ther.* 2005;18(4):308-313.
199. Raap U, Goltz C, Deneka N i wsp. Brain-derived neurotrophic factor is increased in atopic dermatitis and modulates eosinophil functions compared with that seen in nonatopic subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(6):1268-1275.
200. Takaoka A, Arai I, Sugimoto M i wsp. Involvement of IL-31 on scratching behavior in NC/Nga mice with atopic-like dermatitis. *Exp Dermatol.* 2006;15(3):161-167.
201. Grimstad O, Sawanobori Y, Vestergaard C i wsp. Anti-interleukin-31-antibodies ameliorate scratching behaviour in NC/Nga mice: a model of atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* 2009;18(1):35-43.
202. Martin HA. Bradykinin potentiates the chemoresponsiveness of rat cutaneous C-fibre polymodal nociceptors to interleukin-2. *Arch Physiol Biochem.* 1996;104(2):229-238.
203. Darsow U, Scharein E, Bromm B i wsp. Skin testing of the pruritogenic activity of histamine and cytokines (interleukin-2 and tumour necrosis factor-alpha) at the dermal-epidermal junction. *Br J Dermatol.* 1997;137(3):415-417.
204. Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W. *Immunologia.* Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa 2008:108-130.



205. Conti P, Youinou P, Theoharides TC. Modulation of autoimmunity by the latest interleukins (with special emphasis on IL-32). *Autoimmun Rev.* 2007;6(3):131-137.
206. Ghilardi N, Li J, Hongo JA i wsp. A novel type I cytokine receptor is expressed on monocytes, signals proliferation, and activates STAT-3 and STAT-5. *J Biol Chem.* 2002;277:16831-16836.
207. Diveu C, Lelievre E, Perret D i wsp. GPL, a novel cytokine receptor related to GP130 and leukemia inhibitory factor receptor. *J Biol Chem.* 2003;278:49850-49859.
208. Dreuw A, Radtke S, Pflanz S i wsp. Characterization of the signaling capacities of the novel gp130-like cytokine receptor. *J Biol Chem.* 2004;279(34):36112-36120.
209. Boulay JL, O'Shea JJ, Paul WE. Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. *Immunity.* 2003;19(2):159-163.
210. Heise R, Neis MM, Marquardt Y i wsp. IL-31 receptor alpha expression in epidermal keratinocytes is modulated by cell differentiation and interferon gamma. *J Invest Dermatol.* 2009;129(1):240-243.
211. Broxmeyer HE, Li J, Hangoc G i wsp. Regulation of myeloid progenitor cell proliferation/survival by IL-31 receptor and IL-31. *Exp Hematol.* 2007;35:78-86.
212. Metz S, Naeth G, Heinrich PC i wsp. Novel inhibitors for murine and human leukemia inhibitory factor based on fused soluble receptors. *J Biol Chem.* 2008;283(10):5985-5995.
213. Grötzinger J. Molecular mechanisms of cytokine receptor activation. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1592(3):215-223.
214. Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ i wsp. The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science.* 1992;255:1434-1437.
215. Le Saux S, Rousseau F, Barbier F i wsp. Molecular dissection of human interleukin-31-mediated signal transduction through site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 2010;285(5):3470-3477.
216. Cornelissen C, Marquardt Y, Czaja K i wsp. IL-31 regulates differentiation and filaggrin expression in human organotypic skin models. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(2):426-433.
217. Cornelissen C, Lüscher-Firzlaff J, Baron JM i wsp. Signaling by IL-31 and functional consequences. *Eur J Cell Biol.* 2012;91(6-7):552-566.
218. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S i wsp. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003;374:1-20.
219. Hintzen C, Evers C, Lippok BE i wsp. Box 2 region of the oncostatin M receptor determines specificity for recruitment of Janus kinases and STAT5 activation. *J. Biol. Chem.* 2008;283:19465-19477.
220. Hermanns HM, Radtke S, Schaper F i wsp. Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines. The adapter protein Shc is specifically recruited to the oncostatin M receptor. *J. Biol. Chem.* 2000;275:40742-40748.
221. Tong L, Smyth D, Kerr C i wsp. Mitogen-activated protein kinases Erk1/2 and p38 are required for maximal regulation of TIMP-1 by oncostatin M in murine fibroblasts. *Cell. Signall.* 2004;16:1123-1132.
222. Wang, Y, Robledo O, Kinzie E i wsp. Receptor subunit-specific action of oncostatin M in hepatic cells and its modulation by leukemia inhibitory factor. *J. Biol. Chem.* 2000;275:25273-25285.
223. Böing I, Stross C, Radtke S i wsp. Oncostatin M-induced activation of stress-activated MAP kinases depends on tyrosine 861 in the OSM receptor and requires Jak1 but not Src kinases. *Cell Signall.* 2006;18(1):50-61.

224. Tanaka M, Hirabayashi Y, Sekiguchi T i wsp. Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood*. 2003;102:315-3162.
225. Diveu C, Venereau E, Froger J i wsp. Molecular and functional characterization of a soluble form of oncostatin M/interleukin-31 shared receptor. *J Biol Chem*. 2006;281(48):36673-3682.
226. Ip WK, Wong CK, Li ML i wsp. Interleukin-31 induces cytokine and chemokine production from human bronchial epithelial cells through activation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways: implications for the allergic response. *Immunology*. 2007;122(4):532-554.
227. Wells AD. New insights into the molecular basis of T cell anergy: anergy factors, avoidance sensors, and epigenetic imprinting. *J Immunol*. 2009;182(12):7331-7341.
228. Harrison DA, McCoon PE, Binari R i wsp. *Drosophila* unpaired encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes Dev*. 1998;12:3252-3263.
229. Hombria JC, Brown S. The fertile field of *Drosophila* Jak/STAT signalling. *Curr Biol*. 2002;12:569–575.
230. Bando T, Morikawa Y, Komori T i wsp. Complete overlap of interleukin-31 receptor A and oncostatin M receptor beta in the adult dorsal root ganglia with distinct developmental expression patterns. *Neuroscience*. 2006;142(4):1263-1271.
231. Tamura S, Morikawa Y, Miyajima A i wsp. Expression of oncostatin M receptor beta in a specific subset of nociceptive sensory neurons. *Eur J Neurosci*. 2003;17(11):2287-2298.
232. Chattopadhyay S, Tracy E, Liang P i wsp. Interleukin-31 and oncostatin-M mediate distinct signaling reactions and response patterns in lung epithelial cells. *J Biol Chem*. 2007;282(5):3014-3026.
233. Feld M, Shpacovitch VM, Fastrich M i wsp. Interferon- $\gamma$  induces upregulation and activation of the interleukin-31 receptor in human dermal microvascular endothelial cells. *Exp Dermatol*. 2010;19(10):921-923.
234. Cornelissen C, Brans R, Czaja K i wsp. Ultraviolet B (UVB) radiation and reactive oxygen species (ROS) modulate IL-31 expression in T-lymphocytes, monocytes and dendritic cells. *Br J Dermatol*. 2011;165(5):966-975.
235. Niyonsaba F, Ushio H, Hara M i wsp. Antimicrobial peptides human beta-defensins and cathelicidin LL-37 induce the secretion of a pruritogenic cytokine IL-31 by human mast cells. *J Immunol*. 2010;184(7):3526-3534.
236. Pflanz S, Hibbert L, Mattson J i wsp. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol*. 2004;172:2225–2231.
237. Shi Y, Wang W, Yourey PA i wsp. Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;262:132–138.
238. Elson GC, Lelievre E, Guillet C i wsp. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci*. 2000;3:867-872.
239. Senaldi G, Varnum BC, Sarmiento U i wsp. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:11458-11463.
240. Hibi M, Murakami M, Saito M i wsp. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*. 1990;63(6):1149-1157.
241. Derouet D, Rousseau F, Alfonsi F i wsp. Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:4827-4832.
242. Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G i wsp. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*. 1998;334:297-314.

243. Ancey C, Küster A, Haan S i wsp. A fusion protein of the gp130 and interleukin-6/Ralpha ligand-binding domains acts as a potent interleukin-6 inhibitor. *J Biol Chem.* 2003;278(19):16968-16972.
244. Metz S, Wiesinger M, Vogt M i wsp. Characterization of the Interleukin (IL)-6 Inhibitor IL-6-RFP: fused receptor domains act as high affinity cytokine-binding proteins. *J Biol Chem.* 2007;282(2):1238-1248.
245. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:797–819.
246. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(18):6934-6938.
247. Bravo J, Staunton D, Heath J i wsp. Crystal structure of a cytokine-binding region of gp130. *Embo J.* 1998;17:1665–1674.
248. Boulanger MJ, Bankovich AJ, Kortemme T i wsp. Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130. *Mol Cell.* 2003;12:577-589.
249. Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE i wsp. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science.* 2003;300:2101-2104.
250. Hammacher A, Richardson RT, Layton JE i wsp. The immunoglobulin-like module of gp130 is required for signaling by interleukin-6, but not by leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem.* 1998;273:22701–22707.
251. Aasland D, Oppmann B, Grotzinger J i wsp. The upper cytokine-binding module and the Ig-like domain of the leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor are sufficient for a functional LIF receptor complex. *J Mol Biol.* 2002;315:637–646.
252. Plun-Favreau H, Perret D, Diveu C i wsp. Leukemia inhibitory factor (LIF), cardiotrophin-1, and oncostatin M share structural binding determinants in the immunoglobulin-like domain of LIF receptor. *J Biol Chem.* 2003;278:27169-27179.
253. Goldsmith MA, Xu W, Amaral MC i wsp. The cytoplasmic domain of the interleukin-2 receptor beta chain contains both unique and functionally redundant signal transduction elements. *J Biol Chem.* 1994;269(20):14698-14704.
254. Lebrun JJ, Ali S, Ullrich A i wsp. Proline-rich sequence-mediated Jak2 association to the prolactin receptor is required but not sufficient for signal transduction. *J Biol Chem.* 1995;270(18):10664-10670.
255. Tanner JW, Chen W, Young RL i wsp. The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *J Biol Chem.* 1995;270(12):6523-6230.
256. Fukada T, Hibi M, Yamanaka Y i wsp. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity.* 1996;5:449-460.
257. Kasraie S, Niebuhr M, Baumert K i wsp. Functional effects of interleukin 31 in human primary keratinocytes. *Allergy.* 2011;66(7):845-852.
258. Shuai K, Liu B. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:593-605.
259. Chung CD, Liao J, Liu B i wsp. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science.* 1997;278:1803-1805.
260. Liu B, Liao J, Rao X i wsp. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:10626–10631.
261. Liu B, Gross M, ten Hoeve J i wsp. A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:3203-3207.
262. Perrigoue JG, Li J, Zaph C i wsp. IL-31-IL-31R interactions negatively regulate type 2 inflammation in the lung. *J Exp Med.* 2007;204(3):481-487.

263. Castellani ML, Salini V, Frydas S i wsp. Interleukin-31: a new cytokine involved in inflammation of the skin. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2006;19(1):1-4.
264. Castellani ML, Felaco P, Galzio RJ i wsp. IL-31 a Th2 cytokine involved in immunity and inflammation. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010;23(3):709-713.
265. Castellani ML, Felaco P, Pandolfi F i wsp. Inflammatory compounds: neuropeptide substance P and cytokines. *Eur J Inflamm.* 2009;7:63-70.
266. Cheung PF, Wong CK, Ho AW i wsp. Activation of human eosinophils and epidermal keratinocytes by Th2 cytokine IL-31: implication for the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Int Immunol.* 2010;22(6):453-467.
267. Ayimba E, Hegewald J, Ségbéna AY i wsp. Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol.* 2011;166(2):218-226.
268. Perrigoue JG, Zaph C, Guild K i wsp. IL-31-IL-31R interactions limit the magnitude of Th2 cytokine-dependent immunity and inflammation following intestinal helminth infection. *J Immunol.* 2009;182(10):6088-6094.
269. Yagi Y, Andoh A, Nishida A i wsp. Interleukin-31 stimulates production of inflammatory mediators from human colonic subepithelial myofibroblasts. *Int J Mol Med.* 2007;19(6):941-946.
270. Miyajima A, Kinoshita T, Tanaka M i wsp. Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11(3):177-183.
271. Broxmeyer HE, Bruns HA, Zhang S i wsp. Th1 cells regulate hematopoietic progenitor cell homeostasis by production of oncostatin M. *Immunity.* 2002;16(6):815-825.
272. Shaheen M, Broxmeyer HE. The humoral regulation of hematopoiesis. [In:] *Hematology: Basic Principles and Practice*, 4th ed. Hoffman R, Benz E, Shattil S i wsp (eds). Philadelphia: Churchill Livingstone 2005:233–266.
273. Murray PJ, Young RA, Daley GQ. Hematopoietic remodeling in interferon-gamma-deficient mice infected with mycobacteria. *Blood.* 1998;91(8):2914-2924.
274. Lei Z, Liu G, Huang Q i wsp. SCF and IL-31 rather than IL-17 and BAFF are potential indicators in patients with allergic asthma. *Allergy.* 2008;63(3):327-332.
275. Jawa RS, Chattopadhyay S, Tracy E i wsp. Regulated expression of the IL-31 receptor in bronchial and alveolar epithelial cells, pulmonary fibroblasts, and pulmonary macrophages. *J Interferon Cytokine Res.* 2008;28(4):207-219.
276. Wüthrich B. What is atopy? Condition, disease or a syndrome? *Curr Probl Dermatol.* 1999;28:1-8.
277. Cserháti E. Current view on the etiology of childhood bronchial asthma. *Orv Hetil.* 2000;141:759-760.
278. Babey SH, Meng YY, Brown ER i wsp. Nearly six million Californians suffer from asthma symptoms or asthma-like breathing problems. *Policy Brief UCLA Cent Health Policy Res.* 2006;(5):1-7.
279. Fernández C, Cárdenas R, Martín D i wsp. Analysis of skin testing and serum-specific immunoglobulin E to predict airway reactivity to cat allergens. *Clin Exp Allergy.* 2007;37(3):391-399.
280. Amishima M, Munakata M, Nasuhara Y i wsp. Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor immunoreactivity in the asthmatic human airway. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:1907-1912.
281. Romagnani S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Mol Immunol.* 2002;38(12-13):881-885.
282. Okano M, Fujiwara T, Higaki T i wsp. Characterization of pollen antigen-induced IL-31 production by PBMCs in patients with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(1):277-279.

283. Andoh A, Yagi Y, Shioya M i wsp. Mucosal cytokine network in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(33):5154-5161.
284. Brand S, Beigel F, Olszak T i wsp. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(4):827-838.
285. Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M i wsp. Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat Rev Genet*. 2005;6(5):376-388.
286. Söderhäll C, Marenholz I, Kerscher T i wsp. Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLoS Biol*. 2007;5(9):242.
287. Zucchelli M, Torkvist L, Bresso F i wsp. No association between the eczema genes COL29A1 and IL31 and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(7):961-962.
288. Raap U, Wieczorek D, Gehring M. Increased levels of serum IL-31 in chronic spontaneous urticaria. *Exp Dermatol*. 2010;19(5):464-466.
289. Park K, Mori T, Nakamura M i wsp. Increased expression of mRNAs for IL-4, IL-17, IL-22 and IL-31 in skin lesions of subacute and chronic forms of prurigo. *Eur J Dermatol*. 2011;21:135-136.
290. Wallengren J. Prurigo: diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol*. 2004;5(2):85-95.
291. Nagy N, Tanaka A, Techanukul T i wsp. Common IL-31 gene haplotype associated with non-atopic eczema is not implicated in epidermolysis bullosa pruriginosa. *Acta Derm Venereol*. 2010;90(6):631-632.
292. Mellerio JE, Ashton GH, Mohammedi R i wsp. Allelic heterogeneity of dominant and recessive COL7A1 mutations underlying epidermolysis bullosa pruriginosa. *J Invest Dermatol*. 1999;112(6):984-987.
293. Almaani N, Liu L, Harrison N i wsp. New glycine substitution mutations in type VII collagen underlying epidermolysis bullosa pruriginosa but the phenotype is not explained by a common polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 gene promoter. *Acta Derm Venereol*. 2009;89(1):6-11.
294. Lin MW, Lee DD, Liu TT i wsp. Novel IL31RA gene mutation and ancestral OSMR mutant allele in familial primary cutaneous amyloidosis. *Eur J Hum Genet*. 2010;18(1):26-32.
295. Arita K, South AP, Hans-Filho G i wsp. Oncostatin M receptor-beta mutations underlie familial primary localized cutaneous amyloidosis. *Am J Hum Genet*. 2008;82(1):73-80.
296. Hon KL, Leung AK. Alopecia areata. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2011;5(2):98-107.
297. Uehara M, Izukura R, Sawai T. Blood eosinophilia in atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol*. 1990;15(4):264-266.
298. Wardlaw A. Eosinophil trafficking: new answers to old questions. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(5):676-679.
299. Wong CK, Li ML, Wang CB i wsp. House dust mite allergen Der p 1 elevates the release of inflammatory cytokines and expression of adhesion molecules in co-culture of human eosinophils and bronchial epithelial cells. *Int Immunol*. 2006;18(8):1327-1335.
300. Lacy P, Moqbel R. Eosinophil cytokines. *Chem Immunol*. 2000;76:134-155.
301. Wong CK, Lam CW. Clinical applications of cytokine assays. *Adv Clin Chem*. 2003;37:1-46.

302. Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K i wsp. Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesiogenic agents in mice. *Eur J Pharmacol.* 1995;275(3):229-233.
303. Kondo K, Nagami T, Teramoto S. Differences in haematopoietic Heath among inbred strains of mice. [In:] *Comparative Cellular and Species Radiosensitivity.* Bond PV and Sugahara T (eds). Igakushoin, Tokyo 1969:20.
304. Festing MF. *Inbred strains in Biomedical Research.* Macmillan, London 1979.
305. Matsuda H, Watanabe N, Geba GP i wsp. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol.* 1997;9(3):461-466.
306. Suto H, Matsuda H, Mitsuishi K i wsp. NC/Nga mice: a mouse model for atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999;(120):70-75.
307. Vestergaard C, Yoneyama H, Matsushima K. The NC/Nga mouse: a model for atopic dermatitis. *Mol Med Today.* 2000;6(5):209-210.
308. Morita E, Kaneko S, Hiragun T i wsp. Fur mites induce dermatitis associated with IgE hyperproduction in an inbred strain of mice, NC/Kuj. *J Dermatol Sci.* 1999;19(1):37-43.
309. Aioi A, Tonogaito H, Suto H i wsp. Impairment of skin barrier function in NC/Nga Tnd mice as a possible model for atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2001;144(1):12-18.
310. Takano N, Arai I, Kurachi M. Analysis of the spontaneous scratching behavior by NC/Nga mice: a possible approach to evaluate antipruritics for subjects with atopic dermatitis. *Eur J Pharmacol.* 2003;471(3):223-228.
311. Takahashi N, Arai I, Honma Y i wsp. Scratching behavior in spontaneous- or allergic contact-induced dermatitis in NC/Nga mice. *Exp Dermatol.* 2005;14(11):830-837.
312. Mizuno T, Kanbayashi S, Okawa T i wsp. Molecular cloning of canine interleukin-31 and its expression in various tissues. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;131(1-2):140-143.
313. Raap U, Wichmann K, Bruder M i wsp. Correlation of IL-31 serum levels with severity of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(2):421-423.
314. Otsuka A, Tanioka M, Nakagawa Y i wsp. Effects of cyclosporine on pruritus and serum IL-31 levels in patients with atopic dermatitis. *Eur J Dermatol.* 2011;21(5):816-817.
315. Ezzat MH, Hasan ZE, Shaheen KY. Serum measurement of interleukin-31 (IL-31) in paediatric atopic dermatitis: elevated levels correlate with severity scoring. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25(3):334-339.
316. Kim S, Kim HJ, Yang HS i wsp. IL-31 Serum Protein and Tissue mRNA Levels in Patients with Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol.* 2011;23(4):468-473.
317. Gambichler T, Kreuter A, Tomi NS i wsp. Gene expression of cytokines in atopic eczema before and after ultraviolet A1 phototherapy. *Br J Dermatol.* 2008;158(5):1117-1120.
318. Nobbe S, Dziunycz P, Mühleisen B i wsp. IL-31 expression by inflammatory cells is preferentially elevated in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 2012;92(1):24-28.
319. Niebuhr M, Mamerow D, Heratizadeh A i wsp. Staphylococcal  $\alpha$ -toxin induces a higher T cell proliferation and interleukin-31 in atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011;156(4):412-415.
320. Silny W, Czarnecka-Operacz M, Gołębka E i wsp. Punktowy wskaźnik oceny stanu klinicznego u chorych na atopowe zapalenie skóry. *Przegl Dermatol.* 1999;3:215-222.
321. Hanifin JM, Thurston M, Omoto M i wsp. The eczema area and severity index (EASI): assessment of reliability in atopic dermatitis. EASI Evaluator Group. *Exp Dermatol.* 2001;10(1):11-18.

322. Cherill R, Graeber M, Hanifin J i wsp. Eczema area and severity index (EASI): A new tool to evaluate atopic dermatitis [abstract]. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 1998;11:48.
323. Parwaresch MR, Walle AJ, Arndt D. The peripheral kinetics of human radiolabelled eosinophils. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 1976;(1):57-66.
324. Chomczyński P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162:156-159.
325. [www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)
326. Gliński W, Rudzki E. *Alergologia dla lekarzy dermatologów.* Czelej, Lublin 2000:411-483.
327. Bannister MJ, Freeman S. Adult-onset atopic dermatitis. *Australas J Dermatol.* 2000;41:225-228.
328. Tischendorf FW, Brattig NW, Büttner DW i wsp. Serum levels of eosinophil cationic protein, eosinophil-derived neurotoxin and myeloperoxidase in infections with filariae and schistosomes. *Acta Trop.* 1996;62:171-182.
329. Rystedt I. Prognostic factors in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 1985;65:206-213.
330. Wedi B, Raap U, Lewrick H i wsp. Delayed eosinophil programmed cell death in vitro: a common feature of inhalant allergy and extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100:536-543.
331. Cabon N, Ducombs G, Mortureux P i wsp. Contact allergy to aeroallergens in children with atopic dermatitis: comparison with allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis.* 1996;35:27-32.
332. Opiel T, Schuller E, Günther S i wsp. Phenotyping of epidermal dendritic cells allows the differentiation between extrinsic and intrinsic forms of atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2000;143:1193-1198.
333. Park JH, Choi YL, Namkung JH i wsp. Characteristics of extrinsic vs. intrinsic atopic dermatitis in infancy: correlations with laboratory variables. *Br J Dermatol.* 2006;155:778-783.
334. Czarnecka-Operacz M, Jenerowicz D, Silny W. Non-allergic type of atopic dermatitis among patients of Allergic Diseases Diagnostic Center, University of Medical Sciences in Poznań. *Przegl Lek.* 2005;62:1332-1336.
335. Oshima KZ, Asano K, Kanai K i wsp. Influence of epinastine hydrochloride, an H1-receptor antagonist, on the function of mite allergen-pulsed murine bone marrow-derived dendritic cells in vitro and in vivo. *Mediators Inflamm.* 2009;2009:738038.
336. Otsuka A, Honda T, Doi H i wsp. An H1-histamine receptor antagonist decreases serum interleukin-31 levels in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2011;164(2):455-456.
337. Seo HJ, Park KK, Han SS i wsp. Inhibitory effects of the standardized extract (DA-9601) of *Artemisia asiatica* Nakai on phorbol ester-induced ornithine decarboxylase activity, papilloma formation, cyclooxygenase-2 expression, inducible nitric oxide synthase expression and nuclear transcription factor kappa B activation in mouse skin. *Int J Cancer.* 2002;100(4):456-462.
338. Choi SC, Choi EJ, Oh HM i wsp. DA-9601, a standardized extract of *Artemisia asiatica*, blocks TNF-alpha-induced IL-8 and CCL20 production by inhibiting p38 kinase and NF-kappaB pathways in human gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol.* 2006;12(30):4850-4858.
339. Lee S, Park HH, Son HY i wsp. DA-9601 inhibits activation of the human mast cell line HMC-1 through inhibition of NF-kappaB. *Cell Biol Toxicol.* 2007;23(2):105-112.

340. Choi EJ, Lee S, Hwang JS i wsp. DA-9601 suppresses 2, 4-dinitrochlorobenzene and dust mite extract-induced atopic dermatitis-like skin lesions. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(9):1260-1264.
341. Kruszewski J, Silny W, Mazurek H i wsp. Testy skórne. [W:] Standardy w Alergologii. Część I. The UCB Institute of Allergy, Belgium 2003:9-29.
342. Fal AM, Panaszek B. Eozynofile. [W:] Choroby alergiczne i astma. Małolepszy J (red). Volumed, Wrocław 1996:65-78.
343. Czarnecka-Operacz M. Rola Dermatophagoides pteronyssinus w patomechanizmie atopowego zapalenia skóry. Rozprawa doktorska. *Postępy dermatologii.* 1995; t.XII: 281-318.
344. Bousquet J, Coulomb Y, Arrendal H i wsp. Total serum IgE concentrations in adolescents and adults using the phadebas IgE PRIST technique. *Allergy.* 1982;37(6):397-406.
345. Ishii T, Wang J, Zhang W i wsp. Pivotal role of mast cells in pruritogenesis in patients with myeloproliferative disorders. *Blood.* 2009;113(23):5942-5950.
346. Teraki Y, Hotta T, Shiohara T. Increased circulating skin-homing cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA)+ type 2 cytokine-producing cells, and decreased CLA+ type 1 cytokine-producing cells in atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2000;143(2):373-378.
347. Santamaria-Babí LF. CLA(+) T cells in cutaneous diseases. *Eur J Dermatol.* 2004;14(1):13-18.
348. [http://ucl.academia.edu/GrahamRook/Papers/582199/Validation\\_of\\_Housekeeping\\_Genes\\_for\\_Normalizing\\_RNA\\_Expression\\_In\\_Real-Time\\_PCR](http://ucl.academia.edu/GrahamRook/Papers/582199/Validation_of_Housekeeping_Genes_for_Normalizing_RNA_Expression_In_Real-Time_PCR)
349. Kagami S, Kakinuma T, Saeki H i wsp. Significant elevation of serum levels of eotaxin-3/CCL26, but not of eotaxin-2/CCL24, in patients with atopic dermatitis: serum eotaxin-3/CCL26 levels reflect the disease activity of atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol.* 2003;134(2):309-313.
350. McElduff F, Cortina-Borja M, Chan SK i wsp. When t-tests or Wilcoxon-Mann-Whitney tests won't do. *Adv Physiol Educ.* 2010;(34):128-133.
351. Reich A, Szepietowski JC. Mediators of pruritus in psoriasis. *Mediators Inflamm.* 2007;2007:64727.
352. Chen X, Niyonsaba F, Ushio H i wsp. Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. *Eur J Immunol.* 2007;37(2):434-444.
353. Steinhoff M, Bienenstock J, Schmelz M i wsp. Neurophysiological, neuroimmunological, and neuroendocrine basis of pruritus. *J Invest Dermatol.* 2006;126(8): 1705-1718.
354. Porter SR, Kirby A, Olsen I i wsp. Immunologic aspects of dermal and oral lichen planus: a review. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 1997;83:358-366.
355. Shiohara T, Mizukawa Y, Takahashi R i wsp. Pathomechanisms of lichen planus autoimmunity elicited by cross-reactive T cells. *Curr Dir Autoimmun.* 2008;10:206-226.
356. Spandau U, Toksoy A, Goebeler M i wsp. MIG is a dominant lymphocyte-attractant chemokine in lichen planus lesions. *J Invest Dermatol.* 1998;111(6):1003-1009.
357. Górska R. Etiopatogeneza liszaja płaskiego w świetle nowych badań. *Magazyn Stomat.* 1993;3:26.
358. Niyonsaba F, Nagaoka I, Ogawa H. Human defensins and cathelicidins in the skin: beyond direct antimicrobial properties. *Crit Rev Immunol.* 2006;26(6):545-576.



359. Zhou XJ, Sugeran PB, Savage NW i wsp. Intra-epithelial CD8+ T cells and basement membrane disruption in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2002;31(1):23-27.
360. Mihara K, Kuratani K, Matsui T i wsp. Vital role of the itch-scratch response in development of spontaneous dermatitis in NC/Nga mice. *Br J Dermatol.* 2004;151(2):335-345.
361. Hashimoto Y, Arai I, Nakanishi Y i wsp. Scratching of their skin by NC/Nga mice leads to development of dermatitis. *Life Sci.* 2004;76(7):783-794.
362. Tamura S, Morikawa Y, Miyajima A i wsp. Expression of oncostatin M receptor beta in a specific subset of nociceptive sensory neurons. *Eur J Neurosci.* 2003;17(11):2287-2298.
363. Morikawa Y, Tamura S, Minehata K i wsp. Essential function of oncostatin m in nociceptive neurons of dorsal root ganglia. *J Neurosci.* 2004;24(8):1941-1947.
364. Lee HL, Lee KM, Son SJ i wsp. Temporal expression of cytokines and their receptors mRNAs in a neuropathic pain model. *Neuroreport.* 2004;15(18):2807-2811.
365. Hermann GE, Holmes GM, Rogers RC. TNF(alpha) modulation of visceral and spinal sensory processing. *Curr Pharm Des.* 2005;11(11):1391-1409.
366. Ikoma A, Steinhoff M, Ständer S i wsp. The neurobiology of itch. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(7):535-547.
367. Costa C, Rilliet A, Nicolet M i wsp. Scoring atopic dermatitis: the simpler the better? *Acta Derm Venereol.* 1989;69:41-45.
368. Iijima OT, Takeda H, Komatsu Y i wsp. Atopic dermatitis in NC/Jic mice associated with *Myobia musculi* infestation. *Comp Med.* 2000;50(2):225-228.
369. Schmid-Grendelmeier P, Simon D, Simon HU i wsp. Epidemiology, clinical features, and immunology of the "intrinsic" (non-IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis). *Allergy.* 2001;56(9):841-849.

## Załącznik nr 1

### IZOLACJA RNA CHOMCZYŃSKIEGO I SACCHI

#### IZOLACJA Z JEDNOJĄDRZASTYCH KOMÓREK KRWI OBWODOWEJ

1. Nanieść uprzednio wymieszaną krew (ok. 6 ml) na Histopaque 1077 (ok.6 ml) o temperaturze pokojowej
2. Wirować w 23 °C przy 800 xg przez 40 minut
3. Zebrać osocze i zamrozić
4. Zebrać komórki znajdujące się w interfazie do czystej probówki „eppendorf” i dodać do pełna PBS
5. Wirować przy 450 xg przez 15 minut w temperaturze pokojowej
6. Zlać supernatant
7. Osad zalać 1 ml TRIzolu, zworteksować
8. Inkubować 5 minut w temperaturze pokojowej
9. Dodać 200 µl chloroformu i zworteksować
10. Inkubować 10 minut w temperaturze pokojowej
11. Wirować w 2 °C przy 12000 xg przez 12 minut
12. Ściągnąć 500 µl górnej fazy wodnej
13. Dodać 500 µl izopropanolu i zworteksować
14. Mrozić w -80 °C przynajmniej przez 30 minut
15. Wirować w 2 °C przy 12000 xg przez 12 minut
16. Zlać izopropanol
17. Dodać 1 ml 75% etanolu w DEPC-H<sub>2</sub>O i zworteksować
18. Wirować w 2 °C przy 20000 xg przez 10 minut
19. Zlać etanol
20. Suszyć otwarte probówki pod komorą, w termobloku w temperaturze 38 °C
21. Rozpuścić osad w 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O w 38 °C przez 15 minut w termobloku
22. Zmierzyć stężenie RNA
23. Pobrać 1 µg RNA i dodać wody do 17 µl
24. Dodać 2 µl buforu do DNazowania i 1 µl DNAzy
25. Inkubować w 37 °C przez 30 minut
26. Dodać 2 µl odczynnika inaktywującego DNAzę
27. Inkubować przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, lekko wytrząsając
28. Wirować przy 10.000 xg przez 3 minuty

29. Pobrać 11 µl do reakcji odwrotnej transkrypcji

### **IZOALCJA RNA CHOMCZYŃSKIEGO I SACCHI**

#### **IZOLACJA Z WYCINKÓW SKÓRY**

1. Pociąć zamrożony wycinek tkanki, jeśli istnieje obawa, że nie zmieści się w otworach generatora
2. Umieścić tkankę w 1 ml schłodzonego do temperatury 4 °C TRIzolu
3. Umieścić probówkę w komorze anty-rozpryskowej
4. Homogenizować, przy prędkości obrotowej ok. 10.000 rpm, przez 30 sekund, następnie schłodzić probówkę na lodzie. Powtórzyć homogenizowanie dwa razy
5. Mrozić w -30 °C przynajmniej przez 60 minut
6. Rozmrozić, wirować w 2 °C przy 20000 xg przez 12 minut
7. 950 µl supernatantu przenieść do probówki zawierającej 200 µl chloroformu
8. Inkubować 10 minut w temperaturze pokojowej
9. Wirować w 2 °C przy 12000 xg przez 12 minut
10. Ściągnąć 500 µl górnej fazy wodnej
11. Dodać 500 µl izopropanolu i zworteksować
12. Wirować w 2 °C przy 12000g x przez 12 minut
13. Zlać izopropanol
14. Dodać 400 µl Lysis/-Binding Buffer (High Pure RNA Isolation Kit [Roche Applied Science]), worteksować przez 15 sekund
15. Przenieść roztwór do probówki z filtrem
16. Wirować przez 15 sekund przy 8.000 xg, odrzuć eluat
17. Dodać 500 µl Wash Buffer I na filtr, wirować przez 15 sekund przy 8.000 xg, odrzucić eluat
18. Dodać 500 µl Wash Buffer II na filtr, wirować przez 15 sekund przy 8.000 xg, odrzucić eluat
19. Dodać 200 µl Wash Buffer II na filtr, wirować przez 2 minuty przy 13.000 xg, odrzucić eluat
20. Dodać 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O na filtr, umieścić filtr w nowej probówce, wirować przez 1 minutę przy 8.000 xg, zachować eluat, zawierający RNA
21. Zmierzyć stężenie RNA
22. Pobrać 1 µg RNA i dodać wody do 17 µl
23. Dodać 2 µl buforu do DNAzowania i 1 µl DNAzy
24. Inkubować w 37 °C przez 30 minut

25. Dodać 2  $\mu$ l odczynnika inaktywującego DNAzę
26. Inkubować przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, lekko wytrząsając
27. Wirować przy 10.000 xg przez 3 minuty
28. Pobrać 11  $\mu$ l do reakcji odwrotnej transkrypcji

## Załącznik nr 2

### ODWROTNA TRANSKRYPCJA

1. Dodać 2  $\mu$ l starterów heksamerowych. Probówki trzymać na lodzie
2. Inkubować przez 10 minut w temperaturze 65 °C w bloku grzewczym
3. Przenieść probówki na lód 4. Dodać 4  $\mu$ l buforu reakcyjnego, 2  $\mu$ l mieszaniny deoksynukleozydów, 0,5  $\mu$ l inhibitora RNAz i 0,5  $\mu$ l odwrotnej transkryptazy
4. Inkubować przez 10 minut w temperaturze 25 °C
5. Zwirować
6. Inkubować przez 30 minut w temperaturze 55 °C w bloku grzewczym
7. Inaktywować odwrotną transkryptazę przez 5 minut w w temperaturze 85 °C
8. Schłodzić na lodzie, zwirować
9. Rozpipetować po 3,5  $\mu$ l do osobnych probówek
10. Mrozić w temperaturze -80 °C

### Załącznik nr 3

#### DNA-zowanie

1. Pobrano 1 µg RNA i uzupełniono wodą do objętości 11 µl
2. Dodano 1,3 ul buforu do DNAzowania oraz 1 µl DNAzy
3. Delikatnie wymieszano
4. Inkubowano w 37°C przez 30 min.
5. Dodawano 2 µl czynnika inaktywującego DNAzę i inkubowano przez 2 min.
6. Wirowano w temperaturze pokojowej przez 2 min przy obrotach 10 000 x g
7. Ściągano 11 µl RNA (górnjej fazy)

#### Oczyszczanie na kolumnkach

1. Do wyizolowanego RNA dodawano 400 µl buforu lizująco-wiążącego i wortexowano przez 15 s
2. Przenoszono próbę na kolumnkę umieszczoną w probówce
3. Wirowano w temperaturze pokojowej przez 15 s przy 8000 x g
4. Wyciągano kolumnkę i usuwano odwirowany płyn
5. Ponownie umieszczano kolumnkę w probówce
6. Dodawano 500 µl I Buforu Myjącego i wirowano w temperaturze pokojowej przez 15s przy 8000 x g
7. Dodawano 500 µl II Buforu Myjącego i wirowano w temperaturze pokojowej przez 15 s przy 8000 x g
8. Wyciągano kolumnkę i usuwano odwirowany płyn
9. Ponownie umieszczano kolumnkę w probówce
10. Dodawano 200 µl II Buforu Myjącego i wirowano w temperaturze pokojowej przez 2 min przy 13 000 x g
11. Wyciągano kolumnkę i usuwano odwirowany płyn
12. W celu wyeluowania RNA przenoszono kolumnkę do czystej probówki, dodawano 40 µl buforu elucyjnego i wirowano w temperaturze pokojowej przez 1 min przy 8000 x g

13. Usuwano kolumnienkę, a w próbówce pozostawało oczyszczone RNA

#### **Oczyszczanie produktów PCR**

1. Umieszczono kolumnienkę w próbówce i naniesiono 500  $\mu$ l buforu wiążącego
2. Dodano 20  $\mu$ l produktów PCR i wymieszano przez pipetowanie
3. Wirowano w temperaturze pokojowej przez 2 minuty przy 10000 x g
4. Przenoszono kolumnienkę do czystej próbówki i nanoszono na środek filtra 10  $\mu$ l buforu elucyjnego
5. Inkubowano przez minutę
6. Wirowano w temperaturze pokojowej przez 1 minutę przy 6000 x g
7. Usuwano w kolumnienkę, a w próbówce pozostawały oczyszczone fragmenty PCR