

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Anna Bogdali

Wpływ superantygeny *Staphylococcus aureus*, roztoczy kurzu domowego
oraz soli niklu na aktywację limfocytów T w teście Elispot u chorych z
atopowym zapaleniem skóry

praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Krystyna Obtułowicz

Pracę wykonano w Zakładzie Alergologii Klinicznej i Środowiskowej
Katedry Toksykologii i Chorób Środowiskowych UJCM
Kierownik jednostki: dr hab. n. med. Ewa Czarnobilska

Kraków 2012

**Praca została sfinansowana z grantu
Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego
nr 4266/B/P01/2010/39**

Składam serdeczne podziękowania:

Pani Profesor Krystynie Obtulowicz za umożliwienie mi przeprowadzenia badań i propozycję tematu pracy doktorskiej oraz okazaną życzliwość

oraz: dr Wojciechowi Dydze, dr Grażynie Antoszczyk, dr Dorocie Myszkowskiej, paniom Zofii Baran, Zofii Olczak, Marcei Juras, Teresie Firek i Iwonie Jaros za wszelką okazaną pomoc w trakcie realizacji badań

SPIS TREŚCI:

Wstęp	6
I Współczesne poglądy o patogenezie atopowego zapalenia skóry (AZS)	7
1. Podłoże genetyczne i obraz kliniczny AZS	7
2. Mechanizmy immunologiczne zaangażowane w AZS	11
3. Charakterystyka interferonu gamma	14
4. Charakterystyka interleukiny 2	16
5. Charakterystyka interleukiny 13	17
6. Gronkowiec złocisty w atopowym zapaleniu skóry	18
7. Roztocze kurzu domowego w atopowym zapaleniu skóry	21
8. Nikiel w atopowym zapaleniu skóry	23
II. Założenia i cel pracy	27
1. Przesłanki do podjęcia badań	27
2. Cel pracy	27
3. Cele szczegółowe	27
III. Materiały i metody	28
IV. Wyniki	36
1. Charakterystyka badanej grupy chorych z AZS i kontrolnej	36
2. Analiza alergii na nikiel w zaostrzeniu atopowego zapalenia skóry	38
2.1. Wpływ współwystępowania innych chorób na profil cytokinowy powstały w odpowiedzi na siarczan niklu u chorych z atopowym zapaleniem skóry	38
2.2. Wpływ występowania kontaktowej alergii niklowej na nasilenie zmian skórnych w atopowym zapaleniu skóry (wskaźnik SCORAD)	40
2.3. Czy wynik testu skórniego płatkowego na nikiel odzwierciedla potencjał PBMC do reagowania na siarczan niklu in vitro - analiza porównawcza dwóch typów testów: płatkowy in vivo oraz immunobarwienie w teście in vitro Elispot	42
3. Alergia na roztocze kurzu domowego <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> w zaostrzeniu atopowego zapalenia skóry	47
3.1. Wpływ współwystępowania innych chorób na profil cytokinowy powstały w odpowiedzi na a.D1 u chorych z atopowym zapaleniem skóry	47
3.2. Współoddziaływanie alergenów – wpływ modyfikacji środowiska cytokinowego przez nikiel na profil cytokinowy PBMC stymulowanych a.D1	52
3.3 Wpływ występowania alergii roztoczowej potwierdzonej dodatnimi wynikami testu punktowego na a.D1 na nasilenie objawów skórnych w atopowym zapaleniu skóry (wskaźnik SCORAD)	53
3.4 Czy wynik testu skórniego punktowego na a.D1 odzwierciedla potencjał PBMC	

do reagowania na a.D1 in vitro – analiza porównawcza dwóch typów testów:	
skórny punktowy in vivo oraz immunobarwienie w teście in vitro Elispot	55
4.Reaktywność PBMC na enterotoksyny A i B gronkowca złocistego <i>Staphylococcus aureus</i>	58
4.1 Wpływ współwystępowania innych chorób na profil cytokinowy powstały po stymulacji gronkowcowymi enterotoksynami A i B u chorych z atopowym zapaleniem skóry	58
4.2 Wpływ reaktywności PBMC na enterotoksyny gronkowcowe A i B w grupie chorych z AZS na nasilenie objawów skórnych w atopowym zapaleniu skóry (wskaźnik SCORAD)	63
4.3 Współoddziaływanie antygenów: gronkowcowe enterotoksyny A i B oraz nikiel	66
4.4 Czy wynik testu na nosicielstwo <i>S. aureus</i> odzwierciedla potencjał PBMC do reagowania na gronkowcowe enterotoksyny A i B in vitro – analiza porównawcza testów: obecność as IgE specyficznych względem SEA i SEB oraz hodowla bakterii z nosa i zmian skórnych na pożywce oraz immunobarwienie in vitro Elispot	69
5.Zmiany w profilach cytokinowych w remisji względem zaostrzenia atopowego zapalenia skóry	71
5.1 Zmiany profilu cytokinowego w fazie remisji względem fazy zaostrzenia AZS po stymulacji siarczanem niklu in vitro	69
5.2 Zmiany w profilu cytokinowym po stymulacji a.D1 <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> w fazie remisji względem fazy zaostrzenia w AZS	74
3. Zmiany w profilu cytokinowym po stymulacji gronkowcowymi enterotoksynami A i B w fazie remisji względem zaostrzenia w AZS	77
4. Współoddziaływanie alergenów i ich wpływ na profil cytokinowy w AZS	80
V. Dyskusja	86
1. Reaktywność PBMC na siarczan niklu w zaostrzeniu AZS	86
2. Reaktywność PBMC na a.D1 w zaostrzeniu AZS	88
3. Reaktywność PBMC na gronkowcowe enterotoksyny A i B w zaostrzeniu AZS	90
4. Zmiany reaktywności PBMC w remisji względem zaostrzenia AZS	93
VI. Wykaz skrótów	96
VII. Streszczenie	97
VIII. Abstract	102
IX. Spis tabel i wykresów	106
X. Piśmiennictwo	109

WSTĘP

Atopowe zapalenie skóry to przewlekła i nawrotowa dermatoza, u której podstaw leży zaburzenie równowagi immunologicznej Th1/Th2 oraz nieprawidłowa architektura i komórkowy skład skóry. Choroba ta często współwystępuje z innymi chorobami alergicznymi takimi jak: astma alergiczna, alergiczny nieżyt nosa, alergia pokarmowa, alergia kontaktowa. O postaci klinicznej AZS decyduje także ilość i rodzaj alergenów uczulających. Dodatkowym czynnikiem wpływającym na obraz AZS jest komponenta mikrobiologiczna oraz autoagresyjna odgrywające istotną rolę w rozwoju choroby w niektórych przypadkach. Wiedza na temat interakcji różnych molekularnych mechanizmów współtworzących postać kliniczną AZS jest nadal słabo poznana.

I. WSPÓLCZESNE POGLĄDY O PATOGENEZIE ATOPOWEGO ZAPALENIA SKÓRY (AZS)

1. Podłoże genetyczne i obraz kliniczny AZS

Choroby alergiczne są skutkiem nieprawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego wywołanego przez czynniki genetyczne oraz środowiskowe, co w rezultacie prowadzi do nadreaktywności ustroju na substancje obojętne dla zdrowego organizmu oraz osłabienia zdolności obrony organizmu przed patogenami. Charakterystyczną cechą chorób alergicznych jest następująca wraz z wiekiem zmiana obrazu klinicznego, co określa się mianem marszu alergicznego. Zgodnie z klasycznym modelem progresja chorób alergicznych zaczyna się od alergii pokarmowej i atopowego zapalenia skóry w okresie niemowlęctwa lub we wczesnym dzieciństwie, które stopniowo przechodzą w alergiczny nieżyt nosa i astmę alergiczną.¹ Zwolennicy teorii marszu alergicznego powołują się na silny związek mutacji w genie filagryny w skórze niezbędnej w procesie keratynizacji naskórka i błon śluzowych nosa, a wzrostem ryzyka rozwoju AZS.² Mechanizm tej zależności polegałby na aktywacji komórek układu immunologicznego obecnych w skórze przez alergen łatwo wnikający do uszkodzonej skóry, które migrując do krwioobiegu, a potem do płuc mogą być wchłaniane przez komórki dendrytyczne prezentujące antygeny limfocytom T. W rezultacie może dochodzić do nadreaktywności płuc na alergeny powietrzno pochodne. Tak więc zaburzenie funkcji skóry stanowiącej barierę ochronną przed środowiskiem zewnętrznym ułatwia wnikanie do ustroju różnych substancji i może być przyczyną wczesnego uczulenia, nadreaktywności ze strony płuc, a nawet autouczulenia na ludzkie białka pochodzące ze zniszczonych przez alergiczny stan zapalny tkanek.³ W przypadku pojawiania się chorób alergicznych w innej kolejności stosuje się określenie marszu odmiennego.⁴ Obserwuje się także współistnienie chorób alergicznych równocześnie w formie różnych fenotypów u dzieci, a w szczególności dotyczy to atopowego zapalenia skóry i astmy alergiczej. Z kolei przeciwnicy teorii marszu alergicznego popierający hipotezę równoczesnego współistnienia chorób alergicznych opierają się nie tylko na obserwacjach klinicznych, ale także na fakcie braku współistnienia wspólnej puli genowej dla atopowego zapalenia skóry i astmy alergiczej, która z kolei występuje w przypadku AZS i innych niealergiczych chorób skóry.^{5,6,7} Polimorfizmy genów (istniejąca różnorodność odmian genu) typowe dla AZS są następujące:

Polimorfizm genu filagryny – obserwuje się obniżenie poziomu tego białka w skórze i w błonie śluzowej nosa pacjentów z AZS.³ Uważa się, że do czynników odpowiedzialnych za supresję ekspresji filagryny, a także takich białek naskórkowych jak inwolukryna i lorykryna należą

cytokiny związane z limfocytami Th2, powszechnie przyjętymi za marker chorób atopowych, a zwłaszcza IL-4 i IL-13.⁸

Polimorfizmy związane z AZS w obrębie genów kodujących cytokiny typu Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) oraz GM-CSF⁹, a także w genach kodujących receptory np. podjednostkę α receptora IL-4 zaangażowanego w IgE-zależny typ AZS oraz łańcuch β receptora wysokiego powinowactwa dla IgE.¹⁰

Polimorfizmy genów w genach cząsteczek kostymulujących CD80 i CD86¹¹ oraz w genach zaangażowanych w rozpoznanie materiału mikrobiologicznego takich jak CD14 i TLR.¹² Istniejąca różnorodność w obrębie form genów związanych z obroną przed mikroorganizmami może oznaczać, że nie tylko brak kontaktu z organizmami patogennymi we wczesnym dzieciństwie (zgodnie z teorią nadmiernej higieny)¹³, ale też osłabienie mechanizmów rozpoznających patogeny może promować rozwój mechanizmów Th2-zależnych i alergii.

Mutacje w genie cytokiny prozapalnej RANTES, która wywołują pojawienie się miejsca wiązania dla czynników transkrypcyjnych GATA, co w istotny sposób może wpłynąć na poziom ekspresji tej cytokiny.¹⁴

Badania genomowe rodzin ze stwierdzoną atopią doprowadziły do wyodrębnienia regionów chromosomowych związanych z rozwojem atopowego zapalenia skóry i astmy alergicznej. Były to także geny związane z syntezą IgE i korelujące ze stopniem nasilenia zmian skórnych zgodnie ze wskaźnikiem SCORAD.¹⁵⁻¹⁷ Interesujący jest fakt, że nie wszystkie loci genów charakterystycznych dla AZS były również typowe dla występowania astmy alergicznej.^{5,6,7} Dlatego też wydaje się, że atopowe zapalenie skóry może rozwijać się zgodnie z mechanizmem atopowym razem z astmą alergiczną, ale może także pojawić się bez udziału astmy alergicznej poprzez mechanizmy nieatopowe mające związek z rozwojem niealergiczych chorób skóry takich jak: łuszczyca⁵, choroba Netherna⁶ i choroba Wiscott-Aldricha⁷. Wspólne podłoże genetyczne dla AZS i chorób nieatopowych jest następujące:

Wspólna pula genowa dla łuszczycy i AZS odpowiedzialna za kontrolę stanu zapalnego skóry mająca związek z zaburzonym różnicowaniem komórek epidermy, co może wpływać na jej grubość i stopień wysuszenia.⁵

W przypadku choroby Netherna i w wybranych przypadkach AZS dochodzi do zaburzenia funkcjonowania kodowanego przez gen SPINK5 inhibitora proteinaz serynowych syntezowanych w epitelium skóry, błonie śluzowej nosa i tarczycy.⁶

Choroba Wiscott-Aldricha sprzężona z chromosomem X, której polimorficzne formy genu zostały znalezione w pewnych przypadkach AZS charakteryzuje się zaburzeniem funkcjonowania

limfocytów T i B, co prowadzi do nawracających infekcji i trombocytopenii.⁷

Te genetyczne markery nie mające żadnych związków z astmą mogą stanowić połączenie dla przeciwstawnych teorii rozwoju chorób alergicznych. Jak już wspomniano AZS może rozwijać się zarówno na drodze atopowej jak i nieatopowej nie mającej związku z marszem alergicznym. Prawdopodobnie liczba i rodzaj występujących u pacjenta mutacji w znaczącym stopniu decyduje o obrazie klinicznym alergii i stopniu jej ciężkości.

Duża różnorodność obrazów klinicznych atopowego zapalenia skóry przyczyniła się do opracowania kryteriów diagnostycznych m.in. Hanifina i Rajki. Zgodnie z klasycznym modelem atopowego zapalenia skóry lokalizacja i obraz kliniczny zmian są zależne od wieku pacjenta. Można je podzielić na trzy fazy:

I faza- wyprysk atopowy okresu niemowlęctwa do 2 roku życia- intensywnie swędzące grudki i pęcherzyki z rumieniem zlokalizowane na głowie, czole i policzkach

II faza- wyprysk atopowy późnego dzieciństwa do 12 roku życia- grudki i blaszki z lichenizacją obecne na rękach, stopach, wokół nadgarstków i kostek oraz w zgięciach łokciowych i podkolanowych.

III faza- wyprysk atopowy okresu młodzieńczego i osób dorosłych- suche, łuszczące się grudki i blaszki z rumieniem tworzące rozległe zlichenizowane blaszki w fałdach zgięciowych, twarzy i szyi, górnych częściach ramion i pleców, grzbietowych powierzchniach oraz palcach rąk i stóp.

Taki podział jednak niejednokrotnie jest tylko umowny i nie każdy pacjent przechodzi przez wszystkie fazy choroby, które mogą pojawić się we wszystkich etapach życia człowieka. W każdym wieku oraz w różnym stopniu mogą wystąpić samoistne lub indukowane lekami okresy remisji o różnej długości trwania.¹⁸

Najpowszechniej występującym objawem AZS stwierdzonym w 98% przypadków jest suchość skóry manifestująca się okołopłatkowym złuszczeniem naskórka nasilającym się ze wzrostem ciężkości choroby oraz towarzyszącym jej świądem.¹⁸ Zaburzenie funkcjonalności wspomnianego już białka filagryny hamuje jego proteolizę do peptydów i w następstwie do higroskopijnych aminokwasów i pochodnych tworzących naturalny czynnik nawilżający skórę. W rezultacie dochodzi do redukcji ilości naturalnych hydrofilowych czynników nawilżających będących częścią warstwy rogowej naskórka (aminokwasy, kwas piroglutaminowy, mleczany i mocznik).^{19,20} Z kolei brak inhibitora proteazy serynowej LEKTI kodowanego przez gen SPINK5 i obecnego w warstwie rogowej naskórka prowadzi do przedwczesnej hydrolizy profilagryny.¹⁹ Zaburzenia funkcjonalności filagryny wiążą się z cięższym przebiegiem klinicznym AZS¹⁹, nawrotami nadkażeń wirusowych (*eczema herpeticum*)²¹ oraz rozwojem alergii niklowej.²² Dodatkowo, lipidowa lamellarna macierz składająca się z ceramidów, cholesterolu i jego estrów, a

także kwasów tłuszczowych otaczająca strukturę wielu warstw skeratynizowanych keratynocytów (korneocyty) warstwy rogowej skóry ulega modyfikacji u chorych z AZS.²³ Dochodzi do niedoboru ceramidu 1 i keratyn w tej warstwie na skutek obniżonej aktywności sfinngomielinaz biorących udział w syntezie ceramidów. Zmniejszony jest też poziom frakcji lipidowej, fosfolipidowej i steroli.²³ Nieprawidłowy metabolizm lipidów naskórkowych prowadzi do podwyższenia stężenia kwasu linolenowego oraz obniżenia stężenia kwasu γ -linolenowego i arachidonowego w surowicy krwi chorych na AZS.^{23,24} Natomiast w warstwie rogowej naskórka gromadzi się w nadmiarze sfinngofosforylocholina na skutek nadmiernej aktywności deacylasy sfinngomieliny.²⁴ Dochodzi także do niedoczynności gruczołów łojowych.²⁵ Nadmierna przeznaskórkowa utrata wody prowadzi do odwodnienia skóry i utraty bariery ochronnej, co sprzyja bezpośredniemu narażeniu skóry na zmieniające się warunki fizykochemiczne otaczającego ją środowiska. Skóra łatwo ulega podrażnieniu i pękaniu, co z kolei ułatwia wnikanie cząstek drażniących i o potencjale alergennym do jej wnętrza. Świąd towarzyszący wzrostowi suchości skóry, nasilany przez stres, pocenie się, czynniki drażniące i infekcje, prowokuje drapanie się i rozwój stanu zapalnego w skórze.²⁶ Powszechne występowanie białego demografizmu u chorych z AZS może stanowić objaw suchości skóry.²⁷

Na podstawie licznych badań przyjęto, że podwyższony poziom immunoglobuliny E występuje w 60-80 % przypadków AZS. W tej grupie chorych ekspresja receptorów wysokiego ($Fc\epsilon RI$) i niskiego powinowactwa ($Fc\epsilon RII$) obecnego na monocytach rozpoznających IgE jest znacznie wyższa niż w drugiej grupie pacjentów. Tę grupę cechuje rodzinne występowanie alergii oraz obecność skazy alergicznej w niemowlęctwie i wystąpienie pierwszych objawów alergii przed 5 rokiem życia.^{28,29} U 20% chorych z AZS, u których problemy alergiczne rozwinęły się po 20 roku życia stężenie IgE jest prawidłowe. W tej grupie z reguły nie obserwuje się rodzinnych skłonności do alergii ani objawów skazy alergicznej w niemowlęctwie. Może jednak pojawiać się IgE- zależne uczulenie na antygeny drobnoustrojowe, do których zalicza się enterotoksyny *Staphylococcus aureus*, antygeny *Candida albicans* i *Malassezia sympodialis*.^{28,29} U dorosłych spotyka się też postaci mieszane obejmujące elementy wyprysku atopowego, kontaktowego i z podrażnienia. U dzieci mogą wystąpić przejściowe postaci AZS z małym stężeniem IgE w surowicy i bez wykrywalnego uczulenia, przechodzące z wiekiem w AZS z wysokim stężeniem IgE we krwi i rozwojem nadwrażliwości na alergeny powietrzno pochodne i pokarmowe.^{28,29} Na tej podstawie wyróżniono trzy typy atopowego zapalenia skóry:¹³

- IgE- zależny alergiczny typ AZS
- IgE- niezależny (związany z limfocytami T) alergiczny typ AZS
- AZS niealergiczny

2. Mechanizmy immunologiczne zaangażowane w AZS

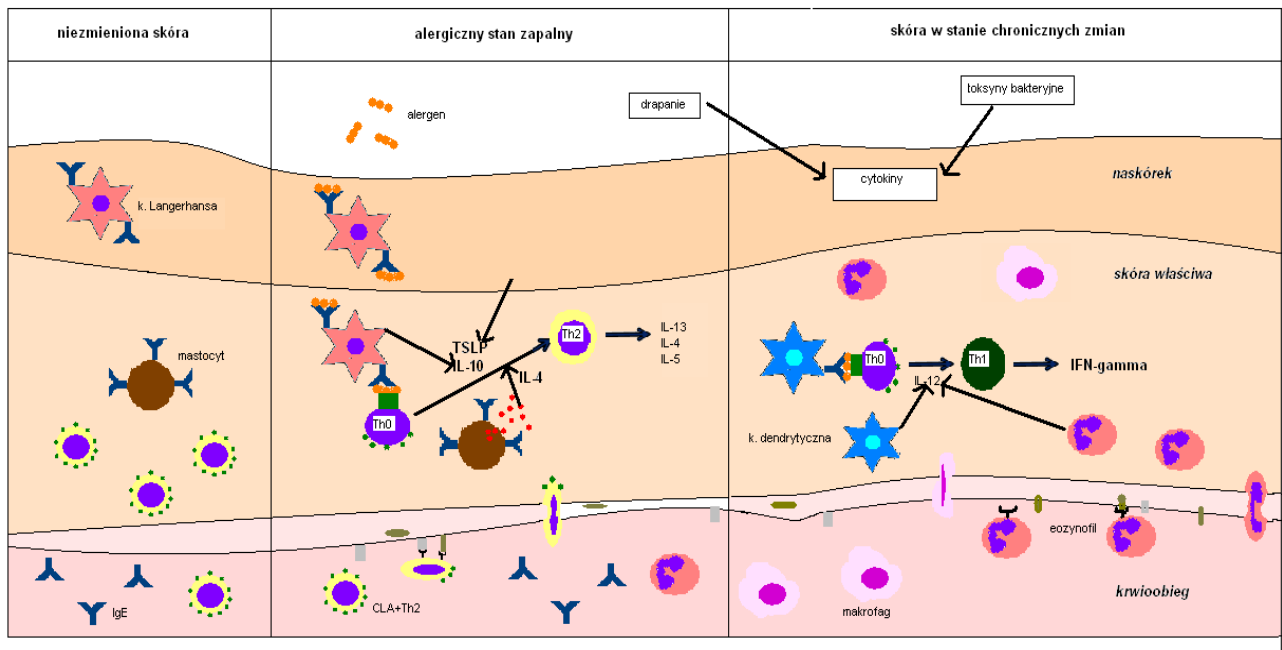
Charakterystyczną cechą skóry atopowej jest zaburzona architektura oraz skład komórkowy. Najnowsze koncepcje dowodzą iż, genetyczny defekt prowadzący do osłabienia integralności skóry ułatwia przenikanie czynników drażniących i alergenów do jej wnętrza, prowadząc do rozwoju stanu zapalnego i pogłębienia utraty ciągłości skóry na skutek zniszczeń wywołanych przez stan zapalny. Tak więc utrata ciągłości skóry składa się z trzech faz: zewnętrznej- genetycznej, wewnętrznej-zapalnej i zewnętrznej-następczej.³⁰ Zaobserwowano, że naskórkowa warstwa rogowa jest cieńsza u chorych z AZS w porównaniu z osobami zdrowymi, co może ułatwiać migrację alergenów do wnętrza skóry. Przyczyną zmniejszenia grubości tej warstwy wydaje się być nadmierna proteolityczna aktywność enzymów wydzielanych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, które odpowiadają za degradację białek tworzących białkowe połączenia między keratynocytami (desmosomy), a także za złuszczenie naskórka i odnowę epidermy³¹. Mechanizm rozwoju alergicznego stanu zapalnego wedle najnowszych koncepcji jest następujący:

1. Antygeny wnikające przez uszkodzony naskórek są wychwytywane przez komórki prezentujące antygen (APC) - Langerhansa stanowiące główną komponentę komórek dendrytycznych skóry oraz makrofagi, które po ich przetworzeniu prezentują je limfocytom Th0.³²

2. Th0 różnicują w następstwie w komórki Th1 pobudzające komórki efektorowe typu monocyty i makrofagi, NK, NKT oraz limfocyty T cytotoksyczne lub Th2 związane z odpowiedzią humoralną i produkcją przeciwciał.³³ Sposób prezentacji antygenów ustrojowi jest w pewnym stopniu zależny od dawki alergenu. Prezentacja małych dawek antygenów zachodzi przy udziale receptora dla IgE o wysokim powinowactwie (FcεRI) odgrywającego istotną rolę w odpowiedzi przeciwbakteryjnej i przeciwwirusowej, w której uczestniczą makrofagi.³⁴ Natomiast krążące kompleksy białkowe są wychwytywane przez receptor IgE o niskim powinowactwie (FcεRII) obecny na komórkach dendrytycznych.³⁵ Limfocyty Th po kontakcie z alergenem tworzą rezerwuar komórek pamięci o charakterystycznym fenotypie CD40RO+ zamiast fenotypu CD40RA+ charakterystycznego dla limfocytów T naiwnych.³⁶ W zdrowej populacji komórki Th0 mają tendencję do różnicowania w komórki typu Th1 w węzle chłonny, natomiast w stanach zaostrzenia AZS obserwowany jest podwyższony poziom limfocytów Th2 w skórze, rozpoznających antygeny pokarmowe i powietrzno pochodne.^{37,38}

W chronicznych zmianach skórnych w AZS obecne są głównie komórki Langerhansa w skórze właściwej i makrofagi w naskórku. U młodzieży i osób dorosłych dochodzi do rozległej fibrozy (zwłóknienia) górnej warstwy skóry właściwej prowadzącej do pogrubienia skóry.³⁹ Jest to typowa cecha nawracających stanów zapalnych związana z nadmierną aktywnością fibroblastów

próbujących odbudować zniszczoną macierz zewnątrzkomórkową skóry właściwej. Komórki APC w AZS mają niefizjologicznie wysoką ekspresję receptora wysokiego powinowactwa dla IgE w większości przypadków AZS.⁴⁰ Podrażnienie skóry przez alergeny, toksyny bakteryjne i inne mikroorganizmy wywołuje świąd oraz drapanie, co w rezultacie aktywuje główny składnik naskórka czyli keratynocyty mające obniżony próg pobudliwości w przypadku AZS.^{13,37} Te komórki uwalniają prozapalne cytokiny i chemokiny, które z kolei indukują ekspresję molekuł adhezyjnych na endotelium naczyń krwionośnych, co umożliwia migrację komórek zapalnych do skóry.⁴¹ W późniejszym okresie dochodzi do migracji do skóry limfocytów posiadających na swojej powierzchni receptor CLA reagujący z białkiem adhezyjnym E-selektyną, co umożliwia przyleganie limfocytów do śródbłonka naczyń i migrację do tkanki.⁴² Dodatkowo, wydzielane przez komórki zapalne cytokiny TNF- α i IFN- γ stymulują ekspresję cytokiny prozapalnej RANTES, co w rezultacie zwiększa wysięk komórek zapalnych do skóry i zapalenie.¹⁴ Keratynocyty wydzielają też czynnik TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin), który wraz z IL-10 wydzielaną przez komórki dendrytyczne stymulują naiwne limfocyty Th0 do różnicowania w kierunku limfocytów Th2 i wydzielania cytokin IL-4 i IL-13.⁴¹ Rekrutacja limfocytów Th2 posiadających chemokinowy receptor CCR4 do atopowej, zapalnej skóry odbywa się też dzięki wydzielanym w nadmiernej ilości w AZS przez makrofagi chemokinom CCL22/MDC (Macrophage-derived chemokine) i CCL17/TARC (Thymus and activation- regulated chemokine).⁴³ Limfocyty występujące w zaostrzeniu AZS są też pochodnymi komórek pamięci CD4+ obecnych w skórze właściwej w stanie zaostrzenia. Komórki pamięci CD45+RO+ posiadają na swojej powierzchni skórnym receptor zasiedlania CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen), który umożliwia przemieszczanie się tych komórek podczas zaostrzenia AZS z krwiobiegu do skóry poprzez sieć naczyń krwionośnych infiltrujących skórę właściwą.^{36,42} Komórki te charakteryzują się też ekspresją receptora IL-2R α .⁴³ W stanie zaostrzenia obserwuje się wzrost surowiczego poziomu IL-2R, spadek produkcji IFN- γ lub IL-12. W stanie zaostrzenia AZS dochodzi do pojawienia się przewagi limfocytów Th2 w stosunku do Th1⁴⁴, natomiast w stanie chronicznym przeważają limfocyty Th1 i Th0^{37,44}. W początkowej fazie rozwoju alergicznego stanu zapalnego obserwuje się też jeszcze nie do końca scharakteryzowane komórki Th17 migrujące do skóry, natomiast w późniejszej fazie ich liczba w skórze spada⁴⁵, a wzrasta liczba limfocytów CD4+ i CD8+ produkujących IL-22.⁴⁴⁻⁴⁵



Ryc1: Molekularny mechanizm atopowego zapalenia skóry

Reasumując można przyjąć, że alergiczna odpowiedź zapalna jest inicjowana i utrzymywana przez mechanizmy IgE-zależne pobudzone przez alergen, która następnie przechodzi w stan chroniczny IgE- niezależny. Za rozwój alergicznego stanu zapalnego związanego z limfocytami Th2 odpowiada kilka mechanizmów:

- wrodzony niedobór limfocytów Th1 produkujących IFN- γ u osób z atopią⁴⁶
- zwiększona podatność na apoptozę komórek Th1 w porównaniu z Th2⁴⁷
- podwyższona ekspresja supresora sygnalizacji cytokinowej SOCS-3 hamującego aktywność komórek Th1 u chorych z AZS⁴⁸
- podwyższona ekspresja receptora wysokiego powinowactwa dla IgE na komórkach dendrytycznych skóry i mastocytach w AZS ułatwiająca wychwytywanie alergenu, degranulację mastocytów i komórek tucznych, co w rezultacie sprzyja rozwojowi stanu zapalnego⁴⁰

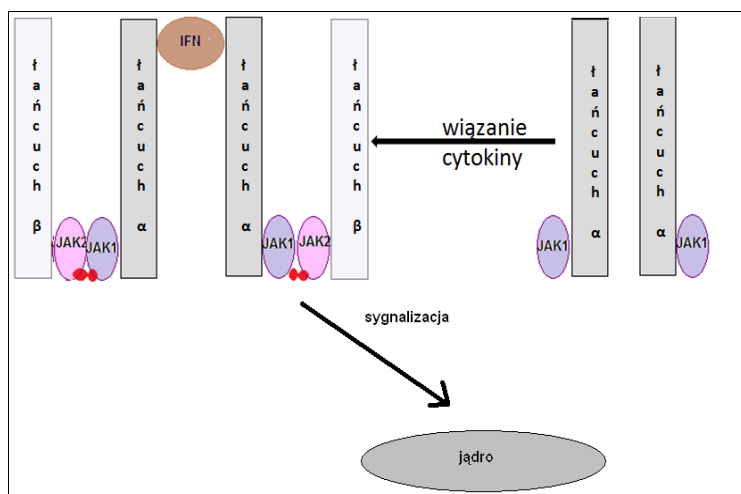
Coraz częściej zwraca się uwagę na regulację odpowiedzi immunologicznej przez populacje komórek regulatorowych T i B, w przypadku których dochodzi do zaburzenia ich funkcjonowania w atopowym zapaleniu skóry.^{49,50} Limfocyty regulatorowe pełnią podstawową rolę w procesach immunotolerancji oraz immunoregulacji. Wyróżnia się limfocyty T regulatorowe powstające w grasicy tzw. naturalne nTreg (CD4CD25FoxP3) oraz peryferyjne Treg, wśród których wyodrębia się trzy podgrupy.^{49,51} Są to Tr1 wydzielające IL-10 i TGF- β , Th3 wydzielające tylko TGF- β oraz indukowane obecnością antygeny iTreg wydzielające TGF- β oraz IL-35. Limfocyty Tr1 obniżają

ekspresję cytokin prozapalnych oraz ekspresję MHC II na monocytach, natomiast nTreg oddziałują z komórkami prezentującymi antygen oraz z limfocytami CD8⁺ Tc cytotoksycznymi.^{49,51} Zaobserwowano, że w atopowym zapaleniu skóry dochodzi do zwiększenia liczby limfocytów Tr1 w krwi oraz nTreg w zmianach skórnych.⁴⁹ Natomiast limfocyty Th3 są raczej związane z tolerancją pokarmową.⁴⁹ Wśród limfocytów B wyróżnia się grupę komórek CD5⁺B1 produkujących autoprzeciwciała.⁵⁰ Wykazują one własności regulatorowe poprzez uwalnianie IL-10 (B10), TGF- β (Br3) oraz wykazujące ekspresję FoxP3 (Bregs/BPS). Wykazano, że Br1 oraz Br3 indukują immunotolerancję alergenów pokarmowych u chorych z AZS z IgE- niezależnym uczuleniem na pokarmy (te komórki ulegają proliferacji pod wpływem kazeiny mleka u pacjentów z AZS tolerujących mleko, w przeciwieństwie do grupy chorych z jego nietolerancją).^{13,50} W przypadku AZS rozwojowi mechanizmów o charakterze alergii może towarzyszyć nadreaktywność immunologiczna o charakterze autoagresji.⁵² Na skutek niszczenia tkanek w alergicznym procesie zapalnym dochodzi do uwalniania wewnątrzkomórkowych białek naskórkowych, śródbłonkowych, z płytek krwi i z fibroblastów. W rezultacie białka te są wychwytywane przez komórki dendrytyczne, które prezentują je limfocytom Th2, czego skutkiem jest powstanie autoagresyjnych klonów komórek B produkujących autoprzeciwciała klasy IgE specyficzne względem niektórych antygenów tkankowych.⁵² Receptor wysokiego powinowactwa dla IgE występujący na komórkach Langerhansa⁴⁰ wiąże te przeciwciała, co ułatwia prezentację autoantygenów, a w rezultacie może dochodzić do powstania klonów Th2 z receptorami TCR specyficznymi dla autoantygenów skóry chorego.^{13,52} Autoprzeciwciała mogą indukować pokrzywkę autoimmunologiczną wskutek degranulacji komórek tucznych wiążąc się na powierzchni tych komórek z receptorami wysokiego i niskiego powinowactwa dla IgE i wpływając na ich reaktywność.^{35,40,52} Te autoprzeciwciała mogą też wiązać się z receptorami dla IgE obecnymi na komórkach Langerhansa wpływając na prezentację antygeny i wychwyt IgE.³⁴

3. Charakterystyka interferonu gamma

Receptor interferonu gamma (IFN γ) składa się z czterech transbłonowych łańcuchów białkowych, z których dwa odpowiadają za wiązanie cytokiny w domenie V przypominającej swoją budowę przeciwciała (IFNGR1), a pozostałe dwa uczestniczą w przekazie sygnału do wnętrza komórki od związanej cytokiny oraz w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej (IFNGR2).⁵³ Regulacja wiązania IFN- γ do receptora ma związek nie tylko z ekspresją samej cytokiny, ale także z gotowością receptora do jej wiązania. Poziom ekspresji IFNGR2 zależy od stopnia aktywacji i zróżnicowania komórek, a więc jest także czynnikiem regulującym oddziaływanie receptora IFNGR z cytokiną.⁵³ Powstały kompleks IFNGR1-IFN- γ jest wchłaniany przez komórkę i w dalszej

kolejności ulega dysocjacji w endosomie, na skutek czego uwolnione białko receptorowe IFNGR1 jest ponownie umieszczane w błonie komórkowej, a cytokina ulega degradacji.^{53,54}



Ryc.2 Schemat oddziaływania IFN γ z receptorem komórkowym

IFN- γ jest produkowany przez limfocyty CD4⁺ Th1, CD8⁺ Tc, NK, NKT, ale także limfocyty B oraz komórki prezentujące antygen (APC).⁵⁴ Sekrecja IFN γ w tkance przez obecne w niej monocyty, tkankowe makrofagi oraz komórki dendrytyczne prowadzi do ich autoaktywacji oraz sąsiednich komórek.⁵⁴ Makrofagi, komórki dendrytyczne oraz neutrofile wydzielają także IL-18 regulującą ekspresję IFN- γ .⁵⁵ Głównym źródłem IFN γ we wczesnej fazie rozwoju zapalenia są komórki dendrytyczne, makrofagi oraz NK, a z czasem ich miejsce zajmują limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ chemotaktycznie przyciągane do obszaru rozwoju infekcji.⁵⁶ Negatywnymi regulatorami produkcji IFN γ są cytokiny typu Th2, a więc: IL-4, IL-10 oraz cytokina regulatorowa TGF- β oraz glukokortykosteroidy.⁵⁶⁻⁵⁸

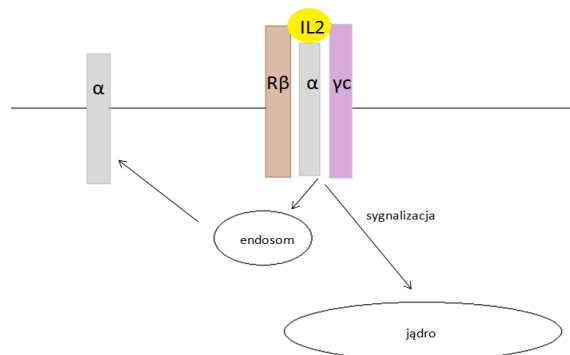
Interferon gamma uczestniczy w obronie przeciwwirusowej oraz zwalczaniu patogenów; wpływa na procesy prezentacji antygenów i ich przetwarzania, uczestniczy w regulacji migracji leukocytów w procesie zapalnym, działa immunomodulująco i hamuje proliferację wybranych grup limfocytów T, uczestniczy w procesach apoptozy leukocytów.⁵⁴ Podstawowe funkcje tej cytokiny opisano w tabeli 1.

Tabela 1: Biologiczne funkcje IFN- γ ⁵⁴

<ul style="list-style-type: none"> •Hamowanie replikacji wirusów.
<ul style="list-style-type: none"> •Pobudzenie własności fagocytarnych makrofagów oraz degradację patogenów poprzez nasilanie produkcji reaktywnych form tlenu (wybuch tlenowy) przez oksydazę NADPH, tlenku azotu NO syntezowanego przez iNOS, oraz dodatknej regulacji ekspresji enzymów lizosomowych. Interferon gamma nasila także własności fagocytarne poprzez zwiększanie ekspresji receptora dla komplementu na fagocytach.
<ul style="list-style-type: none"> •Regulacja migracji leukocytów poprzez zwiększanie ekspresji cytokin (IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1α/β, RANTES) oraz białek adhezji komórkowej (ICAM-1, VCAM-1).
<ul style="list-style-type: none"> •Uczestniczy w zwężaniu światła naczyń krwionośnych wspólnie z NO prowadząc do skurczu komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych, zwolnienia przepływu krwi, co ułatwia wysięk komórek do miejsca zapalenia.
<ul style="list-style-type: none"> •Nasilanie ekspresji białek prezentujących antygen MHC II oraz MHCI, co w rezultacie promuje aktywację limfocytów T CD4+.
<ul style="list-style-type: none"> •Działanie proapoptoczne w stosunku do limfocytów Th2 oraz hamowanie ich proliferacji.
<ul style="list-style-type: none"> •Regulacja funkcjonowania limfocytów B poprzez antagonistyczne w stosunku do IL-4 hamowanie ekspresji receptora FcϵRII dla IgE i promowanie syntezy IgG łączącej się z komplementem.

4. Charakterystyka interleukiny 2

Receptor interleukiny 2 (IL-2) składa się z trzech łańcuchów: IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) oraz γ c (CD132).⁵⁹ Powstały kompleks jest wchłaniany przez komórki; IL-2r α wraca do błony komórkowej, natomiast pozostałe łańcuchy R β oraz γ c ulegają degradacji w endosomach. Łańcuchy R β oraz γ c są również wykorzystywane do przekazu sygnału od IL-15.⁶⁰



Ryc.3 Schemat oddziaływania IL2 z receptorem komórkowym

Funkcjonalność receptora dla IL-2 zależy od ekspresji głównie łańcucha α przejściowo obecnego na

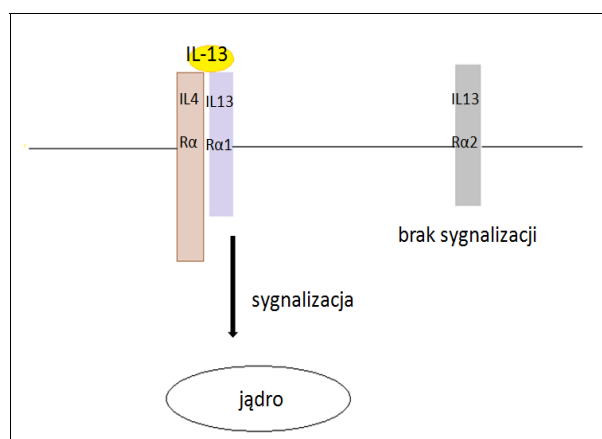
komórkach - jego ekspresja jest indukowana dopiero po aktywacji antygenem na limfocytach Th naiwnych oraz T regulatorowych. Łańcuch β wykazuje ciągłą ekspresję na komórkach NK, NKT oraz limfocytach T pamięci CD8⁺ oraz na limfocytach Th naiwnych po aktywacji antygenem. Z kolei ekspresja łańcucha γ jest ciągła na wszystkich limfocytach.⁵⁹ Do komórek wydzielających IL-2 należą: limfocyty CD4⁺ oraz CD8⁺ pod wpływem stymulacji antygenem, autoreaktywne limfocyty T oraz komórki dendrytyczne.^{59,61} Sygnalizacja związana z IL-2 uczestniczy w procesach tolerancji immunologicznej i autoagresji⁶¹ oraz w procesach związanych z odpowiedzią immunologiczną nabytą⁶² i odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu różnych typów komórek.

Tabela 2: Biologiczne funkcje IL2^{59,61-62}

<p>Limfocyty nTreg grasiczozależne wykazują silną ekspresję receptora IL-2Rα, ponieważ IL-2 odgrywa istotną rolę w dojrzewaniu i funkcjonowaniu tych komórek. Jest też ważna w funkcjonowaniu peryferycznych limfocytów T regulatorowych, jednakże mechanizm jej działania jest słabo poznany.</p>
<p>Komórki T pamięci wydzielają IL-2, ale także limfocyty T CD4⁺ oraz CD8⁺. W przypadku komórek T pamięci przypuszcza się, że ta cytokina wpływa na aktywację tych komórek podczas ponownego kontaktu z antygenem. IL-2 należy także do grupy cytokin wydzielanych po pobudzeniu antygenem przez limfocyty Th0/Th1 i promuje mechanizm odpowiedzi typu komórkowego. Uczestniczy też w końcowym różnicowaniu limfocytów efektorowych cytotoksycznych CD8⁺.</p>
<p>IL-2 hamuje procesy autoagresji. Limfocyty T posiadające receptor TLR specyficzny względem własnych autoantygenów po kontakcie z nimi w grasicy wydzielają IL-2, co pozwala na ich identyfikację oraz usunięcie poprzez indukcję apoptozy. Przypuszcza się, że komórki dendrytyczne prezentujące autoantygeny wydzielają IL-2 działającą chemotaktycznie na limfocyty T.</p>

5. Charakterystyka interleukiny 13

Istnieją dwa rodzaje receptora dla IL-13. Pierwszy z nich to heterodimer składający się z łańcucha rozpoznającego również IL-4, stąd też został nazwany IL-4R α oraz z łańcucha IL-13R α 1. Jest to funkcjonalny receptor, którego pobudzenie poprzez związanie IL-13 do łańcucha α 1 prowadzi do aktywacji sygnalizacji wewnątrzkomórkowej i transkrypcji genów. Drugi typ receptora dla IL13 zawiera łańcuch IL-13R α 2 zamiast α 1 i nie prowadzi do transdukcji sygnału. Pełni on funkcje regulatorowe i występuje zarówno jako białko transbłonowe oraz rozpuszczalne tj. nie związane z błoną komórkową, które hamuje sygnalizację pochodzącą od IL-13 poprzez wiązanie tej cytokiny i uniemożliwienie jej kontaktu z IL-13R α 1.⁶³



Ryc.4 Schemat oddziaływania IL13 z receptorem komórkowym

Receptory dla IL-13 wykryto na komórkach hematopoetycznych: limfocytach B, monocytach i makrofagach, bazofilach, eozynofilach i mastocytach oraz na komórkach niehematopoetycznych takich jak: komórki endotelialne, fibroblasty, epitelialnych nabłonka oddechowego i komórkach mięśni gładkich.⁶⁴⁻⁶⁸ Interleukina 13 jest związana z funkcjonowaniem różnych typów komórek.

Tabela 3: Biologiczne funkcje IL13⁶⁸

Eozynofile - promuje ich przeżywanie, aktywację i rekrutację do miejsca zapalenia.
Mastocyty – aktywacja.
Komórki endotelialne - indukuje ekspresję molekuly adhezyjnej ICAM-1 istotnej podczas rekrutacji komórek do obszaru zapalenia.
Komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych – nasilanie skurczu.
Fibroblasty – indukcja syntezy kolagenu typu I w fibroblastach.
Monocyty i makrofagi- wzmacnia ekspresję integryn istotnych podczas adhezji: CD11b, CD11c, CD18, CD29. Dodatkowo, indukuje ekspresję MHC II oraz CD23. Hamuje ekspresję prozapalnych mediatorów przez te komórki: prostaglandyny, ROS, NOS, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α .
Limfocyty B- promuje ich proliferację oraz przełączanie klas na IgG4 i IgE.

6. Gronkowiec złocisty w atopowym zapaleniu skóry

Gronkowiec złocisty to gram-dodatnia bakteria nie należąca do ludzkiej naturalnej flory mikrobiologicznej, dlatego też zasiedlenie organizmu przez szczepy gronkowca złocistego wywołuje zaburzenia funkcjonowania organizmu w postaci różnych obrazów klinicznych zależnych od miejsca zakażenia bakterią.^{69,70} Gronkowiec złocisty występuje na skórze i błonie śluzowej

nosa.⁷⁰ Najwięcej zakażeń szpitalnych jest powodowanych przez metycylinooporne szczepy *S. aureus*.⁷¹ W przypadku zakażeń gronkowcem złocistym w miejscu wyprysku pojawiają się miodowo-żółte strupy, a nasilone sączenie i nawarstwione strupy w obrębie wyprysku są z reguły wywoływane wtórnym zakażeniem *Staphylococcus aureus*.⁷² Aż u 53% dzieci cierpiących na atopowe zapalenie skóry wykrywane są szczepy gronkowca złocistego produkujące toksyny. Kolonizacja w obrębie zmian w AZS waha się od 76-100%, a w obszarach skóry niezmienionej od 51%- 100%. Dla przykładu nosicielstwo *S. aureus* u osób zdrowych waha się od 2 do 32%. Gęstość kolonizacji *S. aureus* koreluje ze stanem zapalnym skóry i zwiększa się aż 1000-krotnie w stanie zaostrzenia choroby (ponad 10 milionów bakterii/cm² w ostrych, sączących zmianach nadżerkowych).⁷²⁻⁷³ Istnieje szereg czynników wpływających na kolonizację skóry chorych z AZS przez *Staphylococcus aureus*, co przedstawia poniższa tabela:

Tabela 4: Czynniki wpływające na kolonizację skóry przez *S. aureus*⁷⁴⁻⁷⁸

wysuszenie skóry oraz mutacje w genie filagryny prowadzi do pęknięcia naskórka i ułatwia wnikanie patogenów do wnętrza skóry
świąd i drapanie zwiększa ekspozycję białek macierzy zewnątrzkomórkowej naskórka (fibronektyna, fibrynogen, elastyna, laminina i kolagen) i ułatwia wiązanie <i>S. aureus</i> do tych białek poprzez tzw. adhezyny gronkowcowe specyficzne względem fibronektyny i fibrynogenu znajdujące się w ścianie komórkowej bakterii. W rezultacie dochodzi do silnego ich przylegania do powierzchni skóry. Produkcja IL-4 przez limfocyty Th2 w stanie zaostrzenia objawów AZS pobudza fibroblasty do zwiększonej produkcji białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Tak więc rozwój mechanizmów Th2-zależnych promuje infekcje gronkowcem złocistym
utrata wrodzonej aktywności przeciwbakteryjnej na skutek zaburzenia syntezy peptydów antybakteryjnych CLL-37 i β -defensyny przez keratynocyty hamowane przez cytokiny typu Th2
niedobór mechanizmów odpowiedzi typu Th1 związanych z cytolityczną aktywnością limfocytów Tc oraz obniżenie poziomu sekrecji IL-8 oraz IFN γ przez monocyty w fazie zaostrzenia AZS

Zadaniem egzotoksyn wydzielanych przez *S. aureus* jest aktywacja komórek układu odpornościowego do produkcji cytokin.⁷⁹ Enterotoksyny (SE), które stymulują uwalnianie cytokin z limfocytów T CD4+ oraz CD8+ i makrofagów klasyfikuje się jako: A-E i G-J oraz TSST-1, a także białka o podobnej strukturze, u których nie wykryto albo jeszcze nie zbadano ich biologicznych właściwości. Te białka określa się jako enterotoksynopodobne (SEL) i należą do nich: K-R, K2, V, ET1-5, S-T.^{79,80} Do czynników o potencjale immunogennym należy także peptydoglikan ściany

komórkowej *Staphylococcus aureus*.⁸¹ W atopowym zapaleniu skóry wykazano istnienie mechanizmu poliklonalnej nadreaktywności na superantygeny białek bakteryjnych.⁸⁰ Enterotoksyny są to białka o masie od 23 do 29 kDa składające się z dwóch domen o strukturze kartki tj. struktur β połączonych α -helikalnym łańcuchem. Poprzez zdolność do równoczesnego łączenia się z HLA-DR na komórkach prezentujących antygen oraz częścią receptora TCR na limfocytach CD4+ lub CD8+ enterotoksyny indukują pobudzenie tych komórek. Wiążą się poprzez hydrofobowe oddziaływania między enterotoksyną a zewnętrzną częścią HLA-DR tzw. domeną α będącą poza kieszenią prezentującą peptyd na komórkach APC na drodze słabego powinowactwa w przypadku SEB i TSST-1.⁸² Natomiast SEA dodatkowo oddziałuje jeszcze na drodze silnego powinowactwa z domeną β HLA-DR przy udziale jonu cynku.⁸³ W przypadku limfocytów T CD4+ i CD8+ z enterotoksyną oddziałuje wchodzący w skład receptora TCR łańcuch V typu α (SEH) lub typu β , jeśli są to inne enterotoksyny. Ponieważ wiązanie odbywa się poza miejscem rozpoznania antygeny przez receptor TCR, więc jest zależne tylko od rodzaju łańcucha V tego receptora.⁸² Wykazano, że każda enterotoksyna preferuje tylko pewną grupę łańcucha V receptora TCR np. SEB oddziałuje z V β : 3, 8, 12, 14 i 17. Dzięki temu pobudzają one nie tylko jeden klon limfocytów swoiście rozpoznających antygen, tak jak klasyczne antygeny, lecz wszystkie klony limfocytów mające daną odmianę łańcucha V β receptora TCR bez względu na jego swoistość (a więc różne klony limfocytów T). Dzięki takiemu niespecyficznemu mechanizmowi superantygen jest w stanie stymulować do 20% naiwnych limfocytów T, co w rezultacie prowadzi do 10-100 krotnie większej liczby pobudzonych limfocytów T w porównaniu z klasycznym antygenem.⁸² Tak więc widać, że *S. aureus* w pewien sposób może selekcjonować typy klonów limfocytów T obecnych u nosiciela gronkowca złocistego. Wybrane grupy limfocytów T mające odmianę TCR oddziałującą z daną enterotoksyną produkowaną przez szczep *S. aureus* pacjenta mogą ulegać aktywacji na skutek stymulacji superantygenem, co w rezultacie może zwiększać reaktywność tych limfocytów T na antygeny/alergeny. Wydaje się więc, że enterotoksyny mogą więc modulować reaktywność układu immunologicznego i wpływać na nasilenie odpowiedzi na alergeny. Keratynocyty i komórki Langerhansa oddziałują z enterotoksynami i prezentują je limfocytom T.^{84,85} Skutkiem aktywacji limfocytów T przez enterotoksyny gronkowcowe jest wydzielanie licznych cytokin prozapalnych, w tym: TNF α , IL2, IL4, IL5, IL6 oraz IFN γ , IL12.^{84,85} Wykazano, że u pacjentów z AZS są obecne przeciwciała klasy IgE specyficzne względem enterotoksynom A i B.⁸⁶ Te przeciwciała mogą wiązać się do mastocytów i/lub bazofili i indukować wydzielanie histaminy i rozwój zapalenia⁸⁷. Ponadto enterotoksyny wpływają na zasiedlanie skóry przez komórki jednojądrzaste krwi, sprzyjają przełamaniu tolerancji immunologicznej i rozwojowi autoagresji.^{88,89} Enterotoksyny indukują ekspresję CLA na mononuklearnych komórkach krwi obwodowej (PBMC), co sprzyja migracji

komórek mononuklearnych do skóry i rozwojowi późnej reakcji alergicznej. Uważa się, że zachodzi to m.in. przy udziale IL-12.⁹⁰ Biorą także udział w apoptozie komórek jednojądrzastych krwi.⁹¹

Przypuszcza się, że enterotoksyny mogą przyczyniać się do rozwoju mechanizmów autoimmunologicznych poprzez aktywowanie limfocytów T specyficznych względem autoantygenów.^{88,89} Aktywacja ta wydaje się mieć charakter losowy i zależeć od tego, czy limfocyty specyficzne względem autoantygenów znajdują się w grupie komórek posiadających łańcuch V receptora TCR, względem którego enterotoksyny produkowane przez szczepy pacjenta wykazują wysokie powinowactwo. Dotychczas jednak nie wykazano istnienia takich mechanizmów w atopowym zapaleniu skóry. Jednakże pokazano, że superantygeny wpływają na aktywność limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+ w AZS.⁹²

Zabserwowano, że enterotoksyny mają skłonność do pobudzania komórek mononuklearnych do apoptozy w stanach silnego nasilenia objawów AZS. Stymulacja PBMC enterotoksyną B in vitro prowadziła do pojawienia się wczesnego markera apoptozy (APO 2.7) w przypadku aż 60% komórek oraz dochodziło także do znacznego zahamowania proliferacji PBMC. W przypadkach łagodnych zmian AZS było to już tylko 20%, a u osób zdrowych tylko 5% osób wykazywało ekspresję białka APO 2.7.⁹¹ Wydaje się więc, że podwójne pobudzanie PBMC przez alergeny, a potem superantygeny może prowadzić do zaburzenia w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, a w rezultacie kierować komórki na drogę programowanej śmierci.

Zaburzenia w sygnalizacji molekularnej dotyczącej receptorów TLR (Toll-like receptors) mogą prowadzić m.in. do zwiększonej podatności na infekcje gronkowcem złocistym oraz wirusem opryszczki.⁹³ Oba wspomniane patogeny wiążą się z TLR2.⁹⁴ Aktywacja receptorów TLR następuje po ich związaniu do peptydoglikanu (PEG) wchodzącego w skład ściany komórkowej gram-dodatnich bakterii, do których należy *S. aureus* i prowadzi do aktywacji m.in. bazofili oraz monocytów.^{81,87}

7. Roztocze kurzu domowego w atopowym zapaleniu skóry

Roztocze kurzu domowego to 8-nożny bezkręgowiec należący do subklasy *Acari* o długości 170- 500 μm . W klimacie umiarkowanym dominują takie gatunki jak: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Euroglyphus maynei*.⁹⁶ Niezależnie od gatunku, roztocza kurzu domowego preferują ciemne miejsca o wilgotności od 65 do 80% o temperaturze od 20 do 30°C. Takie warunki mają związek z fizjologią roztoczy, u których wymiana gazowa i osmoregulacja odbywa się poprzez kutikulę, co sprawia, że ich procesy życiowe są zależne od dużej wilgotności otoczenia.⁹⁷ Żywe roztocza kurzu domowego nie są alergenne, natomiast proteazy

układu pokarmowego pochodzące z produktów ich rozpadu, odchodów oraz płynu pojawiającego się podczas przemian larwalnych wykazują silnie alergizujące własności. Do najsilniejszych alergenów roztoczowych należą proteazy serynowe i cysteinowe o masie 25-30 kDa, do których należą wydzielane przez *Dermatophagoides pteronyssinus*: Derp1 (papainopodobna proteaza cysteinowa), Derp2, Derp3 (trypsyna), Derp6 (chymotrypsyna) oraz Derp9 (kolagenolityczna proteaza serynowa).⁹⁷ Zgodnie z opisem podanym przez Związek Alergologii Klinicznej i Immunologii (Association of Allergology and Clinical Immunology) nadwrażliwość na alergeny roztocza kurzu domowego pojawia się już od 2 µg Derp1 (100 sztuk *D. pteronyssinus*) / 1 gram kurzu u genetycznie predysponowanych osobników do syntezy IgE specyficznych względem alergenów roztocza kurzu domowego. Powyżej 10 µg Derp1 (500 sztuk *D. pteronyssinus*) / 1 gram kurzu wzrasta ryzyko ataku astmy alergicznej u pacjentów z nadwrażliwością roztoczową.⁹⁷ Alergia roztoczowa jest coraz częściej uznawana za chorobę genetyczną przekazywaną pokoleniowo i ulegającą nasilaniu w kolejnych generacjach. Kliniczny obraz alergii roztoczowej może mieć związek z rozwojem atopowego zapalenia skóry, astmy alergicznej, alergicznego nieżytu oczu i nosa, pokrzywki.⁹⁸ Warto w tym miejscu wspomnieć, że aż do 75% pacjentów ze zdiagnozowanym AZS ma dodatnie testy punktowe i/lub specyficzne IgE dla *Dermatophagoides pteronyssinus*⁹⁹, co oznacza, że alergia roztoczowa odgrywa istotną rolę w patogenezie AZS. Wnikające w uszkodzoną skórę proteazy roztoczowe mają zdolność do degradowania połączeń desmosomowych i białek połączeń szczelinowych (tight junction) tzw. okludynę i klaudynę oraz E-kadherynę łączących komórki epidermy, co znacznie ułatwia migrację alergenów roztoczowych przez warstwy naskórka.¹⁰⁰ Ponadto mutacja w genie SPINK5 kodującym inhibitor proteinaz serynowych, która może wystąpić w atopowym zapaleniu skóry, prowadzi do osłabienia ochrony przed aktywnością proteaz¹⁰¹, co w rezultacie ułatwia degradację naskórka przez enzymy roztoczowe. Alergeny roztoczowe kontaktują się z obecnymi w skórze komórkami rezydentnymi (keratynocyty, fibroblasty, komórki endotelialne) i migrującymi (makrofagi, komórki mastocytarne i Langerhansa oraz leukocytami).¹⁰²⁻¹⁰⁷ Alergeny roztocza kurzu domowego *Dermatophagoides pteronyssinus* i *farinae* uczestniczą w aktywacji licznych molekularnych mechanizmów.

Tabela 5: Molekularne mechanizmy aktywowane przez alergeny *D. pteronyssinus* ¹⁰³⁻¹⁰⁷

Aktywacja ekspresji MHC klasy II i CD80 na keratynocytach pozwala na prezentację antygenów limfocytom T i indukcję ekspresji ICAM-1 i VCAM-1 oraz E-selektyn na ludzkich komórkach endotelialnych, co ułatwia wysięk komórek immunologicznych do skóry. Dodatkowo, alergeny *D. pteronyssinus* i *D. farinae* stymulują sekrecję leukocytarnego czynnika chemotaktycznego GRO- α z keratynocytów.

Pobudzenie fibroblastów skóry do wydzielania IL-6, IL-8, MCP-1 oraz M-CSF.
Pobudzanie komórek dendrytycznych do produkcji IL-6 i IL-12 oraz ekspresji takich białek powierzchniowych jak: CD40, CD80, CD86 i MHCII. Pobudzenie komórek dendrytycznych przez Derp1 prowadzi do rozwoju populacji limfocytów Th2 w AZS, ale nie u zdrowych osób.
Aktywacja komórek mastocytarnych i ich degranulacja oraz indukcja eozynofili do sekrecji IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , GM-CSF, a także ekspresja CD18.
Na przykładzie linii monocytów THP-1 in vitro wykazano, że alergen roztoczowy zwiększają ekspresję MCP-1, IL-6 oraz IL-8 w tych komórkach.

Enzymatyczne własności alergenów roztoczowych prowadzą do wzrostu aktywności proteolitycznej w surowicy krwi na skutek inaktywacji α 1 antytrypsyny przez te alergeny.¹⁰⁸ Dodatkowo Derp1 katalizuje hydrolizę receptora IgE typu 2 CD23 i uwalnianie go z powierzchni limfocytów B. Wzrost stężenia receptora CD23 w formie rozpuszczalnej tj. nie związanej z błoną komórkową we krwi aktywuje limfocyty B do zwiększonej produkcji IgE, która jest wychwytywana przez rozpuszczalną postać receptora (nie związaną z błoną komórkową limfocytów B). Z kolei niedobór CD23 na limfocytach B, będący skutkiem aktywności proteolitycznej Derp1, powoduje, że nie dochodzi do wysycenia tego receptora obecnego na limfocytach B, a w rezultacie nie jest hamowana synteza tej immunoglobuliny. Niedobór transbłonowego CD23 hamuje też aktywację monocytów i makrofagów.¹⁰⁹ Z kolei uwalnianie receptora dla IL-2 CD25 z błony komórkowej przez Derp1 hamuje proliferację limfocytów Th1 i produkcję IFN- γ in vitro.¹¹⁰ Proteiny *Dermatophagoides pteronyssinus* aktywują też receptory typu PAR (Protease Activated Receptors) aktywowane przez proteiny obecne na fibroblastach, mastocytach, neutrofilach, monocytach i makrofagach, limfocytach, komórkach mięśni gładkich oraz komórkach endotelialnych naczyń krwionośnych i epitelialnych płuc, neuronach. Aktywacja receptorów PAR wiąże się więc z uwalnianiem mediatorów stanu zapalnego, zwiększa przepuszczalność naczyń i infiltrację leukocytów do skóry.¹¹¹⁻¹¹³

8. Nikiel w atopowym zapaleniu skóry

Nikiel należy do grupy metali przejściowych, które dążą do osiągnięcia najniższego, a więc najkorzystniejszego z punktu widzenia zasad termodynamiki, stanu energetycznego poprzez całkowite wypełnienie powłok elektronami pochodzącymi od atomów pierwiastków, z którymi tworzą wiązania chemiczne. Ten mechanizm tłumaczy wysoką reaktywność niklu prowadzącą do formowania związków chemicznych oraz biologicznych. Nikiel należy do szeroko

rozpowszechnionych pierwiastków na ziemi i jest obecny w glebie, wodzie, powietrzu oraz biosferze i pełni szereg funkcji w układach biologicznych.

Tabela 6: Biologiczne znaczenie niklu¹¹⁴⁻¹¹⁵

Prawidłowe funkcjonowanie roślin i mikroorganizmów - nikiel wchodzi w skład metaloenzymów występujących w mikroorganizmach, bezkręgowcach oraz roślinach ureaz, bakteryjnych hydrogenaz np. reduktazy metylowej u metanobakterii, dehydrogenazy tlenku węgla.
Pobudzanie enzymów ludzkich tkanek np. tyrozynazy, arginazy, deoksyrybonukleazy, fosfoglukomatazy, kalcyneuryny oraz enzymów przewodu pokarmowego. Uczestniczy także w zwiększaniu aktywności hormonalnej, stabilizacji struktur kwasów nukleinowych, wpływa na procesy erytropoezy poprzez uczestnictwo w metabolizmie witaminy B12 i wchłanianie żelaza z przewodu pokarmowego.
Uczestniczy także w procesie peroksydacji lipidów poprzez formowanie reaktywnych form tlenu i rozwój stresu oksydacyjnego. Wzrost peroksydacji lipidów hamuje agregację płytek krwi.

Nikiel zaliczany jest do grupy ksenobiotyków obecnych w środowisku na skutek skażenia, co może prowadzić do zatruć ostrych i przewlekłych, chorób nowotworowych dróg oddechowych i przewodu pokarmowego, zmian alergicznych typu I i IV manifestujących się jako AZS, AK, pokrzywki współistniejącej z objawem brzuszny, limfoidalnego zapalenia kontaktowego (lymphomatoid contact dermatitis) lub o charakterze zawodowym tj. alergiczna astma na metale i nieżyt nosa oraz spojówek tj. hard metal asthma i hard metal rhinitis. Z kolei ekspozycja śluzówki jamy ustnej na nikiel u ludzi uczulonych na ten pierwiastek może wywołać odpowiedź systemową (Systemic Contact Dermatitis), której ujawnieniu dodatkowo sprzyja alergia dróg oddechowych.¹¹⁴ Do czynników ryzyka rozwoju alergii niklowej oprócz płci żeńskiej i noszenia sztucznej biżuterii należy też palenie papierosów, natomiast wpływ atopii jak również czynników genetycznych na rozwój alergii niklowej nadal pozostaje niejasny.¹¹⁶⁻¹²⁰ Natomiast kontakt błony śluzowej jamy ustnej z niklem np. w przypadku noszenia aparatów ortodontycznych prawdopodobnie zmniejsza ryzyko rozwoju alergii skórnej na ten pierwiastek w późniejszym okresie życia.¹¹⁷ Do grup wysokiego ryzyka rozwoju alergii niklowej należy młodzież i kobiety, które uczulają się 4-krotnie częściej niż mężczyźni, co wydaje się mieć związek z tzw. piercingiem u młodzieży oraz noszeniem biżuterii przez kobiety.¹¹⁶⁻¹¹⁷ Uczulenie na ten metal stwierdza się u 13-17% dorosłych, 10% nastolatków oraz u 8% dzieci.¹²⁰ Nikiel wchodzi w skład sztucznej biżuterii, zegarków i metalowych elementów odzieży np. guzików i sprzączek. Jest też obecny w protezach stawowych, gwoździach śródkostnych, stymulatorach serca, protezach dentystycznych i dlatego

może być przyczyną odrzucania implantów stomatologicznych i ortopedycznych. Wchodzi też w skład igieł do wstrzyknięć i akupunktury, metalowych opakowań żywnościowych, uwalnia się także z narzędzi i naczyń kuchennych zwłaszcza podczas gotowania pokarmów o niskim pH.^{114,120} Jego obecność wykryto również w warzywach, a w szczególności w ziemniakach, pomidorach, marchwi, sałacie, szpinaku, cebuli, rabarbarze, kukurydzy, szparagach, fasoli i grochu. Jest też obecny w kakao, czekoladzie, orzechach, śledziach, ostrygach i grzybach oraz wodzie z kranu, herbacie, winie i piwie, a także w proszku do pieczenia ciast i grubo mielonej mące.¹¹⁵ Nikiel wnika do organizmu przez skórę, drogi oddechowe i przewód pokarmowy w ilości 300-600 mikrogramów/dzień, z czego tylko 5-10% jest wchłaniana w przewodzie pokarmowym, natomiast reszta jest usuwana z kałem.¹¹⁴ Mechanizmy alergii na nikiel są bardzo zróżnicowane, co determinuje obraz kliniczny wielopostaciowej alergii na nikiel, który m.in. zależy od rodzaju cytokin produkowanych przez poszczególne podklasy limfocytów. W reakcji systemowej na nikiel, alergicznym nieżycie nosa, alergicznej astmie oskrzelowej, wyprysku rozproszonym istotną rolę odgrywa aktywacja limfocytów Th2 i ich cytokiny: IL-4, IL-5 i IL13. Dojrzewające komórki efektorowe podlegają regulacji przez mediatory zapalenia, ale również są zależne od środowiska cytokinowego. Nagromadzenie komórek efektorowych w wybranym narządzie prowadzi do rozwoju w nim zapalenia alergicznego. Nikiel stymuluje ekspresję białek kostymulujących CD83 i CD86, a także chemokin CXCL8, CCL5, CCL17, CCL20, co sugeruje, że nikiel sprzyja oddziaływaniom międzykomórkowym oraz ułatwia migrację komórek do narządów.¹²¹⁻¹²³ Uważa się, że nikiel może zapoczątkowywać reakcję alergiczną na drodze kilku mechanizmów podczas prezentacji białkowego kompleksu niklu przez komórki Langerhansa limfocytom T CD4+ lub CD8+.

Tabela 7: Molekularne mechanizmy działania niklu^{121-125, 127}

Nikiel będący haptenem tworzy wiązania koordynacyjne z białkami zewnątrzkomórkowymi lub wewnątrzkomórkowymi tworząc płaskie, prostokątne kompleksy z resztami histydyny lub z grupami aminowymi tworząc z nimi ośmiościenne kompleksy. W przypadku białek zewnątrzkomórkowych powstałe kompleksy są prezentowane przez cząsteczki MHC II obecne na komórkach dendrytycznych.
W przypadku wchłaniania niklu przez komórki prezentujące antygen i wiązania się tego metalu z białkami wewnątrzkomórkowymi powstałe kompleksy są prezentowane przez cząsteczki MHC I.
Podejrzewa się też, że nikiel może niespecyficznie wiązać równocześnie cząsteczki MHC oraz receptor TCR limfocytów T CD4+ oraz CD8+ podobnie jak superantygeny
Zaburzenie homeostazy oksydoredukcyjnej i formowanie nadmiernej ilości reaktywnych form tlenu i azotu, co może prowadzić do rozwoju stresu oksydacyjnego, niszczenia tkanek oraz

zaburzenia sygnalizacji komórkowej oraz sekrecji cytokin.

Pobudzone przez APC limfocyty CD4+ i CD8+ poprzez aktywację receptora TLR¹²⁶ wydzielają cytokiny uczestniczące w tworzeniu obrazu klinicznego alergii nikielowej.

Tabela 8: Kliniczne obrazy alergii na nikiel¹²⁸

Miejscowa lokalizacja zmian typowa dla alergicznego kontaktowego zapalenia skóry wywołana przez odczyn zapalny z przewagą monocytów, w którym uczestniczą makrofagi tkankowe i limfocyty Th1. Wydzielane są takie cytokiny jak IFN- γ , IL-1, IL-2, TNF- α . Ten typ reakcji łączy się często z IVc tworząc obraz kliniczny alergicznego, kontaktowego zapalenia skóry- typ IV a
Zmiany grudkowo-plamiste wywołane przez zapalenie eozynofilowe, w którym uczestniczą też limfocyty Th2 wydzielające takie cytokiny jak: IL-4, IL-5, IL-13- typ IV b
Reakcje pęcherzowe charakteryzujące się apoptozą keratynocytów na skutek nagromadzenia się w skórze limfocytów T CD8+ cytotoksycznych oraz komórek NK kierujących keratynocyty na drogę programowanej śmierci poprzez oddziaływanie Fas-FasL, perforynę oraz granzym B – typ IV c
Zmiany krostkowe wywołane przez odczyn zapalny z przewagą neutrofilów. W przypadku tego obrazu klinicznego również są istotne monocyty oraz limfocyty T CD4+ i CD8+. Głównymi mediatorami zapalenia są IL-8 oraz GM-CSF – typ IV d

Poszczególne typy mechanizmów zachodzą na siebie, jednakże w większości przypadków jeden z nich dominuje. Jak pokazały badania przeprowadzone na mysim modelu kompleksy białkowe niklu mogą wiązać się z resztami histydynowymi receptora TLR-4 (obecnego na makrofagach) zaangażowanego w zwalczanie patogenów, co w rezultacie może prowadzić do rozwoju reakcji zapalnej.¹²⁶ Receptory typu TLR występują również na limfocytach T regulatorowych, co może oznaczać, że patogeneza alergii na nikiel może mieć również związek z modulacją funkcjonowania limfocytów T regulatorowych, a więc wpływać na procesy tolerancji antygenów i autoantygenów.¹²⁹

II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

1. Przesłanki do podjęcia badań

Terapie stosowane w leczeniu atopowego zapalenia skóry powinny dążyć do utrzymania molekularnych mechanizmów immunologicznych charakterystycznych dla fazy remisji choroby, dlatego też badanie mechanizmów komórkowych przejścia z fazy zaostrzenia w fazę remisji jest istotne w celu tworzenia farmakoterapii stymulujących molekularne mechanizmy dominujące w remisji AZS. Niestety, duża niejednorodność obrazów klinicznych AZS tj. współwystępowanie z AZS innych chorób alergicznych, uczulenie na wiele/kilka różnych alergenów utrudnia stworzenie właściwego modelu patogenezy AZS, a stosowane dotychczas terapie niejednokrotnie nie przynoszą oczekiwanego skutku leczniczego. Okazuje się, że terapia IFN γ zmniejsza nasilenie zmian skórnych, ale nie usuwa przyczyny – poziom surowiczej IgE nie ulega zmianie. Odczulająca immunoterapia swoista (SIT) stosowana przy leczeniu alergii na roztocze kurzu domowego nie zawsze jest skuteczna. Szczepionka alergenem przesuwa równowagę immunologiczną puli limfocytarnej Th2 przeważającej w zaostrzeniu choroby w kierunku puli Th1 dominującej w remisji AZS. Skoro jednak nie zawsze SIT umożliwia odczulenie pacjenta, to w takim razie nadal istnieje potrzeba badania oddziaływań limfocytów Th1 i Th2 w atopowym zapaleniu skóry. Okazuje się także, że autoszczepionki gronkowcowe również nie przynoszą oczekiwanych efektów w leczeniu infekcji gronkowcowych u chorych z AZS. Powszechność kontaktowej alergii niklowej u chorych z AZS nasuwa przypuszczenie, że ten czynnik może być istotny w patogenezie choroby, modulując molekularne mechanizmy leżące u jej podstaw.

2. Cel pracy

Badanie reaktywności PBMC pobranych od chorych z AZS w zaostrzeniu i remisji oraz od osób zdrowych – kontrolnych na siarczan niklu, antygen D1 (a.D1) roztocza kurzu domowego *Dermatophagides pteronyssinus* oraz enterotoksyny A i B gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* in vitro.

3. Cele szczegółowe

1. Porównanie profili cytokinowych (IFN γ , IL2, IL13) fazy zaostrzenia i remisji AZS
2. Porównanie profili cytokinowych (IFN γ , IL2, IL13) obu faz AZS i osób zdrowych-kontrolnych
3. Zbadanie wpływu mechanizmów IgE-zależnych na profile cytokinowe w obu fazach AZS
4. Zbadanie wpływu dawkozależności siarczanu niklu i a. D1 na profile cytokinowe obu faz AZS

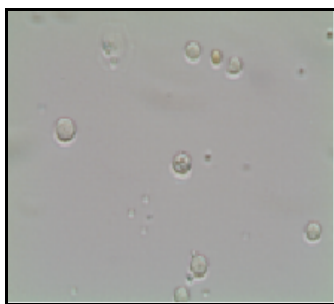
III. MATERIAŁY I METODY

Pacjenci

Badanie przeprowadzono u 30 chorych z atopowym zapaleniem skóry (AZS) w okresie zaostrzenia objawów i remisji choroby, leczonych w Zakładzie Alergologii Klinicznej i Środowiskowej Katedry Toksykologii i Chorób Środowiskowych UJCM oraz u 30 osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną. Rozpoznanie AZS oparto o wywiad i badanie kliniczne oparte na kryteriach Haniffina i Rajki w okresie nawrotu zmian chorobowych. U chorych w okresie remisji wykonano testy skórne punktowe (STP) z inhalantami i pokarmami oraz testy płatkowe z 10 podstawowymi alergenami kontaktowymi tzw. zestawem europejskim. Nasilenie zmian skórnych ocenianych w okresie zaostrzenia objawów choroby podawano jako wartość uśrednioną na podstawie znajomości historii choroby pacjenta i oceniano w skali SCORAD. Pacjentów w fazie zaostrzenia i remisji AZS kwalifikował lekarz - alergolog/dermatolog. Grupa kontrolna to osoby zdrowe bez objawów alergicznych i z ujemnym wywiadem rodzinnym w kierunku alergii i skórnych chorób dermatologicznych. Badania wchodzące w zakres niniejszej pracy były wykonane za zgodą uczestników i uzyskały akceptację Komisji Etycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Nr KBET/61/B/2009. W grupie kontrolnej wykonano skórne testy punktowe z antygenem *Dermatophagoides pteronyssinus* (D1) produkcji Allergopharma oraz testy płatkowe z 5% siarczanem niklu (Chemotechnique) oraz z autoszczepionkami z *S. aureus*. W surowicy badanych oznaczono poziom całkowitej IgE (tIgE) i poziom swoistych IgE dla roztoczy (asIgE D1), enterotoksyn A i B gronkowca złocistego (asIgE SEA i SEB), autoprzeciwciała dsDNA i ANA* metodą fluoroenzymatyczną (UniCAP 100, Pharmacia Upjohn). Te wyniki w grupie chorych z AZS były już znane i na ich podstawie dokonano klasyfikacji chorych do grupy badawczej.

Hodowle komórkowe

Celem oceny reaktywności komórek jednojądrzastych krwi (PBMC) chorym z AZS oraz osobom z grupy kontrolnej pobierano 15 ml krwi (na EDTA), izolowano PBMC metodą gradientu gęstości na Ficollu. Komórki liczone w komorze Bürkera i wysiewano na płytki hodowlane. Żywotność komórek oceniano przy pomocy błękitu trypanu (100µl r-ru PBMC + 100 µl barwnika) przy użyciu



pobierano 15 ml krwi (na EDTA), gradientu gęstości na Ficollu. Bürkera i wysiewano na płytki oceniano przy pomocy w medium hodowlanym mikroskopu świetlnego.

Ryc.5: PBMC w komorze Bürkera po wyizolowaniu na gradiencie Ficollu.

Rozdzielczość: 2500x Fot. własna (mikroskop Olympus SC30)

Hodowle komórkowe przeprowadzono w inkubatorze (37°C, 5%CO₂, 95% RH). PBMC hodowano na płytkach U- dennych 96 dołkowych w trzech powtórzeniach dla każdego stymulanta przez 24 godziny indukując je badanymi substancjami: 1. antygenem D1 roztocza kurzu domowego (0.4 µg/ml oraz 1.0 µg/ml), 2. siarczanem niklu NiSO₄ (25 µM i 50 µM) i 3. gronkowcą enterotoksyną A oraz B w stężeniu 500 ng/ml. W kontroli dodatniej PBMC stymulowano mitogenem L- fitohemaglutyną (L-PHA) o stężeniu 10 µg/ml dla oznaczenia sekrecji IL-2 oraz 5 µg/ml dla oznaczenia wydzielania IFN-γ i IL-13. Jako kontroli negatywnej użyto niestymulowanych PBMC dla oceny spontanicznej sekrecji cytokin. Kontrolę specyficzności barwienia stanowi membrana opłaszczona przeciwciałami, wypełniona płynem hodowlanym bez komórek. Hodowle komórkowe indukowane stymulantami były przenoszone na 96 dołkowe płytki, w których dna studzienek stanowiły membrany ze związanymi przeciwciałami wychwytyjącymi wydzielane przez PBMC badane cytokiny. Szczegółowy protokół barwienia zamieszczono na stronie 33. Surowicę uzyskaną po odwirowaniu na gradiencie Ficollu od pacjentów z AZS w zaostrzeniu choroby oraz od osób kontrolnych zamrażano w temperaturze – 20°C w celu oznaczenia poziomu przeciwciał klasy IgE oraz autoprzeciwciał.

Diagnostyka in vivo

Testy skórne punktowe- stosowane przy testowaniu alergii na alergeny wziewne i pokarmowe wykrywające mechanizm alergii typu I. Standaryzowany ekstrakt alergenu (Allergopharma) był nakładany na skórę przedramienia chorego i igłą dokonywano nakłucia naskórka na głębokość ok. 1 mm, tak aby nie spowodować krwawienia. Odczytu testu dokonywano po 10 minutach. Notowano średnią średnicę bąbla i rumienia w mm porównując je z odczynem kontroli negatywnej (sól fizjologiczna) i pozytywnej (histamina).

Testy płatkowe (naskórne) wykonywane w celu potwierdzenia alergii kontaktowej (mechanizm alergii typu IV) na chemiczne związki małocząsteczkowe. Badane substancje standaryzowanych ekstraktów (Chemotechnique) oraz szczepionki z zabitego *Staphylococcus aureus*** (szczep wzorcowy oraz dziki od pacjentki ze zdiagnozowanym atopowym zapaleniem skóry – szczepionki przygotowane w Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. dra Jana Bobra w Krakowie) nakładano na skórę pleców lub przedramienia w przypadku *Staphylococcus aureus*. Komory były nasączone roztworami przyklejanymi do skóry plastrem hipoalergicznym i pozostawiane w okluzji na 48 godzin. Po tym czasie komory były odklejane od skóry i dokonywano pierwszego odczytu na skórze. Kolejnego odczytu (będącego zarazem odczytem diagnostycznym) dokonywano po 96 godzinach po wykluczeniu podrażnienia, które może pojawić się przy pierwszym odczycie. Skala nasilenia dodatniego odczynu była zgodna z przyjętymi standardami: (+): rumień, (++): rumień i grudki, (+++): rumień, grudki i obrzęk i/lub nadżerka.

Badanie nosicielstwa *Staphylococcus aureus*

Badanie na nosicielstwo gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* przeprowadzano poprzez zakładanie hodowli bakteryjnych na selektywnych płytkach agarowych. Materiał do badania pochodzi z wymazu z nosa oraz ze zmian skórnych. Testy na nosicielstwo *Staphylococcus aureus* przeprowadzano w Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. dra Jana Bobra w Krakowie.

Diagnostyka in vitro

UNICAP – test na obecność przeciwciał IgE

Pomiary stężenia całkowitego IgE i specyficznych IgE w surowicy dokonywano przy wykorzystaniu automatycznego analizatora immunologicznego UniCAP 100, CAP System firmy Phadia. Aparat ten umożliwia oznaczanie poziomu przeciwciał IgE w surowicy metodą fluoroenzymowo - immunologiczną (FEIA). Zasada pomiaru metodą FEIA przedstawia się następująco: wzorcowy znany alergen jest opłaszczony na powierzchni plastiku (ImmunoCAP®). Jeśli surowica badana zawiera swoiste IgE skierowane przeciw alergenowi wiążą się one z jego cząsteczkami i pozostają w próbce. Pozostałe IgE są odpłukiwane. W następnym etapie dodawane są przeciwciała antyIgE znakowane β -galaktozydazą emitującą fluorescencję. Jeśli swoiste IgE są związane z alergenem, to znakowane anty-IgE łączą się z nimi podczas inkubacji. Ilość emitowanej przez te kompleksy fluorescencji jest proporcjonalna do stężenia przeciwciał w badanej próbce. Metody oznaczania IgE są kalibrowane przy użyciu standardu IgE WHO 75/502, a wyniki wyraża się w ilościowych jednostkach U/ml (KU//l); 1U odpowiada 2,44 ng IgE. Wyniki oznaczeń wyraża się również w sposób półilościowy, w skali od 0 (oznacza nieobecność wykrywanego swoistego IgE) do 6 (wykrywane przeciwciała obecne w dużym stężeniu). W przypadku całkowitego IgE (tIgE) jako normę przyjmuje się stężenie 150 kU/L. Czulość analityczna metod oznaczania IgE wynosi 0,1-0,35 U/ml.

Eksperymentalne oznaczenia in vitro

ELISpot: [Enzyme-linked Immunospot Assay] jest nową techniką laboratoryjną pozwalającą na ocenę rodzaju i natężenia odpowiedzi immunologicznej komórek [wydzielanie cytokin] wobec określonych substancji. Jednojądrzaste leukocyty krwi obwodowej (PBMC) izolowane metodą wirowania w gradiencie gęstości na Ficollu są hodowane na płytkach 96-dółkowych (w których dna poszczególnych studzienek stanowi membrana ze związanymi przeciwciałami specyficznymi rozpoznającymi badane cytokiny) w medium z dodatkiem antygenów. Największą zaletą tej techniki jest wysoka czulość metody. Dzięki niej można wykryć pojedynczą komórkę wydzielającą dane białko wśród 10^6 komórek w hodowli. Hodowle są zakładane na 4 dni, po tym czasie przeprowadzana jest analiza profilu wydzielanych cytokin [IFN γ , IL2, IL-13] oznaczonych w

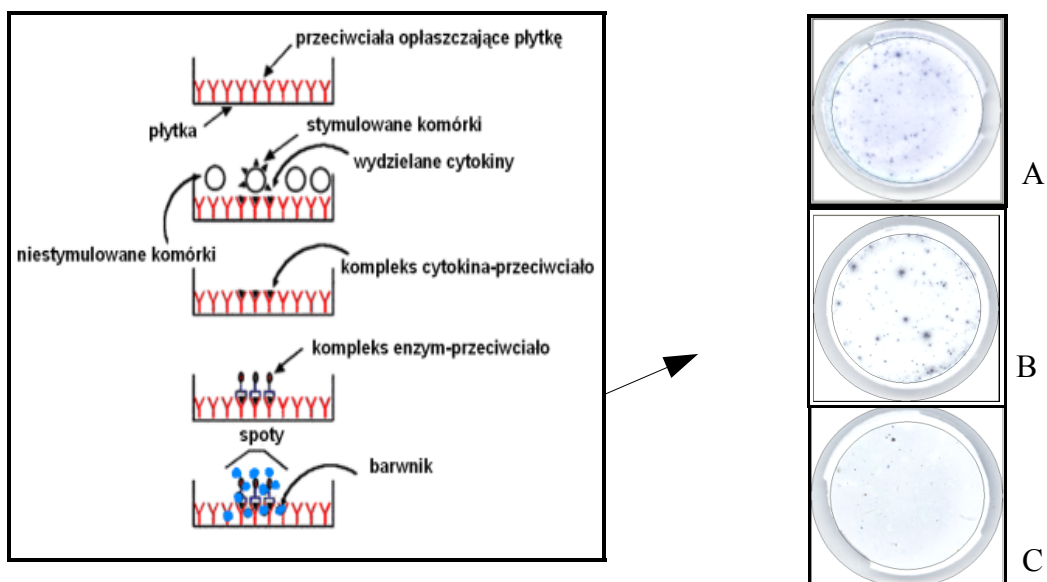
otoczeniu hodowli PBMC. Badana jest tzw. spontaniczna sekrecja cytokin (bez użycia stymulanta) oraz sekrecja po stymulacji in vitro. Jeżeli interesujące nas białko jest wydzielane przez pobudzone limfocyty, to wychwytywane jest ono w bezpośrednim sąsiedztwie komórek przez specyficzne przeciwciała związane do membrany. Pozwala to uniknąć zafałszowania wyniku na skutek konsumpcji analizowanego białka przez komórki w hodowli. Po usunięciu komórek, obecność wydzielonego białka wykrywana jest za pomocą reakcji immunoenzymatycznej. W wyniku katalizowanej przez enzym konwersji w nierozpuszczalny barwny produkt w miejscach uprzedniej obecności komórek wydzielających interesujące nas białko powstają obserwowane na obrazie plamki [*spots*]. Z wykorzystaniem systemu komputerowej analizy obrazu uzyskane wyniki poddawane są analizie cyfrowej, której przedmiotem jest zarówno ilość plamek, jak i ich parametry stanowiące odzwierciedlenie natężenia aktywności wydzielniczej poszczególnych komórek. Zintegrowany system do skanowania płytek ELISpot Eli.Scan firmy A.EL.VIS składa się ze skanera do membran, płytek ELISpot, komputera z zainstalowanym oprogramowaniem do analizy obrazu oraz drukarki. Skaner wyposażony jest w specjalną ramkę do pozycjonowania membran ELISpot. Sekrecję cytokin wyrażano jako zmianę (wzrost/spadek) liczby PBMC wydzielających badaną cytokinę, co przedstawia wzór:

$$\text{sekrecja cytokiny} = \frac{\text{liczba PBMC wydzielających cytokinę po stymulacji in vitro}}{\text{liczba PBMC wydzielających cytokinę spontanicznie (bez stymulacji) in vitro}}$$

Za dodatni przyjęto wynik przynajmniej 2-krotnego wzrostu liczby PBMC wydzielających badaną cytokinę. Podawano również tzw. spontaniczną sekrecję każdej cytokiny wydzielanej przez niestymulowane PBMC in vitro, co przedstawia wzór:

$$\text{spontaniczna sekrecja} = \frac{\text{liczba plamek w hodowli niestymulowanych PBMC}}{\text{w 1 dołku płytki 96 -dołkowej}}$$

Wyniki dla obu parametrów podawano jako medianę z trzech powtórzeń dla każdego oznaczenia.



Ryc. 6: Schemat metody ELISpot (po prawej stronie) oraz zdjęcie dołka płytki hodowlanej (po lewej stronie) po wybarwieniu na obecność IFN γ (A), IL2 (B), IL13 (C) w hodowli PBMC in vitro

Analiza statystyczna:

Analizy statystyczne przeprowadzono przy pomocy następujących testów:

- normalność rozkładu: test W Shapiro-Wilka
- różnice pomiędzy grupą chorych z AZS (zaostrenie lub remisja) oraz kontrolną: test Manna-Whitneya
- różnice pomiędzy zaostreniem a remisją AZS: test Wilcoxon dla par powiązanych
- korelacje pomiędzy parametrami: korelacja Spearmana

Za istotny statystycznie uznawano wynik: $p < 0,05$, testowanie jednostronne. Do obliczeń statystycznych użyto programu STATISTICA 9.0 oraz GraphPad PRISM 5.01

*, ** Wyniki dla tych oznaczeń były ujemne u wszystkich badanych osób, dlatego nie uwzględniano ich w analizach opisanych w tej pracy.

1 dzień

Separacja komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC)

1. Do probówki 50 ml wlać 15 ml Ficollu.
2. Delikatnie nawarstwić krew na Ficoll.
3. Wirować 15 min przy prędkości 2300 obr/min (RCF). HAMOWANIE WYŁĄCZONE.
4. Delikatnie wyjąć z wirówki i za pomocą pipety pasteurowskiej odciągnąć PBMC widoczne w postaci białej warstwy pomiędzy żółtą surowicą a przezroczystym Ficollem.
5. Po zebraniu PBMC dopełnić do 50 ml roztworem PBS-0.1% BSA.
6. Wirować 10 min przy prędkości 1800 obr/min (RCF). HAMOWANIE WŁĄCZONE.
7. Odessać ssakiem płyn z probówki, delikatnie roztrzaskać zlepek komórek na dnie i zawiesić komórki w 25 ml PBS-0.1% BSA.
8. Wirować 5 min przy prędkości 1400 obr/min (RCF). HAMOWANIE WŁĄCZONE.
9. Odessać ssakiem płyn z probówki, delikatnie rozstrząsać zlepek komórek na dnie i zawiesić komórki w płynie hodowlanym (10 ml).
10. Sprawdzić żywotność komórek (100 µl błękitu trypanu + 100 µl r-ru PBMC) pod mikroskopem. Przeliczyć komórki i dopełnić płynem hodowlanym tak, aby uzyskać pożądane zagęszczenie.

WZÓR NA LICZBĘ PBMC W KOMORZE BÜRKERA:

$$N = c * v * r * 10^4$$

c- liczba komórek w 25 polach

v-objętość zawiesiny wyjściowej komórek [ml]

r-krotność rozcieńczenia w błękitie trypanowym

MEDIUM HODOWLANE: IMDM + 50 U/ml Penicylina + 50 µg/ml Streptomycyna
+ 7.8 µg/ml DTT

10. Doprowadzić komórki do odpowiedniej gęstości (50 000 PBMC/ml dla oznaczenia IFN γ), (500 000 PBMC/ml dla oznaczenia IL2 i IL13).
11. Założyć hodowlę komórek w odpowiedniej gęstości w 96 dołkowej U-dennej płytce dodając 200 µl roztworu komórek/dołek płytki.
12. Do zawiesiny komórek dodać stymulanty.
13. Płytkę umieścić w cieplarni (5% CO₂, 37°C, 95% RH) na 24 godziny.

2 dzień

Przygotowanie płytki ELISpot i transfer komórek

1. Rozcieńczyć przeciwciała I-rzędowe (Sanquin)*** (rozc.1:100) w jałowym PBS 1x.
2. Aktywować płytkę poprzez dodanie 50 µl etanolu (40%) na ok. 1 min.
3. Wypłukać płytkę 200 µl PBS 1x 5-krotnie do każdego dołka.
4. Rozpipetować po 50 µl przeciwciał I-rzędowych na dno membrany płytki.
5. Inkubować w cieplarni przez 2 godziny.
6. Z płytki ELISpot usunąć roztwór przeciwciał I-rzędowych i 5-krotnie przepłukać płytkę 200 µl PBS 1x do każdego dołka.
7. Po kilkukrotnym pipetowaniu komórek w płytce U-dennej przenieść komórki pipetą wielokanałową do płytki 96-dołkowej z membraną opłaszczoną przeciwciałami I-rzędowymi. Do trzech dołków dla każdej cytokiny dodać sam płyn hodowlany bez komórek jako kontrolę specyficzności (tło: przeciwciało I-rzędowe -II rządowe).
8. Hodowlę umieścić w cieplarni na 3 dni w przypadku oznaczenia IFN γ oraz 4 dni w przypadku oznaczania IL2 i IL13.

4 lub 5 dzień

Barwienie wydzielonych przez PBMC cytokin

1. Przygotować 50 ml roztworu buforu PeliSPOT Sanquin 1x (rozcieńczyć 5-krotnie roztwór wyjściowy).
2. Przygotować roztwór myjący: 25 µl Tween[®] 20 + 500 ml PBS 1x bez wapnia i magnezu.
3. Przygotować roztwór przeciwciał II-rzędowych (Sanquin)*** (rozc.1:100).
4. Wyrzucić komórki z płytki jednym, płynnym ruchem.
5. Wypłukać płytkę 5 razy 200 µl buforem myjącym do każdego dołka.
6. Dodać po 100 µl przeciwciał II-rzędowych.
7. Inkubować przez 1 godz, a w tym czasie przygotować roztwór strept-poly-HRP (1 µl poly-HRP + 6 ml bufor Pelispot).
8. Usunąć przeciwciała II-rzędowe i wypłukać płytkę 5-krotnie 200 µl roztworem myjącym do każdego dołka.
9. Rozpipetować po 50 µl roztworu poly-HRP.
10. Inkubować 30 min.
11. Wypłukać płytkę 5x roztworem myjącym po 200 µl do każdego dołka.

12. Rozpipetować po 50 µl substratu TMB i pozostawić do pojawienia się plamek tj. do 1 min).
13. Przerwać reakcję przez wypłukanie płytki wodą destylowaną.

Odczynniki:

Allergopharma: roztwór alergenu D1 Dermatophagoides pteronyssinus (nr kat: 725)

Biomed: roztwór ludzkiej albuminy 5%

Biowhittaker-Lonza: medium hodowlane IMDM (nr kat: BE12-915F), roztwór błękitu trypanu(nr kat: 17-942E)

Chemotechnique: zestaw europejski do testów płatkowych(S-1000)

GE Healthcare: Ficoll- pakiet (nr kat: 17-1440-02)

LGCstandards: szczep Staphylococcus aureus (nr kat: ATCC-8095)

Nunclon™: płytki U-denne 96-dołkowe (nr kat: 163320)

Millipore: płytki z membraną do ELISpot 96 dołkowe (nr kat. MSIPS 4510)

Phadia: ImmunoCAP:® tIgE, D1, SEA, SEB, dsDNA, ANA (nr kat:14-4889-01, 14-4890-01, 14-4107-01, 14-4509-01)

Riedel-de Haën: NiSO₄*6H₂O (nr kat: 31483)

Sanquin: odczynniki do metody ELISpot-kit (nr kat: M9433, M9402, M9413, M2540, M2051, M2521)

Sigmaaldrich: glutamina (G6392-1VL), 1,4-dithiotreitol (nr kat: 43815-5G), Tween® 20 (nr kat: P1379), gronkowcowe enterotoksyny A i B z S. aureus (nr kat: S9399-1MG, S4881-1MG), L-fitohemaglutynina (L2769-2 MG), Penicylina-Streptomycyna (P4458)

Thermoscientific: PBS 10x bez wapnia i magnezu (nr kat. SH30258)

*** Wykonywano także próbne barwienia przeciwciałami firmy Mabtech, R&D Systems. Nie zaobserwowano różnic w jakości barwień.

IV WYNIKI

1. Charakterystyka badanej grupy chorych z AZS i kontrolnej

Badania reaktywności komórek jednojądrzastych krwi (PBMC) wydzielających cytokiny typu Th1 (IFN γ , IL2) i Th2 (IL13) przeprowadzono u chorych z atopowym zapaleniem skóry w okresie zaostrzenia i remisji objawów chorobowych, a także osób zdrowych-kontrolnych. Tabela nr 1 przedstawia kliniczną charakterystykę analizowanych grup.

Tabela 9: Kliniczna charakterystyka badanych

Rodzaj grupy badanej	K %	M %	Wiek	tIgE (kIU/ml)	asIgE: D1, m80, m81 %	+ test płatkowy na Ni %	+ test punktowy D1 %	+ wywiad rodzinny %	SCORAD	+ DE %	Inne choroby %
AZS	80,0	20,0	36,77 +/- 14,2	wartości graniczne: 23,8-6140 >200 kIU/ml :35 % <200kIU/ml : 65 %	D1: 54,5 m80: 19 m81: 24	63,00 (++): 33 (+++): 30	64,00	65,00	(1-4) średni: 3	67,00	AK: 53 ANN: 23 ANO: 3 AA: 20 AP: 20 Has:3
Kontrolne	80,0	20,0	36,77 +/- 11,2	wartości graniczne: 2,06-21,0	D1: 0	0	0	-----	-----	-----	-----

Jak wynika z danych zawartych w tabeli 1 wzrost stężenia całkowitego IgE (tIgE) wykazano u 35% badanych. Natomiast wzrost stężenia asIgE dla *Dermatophagoides pteronyssinus* (D1) zaobserwowano u 54,5% chorych z AZS, asIgE dla enterotoksyny gronkowcowej A u 19% badanych z AZS, a także u 24% chorych z AZS wykazano obecność asIgE dla gronkowcowej enterotoksyny B. Dodatni test płatkowy z siarczanem niklu zaobserwowano u 63% chorych z AZS. U 33% badanych nasilenie odczynu było średnie (++) , u 30 % silne, wg przyjętej skali (+++). U osób z grupy kontrolnej test płatkowy z siarczanem niklu był ujemny. Dodatni test punktowy z a. roztoczy (a.D1) wykazano u 64% chorych. Dane z wywiadu ujawniły obecność skazy alergicznej (DE) w dzieciństwie u 67% chorych z AZS, a dodatni wywiad rodzinny wystąpił u 65% pacjentów z tej grupy. U chorych z AZS współwystępowały inne choroby alergiczne, a więc głównie kontaktowe zapalenie skóry (AK) u 53% chorych, alergiczny nieżyt nosa (ANN) u 23% chorych, astma alergiczna (AA) i alergia pokarmowa (AP) u 20% chorych. U pacjentów z AZS zdiagnozowano także chorobę Hashimoto (Has) (3%) oraz alergiczne zapalenie spojówek (AZO) (3%). Wspomniane powyżej parametry były ujemne w grupie kontrolnej. Nie wykazano korelacji pomiędzy występowaniem u chorych z AZS dodatniego testu płatkowego z 5% siarczanem niklu, a dodatnim testem punktowym z a.D1 (korelacja Spearmana $p>0,05$). Podobnie nie wykazano

korelacji pomiędzy wysokim stężeniem tIgE (>200 kIU/ml), a dodatnim wywiadem rodzinnym ($p>0,05$). Natomiast znaleziono korelację pomiędzy wysokim stężeniem tIgE w surowicy chorych, a obecnością skazy alergicznej (DE) w dzieciństwie (korelacja Spearmana $r= 0,45$ $p< 0,05$). Pozwala to wnosić, iż chorzy z AZS stanowią grupę zróżnicowaną pod względem badanych, a często uznawanych za typowe dla AZS parametrów.

Przeprowadzona analiza porównawcza sekrecji cytokin (IFN γ , IL2, IL13) po stymulacji NiSO₄ (25 μ M i 50 μ M) u chorych z AZS nie wykazała różnic pomiędzy grupą chorych z AZS ($n=30$) i grupą kontrolną osób zdrowych ($n=30$) ($p>0,05$). Jednakże analiza danych w Tab. 2 pokazuje, że wydzielanie cytokin jest różnorodne w zależności od użytego antygeny do stymulacji (mediana sekrecji analizowanej cytokiny waha się od 0,77 – krotnej zmiany dla IFN γ po stymulacji 1.0 μ g/ml a.D1 do 1,5-krotnej zmiany dla IFN γ po stymulacji SEA u chorych z AZS). Natomiast w grupie kontrolnej sekrecja waha się od 0,48- krotnej zmiany dla IFN γ po stymulacji 1.0 μ g/ml a.D1 do 1,6- krotnej dla IL13 po stymulacji SEA w zaostrzeniu atopowego zapalenia skóry. W remisji AZS (tabela 3) najwyższa sekrecja występuje dla IFN γ po stymulacji SEB, natomiast najniższa w przypadku IL2 po stymulacji 25 μ M NiSO₄. Zwraca uwagę również fakt dużej różnorodności w obrębie podgrup dla każdego antygeny, o czym świadczy szeroki przedział wartości minimum i maksimum dla każdej z analizowanych cytokin. Świadczy to o dużej niejednorodności wyników w obrębie badanych podgrup. Wykonano także analizę porównawczą spontanicznej (niestymulowane PBMC) sekrecji cytokin, w celu uzyskania informacji czy pobudzenie tych komórek jest inne u chorych z AZS niż w grupie osób kontrolnych-zdrowych in vivo. Odmienna spontaniczna sekrecja w grupie chorych z AZS w porównaniu do kontroli sugerowałaby, że typ profilu cytokinowego po stymulacji alergenem in vitro jest w dużym stopniu zależny nie tylko od rodzaju użytego do stymulacji alergen, ale i środowiska cytokinowego, w którym znajdowały się komórki przed pobraniem krwi. To tłumaczyłoby dużą różnorodność odpowiedzi na alergen w obrębie analizowanej podgrupy. Jednakże przeprowadzona analiza porównawcza nie wykazała istotnych statystycznie różnic w spontanicznej sekrecji każdej z 3 cytokin ($p>0,05$) pomiędzy grupą chorych z AZS i zdrowych-kontrolnych.

Tabela 10: Reaktywność PBMC na siarczan nikiu, a. D1 roztocza kurzu domowego oraz enterotoksyny gronkowcowe A i B w zaostrzeniu AZS (wartości umieszczone w tabeli podano jako medianę +/- maksimum i minimum)

AZS: n=30	IFN γ spont	IL2 spont.	IL13 spont.	IFN γ NiSO $_4$	IL2 NiSO $_4$	IL13 NiSO $_4$	IFN γ D1	IL2 D1	IL13 D1	IFN γ SE	IL2 SE	IL13 SE	IFN γ PHA	IL2 PHA	IL13 PHA
25 μ MNiSO $_4$ 0.4 D1 μ g/ml SEA	61,5 +/- 8-646	18 +/- 3-295	11 +/- 4-82	1,01 +/- 0,3-5,6	1,07 +/- 0,1- 10,6	1,0 +/- 0,1-4,3	0,79 +/- 0,1-4,0	0,87 +/- 0,2- 10,0	0,83 +/- 3,25	1,5 +/- 33,8	1,39 +/- 33,8	1,14 +/- 2,8	0,83 +/- 11,4 -0,03	1,31 +/- 7,6 -0,3	1,12 +/- 5,7 -0,1
50 μ MNiSO $_4$ 1.0 D1 μ g/ml SEB				0,93 +/- 0,1-5,2	1,03 +/- 0,3- 11,6	1,03 +/- 0,2-6,2	0,77 +/- 0,03-5,5	0,89 +/- 0,2- 5,4	1,23 +/- 0,3-6,7	1,33 +/- 0,1- 13,9	1,43 +/- 0,3- 34,4	1,04 +/- 0,3- 5,9			
Kontrola n=30	IFNγ spont	IL2 spont.	IL13 spont.	IFNγ NiSO$_4$	IL2 NiSO$_4$	IL13 NiSO$_4$	IFNγ D1	IL2 D1	IL13 D1	IFNγ SE	IL2 SE	IL13 SE	IFNγ PHA	IL2 PHA	IL13 PHA
25 μ MNiSO $_4$ 0.4 D1 μ g/ml SEA	118 +/- 10-579	42 +/- 3-259	9 +/- 4-133	1,0 +/- 0,1-4,3	0,89 +/- 0,1- 9,3	0,93 +/- 0,07- 4,8	0,63 +/- 0,1-3,1	0,97 +/- 0,1- 5,7	0,91 +/- 0,09- 5,14	0,92 +/- 0,1- 12,6	1,58 +/- 0,2- 8,6	1,6 +/- 0,4- 14,3	0,7 +/- 14,9 -0,16	1,02 +/- 5,3 -0,3	1,4 +/- 9,5 -0,2
50 μ MNiSO $_4$ 1.0 D1 μ g/ml SEB				0,93 +/- 0,06- 21,4	0,86 +/- 0,06- 18,0	0,91 +/- 0,1-6,7	0,48 +/- 0,01-5,3	0,93 +/- 8,0	1,25 +/- 0,2- 8,2	0,94 +/- 11,8	1,35 +/- 4,9	1,54 +/- 6,8			

Tabela 11: Reaktywność PBMC na siarczan nikiu, a.D1 roztocza kurzu domowego oraz enterotoksyny gronkowcowe A i B w remisji AZS (wartości umieszczone w tabeli podano jako medianę +/- maksimum i minimum)

AZS: n=22	IFN γ spont	IL2 spont.	IL13 spont.	IFN γ NiSO $_4$	IL2 NiSO $_4$	IL13 NiSO $_4$	IFN γ D1	IL2 D1	IL13 D1	IFN γ SE	IL2 SE	IL13 SE	IFN γ PHA	IL2 PHA	IL13 PHA
25 μ MNiSO $_4$ 0.4 D1 μ g/ml SEA	47 +/- 272- 2	20,5 +/- 203- 3	7,5 +/- 57- 3	1,06 +/- 22,25- 0,17	0,8 +/- 3,86- 0,19	0,81 +/- 2,64- 0,14	0,94 +/- 14,0- 0,34	0,92 +/- 4,0- 0,17	1,42 +/- 3,4- 0,14	1,55 +/- 35,7- 0,04	0,92 +/- 3,25- 0,32	1,15 +/- 2,05- 0,23	1,04 +/- 12,0- 0,15	1,1 +/- 2,83- 0,29	1,3 +/- 6,64- 0,4
50 μ MNiSO $_4$ 1.0 D1 μ g/ml SEB				0,91 +/- 2,37- 0,22	0,85 +/- 2,4- 0,19	1,06 +/- 2,7- 0,12	0,69 +/- 8,37- 0,2	0,97 +/- 7,5- 0,12	1,71 +/- 3,37- 0,25	1,72 +/- 26,0- 0,06	1,07 +/- 5,0- 0,27	0,97 +/- 2,86- 0,15			

2. Analiza alergii na nikiel w zaostrzeniu atopowego zapalenia skóry

2.1: Wpływ współwystępowania innych chorób na profil cytokinowy powstały w odpowiedzi na siarczan nikiu u chorych z atopowym zapaleniem skóry

Analiza porównawcza sekrecji IFN γ , IL2, IL13 po stymulacji siarczanem nikiu pomiędzy grupą chorych z AZS (n=30) i grupą osób zdrowych-kontrolnych (n=30) dopasowanych wiekowo i płciowo opisanych w tabeli 2 nie wykazała różnic w odpowiedzi na siarczan nikiu in vitro ($p > 0,05$). Jak pokazuje tabela 10 odpowiedź komórek jednojądrzastych krwi (PBMC) na siarczan nikiu w hodowli in vitro jest niejednorodna (duża rozbieżność pomiędzy minimalną a maksymalną

odpowiedzią na siarczan niklu w badanych grupach). Dlatego też dokonano podziału w grupie chorych z AZS pod względem rodzaju chorób współistniejących z AZS, ponieważ jednym z czynników różnicujących odpowiedź na siarczan niklu może być współwystępowanie innych chorób z AZS. Analiza porównawcza przeprowadzona u chorych z AZS z kontaktową alergią niklową bez chorób współistniejących (n=6) i w grupie kontrolnej (n=6) nie wykazała istnienia różnic w sekrecji cytokin (IFN γ , IL2, IL13) in vitro po stymulacji siarczanem niklu ($p>0,05$). Po dołączeniu do badanej grupy chorych tylko z AZS dodatkowych osób, u których współwystępowała astma alergiczna (n= 1) lub astma alergiczna i alergia pokarmowa (n= 2) lub alergiczny nieżył oczu (n=1), alergiczny nieżył nosa i alergia pokarmowa (n=1), cechy alergii kontaktowej (n=3), cechy alergii kontaktowej z alergią pokarmową (n=1) oraz choroby Hashimoto (n=2) również nie wykazano różnic w porównaniu do grupy kontrolnej ($p>0,05$).

Tabela 12: Chorzy z AZS z kontaktową alergią niklową i grupa kontrolna (wartości podano jako medianę +/- maksimum i minimum)

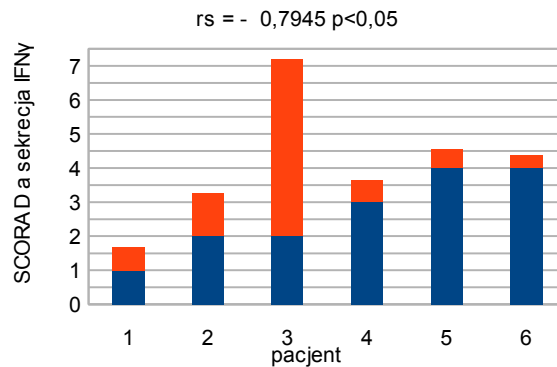
NiSO4	IFN γ 25 μ M	IL2 25 μ M	IL13 25 μ M	IFN γ 50 μ M	IL2 50 μ M	IL13 50 μ M	IFN kontrola 25 μ M	IL2 kontrola 25 μ M	IL13 kontrola 25 μ M	IFN kontrola 50 μ M	IL2 kontrola 50 μ M	IL13 kontrola 50 μ M
AZS	1,03 +/- 5,65-0,68	0,95 +/- 10,6- 0,4	1,04 +/- 4,33- 0,39	0,66 +/- 5,19- 0,36	0,84 +/- 11,6- 0,6	0,84 +/- 3,17- 0,22	0,68 +/- 1,84 -0,12	0,73 +/- 1,86 -0,15	0,49 +/- 0,11 -1,25	0,82 +/- 1,62- 0,06	0,6 +/- 1,39- 0,06	0,65 +/- 1,62- 0,15
AZS i AZS + AA	1,13 +/- 5,65- 0,68	0,9 +/- 10,6- 0,4	1,02 +/- 4,33- 0,39	0,67 +/- 5,19- 0,66	0,84 +/- 11,6- 0,6	0,92 +/- 3,17- 0,22	0,79 +/- 1,84- 0,12	0,75 +/- 1,86- 0,15	0,48 +/- 0,11- 1,25	0,87 +/- 1,62- 0,06	0,8 +/- 1,39- 0,06	0,56 +/- 1,62- 0,15
AZS i AZS +AA + AP	1,03 +/- 5,65- 0,68	0,9 +/- 10,6- 0,4	1,0 +/- 4,33- 0,16	0,67 +/- 5,19- 0,66	0,84 +/- 11,6- 0,33	0,92 +/- 3,17- 0,22	0,79 +/- 1,84- 0,12	0,75 +/- 1,86- 0,15	0,49 +/- 0,11- 1,88	0,91 +/- 1,62- 0,06	0,7 +/- 1,39- 0,06	0,87 +/- 2,88- 0,15
AZS i AZS + ANO	1,04 +/- 5,65- 0,68	0,9 +/- 10,6- 0,11	1,0 +/- 4,33- 0,39	0,67 +/- 5,19- 0,66	0,84 +/- 11,6- 0,6	0,92 +/- 3,17- 0,22	0,79 +/- 1,84- 0,12	0,75 +/- 1,86- 0,15	0,49 +/- 0,11- 1,25	0,75 +/- 1,62- 0,06	0,8 +/- 1,39- 0,06	0,56 +/- 2,88- 0,15
AZS i AZS + ANN + AP	1,03 +/- 5,65- 0,38	0,9 +/- 10,6- 0,29	1,0 +/- 4,33- 0,39	0,67 +/- 5,19- 0,66	0,84 +/- 11,6-0,84	0,92 +/- 3,17-0,22	0,79 +/- 1,84- 0,12	0,75 +/- 1,86- 0,15	0,49 +/- 1,38- 0,11	0,75 +/- 1,62-0,06	0,71 +/- 1,39- 0,06	0,75 +/- 2,88- 0,15
AZS i AZS + AK	1,03 +/- 5,65- 0,38	0,9 +/- 10,6- 0,4	1,0 +/- 4,33- 0,14	0,67 +/- 5,19- 0,14	0,84 +/- 11,6- 0,6	0,92 +/- 3,17- 0,22	0,79 +/- 3,14- 0,12	0,75 +/- 1,86- 0,15	0,51 +/- 1,25- 0,07	0,82 +/- 21,38- 0,06	0,67 +/- 2,33- 0,06	0,53 +/- 2,88- 0,15
AZS i AZS +AK +ANN	1,03 +/- 5,65- 0,35	0,9 +/- 10,6- 0,4	1,0 +/- 4,33- 0,39	0,67 +/- 5,19- 0,66	0,84 +/- 11,6-0,6	0,92 +/- 3,17- 0,22	0,79 +/- 1,84- 0,12	0,75 +/- 1,86- 0,15	0,54 +/- 1,25- 0,11	0,75 +/- 21,38- 0,06	0,57 +/- 2,33- 0,06	0,75 +/- 2,88- 0,15
AZS i AZS + AK + AA	1,03 +/- 5,65-0,35	0,9 +/- 10,6- 0,4	1,0 +/- 4,33- 0,39	0,63 +/- 5,2-0,4	0,83 +/- 11,6-0,33	0,67 +/- 3,17-0,22	0,79 +/- 1,84- 0,12	0,75 +/- 1,86- 0,15	0,54 +/- 1,25- 0,11	0,84 +/- 21,38- 0,06	0,74 +/- 2,33- 0,06	0,53 +/- 2,88-0,15
AZS i AZS +AK + AP	1,03 +/- 5,65-0,35	0,9 +/- 10,6- 0,4	1,0 +/- 4,33- 0,39	0,67 +/- 5,19- 0,66	0,84 +/- 11,6- 0,6	0,92 +/- 3,17- 0,22	0,79 +/- 1,84- 0,12	0,75 +/- 1,86- 0,15	0,54 +/- 1,25- 0,11	0,9 +/- 21,38- 0,06	0,78 +/- 2,33- 0,06	0,56 +/- 2,88- 0,15
AZS i AZS + Has	1,03 +/- 5,65-0,35	0,9 +/- 10,6- 0,4	1,0 +/- 4,33- 0,39	0,67 +/- 5,19- 0,66	0,84 +/- 11,6- 0,6	0,92 +/- 3,17- 0,22	0,79 +/- 1,84- 0,12	0,75 +/- 1,86- 0,15	0,54 +/- 4,83- 0,11	0,91 +/- 21,38- 0,06	0,84 +/- 2,33- 0,06	0,87 +/- 2,88- 0,15

Przeprowadzone analizy sugerują więc, że współwystępowanie innych chorób alergicznych wraz z AZS u chorych z kontaktową alergią niklową nie wydaje się wpływać na molekularny mechanizm odpowiedzi na NiSO₄ in vitro w zaostrzeniu atopowego zapalenia skóry. Wniosek ten wymaga jednak potwierdzenia i dalszych badań.

W dalszej kolejności przeprowadzono analizę porównawczą sekrecji cytokin (IFN γ , IL2, IL13) po stymulacji NiSO₄ (25 μ M i 50 μ M) w grupie chorych z AZS z kontaktową alergią niklową (n = 7), chorych z AZS bez kontaktowej alergii niklowej (n=7) oraz w grupie kontrolnej (n=7). Pacjenci z AZS w grupach AZS Ni(+) i AZS Ni(-) różnili się tylko wynikiem testu płatkowego na nikiel, natomiast mieli ten sam zestaw chorób współtowarzyszących AZS w parze tj. AZS Ni(+) i Ni(-). W ten sposób różnice między grupami, które teoretycznie pojawiłyby się byłyby spowodowane tylko przez obecność kontaktowej alergii niklowej. Nie zaobserwowano różnic w sekrecji cytokin pomiędzy grupami AZS Ni(+) i AZS Ni(-), AZS Ni(+) i kontrolą (p>0,05). Wydaje się więc, że obecność kontaktowej alergii niklowej w AZS nie wpływa na sekrecję analizowanych cytokin przez PBMC pod wpływem siarczanu niklu in vitro.

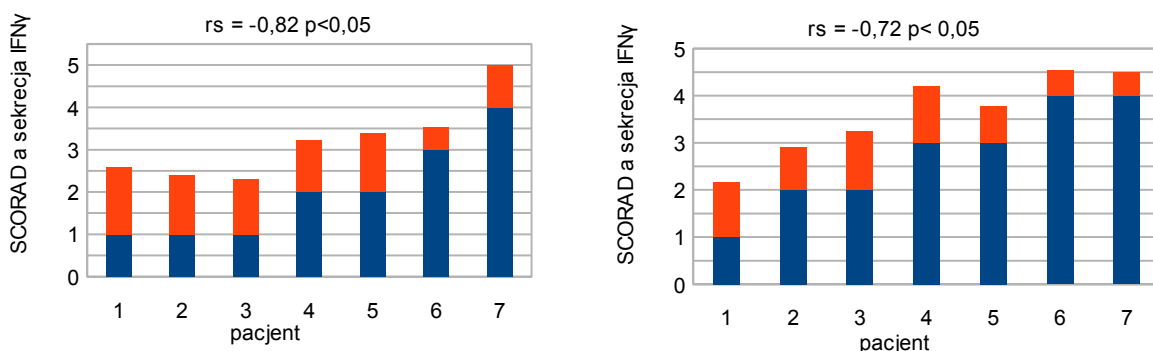
2.2: Wpływ występowania kontaktowej alergii niklowej na nasilenie zmian skórnych w atopowym zapaleniu skóry (wskaźnik SCORAD)

Poszukiwano, czy istnieje związek między spontaniczną sekrecją cytokin (IFN γ , IL2, IL13), a nasileniem zmian skórnych wg wskaźnika SCORAD u chorych z AZS (n=30). Nie wykazano korelacji pomiędzy spontaniczną sekrecją badanych 3 cytokin a wskaźnikiem SCORAD (p>0,05). Wydaje się więc, że profil sekrecji cytokin wydzielanych przez PBMC spontanicznie w hodowli in vitro (na skutek kontaktu z różnymi alergenami in vivo) nie decyduje bezpośrednio o stopniu nasilenia zmian skórnych (SCORAD) w AZS lub inne, nie badane w tym projekcie cytokiny są bezpośrednio związane z nasileniem zmian skórnych w AZS. W dalszej kolejności poszukiwano, czy modyfikacja profilu cytokinowego przez dominujący w danym momencie alergen, tj. będący w dużej ilości w ustroju, może wpływać na nasilenie zmian skórnych (SCORAD). W tym celu poszukiwano korelacji w modelu in vitro pomiędzy profilem cytokinowym powstałym po stymulacji siarczanem niklu (dominujący alergen) a wskaźnikiem SCORAD u chorych z AZS. Zaobserwowano istnienie ujemnej korelacji pomiędzy liczbą PBMC wydzielających IFN γ po stymulacji 50 μ M siarczanem niklu a SCORAD (rs=-0,79 p<0,05).



Ryc. 7: Sekrecja IFN γ po stymulacji 50 μ M siarczanem niklu a SCORAD u chorych tylko z AZS z kontaktową alergią niklową. Kolor: niebieski – SCORAD, czerwony – sekrecja IFN γ

Wydaje się więc, że u chorych z kontaktową alergią niklową w AZS nasileniu zmian skórnych towarzyszy spadek sekrecji IFN γ , co wydaje się mieć związek ze stymulacją siarczanem niklu komórek jednojądrzastych krwi. Następnie przeprowadzono analizę korelacji wskaźnika SCORAD i profilu cytokinowego po stymulacji siarczanem niklu in vitro w grupach chorych z AZS z dodatnim i ujemnym wynikiem testu płatkowego na nikiel. Ze względu na potencjalną możliwość wpływu współwystępowania innych chorób na profil cytokinowy w AZS do badanych grup włączono tylko pacjentów, u których współwystępowały te same choroby alergiczne, a grupy różniły się tylko wynikiem testu płatkowego na nikiel. Analiza korelacji pokazała, że w grupie chorych z AZS z dodatnim wynikiem testu płatkowego na nikiel ($Ni \geq ++$) występuje ujemna korelacja pomiędzy sekrecją IFN γ po stymulacji 50 μ M NISO $_4$ a wskaźnikiem SCORAD ($rs = -0,72$ $p < 0,05$). Natomiast analiza korelacji w grupie chorych z ujemnym wynikiem testu płatkowego na nikiel pokazała, że występuje ujemna korelacja pomiędzy sekrecją IFN γ po stymulacji 25 μ M siarczanem niklu a wskaźnikiem SCORAD ($rs = -0,82$ $p < 0,05$).



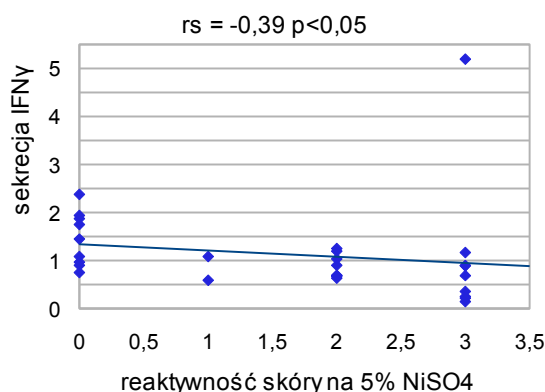
Ryc.8: Sekrecja IFN γ po stymulacji 50 μ M siarczanem niklu u chorych z AZS z kontaktową alergią niklową (wykres po lewej stronie) oraz sekrecja IFN γ po stymulacji 25 μ M siarczanem niklu u chorych z AZS z ujemnym wynikiem testu płatkowego na nikiel (wykres po prawej stronie) a SCORAD. Kolor: niebieski – SCORAD, czerwony – sekrecja IFN γ

Wydaje się więc, że spadek sekrecji IFN γ po stymulacji siarczanem niklu prowadzący do pobudzenia mechanizmów związanych z nasilaniem zmian skórnych (SCORAD) wiąże się z reaktywnością na nikiel komórek układu immunologicznego zdolnych do migracji do skóry, w której odpowiadają za dodatni wynik testu płatkowego (przy wyższej dawce siarczanu niklu in vitro) oraz nie migrujących do skóry (ujemny wynik testu płatkowego) i obecnych w krwiobiegu (niższa dawka siarczanu niklu in vitro).

2.3: Czy wynik testu skórno-płatkowego na nikiel odzwierciedla potencjał komórek PBMC do reagowania na siarczan niklu in vitro – analiza porównawcza dwóch typów testów: płatkowy in vivo oraz immunobarwienie w teście in vitro ELISpot.

Test płatkowy na nikiel informuje o obecności leukocytów w skórze i/lub obecnych w krwiobiegu posiadających receptory kierujące do skóry (Cutaneous Lymphocyte Antigen tzw. CLA). Te komórki mają zdolność reagowania na siarczan niklu zgodnie z mechanizmem immunologicznym typu IV (mechanizm typu późnego). Test ELISpot informuje o obecności leukocytów w krwiobiegu o potencjale reagowania na siarczan niklu in vitro. Te komórki mogą, ale nie muszą posiadać zdolność migracji do skóry.

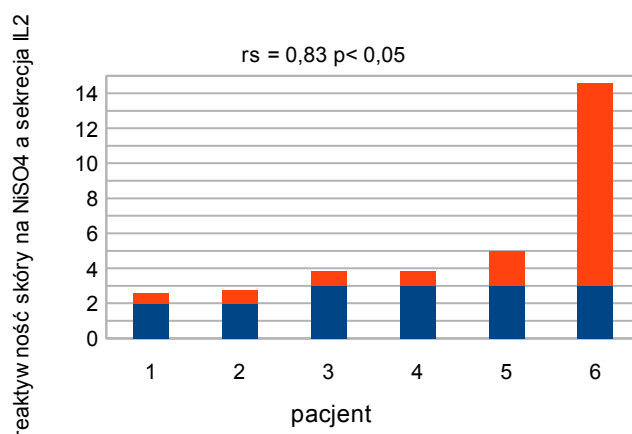
Badano, czy reakcja skóry na nikiel w teście płatkowym zależy od środowiska cytokinowego we krwi. Publikacje z zakresu immunologii sugerują, że środowisko cytokinowe m.in. wpływa na ekspresję receptora CLA na powierzchni PBMC, a więc może wpływać na migrację komórek do skóry, w której mogą one odpowiadać na nikiel w teście płatkowym. Aby sprawdzić, czy istnieje związek pomiędzy reaktywnością skóry na nikiel, a środowiskiem cytokinowym w krwiobiegu poszukiwano czy istnieje zależność pomiędzy spontaniczną sekrecją badanych cytokin, a wynikami testu płatkowego na nikiel. Nie wykazano istnienia zależności ($p > 0,05$) pomiędzy spontaniczną sekrecją badanych cytokin, a wynikami testu płatkowego na nikiel u chorych z AZS z dodatnim i ujemnym wynikiem testu płatkowego. W dalszej kolejności sprawdzano więc, czy wynik testu płatkowego na nikiel zależy od obecności komórek reagujących na nikiel we krwi (PBMC). W tym celu poszukiwano czy istnieje zależność pomiędzy sekrecją badanych cytokin po stymulacji siarczanem niklu in vitro, a wynikami testu płatkowego na nikiel u chorych z AZS z dodatnim i ujemnym wynikiem tego testu. Zaobserwowano, że sekrecja IFN γ po stymulacji 50 μ M NiSO $_4$ spada ze wzrostem reaktywności skóry na siarczan niklu w teście płatkowym ($r_s = -0,39$ $p < 0,05$).



Ryc.9: Sekrecja IFN γ po stymulacji 50 μ M NiSO $_4$ a reaktywność skóry na 5% NiSO $_4$ w teście płatkowym u chorych z AZS z dodatnim i ujemnym wynikiem testu płatkowego

Wyniki analizy sugerują, że ze wzrostem nasilenia odczynu skórniego w teście płatkowym na nikiel maleje sekrecja IFN γ . Wydaje się więc, że reaktywność skóry na nikiel jest zależna od PBMC – spadek sekrecji IFN γ po stymulacji siarczanem niklu wydaje się wiązać ze wzrostem reaktywności układu immunologicznego na nikiel w skórze. Ta obserwacja sugeruje, że test płatkowy na nikiel odzwierciedla potencjał PBMC do reagowania na nikiel *in vitro*.

W dalszej kolejności sprawdzano, jaki typ profilu cytokinowego powstałego w odpowiedzi na siarczan niklu dominuje u chorych z AZS z dodatnim wynikiem testu płatkowego. Wykazano, że ze wzrostem reaktywności skóry na siarczan niklu w teście płatkowym na nikiel wzrasta sekrecja IL2 po stymulacji 50 μ M siarczanem niklu w grupie chorych tylko z AZS z kontaktową alergią niklową ($rs = 0,83$ $p < 0,05$).

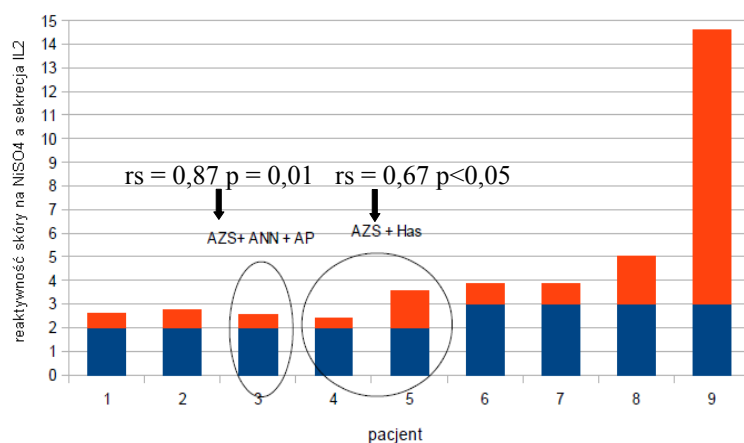


Ryc.10: Sekrecja IL2 po stymulacji 50 μ M siarczanem niklu *in vitro* a wynik testu płatkowego na 5% siarczan niklu u chorych tylko z AZS.

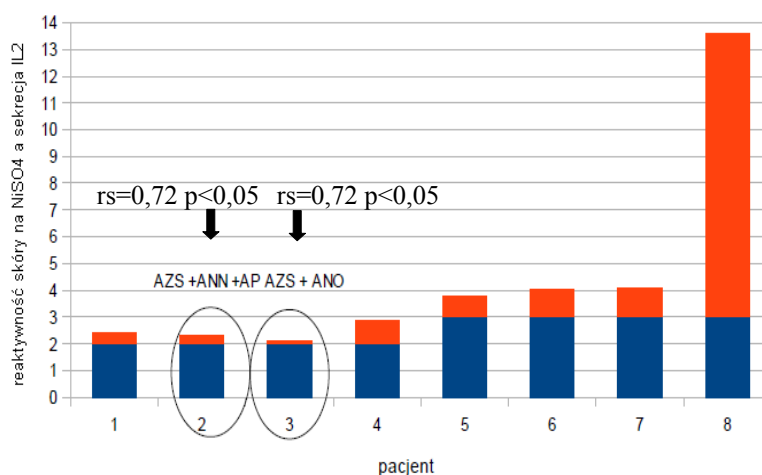
Kolor: niebieski – wynik testu płatkowego na NiSO $_4$, czerwony – sekrecja IL2

Po włączeniu do grupy chorych tylko z AZS pacjentów z AZS z kontaktową alergią niklową ze współwystępującym alergicznym nieżytem nosa (ANN) i alergią pokarmową (AP) ($n=1$) ze

wzrostem reaktywności skóry na siarczan nikiu w teście płatkowym wzrasta sekrecja IL2 po stymulacji 25 μ M siarczanem nikiu ($r_s = 0,72$ $p < 0,05$) oraz po stymulacji 50 μ M siarczanem nikiu ($r_s = 0,87$ $p = 0,01$). Z kolei po włączeniu do grupy chorych tylko z AZS pacjentów z AZS z kontaktową alergią nikiową ze współwystępującą chorobą Hashimoto (Has) ($n = 2$) ze wzrostem reaktywności skóry na siarczan nikiu w teście płatkowym obserwuje się wzrost sekrecji IL2 po stymulacji 50 μ M siarczanem nikiu ($r_s = 0,65$ $p < 0,05$). Natomiast po włączeniu do grupy chorych tylko z AZS pacjenta z AZS z alergicznym zapaleniem spojówek (ANO) ($n = 1$) obserwuje się, że ze wzrostem reaktywności skóry na siarczan nikiu w teście płatkowym wzrasta sekrecja IL2 po stymulacji 25 μ M siarczanem nikiu ($r_s = 0,72$ $p < 0,05$).



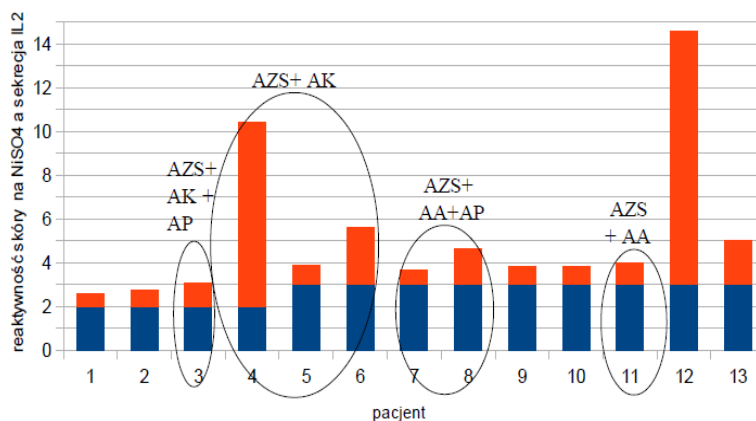
**Ryc.11: Sekrecja IL2 po stymulacji 50 μ M siarczanem nikiu a wynik testu płatkowego na 5% siarczan nikiu u chorych tylko z AZS po dodaniu do tej grupy pacjentów ze współwystępującymi wraz z AZS: ANN i AP (pacjent 3) oraz chorobą Hashimoto (pacjent: 4,5).
Kolor: niebieski - wynik testu płatkowego na NiSO₄, czerwony – sekrecja IL2**



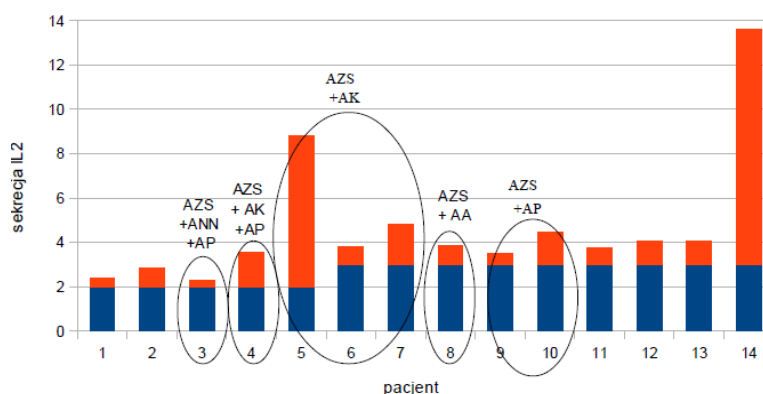
**Ryc.12: Sekrecja IL2 po stymulacji 25 μ M siarczanem nikiu in vitro a wynik testu płatkowego na 5% siarczan nikiu u chorych tylko z AZS po dodaniu do tej grupy pacjentów ze współwystępującymi wraz z AZS: ANN i AP (pacjent 2) oraz AZO (pacjent 3).
Kolor: niebieski - wynik testu płatkowego na NiSO₄, czerwony – sekrecja IL2**

W przypadku dołączenia do grupy chorych tylko z AZS dodatkowych pacjentów z współwystępującą astmą alergiczną (AA) ($n = 1$) lub astmą alergiczną (AA) i alergią pokarmową

(AP) (n= 2) lub AZS z cechami alergii kontaktowej (n=3) lub AZS z cechami alergii kontaktowej (AK) i alergią pokarmową (AP) (n= 1) zanika korelacja ($p>0,05$) pomiędzy reaktywnością skóry na siarczan niklu w teście płatkowym, a sekrecją IL2 po stymulacji 25 μM i 50 μM siarczanem niklu. W przypadku pozostałych dwóch cytokin (IFN γ , IL13) także nie wykazano istnienia korelacji ich sekrecji z reaktywnością skóry na siarczan niklu w teście płatkowym ($p>0,05$).



Ryc.13: Sekrecja IL2 po stymulacji 50 μM siarczanem niklu in vitro a wynik testu płatkowego na 5% siarczan niklu u chorych tylko z AZS po dodaniu do tej grupy pacjentów ze współwystępującymi wraz z AZS: AK i AP (pacjent 3), AK (pacjent: 4,5,6), AA i AP (pacjent: 7, 8), AA (pacjent 11). Kolor: niebieski - wynik testu płatkowego na NiSO₄, czerwony – sekrecja IL2



Ryc.14: Reaktywność PBMC na 25 μM siarczan niklu in vitro a wynik testu płatkowego na 5% siarczan niklu u chorych tylko z AZS po dodaniu do grupy pacjentów z AZS ze współwystępującymi: AK i AP (pacjent 3), AK (pacjent: 4,5,6), AA i AP (pacjent: 7, 8), AA (pacjent 11). Kolor: niebieski - wynik testu płatkowego na NiSO₄, czerwony – sekrecja IL2

Przeprowadzone analizy sugerują, że profil reaktywności PBMC na nikiel w astmie i alergii kontaktowej jest inny niż w atopowym zapaleniu skóry, ponieważ współwystępowanie tych chorób alergicznych z AZS powoduje zanik korelacji pomiędzy sekrecją IL2 po stymulacji siarczanem niklu in vitro, a wynikiem testu płatkowego na nikiel. Wydaje się więc, że na różnorodność profili cytokinowych powstałych po stymulacji PBMC siarczanem niklu in vitro obserwowanych wśród chorych na AZS może wpływać współobecność innych chorób alergicznych. W ramach dodatkowej

obserwacji znaleziono grupę pacjentów z ujemnymi wynikami testów płatkowych na nikiel, u których był przynajmniej dwukrotny wzrost liczby PBMC wydzielających analizowane cytokiny po stymulacji siarczanem niklu in vitro.

Tabela 13: Reaktywność PBMC na nikiel u osób z ujemnym testem płatkowym na nikiel – wybrane przypadki

	stężenie NiSO ₄	IFN γ	IL2	IL13	choroby
Pacjent 1	25 μ M	22,25	0,81	1,14	AA, ANN, AP
Pacjent 1	50 μ M	2,38	0,31	1	AA, ANN, AP
Pacjent 2	25 μ M	2,5	3,85	0,44	ANN, AP
Pacjent 2	50 μ M	1,87	0,95	0,56	ANN, AP
Pacjent 3	25 μ M	1,27	1,05	2,64	AK, ANN, AA
Pacjent 3	50 μ M	0,9	0,87	2,18	AK, ANN, AA

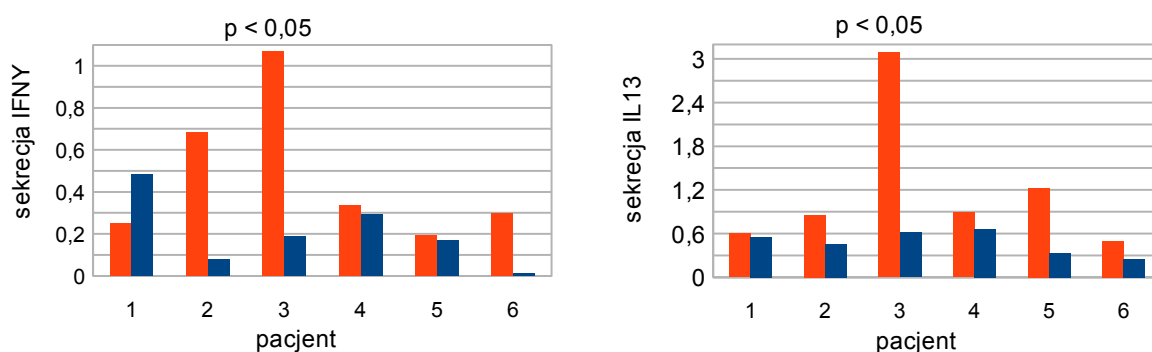
Wydaje się, że PBMC reagujące na siarczan niklu in vitro u osób z ujemnym wynikiem testu płatkowego mogą mieć związek z występowaniem alergii pokarmowej (pacjent: 1,2) w ramach tzw. reakcji krzyżowej niklu obecnego w pokarmach. Natomiast u trzeciego pacjenta jest obecne alergiczne zapalenie kontaktowe oraz astma alergiczna. Podejrzewa się, że ta reaktywność może mieć związek z tzw. systemową alergią niklową i nasilaniem stanu zapalnego w astmie alergicznej.

Podsumowując więc, wydaje się, że wyniki testu skórniego płatkowego na nikiel i ELISpot potwierdzają się, ale współwystępowanie innych chorób alergicznych (astma alergiczna, alergia pokarmowa) może powodować negatywizację wyniku testu płatkowego na nikiel, pomimo obecności w krwiobiegu komórek reagujących na nikiel.

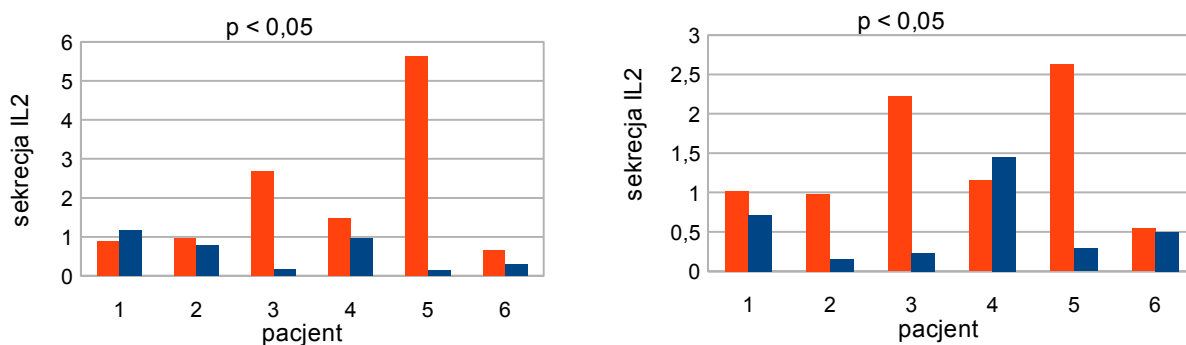
3. Alergia na roztocze kurzu domowego *Dermatophagoides pteronyssinus* w zaostrzeniu atopowego zapalenia skóry

3.1: Wpływ współwystępowania innych chorób na profil cytokinowy powstały w odpowiedzi na a.D1 u chorych z atopowym zapaleniem skóry

Analiza statystyczna porównująca sekrecję IFN γ , IL2, IL13 w grupach chorych z AZS w zaostrzeniu (n=30) i zdrowych-kontrolnych (n=30) nie wykazała istnienia różnic w odpowiedzi komórek na stymulację antygenem D1 (a.D1) o stężeniu 0.4 $\mu\text{g/ml}$ i 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ($p > 0,05$). Jak pokazuje tabela 11 na stronie 38 odpowiedź PBMC na a.D1 w hodowli in vitro jest niejednorodna (duża rozbieżność pomiędzy minimalną i maksymalną odpowiedzią na a.D1 w badanych grupach). Dlatego też w dalszej kolejności sprawdzano, czy współwystępowanie innych chorób może modyfikować profil cytokinowy otrzymywany po stymulacji PBMC a.D1 u chorych z AZS. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała wzrost sekrecji IFN γ i IL13 po stymulacji 1.0 $\mu\text{g/ml}$ a.D1 (IFN γ : $p < 0,05$ i IL13: $p < 0,05$) w grupie chorych z AZS bez chorób współistniejących w porównaniu do kontroli. Wykazano także wzrost sekrecji IL2 po stymulacji 0.4 $\mu\text{g/ml}$ i 1.0 $\mu\text{g/ml}$ a.D1 u chorych tylko z AZS bez chorób współistniejących w porównaniu do kontroli (0.4 $\mu\text{g/ml}$ a.D1: $p < 0,05$ i 1.0 $\mu\text{g/ml}$ a.D1 $p < 0,05$).



Ryc.15a: Sekrecja IFN γ (wykres po lewej stronie) oraz IL13 (wykres po prawej stronie) po stymulacji 1.0 $\mu\text{g/ml}$ a.D1 u chorych z AZS bez chorób współistniejących z dodatnim wynikiem testu punktowego na a.D1 oraz w grupie kontrolnej. Kolor: czerwony – AZS, niebieski – kontrola



Ryc. 15b: Sekrecja IL2 po stymulacji 0.4 $\mu\text{g/ml}$ a.D1 (wykres po lewej stronie) oraz 1.0 $\mu\text{g/ml}$ a.D1 (wykres po prawej stronie) u chorych tylko z AZS z dodatnim wynikiem testu punktowego na a.D1 bez chorób współistniejących oraz w grupie kontrolnej. Kolor: czerwony – AZS, niebieski - kontrola

Po dołączeniu do badanej grupy chorych tylko z AZS dodatkowych osób, u których współwystępowały inne choroby poszukiwano, które z nich najbardziej modyfikują otrzymany profil cytokinowy w stosunku do profilu otrzymanego u chorych tylko z AZS. Zaobserwowano, że najbardziej odbiegające od profilu cytokinowego otrzymanego tylko dla AZS są profile cytokinowe otrzymane dla: AZS + AA, AZS + ANN + AA + AP, AZS+ AK, AZS + AK + AA, AZS + AK + ANN + AA, AZS + AK + AP.

Tabela 14: Profil cytokinowy u chorych tylko z AZS bez chorób współistniejących z dodatnim wynikiem testu punktowego na a.D1 po dołączeniu do tej grupy chorych z AZS z różnymi chorobami współistniejącymi oraz profil cytokinowy w grupie kontrolnej

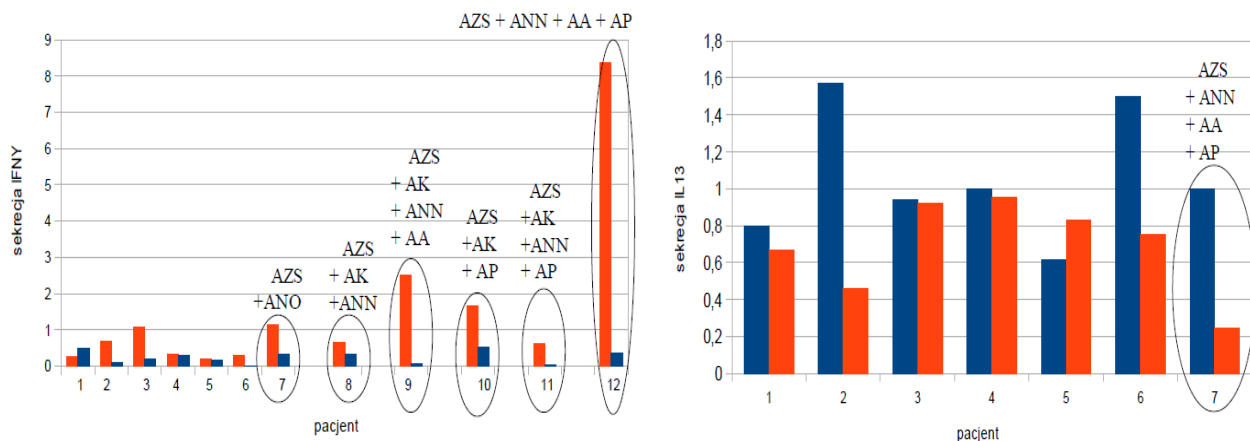
obraz kliniczny	wynik analizy porównawczej *
AZS (n=6) i AZS + ANO (n=1)	IL2 AZS> IL2 K p= 0,0364 0.4 µg/ml a. D1 IFN γ AZS> IFN γ K p=0,0364 1.0 µg/ml a. D1 IL2 AZS> IL2 K p = 0,0131 1.0 µg/ml a. D1 IL13 AZS> IL13 K p = 0,0487 1.0 µg/ml a. D1
AZS (n=6) i AZS + AA (n=2)	IL2 AZS> IL2 K p = 0,019 1.0 µg/ml a. D1 IFNγ, IL2, IL13 p>0,05 1.0 µg/ml a. D1
AZS (n=6) i AZS + ANN + AA + AP (n=1)	IL13 AZS> IL13 K p = 0,0275 0.4 µg/ml a. D1 IFN γ AZS> IFN γ K p= 0,087 1.0 µg/ml a. D1 IL13 AZS> IL13 K p= 0,0087 1.0 µg/ml a. D1
AZS (n=6) i AZS+ AK (n=2)	IFNγ, IL2, IL13 p>0,05 0.4 µg/ml a. D1 IL2 AZS>IL2 K p=0,0202 1.0 µg/ml a. D1 IL13 AZS> IL13 K p=0,0415 1.0 µg/ml a. D1
AZS (n=6) i AZS + AK + AA (n= 1)	IFNγ, IL2, IL13 p>0,05 0.4 µg/ml a. D1 IL2 AZS> IL2 K p=0,0415 1.0 µg/ml a. D1 IL13 AZS> IL13 K p=0,0415 1.0 µg/ml a. D1
AZS (n=6) i AZS + AK + ANN (n= 1)	IL2 AZS>IL2 K p=0,0364 0.4 µg/ml a. D1 IFN γ AZS> IFN γ K p=0,0487 1.0 µg/ml a. D1 IL2 AZS>IL2 K p=0,0265 1.0 µg/ml a. D1 IL13 AZS>IL13 K p=0,0265 1.0 µg/ml a. D1
AZS (n=6) i AZS + AK + ANN + AA (n= 1)	IFNγ, IL2, IL13 p>0,05 0.4 µg/ml a. D1 IFN γ AZS> IFN γ p=0,0364 1.0 µg/ml a. D1 IL2 AZS> IL2 K p=0,0131 1.0 µg/ml a. D1 IL13 AZS> IL13 K p=0,0364 1.0 µg/ml a. D1
AZS (n=6) i AZS + AK + AP (n=1)	IL13 AZS> IL13 K p=0,0367 0.4 µg/ml a. D1 IFN γ AZS> IFN γ K p=0,0265 1.0 µg/ml a. D1 IL2 AZS> IL2 K p=0,0087 1.0 µg/ml a. D1 IL13 AZS> IL13 K p=0,0265 1.0 µg/ml a. D1
AZS (n=6) i AZS + AK + ANN + AP (n=1)	IL2 AZS> IL2 K p=0,0364 0.4 µg/ml a. D1 IFN γ AZS> IFN γ K p=0,0265 1.0 µg/ml a. D1 IL2 AZS> IL2 K p= 0,0265 1.0 µg/ml a. D1
AZS (n=6) i AZS + Has (n=2)	IL2 AZS> IL2 K p= 0,0249 0.4 µg/ml a. D1 IFN γ AZS> IFN γ K p= 0,0249 1.0 µg/ml a. D1 IL2 AZS> IL2 K p= 0,0178 1.0 µg/ml a. D1

*W pozostałych nieumieszczonych w tabeli przypadkach różnice w sekrecji cytokin: p>0,05

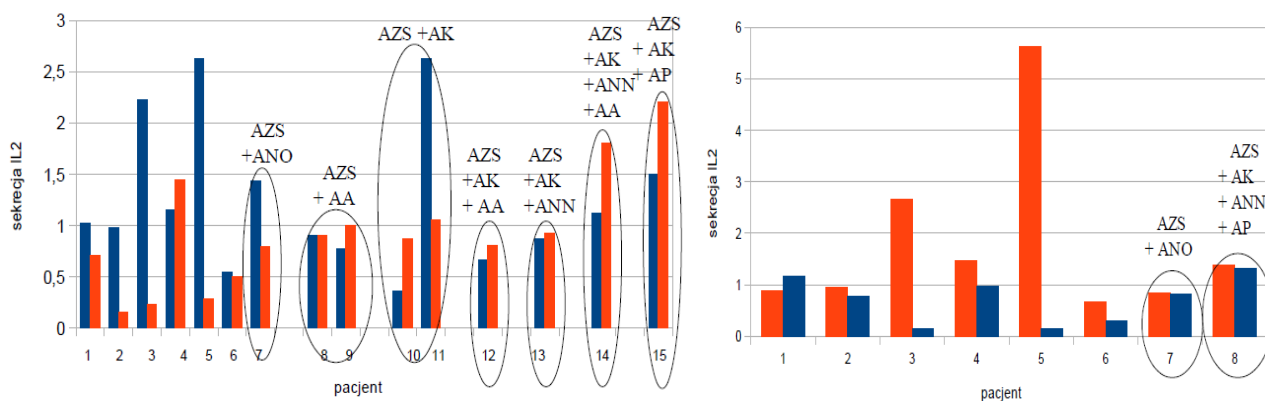
Te obserwacje wydają się pokazywać, że najbardziej skrajny i modyfikujący wpływ na profil cytokinowy w AZS mają astma alergiczna i alergiczne zapalenie kontaktowe. W przypadku astmy alergicznej wartości sekrecji cytokin Th1 (IFN γ , IL2,IL13) są niskie. Natomiast w przypadku pacjentów z alergią kontaktową wartości sekrecji IL2 są różne (wyższe dla jednego pacjenta i niższe dla drugiego pacjenta). Natomiast trudno stwierdzić, jaki jest wpływ alergicznego nieżyty nosa i alergii pokarmowej na profil cytokinowy w AZS powstały po stymulacji a.D1, gdyż w badanej grupie nie znaleziono pacjentów z AZS z alergią roztoczą tylko ze współwystępującą alergią pokarmową. Jednakże analiza wykresów pokazuje, że u pacjenta z obrazem klinicznym AZS + ANN + AA + AP (ryc.16a) obserwuje się bardzo silną sekrecję IFN γ w porównaniu z resztą pacjentów po stymulacji 1.0 μ g/ml a.D1.

Tabela 15: Profil cytokinowy po stymulacji a.D1 u chorych tylko z AZS oraz AZS z astmą alergiczną, AZS z cechami alergii kontaktowej

Pacjent	Obraz kliniczny	a.D1 (μ g/ml)	IFN γ	IL2	L13
Pacjent 1	AZS	0.4	0,37	0,89	0,8
Pacjent 1	AZS	1	0,25	1,02	0,6
Pacjent 2	AZS	0.4	0,53	0,95	1,57
Pacjent 2	AZS	1	0,68	0,98	0,86
Pacjent 3	AZS	0.4	2,03	2,67	0,94
Pacjent 3	AZS	1	1,07	2,22	3,09
Pacjent 4	AZS	0.4	0,44	1,46	1
Pacjent 4	AZS	1	0,33	1,15	0,89
Pacjent 5	AZS	0.4	0,29	5,63	0,62
Pacjent 5	AZS	1	0,19	2,63	1,23
Pacjent 6	AZS	0.4	0,72	0,66	1,5
Pacjent 6	AZS	1	0,3	0,54	0,5
Pacjent 7	AZS+AA	0.4	0,13	0,27	0,58
Pacjent 7	AZS+AA	1	0,28	0,9	1
Pacjent 8	AZS+AA	0.4	0,25	0,89	1
Pacjent 8	AZS+AA	1	0,25	0,78	1,44
Pacjent 9	AZS+AK	0.4	1,22	0,32	3,25
Pacjent 9	AZS+AK	1	0,68	0,36	6,25
Pacjent 10	AZS+AK	0.4	0,29	5,63	0,62
Pacjent 10	AZS+AK	1	0,03	2,63	1,23



Ryc.16a: Sekrecja IFN γ (wykres po lewej stronie) oraz IL13 (wykres po prawej stronie) po stymulacji 1.0 μ g/ml a.D1 u chorych tylko z AZS po włączeniu chorych z AZS z chorobami współistniejącymi. Kolor: czerwony – AZS, niebieski – kontrole

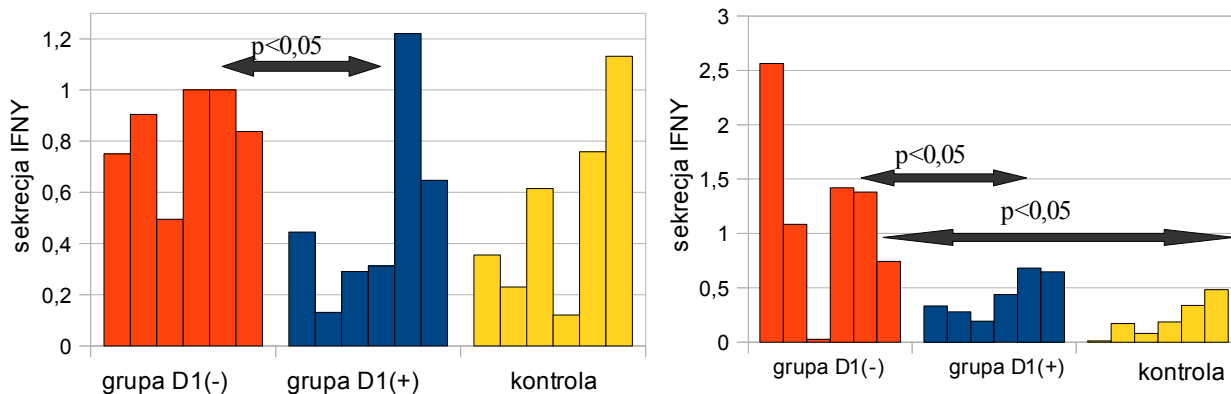


Ryc.16b: Sekrecja IL2 po stymulacji 1.0 μ g/ml a.D1. Kolor: niebieski – AZS, czerwony - kontrola (wykres po lewej stronie). Sekrecja IL2 po stymulacji 0.4 μ g/ml a. D1 (wykres po prawej stronie) u chorych tylko z AZS po włączeniu chorych z AZS z chorobami współistniejącymi. Kolor: czerwony – AZS, niebieski - kontrola

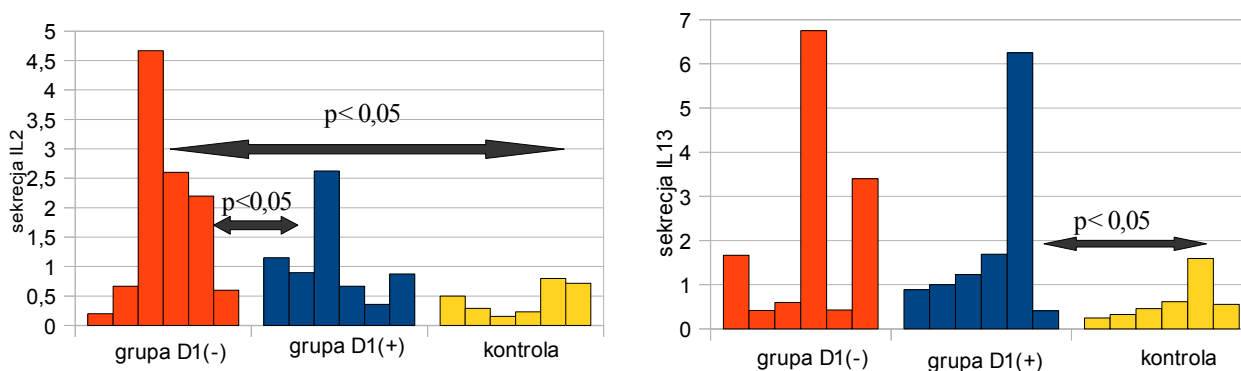
Wstępne obserwacje wydają się sugerować, że współobecność innych chorób alergicznych może modyfikować profil cytokinowy powstały po stymulacji a.D1 w AZS poprzez zwiększanie lub zmniejszanie sekrecji cytokin typu Th1 (IFN γ , IL2) i Th2 (IL13). Wpływ współwystępowania innych chorób alergicznych na profil cytokinowy powstały po a.D1 w AZS wydaje się jednak niewystarczający w przypadku obrazów klinicznych: AZS + ANO, AZS + AK, AZS + AK + ANN, AZS + AK + ANN + AP, AZS + Has), aby w pełni wyjaśnić dużą niejednorodność w odpowiedzi PBMC na a.D1 u chorych z dodatnim wynikiem testu punktowego na a.D1 w AZS.

Sprawdzano, czy profile cytokinowe otrzymane po stymulacji a.D1 u chorych z dodatnim i ujemnym wynikiem skórny testu punktowego na a.D1 różnią się. Przeprowadzono analizę porównawczą sekrecji analizowanych trzech cytokin w grupach chorych z AZS z ujemnym i dodatnim wynikiem testu punktowego na antygen D1 oraz w grupie kontrolnej. Aby uniknąć zafałszowania wyniku w postaci różnic między grupami na skutek potencjalnie modyfikującego wpływu innych chorób, do obu grup przydzielono pacjentów z tym samym "zestawem" chorób

alergicznym (podobnym obrazem klinicznym) różniących się tylko w parze wynikiem testu punktowego na antygen D1. Zaobserwowano wzrost sekrecji IFN γ w grupie D1(-) w porównaniu z D1(+) ($p < 0,05$), ale nie kontrolą ($p > 0,05$) po stymulacji 0.4 $\mu\text{g/ml}$ a.D1. Podobną zależność wykazano po stymulacji PBMC 1.0 $\mu\text{g/ml}$ a.D1 (AZS: IFN γ D1(-) > IFN γ D1(+) $p < 0,05$, kontrola $p < 0,05$ dla każdej cytokiny). W przypadku IL2 obserwuje się wzrost sekrecji tej cytokiny w grupie D1(-) w porównaniu do grupy D1(+) ($p < 0,05$) oraz kontroli ($p < 0,05$) po stymulacji 0.4 $\mu\text{g/ml}$ a.D1. W przypadku wyższego stężenia alergenu D1 użytego do stymulacji (1.0 $\mu\text{g/ml}$ D1) zaobserwowano wzrost sekrecji IL13 w grupie D1(+) w porównaniu do kontroli ($p < 0,05$), ale nie grupy D1(-) ($p > 0,05$). Wydaje się więc, że w grupie AZS D1(-) przeważa odpowiedź typu Th1 (IFN γ , IL2) na a.D1 w porównaniu z grupą AZS D1(+) przy niskich dawkach alergenu, natomiast przy wyższych dawkach alergenu w grupie AZS z D1(+) jest tendencja do odpowiedzi związanej z limfocytami Th2.



Ryc.17a: Sekrecja IFN γ po stymulacji 0.4 $\mu\text{g/ml}$ a.D1 (wykres po lewej stronie) oraz 1.0 $\mu\text{g/ml}$ a.D1 (wykres po prawej stronie) u chorych z AZS z ujemnym D1(-) oraz dodatnim D1(+) wynikiem testu punktowego na a.D1 oraz w grupie kontrolnej



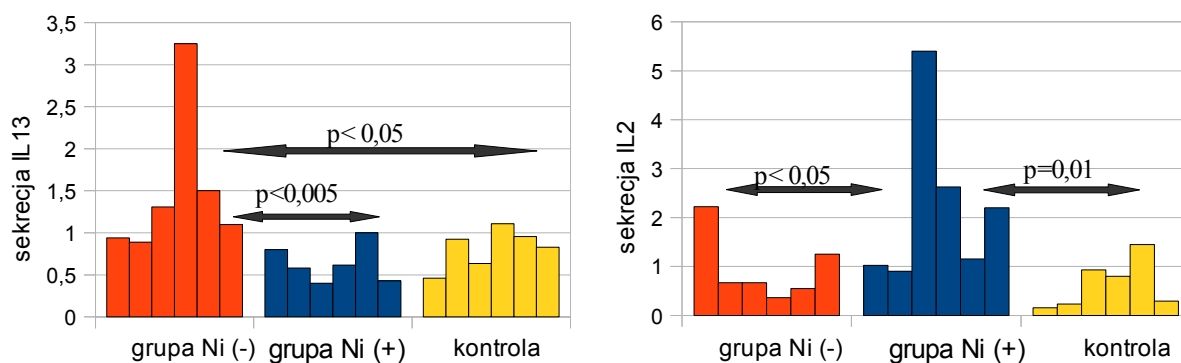
Ryc.17b: Sekrecja IL2 po stymulacji 0.4 $\mu\text{g/ml}$ D1 (wykres po lewej stronie) i sekrecja IL13 po stymulacji 1.0 $\mu\text{g/ml}$ a.D1 (wykres po prawej stronie) u chorych z AZS z ujemnym D1(-) i dodatnim D1(+) wynikiem testu punktowego na a.D1 oraz w grupie kontrolnej

Otrzymane wyniki sugerują więc, że w AZS odpowiedź na a.D1 może być zarówno Th1-zależna oraz Th2-zależna. Jednakże u chorych z AZS ze skórą reagującą na a.D1 zgodnie z mechanizmem

typu wczesnego, w teście punktowym na a.D1 reagują zarówno Th1 oraz Th2 tylko przy wyższych dawkach alergenu. Natomiast u chorych z AZS, których skóra nie reaguje na a.D1 w teście punktowym, obserwuje się tylko aktywację limfocytów Th1 przy niższych dawkach alergenu. Wydaje się więc, że w rozwoju alergii roztoczowej w AZS odgrywają rolę mechanizmy Th1 i Th2 zależne.

3.2: Współdziałanie alergenów – wpływ modyfikacji środowiska cytokinowego przez nikiel na profil cytokinowy PBMC stymulowanych a.D1

Zakłada się, że modyfikacja środowiska cytokinowego przez nikiel może wpływać na profil cytokinowy PBMC reagujących na a.D1. Pobudzone in vivo PBMC przez alergen niklowy (model in vitro reakcji PBMC na siarczan niklu naśladuje zjawisko zachodzące in vivo) odpowiadające na a.D1 in vitro prezentują profil cytokinowy będący wypadkową działania tych dwóch alergenów. Przeprowadzona analiza porównawcza wykazała, że w grupie chorych z AZS z ujemnym wynikiem testu płatkowego na nikiel Ni(-) obserwowano wzrost sekrecji IL13 po stymulacji 0.4 µg/ml a.D1 w porównaniu do chorych z AZS z dodatnim wynikiem testu płatkowego na nikiel Ni(+) (p<0,005) oraz kontroli (p<0,05). Nikiel wydaje się więc przeciwdziałać rozwojowi odpowiedzi typu Th2 (IL13) na a.D1. Natomiast w przypadku stymulacji 1.0 µg/ml a. D1 obserwowano wzrost sekrecji IL2 w grupie AZS z Ni(+) w porównaniu do grupy AZS z Ni(-) (p<0,05) oraz kontroli (p=0,01). Ta obserwacja sugeruje więc, że nikiel może promować odpowiedź typu Th1 na a.D1.



Ryc.18: Sekrecja IL13 po stymulacji 0.4 µg/ml a.D1 (wykres po lewej stronie) oraz IL2 po stymulacji 1.0 µg/ml a.D1 (wykres po prawej stronie) w grupie chorych z AZS z ujemnym Ni(-) i dodatnim Ni(+) wynikiem testu płatkowego na nikiel oraz w grupie kontrolnej

W dalszej kolejności sprawdzono, czy istnieją zależności w sekrecji cytokin po stymulacji a.D1 i siarczanem niklu. Zaobserwowano istnienie następujących korelacji:

Tabela 16: Korelacja pomiędzy sekrecją cytokin po stymulacji a.D1 i NiSO₄ u chorych z AZS z ujemnym Ni(-) i dodatnim Ni(+) wynikiem testu płatkowego na nikiel oraz w grupie kontrolnej

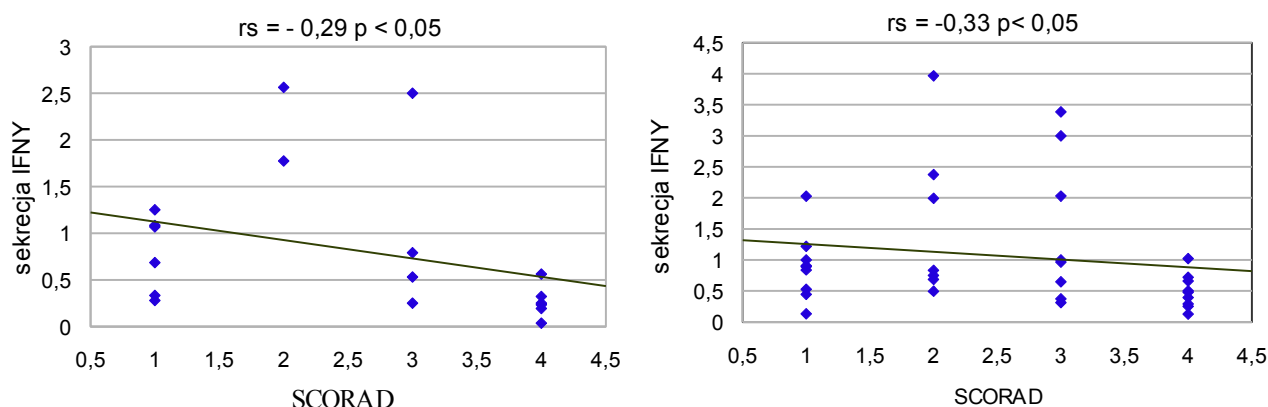
<p>Grupa AZS Ni(-): asIgE dla D1: 2- 4 klasa, (+) test punktowy a. D1: 83%</p> <p>–stymulacja 0.4 µg/ml a.D1: IFNγ NiSO₄ - IFNγ a. D1 rs= 0,8286 p=0,0292</p> <p>–stymulacja 0.4 µg/ml a.D1: IL2 NiSO₄- IFNγ a. D1 rs=0, 8286 p=0,0208</p> <p>–stymulacja 0.4 µg/ml a.D1: IL13 NiSO₄-IFNγ a. D1 rs= 0,8697 p=0,0167</p> <p>W pozostałych przypadkach nie wykazano istnienia korelacji (p>0,05).</p>
<p>Grupa AZS Ni(+): asIgE dla D1: 3-6 klasa (+) test punktowy a. D1: 83%</p> <p>–stymulacja 0.4 µg/ml a.D1: IL2 NiSO₄ - IFNγ a. D1 rs= 0,9429 p=0,0083</p> <p>–stymulacja 1.0 µg/ml a. D1: IFNγ NiSO₄ - IFNγ a. D1 rs= 0,9429 p=0,0083</p> <p>–stymulacja 1.0 µg/ml a. D1: IL2 NiSO₄ – IL2 a. D1 rs= 0,9429 p=0,0083</p> <p>W pozostałych przypadkach nie wykazano istnienia korelacji (p>0,05).</p>
<p>Kontrola: p>0,05 asIgE dla D1: 0 klasa (+) test punktowy a. D1:0%</p>

W przypadku grupy kontrolnej nie zaobserwowano istnienia korelacji, co sugeruje, że nie ma związku pomiędzy reaktywnością PBMC u zdrowych na siarczan nikiel i antygen D1 roztocza kurzu domowego. Natomiast w grupach AZS wykazano istnienie korelacji, co może oznaczać, że komórki reagujące na a.D1 również mogą reagować na nikiel, co może odgrywać istotną rolę w kształtowaniu środowiska cytokinowego istotnego w różnicowaniu limfocytów T oraz ich aktywacji i migracji. W grupie AZS Ni(+) są to głównie synergistyczne zależności pomiędzy cytokinami typu Th1, co mogłoby tłumaczyć wzrost sekrecji IL2 w grupie AZS Ni(+) w porównaniu z pozostałymi grupami. W grupie AZS Ni(-) zaobserwowano, że oprócz wspomnianych powyżej dodatnich korelacji dla cytokin Th1, wzrost sekrecji IFN γ po stymulacji a.D1 wiąże się ze wzrostem sekrecji IL13 po stymulacji siarczanem nikiel.

3.3: Wpływ występowania alergii roztoczowej potwierdzonej dodatnimi wynikami testu punktowego na a.D1 na nasilenie objawów skórnych w atopowym zapaleniu skóry (wskaźnik SCORAD)

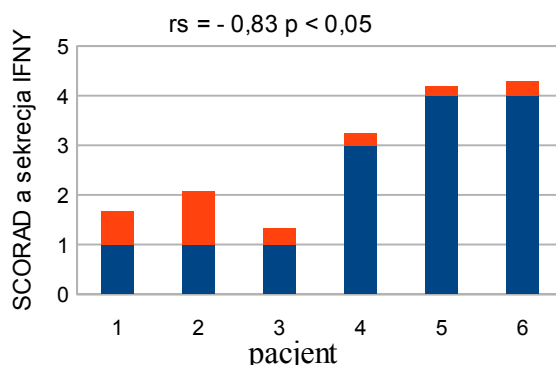
Poszukiwano czy istnieje związek między spontaniczną sekrecją cytokin (IFN γ , IL2, IL13), a nasileniem zmian skórnych wg wskaźnika SCORAD, aby wykazać, że nasilenie zmian skórnych jest zdeterminowane przez środowisko cytokinowe tworzone przez różne alergeny, z którymi PBMC mają kontakt w ustroju. Analizę korelacji wskaźnika nasilenia zmian skórnych SCORAD i profilu cytokinowego po stymulacji a.D1 in vitro przeprowadzono w grupach chorych z AZS (n=30) z dodatnim D1(+) i ujemnym D1(-) wynikiem skórny testu punktowego na a.D1. Zaobserwowano ujemną korelację pomiędzy sekrecją IFN γ po stymulacji 0.4 µg/ml oraz 1.0 µg/ml

a.D1 a SCORAD (0.4 µg/ml a.D1: $r_s = -0,29$ $p < 0,05$,1.0 µg/ml a.D1: $r_s = -0,33$ $p < 0,05$).



Ryc. 19 Sekrecja IFN γ a SCORAD u chorych z AZS po stymulacji 0.4 µg/ml a.D1 (wykres po lewej stronie) i 1.0 µg/ml a.D1 (wykres po prawej stronie)

To sugeruje, że istnieje związek pomiędzy reaktywnością PBMC na a. D1 a nasileniem zmian skórnych. Dalszą analizę przeprowadzono w grupie chorych tylko z AZS D1(+) w celu sprawdzenia czy ta zależność ma związek z klasyczną alergią roztoczą w AZS potwierdzoną dodatnim wynikiem testu punktowego na D1 tj. AZS z D1(+). Zaobserwowano ujemną korelację pomiędzy wskaźnikiem SCORAD a sekrecją IFN γ po stymulacji 1.0 µg/ml a.D1 ($r_s = -0,83$ $p < 0,05$).



Ryc.20: Sekrecja IFN γ a SCORAD u chorych tylko z AZS bez chorób współistniejących z dodatnim wynikiem testu punktowego na a.D1 po stymulacji 1.0 µg/ml a.D1. Kolor: niebieski -SCORAD, czerwony – sekrecja IFN γ

Wydaje się więc, że w atopowym zapaleniu skóry z klasyczną alergią roztoczą z D1(+) dochodzi do zmniejszania się liczby PBMC w krwi wydzielających IFN γ ze wzrostem nasilenia zmian skórnych. W kolejnej analizie sprawdzono czy opisana powyżej zależność występuje również u chorych z AZS z ujemnym wynikiem testu punktowego na a.D1. Aby wykluczyć zafałszowanie wyników przez potencjalnie modyfikujący wpływ współwystępowania chorób z AZS, badania przeprowadzono na grupach z tym samym "zestawem" chorób alergicznych w parze różniących się tylko wynikiem testu punktowego na a.D1. Nie wykazano istnienia korelacji SCORAD – sekrecja cytokin ($p > 0,05$) w żadnej z badanych grup tj. AZS D1(+) i AZS D1(-).

Tabela 17: Reaktywność PBMC na a.D1 a SCORAD u chorych z AZS i chorobami współistniejącymi z dodatnim D1 (+) i ujemnym D1(-) wynikiem testu punktowego na a.D1

D1(+)	a. D1 (µg/ml)	Obraz kliniczny	IFN γ	IL2	IL13	SCORAD	D1(-)	Obraz kliniczny	IFN γ	IL2	IL13	SCORAD
Pac1	0.4	AZS	0,44	1,46	1	1	Pac7	AZS	0,75	1	2,67	2
Pac1	1	AZS	0,33	1,15	0,89	1	Pac7	AZS	2,56	0,2	1,67	2
Pac2	0.4	AZS+AA	0,13	0,27	0,58	1	Pac8	AZS+AA	0,9	2,33	0,42	1
Pac2	1	AZS+AA	0,28	0,9	1	1	Pac8	AZS+AA	1,08	0,67	0,42	1
Pac3	0.4	AZS+AK	0,29	5,63	0,62	4	Pac9	AZS+AK	0,49	10	0,2	2
Pac3	1	AZS+AK	0,19	2,63	1,23	4	Pac9	AZS+AK	0,03	4,67	0,6	2
Pac4	0.4	AZS+AK	0,31	0,5	1,31	3	Pac10	AZS+AK	1	1,8	1,25	3
Pac4	1	AZS+AK	0,44	0,67	1,69	3	Pac10	AZS+AK	1,42	2,6	6,75	3
Pac5	0.4	AZS+AK	1,22	0,32	3,25	1	Pac11	AZS+AK	1	5	0,43	3
Pac15	1	AZS+AK	0,68	0,36	6,25	1	Pac11	AZS+AK	1,38	2,2	0,43	3
Pac6	0.4	AZS+AK+ANN	0,65	0,75	0,59	3	Pac12	AZS+AK+ANN	0,84	0,8	0,8	1
Pac6	1	AZS+AK+ANN	0	0	0	3	Pac12	AZS+AK+ANN	0	0	3,4	1

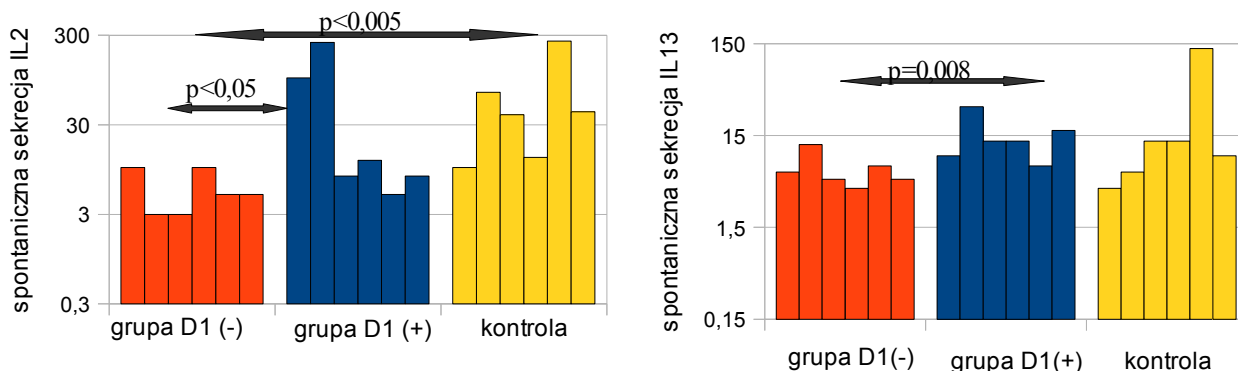
Zaistniała zależność między SCORAD a sekrecją IFN γ u chorych z AZS bez chorób współistniejących zanika, gdy analizę przeprowadzono u chorych z AZS D1(+) z różnymi obrazami klinicznymi. Wydaje się więc, że współwystępowanie chorób alergicznych z AZS może modyfikować profil cytokinowy w odpowiedzi na a.D1, a w rezultacie może wpływać na molekularne mechanizmy związane z pojawianiem się atopowych zmian na skórze.

3.4: Czy wynik testu skórnego punktowego na a.D1 odzwierciedla potencjał PBMC do reagowania na a. D1 in vitro – analiza porównawcza dwóch typów testów: skórnego punktowego in vivo oraz immunobarwienie w teście in vitro ELISpot

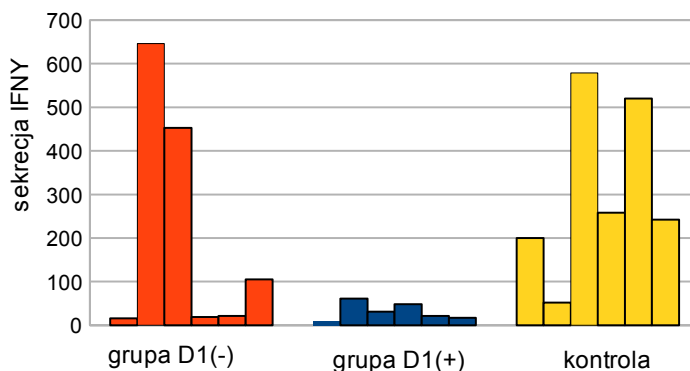
Test punktowy na a.D1 informuje o obecności leukocytów w skórze posiadających receptory kierujące do skóry (Cutaneous Lymphocyte Antigen tzw. CLA). Te komórki mają zdolność reagowania na antygen D1 zgodnie z mechanizmem immunologicznym typu I (wczesna reakcja immunologiczna). Test Elispot informuje o obecności leukocytów w krwiobiegu, w tym przypadku o potencjale reagowania na a.D1 in vitro. Te komórki mogą, ale nie muszą posiadać zdolność migracji do skóry.

Przeprowadzono analizę zależności pomiędzy spontaniczną sekrecją badanych cytokin, a wynikami testu punktowego na a.D1 w celu wykazania, że pojawienie się odpowiedzi skóry na a. D1 zależy od środowiska cytokinowego we krwi, które m.in. może regulować ekspresję receptora CLA (receptor zasiedlania skóry obecny na leukocytach). Leukocyty migrujące do skóry mogą dawać dodatni wynik skórnego testu punktowego na a.D1. Ze względu na ryzyko wystąpienia różnic między grupami AZS D1(+) i D1(-) związanych z dodatkowym wpływem różnych chorób alergicznych na profil cytokinowy w AZS analizę przeprowadzono na pacjentach z tym samym

zestawem chorób alergicznych w parze, różniących się tylko wynikiem skórniego testu punktowego na a.D1. Zaobserwowano niedobór IL2 w grupie D1(-) w stosunku do grupy D1(+) i kontroli ($IL2\ D1(-) < IL2\ D1(+)$ $p < 0,05$ i $IL2\ D1(-) < IL2\ K$ $p < 0,005$). W grupie D1(+) wykazano wzrost sekrecji IL13 w stosunku do grupy AZS z D1(-) ($IL13\ D1(+)$ $> IL13\ D1(-)$ $p = 0,008$), ale nie kontroli ($p > 0,05$). Dodatkowo w grupie D1(+) zaobserwowano niedobór $IFN\gamma$ w stosunku do kontroli ($IFN\gamma\ D1(+)$ $< IFN\gamma\ K$ $p < 0,005$).



Ryc. 21a: Spontaniczna sekrecja IL2 (wykres po lewej stronie) oraz IL13 (wykres po prawej stronie) u chorych z AZS z ujemnym D1(-) i dodatnim D1(+) wynikiem testu płatkowego na a.D1 oraz w grupie kontrolnej



Ryc. 21b: Spontaniczna sekrecja $IFN\gamma$ u chorych z AZS z ujemnym D1(-) i dodatnim D1(+) wynikiem testu płatkowego na a.D1 oraz w grupie kontrolnej

Widoczne jest więc, że u chorych z AZS z D1(+) przeważa sekrecja IL2 oraz IL13, natomiast spada sekrecja $IFN\gamma$ wydzielanego głównie u chorych z AZS z D1(-).

W dalszej kolejności sprawdzano, czy wynik testu punktowego jest zależny od obecności komórek we krwi reagujących na a.D1 i w rezultacie wydzielających cytokinę/y. W tym celu sprawdzono czy PBMC reagujące na a.D1 in vitro występują tylko w grupie AZS z D1(+), AZS z D1(-) oraz w grupie kontrolnej. Zaobserwowano, że przynajmniej dwukrotny wzrost liczby PBMC wydzielających analizowane cytokiny po stymulacji antygenem D1 in vitro występują we wszystkich 3 badanych grupach.

Tabela 18: Wybrane przypadki silnej reaktywność PBMC na a.D1 u chorych z AZS z ujemnym D1(-) i dodatnim D1(+) wynikiem testu punktowego na a.D1 oraz w grupie kontrolnej

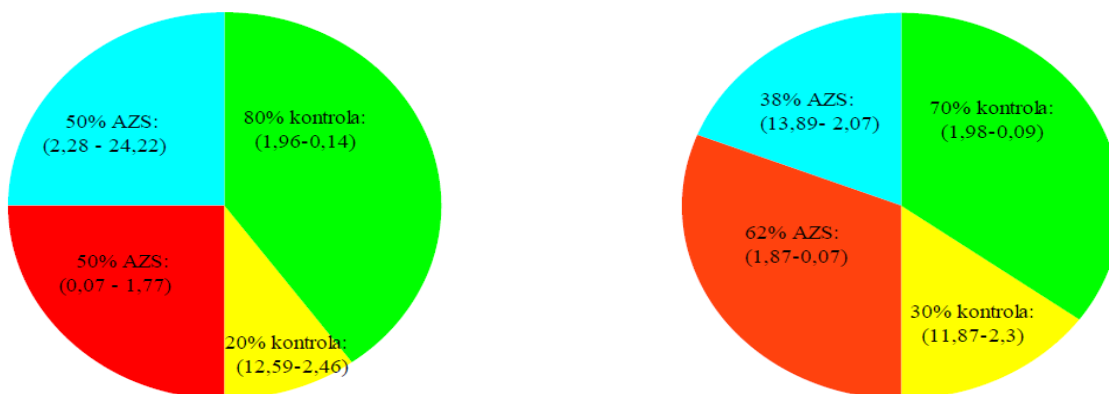
Pacjent	a. D1 (µg/ml)	Obraz kliniczny	IFN γ	IL2	IL13
Pacjent1	0.4	AZS	0,75	1	2,67
Pacjent1	1	AZS	2,56	0,2	1,67
Pacjent2	0.4	AZS+AK	2,03	0,29	0,5
Pacjent2	1	AZS+AK	0,79	0,16	0,33
Pacjent3	0.4	AZS+AK	1	0,75	1,1
Pacjent3	1	AZS+AK	1,25	1,25	2,2
Pacjent4	0.4	AZS+AK	0,49	10	0,2
Pacjent4	1	AZS+AK	0,03	4,67	0,6
Pacjent5	0.4	AZS+AK	1	1,8	1,25
Pacjent5	1	AZS+AK	1,42	2,6	6,75
Pacjent6	0.4	AZS+AK	1	5	0,43
Pacjent6	1	AZS+AK	1,38	2,2	0,43
Pacjent7	0.4	AZS+AK	3,38	1,05	0,86
Pacjent7	1	AZS+AK	5,54	1,37	1,28
Pacjent8	0.4	AZS+AK+ANN	0,84	0,8	0,8
Pacjent8	1	AZS+AK+ANN	0,74	0,6	3,4
Konrtola1	0.4	zdrowy	0,69	0,82	0,8
Konrtola1	1	zdrowy	0,89	1	2,6
Konrtola2	0.4	zdrowy	0,27	1,06	2
Konrtola2	1	zdrowy	0,36	0,89	3,33
Konrtola3	0.4	zdrowy	0,63	0,2	2,1
Konrtola3	1	zdrowy	0,53	2,2	8,2

Wydaje się więc, że nie zawsze skórny test punktowy informuje o obecności PBMC o potencjale reagowania na a.D1.

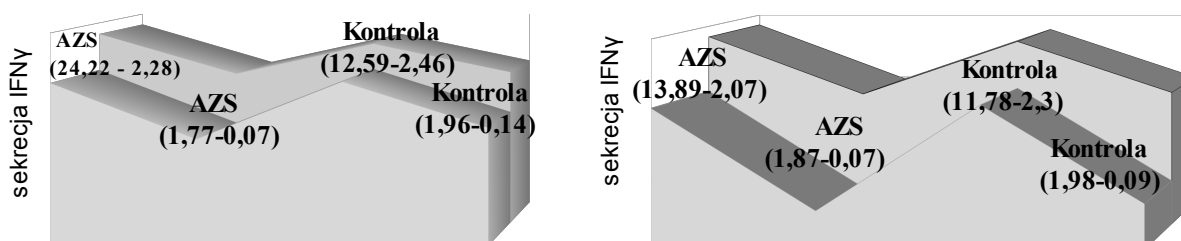
4. Reaktywność PBMC na enterotoksyny A i B gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus*

4.1: Wpływ współwystępowania innych chorób alergicznych na profil cytokinowy powstały po stymulacji gronkowcowymi enterotoksynami A i B u chorych z atopowym zapaleniem skóry

Publikacje z zakresu alergologii donoszą, że u chorych z AZS dochodzi do niedoboru sekrecji IFN γ , co m.in. prowadzi u nich do rozwoju infekcji gronkowcowych. Z drugiej jednak strony terapia IFN γ stosowana u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry nie przynosi oczekiwanych efektów – powoduje zmniejszenie nasilenia zmian skórnych, ale nie likwiduje przyczyny; poziom surowiczej IgE nie ulega zmianie wskutek leczenia IFN γ . Wyniki badań przeprowadzonych w ramach opisanego w tej pracy projektu pokazują (tabela 11 na stronie 38), że odpowiedź komórek jednojądrzastych krwi (PBMC) na SEA i SEB in vitro jest niejednorodna (duża rozbieżność pomiędzy minimalną a maksymalną odpowiedzią na enterotoksyny A i B w grupie chorych z AZS i kontrolnej). W grupie chorych z AZS obserwuje się zarówno pacjentów z dużą sekrecją IFN γ po stymulacji SEA i SEB in vitro (SEA: 50% pacjentów z AZS, SEB: 38%) oraz w grupie osób kontrolnych (SEA: 20%, SEB: 30%), a drugą grupę stanowią osoby z niską sekrecją IFN γ po stymulacji SEA i SEB u chorych z AZS (SEA: 50% , SEB: 62% pacjentów z AZS) oraz w grupie kontrolnej (SEA: 80% , SEB: 70%).



Ryc.22a: Procentowy rozkład sekrecji IFN γ w grupie chorych z AZS i w grupie kontrolnej po stymulacji SEA (diagram po lewej stronie) i SEB (diagram po prawej stronie). W nawiasach podano przedział wartości sekrecji badanej cytokiny w poszczególnych grupach



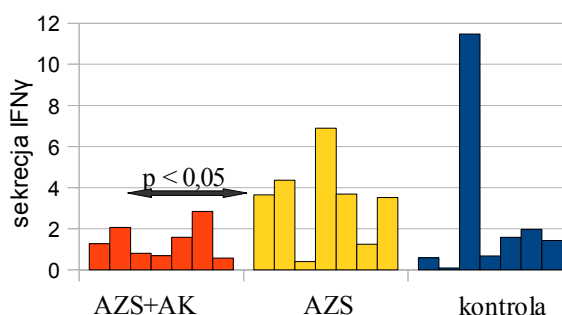
Ryc.22b: Poziom sekrecji IFN γ u chorych z AZS i w grupie kontrolnej po stymulacji SEA (wykres po lewej stronie) i SEB (wykres po prawej stronie)

Superantygeny aktywują limfocyty T niezależnie od ich specyficzności, co pozwala stwierdzić która z puli limfocytów T posiadających receptor TCR przeważa u pacjenta. Wyniki badań sugerują, że zarówno populacja chorych z AZS oraz osób zdrowych dzieli się na podgrupę chorych z przewagą limfocytów Th1 (sekrecja IFN γ) - głównie wśród chorych z AZS i w mniejszym stopniu w grupie kontrolnej. Drugą podgrupę stanowią osoby, u których nie zaobserwowano przewagi żadnej z populacji limfocytów Th zarówno wśród chorych z AZS oraz w grupie kontrolnej.

Aby odpowiedzieć na pytanie, co może być przyczyną różnej sekrecji IFN γ , pacjentów podzielono pod względem współwystępowania z AZS innych chorób. W przypadku chorych tylko z AZS bez chorób współistniejących nie zaobserwowano różnic w sekrecji badanych cytokin po stymulacji SEA i SEB w porównaniu z grupą kontrolną (SEA i SEB: $p > 0,05$). W tej grupie byli zarówno pacjenci, których PBMC charakteryzowały się wysoką oraz niską sekrecją IFN γ oraz IL2 i IL13 po stymulacji SEA oraz SEB in vitro. Po dołączeniu do grupy chorych tylko z AZS pacjentów z następującymi obrazami klinicznymi: AZS z astmą alergiczną ($n=2$), AZS z alergią pokarmową ($n=1$), AZS z astmą alergiczną i alergią pokarmową ($n=2$), AZS z astmą alergiczną i alergicznym nieżytem nosa i alergią pokarmową ($n=1$), AZS z alergicznym nieżytem oczu ($n=1$), AZS z chorobą Hashimoto ($n=2$), AZS z cechami alergii kontaktowej, alergicznym nieżytem nosa i alergią pokarmową ($n=2$) nie zaobserwowano różnic pomiędzy chorymi z AZS i grupą kontrolną ($p > 0,05$).

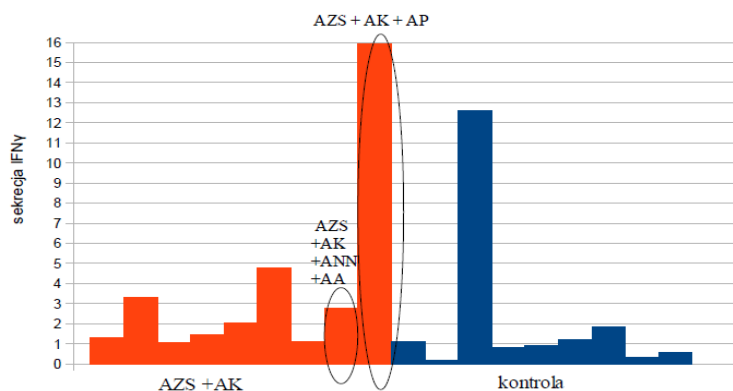
dla SEA i SEB). Wśród tych chorych również byli pacjenci z wysoką i niską sekrecją IFN γ po stymulacji SEA i SEB.

Analiza porównawcza profili cytokinowych powstałych po stymulacji SEA i SEB w grupie chorych z AZS z cechami alergii kontaktowej z grupą chorych tylko z AZS oraz z grupą kontrolną wykazała, że u chorych tylko z AZS sekrecja IFN γ po stymulacji SEB jest wyższa niż u chorych z AZS z cechami alergii kontaktowej ($p < 0,05$), ale nie wyższa niż u kontroli ($p > 0,05$). W przypadku stymulacji SEA nie wykazano różnic w sekrecji cytokin pomiędzy badanymi grupami ($p > 0,05$).



Ryc.23: Sekrecja IFN γ u chorych z AZS+AK, AZS oraz w grupie kontrolnej po stymulacji SEB.

Wydaje się więc, że wystąpienie cech alergii kontaktowej u chorych z AZS będzie się wiązało ze zmniejszeniem puli limfocytów Th1 (zmniejszenie sekrecji IFN γ po stymulacji enterotoksyną B). Po dodaniu do grupy chorych z AZS i cechami alergii kontaktowej pacjenta z AZS i cechami alergii kontaktowej i alergicznym nieżytem nosa i astmą alergiczną zaobserwowano wzrost sekrecji IFN γ w stosunku do kontroli (IFN γ po SEA: AZS +AK+ ANN + AA > IFN γ po SEA: K $p < 0,05$). Podobny wynik otrzymano w przypadku dodania do grupy chorych z AZS z cechami alergii kontaktowej pacjenta z AZS z cechami alergii kontaktowej i alergią pokarmową (IFN γ po SEA : AZS +AK + AP > IFN γ po SEA : K $p < 0,05$). Wartości sekrecji IFN γ otrzymane dla pacjenta z AZS z cechami alergii kontaktowej i alergicznym nieżytem nosa i astmą alergiczną są na poziomie wyższych wartości otrzymanych dla chorych z AZS z cechami alergii kontaktowej. Natomiast u pacjentki z AZS z cechami alergii kontaktowej i alergią pokarmową wartości sekrecji IFN γ kilkakrotnie przewyższały najwyższą wartość sekrecji tej cytokiny po stymulacji SEA otrzymaną dla chorych z AZS z cechami alergii kontaktowej. W przypadku profili cytokinowych powstałych po stymulacji SEB nie wykazano różnic między grupami chorych z AZS i kontrolną ($p > 0,05$).



Ryc.24: Sekrecja IFN γ po stymulacji SEA u chorych z AZS + AK po dodaniu do grupy pacjentów z AZS + AK + ANN + AA oraz AZS + AK + AP.

Wydaje się więc, że obecność alergii pokarmowej u chorych z cechami alergii kontaktowej w AZS oraz alergii układu oddechowego (alergiczny nieżyt nosa i astma alergiczna) sprzyja zwiększeniu puli limfocytów Th1 wydzielających IFN γ . Wyniki powyższych analiz pokazują, że obecność innych chorób alergicznych u chorych z AZS wpływa na profil cytokinowy powstały po stymulacji PBMC gronkowcowymi enterotoksynami A i B in vitro, gdy u pacjentów występują cechy alergii kontaktowej. W przypadku współwystępowania z AZS innych chorób (astma alergiczna, alergiczny nieżyt nosa, alergiczny nieżyt oczu) oraz choroby Hashimoto bez udziału cech alergii kontaktowej nie obserwowano wpływu współwystępowania tych chorób na profil cytokinowy po SEA i SEB w AZS.

W dalszej kolejności sprawdzono czy nosicielstwo *Staphylococcus aureus* wpływa na profil cytokinowy otrzymywany po stymulacji SEA i SEB in vitro. Zakłada się, że obecność *S. aureus* aktywuje układ immunologiczny in vivo, a stymulacja SEA i SEB in vitro pokazuje jaki typ limfocytów Th dominuje w tej grupie chorych z AZS. W celu sprawdzenia tej hipotezy pacjentów podzielono na grupę chorych z AZS, w której wykazano nosicielstwo *S. aureus*, grupę chorych z AZS z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo *S. aureus* oraz grupę kontrolną również z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo *S. aureus*. W pierwszej kolejności sprawdzono, czy PBMC w badanych grupach wykazują różnice w spontanicznej sekrecji cytokin in vitro. Podejrzewa się, że u nosicieli *S. aureus* PBMC uległy aktywacji in vivo, czego skutkiem będzie inna (wyższa/nizsza) spontaniczna sekrecja cytokin in vitro w porównaniu z pacjentami z AZS i kontrolami z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo tej bakterii. Przeprowadzona analiza nie wykazała istnienia różnic w spontanicznej sekrecji cytokin (IFN γ , IL2, IL13) pomiędzy grupą nosicieli *S. aureus* z AZS, chorych z AZS z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo oraz kontroli ($p > 0,05$).

Tabela 19: Spontaniczna reaktywność PBMC na SEA i SEB u nosicieli *S. aureus* z AZS, chorych z AZS oraz kontroli z ujemnym testem na nosicielstwo *S. aureus*

brak <i>S. aureus</i>	IFN γ	IL2	IL13	<i>S. aureus</i>	IFN γ	IL2	IL13	kontrole	IFN γ	IL2	IL13
Pac1	75	203	17	Pac1	18	14	8	Kontr 1	150	33	11
Pac2	62	6	9	Pac2	47	89	26	Kontr 2	13	3	7
Pac3	646	3	12	Pac3	4	9	16	Kontr 3	176	68	13
Pac4	236	58	9	Pac4	105	5	5	Kontr 4	13	20	25
Pac5	13	106	29	Pac5	531	101	8	Kontr 5	11	14	7
Pac6	8	37	8	Pac6	19	60	7	Kontr 6	10	21	11

Wyniki sugerują więc, że nosicielstwo *S. aureus* w AZS nie zmienia składu PBMC (Th1/Th2).

Sprawdzono także, czy nosicielstwo *S. aureus* wpływa na przesunięcie równowagi immunologicznej Th1/Th2 poprzez analizę profili cytokinowych in vitro w badanych grupach AZS nosicieli *S. aureus* i chorych z AZS oraz kontroli z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo. W tym celu porównano profile cytokinowe powstałe po stymulacji SEA i SEB specyficznymi wiążącymi się z limfocytami T zawierającymi receptor TCR. Analiza porównawcza przyrostu liczby PBMC wydzielających cytokiny (IFN γ , IL2, IL13) po stymulacji SEA i SEB in vitro nie wykazała istnienia różnic pomiędzy grupą chorych z AZS będących nosicielami *S. aureus* oraz chorych z AZS z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo ($p > 0,05$). Podobnie w przypadku grupy chorych z AZS z dodatnim i ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo *S. aureus* nie stwierdzono istnienia różnic w porównaniu do kontroli ($p > 0,05$). W obu grupach chorych z AZS i kontroli są pacjenci, których PBMC wykazują wysoką i niską sekrecję IFN γ .

Tabela 20: Sekrecja cytokin u chorych z AZS będących nosicielami *S. aureus* oraz chorych z AZS i kontroli z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo *S. aureus*

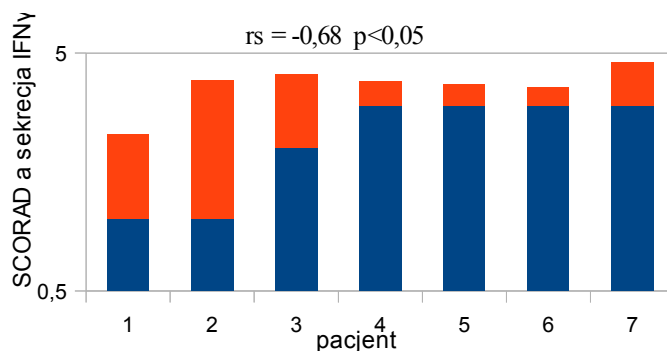
stymulant	Brak <i>S.aureus</i>	IFN γ	IL2	IL13	<i>S.aureus</i>	IFN γ	IL2	IL13	Kontrole	IFN γ	IL2	IL13
SEA	Pac1	4,8	0,59	0,94	Pac7	15,94	1,5	1,25	kontr1	1,85	4	1,09
SEB	Pac1	2,84	0,66	1,06	Pac7	13,89	1,36	1,88	kontr1	1,43	3,73	1,54
SEA	Pac2	3,35	0,67	0,67	Pac8	3,35	0,67	0,67	kontr2	0,92	1,67	0,86
SEB	Pac2	4,16	0,83	0,56	Pac8	4,16	0,83	0,55	kontr2	1	2	0,71
SEA	Pac3	0,25	2	0,58	Pac9	0,75	0,44	0,44	kontr3	1,21	1,94	0,46
SEB	Pac3	0,51	2	0,5	Pac9	0,5	0,78	0,56	kontr3	1,98	1,91	1,15
SEA	Pac4	2,28	2	0,44	Pac10	3,29	4,2	1,6	kontr4	1,15	0,9	1,04
SEB	Pac4	3,05	3,12	0,78	Pac10	2,07	2	0,8	kontr4	0,61	1,35	1,08
SEA	Pac5	1,46	0,95	1,14	Pac11	0,51	1,69	2,5	kontr5	1,45	0,4	1
SEB	Pac5	0,69	0,9	0,34	Pac11	0,16	1,74	5,87	kontr5	1,79	0,5	1,75
SEA	Pac6	0,37	1,35	1,75	Pac12	2,42	0,92	1,71	kontr6	5,5	1,52	2,18
SEB	Pac6	1,25	0,81	2,12	Pac12	4,37	0,93	0,86	kontr6	2,3	0,67	1,09

Wyniki otrzymanych analiz sugerują więc, że nosicielstwo *S. aureus* nie wpływa na typ limfocytów T dominujących w ustroju chorego z AZS.

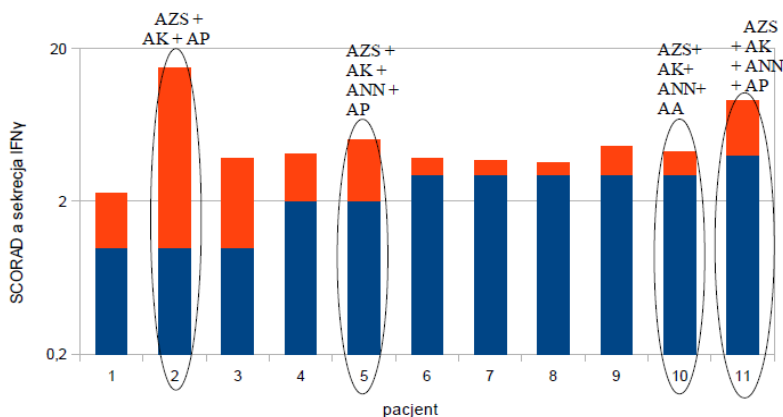
4.2: Wpływ reaktywności PBMC na enterotoksyny gronkowcowe A i B w grupie chorych z AZS na nasilenie objawów skórnych w atopowym zapaleniu skóry (wskaźnik SCORAD)

Zakłada się, że nasilenie zmian skórnych (wskaźnik SCORAD) jest zdeterminowane przez środowisko cytokinowe tworzone m.in. przez PBMC obecne w ustroju. Wykonano analizę korelacji wskaźnika SCORAD i profilu cytokinowego powstałego po stymulacji SEA i SEB u chorych z AZS. Nie wykazano istnienia związku pomiędzy wartościami wskaźnika SCORAD, a spontaniczną sekrecją cytokin u nosicieli *S. aureus* oraz pacjentów z AZS z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo ($p > 0,05$). U pacjentów tylko z AZS nie zaobserwowano związku pomiędzy sekrecją cytokin po stymulacji SEA i SEB a SCORAD ($p > 0,05$). Również po dodaniu do grupy chorych tylko z AZS pacjentów ze współwystępującą astmą alergiczną, alergią pokarmową, astmą alergiczną i alergią pokarmową, alergicznym nieżytem oczu, alergicznym nieżytem nosa i astmą alergiczną i alergią pokarmową nie zaobserwowano związku między SCORAD a profilem cytokinowym (dla każdej z analiz $p > 0,05$). Natomiast w przypadku alergii kontaktowej u chorych z AZS obserwuje się ujemną korelację pomiędzy sekrecją IFN γ po stymulacji SEB a SCORAD ($r_s = -0,67$ $p < 0,05$). W przypadku pozostałych badanych cytokin oraz SEA nie zaobserwowano istnienia korelacji pomiędzy sekrecją cytokin a wskaźnikiem SCORAD ($p > 0,05$) w tej grupie badanych.

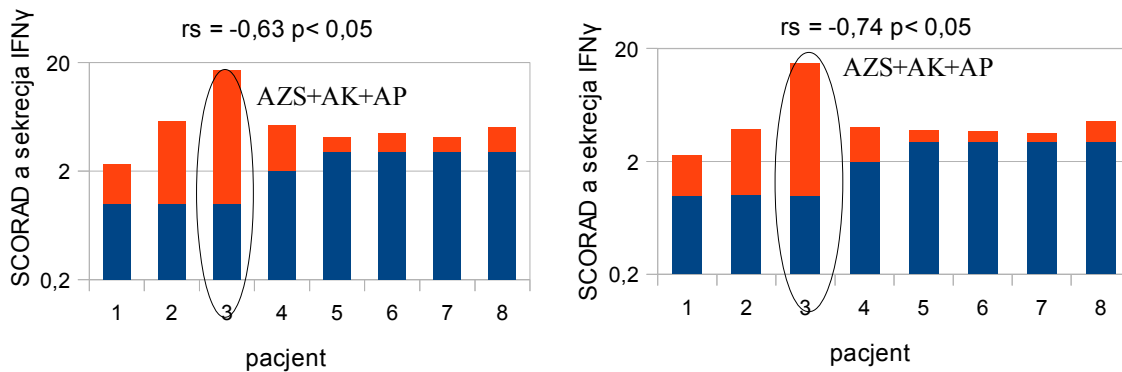
Zależność nie uległa zmianie po dodaniu do grupy chorych z AZS z cechami alergii kontaktowej chorych z AZS z cechami alergii kontaktowej i alergicznym nieżytem nosa oraz alergią pokarmową (SEB: IFN γ -SCORAD $r_s = -0,70$ $p < 0,05$). Po dodaniu do grupy chorych z AZS z cechami alergii kontaktowej chorych z AZS z cechami alergii kontaktowej ze współwystępującymi alergią pokarmową obserwuje się ujemną korelację pomiędzy sekrecją IFN γ a wskaźnikiem SCORAD po stymulacji obiema gronkowcowymi enterotoksynami (SEA: $r_s = -0,63$ $p < 0,05$, SEB: $r_s = -0,74$ $p < 0,05$).



Ryc.25a: Sekrecja IFN γ po stymulacji SEB a SCORAD u chorych z AZS + AK.
Kolor: niebieski – SCORAD, czerwony – sekrecja IFN γ



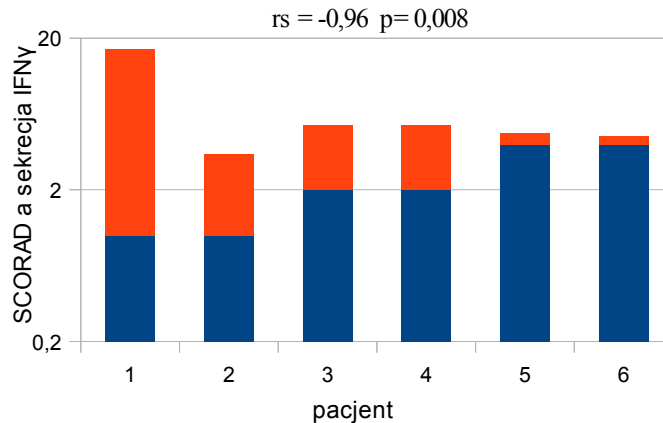
Ryc.25b: Sekrecja IFN γ po stymulacji SEB a SCORAD u chorych z AZS + AK po dodaniu do grupy pacjentów z AZS + AK+ ANN + AP lub AZS +AK+ANN +AA lub AZS + AK + ANN + AP.
Kolor: niebieski – SCORAD, czerwony – sekrecja IFN γ



Ryc.25c: Sekrecja IFN γ po stymulacji SEA (wykres po lewej stronie) i SEB (wykres po prawej stronie) a SCORAD u chorych z AZS + AK po dodaniu do grupy pacjenta z AZS + AK+ AP. Kolor: niebieski – SCORAD, czerwony – sekrecja IFN γ

Wykonane analizy pokazują więc, że w przypadku współwystępowania alergii kontaktowej (oraz dodatkowo alergii kontaktowej z innymi chorobami alergicznymi z AZS) spadek sekrecji IFN γ po stymulacji SEA i SEB, występuje u chorych z dużymi nasileniami zmian skórnych mierzonych wskaźnikiem SCORAD.

W dalszej części analiz pacjentów podzielono na grupę chorych z AZS z dodatnim i ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo *S. aureus*, aby sprawdzić, czy to nosicielstwo wpływa na reaktywność PBMC i ma związek z występowaniem zmian skórnych. W tym celu wykonano test korelacji analizujący profil cytokinowy PBMC po stymulacji SEA i SEB in vitro u nosicieli *S. aureus* w AZS i jego związek z nasileniem zmian skórnych mierzonych wskaźnikiem SCORAD. Analogiczną analizę wykonano dla pacjentów z AZS, u których nie wykazano obecności *S. aureus*. W przypadku pacjentów z AZS będących nosicielami *S. aureus* oraz pacjentów z AZS, u których nie wykazano nosicielstwa *S. aureus* nie stwierdzono związku sekrecji cytokin po stymulacji SEA i SEB in vitro ze wskaźnikiem SCORAD ($p > 0,05$). Natomiast w przypadku pacjentów, u których wykazano nosicielstwo *S. aureus* zaobserwowano ujemną korelację pomiędzy sekrecją IFN γ po stymulacji SEB a wskaźnikiem SCORAD ($r_s = -0,96$ $p = 0,008$). W przypadku IL2 i IL13 oraz SEA nie zaobserwowano istnienia korelacji ze wskaźnikiem SCORAD ($p > 0,05$).

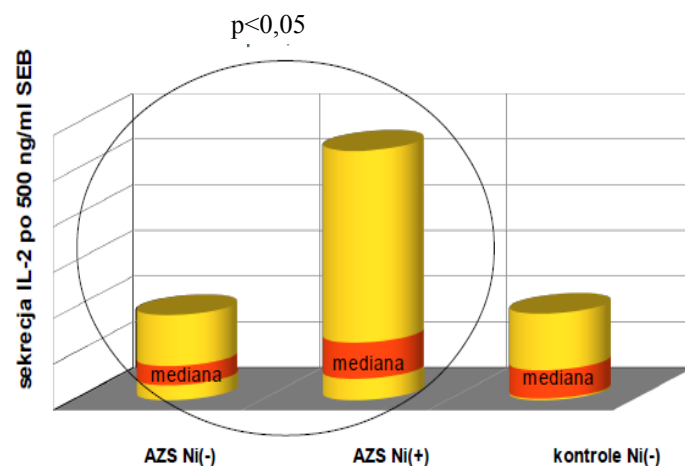


**Ryc.26: Sekrecja IFN γ po stymulacji SEB a SCORAD u nosicieli *S. aureus* z AZS.
Kolor: niebieski – SCORAD, czerwony – sekrecja IFN γ**

Otrzymane wyniki sugerują więc, że niska sekrecja IFN γ po stymulacji SEB wiąże się z nasileniem zmian skórnych, które z kolei mogą mieć związek z nosicielstwem gronkowca złocistego. Wydaje się więc, że infekcja *S. aureus* ma związek ze spadkiem sekrecji IFN γ wydzielanego przez limfocyty Th1.

4.3: Współdziałanie antygenów: gronkowcowe enterotoksyny A i B oraz nikiel

W tej części badań sprawdzano, czy różnorodność profili cytokinowych (głównie IFN γ) powstałych po stymulacji SEA i SEB może być wywołana przez nikiel powszechnie występujący w wodzie, pokarmach i przedmiotach codziennego użytku. Sprawdzone, czy kontaktowa alergia niklowa potwierdzona testami płatkowymi może mieć związek z różnicami w sekrecji IFN γ po stymulacji SEA i SEB u chorych z AZS. W tym celu wykonano analizę porównawczą profilu cytokinowego po stymulacji SEA i SEB u chorych z AZS z dodatnimi i ujemnymi wynikami testu płatkowego na nikiel. Pacjentów w obu grupach dobrano na podstawie podobieństwa obrazów klinicznych oraz nosicielstwa *S. aureus*. Przeprowadzona analiza pokazała, że u chorych z AZS najwyższa sekrecja IL2 po stymulacji SEB była w grupie chorych z AZS z dodatnim wynikiem testu płatkowego na nikiel ($p < 0,05$). Sekrecja IL2 w grupie kontrolnej była na poziomie wartości otrzymanej dla AZS-Ni(-) ($p > 0,05$).



Ryc.27: Sekrecja IL2 po stymulacji SEB u chorych z AZS z ujemnym Ni(-) i dodatnim Ni(+) wynikiem testu płatkowego na nikiel oraz w grupie kontrolnej.

Kolor: czerwony – mediana sekrecji IL2, żółty – maksimum i minimum sekrecji IL2 w grupie

Wydaje się więc, że nikiel może promować odpowiedź typu Th1 związaną z IL2 po stymulacji SEB.

W dalszej kolejności sprawdzono, czy różna (wysoka i niska) sekrecja IFN γ po stymulacji SEA i SEB in vitro może mieć związek z pobudzeniem PBMC wydzielających tę cytokinę przez nikiel obecny w ustroju in vivo. W tym celu poszukiwano korelacji w sekrecji cytokin po stymulacji SEA i SEB, a siarczanem niklu w grupie chorych z AZS z dużą sekrecją IFN γ oraz w grupie chorych z małą sekrecją IFN γ . Kolejne grupy to kontrole o wysokiej sekrecji IFN γ i niskiej sekrecji IFN γ po stymulacji SEA i SEB. Pacjentów do przeciwstawnych grup dobrano na podstawie podobieństwa obrazów klinicznych, aby potencjalne różnice między grupami nie były skutkiem modyfikującego wpływu współwystępowania innych chorób z AZS. Zaobserwowano istnienie korelacji pomiędzy sekrecją cytokin tylko w grupach (AZS i kontrola) o wysokiej sekrecji IFN γ po stymulacji SEA i SEB.

Tabela 21: Korelacje pomiędzy sekrecją cytokin po stymulacji enterotoksynami i siarczanem niklu w grupach z wysoką i niską sekrecją IFN γ po stymulacji SEA i SEB u chorych z AZS i kontroli

Wysoka sekrecja IFN γ po stymulacji SEA/B	Wyniki dla testu korelacji Spearmana
AZS: IFN γ 50 μ M NiSO $_4$ - IL13 SEB	rs = 0,94 p= 0, 008
Kontrola: IL2 25 μ M NiSO $_4$ - IFN γ SEA	rs = - 0,83 p< 0,05
Niska sekrecja IFN γ po stymulacji SEA/B	Wyniki dla testu korelacji Spearmana
AZS: SEA i SEB	p>0,05
Kontrola: SEA i SEB	p>0,05

Wydaje się więc, że wysoka sekrecja IFN γ może wiązać się z modyfikującym wpływem niklu na sekrecję cytokin po SEA i SEB. Mechanizm ten wydaje się być inny u chorych z AZS w porównaniu z grupą kontrolną.

Przypuszcza się, że modyfikujący wpływ niklu na równowagę immunologiczną Th1/Th2 (badaną poprzez analizę profili cytokinowych powstałych po stymulacji SEA i SEB) może wpływać na odpowiedź układu immunologicznego na *S. aureus*, a więc w rezultacie reaktywność na nikiel może mieć związek z kolonizacją pacjenta przez gronkowca złocistego. W celu sprawdzenia tej hipotezy poszukiwano korelacji pomiędzy sekrecją cytokin po stymulacji SEA i SEB oraz siarczanem niklu u nosicieli *S. aureus*, pacjentów z AZS z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo tej bakterii oraz kontroli. Zaobserwowano, że w grupie nosicieli *S. aureus* ze wzrostem sekrecji IL2 po stymulacji siarczanem niklu wzrasta sekrecja IL2 po stymulacji SEA i SEB. U pacjentów, u których nie wykazano nosicielstwa *S. aureus* nie zaobserwowano zależności ($p > 0,05$). W przypadku osób kontrolnych wzrost sekrecji IL2 po stymulacji siarczanem niklu wiązał się ze spadkiem sekrecji IFN γ po stymulacji SEA.

Tabela 22: Korelacje pomiędzy sekrecją cytokin po stymulacji enterotoksynami i siarczanem niklu w grupie nosicieli *S. aureus* z AZS, chorych z AZS z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo oraz w grupie kontrolnej

AZS: Nosiciele Staphylococcus aureus	Wyniki testu korelacji Spearmana
Obrazy kliniczne: AZS + AK + AP, AZS, AZS + AK + ANN+AA _{dz} + AP, AZS + AK + ANN, AZS + AA, AZS + AP	
IL2 25 μ M NiSO ₄ ---IL2 SEA	rs = 0,94 p = 0,008
IL2 50 μ M NiSO ₄ ---IL2 SEB	rs = 0,83 p < 0,05
AZS:brak nosicielstwa <i>Staphylococcus aureus</i>	Wyniki testu korelacji Spearmana
Obrazy kliniczne: AZS +AK, AZS + AA _{dz} , AZS + AK+ ANN + AP, AZS + ANO, AZS + AK, AZS + AK +AA	
SEA i SEB	p>0,05
Kontrole:	Wyniki testu korelacji Spearmana
IL2 25 μ M NiSO ₄ ---IFN γ SEA	rs = - 0, 83 p <0,05

Otrzymane wyniki sugerują, że u nosicieli *S. aureus* potencjalna modyfikacja odpowiedzi PBMC na SEA i SEB przez nikiel jest inna niż w grupie kontrolnej (dodatknie korelacje pomiędzy sekrecją cytokiny Th1(IL2) w AZS oraz ujemna korelacja pomiędzy sekrecją cytokin Th1 (IFN γ -IL2) w grupie kontrolnej), a nie istnieje u chorych z AZS z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo *S. aureus*. Dodatkowo zaobserwowano, że w grupie nosicieli *S. aureus* częściej występowała alergia pokarmowa (3 pacjentów) w porównaniu z pacjentami z AZS mającymi ujemny wynik testu na nosicielstwo *S. aureus* (1 pacjent). Modyfikacja środowiska cytokinowego przez PBMC reagujące

na nikiel może więc zmieniać mechanizm odpowiedzi układu immunologicznego na *S. aureus*, a w rezultacie sprzyjać kolonizacji chorych z AZS przez tę bakterię. Ten wniosek znajduje potwierdzenie w wynikach obserwacji klinicznych – nosicielstwo *S. aureus* wykazano tylko u chorych z AZS z kontaktową alergią niklową lub u chorych z alergią pokarmową uczulonych na pokarmy, u których może występować reakcja krzyżowa na nikiel w alergii pokarmowej. Ta sugestia wymaga jednak potwierdzenia testami niklowej prowokacji doustnej.

Tabela 23: Charakterystyka pacjentów z AZS będących nosicielami *S. aureus*

Pacjent	Wynik testu płatkowego na NiSO₄	Obraz kliniczny
Pacjent 1	(++)	AZS+ AK, ANN
Pacjent 2	(-)	AZS, ANN, AA, AP
Pacjent 3	(-)	AZS, AP
Pacjent 4	(-)	AZS+AK, ANN, AA _{rem} , AP
Pacjent 4	(+++)	AZS
Pacjent 5	(++)	AZS + AK, AP
Pacjent 6	(+++)	AZS+AK, ANN

4.4: Czy wynik testu na nosicielstwo *S. aureus* odzwierciedla potencjał PBMC do reagowania na gronkowcowe enterotoksyny A i B in vitro – analiza porównawcza testów: obecność asIgE specyficznych względem SEA i SEB oraz hodowla bakterii z nosa i zmian skórnych na pożywce oraz immunobarwienie in vitro (Elispot)

Podstawową cechą każdego testu diagnostycznego jest jego wiarygodność, co jednak wiąże się z ryzykiem otrzymania wyniku fałszywie dodatniego i fałszywie ujemnego. Ponadto czasami uzyskanie materiału do analizy mikrobiologicznej z wewnętrznych jam ciała jest trudne. Dlatego też porównano wyniki trzech testów, aby sprawdzić czy wzajemnie się potwierdzają i informują o obecności *S. aureus* w organizmie. Analizę porównawczą wykonano u pacjentów z AZS z dodatnim wynikiem testu na nosicielstwo *S. aureus*, ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo *S. aureus* oraz w grupie kontrolnej z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo. Wyniki analiz opisane w tym rozdziale nie wykazały związku sekrecji cytokin (IFN γ , IL2, IL13) z nosicielstwem *S. aureus* w nosie i na zmianach skórnych. Zaobserwowano także, że jest grupa pacjentów, u których wykazano nosicielstwo *S. aureus*, ale nie wykryto przeciwciał dla SEA i SEB.

Tabela 24: Pacjenci z AZS- nosiciele *S. aureus*, u których nie wykryto przeciwciał dla SEA i SEB

Pacjent 1: AZS + ANN	sIgE dla SEA i SEB 0kl	nosicielstwo: nos i skóra
Pacjent 2: AZS + AK + AP	sIgE dla SEA i SEB 0kl	nosicielstwo: nos i skóra
Pacjent 3: AZS+AK+ANN+AA _{dz} +AP	sIgE dla SEA i SEB 0kl	nosicielstwo: nos i skóra
Pacjent 4: AZS+ ANN	sIgE dla SEA i SEB 0kl	nosicielstwo: skóra

Wyniki przeprowadzonych analiz pokazują, że testy in vitro badające reaktywność PBMC poprzez analizę powstałych po stymulacji profili cytokinowych nie informują o obecności *S. aureus*. Ponadto, nie zawsze ujemny wynik na obecność przeciwciał rozpoznających gronkowcowe enterotoksyny jest równoznaczny z brakiem *S. aureus* w organizmie. Z drugiej jednak strony pozytywny wynik wymazu może być skutkiem przejściowej obecności *S. aureus* w nosie/na skórze, dlatego każdy wymaz wymaga potwierdzenia wyniku w odstępie czasowym. Otrzymane wyniki badań sugerują więc, że najpewniejszym testem wykrywającym obecność *S. aureus* jest wymaz, który może być potwierdzony, ale nigdy wykluczony testem na obecność przeciwciał specyficznych względem enterotoksyn w surowicy.

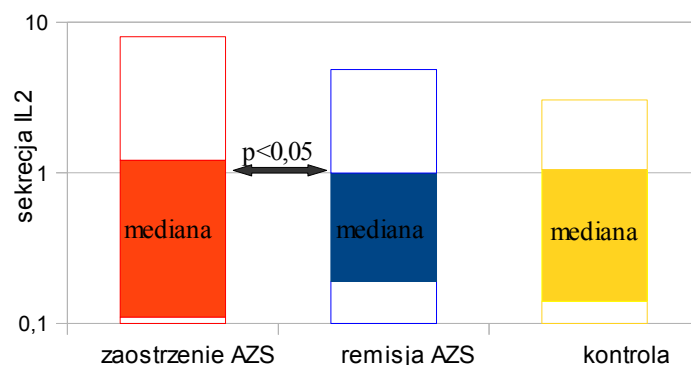
5. Zmiany w profilach cytokinowych w remisji względem zaostrzenia atopowego zapalenia skóry

U pacjentów z atopowym zapaleniem skóry badano, czy podczas remisji objawów chorobowych AZS następuje zmiana w profilach cytokinowych powstałych po stymulacji siarczanem niklu, alergenem D1 *Dermatophagoides pteronyssinus* oraz gronkowcowymi enterotoksynami A i B względem fazy zaostrzenia choroby oraz względem grupy kontrolnej. Poznanie molekularnych mechanizmów związanych z przejściem z fazy zaostrzenia w fazę remisji jest istotne dla opracowywania terapii promujących utrzymanie fazy remisji u chorych z AZS.

Faza remisji wydaje się mieć związek ze zmianami w środowisku cytokinowym *in vivo*, co powinno być dostrzegalne jako różnice w niestymulowanej *in vitro* (spontanicznej) sekrecji cytokin pomiędzy fazą zaostrzenia, remisji oraz grupą kontrolną. Nie zaobserwowano różnic w spontanicznej sekrecji cytokin (IFN γ , IL2, IL13) w fazie remisji względem zaostrzenia AZS i grupą kontrolną ($p > 0,05$). Natomiast jak pokazuje tabela 11 na stronie 38 występuje duża rozbieżność między maksymalną i minimalną spontaniczną sekrecją każdej z badanych cytokin w fazie remisji. Wydaje się więc, że istnieją czynniki modyfikujące molekularne mechanizmy związane z osiągnięciem stanu remisji.

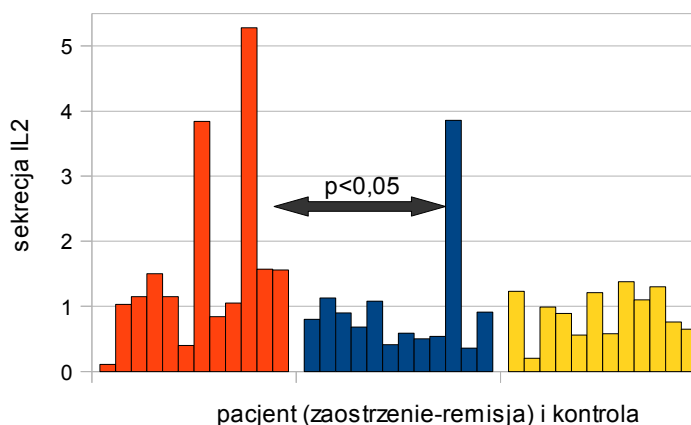
5.1: Zmiany profilu cytokinowego w fazie remisji względem fazy zaostrzenia AZS po stymulacji siarczanem niklu *in vitro*.

Wykonano analizy porównawcze sekrecji cytokin po stymulacji siarczanem niklu (25 μM i 50 μM NiSO $_4$) w fazie zaostrzenia i remisji oraz w grupie kontrolnej. Otrzymane wyniki pokazują, że w fazie remisji w badanej grupie chorych z AZS ($n=22$) była tendencja do spadku sekrecji IL2 po stymulacji 25 μM NiSO $_4$ w porównaniu z fazą zaostrzenia AZS ($p < 0,05$). Nie zaobserwowano różnic w profilach cytokinowych powstałych po stymulacji siarczanem niklu pomiędzy fazą remisji a kontrolą ($p > 0,05$). W przypadku wyższego stężenia NiSO $_4$ nie zaobserwowano różnic pomiędzy fazą remisji i zaostrzenia oraz grupą kontrolną ($p > 0,05$).



Ryc.28: Sekrecja IL2 po stymulacji 25 μM NiSO_4 w fazie zaostwienia (czerwony) i remisji (niebieski) AZS oraz w grupie kontrolnej (żółty). Liczba badanych w każdej grupie: n=22.

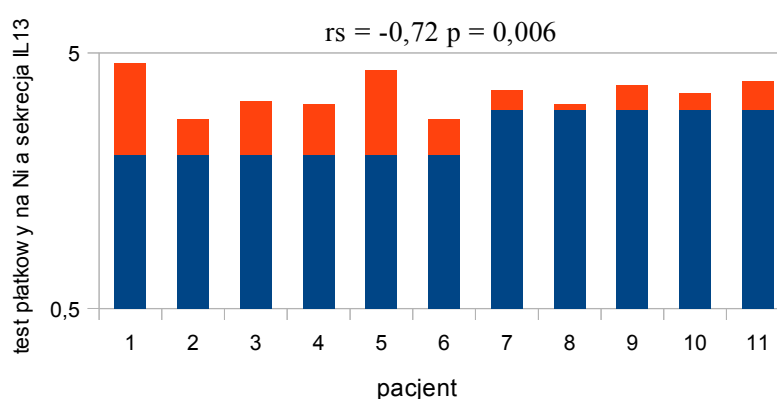
Wydaje się więc, że w przypadku nadwrażliwości na nikiel w AZS przejście z fazy zaostwienia w fazę remisji wiąże się ze spadkiem sekrecji cytokiny typu Th1 (IL2). W dalszej kolejności poszukiwano związku pomiędzy nasileniem zmian skórnych (wskaźnik SCORAD) a profilem cytokinowym w fazie remisji. Wyniki analiz porównawczych SCORAD a profil cytokinowy po stymulacji siarczanem niklu (25 μM i 50 μM) pokazują, że w grupie z niską wartością wskaźnika SCORAD jest tendencja do spadku sekrecji IL2 po stymulacji 25 μM NiSO_4 w fazie remisji AZS w porównaniu z fazą zaostwienia ($p < 0,05$), ale nie z kontrolą ($p > 0,05$). Nie zaobserwowano związku pomiędzy wartościami wskaźnika SCORAD a profilem cytokinowym po stymulacji siarczanem niklu (25 μM i 50 μM) NiSO_4 in vitro w grupie o wysokim wskaźniku SCORAD ($p > 0,05$).



Ryc.29: Sekrecja IL2 u chorych z AZS w fazie zaostwienia (czerwony) i remisji (niebieski) o niskim SCORAD po stymulacji 25 μM NiSO_4 oraz w grupie kontrolnej (żółty)

Otrzymane wyniki sugerują więc, że różnorodność w profilach cytokinowych powstałych po stymulacji siarczanem niklu u chorych z AZS w fazie remisji może mieć związek z odmiennym nasileniem procesów, zachodzących podczas zmiany fazy zaostwienie-remisja, u chorych z dużymi zmianami skórными i małymi zmianami skórными (SCORAD).

W dalszej kolejności sprawdzono, czy obecność kontaktowej alergii niklowej może być czynnikiem różnicującym chorych z AZS pod względem molekularnych mechanizmów związanych z przechodzeniem z fazy zaostrzenia w fazę remisji AZS. W tym celu pacjentów z AZS podzielono na grupę o dodatnim i ujemnym wyniku testu płatkowego na nikiel. W grupie z dodatnim wynikiem testu płatkowego na nikiel zaobserwowano istnienie ujemnej korelacji pomiędzy nasileniem wyniku testu płatkowego na nikiel a sekrecją IL13 po stymulacji 25 μ M NiSO₄ ($r_s = -0,72$ $p = 0,006$). Natomiast u pacjentów z AZS w przypadku braku reaktywności skóry na siarczan niklu w teście płatkowym nie zaobserwowano istnienia korelacji pomiędzy wynikiem testu płatkowego na nikiel a profilem cytokinowym powstałym po stymulacji siarczanem niklu ($p > 0,05$).

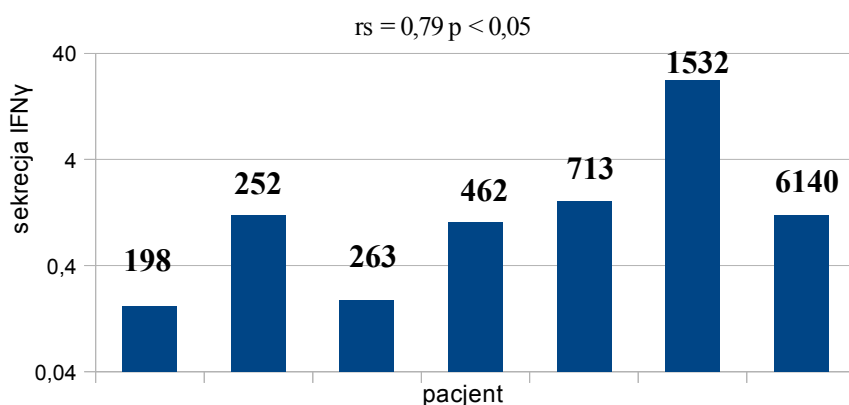


Ryc.30: Zależność pomiędzy sekrecją IL13 po stymulacji 25 μ M NiSO₄, a nasileniem testu płatkowego u chorych z AZS z kontaktową alergią niklową.

Kolor: niebieski – wynik testu płatkowego na nikiel, czerwony – sekrecja IL13

Obserwowana zależność sugeruje, że w fazie remisji hamowane są mechanizmy typu Th2 u chorych z kontaktową alergią niklową.

Następnie poszukiwano związku pomiędzy stężeniem tIgE a sekrecją cytokin po stymulacji siarczanem niklu w fazie remisji AZS. Przeprowadzono analizę korelacji pomiędzy stężeniem tIgE a profilem cytokinowym powstałym po stymulacji siarczanem niklu in vitro w fazie remisji AZS. Pacjentów podzielono na grupę o wysokim stężeniu tIgE i niskim stężeniu tIgE. W grupie z wysokim stężeniem tIgE zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem tIgE a sekrecją IFN γ po stymulacji 25 μ M NiSO₄ ($r_s = 0,79$ $p < 0,05$). Nie zaobserwowano żadnej korelacji w grupie z niskim stężeniem tIgE ($p > 0,05$).



Ryc.31: Zależność sekrecji IFN γ po stymulacji 25 μ M NiSO $_4$, a stężenie tIgE (198-6140 kUA/l) u chorych z AZS z wysokim stężeniem surowiczej IgE

Ta obserwacja sugeruje, że osiągnięcie fazy remisji wiąże się z promocją sekrecji cytokiny typu Th1 (IFN γ) w AZS w odpowiedzi na siarczan niklu, u chorych z wysokim stężeniem tIgE.

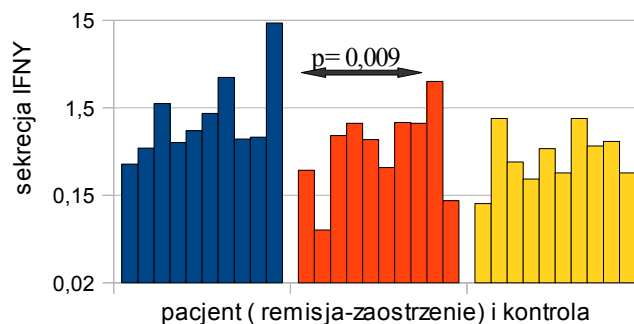
5.2: Zmiany w profilu cytokinowym po stymulacji a.D1 *Dermatophagoides pteronyssinus* w fazie remisji względem fazy zaostrzenia w AZS

Wykonano analizy porównawcze sekrecji cytokin (IFN γ , IL2, IL13) w fazie remisji po stymulacji a.D1 i w fazie zaostrzenia AZS oraz w grupie kontrolnej. Nie zaobserwowano różnic w profilach cytokinowych pomiędzy fazą remisji a zaostrzeniem i grupą kontrolną u chorych z AZS (n=22) w odpowiedzi na 0.4 μ g/ml i 1.0 μ g/ml a.D1 in vitro (p>0,05). W fazie remisji były widoczne profile typu Th1 (przewaga sekrecji cytokin Th1), profile typu Th2 (przewaga cytokin typu Th2) i mieszane (Th1-Th2). Próbowano także wyjaśnić, czy wysoka sekrecja cytokin (**pogrubiona czcionka**) ma związek ze współwystępowaniem innych chorób alergicznych wraz z AZS. Zaobserwowano, że w 2 przypadkach chorych, u których współwystępowała tylko astma alergiczna (pacjenci: 1 i 3) wraz z AZS była wysoka sekrecja IL2 po stymulacji a.D1. W dwóch przypadkach chorych z AZS z cechami alergii kontaktowej wystąpił wzrost sekrecji IL13. Wydaje się więc, że współwystępowanie innych chorób alergicznych może wpływać na molekularne mechanizmy związane z osiągnięciem stanu remisji w AZS, ale taka sugestia wymaga potwierdzenia na reprezentatywnej grupie chorych z tym samym obrazem klinicznym.

Tabela 25: Profil cytokinowy powstały po stymulacji a.D1 (0.4 µg/ml i 1.0 µg/ml) w remisji AZS

Pacjent	Obraz kliniczny	a.D1 (µg/ml)	IFN γ	IL2	IL13	a.D1 (µg/ml)	IFN γ	IL2	IL13
Pacjent1	AK	0.4	0,53	2,1	1,71	1	0,27	2,6	1,14
Pacjent2	AZS+AA	0.4	0,34	1,27	1,81	1	0,31	2,18	1,87
Pacjent3	AZS+AP	0.4	0,52	0,61	0,23	1	0,48	2,65	0,27
Pacjent4	AZS+AK	0.4	1,68	0,3	1,5	1	1,94	0,22	1,83
Pacjent5	AZS+AK+ANN+AP	0.4	1,25	0,99	3,4	1	0,63	1,16	2,6
Pacjent6	AZS+AA	0.4	0,51	0,57	1,24	1	0,49	0,37	1,47
Pacjent7	AZS+Has	0.4	1,96	0,63	0,59	1	1,44	0,75	0,82
Pacjent8	AZS+AK	0.4	0,6	1	1	1	0,2	0,33	0,25
Pacjent9	AZS+AK+ANN+AA	0.4	1,41	1,18	2,14	1	1,48	1,13	1,71
Pacjent10	AZS+ANN+AA+AP	0.4	0,82	0,75	1,33	1	0,39	1,87	1,83
Pacjent11	AZS+ANO	0.4	1	0,83	1	1	0,5	0,94	1,5
Pacjent12	AZS+AA+AP	0.4	1	0,94	1,17	1	1,5	0,34	2,04
Pacjent13	AZS+AK	0.4	1,29	2	0,14	1	1,88	0,67	0,29
Pacjent14	AZS+AK	0.4	3,33	4	2,75	1	0,67	7,5	3,37
Pacjent15	AZS+Has	0.4	0,89	0,9	0,61	1	0,72	1,7	0,92
Pacjent16	AZS+AK+ANN+AA	0.4	2,26	0,68	0,64	1	0,89	0,36	1,71
Pacjent17	AZS+AK+ANN+AP	0.4	0,73	2,14	2	1	0,35	2,57	3,33
Pacjent18	AZS+AA	0.4	0,66	0,5	2,5	1	0,57	0,36	1,58
Pacjent19	AZS+AA	0.4	0,69	1,12	2,09	1	0,8	0,99	3,27
Pacjent20	AZS+Has	0.4	1,99	1,27	1,83	1	1,05	1,18	2,17
Pacjent21	AZS+AK	0.4	14	0,17	1	1	8,37	0,12	1,71
Pacjent22	AZS+Has	0.4	0,54	0,5	1,5	1	0,9	0,66	1,9

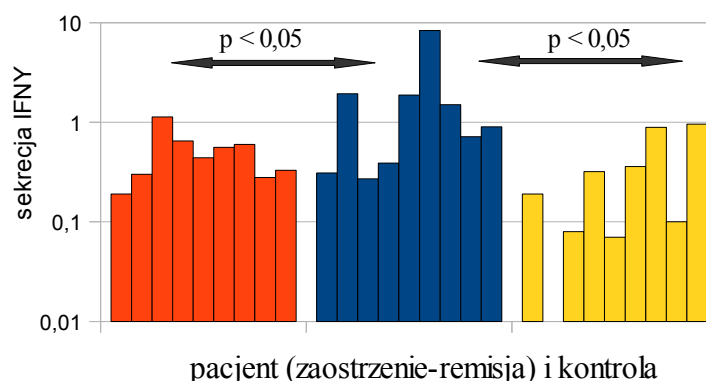
W dalszej kolejności poszukiwano związku pomiędzy nasileniem zmian skórnych (SCORAD) a profilem cytokinowym powstałym po stymulacji a.D1 w fazie remisji. Wykazano, że w grupie chorych z AZS w o wysokich wartościach SCORAD sekrecja IFN γ po stymulacji 0.4 µg/ml a.D1 w fazie remisji jest wyższa niż w zaostrzeniu ($p=0,009$), ale nie wyższa niż w grupie kontrolnej. Tego typu zależności nie zaobserwowano po stymulacji PBMC 1.0 µg/ml a.D1 ($p>0,05$).



Ryc.32: Sekrecja IFN γ po stymulacji 0.4 μ g/ml a.D1 u chorych z AZS o wysokim SCORAD (3-4) w remisji (niebieski), w zaostreniu (czerwony) oraz kontroli (żółty)

Wzrost sekrecji IFN γ w fazie remisji po stymulacji a. D1 względem grupy kontrolnej sugeruje, że u chorych z nasilonym AZS w fazie remisji istotną rolę odgrywa cytokina Th1 (IFN γ).

Obserwacje kliniczne pokazują, że nie zawsze klasa asIgE D1 odpowiada stopniowi nasilenia objawów alergii roztoczowej w AZS. Poszukiwano związku pomiędzy mechanizmami IgE zależnymi (obecność asIgE D1) u chorych z AZS z alergią roztoczową a sekrecją cytokin po stymulacji a.D1. Pacjentów z AZS podzielono na grupę, u której wykryto przeciwciała asIgE D1 z dodatnim wynikiem testu punktowego na a.D1 oraz taką, u której nie wykazano obecności tych przeciwciał oraz wynik testu punktowego na a.D1 był ujemny. Wykonano analizę porównawczą profili cytokinowych powstałych po stymulacji a.D1 w fazie zaostrenia i remisji w obu grupach z AZS oraz w grupie kontrolnej. Zaobserwowano wzrost sekrecji IFN γ po stymulacji 1.0 μ g/ml a.D1 w fazie remisji względem zaostrenia u chorych z AZS posiadających przeciwciała asIgE D1 (3-6 klasa asIgE D1 ($p < 0,05$) oraz względem kontroli ($p < 0,05$). W przypadku grupy chorych z AZS z asIgE D1: 0-1 kl nie zaobserwowano różnic w profilu cytokinowym powstałym po stymulacji a.D1 pomiędzy tą grupą chorych z AZS a grupą kontrolną ($p > 0,05$).

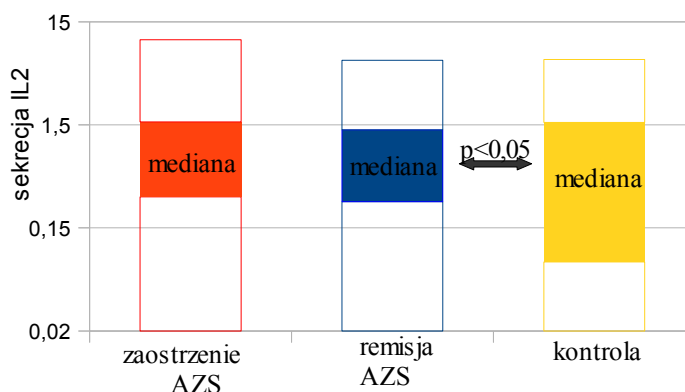


Ryc.33: Sekrecja IFN γ po stymulacji 1.0 μ g/ml a.D1 w fazie zaostrenia (czerwony) i remisji (niebieski) u chorych z AZS z asIgE D1 (3-6 klasa) i kontroli (żółty)

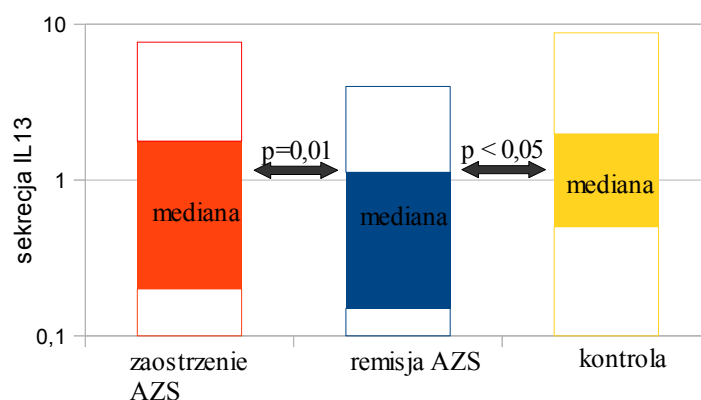
Przeprowadzone obserwacje wydają się oznaczać, że molekularne mechanizmy związane z cytokinami Th1 (IFN γ) u chorych z IgE-zależną alergią roztoczą w AZS odgrywają istotną rolę w osiągnięciu stanu remisji AZS.

5.3: Zmiany w profilu cytokinowym po stymulacji gronkowcowymi enterotoksynami A i B w fazie remisji względem zaostrzenia w AZS

Założono, że w fazie remisji profil sekrecji cytokin po stymulacji SEA i SEB ulega zmianie w porównaniu z profilem cytokinowym w fazie zaostrzenia AZS. W tym celu wykonano analizę porównawczą profili cytokinowych w obu fazach AZS (n=22) i w kontroli. Zaobserwowano, że po stymulacji SEB spada sekrecja IL13 w fazie remisji w porównaniu z fazą zaostrzenia (p=0,01). Sekrecja IL13 po stymulacji SEB jest jednak wyższa niż w grupie kontrolnej (p<0,05). Zaobserwowano także spadek sekrecji IL2 po stymulacji SEB w fazie remisji w porównaniu z grupą kontrolną (p<0,05).



Ryc. 34a: Sekrecja IL2 po stymulacji SEB w fazie zaostrzenia (czerwony), remisji (niebieski) AZS oraz w grupie kontrolnej (żółty). Liczba badanych w każdej grupie: n=22.



Ryc. 34b: Sekrecja IL13 po stymulacji SEB w fazie zaostrzenia (czerwony) remisji (niebieski) AZS oraz w grupie kontrolnej (żółty). Liczba badanych w każdej grupie: n=22.

Wydaje się, że w atopowym zapaleniu skóry spada sekrecja IL2 oraz IL13 w odpowiedzi na SEB podczas przejścia z fazy zaostrzenia w remisję, ale poziom sekrecji cytokiny typu Th2 (IL13) wydaje się jednak być wyższy w remisji niż w grupie kontrolnej. Oznaczałoby to, że poziom sekrecji IL13 jest wyższy u chorych z AZS niezależnie od fazy w porównaniu z osobami zdrowymi. Te obserwacje sugerują, że spadek sekrecji tych dwóch cytokin wydaje się istotny dla osiągnięcia stanu remisji w AZS, a IL13 odgrywa istotną rolę w patogenezie AZS.

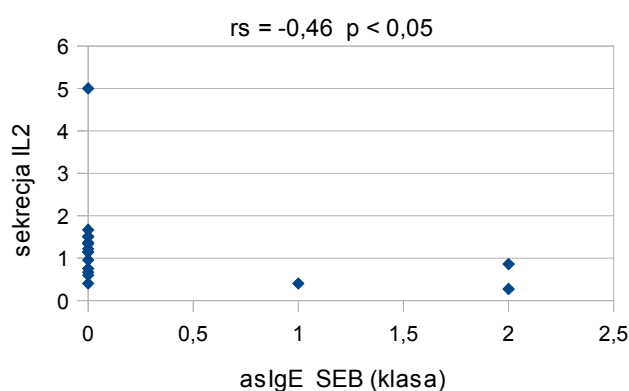
W dalszej kolejności poszukiwano związku pomiędzy nasileniem zmian skórnych (SCORAD) a profilem cytokinowym powstałym po stymulacji SEA i SEB w fazie remisji. Nie zaobserwowano istnienia korelacji pomiędzy wartością wskaźnika SCORAD a profilem cytokinowym powstałym po stymulacji SEA i SEB oraz w porównaniu z grupą kontrolną ($p > 0,05$).

Zaobserwowano że w fazie remisji w krwiobiegu obecne były zarówno limfocyty Th1 i Th2, które ulegały pobudzeniu przez superantygeny (SEA i SEB) in vitro. Sprawdzone, czy wysoka sekrecja cytokin pod wpływem superantygenów (**pogrubiona czcionka**) mogłaby mieć związek ze współwystępowaniem innych chorób alergicznych wraz z AZS. Wykazano, że w przypadku 4 pacjentów z AZS z cechami alergii kontaktowej (AZS + AK: pacjent: 8 i 21, AZS + AK + ANN + AP: 5 i 17) wystąpił wzrost sekrecji $IFN\gamma$.

Tabela 26: Profil cytokinowy powstały po stymulacji SEA i SEB (500 ng/ml) w fazie remisji AZS

Pacjent	SCORAD	Obraz kliniczny	$IFN\gamma$	IL2	IL13	$IFN\gamma$	IL2	IL13
Pacjent1	4	AK	0,34	1,09	1,5	0,22	1	0,94
Pacjent2	4	AZS+AA	0,41	1,26	0,23	0,44	1,22	0,23
Pacjent3	4	AZS+AP	1,24	0,32	1	1,17	0,27	0,83
Pacjent4	3	AZS+AK	1,6	0,67	1	0,4	0,67	0,5
Pacjent5	3	AZS+AK+ANN+AP	0,93	0,75	1	4,16	0,75	0,5
Pacjent6	3	AZS+AA	0,75	1,17	1,14	0,57	1,67	1,71
Pacjent7	4	AZS+Has	35,67	3,25	1,37	26	5	1,37
Pacjent8	3	AZS+AK	4,87	2,07	1,83	8,38	1,14	1,67
Pacjent9	3	AZS+AK+ANN+AA	1,32	1,26	1,09	1,53	1,29	1,45
Pacjent10	4	AZS+ANN+AA+AP	4,25	0,93	1,71	7,37	1,34	2
Pacjent11	2	AZS+ANO	1,71	0,7	1,86	1,9	0,4	2,86
Pacjent12	2	AZS+AA+AP	0,31	0,92	2	0,06	0,96	0,6
Pacjent13	1	AZS+AK	1,76	0,55	0,74	1,42	0,57	0,67
Pacjent14	1	AZS+AK	4,8	0,59	0,94	2,84	0,66	1,06
Pacjent15	1	AZS+Has	1,86	1,01	2,05	2,62	1,28	2,09
Pacjent16	2	AZS+AK+ANN+AA	1,5	0,61	2	1	1,5	1,75
Pacjent17	2	AZS+AK+ANN+AP	2,83	0,8	1	3,83	0,59	0,83
Pacjent18	1	AZS+AA	0,94	0,7	0,46	0,5	0,4	0,15
Pacjent19	1	AZS+AA	5,26	1,32	1,43	13,16	0,86	0,79
Pacjent20	1	AZS+Has	0,04	1,14	1,83	0,08	1,14	1,33
Pacjent21	2	AZS+AK	0,73	0,91	1,17	2,58	1,36	1
Pacjent22	1	AZS+Has	2,88	1,64	0,33	2,58	1,51	0,42

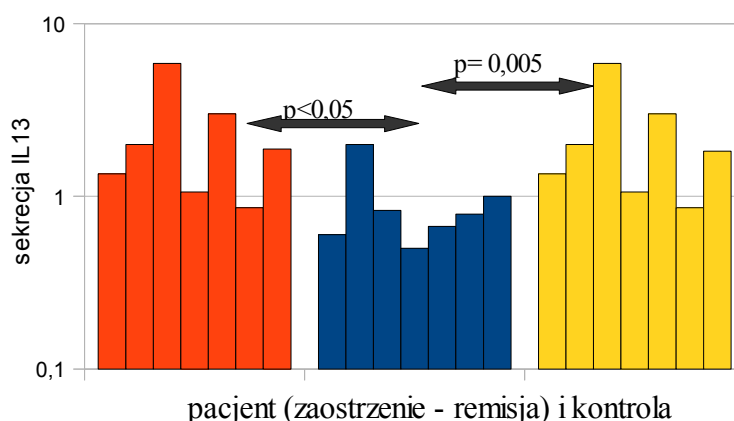
Wydaje się więc, że współwystępowanie innych chorób alergicznych może wpływać na molekularne mechanizmy związane z osiągnięciem stanu remisji w AZS, ale taka sugestia wymaga potwierdzenia na reprezentatywnej grupie chorych z tym samym obrazem klinicznym. Następnie sprawdzano, czy obecność asIgE SEA i asIgE SEB wpływa na molekularne mechanizmy aktywowane podczas przechodzenia z fazy zaostrzenia w fazę remisji AZS. W tym celu poszukiwano związku pomiędzy stężeniem asIgE SEA i SEB a profilem cytokinowym powstałym po stymulacji SEA i SEB *in vitro* w fazie remisji. Zaobserwowano, że obecność przeciwciał asIgE SEB (m81) wiąże się ze spadkiem sekrecji IL2 po stymulacji SEB ($r_s = -0,46$ $p < 0,05$) w fazie remisji. W pozostałych przypadkach (SEA i przeciwciała asIgE SEA) nie zaobserwowano istnienia korelacji ($p > 0,05$).



Ryc.35: Zależność pomiędzy obecnością przeciwciał asIgE SEB (m81) a sekrecją IL2 po stymulacji SEB w fazie remisji AZS

Spadek sekrecji cytokiny Th1 (IL2) u chorych z asIgE SEB w fazie remisji sugeruje, że zmniejszenie sekrecji tej cytokiny wydaje się istotne w celu osiągnięcia stanu remisji u pacjentów z AZS z IgE-zależnym mechanizmem odpowiedzi na gronkowcową enterotoksynę B.

W dalszej kolejności pacjentów z AZS podzielono na grupy, u których wykryto nosicielstwo *S. aureus* w nosie/skóra oraz, u których nie wykazano obecności *S. aureus* oraz grupę kontrolną również z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo na bakterii. Zaobserwowano, że u chorych z AZS będących nosicielami *S. aureus* w fazie remisji spada sekrecja IL13 w porównaniu z fazą zaostrzenia po stymulacji SEB *in vitro* ($p < 0,05$) oraz kontrolą ($p = 0,005$). Natomiast nie zaobserwowano takiej zależności u chorych z AZS nie będących nosicielami *S. aureus* ($p > 0,05$).



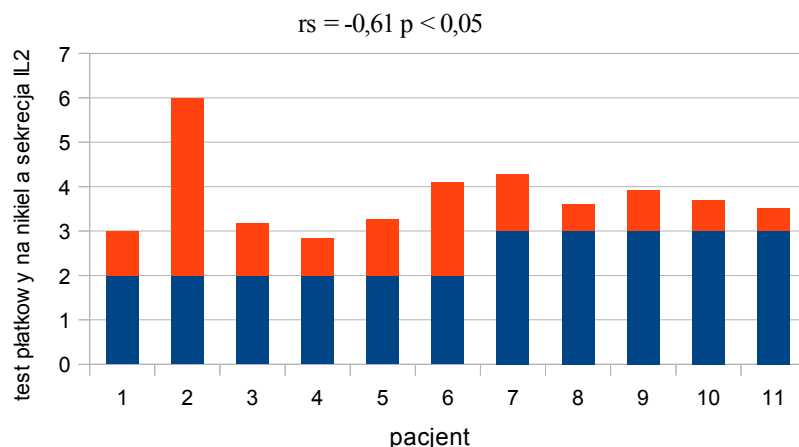
Ryc.36: Sekrecja IL13 po stymulacji SEB w fazie zaostwienie (czerwony), remisji (niebieski), kontroli (żółty) u nosicieli *S. aureus* z AZS

Wydaje się więc, że obserwowany spadek sekrecji IL13 u chorych z AZS w remisji względem zaostwienia po stymulacji SEB ma związek z obecnością gronkowca złocistego.

5.4: Współoddziaływanie alergenów i ich wpływ na profil cytokinowy w AZS

Wyniki analiz profili cytokinowych powstałych po stymulacji alergenami: D1 *Dermatophagoides pternyssinus*, siarczanem niklu oraz gronkowcowymi enterotoksynami A i B w fazie remisji były niejednorodne (typ sekrecji cytokin: Th1, Th2 i Th1-Th2 dla każdego alergenu). Wydaje się więc, że istnieją czynniki zaburzające klasyczne mechanizmy alergiczne. Przypuszcza się, że jednym z nich może być współoddziaływanie alergenów.

Wykonano analizy korelacji poszukując związków pomiędzy nasileniem testu płatkowego na nikiel a profilami cytokinowymi powstałymi po stymulacji a.D1 (0.4 µg/ml i 1.0 µg/ml) i SEA oraz SEB (500 ng/ml). Analizę wykonano w grupie chorych z dodatnim wynikiem testu płatkowego na nikiel oraz ujemnym wynikiem testu płatkowego na nikiel. Analiza korelacji pomiędzy wynikiem testu płatkowego na nikiel oraz sekrecją cytokin po stymulacji a.D1 wykazała, że w grupie chorych z AZS z silną reaktywnością skóry na nikiel w teście płatkowym występuje ujemna korelacja pomiędzy nasileniem testu płatkowego na nikiel a sekrecją IL2 po stymulacji 0.4 µg/ml a.D1 ($r_s = -0,61$ $p < 0,05$).



**Ryc.37: Zależność pomiędzy wynikiem testu płatkowego na nikiel (wartości testu 2 i 3), a sekrecja IL2 po stymulacji 0.4 µg/ml antygeny D1 *Dermatophagoides pteronyssinus* w fazie remisji AZS.
Kolor: niebieski – wynik testu płatkowego na nikiel, czerwony – sekrecja IL2**

Podjeżdza się więc, że występowanie kontaktowej alergii niklowej w AZS działa antagonistycznie względem sekrecji cytokiny Th1 (IL2) w odpowiedzi na a.D1 w remisji AZS.

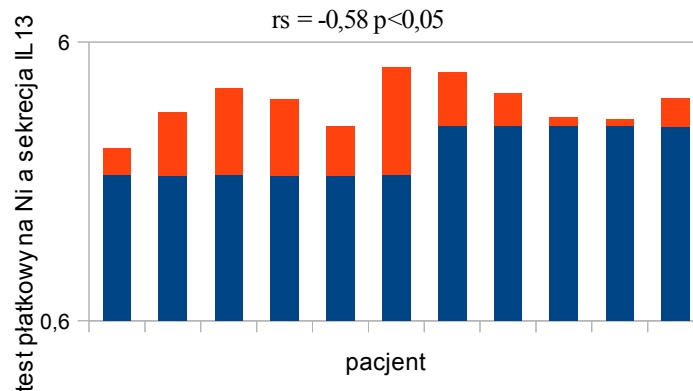
Następnie poszukiwano korelacji pomiędzy sekrecją cytokin po stymulacji a.D1 i siarczanem niklu w fazie remisji AZS, aby wyjaśnić mechanizmy potencjalnego wpływu niklu na profil cytokinowy powstały po stymulacji a.D1 w fazie remisji AZS. Widoczny jest związek pomiędzy reaktywnością PBMC na a.D1 i siarczanem niklu w fazie remisji. W grupie z kontaktową alergią niklową obserwuje się stymulujące (dodatnie) zależności w sekrecji cytokin Th1 oraz Th2 i Th1. Natomiast w grupie chorych z AZS bez alergii niklowej obserwuje się zależności pomiędzy cytokinami typu Th1 stymulujące (dodatnie) oraz hamujące (ujemne) ich sekrecję. Natomiast w grupie kontrolnej korelacje są dodatnie i występują tylko pomiędzy cytokinami typu Th1 lub tylko Th2, a nie ma korelacji mieszanych Th1-Th2 lub ujemnych.

Tabela 27: Zależności pomiędzy sekrecją cytokin po stymulacji a.D1 i siarczanem niklu in vitro u chorych z AZS w remisji z dodatnim i ujemnym wynikiem testu płatkowego na nikiel i w grupie kontrolnej

Typ korelacji	Wyniki testu nieparametrycznej korelacji Spearmana
Chorzy z AZS z dodatnim wynikiem testu płatkowego na nikiel	
IFN γ 25 μ M NiSO $_4$ - IFN γ 0.4 μ g/ml a.D1	rs= 0,66 p=0,01
IL13 25 μM NiSO$_4$ - IFNγ 0.4 μg/ml a.D1	rs= 0,6 p< 0,05
IL13 25 μM NiSO$_4$ - IL2 0.4 μg/ml a.D1	rs= 0,56 p<0,05
IFN γ 50 μ M NiSO $_4$ - IFN γ 1.0 μ g/ml a.D1	rs= 0,72 p= 0,006
Chorzy z AZS z ujemnym wynikiem testu płatkowego na nikiel	
IFN γ 25 μ M NiSO $_4$ - IFN γ 0.4 μ g/ml a.D1	rs= 0,53 p<0,05
IL2 25 μ M NiSO $_4$ - IL2 0.4 μ g/ml a.D1	rs=0,66 p= 0,01
IL2 50 μM NiSO$_4$ - IFNγ 1.0 μg/ml a. D1	rs = - 0,69 p=0,009
IL2 50 μ M NiSO $_4$ - IL2 1.0 μ g/ml a.D1	rs = 0,84 p=0,0007
Osoby zdrowe - kontrolne	
IFN γ 25 μ M NiSO $_4$ - IFN γ 0.4 μ g/ml a.D1	rs= 0,62 p<0,05
IFN γ 25 μ M NiSO $_4$ -IL2 0.4 μ g/ml a.D1	rs=0,77 p=0,003
IL2 25 μ M NiSO $_4$ - IFN γ 0.4 μ g/ml a.D1	rs= 0,71 p=0,007
IL2 25 μ M NiSO $_4$ - IL2 0.4 μ g/ml a.D1	rs=0,78 p=0,002
IFN γ 50 μ M NiSO $_4$ - IFN γ 1.0 μ g/ml a.D1	rs = 0,67 p<0,05
IFN γ 50 μ M NiSO $_4$ - IL2 1.0 μ g/ml a.D1	rs= 0,58 p<0,05
IL2 50 μ M NiSO $_4$ - IL2 1.0 μ g/ml a.D1	rs= 0,67 p<0,05
IL13 50 μ M NiSO $_4$ - IL13 1.0 μ g/ml a.D1	rs= 0,84 p=0,001

Te wyniki sugerują, że promowanie sekrecji cytokin typu Th1 (głównie IFN γ) w odpowiedzi na a.D1 przez cytokiny wydzielane pod wpływem niklu może sprzyjać osiągnięciu stanu remisji, gdyż jak pokazują badania opisane w tej pracy oraz także doniesienia z zakresu immunologii w stanie remisji AZS dominują mechanizmy Th1-zależne. Nikiel może więc być istotnym czynnikiem wpływającym na osiąganie stanu remisji przez układ immunologiczny pacjenta z AZS mającego PBMC reaktywne na a.D1 *Dermatophagoides pteronyssinus*.

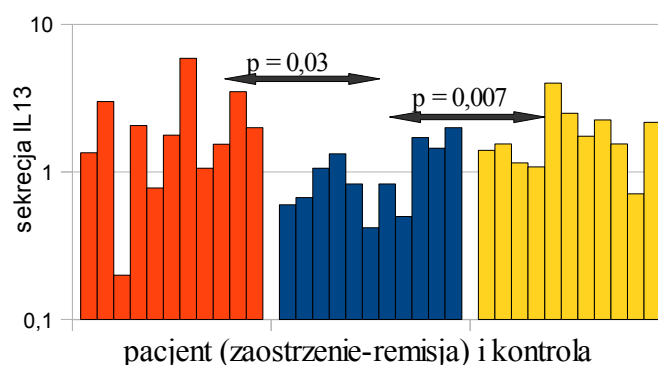
W dalszej kolejności sprawdzono, czy alergia kontaktowa na nikiel u chorych z AZS wpływa na powstanie różnic w profilach cytokinowych po stymulacji SEA i SEB u chorych z AZS w fazie remisji względem fazy zaostrzenia. Poszukiwano korelacji pomiędzy wynikami testu płatkowego na nikiel a profilem cytokinowym powstałym po stymulacji SEA i SEB w fazie remisji AZS. Zaobserwowano istnienie ujemnej korelacji pomiędzy wynikami testu płatkowego na nikiel a sekrecją IL13 po stymulacji SEB (rs= -0,58 p=0,03).



Ryc.38: Zależność pomiędzy nasileniem testu płatkowego na nikiel (wartość 2 i 3), a sekrecja IL13 po SEB u chorych z AZS z kontaktową alergią nikielową.
Kolor: niebieski – wynik testu płatkowego na nikiel, czerwony – sekrecja IL13

Podjeżewa się więc, że występowanie kontaktowej alergii nikielowej w AZS działa antagonistycznie względem sekrecji cytokin Th2 (IL13) w odpowiedzi na SEB w remisji AZS.

W dalszej kolejności sprawdzono jak zmienia się profil cytokinowy powstały po stymulacji SEA i SEB in vitro w fazie remisji względem zaostrzenia u chorych z AZS ze zdiagnozowaną alergią kontaktową na nikiel oraz w grupie chorych z ujemnym wynikiem testu płatkowego na nikiel oraz w grupie kontrolnej. Nie wykazano istnienia różnic w sekrecji cytokin pomiędzy fazą zaostrzenia a fazą remisji u chorych z kontaktową alergią nikielową w AZS po stymulacji SEA i SEB ($p > 0,05$). Również nie wykazano istnienia różnic w profilach cytokinowych powstałych po stymulacji SEA i SEB pomiędzy fazą remisji i grupą kontrolną ($p > 0,05$). Natomiast w grupie chorych z AZS bez kontaktowej alergii nikielowej w fazie remisji AZS spada sekrecja IL13 po stymulacji SEB w porównaniu z fazą zaostrzenia AZS ($p < 0,05$) i grupą kontrolną ($p = 0,007$). W przypadku stymulacji SEA nie zaobserwowano różnic w profilach cytokinowych pomiędzy fazą zaostrzenia, remisji i kontrolą ($p > 0,05$).



Ryc.39: Sekrecja IL13 po stymulacji SEB w fazie zaostrzenia (czerwony), remisji (niebieski) w grupie chorych z AZS bez kontaktowej alergii nikielowej i w grupie kontrolnej (żółty)

Przeprowadzone analizy wyników otrzymanych po stymulacji PBMC enterotoksyną B sugerują, że w remisji AZS spada sekrecja IL13 wydzielanej przez Th2 u pacjentów nie mających kontaktowej alergii niklowej. Natomiast nasilenie kontaktowej alergii niklowej mierzone wynikiem testu płatkowego wiązało się spadkiem sekrecji IL13 w remisji AZS. Wydaje się więc, że kontaktowa alergologia niklowa sprzyja utrzymaniu stałego poziomu IL13 niezależnie od fazy choroby – dlatego też różnica w sekrecji tej cytokiny po stymulacji SEB pomiędzy fazą zaostrzenia a remisji nie była widoczna u chorych z AZS z kontaktową alergią niklową, natomiast była widoczna u chorych z AZS bez kontaktowej alergii niklowej, w przypadku której nikiel nie odgrywał istotnej roli.

Następnie poszukiwano korelacji pomiędzy sekrecją cytokin po stymulacji SEA i SEB oraz siarczanem niklu w fazie remisji AZS. Zarówno u chorych z kontaktową alergią niklową w AZS i u chorych z AZS z ujemnym wynikiem testu płatkowego na nikiel zauważalne jest, że ze wzrostem sekrecji cytokin typu Th1 lub Th2 po stymulacji siarczanem niklu wzrasta sekrecja cytokin typu Th1 lub Th2 po stymulacji SEA lub SEB. Widać więc klasyczną dodatnią regulację Th1-Th1 oraz Th2-Th2. Jednakże, u pacjentów z kontaktową alergią na nikiel obserwuje się nietypową zależność; ze wzrostem sekrecji cytokiny Th2 (IL13) po stymulacji siarczanem niklu wzrasta sekrecja cytokiny Th1 (IFN γ) po stymulacji SEA i SEB. Natomiast u pacjentów bez kontaktowej alergii niklowej była widoczna ujemna regulacja tj. ze wzrostem sekrecji cytokiny typu Th2 (IL13) po stymulacji siarczanem niklu malała sekrecja cytokiny Th1 (IFN γ) po stymulacji SEA i SEB. Zaobserwowano także wystąpienie nietypowej zależności w tej grupie chorych z AZS bez kontaktowej alergii niklowej – wzrost sekrecji cytokiny Th1 (IL2) po stymulacji siarczanem niklu wiąże się ze spadkiem sekrecji innej cytokiny Th1 (IFN γ) po stymulacji SEA i SEB. Natomiast w grupie kontrolnej obserwuje się tylko dodatnie (stymulujące) zależności między sekrecją cytokin po siarczanie niklu i SEA/SEB. Te zależności dotyczą tylko tej samej cytokiny (są tylko homogenne, czego nie wykazano u osób z AZS).

Tabela 28: Zależności pomiędzy sekrecją cytokin po stymulacji SEA i SEB oraz siarczanem niklu in vitro u chorych z AZS w remisji z dodatnim i ujemnym wynikiem testu płatkowego na nikiel i w grupie kontrolnej

Typ korelacji	Wyniki testu nieparametrycznej korelacji Spearmana
Chorzy z AZS z kontaktową alergią nikielową	
IL2 NiSO ₄ 25 μM – IL2 SEA	rs = 0,58 p< 0,05
IL13 NiSO₄ 25 μM - IFNγ SEA	rs = 0,57 p< 0,05
IL13 NiSO₄ 25 μM - IFNγ SEB	rs = 0,61 p< 0,05
IL13 NiSO ₄ 25 μM – IL13 SEB	rs = 0,7 p=0,009
IFNγ NiSO ₄ 50 μM - IL2 SEB	rs = 0,74 p<0,005
IL2 NiSO ₄ 50 μM – IL2 SEA	rs = 0,71 p=0,007
IL13 NiSO₄ 50 μM - IFNγ SEA	rs = 0,74 p<0,005
IL13 NiSO ₄ 50 μM – IL13 SEA	rs= 0,56 p< 0,05
IL13 NiSO₄ 50 μM - IFNγ SEB	rs = 0,74 p< 0,005
IL13 NiSO ₄ 50 μM - IL13 SEB	rs = 0,74 p< 0,005

Chorzy z AZS bez kontaktowej alergii nikielowej	
IFNγ NiSO ₄ 25 μM - IL13 SEB	rs = 0,65 p< 0,05
IL2 NiSO ₄ 25 μM – IL2 SEA	rs = 0,68 p=0,01
IL2 NiSO₄ 25 μM - IFNγ SEB	rs = - 0,63 p< 0,05
IL2 NiSO ₄ 25 μM – IL2 SEB	rs = 0,67 p = 0,01
IL13 NiSO ₄ 25 μM – IL13 SEB	rs = 0,53 p<0,05
IL2 NiSO₄ 50 μM - IFNγ SEA	rs = -0,75 p= 0,004
IL2 NiSO₄ 50 μM - IFNγ SEB	rs = -0,57 p < 0,05
IL13 NiSO₄ 50 μM - IFNγ SEA	rs = -0,6 p< 0,05
IL13 NiSO ₄ 50 μM – IL13 SEA	rs = 0,72 p= 0,006
IL13 NiSO₄ 50 μM - IFNγ SEB	rs = -0,71 p=0,007
Zdrowi-kontrolni (bez alergii nikielowej)	
IFNγ NiSO ₄ 50 μM - IFNγ SEB	rs=0,5 p=0,009
IL13 NiSO ₄ 50 μM – IL13 SEB	rs=0,66 p=0,0004
IL13 NiSO ₄ 25 μM – IL13 SEA	rs=0,68 p=0,0003
IFNγ NiSO ₄ 50 μM - IFNγ SEA	rs=0,55 p=0,004
IL13 NiSO ₄ - IL13 SEA	rs=0,51 p=0,008
IL2 NiSO ₄ 50 μM – IL2 SEB	rs=0,36 p=0,05
IL13 NiSO ₄ 25 μM – IL13 SEB	rs=0,56 p=0,003

Na podstawie otrzymanych wyników przypuszcza się, że inne środowisko cytokinowe jest tworzone u chorych z i bez kontaktowej alergii nikielowej w remisji AZS oraz u osób zdrowych – kontrolnych. Te różnice mogą wpływać na zdolność organizmu do obrony przed kolonizacją przez *S. aureus*, a więc ułatwiać rozwój infekcji lub hamować w przypadku osób zdrowych.

V. Dyskusja Wyników

1: Reaktywność PBMC na siarczan niklu w zaostrzeniu AZS

Przeprowadzona analiza danych nie wykazała istnienia różnic w sekrecji IFN γ , IL2 oraz IL13 przez PBMC stymulowane siarczanem niklu *in vitro* pomiędzy grupą chorych z z kontaktową alergią niklową w AZS bez chorób współistniejących i grupą kontrolną. Nie zaobserwowano także różnic między chorymi z kontaktową alergią niklową w AZS i chorymi z AZS bez kontaktowej alergii niklowej. Nie zaobserwowano także różnic w sekrecji badanych cytokin po stymulacji siarczanem niklu pomiędzy grupą chorych z AZS z kontaktową alergią niklową i grupą zdrowych-kontrolnych osób. Wydaje się więc, że inne molekularne mechanizmy mogą być zaangażowane w alergię niklową w atopowym zapaleniu skóry. O udziale innych cytokin w rozwoju alergii niklowej w AZS może świadczyć ujemna korelacja pomiędzy sekrecją IFN γ po stymulacji siarczanem niklu *in vitro* i wskaźnikiem zmian skórnych SCORAD oraz nasileniem testu płatkowego na nikiel. Spadek wydzielania IFN γ będącej cytokiną typu Th1 teoretycznie powinien oznaczać wzrost sekrecji cytokiny antagonistycznej z grupy Th2. W przypadku przeanalizowanej grupy chorych z AZS raczej nie była nią IL13, gdyż nie zaobserwowano różnic w jej sekrecji między grupą chorych z AZS a grupą kontrolną. Najnowsze publikacje z zakresu alergologii podają, że cytokiny związane z nadwrażliwością na nikiel to oprócz badanych w ramach tego projektu IFN γ , IL2, IL13 to także takie cytokiny jak: IL4, IL5 i IL10^{128,130}. W mechanizmie alergii kontaktowej niklowej sekrecja IL5 koreluje z wynikami testu płatkowego na nikiel.¹³¹ W przypadku alergii systemowej na nikiel np. alergicznym nieżycie nosa, astmie oskrzelowej ważną rolę odgrywają takie cytokiny jak: IL4, IL5, IL13.¹¹⁴ Ponadto sugeruje się, że nikiel może uczestniczyć w patogenezie AZS poprzez wywoływanie stresu oksydacyjnego.¹²⁷ W przeprowadzonych badaniach w ramach opisanego projektu dowodem na to, że nikiel odgrywa jednak istotną rolę w AZS jest dodatnia korelacja pomiędzy wydzielaniem IL2 a nasileniem wyniku testu płatkowego na nikiel u chorych z AZS. Współobecność astmy alergiczej i alergii kontaktowej z AZS powodowała zanik tej zależności, co może oznaczać, że inne molekularne mechanizmy są zaangażowane w nadwrażliwość na nikiel w przypadku tych dwóch chorób. Ze względu na fakt, że w przeprowadzonych badaniach nie zaobserwowano różnic w odpowiedzi PBMC na siarczan niklu pomiędzy grupą chorych z AZS i osobami zdrowymi podejrzewa się, że zarówno PBMC pochodzące od osób chorych z AZS i zdrowych mogą wydzielać cytokiny jeśli mają kontakt z nikiem. U chorych z AZS są jednak obecne PBMC specyficzne względem innych alergenów w alergiach poliwalentnych, migrujące do skóry, gdzie mogą reagować na te inne alergeny np. aeroalergeny, autoantygeny. Natomiast u osób zdrowych nie ma takich komórek. Wedle tej hipotezy nikiel może więc pełnić rolę inicjatora

(pobudzanie aktywności PBMC do wydzielania cytokin) aktywującego komórki „alergiczne” odpowiadające na inne alergeny. Możemy mieć więc do czynienia z tzw. współoddziaływaniem alergenów w atopowym zapaleniu skóry. Tego typu mechanizm mógłby stanowić alternatywną teorię wyjaśniającą tzw. późny typ reakcji alergicznej obserwowanej w skórze podczas wykonywania testu płatkowego na nikiel.¹²⁸ Podczas tego typu testowania obserwuje się rumień/grudki/obrzęk po 48 godzinach okluzji, które są widoczne do 96 godzin lub szybko zanikają lub też te zmiany na skórze pojawiają się dopiero po 48 godzinach po usunięciu alergenu i wystawieniu skóry na ekspozycję środowiska zewnętrznego. Zjawisko opóźnionej reakcji na nikiel tłumaczy się potrzebą czasu niezbędnego do napływu limfocytów do miejsca ekspozycji alergenu, gdzie komórki tworzą odczyn alergiczny, oraz czasem potrzebnym do tworzenia kompleksów haptenu czyli nikiel-białko prezentowanych w kontekście MHC przez komórki prezentujące antygen limfocytom T.¹²⁸ Z drugiej jednak strony przyjmując teorię współoddziaływania alergenów można założyć, że ekspozycja na nikiel i kontakt z tym metalem aktywuje komórki w sposób niespecyficzny do wydzielania cytokin. Pobudzeniu mogą więc ulec zarówno komórki pochodzące od chorych na AZS z kontaktową alergią niklową oraz od osób zdrowych. Publikacje z zakresu alergologii sugerują, że nikiel wiąże się z receptorem TCR¹²⁵ obecnym na limfocytach T osób chorych z AZS i zdrowych. Skutkiem niespecyficznej aktywacji komórek układu immunologicznego skóry przez nikiel może być widoczna po 48 godzinach zmiana na skórze. Przypuszcza się, że u chorych z AZS, u których jest zaburzona architektura i skład komórkowy skóry przenikanie niklu do jej wnętrza jest łatwiejsze niż u osób zdrowych.²² Może więc dlatego po 48 godzinach okluzji nie obserwuje się reakcji skóry na nikiel u osób zdrowych. Zgodnie z tą hipotezą po wyeksponowaniu skóry na środowisko zewnętrzne po usunięciu okluzji z siarczanem niklu komórki pobudzone wcześniej przez nikiel reagują w sposób specyficzny tylko u chorych z AZS na alergeny środowiskowe tzw. aeroalergeny¹⁰⁰ i/lub autoantygeny.⁸⁹ Skutkiem tego może być wydłużenie obecności zmian na skórze do 96 godzin lub pojawienie się tych zmian dopiero po wyeksponowaniu skóry na środowisko zewnętrzne- aeroalergeny (czyli po 48 godzinach). Aktywność komórek pobudzonych przez nikiel może też ulegać wyciszeniu, gdy komórki nie są specyficzne względem aeroalergenów i/lub autoantygenów (zanik reakcji skórnej po 48 godzinach w teście płatkowym na nikiel). To tłumaczyłoby, dlaczego nie zaobserwowano różnic w sekrecji cytokin in vitro między osobami zdrowymi i chorymi z AZS, a wykazano istnienie korelacji między poziomem nasilenia testu płatkowego na nikiel a sekrecją IL2 po stymulacji siarczanem niklu in vitro u chorych z AZS. Dodatkową informacją na temat molekularnych mechanizmów oddziaływania niklu z komórkami w AZS jest obserwacja, że nie zawsze wynik testu płatkowego na nikiel informuje o obecności PBMC ulegających pobudzeniu przez nikiel – dodatnia korelacja

między liczbą komórek wydzielających IL2 a wynikiem testu płatkowego na nikiel u chorych z AZS zanikła, gdy do grupy wprowadzono pacjentów, u których współwystępowała astma alergiczna i alergii pokarmowa oraz alergii kontaktowa. Ponadto zaobserwowano pojedyncze przypadki pacjentów ze współwystępującą astmą alergiczną, alergicznym nieżytem nosa oraz alergią pokarmową i kontaktową z ujemnym wynikiem testu płatkowego na nikiel, u których wzrost liczby PBMC po stymulacji siarczanem niklu *in vitro* był przynajmniej dwukrotny. W przypadku współwystępowania z AZS alergii pokarmowej nadwrażliwość na nikiel prawdopodobnie objawiała się po spożyciu pokarmów zawierających nikiel i została wykazana w testach prowokacji doustnej.¹³² W przypadku pacjentów z AZS z cechami alergii kontaktowej inne cytokiny mogą być zaangażowane w molekularny mechanizm odpowiedzi na obecność niklu.¹³¹ Natomiast interesujący jest fakt wystąpienia dużej reaktywności na nikiel u chorego ze współwystępującą astmą alergiczną bez stwierdzonej obecności alergii pokarmowej. Publikacje z zakresu alergologii dowodzą, że komórki nie posiadające receptora kierującego do skóry (CLA) migrują do płuc.^{132,136} Przypuszcza się więc, że w opisanym przypadku pacjent mógł posiadać komórki jednojądrzaste krwi, które łatwo ulegały pobudzeniu przez nikiel, migrowały do dróg oddechowych i tam ulegały pobudzeniu przez aeroalergeny. Brak receptora kierującego PBMC do skóry (CLA) tłumaczyłoby dlaczego u tego pacjenta wynik testu płatkowego na nikiel był ujemny. Z drugiej jednak strony należy pamiętać, że test płatkowy może ulegać negatywizacji u osób z długotrwałą ekspozycją na nikiel, co wynika z nabywania tolerancji immunologicznej na ten pierwiastek i wiąże się ze zwiększonym wydzielaniem IL10.¹³⁰

2: Reaktywność PBMC na a.D1 w zaostrzeniu AZS

W alergii roztoczowej w atopowym zapaleniu skóry potwierdzonej dodatnim wynikiem testu punktowego na a.D1 obserwowano wzrost sekrecji wszystkich trzech analizowanych cytokin (IFN γ , IL2, IL13) w zależności od stosowanej dawki antygeny D1 *in vitro*. Źródła literaturowe donoszą o udziale cytokin typu Th2, ale również i Th1 w rozwoju alergii roztoczowej w AZS.¹³⁵ Częstym obrazem klinicznym obserwowanym u pacjentów z AZS jest współwystępowanie z AZS innych chorób alergicznych¹, które, jak wykazały analizy przeprowadzone w tej pracy, wydają się modyfikować profil cytokinowy będący odpowiedzią na kontakt PBMC z antygenem D1. U chorych z AZS z alergią roztoczową bez chorób współistniejących ze wzrostem nasilenia zmian skórnych (wskaźnik SCORAD) maleje sekrecja IFN γ . Natomiast u chorych z AZS z alergicznymi chorobami współistniejącymi zanika ta zależność. Przeprowadzone analizy, zwłaszcza u chorych z AZS ze współwystępującą astmą alergiczną bez innych chorób lub też w obrazie klinicznym AZS + AA + ANN + AP, sugerują, że ten modyfikujący wpływ współwystępowania z AZS innych chorób

dotyczy spadku/wzrostu sekrecji cytokiny Th1 (IFN γ). Modyfikujący wpływ współwystępowania innych chorób alergicznych na profil cytokinowy w alergii roztoczowej w AZS nie tłumaczy jednak, dlaczego w przypadku grupy osób tylko z AZS z dodatnim wynikiem testu punktowego na a.D1 dochodzi do przyrostu liczby PBMC wydzielających zarówno cytokiny Th2 (IL13) i/lub Th1 (IFN γ , IL2). Podejrzewa się, że niejednorodność odpowiedzi PBMC na a.D1 może być spowodowana reaktywnością PBMC na powszechnie występujący nikiel obecny w wodzie, pokarmach i przedmiotach codziennego użytku,^{114,115} modyfikujący w rezultacie środowisko cytokinowe. Tak więc można oczekiwać innego profilu cytokinowego w odpowiedzi na a.D1 w alergii monowalentnej z jednym alergenem uczulającym, a innego w poliwalentnej z wieloma alergenami uczulającymi i tworzącymi wspólne środowisko cytokinowe nietypowe dla każdego z tych alergenów uczulających osobno. Jak wykazały przeprowadzone analizy, u chorych z AZS Ni(-) przeważa sekrecja IL13, a spada sekrecja IL2 dominującej w odpowiedzi na a.D1 u chorych z AZS Ni(+). Wydaje się więc, że nikiel może hamować Th2-zależne mechanizmy związane z odpowiedzią na a.D1 i promować mechanizmy typu Th1 w odpowiedzi na a.D1. To tłumaczyłoby dlaczego w klasycznej Th2-zależnej związanej z IgE alergii roztoczowej w AZS obserwowano wzrost sekrecji zarówno IL13, ale też i IL2. Kolejna obserwacja przemawiająca za udziałem dodatkowego czynnika modyfikującego profil cytokinowy w alergii roztoczowej w AZS (bez udziału innych chorób alergicznych) pokazuje, że profil cytokinowy tworzony przez PBMC "spontanicznie" (bez stymulacji alergenem) wydzielające cytokiny wydaje się być powiązany z wynikiem testu punktowego na a.D1 – tę zależność wykazuje zarówno IL2 oraz IL13. Wydaje się więc, że już w chwili pobierania PBMC z żyły te komórki są pobudzone przez alergeny in vivo promujące zarówno syntezę cytokin typu Th1 oraz Th2– jednym z nich może być nikiel. Przeprowadzone analizy pokazują, że wynik testu punktowego na a.D1 i test Elispot wzajemnie potwierdzają swoje wyniki, o czym świadczą korelacje pomiędzy wynikami tych testów. Nie można jednak jednoznacznie powiedzieć, że ujemny wynik testu punktowego na a.D1 oznacza brak PBMC w ustroju reagujących na antygen D1. Zaobserwowano grupę pacjentów tylko z AZS z ujemnym wynikiem testu punktowego na a.D1 oraz osoby w grupie kontrolnej, u których wzrost liczby PBMC wydzielających cytokiny był przynajmniej dwukrotny po stymulacji a.D1 in vitro. Typ wydzielanych cytokin był niejednorodny (Th1, Th2, Th1-Th2). Żaden z tych pacjentów, w przeciwieństwie do chorych z AZS z D1(+), u których 68,5% miało asIgE dla D1 oraz 44% miało podwyższone tIgE, nie posiadał asIgE dla D1 oraz tIgE było w normie. Pojawia się więc pytanie o możliwość istnienia mechanizmu alergii roztoczowej IgE- niezależnego i nie dającego dodatniego wyniku testu punktowego. Coraz częściej w literaturze pojawiają się doniesienia o znaczeniu testu płatkowego w wykrywaniu mechanizmu typu późnego w alergii roztoczowej.¹³⁵ Może więc

wykonanie tego typu testu chociaż częściowo tłumaczyłoby otrzymane zjawisko. Z drugiej jednak strony należy podkreślić, że są prace informujące o PBMC specyficznie reagujących na a.D1 in vitro u chorych z AZS i współistniejącą astmą alergiczną, wśród których są obecne komórki nie posiadające receptora kierującego do skóry.¹³⁶ Takie komórki migrują do innych narządów (np. do płuc) lub mogą pozostawać w krwioobiegu modyfikując środowisko cytokinowe i w ten sposób wpływając na pobudzenie innych PBMC, ekspresję receptorów i innych białek powierzchniowych i pośrednio nasilając/ hamując rozwój nadwrażliwości na inny alergen. Badania opisane w tej pracy pokazują, że w przypadku klasycznej, IgE-zależnej alergii roztoczowej (potwierdzonej skórnymi testami punktowymi) dodatni wynik skórny testu punktowego zależy nie tylko od obecności PBMC rozpoznających a.D1, ale ważny jest jaki jest to typ komórek (zarówno Th1 oraz Th2 muszą ulegać aktywacji w klasycznej alergii roztoczowej w AZS u chorych z dodatnim wynikiem skórny testu punktowego na a.D1). Nie bez znaczenia wydaje się także stężenie alergenu – ze wzrostem stężenia a.D1 nasileniu ulegają molekularne mechanizmy (sekrecja IL13) związane z rozwojem klasycznej Th2-zależnej alergii roztoczowej. Dodatkowo, ważne jest środowisko cytokinowe, w którym PBMC przebywają. To środowisko determinuje polaryzację Th1- Th2³⁸, a więc decyduje, czy rozwinie się alergia roztoczowa czy też nie. Z kolei to środowisko może być modyfikowane przez wiele czynników (współobecność innych chorób alergiczych i udział innych alergenów). Wydaje się więc, że o tym, czy rozwinie się alergia roztoczowa u pacjenta decyduje nie tylko obecność receptora na PBMC rozpoznającego specyficznie a.D1, ale także mikrośrodowisko, w którym komórki się znajdują.

3: Reaktywność PBMC na gronkowcowe enterotoksyny A i B w zaostrzeniu AZS

Przeprowadzone w tej pracy analizy nie wykazały istnienia różnic w spontanicznej sekrecji cytokin i po stymulacji enterotoksynami A i B pomiędzy grupą chorych z AZS będących nosicielami *S. aureus* w nosie i/lub skórze, chorych z AZS z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo tej bakterii i kontrolami również z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo *S. aureus*. Nie zaobserwowano także związków profili cytokinowych spontanicznych ze wskaźnikiem nasilenia zmian skórnych SCORAD u nosicieli *S. aureus* z AZS oraz chorych z AZS z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo tej bakterii. Brak różnic w spontanicznej sekrecji badanych cytokin między chorymi z AZS będącymi nosicielami *S. aureus*, chorymi z AZS z ujemnymi wynikami testu na nosicielstwo oraz kontrolami może mieć związek z nabyciem tolerancji obecności bakterii przez układ immunologiczny nosiciela *S. aureus*. Tak więc zgodnie z tą hipotezą bakteria stawałaby się składnikiem flory bakteryjnej skóry pacjenta-nosiciela z AZS (skoro układ

immunologiczny nie jest w stanie usunąć bakterii, to zaczyna ją tolerować, gdyż długotrwały stan zapalny może być niebezpieczny dla organizmu). Brak różnic w odpowiedzi PBMC na SEA i SEB pomiędzy grupą chorych z AZS a grupą kontrolną może mieć związek z mechanizmem działania superantygenów, które aktywują limfocyty T posiadające TCR niezależnie od ich specyficzności.^{82,83} Tak więc pobudzeniu do sekrecji cytokin ulegają limfocyty T posiadające receptor TCR, które są obecne zarówno u osób zdrowych oraz chorych z AZS. Natomiast zaobserwowano, że dochodzi do spadku sekrecji IFN γ po stymulacji SEB ze wzrostem nasilenia zmian skórnych (SCORAD) u nosicieli *S. aureus* z AZS. Sugeruje to, że w przypadku silnego nasilenia zmian skórnych pula limfocytów Th1 ulega zmniejszeniu w krwiobiegu, co może być skutkiem apoptozy komórek Th1 i/lub ich migracji do skóry objętej stanem zapalnym.^{36,91} Jest też możliwe, że zasiedlenie skóry przez *S. aureus* jest skutkiem niedoboru limfocytów Th1 wydzielających IFN γ .^{47,91} W rezultacie infekcja gronkowcowa sprzyja nasilaniu zmian skórnych u chorych z AZS. Zaobserwowano także, że współwystępowanie innych chorób alergicznych wraz z AZS wpływa na sekrecję IFN γ . U chorych na AZS z cechami alergii kontaktowej po stymulacji SEB sekrecja tej cytokiny jest mniejsza niż u chorych z AZS bez chorób współwystępujących. Natomiast współwystępowanie wraz z AZS z cechami alergii kontaktowej alergicznego nieżytu nosa i astmy alergicznej lub alergii pokarmowej powoduje wzrost sekrecji tej cytokiny względem kontroli po stymulacji SEA. Wzrost sekrecji IFN γ związany ze zwiększeniem puli Th1 w krwiobiegu może być skutkiem migracji limfocytów Th2 do płuc w przypadku współwystępowania z AZS astmy alergicznej lub do układu pokarmowego, gdzie komórki te mogą wywoływać reakcje alergiczne IgE-zależne. W rezultacie może to prowadzić do przewagi puli Th1 nad Th2 w krwiobiegu. Ta pula limfocytów Th, która dominuje w krwiobiegu w przypadku danego obrazu klinicznego AZS w zaostrzeniu będzie aktywowana przez superantygen zgodnie z założeniami tej hipotezy. Z drugiej jednak strony podwójny sygnał pochodzący od alergenu i superantygeny może kierować dominujące w krwiobiegu limfocyty Th na drogę programowanej śmierci (apoptozy), co prowadziło do przewagi mniej licznej puli Th w krwiobiegu. Powszechnie przyjęła się teoria o apoptozie limfocytów Th1 na skutek stymulacji superantygenami.⁹¹ Tak więc zwiększenie się puli Th1 w krwiobiegu w przypadku współwystępowania astmy alergicznej i alergii pokarmowej z AZS nie może być tłumaczona przy pomocy tej teorii. Doniesienia literaturowe wskazują na związek pomiędzy obecnością konkretnych podtypów receptora TCR a wybranymi jednostkami chorobowymi.¹³⁷ Tak więc z jednej strony superantygeny nie wiążą się tak specyficznie z receptorami jak typowe alergeny, ale mają większe lub mniejsze preferencje do wiązania z danymi podtypami receptora TCR, których ekspresja może być zależna od jednostki chorobowej, która współwystępuje z AZS. Ta teoria mogłaby tłumaczyć, dlaczego zaobserwowano w kilku

przypadkach wpływ współwystępowania z AZS innych chorób alergicznych na profil cytokinowy pacjentów z AZS powstały po stymulacji SEA i SEB in vitro. Migracja limfocytów Th1 i Th2 posiadających różne odmiany receptora TCR (alfa/beta lub gamma/delta) między tkankami/narządami objętymi zapaleniem alergicznym mogłaby stanowić dobre wyjaśnienie, dlaczego współwystępowanie innych chorób alergicznych z AZS wpływa na profil cytokinowy powstały po stymulacji superantygenami SEA i SEB. Przyczyn różnorodności w odpowiedzi PBMC na SEA i SEB in vitro poszukiwano również w modyfikującym wpływie niklu na środowisko cytokinowe. Powszechnie występujący w pokarmach, wodzie oraz przedmiotach codziennego użytku nikiel¹¹⁴⁻¹¹⁵ wywołuje sekrecję cytokin tworzących środowisko cytokinowe. Dlatego więc PBMC u chorych z AZS z alergią na nikiel i chorych bez tej alergii mogą inaczej reagować na stymulację SEA i SEB in vitro, ponieważ mogą znajdować się w różnych środowiskach cytokinowych. Zaobserwowano, że u chorych z AZS z kontaktową alergią niklową po stymulacji SEB sekrecja IL2 jest wyższa niż u chorych z AZS bez kontaktowej alergii niklowej. Ponadto zaobserwowano istnienie korelacji pomiędzy sekrecją cytokin po stymulacji siarczanem niklu oraz SEA i SEB głównie u chorych z AZS z wysoką sekrecją IFN γ oraz u nosicieli *S. aureus*. Tak więc jest możliwe, że limfocyty Th związane z nadwrażliwością na nikiel, u której podstaw może znajdować się reakcja tego metalu z wybranym odcinkiem receptora TCR w warunkach in vitro ulegają wtórnemu pobudzeniu przez SEA i SEB również poprzez mechanizm związany z receptorem TCR. Mechanizm oddziaływania niklu z TCR i superantygenów SEA i SEB są jednak inne.^{84,125} Przypuszcza się, że zdolność układu immunologicznego do usuwania *S. aureus* z organizmu u chorych z AZS może więc ulegać zaburzeniu przez modyfikujący oddziaływanie niklu, wpływającego na sekrecję cytokin, poprzez mechanizm związany z TCR. Związek niklu z infekcjami *S. aureus* wydają się potwierdzać wyniki badań El Safty i wsp¹³⁸, który zaobserwował, że u pracowników wytwarzających elektrodytyki niklowe rozwijają się infekcje bakteryjne – w tym infekcje *S. aureus*. Interesująca jest też obserwacja, że u pacjenta z obrazem klinicznym: AZS z cechami alergii kontaktowej i alergią pokarmową z kontaktową alergią niklową dochodzi do bardzo silnej sekrecji IFN γ po stymulacji SEA. Oznacza to, że w przypadku takiego obrazu klinicznego dominują limfocyty Th1. Obecność alergii pokarmowej i kontaktowej alergii niklowej może oznaczać, że nikiel oddziałujący kontaktowo¹²⁴ oraz poprzez reakcję krzyżową w pokarmach¹³² silnie modyfikuje środowisko cytokinowe. Podejrzewa się, że związek pokarmowej alergii niklowej z rozwojem infekcji *S. aureus* w AZS mógłby polegać na wpływie niklu na funkcjonowanie limfocytów T regulatorowych typu Th3 związanych z indukowaniem tolerancji pokarmowej.^{113,130} Te limfocyty wydzielają TGF β , który jak wykazano, wpływa na ekspresję fibronektyny.¹³⁹, która jest białkiem macierzy zewnątrzkomórkowej, z którym wiąże się *S. aureus*.⁷⁶ Istnieją doniesienia

literaturowe o wpływie niklu na sygnalizację wewnątrzkomórkową indukowaną przez TGF β .¹⁴⁰ Znalezienie odpowiedzi na pytanie czy nosicielstwo *S. aureus* i współwystępowanie nadwrażliwości na nikiel wraz z AZS mają ze sobą związek wydaje się istotną kwestią, gdyż infekcje gronkowcowe oraz alergię nikielowa jest powszechnie stwierdzana w populacji chorych z atopowym zapaleniem skóry. Powszechność infekcji gronkowcowych u chorych z AZS, trudność w pobraniu wymazów na obecność *S. aureus* z jam ciała, a nie tylko z powierzchni skóry czy też z nosa, skłania do poszukiwania nowych testów diagnostycznych. Problemem też jest fakt, że obecność *S. aureus* na powierzchni ciała tj. skóra i nos może być przejściowa i *S. aureus* może nie wchodzić w skład stałej flory bakteryjnej. Dlatego też wyniki wymazów wymagają powtórzeń w odstępach czasowych, co czasami może stanowić utrudnienie w praktyce klinicznej. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach opisanego w tej pracy projektu pokazują, że test reaktywności PBMC na SEA i SEB in vitro nie pokazuje różnic pomiędzy wynikami nosicieli *S. aureus* i pacjentów, u których nie wykazano nosicielstwa. Wydaje się jednak, że jest to skutek molekularnego mechanizmu działania superantygenów SEA i SEB, natomiast powstaje pytanie czy w przypadku użycia do stymulacji roztworu zabitego *S. aureus* takie różnice mogłyby zaistnieć. Drugi rodzaj testu wykrywający obecność przeciwciał specyficznych względem SEA i SEB w surowicy nie zawsze informuje o obecności *S. aureus* na skórze lub w nosie, jak pokazały wyniki badań opisanych w tej pracy. Prawdopodobnie jest to skutek tego, że różne szczepy *S. aureus* syntezują różne enterotoksyny, a także nie każdy szczep tej bakterii jest zdolny do produkcji enterotoksyn.¹⁴¹ Ten typ testu może więc tylko stanowić potwierdzenie wyników innych testów diagnozujących nosicielstwo *S. aureus*.

4: Zmiany reaktywności PBMC w remisji względem zaostrzenia AZS

Przeprowadzone analizy pokazują, że typ molekularnych mechanizmów aktywowanych podczas przejścia z fazy zaostrzenia w remisję w AZS nie jest jednorodny dla danego alergenu i wydaje się zależeć od szeregu dodatkowych czynników. W przypadku odpowiedzi PBMC na siarczan niklu obserwuje się spadek sekrecji IL2 wydzielanej przez limfocyty Th0 i Th1 w fazie remisji u chorych z mniejszymi zmianami skórnymi. Natomiast u chorych z AZS z wysokim surowiczym IgE obserwuje się wzrost sekrecji cytokiny Th1- IFN γ . Z kolei u chorych z nasiloną kontaktową alergią nikielową obserwuje się spadek sekrecji cytokiny Th2 – IL13. Według doniesień literaturowych analizy przeprowadzone na wycinkach z biopsji pokazują, że w chronicznych zmianach jest więcej mRNA dla IFN γ i mniej mRNA dla IL13 w komórkach w porównaniu ze skórą w zaostrzeniu AZS.³⁸

W przypadku odpowiedzi PBMC na a. D1 *Dermatophagoides pteronyssinus* obserwuje się

wzrost sekrecji cytokiny Th1- IFN γ w fazie remisji, który ulega nasileniu u chorych z asIgE D1. Dodatkowo, zaobserwowano spadek sekrecji IL2 w remisji względem zaostrzenia AZS po stymulacji PBMC a.D1 u chorych z kontaktową alergią niklową. Wydaje się więc, że sekrecja IL2 w fazie remisji w odpowiedzi na a.D1 jest hamowana w przypadku współwystępowania kontaktowej alergii niklowej w AZS. Uważa się, że IL2 odpowiada za promowanie procesów immunotolerancji autoantygenów i alergenów.^{44,61} Spadek jej sekrecji w fazie remisji może oznaczać, że nikiel u chorych z kontaktową alergią niklową poprzez mechanizm związany z IL2 uczestniczy w regulacji wystąpienia fazy zaostrzenia i remisji u chorych z alergią roztozczową w AZS. Spadek sekrecji IL2 w odpowiedzi na a.D1 w fazie remisji może przyspieszać wystąpienie zaostrzenia, a wzrost sekrecji IL2 w zaostrzeniu w odpowiedzi na a.D1 może promować immunotolerancję alergenów i wystąpienie remisji. Tak więc u chorych z AZS z alergią roztozczową nikiel może być jednym z czynników regulujących przejścia zaostrzenia - remisja AZS.^{18,38}

Odpowiedź PBMC na gronkowcową enterotoksynę B w fazie remisji wiązała się z spadkiem sekrecji IL2 w porównaniu z fazą zaostrzenia w obecności IgE-zależnych mechanizmów (znaleziono asIgE SEB w surowicy pacjentów). U nosicieli *Staphylococcus aureus* obserwowano spadek sekrecji IL13 w remisji w odpowiedzi na SEB. Widoczna jest więc zgodność otrzymanych wyników z doniesieniami literaturowymi, w których przejście z fazy zaostrzenia w fazę remisji AZS polega na przesunięciu równowagi puli limfocytarnej w kierunku przewagi liczby/aktywności limfocytów Th1 i spadku sekrecji cytokin typu Th2.^{9,18,38}

Zaobserwowano także, że środowiska cytokinowe tworzone przez PBMC reagujące na siarczan niklu u chorych z i bez kontaktowej alergii niklowej oraz na SEA i SEB są inne (u chorych z kontaktową alergią niklową obserwuje się tylko synergistyczne zależności w sekrecji cytokin po stymulacji SEA i SEB i NiSO₄, a u chorych bez kontaktowej alergii niklowej te zależności są zarówno synergistyczne jak i antagonistyczne). Te różnice w tworzonych przez alergeny środowiskach cytokinowych może ułatwiać lub utrudniać osiągnięcie stanu remisji. Uogólniając, wydaje się, że regulacja Th1/Th2 związana z przejściem z fazy zaostrzenia w fazę remisji ma związek z wpływem alergenów na środowisko cytokinowe oraz jest ściśle powiązana z nasileniem procesów IgE- zależnych. To zjawisko można próbować tłumaczyć w ten sposób, że im bardziej są nasilone procesy IgE-zależne tym udział puli limfocytów Th2 wydaje się być większy, a więc przesunięcie równowagi w kierunku limfocytów Th1 związanych z fazą remisji może być trudniejsze. Może to oznaczać, że w takich przypadkach istnieje potrzeba zaangażowania większej liczby PBMC wydzielających cytokiny Th1 i polaryzację Th0 w Th1, wyższej sekrecji cytokin i udziału dodatkowych cytokin typu Th1. Ponadto wydaje się, że dodatkowym czynnikiem wpływającym na molekularne mechanizmy związane z przejściem z fazy zaostrzenia w remisję jest

wpływ współwystępowania innych chorób – w tym astmy alergicznej i alergii kontaktowej.¹⁴² Może to być skutkiem migracji komórek pomiędzy tkankami i krwioobiegem.^{36,42} Powracające ze skóry/płuc komórki do krwioobiegu, gdzie nie mają kontaktu z alergenem np. a.D1, SEA, SEB, wydzielają cytokiny, które wpływają na inne PBMC obecne we krwi modyfikując ich odpowiedź. Taki mechanizm mógłby tłumaczyć potencjalny wpływ współwystępowania innych chorób alergicznych na profil cytokinowy w remisji u chorych z AZS z różnymi chorobami współwystępującymi, co jednak wymaga przeprowadzenia badań w grupach wieloosobowych z tymi samymi obrazami klinicznymi. Wydaje się także, że obecność alergii poliwalentnej czyli współwystępowanie alergii na kilka alergenów u chorego (np.roztocze i nikiel), nosicielstwo patogennych mikroorganizmów (np. *S. aureus*) może wpływać na molekularne mechanizmy aktywowane w fazie remisji sprzyjając lub utrudniając osiągnięcie stanu remisji. Dlatego też istotne jest, aby przy wybieraniu odpowiedniej terapii dla pacjenta z AZS zwracać uwagę na alergie współtowarzyszące i obecność innych chorób alergicznych, które mogą nasilać lub hamować efekt leczniczy stosowanej terapii dążącej do osiągnięcia długotrwałej remisji. Tak więc u pacjentów z tym samym rozpoznaniem – AZS - mechanizmy przejścia w fazę remisji mogą być różne i w związku z tym mogą wymagać innych terapii dla promowania osiągnięcia tej fazy. Pojawia się więc potrzeba indywidualizacji terapii w leczeniu atopowego zapalenia skóry.

VI. WYKAZ SKRÓTÓW

a.D1 – antygen D1 roztocza kurzu domowego *Dermatophagoides pteronyssinus*

asIgE – specyficzne IgE

AZS – atopowe zapalenie skóry

AA – astma alergiczna

AA_{dz}- astma alergiczna w dzieciństwie

ANN – alergiczny nieżyt nosa

ANO – alergiczny nieżyt oczu (spojówek)

AK – alergia kontaktowa

AP – alergia pokarmowa

Has – choroba Hashimoto

IFN γ - interferon gamma

IL2 – interleukina 2

IL13 – interleukina 13

MHC - (Major Histocompatibility Complex) – kompleks zgodności tkankowej

NiSO₄– siarczan niklu

PBMC – (Peripheral Blood Mononuclear Cells) – komórki jednojądrzaste krwi

PHA – L- fitohemaglutynina

SEA – gronkowcowa enterotoksyna A

SEB – gronkowcowa enterotoksyna B

TCR – (T cell receptor) receptor limfocytów T

T CD4 (Th) – limfocyty T pomocnicze

T CD8 (Tc) – limfocyty T efektorowe (cytotoksyczne)

tIgE – całkowita surowicza immunoglobulina E

VII. STRESZCZENIE

Oddziaływania pomiędzy komórkami układu immunologicznego decydują o rozwoju atopowego zapalenia skóry, nasileniu objawów choroby oraz wystąpieniu fazy remisji. Reaktywność komórek jednojądrzastych krwi (PBMC) *in vivo* na różne substancje może zależeć od współdziałania alergenów poprzez indukowanie przez te substancje różnych cytokin w tkance objętej odczynem chorobowym. To może powodować, że reakcja na ten sam alergen może być różna u chorych z AZS. Wiedza na temat mechanizmów międzykomórkowych i interakcji komórek z alergenami może być przydatna w procesie leczenia tzn. pomóc w opracowaniu terapii promujących te molekularne procesy, które prowadzą do wyciszenia objawów choroby.

Celem pracy było badanie reaktywności PBMC u chorych z AZS w zaostrzeniu i remisji oraz w grupie osób zdrowych – kontrolnych na siarczan niklu, antygen D1 roztocza kurzu domowego *Dermatophagoides pteronyssinus* oraz enterotoksyny A i B gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus*.

Badaniem objęto 30 chorych z atopowym zapaleniem skóry w okresie zaostrzenia objawów chorobowych oraz w remisji leczonych w Poradni Zakładu Alergologii Klinicznej i Środowiskowej Katedry Toksykologii i Chorób Środowiskowych UCJM. Grupę referencyjną stanowiło 30 osób zdrowych.

Badano profile cytokinowe komórek jednojądrzastych krwi (PBMC) spontaniczne i powstałe po stymulacji alergenami techniką ELISpot. Stężenie tIgE, asIgE D1, asIgE SEA, asIgE SEB, panel autoagresyjny: dsDNA i ANA w surowicy krwi oznaczano metodą UNICAP (Pharmacia).

Na podstawie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników wyciągnięto następujące wnioski:

1. Przeprowadzone badania pokazują, że chorzy z AZS stanowią grupę zróżnicowaną pod względem badanych, a często uznawanych za typowe dla AZS parametrów. W grupie chorych z AZS wzrost stężenia całkowitego IgE (tIgE) wykazano u 35% badanych. Natomiast wzrost stężenia asIgE dla *Dermatophagoides pteronyssinus* (D1) zaobserwowano u 54,5% chorych z AZS, asIgE dla enterotoksyny gronkowcowej A u 19% badanych z AZS, a także u 24% chorych z AZS wykazano obecność asIgE dla gronkowcowej enterotoksyny B. Dodatni test płatkowy z siarczanem niklu zaobserwowano u 63% chorych z AZS. Dodatni test punktowy z a. D1 *Dermatophagoides pteronyssinus* wykazano u 64% chorych. Dane z wywiadu ujawniły obecność skazy alergicznej (DE) w dzieciństwie u 67% chorych z AZS, a dodatni wywiad rodzinny wystąpił u 65% pacjentów z tej grupy. U chorych z AZS współwystępowały inne choroby tj. głównie kontaktowe zapalenie skóry (53%), alergiczny nieżyt nosa (23%), astma alergiczna (20%), alergia pokarmowa (20%),

alergiczne zapalenie spojówek (3%) oraz choroba Hashimoto (3%). Te wszystkie parametry były ujemne w grupie kontrolnej osób zdrowych.

2. Nikiel wydaje się uczestniczyć w patogenezie kontaktowej alergii niklowej jako niespecyficzny inicjator reakcji alergicznej na inne alergeny uczulające chorych z AZS. Przypuszcza się, że nikiel poprzez niespecyficzne pobudzanie do sekrecji cytokin PBMC sprzyja ich aktywacji, co w przypadku obecności w ustroju komórek alergenowospecyficznych może inicjować/regulować reakcję alergiczną na inne alergeny np. aeroalergeny, autoantygeny, które wywołują odczyn skórny w teście płatkowym na nikiel w tzw. mechanizmie typu opóźnionego. Przeprowadzone badania nie wykazały istnienia różnic w sekrecji cytokin (IFN γ , IL2, IL13) pomiędzy pacjentami chorymi na AZS z kontaktową alergią niklową i osobami zdrowymi – kontrolnymi, natomiast ze wzrostem reaktywności skóry na siarczan nikiel w teście płatkowym u chorych z AZS wzrastała sekrecja IL2 po stymulacji siarczanem nikiel. Zaobserwowano także spadek sekrecji IFN γ wydzielanego przez PBMC po stymulacji siarczanem nikiel u chorych na AZS z kontaktową alergią niklową ze wzrostem nasilenia zmian skórnych (SCORAD).

3. Obecność kontaktowej alergii niklowej poprzez hamowanie procesów Th2 – zależnych i promowanie procesów Th1-zależnych może u pacjentów z genetyczną predyspozycją do rozwoju alergii roztoczowej utrudniać ujawnienie się tej alergii. Opisane w tej pracy badania wykazały, że u chorych z AZS, u których nie zdiagnozowano kontaktowej alergii niklowej sekrecja IL13 po stymulacji niższym stężeniem a.D1 była wyższa w porównaniu z chorymi na AZS z kontaktową alergią niklową oraz w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast u chorych z kontaktową alergią niklową wykazano wzrost sekrecji IL2 (Th1) po stymulacji wyższą dawką a.D1 w porównaniu do chorych z AZS, u których nie zdiagnozowano kontaktowej alergii niklowej oraz w porównaniu do grupy kontrolnej. Nikiel wydaje się więc hamować mechanizmy typu Th2 w odpowiedzi na niskie stężenie a.D1 oraz promować mechanizmy typu Th0/Th1 w odpowiedzi na wysokie stężenia a.D1 zarówno u chorych z AZS z kontaktową alergią niklową oraz u osób zdrowych. U pacjentów z AZS mających genetyczne predyspozycje do rozwinięcia alergii roztoczowej modyfikacja odpowiedzi PBMC na a.D1 przez środowisko cytokinowe współtworzone przez nikiel może zmieniać mechanizmy immunologiczne związane z tym typem alergii. Natomiast u osób zdrowych, u których immunologiczne mechanizmy związane z rozwojem roztoczowej alergii są nieaktywne modyfikacja środowiska cytokinowego przez nikiel wydaje się nie odgrywać większego znaczenia.

4. Alergia na nikiel (kontaktowa alergia niklowa, krzyżowa z niklem alergia pokarmowa) może sprzyjać rozwojowi infekcji skóry gronkowcem złocistym u chorych z AZS. Zgodnie z sugestiami z najnowszej literatury fachowej, skłonność do infekcji *S. aureus* może mieć związek z wpływem nikiel na sekrecję TGF β przez limfocyty T regulatorowe. Ta cytokina odpowiada m.in. za ekspresję

fibronektyny, do której wiąże się *S. aureus* na skórze. Wyniki badań opisanych w tej pracy pokazały, że najwyższą sekrecję IL2 po stymulacji SEB zaobserwowano u chorych z AZS z kontaktową alergią niklową w porównaniu z chorymi z AZS, u których nie zdiagnozowano kontaktowej alergii na nikiel i z osobami kontrolnymi. Wykazano również, że ze wzrostem sekrecji IL2 przez PBMC po stymulacji siarczanem niklu wzrasta także sekrecja IL2 po stymulacji SEA i SEB tylko u nosicieli *S. aureus* chorych na AZS. Zaobserwowano także, że w grupie nosicieli *S. aureus* chorych na AZS częściej występowała alergija pokarmowa (w przypadku alergii pokarmowej może wystąpić reakcja krzyżowa na nikiel) w porównaniu z chorymi na AZS nie będącymi nosicielami tej bakterii. Ta sugestia wymaga jednak potwierdzenia w teście prowokacji doustnej z nikiem.

5. Wydaje się, że nie zawsze wynik testu płatkowego może informować o obecności komórek reagujących na nikiel w krwiobiegu. Wyniki badań opisanego w tej pracy projektu pokazały, że znaleziono pacjentów, których wyniki badań testu płatkowego na nikiel były ujemne, natomiast PBMC pochodzące od tych pacjentów charakteryzowały się wysoką sekrecją cytokin (IFN, IL2, IL13) wydzielanych przez PBMC po stymulacji siarczanem niklu *in vitro*. Ta reaktywność PBMC na nikiel *in vitro* może mieć związek z obecnością systemowej alergii niklowej, gdyż u tych pacjentów stwierdzono astmę alergiczną i/lub alergię pokarmową. Ta sugestia wymaga jednak sprawdzenia uznanymi testami diagnostycznymi.

6. Mechanizmy Th1-zależne wydają się niewystarczające do wywołania alergii roztoczowej w AZS. O jej pojawieniu się prawdopodobnie decyduje obecność mechanizmów Th2-zależnych w odpowiedzi na a.D1 ujawniających się ze wzrostem stężenia alergenu D1. Opisanie w tej pracy analizy wykazały, że u chorych z AZS, u których nie zdiagnozowano alergii roztoczowej przeważały mechanizmy typu Th1 związane z sekrecją IFN γ i IL2 wydzielanych przez PBMC w odpowiedzi na stymulację niskim stężeniem a.D1. Natomiast u chorych na AZS ze zdiagnozowaną alergią roztoczową dominuje mechanizm typu Th2 związany z sekrecją IL13 wydzielanej przez PBMC w odpowiedzi na stymulację wyższym stężeniem a.D1.

7. Spadek sekrecji IFN γ w krwiobiegu wydaje się sprzyjać nosicielstwu *S. aureus*, co może prowadzić do wystąpienia nasilonych zmian skórnych u chorych z AZS. Wyniki badań opisanych w tej pracy pokazują, że u nosicieli *S. aureus* chorych na AZS nasilonym zmianom skórnym (SCORAD) towarzyszyła niska sekrecja IFN γ wydzielanego przez PBMC po stymulacji superantigenem SEB. Ta obserwacja sugeruje więc, że wśród nosicieli *S. aureus* chorych na AZS pula limfocytów Th1 wydzielających IFN γ zmniejsza się wraz ze wzrostem nasilenia zmian skórnych.

8. Współwystępowanie innych chorób alergiczych wraz z AZS (zwłaszcza astmy alergiczej i

alergii kontaktowej) może modyfikować molekularne mechanizmy związane z reaktywnością PBMC na a.D1 oraz superantygeny *S. aureus* oraz na nikiel w zaostrzeniu AZS. Przeprowadzone analizy pokazały, że profil reaktywności PBMC na nikiel w astmie alergicznej i alergii kontaktowej jest inny niż w AZS, ponieważ współwystępowanie tych chorób alergicznych z AZS powoduje zanik korelacji pomiędzy sekrecją IL2 po stymulacji siarczanem niklu in vitro, a wynikiem testu płatkowego na nikiel. Natomiast zaobserwowano, że współwystępowanie astmy alergicznej lub kontaktowej alergii z AZS może wpływać na sekrecję IFN γ w przypadku odpowiedzi PBMC na a.D1. Stymulacja PBMC superantygenem SEB pokazała, że wystąpienie cech alergii kontaktowej z AZS wydaje się prowadzić do spadku liczebności Th1 wydzielających IFN γ . Natomiast obecność alergii pokarmowej, alergii układu oddechowego (astma alergiczna i alergiczny nieżyt nosa) u chorych z AZS z cechami alergii kontaktowej wydaje się sprzyjać zwiększeniu puli Th1 wydzielających IFN γ po stymulacji hodowli PBMC superantygenem SEB. U pacjentów, u których nie wykazano cech alergii kontaktowej z AZS nie zaobserwowano żadnych zależności po stymulacji superantygenami. Te wstępne obserwacje wymagają jednak potwierdzenia na większych grupach chorych z AZS, u których współwystępują z AZS te same choroby w grupie.

9. Zaobserwowano, że niezależnie od użytego alergenu widać przewagę mechanizmów Th1 nad Th2 podczas przejścia z fazy zaostrzenia w remisję AZS. Mechanizmy IgE – zależne oraz stopień nasilenia zmian skórnych, a także współobecność cech alergii kontaktowej z AZS oraz obecność kontaktowej alergii niklowej wydawały się wpływać na to, które z badanych cytokin odgrywały istotną rolę w osiągnięciu stanu remisji. Wyniki przeprowadzonych badań pokazywały, że u chorych z AZS z małym nasileniem zmian skórnych (SCORAD) dochodziło do zmniejszenia sekrecji IL2 wydzielanej przez PBMC po stymulacji siarczanem niklu w remisji AZS w porównaniu z zaostrzeniem AZS, ale nie z grupą kontrolną. U chorych z AZS w remisji spadek sekrecji IL13 wydzielanej przez PBMC stymulowane siarczanem niklu był najbardziej widoczny u pacjentów z najsilniejszym odczynem w teście płatkowym na nikiel. W remisji AZS u pacjentów z wysokim stężeniem tIgE obserwowano największą sekrecję IFN γ wydzielanego przez PBMC po stymulacji siarczanem niklu.

Zaobserwowano, że w remisji u chorych z AZS, u których zmiany skórne w zaostrzeniu były nasilone (SCORAD), a także u pacjentów mających asIgE D1, występował wzrost sekrecji IFN γ wydzielanego przez PBMC po stymulacji a.D1.

Wykazano, że u nosicieli *S. aureus* w remisji AZS sekrecja IL13 wydzielanej przez PBMC po stymulacji SEB była niższa niż w zaostrzeniu AZS i niż w grupie kontrolnej. Zaobserwowano także, że obecność asIgE SEB w surowicy nosicieli *S. aureus* sprzyjała spadkowi sekrecji IL2

wydzielanej przez PBMC po stymulacji SEB w remisji AZS.

Otrzymane wyniki wydają się sugerować, że nikiel może wpływać na osiągnięcie stanu remisji – wykazano, że największy wzrost sekrecji IL2 wydzielanej przez PBMC stymulowane a.D1 zaobserwowano w remisji AZS u chorych z kontaktową alergią niklową. Teoretyczny mechanizm wpływu niklu regulującego osiągnięcie stanu remisji w AZS mógłby polegać na modyfikacji środowiska cytokinowego – w remisji AZS u chorych z kontaktową alergią niklową obserwowano tylko dodatnie korelacje pomiędzy sekrecją różnych cytokin wydzielanych przez PBMC po stymulacji siarczanem niklu i SEA lub SEB. Natomiast u chorych z AZS bez kontaktowej alergii niklowej te korelacje występowały pomiędzy różnymi cytokinami i były dodatnie i ujemne. Z kolei u osób zdrowych korelacje były tylko dodatnie, ale nigdy pomiędzy różnymi cytokinami.

VIII. ABSTRACT

The cell-cell interactions of the immune system decide about the development of atopic dermatitis, its progression and the switch to the chronic phase of the disease. The reactivity of peripheral blood mononuclear cells in vivo to allergens is supposed to be dependent on the cooperation of these substances, via induction of cytokines secretion, in the allergic inflamed tissue. The allergens cooperation may be the reason of different molecular reaction of the immune system to the same allergen in atopic dermatitis. The knowledge about the cell-cell interactions and other molecular processes involved in allergic diseases is useful for the proper treatment of patients and may help to design new therapies promoting the molecular mechanisms involved in the appearance of remission in atopic dermatitis.

The investigation of reactivity of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to nickel sulfate, D1 antigen of house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* and staphylococcal enterotoxin A and B of *Staphylococcus aureus* in vitro in acute phase and remission of atopic dermatitis (AD).

The thirty people being patients of Clinic of the Department of Clinical and Environmental Allergology, Faculty of Toxicology and Environmental Diseases suffering with atopic dermatitis participated in the project in the acute phase and in the remission of the illness. The reference group consisted of thirty healthy volunteers.

Following the results of performed analyses it was concluded:

1. The performed analyses showed that patients with AD are heterogenic concerning analysed and classified as typical for AD parameters. The high level of IgE was found in 35% of patients with AD. The presence of asIgE D1 was detected in 54,5% of patients with AD, asIgE for staphylococcal enterotoxin A in 19% of patients with AD, asIgE for staphylococcal enterotoxin B in 24% of patients with AD. The positive result of patch test to nickel was found in 63% of patients with AD. The positive prick test to D1 antigen of *Dermatophagoides pteronyssinus* was found in 64% of patients with AD. The family background was discovered in 65% of patients with AD. In the group of patients with AD the following diseases accompanied with AD: contact dermatitis (53%), nasal rhinitis (23%), allergic asthma (20%), food allergy (20%), ocular rhinitis (3%), Hashimoto disease (3%). All these parameters were negative in controls (healthy volunteers).

2. Nickel is supposed to participate in the pathogenesis of contact allergy to nickel in atopic dermatitis as a nonspecific originator/regulator of allergic reactions to other allergens in atopic dermatitis. Nickel might activate PBMC to secrete cytokines and initiate/intensificate an allergic reactions to other allergens like aeroallergens autoantigens as a result if there were allergen-specific cells among PBMC. So far, the allergen-specific PBMC would lead to the positive result of patch

test following the late mechanism of allergic reaction. The results of performed project did not show any differences in cytokines secretion (IFN γ , IL2, IL13) between patients with contact allergy to nickel in AD and healthy volunteers. Nevertheless, the higher skin reactivity to nickel in the patch test was observed the higher IL2 secretion was found in PBMC cell culture from patients with AD. Moreover, the more decreased IFN γ secretion was found in PBMC cell culture under nickel sulfate stimulation the more exacerbated AD (SCORAD index) was observed.

3. The presence of contact allergy to nickel is supposed to inhibit the development of house dust mite allergy (HDM) by the inhibition of Th2-dependent processes and the stimulation of Th1 – dependent processes in genetically predisposed patients. The results of performed project suggested that a secretion of IL13 by PBMC from patients with AD without contact allergy to nickel stimulated with a low concentration of the D1 antigen was higher in comparison with patients with contact allergy to nickel in AD and controls. In turn, there was an increase of IL2 (Th1) secretion by PBMC stimulated with higher concentration of D1 antigen in patients with contact allergy to nickel in AD in comparison with patients with AD without contact allergy to nickel and controls. Nickel seems to inhibit Th2 mechanisms in response to the high concentration of D1 antigen and promote/stimulate Th1 mechanisms in response to a low concentration of D1 antigen in both patients with contact dermatitis to nickel in AD and controls. It is supposed that nickel could change the immunologic mechanisms involved in the development of HDM allergy by modification of cytokines milieu in patients with AD genetically predisposed to this allergy occurrence. In turn, the influence of nickel to cytokines milieu in controls (healthy volunteers) is not supposed to promote/regulate any allergy development due to the lack of allergen-specific cells among PBMC from the controls.

4. The allergy to nickel (contact allergy to nickel and the cross-reactivity of nickel in food allergy) seems to facilitate *S. aureus* infection in AD. The explanation of this observation could be as followed according to the publications: the susceptibility to *S. aureus* infection might be related with the influence of nickel to a secretion of TGF β by Tregs. This cytokine stimulates the expression of fibronectin that is protein to which *S. aureus* can bind. The results have also shown that the highest secretion of IL2 stimulated with SEB was found in AD patients with contact allergy to nickel in comparison with patients with AD without contact allergy and controls. It was also found that the higher secretion of IL2 by PBMC from the carriers of *S. aureus* with AD under nickel sulfate stimulation the higher IL2 secretion under SEA and SEB stimulation. Moreover, the accompaniance of food allergy (the cross – reactivity to nickel in food allergy may occur) with AD was more frequent in the carriers of *S. aureus* in comparison with patients without *S. aureus*. Nevertheless, this suggestion needs to be confirmed by the provocation test with nickel.

5. The performed analyses suggested that a patch test to nickel did not always inform about the presence of PBMC able to react to nickel in the circulation. There was a group of patients with negative result of patch test to nickel whose PBMC secreted cytokines (IFN γ , IL2, IL13) under nickel sulfate stimulation in vitro. The reason of this high reactivity of PBMC to nickel sulfate might be related with the systemic allergy to nickel appearing as diagnosed in these patients allergic asthma and food allergy. Nonetheless, this suggestion needs to be confirmed by certificated diagnostics tests.

6. The Th1 mechanisms are supposed not to be sufficient for the development of allergy to house dust mite (HDM) in AD. The HDM allergy seems to required Th2 mechanisms activated when the concentration of D1 antigen is increased. The performed analyses in this project showed that Th1 mechanisms based upon IFN γ , IL2 secretion dominated in PBMC cell culture from patients with AD without the HDM allergy under low concentration of D1 antigen in vitro. In turn, Th2 mechanisms based upon IL13 secretion dominated in PBMC cell culture from patients with AD with the HDM allergy under high concentration of D1 antigen in vitro.

7. The decrease of IFN γ secretion in the circulation is supposed to facilitate the *S. aureus* infection that might lead to the exacerbation of skin erythema in AD. The performed analyses in this project showed that the decrease of IFN γ secretion by PBMC under SEB stimulation in vitro positively correlated with the exacerbation of AD (SCORAD index) in the carriers of *S. aureus* with AD. This suggest that the Th1 population secreting IFN γ among PBMC decreased when the skin erythema measured by SCORAD index exacerbated.

8. The accompaniance of other allergic diseases (especially allergic asthma, food allergy and contact allergy) is supposed to modify the molecular mechanisms of PBMC reactivity to D1 antigen and staphylococcal superantigens and nickel in AD. The performed analyses in this project showed that the reactivity profile of PBMC to nickel sulfate in vitro in allergic asthma and allergic contact dermatitis was different than in atopic dermatitis, because the accompaniance of these diseases with AD turned to the disappearance of the correlation between the secretion of IL2 by PBMC under nickel sulfate stimulation in vitro and the result of patch test to nickel. In turn, it was found that the presence of allergic asthma or contact allergy together with AD can modify the secretion of IFN γ by PBMC stimulated with D1 antigen in vitro. The decrease of IFN γ secretion by Th1 was observed in PBMC cell culture from AD only with contact allergy under SEB stimulation in vitro. In turn, the accompaniance of food allergy and allergy of the respiratory system (allergic asthma, nasal rhinitis) with contact allergy in AD in others patients was related with the increase of IFN γ secretion by PBMC under SEB stimulation in vitro. These preeliminary conclusions need to

be confirmed by other research projects.

9. It is supposed that no matter which allergen stimulates PBMC in vitro from patients with AD in the chronic phase (remission) the predominance of Th1 mechanisms is observed in comparison to the acute phase of the disease. The IgE – dependent mechanisms, the exacerbation of skin erythema measured by SCORAD index, the accompaniement of contact allergy features in AD and the contact allergy to nickel in AD are supposed to influence the type of dominating cytokine in cytokines profile of PBMC from AD patients. The comparison of cytokines secretion (under nickel sulfate stimulation in vitro in the remission and the acute phase of AD and in controls) showed that the more intensive decrease of IL2 by PBMC from patients with AD in remission was found in patients with nonexacerbated skin erythema classified by SCORAD index. Moreover, the more intensive result of patch test to nickel was observed the more decreased secretion of IL13 by PBMC from patients with AD in remission under nickel sulfate stimulation in vitro was found. The highest secretion of IFN γ by PBMC from patients with AD in remission under nickel sulfate stimulation in vitro was found in the group of patients with high concentration of tIgE in serum. In case of PBMC response to D1 antigen in remission of AD it was found that the highest secretion of IFN γ observed in exacerbated AD with the presence of asIgE D1. Concerning the response of PBMC to staphylococcal superantigens it was found that the secretion of IL13 by PBMC stimulated with SEB was lower in the remission of AD in comparison to the acute phase of AD and controls. Moreover, the presence of asIgE SEB in the serum of the *S. aureus* carriers correlated with the decrease of IL2 secretion by PBMC from patients with AD in remission under SEB stimulation in vitro. The results suggested that nickel might support the switch from acute phase to remission of AD. It was shown that in the remission in comparison to the acute phase there was an increase of IL2 secretion by PBMC from patients with contact allergy to nickel in AD under D1 antigen stimulation in vitro. The theoretical mechanism of the nickel influence regulating the switch from the acute phase into the remission of AD could be related with the change of cytokine milieu by nickel. It was found that in the remission of AD there were only positive correlations between secretion of different cytokines (IL2-IL2, IL13-IFN γ , IL13-IL13, IFN γ -IL2) by PBMC from patients with contact allergy to nickel in AD stimulated with nickel sulfate and superantigens SEA and SEB in vitro. In turn, there were positive and negative correlations between different cytokines (IFN γ -IL13, IL2-IL2, IL2-IFN γ , IL13-IL13) secreted by PBMC from AD patients in remission without contact allergy to nickel. In case of controls the correlations between cytokines were positive but only between the same type of cytokines (IFN γ -IFN γ , IL13-IL13, IL2-IL2).

IX. SPIS TABEL I WYKRESÓW

- Tab.1:** Biologiczne funkcje IFN γ - strona 15
- Tab.2:** Biologiczne funkcje IL2 – strona 17
- Tab.3:** Biologiczne funkcje IL13 – strona 18
- Tab.4:** Czynniki wpływające na kolonizację skóry przez *S. aureus* – str.19
- Tab.5:** Molekularne mechanizmy aktywowane przez alergeny *D. pteronyssinus* – str. 22
- Tab.6:** Biologiczne znaczenie niklu – str. 23
- Tab.7:** Molekularne mechanizmy działania niklu – str. 25
- Tab.8:** Kliniczne obrazy alergii na nikiel – str. 25
- Tab.9:** Kliniczna charakterystyka badanych – str. 36
- Tab.10:** Reaktywność PBMC na siarczan niklu, a.D1 roztocza kurzu domowego oraz enterotoksyny gronkowcowe A i B w zaostrzeniu AZS – str. 38
- Tab.11:** Reaktywność PBMC na siarczan niklu, a.D1 roztocza kurzu domowego oraz enterotoksyny gronkowcowe A i B w remisji AZS – str.38
- Tab.12:** Chorzy z AZS z kontaktową alergią niklową i grupa kontrolna – str. 39
- Tab.13:** Reaktywność PBMC na nikiel u osób z ujemnym testem płatkowym na nikiel – wybrane przypadki – str. 46
- Tab.14:** Profil cytokinowy u chorych tylko z AZS bez chorób współistniejących po dołączeniu chorych z AZS z różnymi chorobami współistniejącymi z dodatnim wynikiem testu punktowego na a.D1 oraz w grupie kontrolnej – str. 48
- Tab.15:** Profil cytokinowy po stymulacji a.D1 u chorych tylko z AZS oraz AZS z astmą alergiczną, AZS z cechami alergii kontaktowej – str. 49
- Tab.16:** Korelacja pomiędzy sekrecją cytokin po stymulacji a.D1 i NiSO₄ u chorych z AZS z ujemnym Ni(-) i dodatnim Ni(+) wynikiem testu płatkowego na nikiel oraz w grupie kontrolnej – str. 53
- Tab.17:** Reaktywność PBMC na a.D1 a SCORAD u chorych z AZS i chorobami współistniejącymi z dodatnim D1(+) i ujemnym D1(-) wynikiem testu punktowego na a.D1 – str. 55
- Tab.18:** Wybrane przypadki silnej reaktywności PBMC na a.D1 u chorych z AZS z ujemnym D1(-) i dodatnim D1(+) wynikiem testu punktowego na a.D1 oraz w grupie kontrolnej – str. 57
- Tab. 19:** Spontaniczna reaktywność PBMC na SEA i SEB u nosicieli *S. aureus* z AZS, chorych z AZS oraz kontroli z ujemnym testem na nosicielstwo *S. aureus* - str. 62
- Tab.20:** Sekrecja cytokin u chorych z AZS będących nosicielami *S. aureus* oraz chorych z AZS i kontroli z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo *S. aureus* – str. 63
- Tabela 21:** Korelacje pomiędzy sekrecją cytokin po stymulacji enterotoksynami i siarczanem niklu w grupie nosicieli *S. aureus* z AZS, chorych z AZS z ujemnym wynikiem testu na nosicielstwo oraz w grupie kontrolnej – str. 68
- Tabela 22:** Charakterystyka pacjentów z AZS będących nosicielami *S. aureus* – str. 69
- Tabela 23:** Pacjenci z AZS – nosiciele *S. aureus*, u których nie wykryto przeciwciał dla SEA i SEB – str. 70
- Tab.24:** Profil cytokinowy powstały po stymulacji a.D1 (0.4 μ g/ml i 1.0 μ g/ml a.D1) w remisji AZS – str. 75
- Tab.25:** Profil cytokinowy powstały po stymulacji SEA i SEB w fazie remisji AZS – str. 79
- Tab.26:** Zależność pomiędzy wynikiem testu płatkowego na nikiel, a sekrecja IL2 po stymulacji 0.4 μ g/ml a. D1 *Dermatophagoides pteronyssinus* w fazie remisji AZS – str. 82
- Tab. 27:** Zależność pomiędzy sekrecją cytokin po stymulacji SEA i SEB oraz siarczanem niklu in vitro u chorych z AZS w remisji z dodatnim i ujemnym wynikiem testu płatkowego na nikiel i w grupie kontrolnej – str. 85
- Ryc.1:** Molekularny mechanizm atopowego zapalenia skóry – str. 13
- Ryc.2:** Schemat oddziaływań IFN γ z receptorem komórkowym – str. 15
- Ryc.3:** Schemat oddziaływań IL2 z receptorem komórkowym – str. 16
- Ryc.4:** Schemat oddziaływań IL13 z receptorem komórkowym – str. 17
- Ryc.5:** PBMC w komorze Bürkera po wyizolowaniu na gradiencie Ficollu – str. 28
- Ryc.6:** Schemat metody Elispot oraz zdjęcie dołka płytki hodowlanej po wybarwieniu na obecność IFN γ , IL2, IL13 wydzielonego przez PBMC in vitro – str. 32
- Ryc.7:** Sekrecja IFN γ po stymulacji 50 μ M siarczanem niklu a SCORAD u chorych tylko z AZS z kontaktową alergią niklową – str. 40

- Ryc.8:** Sekrecja IFN γ po stymulacji 50 μ M siarczanem niklu u chorych z AZS z kontaktową alergią niklową oraz sekrecja IFN γ po stymulacji 25 μ M siarczanem niklu u chorych z AZS z ujemnym wynikiem testu płatkowego na nikiel a SCORAD – str. 41
- Ryc.9:** Sekrecja IFN γ po stymulacji 50 μ M siarczanem niklu a reaktywność skóry na 5% NiSO $_4$ w teście płatkowym u chorych z AZS z dodatnim i ujemnym wynikiem testu płatkowego – str. 42
- Ryc.10:** Sekrecja IL2 po stymulacji 50 μ M siarczanem niklu in vitro a wynik testu płatkowego na 5% siarczan niklu u chorych tylko z AZS – str. 43
- Ryc.11:** Sekrecja IL2 po stymulacji 50 μ M siarczanem niklu, a wynik testu płatkowego na 5% siarczan niklu u chorych tylko z AZS po dodaniu do tej grupy pacjentów ze współwystępującymi wraz z AZS: ANN i AP oraz chorobą Hashimoto – str 44
- Ryc.12:** Sekrecja IL2 po stymulacji 25 μ M siarczanem niklu in vitro, a wynik testu płatkowego na 5% siarczan niklu u chorych tylko z AZS po dodaniu do tej grupy pacjentów ze współwystępującymi wraz z AZS: ANN i AP oraz AZO -str 44
- Ryc.13:** Sekrecja IL2 po stymulacji 50 μ M siarczanem niklu in vitro a wynik testu płatkowego na 5% siarczan niklu u chorych tylko z AZS po dodaniu do tej grupy pacjentów ze współwystępującymi wraz z AZS: AK i AP, AK, AA i AP, AA – str 45
- Ryc.14:** Reaktywność PBMC na 25 μ M siarczan niklu in vitro, a wynik testu płatkowego na 5% siarczan niklu u chorych tylko z AZS po dodaniu do grupy pacjentów z AZS ze współwystępującymi: AK i AP, AK, AA i AP, AA – str 45
- Ryc.15a:** Sekrecja IFN γ oraz IL13 po stymulacji 1.0 μ g/ml a.D1 u chorych z AZS bez chorób współistniejących z dodatnim wynikiem testu punktowego na a.D1 raz w grupie kontrolnej – str 47
- Ryc.15b:** Sekrecja IL2 po stymulacji 0.4 μ g/ml a.D1 oraz 1.0 μ g/ml a.D1 u chorych z AZS z dodatnim wynikiem testu punktowego na a.D1 bez chorób współistniejących oraz w grupie kontrolnej – str 47
- Ryc. 16a:** Sekrecja IFN γ oraz IL13 po stymulacji 1.0 μ g/ml a.D1 u chorych tylko z AZS po włączeniu chorych z AZS z chorobami współistniejącymi – str. 50
- Ryc. 16b:** Sekrecja IL2 po stymulacji 0.4 μ g/ml a.D1 u chorych tylko z AZS po włączeniu do grupy chorych z AZS z chorobami współistniejącymi – str. 50
- Ryc. 17a:** Sekrecja IFN γ po stymulacji 0.4 μ g/ml a.D1 oraz 1.0 μ g/ml a.D1 u chorych z AZS z ujemnym D1(-) oraz dodatnim D1(+) wynikiem testu punktowego na a.D1 oraz w grupie kontrolnej – str. 51
- Ryc. 17b:** Sekrecja IL2 po stymulacji 0.4 μ g/ml a.D1 i sekrecja IL13 po stymulacji 1.0 μ g/ml a.D1 u chorych z AZS z ujemnym D1(-) i dodatnim D1(+) wynikiem testu punktowego na a.D1 oraz w grupie kontrolnej -str. 51
- Ryc. 18:** Sekrecja IL13 po stymulacji 0.4 μ g/ml a.D1 oraz IL2 po stymulacji 1.0 μ g/ml a.D1 w grupie chorych z AZS z ujemnym Ni(-) i dodatnim Ni(+) wynikiem testu płatkowego na nikiel oraz w grupie kontrolnej – str. 52
- Ryc. 19:** Sekrecja IFN γ a SCORAD u chorych tylko z AZS bez chorób współistniejących po stymulacji 0.4 μ g/ml a.D1 i 1.0 μ g/ml a.D1 – str. 54
- Ryc. 20:** Sekrecja IFN γ a SCORAD u chorych tylko z AZS bez chorób współistniejących z dodatnim wynikiem testu punktowego na a.D1 po stymulacji 1.0 μ g/ml a.D1. - str. 54
- Ryc.21a:** Spontaniczna sekrecja IL2 oraz IL13 u chorych z AZS z ujemnym D1(-) i dodatnim D1(+) wynikiem testu płatkowego na a.D1 oraz w grupie kontrolnej – str. 56
- Ryc.21b:** Spontaniczna sekrecja IFN γ u chorych z AZS z ujemnym D1(-) i dodatnim D1(+) wynikiem testu płatkowego na a.D1 oraz w grupie kontrolnej – str.56
- Ryc.22a:** Procentowy rozkład sekrecji IFN γ w grupie chorych z AZS i w grupie kontrolnej po stymulacji SEA i SEB – str. 59
- Ryc.22b:** Poziom sekrecji IFN γ u chorych z AZS i w grupie kontrolnej po stymulacji SEA i SEB – str. 59
- Ryc.23:** Sekrecja IFN γ u chorych z AZS + AK, AZS oraz w grupie kontrolnej po stymulacji SEB – str.60
- Ryc.24:** Sekrecja IFN γ po stymulacji SEA u chorych z AZS + AK po dodaniu do grupy pacjentów z AZS + AK +ANN + AA oraz AZS + AK + AP – str. 61
- Ryc. 25a:** Sekrecja IFN γ po stymulacji SEB a SCORAD u chorych z AZS + AK – str. 64
- Ryc. 25b:** Sekrecja IFN γ po stymulacji SEB a SCORAD u chorych z AZS + AK po dodaniu do grupy pacjentów z AZS + AK + ANN + AP lub AZS + AK + ANN + AA lub AZS + AK + ANN + AP – str. 64
- Ryc. 25c:** Sekrecja IFN γ po stymulacji SEA i SEB a SCORAD u chorych z AZS + AK po dodaniu do grupy

pacjenta z AZS + AK + AP – str. 65

Ryc. 26: Sekrecja IFN γ po stymulacji SEB a SCORAD u nosicieli *S. aureus* z AZS – str. 66

Ryc. 27: Sekrecja IL2 po stymulacji SEB u chorych z AZS z ujemnym Ni(-) i dodatnim Ni(+) wynikiem testu płatkowego na nikiel oraz w grupie kontrolnej – str. 67

Ryc. 28: Sekrecja IL2 po stymulacji 25 μ M NiSO $_4$ w fazie zaostrzenia i remisji AZS oraz w grupie kontrolnej – str. 72

Ryc. 29: Sekrecja IL2 u chorych z AZS w fazie zaostrzenia i remisji o niskim SCORAD po stymulacji 25 μ M NiSO $_4$ oraz w grupie kontrolnej – str. 72

Ryc. 30: Zależność pomiędzy sekrecją IL13 po stymulacji 25 μ M NiSO $_4$ a nasileniem testu płatkowego u chorych z AZS z kontaktową alergią niklową – str. 73

Ryc. 31: Zależność sekrecji IFN γ po stymulacji 25 μ M siarczanem niklu a stężenie tIgE u chorych z AZS z wysokim stężeniem surowiczej IgE – str. 74

Ryc. 32: Sekrecja IFN γ po stymulacji 0.4 μ g/ml a.D1 u chorych z AZS o wysokim SCORAD w zaostrzeniu, remisji oraz kontroli – str. 76

Ryc. 33: Sekrecja IFN γ po stymulacji 1.0 μ g/ml a.D1 w fazie zaostrzenia i remisji u chorych z AZS z asIgE D1 i kontroli – str. 77

Ryc. 34a: Sekrecja IL13 po stymulacji SEB w fazie zaostrzenia, remisji AZS oraz w grupie kontrolnej – str. 78

Ryc. 34b: Sekrecja IL2 po stymulacji SEB w fazie zaostrzenia, remisji AZS oraz w grupie kontrolnej – str. 78

Ryc. 35: Zależność pomiędzy obecnością przeciwciał asIgE SEB a sekrecją IL2 po stymulacji SEB w fazie remisji AZS – str. 80

Ryc. 36: Sekrecja IL13 po stymulacji SEB w fazie zaostrzenia, remisji, kontroli u nosicieli *S. aureus* – str. 81

Ryc. 37: Zależność pomiędzy wynikiem testu płatkowego na nikiel, a sekrecją IL2 po stymulacji 0.4 μ g/ml antygeny D1 *Dermatophagoides pteronyssinus* w fazie remisji AZS – str. 82

Ryc. 38: Zależność pomiędzy nasileniem testu płatkowego na nikiel, a sekrecją IL13 po stymulacji SEB u chorych z AZS z kontaktową alergią niklową – str. 83

Ryc. 39: Sekrecja IL13 po symulacji SEB w fazie zaostrzenia, remisji oraz w grupie chorych z AZS bez kontaktowej alergii niklowej i w grupie kontrolnej – str. 84

X. PIŚMIENICTWO

1. Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112: S128-S139.
2. Hawro T, Sysa-Jędrzejowska A, Narbutt J. Rola mutacji w genie filagryny w etiopatogenezie atopowego zapalenia skóry. *Przegląd Piśmiennictwa. Post Dermatol Alergol* 2008; XXV (1):12-15.
3. Marenholz I, Nickel R, Rüschenhoff F i wsp. Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118(4):866-871.
4. Duczmal E, Bręborowicz A, Duczmal T. Marsz alergiczny w okresie dzieciństwa. *Post Dermatol Alergol* 2010; XXVII(4): 231-237.
5. Hoffjan S, Epplen JT. The genetics of atopic dermatitis: recent findings and future options. *J Mol Med* 2005; 83: 682-694.
6. Walley AJ, Chavanas S, Moffatt MF i wsp. Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nat Genet* 2001; 29: 175-178.
7. Bradley M, Soderhall C, Wahlgren CF i wsp. The Wiskott-Aldrich total genome-scan for susceptibility genes in AD. *Acta Derm Venereol* 2001; 81: 340 – 342.
8. Kim BE, Leung DYM, Boguniewicz M i wsp. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clin Immunol* 2008; 126(3): 332–337.
9. Allam JP, Novak N. The pathophysiology of atopic eczema. *Clin Exp Dermatol* 2006; 31(1): 89-93.
10. Cox HE, Moffatt MF, Faux JA i wsp. Association of atopic dermatitis to the beta subunit of the high affinity immunoglobulin E receptor. *Br J Dermatol* 1998; 138(1): 182–187.
11. Cookson WO, Moffatt MF. The genetics of atopic dermatitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 2:383-387.
12. 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.
13. Novak N, Bieber T. FcεRI- Toll-like receptor interaction in atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol* 2011; 41: 47-53.
14. Nickel RG, Casolaro V, Wahn U i wsp. Atopic Dermatitis is Associated with a Functional Mutation in the Promoter of the C-C Chemokine RANTES. *J Immunol* 2000 164(3): 1612-1616.
15. Bradley M, Söderhäll C, Luthman H i wsp. Susceptibility loci for atopic dermatitis on chromosomes 3, 13, 15, 17 and 18 in a Swedish population *Hum Mol Genet* 2002; 11(13): 1539-1548.
16. Coleman R, Trembath RC, HARPER JI. Genetic studies of atopy and atopic dermatitis. *Brit J Dermatol* 1997; 136(1): 1-5.
17. Kato A. Association of SPINK5 gene polymorphisms with atopic dermatitis in the Japanese population. *Br J Dermatol*. 2003;148: 665-669.
18. Czarnecka-Operacz M. Współczesne poglądy na etiopatogenezę atopowego zapalenia skóry. *Alergia* 2011; 3: 29-34.
19. Seguchi T, Chang-Yi C, Kusuda S i wsp. Decreased expression of filaggrin in atopic skin. *Arch Dermatol Res* 1996; 288(8): 442-446.
20. Sator PG, Schmidt JB, Honigsmann H. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48: 352-358.
21. Gao PS, Rafaels NM, Hand T i wsp. Filaggrin mutations that confer risk of atopic dermatitis confer greater risk for eczema herpeticum. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(3): 507–513.
22. Novak N, Baurecht H, Torsten S i wsp. Loss-of-Function Mutations in the Filaggrin Gene and Allergic Contact Sensitization to Nickel. *J Invest Dermatol* 2008; 128:1430–1435.
23. Pilgram GS, Vissers DC, van der Meulen H I wsp. Abberant lipid organization in stratum corneum of patients with atopic dermatitis and lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol* 2001; 117(3): 710-717.
24. Imokawa G. A possible mechanism underlying the ceramide deficiency in atopic dermatitis: expression of a deacylase enzyme that cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide. *J Dermatol Sci* 2009; 55(1): 1-9.
25. Wirth H, Gloor M, Stoika D. Sebaceous glands in uninvolved skin of patients suffering from atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1981; 270(2): 167-169.

26. 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; 61:969-987.
27. Wong SS, Edwards C, Marks R. A study of white dermographism in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*. 1996; 11(2): 148-153.
28. Novak N, Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112: 252-26.
29. 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: 969-987.
30. Elias PM, Steinhoff M. "Outside-to-Inside" (and Now Back to "Outside") Pathogenic Mechanisms in Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 1067–1070.
31. Pilgram GSK, Vissers DCJ, van der Meulen H i wsp. Aberrant Lipid Organization in Stratum Corneum of Patients with Atopic Dermatitis and Lamellar Ichthyosis. *J Invest Dermatol*. 2001;117: 710–717.
32. Novak N, Kraft, S, Bieber, T. Unraveling the mission of FcepsilonRI on antigen-presenting cells. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 38-44.
33. Leung DY. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 105: 860-876.
34. Atopic dermatitis pod red. Thomas Bieber, Donald Y.M. Leung, str. 130. Master e-book ISBN 0-203-90887-2.
35. Rogala B, Rymarczyk B. Soluble CD23 in allergic diseases. *Arch Immunol Ther Exp* 1999; 47(4): 251-255.
36. Sallusto F, Lenig D, Förster R i wsp. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401(6754):708-712.
37. Yamanaka K, Mizutoni H. The role of cytokines/chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol* 2011; 41: 80-92.
38. Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DY. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest* 1994; 94: 870-876.
39. Oh MH, Oh SY, Yu J i wsp. IL-13 induces skin fibrosis in atopic dermatitis by thymic stromal lymphopoietin. *Immunol*. 2011;186(12):7232-7242.
40. Novak N. i wsp. Evidence for a differential expression of the FcepsilonRIgamma chain in dendritic cells of atopic and nonatopic donors. *J Clin Invest* 2003;111: 1047-1056.
41. Santamaria Babi LF, Picker LJ, Perez Soler MT 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.
42. Berg EL, Yoshino, Rott LS i wsp. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med*. 1991; 174(6): 1461-1466.
43. Brandt EB, Sivaprasad M. Th2 cytokines and atopic dermatitis. *J Clin Cell Immunol* 2011; 2(3):110-114.
44. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M i wsp. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155(3): 1151-1164.
45. Tode M, Leung DY, Molet S i wsp. Polarized in vivo expression of IL11 and IL17 between acute and chronic skin lesions. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111: 875-881.
46. Warner JA, Miles EA, Jones AC i wsp. *Clin Exp Allergy* 1994; 24(5): 423-430.
47. Warner JA, Miles EA, Jones AS i wsp. Is deficiency of interferon gamma production by allergen triggered cord blood cells a predictor of atopic eczema? *Clin Exp Allergy* 1994; 24(5): 423-430.
48. Akdis M, Trautmann A, Klunker S i wsp. T helper (Th) 2 predominance in atopic diseases is due to preferential apoptosis of circulating memory/effector Th1 cells. *FASEB J* 2003; 17(9): 1026-1035.
49. Szegedi A, Barath S, Nagy G i wsp. Regulatory T cells in atopic dermatitis: epidermal dendritic cell clusters may contribute to their local expansion. *Br J Dermatol* 2009; 160: 984-993.
50. Geunwoong N, Lee JH. Regulatory B Cells and Allergic Diseases. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2011; 3(3): 168–177.
51. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P i wsp. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol*. 2009; 21: 1105-1111.

52. Kubo M, Inoue H. Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in Th2 cells evokes Th2 cytokines, IgE, and eosinophilia. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2006; 6(1): 32-39.
53. Pestka S, Kotenko SV, Muthukumar G i wsp. The interferon gamma (IFN γ) receptor: a paradigm for the multichain cytokine receptor. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8(3): 189-206.
54. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T i wsp. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004; 75(2):163-89.
55. Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y i wsp. Interleukin 18 (IFN γ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 β via TNF α production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 1998; 101(3): 711-721.
56. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 2007; 96: 41-101.
57. Lee YJ, Han Y, Lu HAT i wsp. TGF-beta suppresses IFN-gamma induction of class II MHC gene expression by inhibiting class II transactivator messenger RNA expression. *J Immunol*. 1997; 158: 2065-2075.
58. Hu X, Li WP, Neng C i wsp. Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticosteroids. *J Immunol* 2003;170(9): 4833-4839.
59. Minami Y, Kono T, Miyazaki T. The IL2 receptor complex: its structure, function and target genes. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 245-268.
60. Mills GB, Schmandt R, Gibson S i wsp. Transmembrane signaling by the interleukin-2 receptor: progress and controversies. *Semin Immunol* 1993; 5(5): 345-364.
61. Sharma R, Fu SM, Ju ST. IL2: a two-faced master regulator of autoimmunity. *J Autoimmun* 2011; 36(2): 91-97.
62. Dai Z, Konieczny BT, Lakkis FG. The dual role of IL-2 in the generation and maintenance of CD8+ memory T cells. *J Immunol* 2000; 165(6): 3031-3036.
63. Murata T, Obiri NI, Puri RK. Structure of and signal transduction through interleukin-4 and interleukin-13 receptors. *Int J Mol Med*. 1998; 1(3): 551-557.
64. Myrtek D, Knoll M, Matthies T i wsp. Expression of interleukin-13 receptor α 1-subunit on peripheral blood eosinophils is regulated by cytokines. *Immunology* 2004; 112(4): 597-604.
65. Newcomb DC, Boswell MG, Zhou W i wsp. Human Th17 cells express a functional IL-13 receptor and IL-13 attenuates IL-17A production. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127(4): 1006-1013.
66. Aheng H, Hajoui O, Fawaz LM i wsp. Expression of IL13 receptor alpha 1 in human B cells committed to produce IgE. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113(2): 353-357.
67. Zhao Y, He D, Zhao J i wsp. Lysophosphatidic Acid Induces Interleukin-13 (IL-13) receptor 2 expression and inhibits IL13 signaling in primary human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem* 2007; 282(14): 10172-10179.
68. Wynn TA. IL13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 425-456.
69. Petti CA, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis. *Infect Dis Clin North Am*. 2002; 16(2): 413-435.
70. Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF i wsp. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. *Clin Infect Dis* 2005; 41:1373-1406.
71. Jappe U, Heuck D, Strommenger B i wsp. *Staphylococcus aureus* in dermatology in outpatients with special emphasis on community-associated methicillin-resistant strains. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2655-2664.
72. Lever R. Infection in atopic dermatitis. *Curr Opin Pediatr* 2003;15:399-404.
73. Bunikowska R, Mielke M, Skarabis H i wsp. Evidence for a disease promoting effect of *Staphylococcus aureus* – derived exotoxins in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 814-819.
74. Rippke F, Schreiner V, Doering T. Stratum corneum pH in atopic dermatitis: impact on skin barrier function and colonization with *Staphylococcus aureus*. *Am J Clin Dermatol* 2004; 5(4): 217-223.
75. Miajlovic H, Fallon PG, Irvine AD i wsp. Effect of filaggrin breakdown products on growth of and protein expression by *Staphylococcus aureus*. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126(6): 1184-1190.
76. Piroth L, Que YA, Widmer E i wsp. The Fibrinogen- and Fibronectin-Binding Domains of *Staphylococcus aureus* Fibronectin-Binding Protein A Synergistically Promote Endothelial Invasion and Experimental Endocarditis. *Infect Immun* 2008; 76(8): 3824–3831.
77. Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H i wsp. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J Clin Invest* 1992; 90(4): 1479–1485.
78. 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.

79. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(1): 16-34.

80. McFadden JP, Noble WC, Camp RDR. Superantigenic exotoxin-secreting potential of staphylococci isolated from atopic eczematous skin. *Br J Dermatol* 2000; 128: 631-632.

81. Hadley IS, Wang IE, Foster SI i wsp. Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* Upregulates Monocyte Expression of CD14, Toll-Like Receptor 2 (TLR2), and TLR4 in Human Blood: Possible Implications for Priming of Lipopolysaccharide Signaling *Infect Immun* 2005; 73 (11): 7613-7619.

82. Labrecque N, Thibodeau J, Sékaly RP. Interactions between staphylococcal superantigens and MHC class II molecules. *Semin Immunol* 1993; 5(1): 23-32.

83. Pontzer CH, Russell JK, Johnson HM. Structural basis for differential binding of staphylococcal enterotoxin A and toxic shock syndrome toxin 1 to class II major histocompatibility molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(1): 125-128.

84. Tokura Y, Yagi J, O'Malley J i wsp. Superantigenic Staphylococcal Exotoxins Induce T-Cell Proliferation in the Presence of Langerhans Cells or Class II-Bearing Keratinocytes and Stimulate Keratinocytes to Produce T-Cell-Activating Cytokines. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 31-38.

85. Escotte S, Al Alam D, Le Naour R i wsp. T Cell Chemotaxis and Chemokine Release after *Staphylococcus aureus* Interaction with Polarized Airway Epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34(3): 348-354.

86. Walsh GA, Richards KL, Douglas SD i wsp. Immunoglobulin E anti-*Staphylococcus aureus* antibodies in atopic patients. *J Clin Microbiol* 1981; 13(6): 1046-1048.

87. Bieneman AP, Chichester KL, Chen YH i wsp. Toll-like receptor 2 ligands activate human basophils for both IgE-dependent and IgE-independent secretion. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115(2): 295-301.

88. Dar SA, Das S, Bhattacharya SN i wsp. Possible role of superantigens in inducing autoimmunity in pemphigus patients. *J Dermatol* 2011; 38(10): 980-987.

89. Friedman SM, Posnett DN, Tumang JR i wsp. A potential role for microbial superantigens in the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Arthritis Rheum*. 1991; 34(4): 468-480.

90. Leung DY, Gately M, Trumble A i wsp. Bacterial superantigens induce T cell expression of the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen, via stimulation of interleukin 12 production. *J Exp Med* 1995; 181(2): 747-753.

91. Yoshino T, Asada H, Sano S i wsp. Impaired responses of peripheral blood mononuclear cells to staphylococcal superantigen in patients with severe atopic dermatitis: a role of T cell apoptosis. *J Invest Dermatol* 2000; 114(2): 281-288.

92. Ou LS, Goleva E, Hall C i wsp. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113(4): 756-763.

93. Niebuhr M, Langnickel J, Draing C i wsp. Dysregulation of toll-like receptor-2 (TLR-2)-induced effects in monocytes from patients with atopic dermatitis: impact of the TLR-2 R753Q polymorphism. 2008; *Allergy* 63(6): 728-734.

94. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 2003; 85(2): 85-95.

95. Solarz K. Risk of exposure to house dust pyroglyphid mites in Poland. *Ann Agric Environ Med* 2001; 8: 11-24.

96. Nuttall TJ, Hill PB, Bensignor E i wsp. House dust and forage mite allergens and their role in human and canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2006; 17: 223-235.

97. Platts-Mills TA, Thomas WR, Aalberse RC i wsp. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. Association of Allergology and Clinical Immunology *J Allergy Clin Immunol*. 1992; 89:1046-1060.

98. Arlian LG, Platts-Mills TA. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(3): 406-413.

99. Darsow U, Ring J. Airborne and dietary allergens in atopic eczema: a comprehensive review of diagnostic tests. *Clin Exp Dermatol* 2000; 25: 544-551.

100. Wan H, Winton HL, Soeller C i wsp. Derp1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* 1999; 104(1): 123-133.

101. Chavanas S, Bodemer C, Rochat A i wsp. Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat Genet* 2000; 25: 141-142.

- ¹⁰². Arlian LG, Elder BL, Morgan MS. House Dust Mite Extracts Activate Cultured Human Dermal Endothelial Cells to Express Adhesion Molecules and Secrete Cytokines. *J Med Entomol.* 2009; 46(3): 595–604.
- ¹⁰³. Boasen J, Chisholm D, Lebet L. House dust extracts elicit Toll-like receptor dependent dendritic cell responses. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 185–191.
- ¹⁰⁴. Arlian LG, Morgan MS, Peterson KT. House dust and storage mite extracts influence skin keratinocyte and fibroblast function. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 145: 33–42.
- ¹⁰⁵. Stewart GA, Boyd SM, Bird CH. Immunobiology of the serine protease allergens from house dust mites. *Am J Ind Med* 1994; 25: 105–107.
- ¹⁰⁶. 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: 1327–1335.
- ¹⁰⁷. Lee JS, Kim IS, Ryu JS i wsp. House dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, increases expression of MCP-1, IL-6, and IL-8 in human monocytic THP-1 cells. *Cytokine* 2008; 42: 365–371.
- ¹⁰⁸. Kalsheker NA, Deam S, Chambers L i wsp. The house dust mite allergen Derp1 catalytically inactivates alpha 1 antitrypsin by specific reactive centre loop cleavage that promotes airway inflammation and asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221(1): 59-61.
- ¹⁰⁹. Hewitt CR, Brown AP, Hart BJ i wsp. A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases. *J Exp Med* 1995; 182: 537–1544.
- ¹¹⁰. Schulz O, Sewell HF, Shakib F. Proteolytic cleavage of CD25, the alpha subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J Exp Med* 1998; 187: 271–275.
- ¹¹¹. Red CE, Kita HJ. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 997-1008.
- ¹¹². Schechter NM, Brass LF, Lavker RM i wsp. Reaction of mast cell proteases tryptase and chymase with protease activated receptors (PARs) on keratinocytes and fibroblasts. *J Cell Physiol* 1998; 176: 365-373.
- ¹¹³. Asokanathan N, Graham PT, Stewart DJ i wsp. House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: The cysteine protease allergen, Derp1, activates protease-activated receptor (PAR-2) and inactivates PAR-1. *The Journal of Immunology* 2002 169; 4572-4578.
- ¹¹⁴. Anoszczyk G, Obtułowicz K. Systemowe działanie niklu. *Post Dermatol. Alergol* 2005; 22: 29–36.
- ¹¹⁵. Spiewak R, Pietowska J, Curzytek K. Nickel: a unique allergen – from molecular structure to European legislation *Expert Rev Clin Immunol* 2007; 3(6): 851-859.
- ¹¹⁶. Uter W, Pfahlberg A, Gefeller O i wsp. Risk factors for contact allergy to nickel – results of a multifactorial analysis. *Contact Derm* 2003; 48: 33-38.
- ¹¹⁷. Mortz CG, Lauritsen JM, Bindslev-Jensen C i wsp. Nickel sensitization in adolescents and association with ear piercing, use of dental braces and hand eczema. *The Odense Adolescence Cohort Study on Atopic Diseases and Dermatitis (TOACS).* *Acta Derm Venereol* 2002; 82: 359-364.
- ¹¹⁸. Linneberg A, Nielsen NH, Menne T i wsp. Smoking might be a risk factor for contact allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 980-984.
- ¹¹⁹. Spiewak R. Atopy and contact hypersensitivity: a reassessment of the relationship using objective measures. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005; 95: 61-65.
- ¹²⁰. Uter W, Hegewald J, Aberer W i wsp. The European standard series in 9 European countries, 2002/2003 – first results of the European Surveillance System on Contact Allergies. *Contact Derm.* 2005; 53: 136-145.
- ¹²¹. Meth MJ, Sperber KE: Phenotypic diversity in delayed drug hypersensitivity: an immunologic explanation. *Mt Sinai J. Med* 2006; 73: 769-774.
- ¹²². Friedmann PS. Contact sensitization and allergic contact dermatitis: immunobiological mechanisms. *Toxicol Lett.* 2006; 162: 49-54.
- ¹²³. Toebak MJ, Pohlmann PR, Sampat-Sardjoepersad SC i wsp. CXCL8 secretion by dendritic cells predicts contact allergens from irritants. *Toxicol. In vitro* 2006; 20: 117-124.
- ¹²⁴. Friedmann PS. Contact sensitization and allergic contact dermatitis: immunobiological mechanisms. *Toxicol Lett.* 2006; 162: 49-54.
- ¹²⁵. Vollmer J, Weltzien HU, Moulon C. TCR reactivity in human nickel allergy indicates contacts with complementarity – determining region 3 but excludes superantigen-like recognition. *J Immunol* 1999; 163: 2723-2731.
- ¹²⁶. Schmidt M, Raghaven B, Müller V i wsp. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development

of contact allergy to nickel. *Nat Immun* 2010; 11: 814-819.

¹²⁷Gangemi S, Ricciardi L, Minciullo PL i wsp. Serum levels of protein oxidation products in patients with nickel allergy. *czasopismo*¹²⁷.Gangemi S, Ricciardi L, Minciullo PL i wsp. Serum levels of protein oxidation products in patients with nickel allergy. *Allergy Asthma Proc.* 2009; 30(5):552-557.

¹²⁸Czarnobilska E, Obtulowicz K, Wsołek K. Reakcja alergiczna typu IV i jej podtypy. *Przeg Lek* 2007; 64(7-8): 506-508.

¹²⁹ Meiller F, Klunker S, Zimmermann M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 2008; 63(11): 1455-1461.

¹³⁰ Rustemeyer T, von Blomberg B, van Hoogstraten I. Analysis of effector and regulatory immune reactivity to nickel. *Clin Exp Allergy* 2004;34: 1458- 1466.

¹³¹ Czarnobilska E, Jenner B, Kaszuba-Zwoińska J i wsp. Contact allergy to nickel: patch test score correlates with IL-5, but not IFN-gamma nickel-specific secretion by peripheral blood lymphocytes. *Ann Agric Environ Med.* 2009; 16(1): 37-41.

¹³² Rudzki E., Chlebus E., Szmurło A i wsp. Doustne podawanie metali jako metoda wykrywania przyczyn wyprysku kontaktowego. *Przeg Dermatol* 1991; 2: 85-87.

¹³³ Van Moren WWC, Jacobs JFM, de Vries JM i wsp. Toll-like receptor signalling on T regs: to suppress or not to suppress? *Immunology* 2008; 124(4): 445-452.

¹³⁴ Akdis CA. New insights into mechanisms of immunoregulation in 2007. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 700-709.

¹³⁵ Sager N, Feldman A, Schilling G i wsp. House dust mite-specific T cells in the skin of subjects with atopic dermatitis: frequency and lymphokine profile in the allergen patch test. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 801-810.

¹³⁶ Bebi LFS, Picker LJ, Perez Soler MT 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: 1935-1940.

¹³⁷ Maeurer M, Zitvogel L, Elder E i wsp. Human intestinal V delta 1+ T cells obtained from patients with colon cancer respond exclusively to SEB but not to SEA. *Nat Immun* 1995;14(4): 188-197.

¹³⁸ El Safty AMK, Metwaly FM, Rashol HM i wsp. Susceptibility to infection among nickel electroplaters. *J Am Science* 2009; 5(3): 74-82.

¹³⁹ Hocevar BA, Brown TL, Howe PH. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J* 1999; 18(5): 1345-1356.

¹⁴⁰ Mollerup S, Rivedal E, Mæhle L i wsp. Nickel(II) induces alterations in EGF- and TGF-beta 1-mediated growth control during malignant transformation of human kidney epithelial cells. *Carcinogenesis* 1996; 17(2): 361-367.

¹⁴¹ Beckers HJ, van Leusden FM, Tips PD. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in shrimp. *J Hyg Camb* 1985; 95: 685-693.

¹⁴² Antúnez C, Torres MJ, Mayorga C i wsp. Cytokine production, activation marker, and skin homing receptor in children with atopic dermatitis and bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2006; 17(3): 166-174