

**KLINICZNE ZNACZENIE WARIANTÓW POLIMORFICZNYCH
GENU IL-33 U CHORYCH Z ZIARNINIAKIEM GRZYBIASTYM**

ALICJA RUSTOWSKA - ROGOWSKA

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor:

dr hab. n. med. Małgorzata Sokołowska-Wojdyło, prof. nadzw. GUMed

Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

GDAŃSK 2017

Finansowane z grantu Polskiego Towarzystwa Onkologicznego nr PTO 07-0030

Pragnę podziękować

prof. dr hab. n. med. Małgorzata Sokołowska-Wojdyło, prof. nadzw. GUMed.

prof. dr hab. med. Romanowi Nowickiemu

Pani Docent Aleksandrze Wilkowskiej

Dr. N. med. Jolancie Gleń

Rodzinie, Mamie, Siostrze i Mężowi

Koleżankom i kolegom z pracy

1 Spis treści

1	Spis treści.....	3
2	Indeks skrótów	5
3	Wstęp	6
3.1	Ziarniniak grzybiasty – historia	6
3.2	Etiologia ziarniniaka grzybiastego	7
3.3	Epidemiologia ziarniniaka grzybiastego	8
3.4	Genetyka ziarniniaka grzybiastego.....	9
3.5	Immunologia ziarniniaka grzybiastego.....	9
3.6	Pierwotne chłoniaki skóry – klasyfikacja.....	10
3.7	Klasyfikacja chłoniaków pierwotnie skórnych z komórek T wg WHO-EORTC.....	11
3.8	Odmiany kliniczne ziarniniaka grzybiastego.....	12
3.9	Obraz histopatologiczny ziarniniaka grzybiastego	15
3.10	Leczenie ziarniniaka grzybiastego	15
3.11	Interleukina 33	18
3.12	Jądrowa postać IL-33	19
3.13	Funkcje IL-33.....	19
3.14	Receptor ST2	21
3.15	Rola szlaku sygnałowego IL-33/ST2 w chorobach zapalnych	22
3.16	Polimorfizmy genu IL-33.....	23
4	Cele pracy	24
5	Materiał i metodyka	24
5.1	Izolacja genomowego DNA.....	25
5.2	Badania molekularne.....	25
5.3	Badanie poziomu IL-33 w surowicy	27
5.4	Badanie poziomu receptora ST2 (IL1RL1) w surowicy	29
6	Analiza statystyczna	30
7	Wyniki.....	31
7.1	Ogólna charakterystyka pacjentów i osób zdrowych.....	31
7.2	Analiza poziomów IL-33 i receptora ST2	31
7.3	Analiza genotypów SNP w locus 9894 i 11877 genu IL-33	32
7.4	Analiza poziomów IL-33 i receptora ST2 w zależności od genotypu.....	36
7.5	Analiza poziomów IL-33 i receptora ST2 w zależności od stadium ziarniniaka grzybiastego	45
7.6	Analiza nasilenia świądu w zależności od genotypów SNP	49

7.7	Analiza częstości występowania genotypów SNP w zależności od stadium ziarniniaka grzybiastego	52
7.8	Poziomy IL-33 i receptora ST2 w zależności od genotypu dla poszczególnych stadiów ziarniniaka grzybiastego	58
8	Dyskusja.....	63
8.1	Ocena, czy warianty polimorficzne – 9894 T/C i 11877 C/T – genu IL-33 odpowiadają za odmienny przebieg ziarniniaka grzybiastego oraz czy mogą stanowić czynnik prognostyczny choroby 65	
8.2	Ocena wartości rokowniczej stężenia IL-33 w surowicy w ziarniniaku grzybiastym	66
8.3	Ocena znaczenia IL-33 w patogenezie świądu u chorych z ziarniniakiem grzybiastym	70
9	Wnioski	72
10	Streszczenie po polsku	73
11	Streszczenie po angielsku	76
12	Piśmiennictwo	79

2 Indeks skrótów

- 9894 T/C – polimorfizm pojedynczego nukleotydu zlokalizowany w intronie 3 genu IL-33
- 11877 C/T – polimorfizm pojedynczego nukleotydu zlokalizowany w egzonie 5 genu IL-33
- ARMS-PCR – allelospecyficzna łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction*)
- CBCL – chłoniak pierwotnie skórny B-komórkowy (ang. *cutaneous B-cell lymphoma*)
- CD4+ – limfocyty T o fenotypie CD4+
- CD8+ – limfocyty T o fenotypie CD8+
- CTCL – chłoniak pierwotnie skórny T-komórkowy (ang. *cutaneous T-cell lymphoma*)
- DVS 27 – pierwotne oznaczenie interleukiny 33 nazwą kolonu, którego cDNA, który wykazywał największą ekspresję w bibliotece genów wyizolowanej z tętnicy mózgowej
- INF γ – interferon γ
- IL-5 – interleukina 5
- IL-10 – interleukina 10
- IL-13 – interleukina 13
- IL-33 – interleukina 33
- MF – ziarniniak grzybiasty (ang. *mycosis fungoides*)
- NHL – chłoniak nieziarniczny (ang. *non-Hodgkin lymphoma*)
- rST2 – receptor ST2
- SE – enterotoksyny gronkowcowe (ang. *staphylococcal enterotoxins*)
- SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*)
- spIL-33 – aktywny molekularnie wariant IL-33
- SS – zespół Sézary'ego (ang. *Sezary syndrome*)
- sST2 – wydzielnicza, rozpuszczalna postać receptora ST2
- ST2 – receptor ST2
- ST2L – przezbłonowa postać receptora ST2
- T_{cm} – limfocyty T pamięci (ang. *central memory T cells*)
- T_{em} – limfocyty T efektorowe (ang. *effector memory T cells*)
- TNF α – czynnik martwicy nowotworu α , czynnik martwicy guza α (ang. *tumor necrosis factor α*)
- TNMB – klasyfikacja nowotworów zależna od stopnia zajęcia skóry, węzłów chłonnych, narządów wewnętrznych i krwi (ang. *tumor, node, metastasis, blood*)

3 Wstęp

Ziarniniak grzybiasty (MF, *mycosis fungoides*) jest najczęstszym chłoniakiem pierwotnie skórny wywodzącym się z komórek T (CTCL, ang. *cutaneous T-cell lymphoma*). CTCL są heterogenną grupą chłoniaków pozawęzłowych z limfocytów T, typu nie-Hodgkina (NHL, ang. *non-Hodgkin lymphoma*), które w momencie postawienia diagnozy i oceny stopnia zaawansowania z definicji ograniczone są tylko do skóry. Najczęstszą odmianą CTCL (70%) jest MF, którego częstość występowania szacuje się na 0,36/100 000 osób rocznie. Charakteryzuje się on niską złośliwością oraz przewlekłym przebiegiem, w którym wyróżnia się okresy typowe dla choroby z uwzględnieniem jej rokowania. Schorzeniu temu towarzyszy świąd, który pojawia się często już w okresie wstępnym choroby i nasila się w miarę jej postępu. Objaw ten może jednak wyprzedzać pojawienie się zmian skórnych, jak również sygnalizować nawrót choroby.

MF wywodzi się najczęściej z komórek T pamięci CD4+, które wykazują potencjał do naciekania skóry. Komórki te stwierdza się również w skórze pacjentów z przewlekłymi zapalnymi chorobami skóry, co ze względu na podobieństwo obrazu klinicznego tych schorzeń i MF jest przyczyną istotnych trudności diagnostycznych. Etiopatogeneza MF nadal nie została wyjaśniona. Wysunięto hipotezę, że ciągła stymulacja komórek T może doprowadzić do przewlekłego stanu zapalnego, który w efekcie prowadzi do powstania złośliwego klonu T-komórkowego. Czynniki genetyczne, środowiskowe, infekcyjne, wirusowe, substancje toksyczne oraz leki (np. hydrochlorotiazyd) mogą wyzwać aktywację lub transformację limfocytów, prowadząc do rozwoju MF (Akinbami i wsp., 2014).

3.1 Ziarniniak grzybiasty – historia

Ziarniniak grzybiasty po raz pierwszy opisał w 1806 roku francuski lekarz, baron Jean Louis Alibert, który zaobserwował u 56-letniego mężczyzny zmiany skórne o charakterze guzowatym przypominające grzyby. W 1870 Bazin wprowadził typowe dla MF okresy choroby: rumieniowy, naciekowy i guzowaty (Bazin, 1870). W 1975 roku Lutzner i Edelson wprowadzili określenie CTCL.

XX wiek to czas tworzenia klasyfikacji chłoniaków i chłoniaków rzekomych. Pierwszą klasyfikacją, która ujęła chłoniaki skóry, była klasyfikacja Rappaporta (Tabela 1).

Tabela 1. Kolejne klasyfikacje uwzględniające chłoniaki pierwotnie skórne.

Rok	Klasyfikacja
1956, 1966	Rappaporta
1971	Ann Arbor
1973, 1975	Lukasa i Collinsa
1974	Kilońska
1974	Brytyjska
1974	Dorfmana
1975	Europejska
1976	Lyońska
1976	WHO
1977	Stanfordzka
1979	CTCL
1980	Polska szkoła
1982	International Working Formulation
1988	Unowocześniona kilońska
1993	REAL
1997	EORTC
2005	WHO-EOTRC pierwotnych chłoniaków skóry
2008, 2010	WHO/EORTC z 2008, zmodyfikowana w 2010 roku

Klasyfikacja WHO/EORTC z 2008, zmodyfikowana w 2010 roku, dzieli chłoniaki na wywodzące się z komórek T i NK oraz z komórek B (nowotwór z komórek prekursorowych został w 2010 roku przeniesiony do grupy rozrostów szpiku).

3.2 Etiologia ziarniniaka grzybiastego

Przyczyny rozwoju MF nie zostały ostatecznie wyjaśnione. W jego patogenezie nie udowodniono wpływu czynników środowiskowych czy zawodowych, takich jak substancje chemiczne i rozpuszczalniki (Wilcox, 2014), choć wcześniej uznawano związek z kontaktem zawodowym (produkcja szkła, ceramiki, przemysł papierniczy) (Morales-Suárez-Varela i wsp., 2004; Whittemore i wsp., 1989).

Podobieństwo MF do białaczki T-komórkowej dorosłych związanej z obecnością wirusa HTLV1 skłoniło do rozszerzenia badań o podłoże wirusowe w rozwoju CTCL. W badaniach amerykańskich w komórkach krwi obwodowej oraz wycinkach skóry chorych z MF wykryto cząsteczki wirusa HTLV1 i HTLV2, podkreślając, że nie można wykluczyć ich roli przy współtworzeniu w procesie nowotworowym (Zendri i wsp., 2008). W innych badaniach nie stwierdzono jednak związku pomiędzy MF i zakażeniem HTLV1 (Cournaud i wsp., 2009).

Obecność wirusa Epsteina-Barr (EBV) w ogniskach ziarniniaka grzybiastego została stwierdzona w małym odsetku przypadków, jednak zwrócono uwagę na związane z tym gorsze rokowanie (Novelli i wsp., 2009).

Bakteryjne superantygeny, np. gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*), również mogą stanowić przyczynę ciągłej stymulacji komórek T (Vonderheid i wsp., 2005). Być może rolę w tym procesie odgrywają również enterotoksyny ww. gronkowca (SE, ang. *staphylococcal enterotoxins*), które oddziałują na porozumienie między komórkami T nowotworowymi i zapalnymi,

promują proliferację nowotworu, aktywują Stat3 i ekspresję cytokin regulowanych przez Stat3 w limfocytach nowotworowych. Stat3 indukuje stałą ekspresję SOCS3 (ang. *suppressor of cytokine signaling-3*), co moduluje aktywność licznych cytokin, w tym IFN γ i IFN α , a w konsekwencji chroni komórki nowotworowe przed przeciwnowotworową odpowiedzią mediowaną przez cytokiny. Znajomość tych mechanizmów wspiera tezę o konieczności unikania immunosupresji u pacjentów z CTCL, gdyż ta, promując rozwój populacji *S. aureus*, powoduje progresję choroby (Krejsgaard i wsp., 2017; Talpur i wsp., 2008).

Odkrycie powyższych mechanizmów pozwala przypuszczać, że istnieją również inne patogeny wpływające na środowisko tkankowe chłoniaka i mogące promować jego rozwój i progresję. Także sam proces przejścia nowotworu w stadium zaawansowane może sprzyjać rozwojowi infekcji, co być może tworzy swoiste koło nakręcające proces progresji. Interesujące są wyniki badań nad obecnością *Chlamydia pneumoniae* w późnych stadiach CTCL, co może być tłumaczone przejściem, wraz z progresją, z dominacji Th1 do Th2 i supresją układu immunologicznego w miarę postępu choroby (dzięki uprzejmości Nedoszytko i wsp. Praca ADA-00844-2017-02 „Presence of Chlamydia pneumoniae DNA in blood cells is frequent event in patients with late stage of Primary Cutaneous Lymphomas and with atopic dermatitis” zaakceptowana do druku w *Advances in Dermatology and Allergology*, przyjęta do druku i zaplanowana do publikacji w nr 3 roku 2018).

Ostatnie badania wskazują, że niektóre leki mogą doprowadzić do stymulowanej antygenem limfoproliferacji komórek T lub zjawiska dyskrazji. Przeprowadzono badania u pacjentów z ziarniniakiem grzybiastym/zespołem Sézary’ego (SS, ang. *Sezary syndrome*) przyjmujących hydrochlorotiazyd z powodu nadciśnienia tętniczego i uzyskane wyniki porównano z wynikami pacjentów z MF/SS, którzy nie stosowali tego leku. U pacjentów przyjmujących hydrochlorotiazyd stwierdzono mniejsze prawdopodobieństwo rearanżacji klonalnej w genie TCR w zmianach skórnych. Co ważne – w podgrupie pacjentów stosujących hydrochlorotiazyd po odstawieniu leku uzyskano częściową lub całkowitą regresję zmian skórnych. Podjęto rozważania, czy lek może indukować zmiany o charakterze MF we wczesnym stadium, czy też raczej pseudochłoniaka skóry. Autorzy badania zasugerowali, że hydrochlorotiazyd może być związany ze stymulowaną antygenowo proliferacją limfocytów T oraz promować rozwój zmian skórnych typowych dla MF (Wilcox, 2014).

3.3 Epidemiologia ziarniniaka grzybiastego

Częstość występowania MF szacuje się, jak wspomniano, na 0,36/100 000 osób rocznie. MF stwierdza się 2 razy częściej u mężczyzn niż u kobiet oraz u rasy czarnej niż u rasy białej i azjatyckiej. Choroba najczęściej objawia się w wieku między 45.-60. rokiem życia, jednak opisano również jej przypadki u dzieci i nastoletnich pacjentów. Średnia mediana zachorowania wg badań, które przeprowadzili Weinstock i Reynes, to 55. rok życia (Weinstock i Reynes, 1999), a wg badań Morales-

Suárez-Vareli między 45. a 60. rokiem życia (Morales-Suárez-Varela i wsp., 2004, 2005). Przeżycie 5-letnie różni się w zależności od stadium MF, ale także od kraju, w którym żyje pacjent – przykładowo w latach 2003-2007 5-letnie przeżycie w Niemczech wyniosło 94,9%, a w USA 86,5%; w latach 2008-2010 odpowiednio 97,4% i 92,7%. Różnica ta wynikała z odmienności systemu ubezpieczeń w obu krajach. Krótszy czas przeżycia w USA niż w Niemczech powiązano z tym, że w USA więcej osób jest nieobjętych opieką zdrowotną, a także działa system Medicaid, który nie zawsze umożliwia odpowiednią diagnostykę i leczenie osobom po 65. roku życia. Ponadto autorzy badań uznali również, że w Niemczech pacjenci mają lepszy dostęp do badań klinicznych. Przyczyna może również leżeć w różnicach w rejestracji w danym kraju chorych zgodnie z ICD-10 (Pulte i wsp., 2017).

3.4 Genetyka ziarniniaka grzybiastego

Do rozwoju MF mogą przyczyniać się czynniki genetyczne gospodarza. Większość chorych ma jedną lub więcej nieprawidłowości chromosomalnych, które można odkryć w DNA komórek nowotworowych. U osób z MF stwierdza się również zwielokrotniony materiał DNA w regionach chromosomów 7 i 17 oraz utratę DNA w regionach chromosomów 9 i 10. Znaczenie tego faktu nie jest ostatecznie wyjaśnione, ale wysoce prawdopodobny jest związek z niestabilnością chromosomalną, częstym zjawiskiem w przypadku wielu nowotworów, prowadzącym do zmian genetycznych pozwalających na wzrost i niekontrolowany podział komórek (Akinbami i wsp., 2014).

Bardzo rzadko stwierdza się rodzinne występowanie MF (Wilcox, 2014). Określone warianty genów HLA klasy II mogą mieć wpływ na rozwój MF i jego progresję, niektóre są też dziedziczne (Akinbami i wsp., 2014). W badaniu przeprowadzonym przez Hodak i wsp. stwierdzono, że częstość występowania allelu HLA DQB1 *03 była znacząco wyższa u 12 pacjentów pochodzenia żydowskiego z 6 rodzin niż w grupie kontrolnej, tym samym podkreślając związek tego allelu z rodzinną formą MF, gdyż u dwóch pacjentów wspomniane HLA występowało u dwójki bliźniąt (Hodak i wsp., 2005). Ponadto w Szkocji w MF dominuje HLA I A19 i B8, we Włoszech HLA-A*24, A*68, A*69 i HLA-B*35, u rasy kaukaskiej w Ameryce Północnej i u Żydów w Izraelu HLA II DRB1*11 i wspomniane już DQB1*03. Doniesienia te dotyczą pacjentów dorosłych i nie stwierdza się związku HLA z występowaniem MF u dzieci (Reiter i wsp., 2017). W piśmiennictwie opisano też przypadek zachorowania na ziarniniaka grzybiastego u małżeństwa (Wooldridge i Lorenc, 1985).

3.5 Immunologia ziarniniaka grzybiastego

Większość komórek rezydujących w skórze jest typu CD45RO+ i wykazuje ekspresję cząsteczki CLA, która wiąże E-selektynę zlokalizowaną na postkapilarnych żyłach w skórze – dzięki temu zachodzi zjawisko rollingu limfocytów. Komórki T rezydujące w skórze mają wysoką ekspresję m.in. receptorów chemokin CCR4, CCR6 i CCR10, w przeciwieństwie do centralnych komórek limfocytów T pamięci (T_{cm}, ang. *central memory T cells*) wykazujących ekspresję CCR7 i L-selektyny, niezbędnych do zasiedlania

węzłów chłonnych i krążenia w krwi obwodowej. Efektorowe limfocyty T (Tem, ang. *effector memory T-cells*) formują stałą populację rezydujących komórek w tkankach zdolnych do natychmiastowej odpowiedzi na ponowne wniknięcie antygeny i stanowią 80% komórek rezydujących w skórze zdrowej (Wilcox, 2014). Komórki Tcm wykryto w węzłach chłonnych, w skórze i krwi i są one odporne na apoptozę. Komórki Tem rezydują w skórze i nie krążą w krwi obwodowej. Za pomocą badań immunofenotypowych zademonstrowano, że nowotworowe limfocyty T w zespole Sézary'ego wykazują ekspresję taką jak komórki Tcm (CCR7 i L-selektyna), a komórki nowotworowe w MF odpowiadają Tem (Wilcox, 2014). Większość komórek T rezydujących w skórze to komórki efektorowe produkujące cytokiny, m.in. Th1/Th2/Th17. Heterogenność efektorowych komórek T zwiększa możliwość podziału CTCL w oparciu o podgrupy komórek T. W MF dochodzi do ekspresji genów i produkcji cytokin Th2-zależnych, co zwiększa możliwość, że w podgrupie pacjentów mogą znajdować się klony pochodzące od Th2 (Wilcox, 2014).

Mutacje w szlaku aktywacji ścieżek sygnałowych mogą promować pojawienie się fenotypów niezależnie od pochodzenia komórkowego – dotyczy to również limfocytów T. Konsekwencją tego jest fakt różnorodności fenotypu nowotworowych komórek T i ich zależności od mikrośrodowiska. Jako że tło genetyczne i domniemana komórka definiują podgrupy CTCL, w tym MF i SS, ma to istotny wpływ na klasyfikację i leczenie tych schorzeń oraz ocenę związanego z nimi ryzyka (Wilcox, 2014).

3.6 Pierwotne chłoniaki skóry – klasyfikacja

Chłoniaki skóry definiuje się jako pierwotnie skórne, gdy przy rozpoznaniu zmiany są ograniczone wyłącznie do skóry i nie stwierdza się zmian w układzie chłonnym, szpiku i narządach wewnętrznych, choć w przypadku np. zespołu Sézary'ego możliwe jest rozpoznanie na etapie odczynu białaczkowego we krwi z zajęciem węzłów chłonnych. Częściej występują chłoniaki z komórek T – 65%, rzadziej – chłoniaki z komórek B. Pierwotne chłoniaki skóry z komórek T stanowią rzadką, heterogenną grupę rozrostów limfoproliferacyjnych. Ziarniniak grzybiasty stanowi około 50-60% CTCL (Tabela 2) (Sokołowska-Wojdyło, 2015).

Tabela 2. Częstość występowania poszczególnych chłoniaków pierwotnych skórnych (Sokołowska-Wojdyło, 2015).

Podtyp	Częstość (%)	5-letnie przeżycie (%)
CTCL o powolnym przebiegu		
Ziarniniak grzybiasty (MF)	44	88
MF odmiana folikulotropowa	4	80
Siatkowica pagetoidalna	<1	100
MF typu skóry obwisłej i ziarniniakowej	<1	100
Lymphomatoid papulosis (LyP)	12	100
Pierwotny skórny chłoniak z dużych komórek anaplastyczny (C-ALCL)	8	95
Chłoniak z komórek T tkanki podskórnej typu zapalenia tkanki podskórnej (SPTCL)	1	82
Pierwotny skórny chłoniak z małych/średnich komórek T CD4+	2	72
CTCL o agresywnym przebiegu		
Zespół Sézary'ego (SS)	3	24
Pierwotny skórny chłoniak z komórek T, podtyp nieokreślony	2	16
Pierwotny skórny agresywny epidermotropowy chłoniak z komórek CD8+ (AECTCL)	<1	18
Pierwotny skórny chłoniak z komórek T (gama-delta) (PCGD-TCL)	<1	-
Pozawęzłowy chłoniak z komórek NK/T typu nosowego	<1	-
CBCL		
Pierwotny skórny chłoniak z ośrodków rozmnażania (PCFCL)	11	95
Pozawęzłowy chłoniak strefy brzeżnej (PCLMZL)	7	99
Pierwotny skórny chłoniak rozlany z dużych komórek B typu kończynowego (PCLBCL, ang. <i>leg type</i>)	4	55

3.7 Klasyfikacja chłoniaków pierwotnie skórnych z komórek T wg WHO-EORTC

Tabela 3. Klasyfikacja rozróżnia CTCL na postaci o przebiegu indolentnym i agresywnym oraz rozrosty z komórek prekursorowych (Pinter-Brown, 2017; Sokołowska-Wojdyło, 2015).

CTCL o indolentnym przebiegu	Ziarniniak grzybiasty
	MF postać folikulotropowa, siatkowica pagetoidalna, MF typu skóry obwisłej i ziarniniakowej
	Pierwotne skórne schorzenia limfoproliferacyjne CD 30+ lymphomatoid papulosis, pierwotny skórny chłoniak anaplastyczny z dużych komórek
	Chłoniak podskórny z komórek T
	Chłoniak T-komórkowy pierwotnie skórny CD 4+ z małych i średnich komórek pleomorficznych
CTCL o agresywnym przebiegu	Zespół Sézary'ego
	Chłoniak NK-T-komórkowy o lokalizacji pozawęzłowej, typ nosowy
	Chłoniak pierwotnie wywodzący się ze skóry obwodowej T-komórkowy, nieokreślony
	Chłoniak T-komórkowy pierwotnie skórny agresywny epidermotropowy CD8+
	Chłoniak T-komórkowy skórny gamma/delta +

Obraz kliniczny MF opisany przez Aliberta i Bazina charakteryzuje się typową ewolucją objawów, od zmian rumieniowych przez naciekowe i guzowate aż do zajęcia węzłów chłonnych i narządów wewnętrznych. MF może doprowadzić do erythrodermii. Wyróżnia się trzy charakterystyczne okresy tej choroby – wstępny, naciekowy i guzowaty. Ważnym objawem jest świąd skóry, który pojawia się we wczesnych stadiach MF, wyprzedza objawy choroby i/lub nasila się w momencie jej progresji. Leczenie pierwotnych chłoniaków skóry prowadzi się na podstawie rekomendacji sekcji chłoniaków skóry polskiej grupy badawczej chłoniaków. W celu oceny rozległości nowotworu u dorosłych przydatne jest zastosowanie reguły dziewiątek wg Wallace'a oraz reguła dłoni. U niemowląt obowiązuje reguła piętek (Sokołowska-Wojdyło i wsp., 2010).

Chociaż w oficjalnej klasyfikacji ujęte są tylko odmiany MF przedstawione w tabeli 4, wyróżnia się już 31 jego odmiany kliniczne, w tym opisaną ostatnio łuszczycopodobną (Jinno i wsp., 2015), która może być jednak odmianą typu pagetoidalnego.

3.8 Odmiany kliniczne ziarniniaka grzybiastego

- Anetodermiczny
- Angiocentryczny
- Dyshydrotyczny
- Dłoni i stóp
- Erytrodermiczny
- Grudkowy
- Hiperkeratotyczny
- Jednoogniskowy
- Krostkowy
- Łuszczycopodobny
- Niewidoczny
- Odbarwiony
- Pęcherzowy
- Pilotropowy
- Przebarwiony
- Przyłuszczyca wielkoogniskowa
- Syringotropowy
- Śródmiąższowy
- Typu *papuloerythrodermii Ofuji*
- Typu *poikiloderma vasculare atrophicans*
- Typu półpaśca
- Typu przyłuszczycy drobnoplamistej
- Typu rogowacenia czarnego
- Typu rybiej łuski
- Typu zapalenia okołoustnego
- Z mucynozą mieszkową
- Z transformacją wielkokomórkową
- Z wysiewnymi torbielami
- Ziarniniakowy
- Siatkowica pagetoidalna typ Woringera-Koloppa
- Typu skóry obwisłej i ziarniniakowej

Tabela 4. Odmiany ziarniniaka grzybiastego zgodne z klasyfikacją WHO 2010 MD Medscape. (Sokołowska-Wojdyło, 2015).

Podtyp	Zmiany kliniczne i patologiczne
Odmiana folikulotropowa	Najczęściej zlokalizowane na skórze głowy i szyi. Zmiany skórne związane są z łysieniem i mucynozą. Charakteryzuje się powolnym wzrostem. W badaniu histopatologicznym skóry stwierdza się nacieki zapalne wokół mieszków włosowych
Skóra obwisła i ziarniniakowa	Najczęściej zlokalizowane w zgięciach pachwinowych i dołach pachowych. Charakteryzuje się powolnym rozwojem wiotkich i obwisłych fałdów skóry z ziarniniakowym naciekiem z klonalnych komórek T
Siatkowica pagetoidalna	Najczęściej zlokalizowane na kończynach dolnych. Charakteryzuje się ogniskami tłuszczopodobnymi i hiperkeratocytycznymi

Klasyfikacja TNMB (ang. *tumor, node, metastasis, blood*) MF oraz zespołu Sézary'ego według International Society of Cutaneous Lymphoma i European Organization of Research and Treatment of Cancer (ISCL/EORTC) ocenia stopień zaawansowania nowotworu. Jest ona niezbędna do wdrożenia właściwego postępowania terapeutycznego (Krzakowski i Warzocha, 2014) (Tabele 4 i 5).

Tabela 5. Klasyfikacja TNMB (ang. tumor, node, metastasis, blood) ziarniniaka grzybiastego oraz zespołu Sézary'ego według International Society of Cutaneous Lymphoma i European Organization of Research and Treatment of Cancer (ISCL/EORTC) z 2007 i klasyfikacji T

TNMB		
Zmiany skórne		
T1		Tylko zmiany rumieniowate, grudki i/lub zmiany naciekowe pokrywające <10% powierzchni skóry
	T1a	Tylko zmiany rumieniowe (<10% powierzchni skóry)
	T1b	Zmiany rumieniowe i naciekowe (<10% powierzchni skóry)
T2		Zmiany rumieniowe, grudki i zmiany naciekowe pokrywające ≥10% powierzchni skóry
	T2a	Tylko zmiany rumieniowe (≥10% powierzchni skóry)
	T2b	Zmiany rumieniowe i naciekowe (≥10% powierzchni skóry)
T3		Co najmniej jeden guz (średnica ≥1cm)
T4		Zlewne zmiany rumieniowe pokrywające ≥80% powierzchni skóry
Zmiany węzłowe		
N0		W badaniu klinicznym nie stwierdza się nieprawidłowych* obwodowych węzłów chłonnych (tj. szyjnych, nadobojczykowych, nadkłykciowych, pachowych i pachwinowych); biopsja węzła chłonnego nie jest wymagana
N1		W badaniu klinicznym stwierdza się nieprawidłowe obwodowe węzły chłonne, histologicznie w klasyfikacji holenderskiej stopień 1. (Dutch 1) lub w klasyfikacji NCI stopień LN 0-2.
N2		W badaniu klinicznym stwierdza się nieprawidłowe obwodowe węzły chłonne, histologicznie w klasyfikacji holenderskiej stopień 1. (Dutch 3) lub w klasyfikacji NCI stopień LN 0-3.
	N2a	Poliklonalne
	N2b	Monoklonalne
N3		W badaniu klinicznym stwierdza się nieprawidłowe obwodowe węzły chłonne, histologicznie w klasyfikacji holenderskiej stopień 3.-4. (Dutch 3-4) lub w klasyfikacji NCI stopień LN 4.: poliklonalne lub monoklonalne
NX		W badaniu klinicznym stwierdza się nieprawidłowe obwodowe węzły chłonne; bez potwierdzenia histologicznego
Stopnie zaawansowania histopatologicznego węzłów chłonnych		
Klasyfikacja ISCL/EORTC (TNMB)	System holenderski (Dutch system)	NCI-VA
N1	Stopień 1.: odczynowe zapalenie węzłów chłonnych (dermatopathic lymphadenopathy, DL)	LN0: brak atypowych limfocytów; LN1: przypadkowe i pojedyncze atypowe limfocyty (nietworzące grup); LN2: liczne atypowe limfocyty lub grupy liczące po 3-6 komórek
N2	Stopień 2.: DL: wczesne zajęcie przez MF (obecność pofałdowanych mózgowkształtnych jąder komórkowych >7,5µm)	LN3: skupiska atypowych limfocytów; zachowana architektura węzła chłonnego
N3	Stopień 3.: częściowe zatarcie architektury węzła chłonnego; obecność licznych jednojądrowych komórek o pofałdowanych jądrach (cerebriform mononuclear cells, CMCs) Stopień 4.: całkowite zatarcie architektury węzła chłonnego	LN4: częściowe zatarcie architektury węzła chłonnego przez limfocyty atypowe lub komórki nowotworowe
Zajęcie narządów wewnętrznych		
M0		Bez zajęcia narządów wewnętrznych
M1		Z zajęciem narządów wewnętrznych (niezbędne potwierdzenie histopatologiczne* oraz wskazanie zajętego narządu)
Stopień zajęcia krwi obwodowej		
B0		Bez cech zajęcia krwi obwodowej lub ≤5% limfocytów krwi obwodowej stanowią komórki atypowe (Sézary'ego,)
	B0a	Poliklonalne
	B0b	Monoklonalne
B1		>5% limfocytów krwi obwodowej stanowią komórki atypowe (Sézary'ego), ale ich liczba jest mniejsza niż próg określony w definicji stopnia B2
	B1a	Poliklonalne
	B1b	Monoklonalne
B2		≥1000 monoklonalnych atypowych komórek (Sézary'ego)/µl

Tabela 6. Stopień zaawansowania TNMB chłoniaków skóry (Sokołowska-Wojdyło, 2015).

Stopień TNMB	
IA	T1, N0, M0, B0–B1
IB	T2, N0, M0, B0
IIA	T1–T2, N1–N2–NX, M0, B0–B1
IIB	T3, N0–N1–N2–NX, M0, B0
IIIA	T4, N0–N1–N2–NX, M0, B0
IIIB	T4, N0–N1–N2–NX, M0, B1
IVA1	T1–T4, N0–N1–N2–NX, M0, B2
IVA2	T1–T4, N3, M0, B0–B2
IVB	T1–T4, N1–N2–N3–NX, M1, B0–B2

Podejście terapeutyczne w chłoniakach skóry uwarunkowane jest rozpoznaniem histopatologicznym oraz stopniem zaawansowania nowotworu.

3.9 Obraz histopatologiczny ziarniniaka grzybiastego

Okres wstępny (stadium *praemycoticum*) – obraz histologiczny jest niecharakterystyczny. Limfocyty w naskórku bez cech stanu gąbczastego, ich ułożenie zarówno w postaci drobnych skupień, jak i wzdłuż błony podstawnej, większe limfocyty w naskórku, a nie w skórze właściwej, *interface dermatitis*, delikatne włóknienie brodawek skórnych.

Okres naciekowy (stadium *infiltrativum*) – epidermotropizm, mikroropnie Pautriera, naciek jest bardzo gęsty, ale nadal wielopostaciowy, w naskórku występują zmiany odczynowe.

Okres guzowaty (stadium *tumeriforme*) – występują średnie i duże komórki atypowe, często nie stwierdza się już epidermotropizmu ze strefą Grenza, komórki guza stanowią atypowe komórki hiperchromatyczne o nieregularnym kształcie jąder (Sokołowska-Wojdyło, 2015; Sokołowska-Wojdyło i Roszkiewicz, 2010).

3.10 Leczenie ziarniniaka grzybiastego

Leczenie chłoniaków pierwotnie skórnych jest procesem interdyscyplinarnym, wskazane jest prowadzenie go w ośrodkach specjalistycznych we współpracy dermatologa z hematologiem, onkologiem i patomorfologiem. Postępowanie terapeutyczne uwarunkowane jest właściwym rozpoznaniem klinicznym, histopatologicznym oraz oceną stopnia zaawansowania choroby (Tabele 7-11).

Tabela 7. Leczenie ziarniniaka grzybiastego w stadium IA-IIA (na podstawie: Sokołowska-Wojdyło, 2015; Sokołowska-Wojdyło i wsp., 2017).

Leczenie ziarniniaka grzybiastego w stadium IA-IIA	
Leczenie I linii	Leczenie II linii
Glikokortykosteroidy miejscowo 2–3 razy w tygodniu przez 3–4 miesiące, pod okluzją	Beksaroten doustnie w dawce 300 mg/m ²
Fototerapia promieniowaniem ultrafioletowym typu B (UVB) PUVA 2–3 razy w tygodniu; można łączyć z retinoidami lub reksinoidami, IFN α	Monoterapia IFN α — w dawce 3 MU dziennie 3 razy w tygodniu; można łączyć z PUVA, retinoidami i reksinoidami, IFN γ
Miejscowo stosowane tazaroten, beksaroten, karmustyna*, mechloretamina*, imikwimod	Małe dawki metotreksatu p.o. — 20–30 mg tygodniowo (do 100 mg tygodniowo); skuteczne u pacjentów z towarzyszącym <i>lymphomatoid papulosis</i> ; można łączyć ze steroidami, fotoforezą pozaustrojową, PUVA i IFN α
Radioterapia pojedynczych zmian	Worinostat*, romidepsyna*, depsipeptyd*, brentuximab vedotin* — można łączyć ze steroidami, PUVA i IFN α , a także z chemioterapią
Napromienianie ciała szybkimi elektronami (TSEB, <i>total skin electron beam therapy</i>)	Nowe leki w trakcie badań klinicznych, w stadiach IA-IIA nie należy wdrażać chemioterapii — jeśli wydaje się to konieczne, należy najpierw zakwalifikować pacjenta do badania klinicznego

PUVA — *psolaren plus UVA*; IFN α — *interferon α* ; TSEB (*total skin electron beam therapy* napromienianie elektronami całego ciała); HDACI (*histone deacetylase inhibitor — inhibitor deacetylazy histonowej* (*vorinostat*, *romidepsin*); p.o (*per os — doustnie*); *lek niedostępny w Polsce

Tabela 8. Leczenie ziarniniaka grzybiastego w stadium IIB (na podstawie: Sokołowska-Wojdyło, 2015; Sokołowska-Wojdyło i wsp., 2017).

Leczenie ziarniniaka grzybiastego w stadium IIB	
Leczenie I linii	Leczenie II linii
Radioterapia guzów	Jak pierwsza linia
IFN α , retinoidy lub beksaroten, metotreksat, worinostat*, depsipeptyd*, romidepsyna*, brentuximab vedotin* w monoterapii i terapii skojarzonej, również z radioterapią	Badania kliniczne nowych leków, jeśli ww. są nieskuteczne (przed wdrożeniem chemioterapii)
	Autologiczna transplantacja komórek krwiotwórczych (<i>allogeneic hematopoietic cell transplantation, allo HCT</i>) u wybranych pacjentów
	Chemioterapia – liposomalna doksorubicyna, gemcytabina; jeśli nieskuteczne: chlorambucyl, etopozyd, pentostatyna, cyklofosfamid, temozolomid, małe dawki pralatreksatu, CHOP, EPOCH, ESHAP
	Nowe leki w trakcie badań klinicznych, jeśli wyżej wymienione są nieskuteczne (przed wdrożeniem chemioterapii)

PUVA — *psolaren plus UVA*; IFN (*interferone — interferon*); TSEB (*total skin electron beam therapy — napromienianie elektronami całego ciała*); HDACI (*histone deacetylase inhibitor — inhibitor deacetylazy histonowej* (*vorinostat*, *romidepsin*); p.o (*per os — doustnie*); i.v. (*intra venous — dożylnie*); *lek niedostępny w Polsce

Tabela 9. Leczenie ziarniniaka grzybiastego i zespołu Sézary'ego w stadium III (na podstawie: Sokołowska-Wojdyło, 2015; Sokołowska-Wojdyło i wsp., 2017).

Leczenie ziarniniaka grzybiastego w stadium III	
Leczenie I linii	Leczenie II linii
Fotoforeza pozaustrojowa — powinna być rozważana u pacjentów z zespołem Sézary'ego; często łączona z doustnymi steroidami, IFN α , beksarotenem oraz metotreksatem; czas leczenia: od wielu tygodni do miesięcy	Jak IIB
IFN α w monoterapii lub z PUVA, retinoidy, beksaroten	
Beksaroten, worinostat*, depsiptyd*, romidepsyna* jak IA-IIA	
Metotreksat jak IA-IIB	

PUVA — psolaren plus UVA; IFN (interferone) — interferon; TSEB (total skin electron beam therapy — napromienianie elektronami całego ciała); HDACI (histone deacetylase inhibitor — inhibitor deacetyazy PUVA — psolaren plus UVA; IFN (interferone — interferon); TSEB (total skin electron beam therapy — napromienianie elektronami całego ciała); HDACI (histone deacetylase inhibitor — inhibitor deacetyazy histonowej (vorinostat, romidepsin); p.o. (per os — doustnie); i.v. (intra venous — dożylnie); *lek niedostępny w Polsce

Tabela 10. Leczenie ziarniniaka grzybiastego i zespołu Sézary'ego w stadium IV (na podstawie: Sokołowska-Wojdyło, 2015; Sokołowska-Wojdyło i wsp., 2017).

Leczenie ziarniniaka grzybiastego w stadium IV i zespołu Sézary'ego	
Leczenie I linii	Leczenie II linii
Fotoforeza pozaustrojowa — powinna być rozważana u pacjentów z zespołem Sézary'ego; często łączona z doustnymi steroidami, IFN α , beksarotenem oraz metotreksatem; czas leczenia: od wielu tygodni do miesięcy	Beksaroten — jak w stopniach mniej zaawansowanych; rekomenduje się łączenie z fotoforezą pozaustrojową i INF α
IFN α — 3–5 MU dziennie; można łączyć z PUVA (nie rekomenduje się leczenia PUVA samodzielnie; naświetlania 2–3 razy w tygodniu), retinoidami, beksarotenem i fotoforezą pozaustrojową	Worinostat*, depsiptyd*, brentuximab vedotin* — jak w stopniach mniej zaawansowanych

PUVA — psolaren plus UVA; IFN (interferone — interferon); TSEB (total skin electron beam therapy — napromienianie elektronami całego ciała); HDACI (histone deacetylase inhibitor — inhibitor deacetyazy histonowej (vorinostat, romidepsin); p.o. (per os — doustnie); i.v. (intra venous — dożylnie); *lek niedostępny w Polsce

Tabela 11. Leczenie zespołu Sézary'ego (na podstawie: Sokołowska-Wojdyło, 2015; Sokołowska-Wojdyło i wsp., 2017).

Leczenie zespołu Sézary'ego	
Leczenie I linii	Leczenie II linii (zależne od dostępności)
Fotoforeza pozaustrojowa, IFN α , IFN γ , retinoidy lub beksaroten, metotreksat poniżej 100 mg tygodniowo, worinostat*, depsiptyd*, romidepsyna*, brentuximab vedotin* w monoterapii i terapii skojarzonej, też z radioterapią	Allo-HCT
	Nowe leki w trakcie badań klinicznych, jeśli wyżej wymienione są nieskuteczne (przed wdrożeniem chemioterapii)
	Alemtuzumab*
	Chemioterapia — liposomalna doksorubicyna, gemcytabina, jeśli nieskuteczne chlorambucyl, etopozyd, pentostatyna, cyklofosfamid, temozolomid, małe dawki pralatreksatu, CHOP, EPOCH, ESHAP

PUVA — psolaren plus UVA; IFN (interferone — interferon); TSEB (total skin electron beam therapy — napromienianie elektronami całego ciała); HDACI (histone deacetylase inhibitor — inhibitor *lek niedostępny w Polsce

3.11 Interleukina 33

IL-33 jest stosunkowo niedawno odkrytą cytokiną należącą do nadrodziny interleukiny 1 (Cherry i wsp., 2008). Pierwotnie nosiła nazwę DVS 27 (nazwa DVS 27 oznaczała nazwę kolonu, którego cDNA, który wykazywał największą ekspresję w bibliotece genów wyizolowanej z tętnicy mózgowej. Gen ulegający nadekspresji w skurczu naczyń mózgowych (Onda i wsp., 1999). Po raz pierwszy została opisana w 2003 roku przez Baekkevolda i współpracowników w komórkach śródbłonna jako czynnik jądrowy komórek wysokiego śródbłonna (NF-HEV, ang. *nuclear factor-high endothelial venules*) (Baekkevold i wsp., 2003). W 2005 roku Schmitz i współpracownicy odkryli związek IL-33 z IL-1 i czynnikiem wzrostu fibroblastów i na podstawie analizy podobieństwa w budowie aminokwasów i zdolności wiązania z receptorami z rodziny IL-1 zakwalifikowali ją do grupy, do której należą IL-18 i IL-1 (Schmitz i wsp., 2005).

Ludzki gen IL-33, który w 54% wykazuje podobieństwo sekwencji aminokwasów do sekwencji mysich, zlokalizowany jest na chromosomie 9 (9p24.1) i koduje białko wielkości 30 kDa złożone z 270 aminokwasów (Palmer i Gabay, 2011). Gen IL-33 wykazuje homologię z IL-18, głównie za pośrednictwem domeny beta-koniczyny zlokalizowanej na C-końcu cząsteczki, dzięki której łączy się z receptorem ST2. Interleukina 33 ulega ekspresji w wielu narządach u ludzi i u myszy. Obecność mRNA IL-33 odkryto w tkance mózgowej, rdzeniu kręgowym, płucach, skórze, węzłach chłonnych, wątrobie, trzustce, nerkach i w sercu. Na poziomie białka podlega ekspresji w komórkach nabłonka i śródbłonna. IL-33 pod wpływem stymulacji TNF α , IL-1 i INF γ jest uwalniana przez komórki dendrytyczne, makrofagi i komórki układu odpornościowego (Milovanovic i wsp., 2012).

IL-33 zlokalizowana w jądrze komórkowym może działać jako swoista alarmina, uwalniana z komórek strukturalnych w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek wskutek nekrozy. Działa jako sygnał ostrzegający tkanki objęte uszkodzeniem i aktywuje układ odpornościowy do właściwej reakcji na uszkodzenie (Ali i wsp., 2011).

Początkowo uważano, że do uzyskania pełnej biologicznej aktywności uwolnione białko prekursorowe IL-33 wymaga cięcia przez kaspazy, podobnie jak w przypadku innych cytokin z rodziny IL-1. Okazało się jednak, że nie jest to konieczne i istnieje aktywny biologicznie molekularny wariant (spIL-33), który nie posiada sekwencji rozpoznawanej przez kaspazy. Stwierdzono też, że uwolnione z komórek w wyniku apoptozy kaspazy 3 i 7 inaktywują IL-33.

Zwraca się też uwagę na wpływ środowiska zapalnego w modyfikacji aktywności biologicznej IL-33. Uwolnione z aktywowanych neutrofilów elastaza i katepsyna G mają zdolność cięcia proteolitycznego biologicznie aktywnej, pełnej postaci IL-33 (1-270) i tworzenia jej krótszych form: IL-33 (95-270), IL-33 (99-270) i IL-33 (109-270). Krótsze fragmenty cząsteczki wykazują 10-krotnie wyższą aktywność biologiczną w porównaniu z cząsteczką o pełnej długości (Lefrançois i wsp., 2012).

3.12 Jądrowa postać IL-33

IL-33 jest uwalniana w jądrze komórkowym. N-końcowa domena typu „spinki do włosów” jest odpowiedzialna za umiejscowienie tej cytokiny w jądrze i połączenie z chromatyną. IL-33 może uczestniczyć w hamowaniu transkrypcji genów – łączy się z kompleksem nukleosomów (H2A, H2B) przy udziale krótkiego motywu wiążącego chromatynę (CBM, ang. *chromatin binding motif*), co prowadzi do zagęszczania chromatyny (Carriere i wsp., 2007).

Forma wewnątrzkomórkowa IL-33 może wchodzić w interakcje z podjednostką p65 czynnika transkrypcji NF- κ B w jądrze komórkowym i cytosolu; reakcja ta jest dodatkowo wzmocniona po aktywacji szlaku sygnałowego przez IL-1. Te oddziaływania mogą prowadzić do opóźnienia lub braku ekspresji genów będących pod kontrolą NF- κ B (I κ B, TNF α , białka C-REL) (Ali i wsp., 2011).

IL-33 może prowadzić do wzrostu ekspresji genów przez wyciszenie czynników transkrypcji na heterochromatynie, zmniejszając ich stężenie na właściwych promotorach, co w efekcie umożliwia aktywatorom transkrypcji połączenie ze swoistymi sekwencjami promotorowymi (Carriere i wsp., 2007).

3.13 Funkcje IL-33

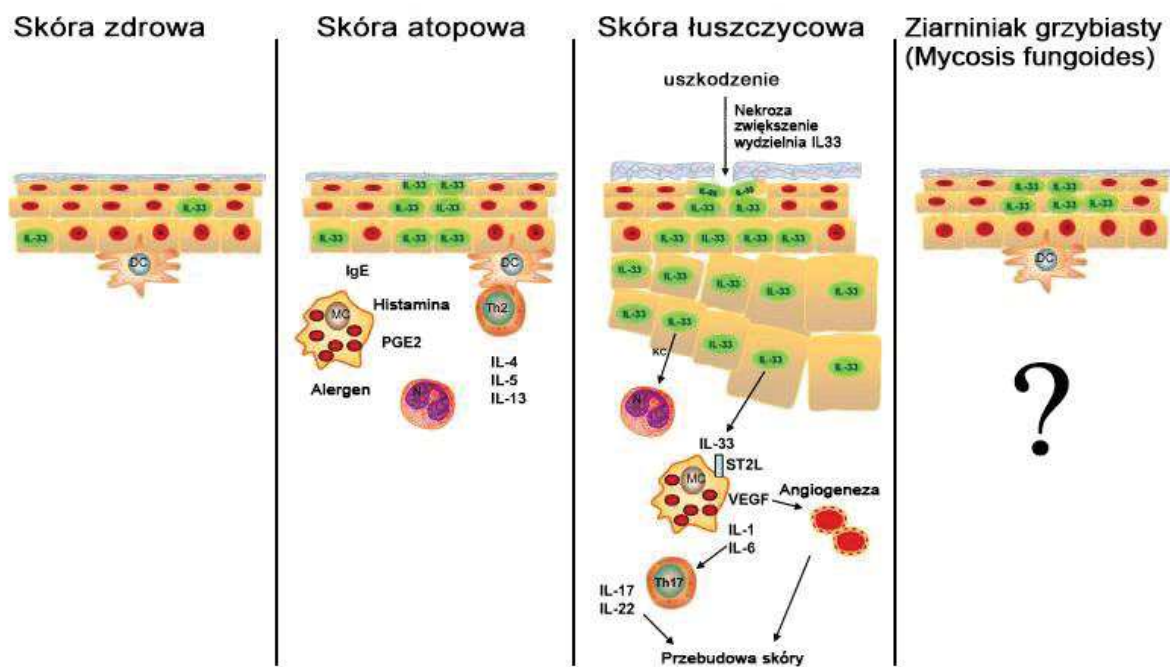
IL-33 odgrywa rolę w indukcji odpowiedzi komórkowej typu Th2 układu odpornościowego. Ponadto bierze udział w polaryzacji naiwnych limfocytów T w kierunku fenotypu Th2, stymulując je do wydzielania cytokin takich jak IL-5 i IL-13. W stosunku do komórek Th2 IL-33 pełni rolę chemoatraktanta, może też aktywować limfocyty B typu B1 *in vivo*, wyraźnie zwiększając produkcję przeciwciał klasy IgM oraz IL-5 i IL-13. IL-33 jest również silnym aktywatorem wrodzonego układu immunologicznego oraz eozynofiliów, prowadząc do syntezy anionu nadtlenkowego, IL-8 oraz degranulacji komórek. Cytokina ta jest także silnym aktywatorem mastocytów i bazofilów, wywołując ich dojrzewanie i degranulację oraz syntezę i uwalnianie wielu cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 oraz chemokina GM-CSF. Na powierzchni makrofagów wykazano ekspresję receptora ST2L, co świadczy o umiejętności tych komórek do odpowiedzi na sygnał przekazany przez IL-33. Cytokina ta może wzmocnić polaryzację makrofagów w kierunku alternatywnie aktywowanych makrofagów lub M2 oraz indukować dojrzewanie komórek dendrytycznych (Kurowska-Stolarska i wsp., 2009).

Dodatkowo IL-33 poprzez działanie na komórki Th2 (mastocyty i bazofile) bierze udział w obronie przeciwko patogenom, np. *Pneumocystis murina*, *Trichuris muris* i *Toxoplasma gondii* (Yang i wsp., 2011).

IL-33 może także indukować odpowiedź typu Th1. Zespół Yanga na podstawie przeprowadzonych badań *in vitro* udowodnił, że receptor ST2 ulega ekspresji na cytotoksycznych limfocytach T typu 1 (Tc1). Odpowiedź ta jest zależna od T-bet będącego głównym czynnikiem

regulującym transkrypcję Th1 i Tc1. Ponadto IL-33 w zależności od obecności receptora TCR i/lub IL-12 uczestniczy w produkcji INF γ na komórkach Tc1 oraz promuje zjawiska efektorowych komórek T CD8+ (Yang i wsp., 2011). Potencjalną rolą IL-33 jest prawdopodobnie wzmocnienie limfocytów T cytotoksycznych, które odgrywają zasadniczą rolę w odpowiedzi odpornościowej przeciwko patogenom wewnątrzkomórkowym, takim jak wirusy i bakterie, a także przeciwko komórkom nowotworowym (Yang i wsp., 2011).

Rycina 1. Rola IL-33 w dermatozach. Na rycinie przedstawiono potencjalną prozapalną rolę IL-33 w skórze nieuszkodzonej, w skórze atopowej i w łuszczycy.



Uszkodzenie skóry wskutek drapania w odpowiedzi na alergen lub stan zapalny prowadzi do nekrozy komórki i uwolnienia biologicznie aktywnej IL-33. Cytokina ta może oddziaływać z receptorem ST2L na wielu typach komórek skóry, m.in. na komórkach rezydujących w skórze i naciekających komórkach immunologicznych. IL-33 może indukować komórkę dendrytyczną pośrednio poprzez polaryzację naiwnych komórek T CD4+ celem tworzenia fenotypu Th2 i produkcji cytokin IL-5, IL-10 i IL-13. Może też aktywować mastocyty, prowadząc do uwolnienia biologicznie aktywnych mediatorów, takich jak VEGF, histaminy i prostaglandyny E2 (PGE2), oraz do produkcji chemokin i rekrutacji neutrofilii (N). IL-33 stymuluje też wzrost komórek Th17 i wydzielanie związanych z nimi cytokin IL-17 i IL-22, przez co może również uaktywnić wydzielanie IL-1 i IL-6. Ponadto IL-33 pośrednio przy udziale VEGF może prowadzić do angiogenezy i remodelingu skóry (Miller, 2011).

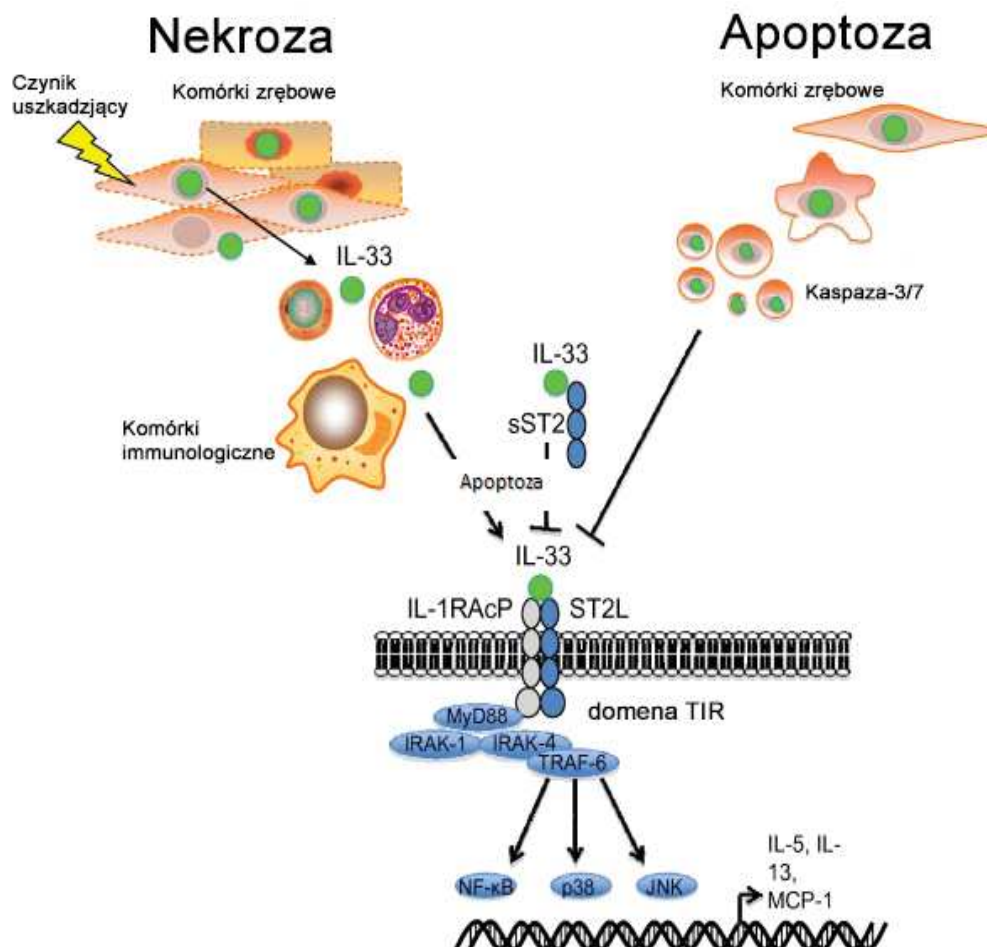
IL-33 odgrywa rolę w wielu zapalnych chorobach skóry. W skórze i fibroblastach skóry, w porównaniu z innymi tkankami i komórkami, stwierdza się dużo wyższą ekspresję mRNA IL-33. Poziom mRNA IL-33 i białka jest również wyższy w skórze atopowej zmienionej zapalnie w porównaniu z

niezmienioną (Pushparaj i wsp., 2012). Podobne obserwacje dotyczą poziomu IL-33 w tłuszczycy. Podwyższone stężenie IL-33 stwierdzono także w skórze pacjentów ze sklerodermią – pozytywnie korelowało ono z zajęciem skóry. Podskórne podanie IL-33 może indukować zależne od IL-13 włóknienie skóry u myszy (Rankin i wsp., 2010). U myszy pozbawionych receptora ST2(-/-) stwierdza się zredukowaną reakcję zapalną w porównaniu z myszami WT w estrze forbolu (Hueber i wsp., 2011). Ponadto ekspresję IL-33 opisano w perycytach w eksperymentalnym modelu gojenia ran w skórze szczura (Sponheim i wsp., 2010).

3.14 Receptor ST2

Gen ST2 koduje co najmniej trzy izoformy białka ST2, które powstają wskutek molekularnego składowania: białko przezbłonowe (ST2L), wydzielniczą postać rozpuszczalną ST2 (sST2) oraz wariant ST2 (ST2V) umiejscowiony przede wszystkim w ludzkim jelicie. IL-33 łączy się z ST2L, tworząc kompleks z białkami towarzyszącymi receptorowi z rodziny IL-1 (IL-1RAcP). W transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego biorą udział m.in. białko adaptorowe MyD88 i inne białka cytosolu oraz kinazy (IRAK-1/4, TRAF6, MAP), prowadząc do aktywacji czynników transkrypcji – NF- κ B (Miller, 2011).

Rycina 2. Nekroza i apoptoza a uwolnienie IL-33. Zwiększone uwalnianie IL-33 następuje w skutek nekrozy.



IL-33 jest przeważnie uwalniana przez komórki zrębowe. Ich uszkodzenie może indukować nekrozę i uwolnienie IL-33, która aktywuje heterodimerski kompleks receptora ST2L/IL-1RAcP na różnych komórkach immunologicznych (Rycina 2). IL-33 jest inaktywowana przez połączenie z ST2L. Podczas apoptozy dochodzi do cięcia IL-33 przez kaspazy 3 i 7, co prowadzi do jej inaktywacji.

Na skutek aktywacji ST2L zostaje przekazany sygnał za pomocą białek MyD88 i IRAK-1/4, co prowadzi do aktywacji jądrowych czynników transkrypcji oraz szlaku kinazy MAPK, która pośredniczy w aktywacji zewnątrzkomórkowej kinazy ERK regulującej sygnał, p38 i N-terminalnej kinazy JUN, co docelowo prowadzi do produkcji cytokin i chemokin Th2 (Miller, 2011).

Na powierzchni limfocytów Th2 (ale nie Th1), komórek dendrytycznych, granulocytów, komórek NK i T znajduje się długa postać przezbłonowa receptora ST2 (ST2L) (Schmitz i wsp., 2005).

Postać wydzielnicza receptora ST2 (sST2) jest receptorem „pułapką”, który wiąże cząsteczki IL-33 i hamuje jej biologiczną aktywność. Zwiększoną syntezę sST2 mogą indukować cytokiny prozapalne: TNF α i IL-6. W hamowaniu sygnału komórkowego mediowanego przez IL-33 za pośrednictwem receptora TLR-IL-1R może uczestniczyć inny receptor z rodziny IL-1 – SIGIRR (Toll IL-1R8). W badaniach *in vitro* wykazano, że pod wpływem stymulacji IL-33 receptor SIGIRR może tworzyć kompleks z receptorem ST2, hamując działanie biologiczne tej cytokiny (Bulek i wsp., 2009).

3.15 Rola szlaku sygnałowego IL-33/ST2 w chorobach zapalnych

IL-33 może uczestniczyć w patogenezie chorób Th2-zależnych takich jak astma, atopowe zapalenie skóry i wstrząs anafilaktyczny. Jej działanie protekcyjne zaobserwowano w chorobach sercowo-naczyniowych: w miażdżycy tętnic, otyłości, cukrzycy typu 2 i zawale mięśnia sercowego.

Badania przeprowadzone przez japońskich naukowców ujawniły ekspresję ST2 w białaczkach i chłoniakach T-komórkowych (Tsuchiya i wsp., 2004; Yoshida i wsp., 1995).

Sygnał IL-33/ST2 pełni też istotną rolę jako element odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw guzom, na czynnik wzrostu i/lub przerzuty. W badaniu przeprowadzonym u myszy ST2(-/-) z guzami sutka osłabiły wzrost guza i przerzuty, ze zwiększeniem poziomu krążących prozapalnych cytokin, aktywowanych NK i komórek CD8⁺ (Jovanovic i wsp., 2011).

Ponadto IL-33 aktywuje proliferację, migrację i różnicowanie komórek śródbłonka związanych z angiogenezą, dlatego też może być mediatorem w tzw. ucieczce guza spod kontroli immunologicznej i w jego angiogenezie.

Podkreśla się również rolę IL-33 w płucach, co wspiera koncepcję ST2 jako celu terapeutycznego w astmie (Miller, 2011).

Ponadto istnieją dowody na obecność sygnału IL-33/ST2 w chorobach reumatologicznych, m.in. reumatoidalnym zapaleniu stawów, zapaleniu kostno-stawowym, tłuszczycowym zapaleniu stawów i

toczniu rumieniowatym układowym. IL-33 wywiera pozapalny wpływ dzięki aktywacji fibroblastów błony maziowej oraz mastocytów w stawach (Miller, 2011).

Szlak sygnałowy IL-33/ST2 może też odgrywać rolę regulującą w przewlekłych chorobach zapalnych jelit, wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego (CU, ang. *colitis uclerosa*) i chorobie Crohna (jego znaczenie jest większe w przypadku CU, a mniejsze w chorobie Crohna). Stwierdzono podwyższone stężenie IL-33 i sST2 u pacjentów z CU w porównaniu z grupą kontrolną, a leczenie preparatami anty-TNF obniżyło poziom krążącej IL-33, zwiększając sST2 (Pastorelli i wsp., 2010).

IL-33 może również pełnić rolę w regulacji patofizjologii i odpowiedzi zapalnej w centralnym systemie nerwowym: poziom mRNA IL-33 jest znacznie podwyższony w mózgu i rdzeniu kręgowym oraz po eksperymentalnym krwawieniu podpajęczynówkowym (Onda i wsp., 1999). Ekspresja IL-33 w komórkach glejowych i astrocytach jest zwiększona dzięki ligandom TLR. Leczenie IL-33 indukuje proliferację mikrogleju i zwiększa produkcję prozapalnych cytokin: IL-1 β , TNF α , chemokin i tlenku azotu oraz cytokin przeciwzapalnych, w tym IL-10 (Yasuoka i wsp., 2011).

IL-33 odgrywa ważną rolę w chorobach sercowo-naczyniowych. Koncepcja ta została potwierdzona badaniami, w których wykryto zwiększone stężenie rozpuszczalnej formy receptora sST2 w ostrym zawale mięśnia sercowego, duszności oraz przewlekłej niewydolności serca. Stwierdzono także, że sST2 może być biomarkerem przydatnym do oceny ryzyka wystąpienia zgonu oraz zawału mięśnia sercowego u pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi (Shah i Januzzi, 2010; Yanavitski i Givertz, 2011). Szlak sygnałowy IL-33/ST2 może pełnić rolę protekcyjną w miażdżycy tętnic (Demjanets i wsp., 2011).

Białka szlaku IL-33/ST2 mają też ważne znaczenie w biologii tkanki tłuszczowej, chroniąc przed metabolicznymi skutkami otyłości. Wykazano, że stymulacja mysich adipocytów za pomocą IL-33 wywołuje napływ limfocytów Th2, wzrost syntezy IL-5 i IL-13 oraz polaryzację makrofagów w kierunku fenotypu M2. IL-33 ogranicza także magazynowanie tłuszczu, zmniejsza wielkość adipocytów, obniża stężenie cholesterolu całkowitego oraz powoduje spadek ekspresji rezystyny, mediatora odpowiedzialnego za rozwój insulinooporności i cukrzycy typu 2, wpływając dodatnio na metabolizm glukozy. Uważa się, że działanie ochronne IL-33 związane jest z jej zdolnością do hamowania ekspresji genów odpowiedzialnych za adipogenezę oraz metabolizm lipidów.

IL-33 oraz jej receptor ST2 stanowią potencjalny cel w leczeniu alergicznych i autoimmunologicznych chorób (Miller, 2011).

3.16 Polimorfizmy genu IL-33

W 2008 japońscy naukowcy opublikowali badanie, w którym zbadali powiązanie polimorfizmów w genie IL-33 z wystąpieniem japońskiego nieżytu nosa [Japanese cedar (JC) pollinosis], alergicznej reakcji modulowanej przez limfocyty Th2. Receptor IL1RL1, którego ligandami są IL-1 i IL-33, jest bardzo

ważnym efektem odpowiedzi Th2 (Sakashita i wsp., 2008). Zespół badawczy, analizując publiczną bazę danych HapMap (URL: <http://www.hapmap.org/index.html.en>), wyselekcjonował 22 polimorfizmy SNP w genie IL-33 wstępujące z częstotliwością większą niż 0,10. Na podstawie analizy statystycznej do genotypowania w grupach pacjentów i grupie osób zdrowych zostały wybrane polimorfizmy: 9894 T/C (rs1929992) zlokalizowany w intronie 3 genu IL-33 oraz 11877 C/T (rs10975519) zlokalizowany w egzonie 5 genu IL-33. Badaczom udało się odnaleźć istotne statystycznie powiązanie pomiędzy podatnością na japoński nieżyt nosa z polimorfizmem w locus 9894 T/C (rs1929992) SNP ($p=0,048$). Ponadto pacjenci mieli znacząco wyższy poziom IL-33 we krwi w porównaniu do osób zdrowych.

4 Cele pracy

1. Ocena, czy warianty polimorficzne – 9894 T/C i 11877 C/T – genu IL-33 odpowiadają za odmienny przebieg MF u pacjentów, u których doszło lub może dojść do progresji, w porównaniu z pacjentami nieprogresującymi [stanowiącymi większość, ok. 90%, przypadków (Sakashita i wsp., 2008)]. Ocena, czy wspomniane warianty mogą stanowić czynnik prognostyczny
2. Ocena wartości rokowniczej stężenia IL-33 i jej receptora w surowicy chorych z MF
3. Ocena znaczenia IL-33 i jej receptora w patogenezie świądu u chorych z MF

5 Materiał i metodyka

Badania przeprowadzono w latach 2012-2015 i włączono do nich grupę 88 pacjentów z MF będących pod opieką Poradni Dermatologicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku oraz grupę kontrolną składającą się z 66 zdrowych osób.

Wśród pacjentów z MF było 30 kobiet w wieku od 35. do 78. roku życia (średnia 61,63) i 58 mężczyzn w wieku od 20. do 86. roku życia (średnia 57,91). Rozpoznanie zostało zweryfikowane badaniem histopatologicznym. Stadia zaawansowania choroby przedstawiały się następująco:

- Remisja całkowita: 6 pacjentów (2 kobiety i 4 mężczyzn)
- MF Ia: 31 pacjentów (14 kobiet i 17 mężczyzn)
- MF Ib: 24 pacjentów (7 kobiet i 17 mężczyzn)
- MF IIa: 2 pacjentów (2 mężczyzn)
- MF IIb: 10 pacjentów (3 kobiety i 7 mężczyzn)
- MF III: 6 pacjentów (6 mężczyzn)
- MF IVa: 1 pacjent (1 mężczyzna)
- MF IVb: 6 pacjentek (6 kobiet)

W grupie kontrolnej było 68 zdrowych kobiet w wieku 46 lat i 54 zdrowych mężczyzn w wieku 49,4 roku. Wywiad w kierunku obciążeń internistycznych, kardiologicznych, neurologicznych, chorób alergicznych, autoimmunologicznych, infekcji wirusowych i bakteryjnych był negatywny.

Od wszystkich osób (zarówno chorych, jak i zdrowych) jednorazowo pobrano krew żylną w ilości 5 ml do probówki „na skrzep”, następnie odwirowano i uzyskano surowicę do oznaczenia poziomu IL-33 i ST2 oraz 5 ml krwi do probówki z etylenodwuaminocteroocyanem (EDTA) celem wyizolowania genomowego DNA. Materiał został pobrany zgodnie z zasadami aseptyki i zabezpieczony w temperaturze -80°C do czasu wykonania analiz.

Wszystkie osoby podpisały zgodę na udział w badaniu.

Projekt badania został zatwierdzony przez Niezależną Komisję Bioetyczną Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Finansowanie – grant Polskiego Towarzystwa Onkologicznego.

5.1 Izolacja genomowego DNA

Izolację przeprowadzono, używając zestawu Blood Mini (A&A Biotechnology). Kolumnienki, na których odbywała się izolacja, były wypełnione złożem krzemionkowym posiadającym zdolność wiązania DNA przy wysokim stężeniu soli chaotropowych.

Do 100 µl krwi obwodowej dodano 130 µl uniwersalnego buforu lizującego LT, który spowodował lizę krwinek czerwonych oraz białych, oraz 20 µl proteiny K, dzięki której zostały usunięte nukleazy i inne zanieczyszczenia białkowe. Całość została wymieszana i inkubowana w temperaturze 37°C (optymalna dla działania proteiny K). Po inkubacji próbki były intensywnie mieszane i naniesione na minikolumny do oczyszczania DNA. W celu przesączenia przez kolumnienki wirowano je przy prędkości 12 tys. rpm. Następnie minikolumny były płukane dwukrotnie buforem płuczającym i wirowane przy prędkości 12 tys rpm. Po zakończeniu procesu płukania minikolumny umieszczono w nowych probówkach i dodano po 200 µl buforu elucyjnego TRIS, którego zadaniem było wymycie związanego ze złożem krzemionkowym genomowego DNA. Kolumnienki z buforem TRIS inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej, a następnie odwirowano przez 1 minutę przy prędkości 12 rpm. Izolaty DNA do czasu dalszych analiz były przechowywane w lodówce w temperaturze 4°C.

5.2 Badania molekularne

Polimorfizmy genu IL-33 zostały oznaczone za pomocą allelospecyficznego łańcuchowej reakcji polimerazy (ARMS-PCR, ang. *amplification refractory mutation system - polymerase chain reaction*). Użyte startery (ang. *primers*) (Tabela 12) zostały zaprojektowane za pomocą oprogramowania Primer3Web (bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0) na podstawie sekwencji IL-33 uzyskanej z bazy NCBI.

Tabela 12. Sekwencje starterów wykorzystanych w reakcji ARMS-PCR.

Gen	Polimorfizm	Allel częstszy i rzadszy	Starter	Sekwencja	Wielkość produktu PCR
IL-33	IL-33 9894 (rs1929992)	T/C	IL33.9894-F1	ACACATTTTCCCCCAAATTTCTAT	108 bp
			IL33.9894-F2	ACACATTTTCCCCCAAATTTCCAC	
			IL33.9894-R	CCATCTTAACTACTACTTAAAATGTATAAAGTGTTAGAATTAT	
IL-33	IL-33 11877 (rs10975519)	C/T	IL33.11877-F1	ATTTGAGGGGTGTTGAGACTCAGAG	222 bp
			IL33.11877-F2	ATTTGAGGGGTGTTGAGACTCAGAA	
			IL33.11877-R	GGAGAATTCATCAGAGCATATTCGTG	
GH1 (hormon wzrostu 1)	-	-	GH1-F	GCCTTCCAACCATTCCTTA	429 bp
			GH1-R	TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC	

Startery F1 odpowiadają allelowi częstszemu. Startery F2 odpowiadają allelowi rzadszemu. W sekwencjach starterów F1 i F2 podkreślono sztucznie wprowadzone niezgodności w celu uzyskania specyficzności dla danego allelu.

Tabela 13. Skład mieszaniny reakcyjnej do ARMS-PCR.

Woda dejonizowana wolna od nukleaz	14 µl
Bufor do reakcji PCR 10x stężony (Sigma-Aldrich)	2,5 µl
Taq polimerazy DNA (Sigma-Aldrich)	1 µl
Startery dla odpowiedniego allelu o stężeniu 10 µM	po 1µl = 2µl
Mieszanina czterech deoksynukleotydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) o stężeniu 10 mM (Sigma-Aldrich)	0,5 µl
Wyizolowane matrycowe DNA	5 µl
ŁĄCZNIK	25 µl

W kontroli negatywnej matrycowe DNA zastąpiono wodą, a do wewnętrznej kontroli amplifikacji zastosowano hormon wzrostu (GH1).

Po przygotowaniu mieszaniny reakcyjnej i dodaniu matrycowego DNA całość została odwirowana przez 15 sekund i umieszczona w termocyklerze Mastercycler Gradient firmy Eppendorf. Warunki reakcji PCR przedstawiono w tabeli 14.

Tabela 14. Warunki reakcji PCR.

Denaturacja wstępna: w celu wstępnej denaturacji matrycowego DNA i usunięcia ewentualnych zanieczyszczeń	5 min	95°C	1 cykl
Denaturacja właściwa	50 s	95°C	35 cykli
Annealing: hybrydyzacja odcinków starterowych	50 s	59°C (9894) 60°C (11877)	35 cykli
Elongacja	60 s	72°C	35 cykli
Inkubacja: w celu zakończenia niekompletnych syntez i dokończenia hybrydyzacji niekompletnych produktów	5 min	72°C	1 cykl

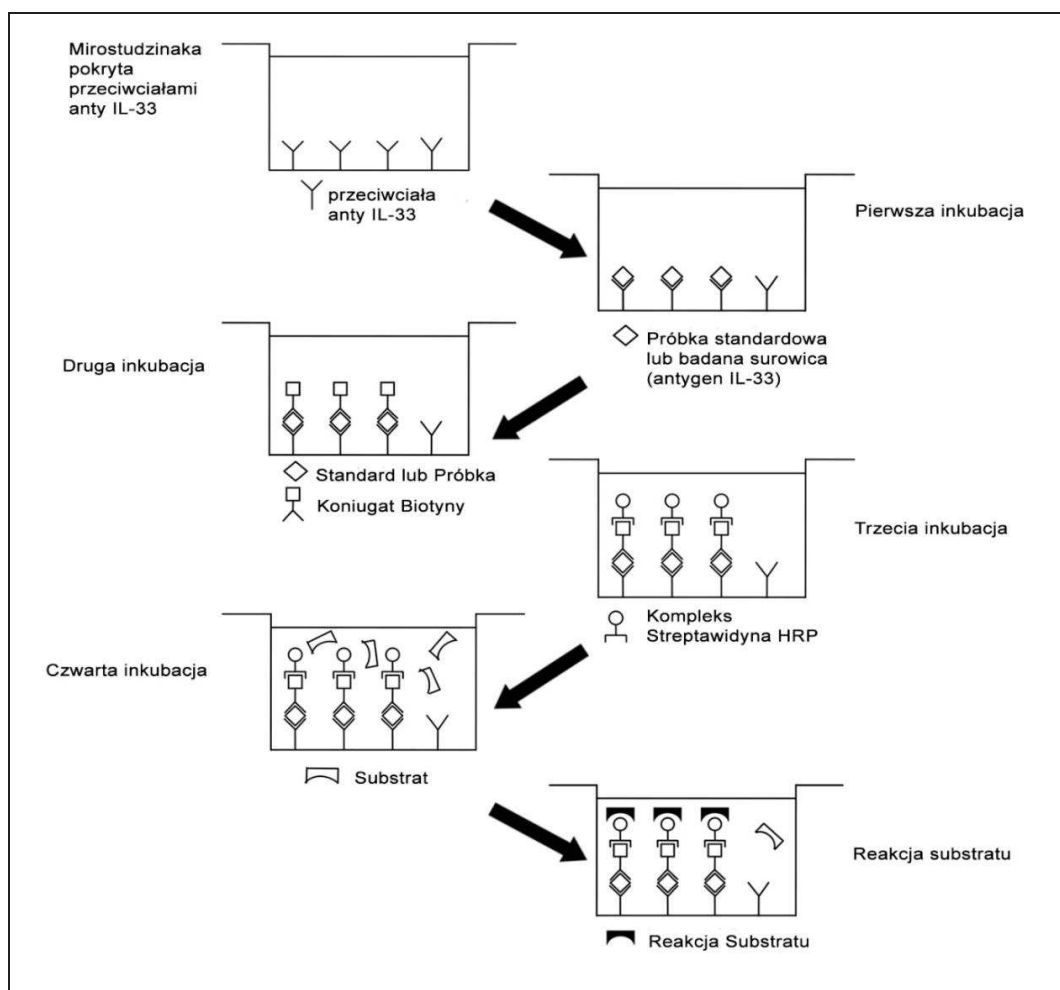
Następnie została wykonana elektroforeza w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny, który w świetle ultrafioletowym umożliwia obserwację produktu reakcji PCR. Do studzienek w żelu agarowym naniesiono po 25 µg produktu reakcji PCR, a do jednej ze studzienek marker wielkości (100-500 pz), który pozwalał ocenić wielkość rozdzielanych fragmentów DNA.

Fragmenty DNA, które zostały rozdzielone w procesie elektroforezy, były obserwowane za pomocą transiluminatora Foto/Eclipsy firmy Fotodyne. Analiza i archiwizacja żeli została przeprowadzona za pomocą oprogramowania FOTOAnalyst PC Image firmy Fotodyne.

5.3 Badanie poziomu IL-33 w surowicy

Za pomocą metody ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) oznaczono poziom IL-33 w surowicy u poszczególnych pacjentów (Rycina 3). Surowica do czasu analizy była przechowywana w temperaturze -20°C. W analizie wykorzystano zestaw Platinum ELISA (BMS2048) przygotowany przez firmę Affymetrix eBioscience.

Rycina 3



Zestaw do ELISA składał się z:

- 96-dołkowych płytek opłaszczonych przeciwciałami poliklonalnymi wiążącymi się z IL-33
- Liofilizowanego standardu dla ludzkiej IL-33 (500 pg/ml)
- Mieszaniny znakowanych biotyną przeciwciał przyłączających się do IL-33
- Roztworu streptawidyny sprzężonej z enzymem HRP (peroksydaza chrzanowa)
- Roztworu substratu TMB (3,3',5,5'-Tetrametylobenzydyna)
- Roztworu buforu do rozcieńczeń Assay Buffers, 20x stężonego (PBS with 1% Tween 20 and 10% BSA)
- Roztworu buforu płuczącego, 20x stężonego (PBS with 1% Tween 20)
- Roztworu zatrzymującego reakcję barwną (1M kwas ortofosforowy H₃PO₄)

W celu przeprowadzenia testu ELISA w pierwszej kolejności przygotowano odczynniki i standardy ze znanymi stężeniami IL-33. Następnie na 96-dołkową płytkę naniesiono standardy, próbę ślepa oraz badane próbki w ilości 50 µl na jedną studzienkę i inkubowano przez 2h w temperaturze pokojowej. W tym czasie następowało wiązanie IL-33 zawartej w surowicy i w standardach z przeciwciałami, którymi była opłaszczona płytka. Po inkubacji surowica, standardy oraz próba ślepa zostały usunięte z płytki. Następnie zapełnione studzienki były płukane sześciokrotnie buforem płuczącym. Później do każdej studzienki została dodana mieszanina przeciwciał znakowanych biotyną w ilości 100 µl na jeden dołek. Po przykryciu płytki została przeprowadzona inkubacja w temperaturze 21°C (1h), podczas której przeciwciała znakowane biotyną przyłączały się do kompleksu przeciwciało-IL-33. Po inkubacji mieszanina została usunięta i przeprowadzono sześciokrotne płukanie buforem płuczającym, podczas którego zostały usunięte przeciwciała niezwiązane z kompleksem. Następnie do każdego dołka na płytce dodano 100 µl roztworu streptawidyny sprzężonej z enzymem HRP i przeprowadzono inkubację w temperaturze 21°C (1h). Podczas inkubacji streptawidyna silnie wiązała się z biotyną znajdującą się na przeciwciałach i tworzyła kolejny element kompleksu przeciwciało-IL-33. Po inkubacji roztwór streptawidyny sprzężonej z enzymem HRP został usunięty i przeprowadzono sześciokrotne płukanie buforem płuczającym, podczas którego został usunięty nadmiar enzymu. W celu wywołania reakcji barwnej został dodany roztwór substratu TMB. W temperaturze 21°C, w zaciemnieniu, została przeprowadzona inkubacja (25 min), podczas której substrat TMB przekształcił się w ciemnoniebieski produkt. Reakcja została zatrzymana przez szybkie dodanie 100 µl roztworu zatrzymującego reakcję barwną. W zależności od stężenia IL-33 w badanej próbce lub w standardzie roztwór po zakończeniu reakcji barwnej różnił się odcieniem koloru niebieskiego. W celu oceny dokładnej ilości IL-33 w badanych próbkach płytka została zbadana absorbancją na spektrofotometrze (czytnik płytek) przy długości fali 450 nm. Na podstawie standardów ze znaną ilością IL-33 wykreślono krzywą wzorcową, a następnie na jej podstawie określono wartość IL-33 w surowicy (pg/ml).

5.4 Badanie poziomu receptora ST2 (IL1RL1) w surowicy

Poziom receptora ST2 w surowicy również został oznaczony za pomocą metody ELISA. Surowica do czasu analizy była przechowywana w temperaturze -20°C. W analizie został wykorzystany zestaw ELISA (SEH820Hu 96 Tests) przygotowany przez Cloud-Clone Corp. (www.cloud-clone.us).

Zestaw do ELISA składał się z:

- 96-dołkowych płytek opłaszczonych przeciwciałami poliklonalnymi wiążącymi się z IL1RL1
- Liofilizowanych standardów dla IL1RL1
- Mieszaniny znakowanych biotyną przeciwciał przyłączających się do IL1RL1
- Roztworu streptawidyny sprzężonej z enzymem HRP (peroksydaza chrzanowa)
- Roztworu substratu TMB (3,3',5,5'-Tetrametylobenzodyna)
- Roztworu buforu płuczącego, 30x stężonego
- Roztworu zatrzymującego reakcję barwną
- Roztworu buforu do rozcieńczeń

W celu przeprowadzeniu testu ELISA w pierwszej kolejności zostały przygotowane odczynniki i standardy ze znanymi stężeniami IL1RL1. Następnie na 96-dołkową płytkę naniesiono standardy, próbę ślepa oraz badane próbki w ilości 100 µl na jedną studzienkę i inkubowano przez 2h w temperaturze 37°C. W tym czasie następowało wiązanie receptora IL1RL1 zawartego w surowicy i standardach z przeciwciałami, którymi była opłaszczona płytka. Po inkubacji surowica, standardy oraz próba ślepa zostały usunięte z płytki. Później do każdej studzienki została dodana mieszanina przeciwciał znakowanych biotyną w ilości 100 µl na jeden dołek. Po przykryciu płytki została przeprowadzona inkubacja w temperaturze 37°C (1h), podczas której przeciwciała znakowane biotyną przyłączały się do kompleksu przeciwciało-receptor IL1RL1. Po inkubacji mieszanina została usunięta i przeprowadzono trzykrotne płukanie buforem płuczającym, podczas którego zostały usunięte przeciwciała niezwiązane z kompleksem. Następnie do każdego dołka na płytce dodano 100 µl roztworu streptawidyny sprzężonej z enzymem HRP i przeprowadzono inkubację w temperaturze 37°C (30 min). Podczas inkubacji streptawidyna silnie wiązała się z biotyną znajdującą się na przeciwciałach i tworzyła kolejny element kompleksu. Po inkubacji roztwór streptawidyny sprzężonej z enzymem HRP został usunięty i przeprowadzono pięciokrotne płukanie buforem płuczającym, podczas którego został usunięty nadmiar enzymu. W celu wywołania reakcji barwnej dodano 90 µl roztworu substratu TMB. W temperaturze 37°C, w zaciemnieniu, została przeprowadzona inkubacja (25 min), podczas której substrat TMB przekształcił się w niebieski produkt. Reakcja została zatrzymana przez szybkie dodanie 50 µl roztworu zatrzymującego reakcję barwną. W zależności od stężenia receptora ST2 w badanej próbce lub w standardzie roztwór po zakończeniu reakcji barwnej różnił się wysyceniem koloru niebieskiego. W celu oceny dokładnej ilości IL1RL1 w badanych próbkach płytka została zbadana absorbancją na

spektrofotometrze (czytnik płytek) przy długości fali 450 nm. Na podstawie standardów ze znaną ilością ST2 wykreślono krzywą wzorcową, a następnie na jej podstawie określono wartość IL1RL1 w surowicy (pg/ml).

6 Analiza statystyczna

Dla celów analizy statystycznej zastosowano 3 różne grupowania genotypów SNP: grupowanie 1., w którym występowały genotypy CC, CT, TT, odpowiadające bezpośrednio uzyskanym danym z analizy laboratoryjnej; grupowanie 2., w którym podział opierał się na stwierdzeniu, czy występuje nukleotyd cytozyna [C (+), C (-)]; grupowanie 3., opierające się na stwierdzeniu, czy występuje nukleotyd tymina [T (+), T (-)].

Za pomocą testu Manna-Whitneya zbadano istotność różnic pomiędzy dwiema wartościami średnimi zmiennych nieposiadającymi rozkładu normalnego. Test został wykorzystany do zbadania różnic w poziomach IL-33 i receptora ST2 pomiędzy grupą osób zdrowych i pacjentów, a także do określenia różnic poziomów receptora ST2 i IL-33 genotypów w grupach C (+), C (-) i T (+), T (-). W przypadku większej liczby grup nieposiadających rozkładów normalnych istotność różnic określono za pomocą testu Kruskala-Wallisa. Test został wykorzystany do porównania poziomów IL-33 lub rST2 w grupach CC, CT i TT.

Dane nieparametryczne jakościowe zostały ocenione za pomocą testu χ^2 i dokładnego testu Fishera z poprawką Yatesa. Za pomocą tej analizy porównano częstości występowania genotypów w zależności od stadium choroby.

Dane nieparametryczne ciągłe w celu określenia zależności zostały zbadane za pomocą korelacji rang Spearmana. W analizie zbadano korelację pomiędzy poziomami IL-33 lub receptora ST2 a poziomem świądu według skali VAS lub NRS.

Do oszacowania zmienności haplotypów w grupie pacjentów wykorzystano algorytmy EM (Dempster i wsp., 1977) i ELB (Excoffier i wsp., 2003).

Dla testów statystycznych przyjęto poziom istotności $p < 0,05$.

7 Wyniki

7.1 Ogólna charakterystyka pacjentów i osób zdrowych

Badania przeprowadzono w latach 2012-2015 i włączono do nich grupę 88 pacjentów z MF będących pod opieką Poradni Dermatologicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku oraz grupę kontrolną składającą się z 66 zdrowych osób.

Wśród pacjentów z MF było 30 kobiet w wieku od 35. do 78. roku życia (średnia 61,63) i 58 mężczyzn w wieku od 20. do 86. roku życia (średnia 57,91). Rozpoznanie zostało zweryfikowane badaniem histopatologicznym. Stadia zaawansowania choroby przedstawiały się następująco:

- Remisja całkowita: 6 pacjentów (2 kobiety i 4 mężczyzn)
- MF Ia: 31 pacjentów (14 kobiet i 17 mężczyzn)
- MF Ib: 24 pacjentów (7 kobiet i 17 mężczyzn)
- MF IIa: 2 pacjentów (2 mężczyzn)
- MF IIb: 10 pacjentów (3 kobiety i 7 mężczyzn)
- MF III: 6 pacjentów (6 mężczyzn)
- MF IVa: 1 pacjent (1 mężczyzna)
- MF IVb: 6 pacjentek (6 kobiet)

W grupie kontrolnej było 68 zdrowych kobiet w wieku 46 lat i 54 zdrowych mężczyzn w wieku 49,4 lat. Wywiad w kierunku obciążeń internistycznych, kardiologicznych, neurologicznych, chorób alergicznych, autoimmunologicznych, infekcji wirusowych i bakteryjnych był negatywny.

Stężenia IL-33 zostały zbadane u 88 pacjentów i 66 osób zdrowych. Stężenia receptora ST2 zostały określone u 87 pacjentów i 66 osób zdrowych. Polimorfizm w locus 9894 został zbadany u 88 pacjentów i 60 osób zdrowych, natomiast polimorfizm w locus 11877 u 88 pacjentów i 66 osób zdrowych.

7.2 Analiza poziomów IL-33 i receptora ST2

Tabela 15. Charakterystyka pacjentów i grupy kontrolnej (osoby zdrowe) – poziom IL-33 i receptora ST (rST2).

Charakterystyka pacjentów					
	Średnia	Odchylenie standardowe	Mediana	Rozstęp ćwiartkowy	Liczba zbadanych osób
Poziom IL-33	5,98	2,74	5,63	1,38	88
Poziom rST2	386,58	248,90	366,27	214,93	87
Charakterystyka grupy kontrolnej					
	Średnia	Odchylenie standardowe	Mediana	Rozstęp ćwiartkowy	Liczba osób
Poziom IL-33	6,15	3,33	5,61	2,39	66
Poziom rST2	239,08	191,15	169,16	285,32	66

Tabela 16. Porównanie średnich stężeń IL-33 i receptora ST2 w surowicy pacjentów i w grupie kontrolnej. Wartość p dla testu U Manna-Whitneya – wartość przybliżona do oszacowania wpływu poprawki Bonferroniego.

	U	Z	Pacjenci	Kontrola	P
IL-33	2801,500	0,372402	88	66	0,709594
rST2	1648,000	4,503473	87	66	0,000007

U, Z – wartości statystyki testowej dla testu U Manna-Whitneya. Testy są istotne statystycznie, jeżeli $p < 0,05$

Wykazano istotną statystycznie różnicę w stężeniu receptora ST2 w surowicy krwi pacjentów i osób zdrowych (test U Manna-Whitneya, $p < 0,05$). Stężenie receptora było 1,6x większe u pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy poziomami IL-33 w surowicy krwi pacjentów i osób zdrowych (test U Manna-Whitneya, $p < 0,05$): pomiędzy IL-33 w surowicy IL-33 w surowicy w badanych grupach $p = 0,71$.

Brak istotnej statystycznie różnicy pomiędzy poziomami IL-33 w surowicy krwi pacjentów i osób zdrowych może wynikać z szybkich zmian poziomów IL-33 w trakcie przebiegu MF (prawdopodobnie w trakcie rozwoju choroby IL-33 jest wychwytywane przez receptor ST2). Należy jednak zwrócić uwagę, że nie było dokładnie określonego czasu, w którym pobierano krew od pacjentów, co mogło być przyczyną braku takiej różnicy.

7.3 Analiza genotypów SNP w locus 9894 i 11877 genu IL-33

W analizie genotypów SNP zostały zastosowane wspomniane 3 grupowania genotypów SNP: grupowanie 1., w którym występowały genotypy CC, CT, TT, odpowiadające bezpośrednio uzyskanym danym z analizy laboratoryjnej; grupowanie 2., w którym podział opierał się na stwierdzeniu, czy występuje nukleotyd cytozyna [C (+), C (-)]; grupowanie 3., opierające się na stwierdzeniu, czy występuje nukleotyd tymina [T (+), T (-)].

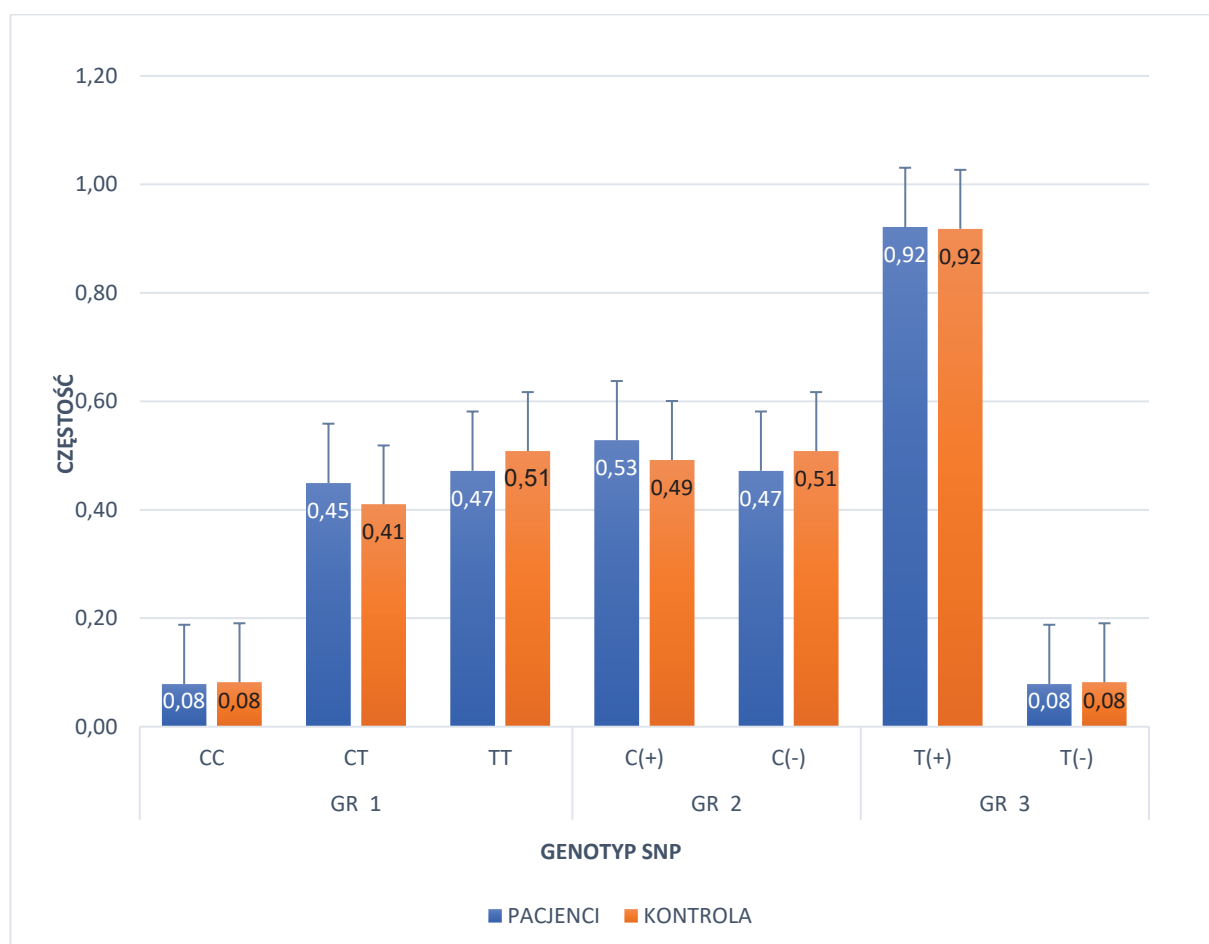
Na wykresie porównano grupę pacjentów i osób zdrowych. Na podstawie analizy wykresu nie udało się zaobserwować znaczących różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów SNP genu IL-33 w locus 9894.

Tabela 17. Częstość występowania polimorficznych genotypów genu IL-33 w locus 9894 w grupie chorych oraz w grupie kontrolnej.

Locus	RODZAJ SNP	Genotyp	Pacjenci Częstość	Kontrola Częstość	Porównanie częstości genotypów	Test	Wartość χ^2	Wartość p
IL-33 9894	GR 1	CC	0,079	0,082	CC vs CT vs TT	Chi2	0,3337	0,846
		CT	0,449	0,410				
		TT	0,472	0,508				
	GR 2	C (+)	0,528	0,492	C (+) vs C (-)	Dokładny test Fishera		0,676
		C (-)	0,472	0,508				
	GR 3	T (+)	0,921	0,918	T (+) vs T (-)	Dokładny test Fishera		1,000
T (-)		0,079	0,082					
Liczba osób			89	122				

Testy są istotne statystycznie, jeżeli $p < 0,05$

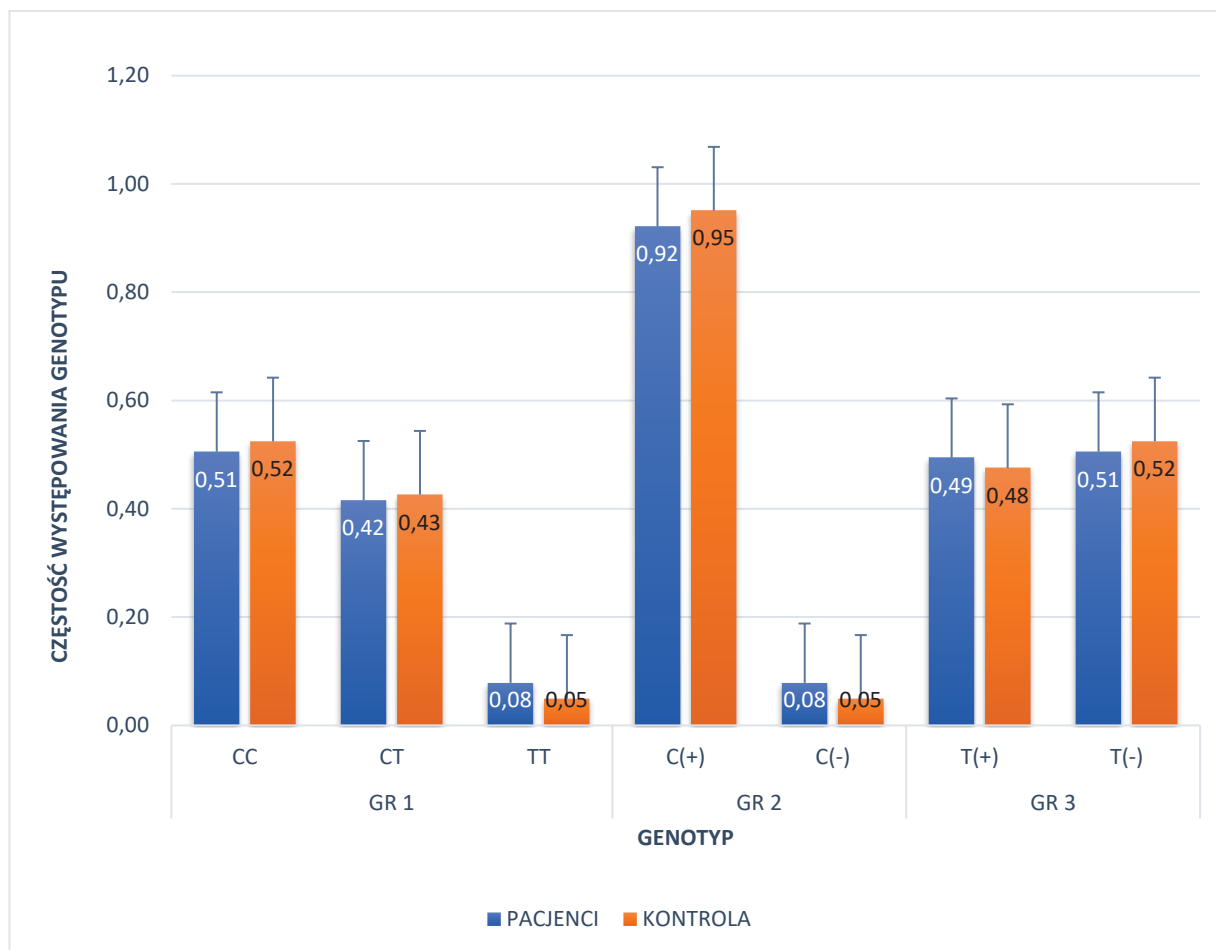
Wykres 1. Częstości występowania polimorficznych genotypów genu IL-33 w grupie chorych oraz w grupie kontrolnej w locus IL33 9894.



Za pomocą testu χ^2 i dokładnego testu Fishera porównano częstość występowania poszczególnych genotypów w locus 9894 genu IL-33 w grupach pacjentów i osób zdrowych, nie stwierdzając istotnych statystycznie różnic.

- Częstość występowania genotypu, pacjenci vs kontrola [grupowanie 1. CC CT TT]: test $\chi^2=0,3337$; $p>0,05$
- Częstość występowania genotypu, pacjenci vs kontrola [grupowanie 2. C (+) C (-)]: test Fishera; $p>0,05$
- Częstość występowania genotypu, pacjenci vs kontrola [grupowanie 3. T (+) T (-)]: test Fishera; $p>0,05$

Wykres 2. Częstość występowania polimorficznych genotypów genu IL-33 w locus 11877 w grupie chorych oraz w grupie kontrolnej.



Na wykresie porównano grupę pacjentów i osób zdrowych. Na podstawie analizy wykresu nie udało się zaobserwować znaczących różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów SNP genu IL-33 w locus 11877.

Tabela 18. Częstość występowania polimorficznych genotypów genu IL-33 w locus 11877 w grupie chorych oraz w grupie kontrolnej.

Locus	RODZAJ SNP	Genotyp	Pacjenci Częstość	Kontrola Częstość	Porównanie częstości genotypów	Test	Wartość χ^2	Wartość p	
IL-33 11877	GR 1	CC	0,51	0,52	CC vs CT vs TT	Chi ²	0,775	0,679	
		CT	0,42	0,43					
		TT	0,08	0,05					
	GR 2	C (+)	0,92	0,95	C (+) vs C (-)	Dokładny test Fishera		0,399	
		C (-)	0,08	0,05					
	GR 3	T (+)	0,49	0,48	T (+) vs T (-)	Dokładny test Fishera		0,889	
		T (-)	0,51	0,52					
	Liczba zbadanych osób			89	122				

Testy są istotne statystycznie, jeżeli $p < 0,005$

Za pomocą testu χ^2 i dokładnego testu Fishera porównano częstość występowania poszczególnych genotypów w locus 11877 genu IL-33 w grupach pacjentów i osób zdrowych, nie stwierdzając istotnych statystycznie różnic.

- Częstość występowania genotypu, pacjenci vs kontrola [grupowanie 1. CC CT TT]: test $\chi^2 = 0,775$; $p > 0,05$
- Częstość występowania genotypu, pacjenci vs kontrola [grupowanie 2. [C (+), C (-)]: test Fishera; $p > 0,05$
- Częstość występowania genotypu, pacjenci vs kontrola [grupowanie 3. [T (+), T (-)]: test Fishera; $p > 0,05$

Tabela 19. Częstość występowania haplotypów określanych przez dwa polimorfizmy SNP 9894 T/C i 11877 C/T genu IL-33 u pacjentów ($n = 89$) i w grupie osób zdrowych ($n = 122$).

Haplotypy	Metody oszacowania częstości występowania haplotypów					
	Algorytm EM			Algorytm ELB		
	Pacjenci	Kontrola	Wartość p	Pacjenci	Kontrola	Wartość p
C C	0,092	0,078	0,721899	0,084	0,074	0,716288
C T	0,212	0,209	0,904573	0,219	0,213	0,904976
T C	0,622	0,659	0,471700	0,629	0,664	0,471321
T T	0,075	0,054	0,419218	0,067	0,049	0,524064

Haplotyp – układ polimorfizmów (SNP) położonych na jednej chromatydzie, który dziedziczy się jako zestaw sprzężonych ze sobą alleli.; algorytm EM – ang. expectation-maximization algorithm; algorytm ELB – ang. The Excoffier-Laval-Balding algorithm

W analizie porównano częstość występowania poszczególnych haplotypów w grupie pacjentów i osób zdrowych. Do oszacowania częstości haplotypów w obydwu grupach użyto dwóch różnych algorytmów, algorytmu EM (Dempster i wsp., 1977) i algorytmu ELB (Excoffier i wsp., 2003). W analizie nie udało się wykazać istotnych statystycznie różnic pomiędzy pacjentami a grupą kontrolną.

7.4 Analiza poziomów IL-33 i receptora ST2 w zależności od genotypu

Wykres 3. Średnie poziomy IL-33 [pg/ml] dla poszczególnych polimorficznych genotypów SNP w locus 9894 genu IL-33.

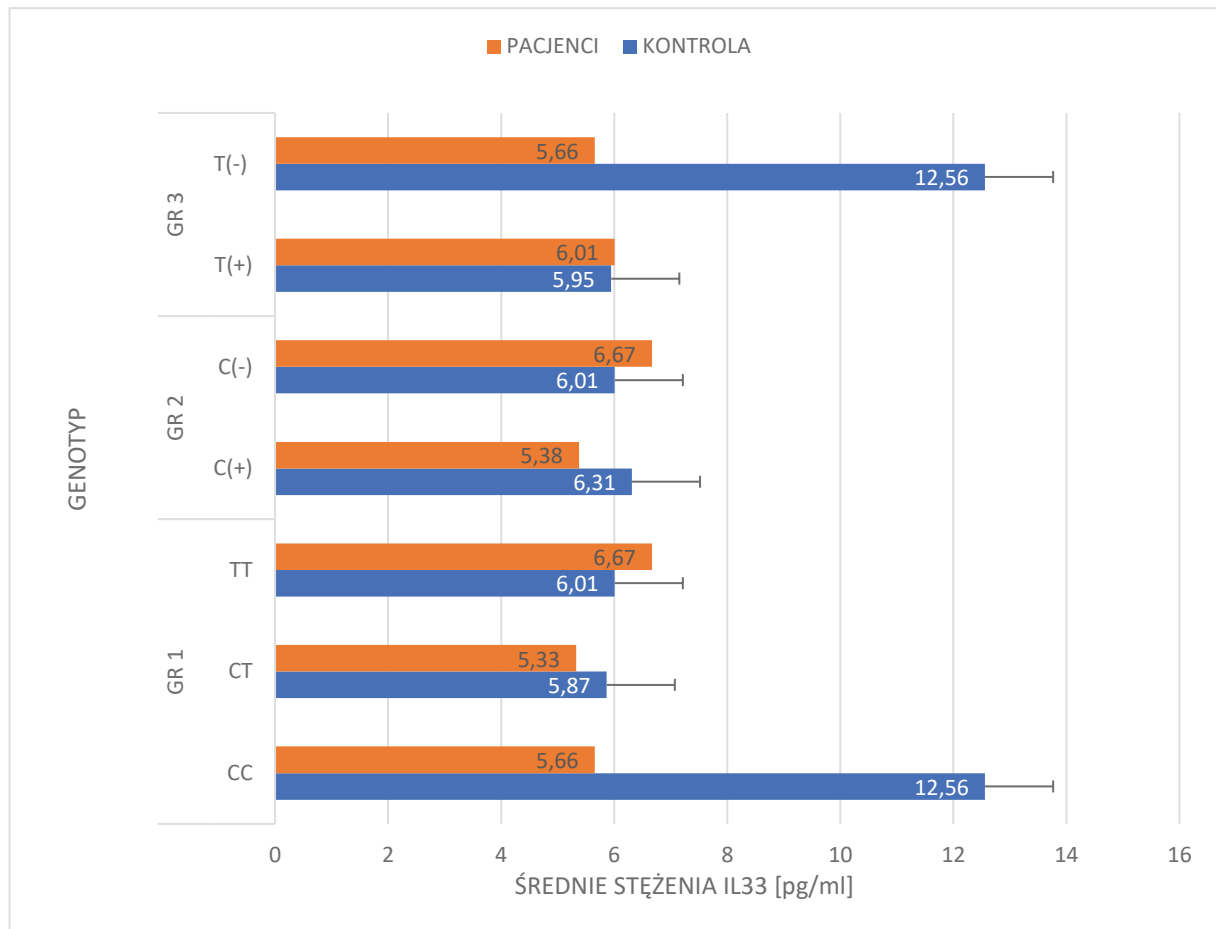


Tabela 20. Średnie poziomy IL-33 [pg/ml] dla poszczególnych polimorficznych genotypów SNP w locus 9894 genu IL-33,

Podział	Genotyp	Kontrola					Pacjenci					Test U Manna-Whitneya wyniki istotne przy $p < 0,05$		
		Śr. poziom IL-33	Odchylenie stand.	Mediana	Roz. ćw.	Liczba osób	Śr. poziom IL-33	Odchylenie stand.	Mediana	Roz. ćw.	Liczba osób	U	Z	p
GR 1	CC	12,56	9,70	12,56	13,72	2	5,66	1,52	5,23	2,76	7	3,00	-1,025	0,306
	CT	5,87	2,56	5,63	2,28	28	5,33	1,33	5,43	1,24	40	508,50	-0,636	0,525
	TT	6,01	3,23	5,44	2,23	30	6,67	3,64	5,82	2,17	41	608,50	1,317	0,188
GR 2	C (+)	6,31	3,49	5,67	2,39	30	5,38	1,35	5,43	1,38	47	629,50	-0,783	0,433
	C (-)	6,01	3,23	5,44	2,23	36	6,67	3,64	5,82	2,17	41	608,50	1,317	0,188
GR 3	T (+)	5,95	2,93	5,55	2,39	64	6,01	2,82	5,63	1,38	81	2456,00	0,5395	0,590
	T (-)	12,56	9,70	12,56	13,72	2	5,66	1,52	5,23	2,76	7	3,00	-1,025	0,306

Roz. ćw. – rozstęp ćwiartkowy; odchylenie stand. – odchylenie standardowe

Wykres i tabela przedstawiają różnice w poziomach IL-33 w grupie pacjentów i osób zdrowych dla poszczególnych typów genotypów SNP w locus 9894 genu IL-33. Nie udało się wykazać istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą kontrolną a pacjentami. Na podstawie analizy histogramu w grupowaniu 1. udało się zaobserwować różnice w poziomie IL-33 dla genotypu CC, a w grupowaniu 2. dla genotypu T (-). Należy jednak zwrócić uwagę na małą liczebność ($n=2$) grupy kontrolnej. W celu dokładniejszej oceny należałoby powiększyć grupę kontrolną tak, aby uzyskać więcej próbek z genotypami CC.

Wykres 4. Średnie poziomy IL-33 [pg/ml] dla poszczególnych polimorficznych genotypów SNP w locus 11877 genu IL-33.

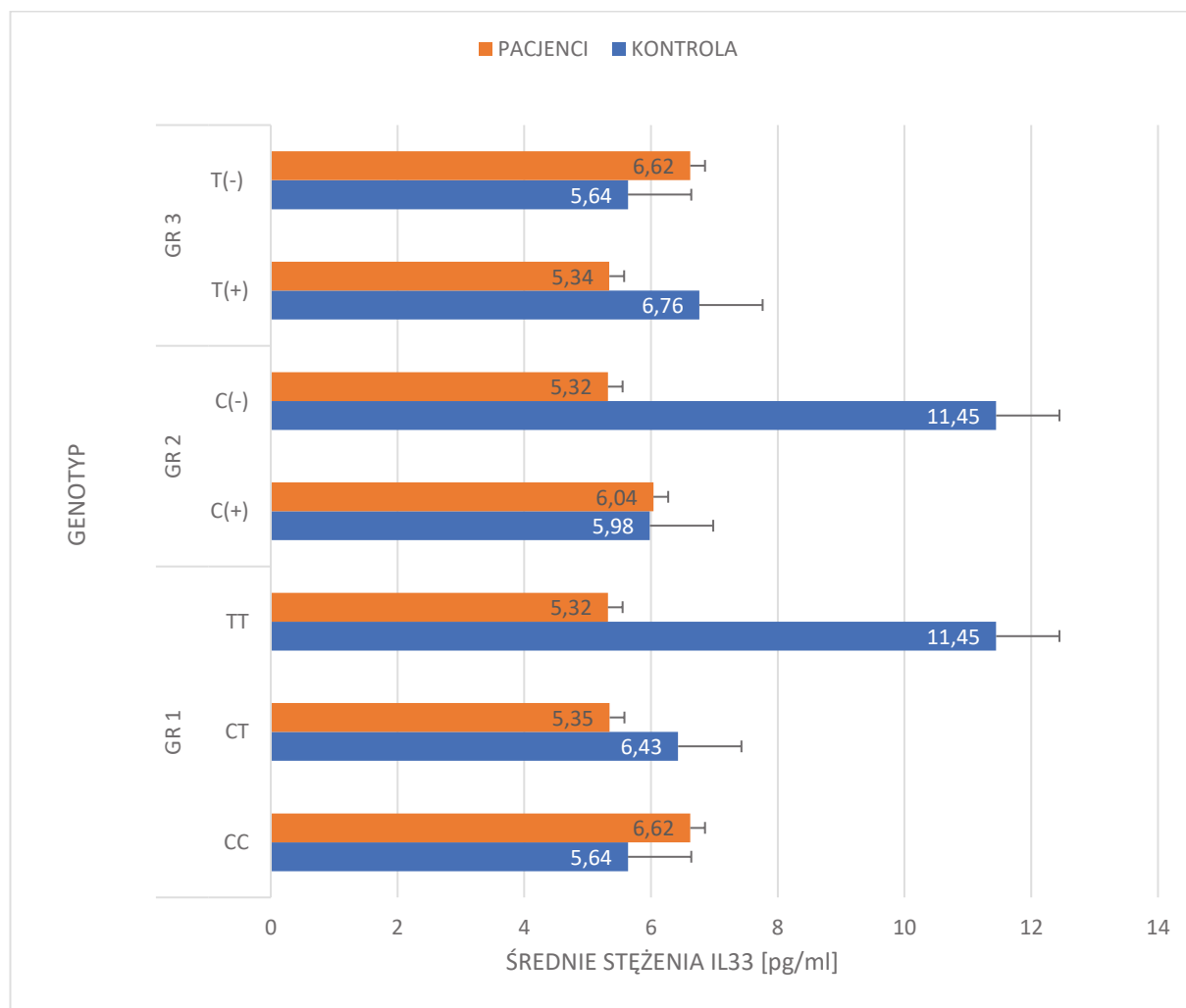


Tabela 21. Średnie poziomy IL-33 [pg/ml] dla poszczególnych polimorficznych genotypów SNP w locus 11877 genu IL-33, porównanie grupy pacjentów i grupy kontrolnej (test Manna-Whitneya, wyniki istotne przy $p < 0,05$).

Podział	Genotyp	Kontrola					Pacjenci					Test U Manna-Whitneya wyniki istotne przy $p < 0,05$		
		Śr. poziom IL-33	Odchylenie stand.	Mediana	Roz. ćw.	Liczba osób	Śr. poziom IL-33	Odchylenie stand.	Mediana	Roz. ćw.	Liczba osób	U	Z	p
GR 1	CC	5,64	2,40	5,47	2,40	36	6,62	3,57	5,89	2,10	44	612,50	1,731	0,083
	CT	6,43	3,46	5,70	3,46	28	5,35	1,32	5,25	1,24	37	422,50	-1,259	0,208
	TT	11,45	11,28	11,45	11,28	2	5,32	0,85	5,63	0,98	7	7,00	-0,146	0,884
GR 2	C (+)	5,98	2,91	5,61	2,30	64	6,04	2,84	5,63	1,58	81	2477,00	0,456	0,648
	C (-)	11,45	11,28	11,45	15,95	2	5,32	0,85	5,63	0,98	7	7,00	-0,146	0,884
GR 3	T (+)	6,76	4,15	5,70	2,51	30	5,34	1,25	5,34	1,21	44	549,50	-1,211	0,226
	T (-)	5,64	2,40	5,47	1,98	36	6,62	3,57	5,89	2,10	44	612,50	1,731	0,083

Roz. ćw. – rozstęp ćwiartkowy; odchylenie stand. – odchylenie standardowe

Wykres i tabela przedstawiają różnice w poziomach IL-33 w grupie pacjentów i osób zdrowych dla poszczególnych typów genotypów SNP w locus 11877 genu IL-33. W grupowaniu 1. udało się zaobserwować wyraźne różnice w poziomie IL-33 dla genotypu TT, a w grupowaniu 2. dla genotypu C (-). Niestety, liczebność podgrup z genotypem TT i C (-) była zbyt mała, aby stwierdzić, czy uzyskane wyniki są istotne statystycznie. W celu dokładniejszej oceny należałoby powiększyć grupę kontrolną tak, aby uzyskać więcej próbek z genotypami TT i C (-).

Wykres 5. Średnie poziomy receptora ST2 [pg/ml] dla poszczególnych polimorficznych genotypów SNP w locus 9894 genu IL-33.

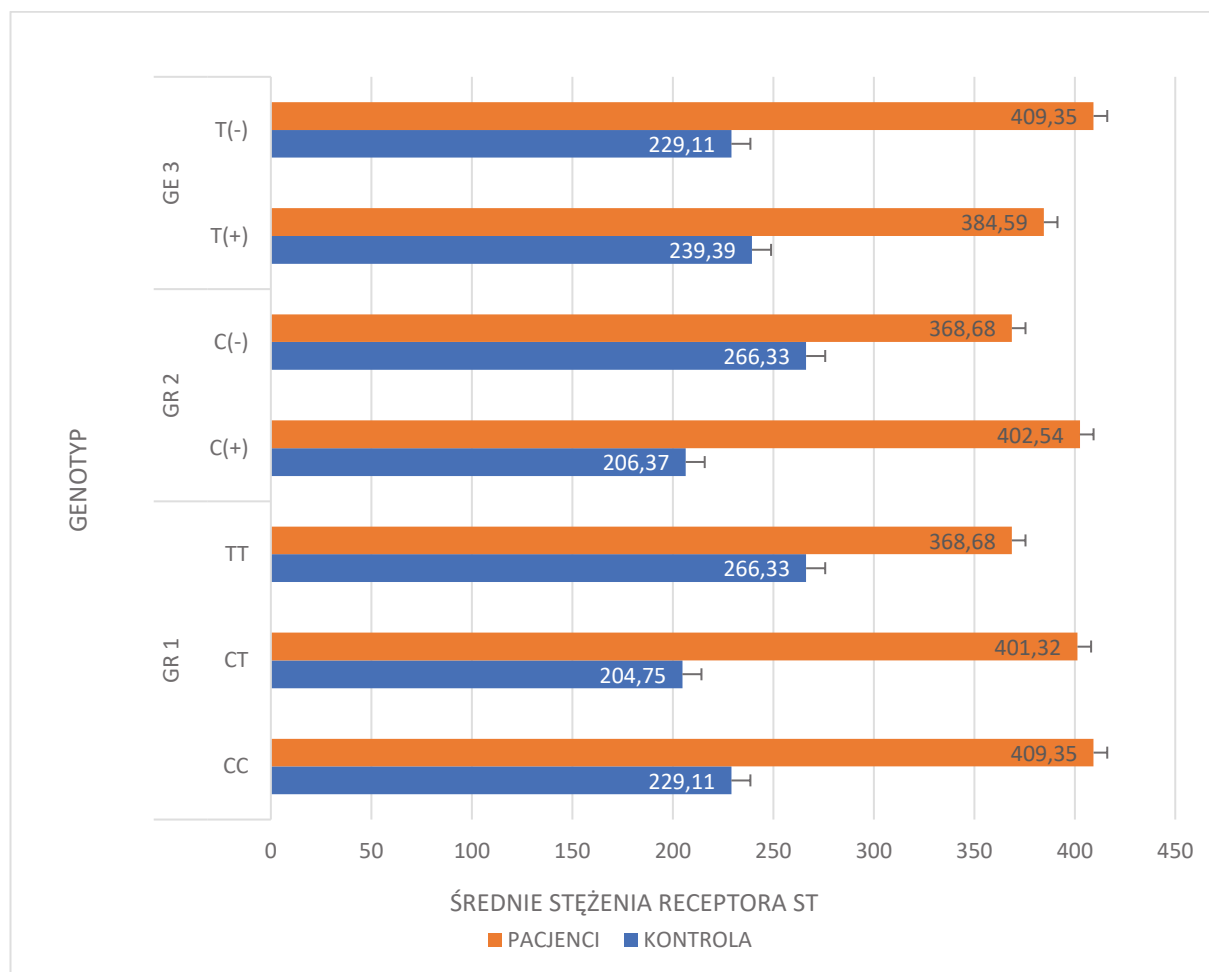


Tabela 22. Średnie poziomy receptora ST2 [pg/ml] dla poszczególnych polimorficznych genotypów SNP w locus 9894 genu IL-33, porównanie grupy pacjentów i grupy kontrolnej (test Manna-Whitneya, wyniki istotne przy $p < 0,05$).

Podział	Genotyp	Kontrola					Pacjenci					Test U Manna-Whitneya wyniki istotne przy $p < 0,05$		
		Śr. poziom rST2	Odchylenie stand.	Mediana	Roz. ćw.	Liczba osób	Śr. poziom rST2	Odchylenie stand.	Mediana	Roz. ćw.	Liczba osób	U	Z	p
GR 1	CC	229,11	252,67	229,11	357,33	2	409,35	201,07	370,91	351,23	7	4,000	0,732	0,464
	CT	204,75	185,90	119,72	178,67	28	401,32	267,44	390,67	214,10	39	266,500	3,547	0,000
	TT	266,33	194,06	247,31	302,41	36	368,68	241,97	337,94	139,00	41	508,000	2,343	0,019
GR 2	C(+)	206,37	185,52	119,72	179,63	30	402,54	256,51	380,79	214,10	46	328,500	3,836	0,000
	C(-)	266,33	194,06	247,31	302,41	36	368,68	241,97	337,94	139,00	41	508,000	2,343	0,019
GR 3	T(+)	239,39	191,52	169,16	259,51	64	384,59	253,61	354,29	215,27	80	1484,000	4,324	0,000
	T(-)	229,11	252,67	229,11	357,33	2	409,35	201,07	370,91	351,23	7	4,000	0,732	0,464

Roz. ćw. – rozstęp ćwiartkowy; odchylenie stand. – odchylenie standardowe; śr. poziom rST2 – średni poziom rST2

Histogram i tabela przedstawiają różnice w poziomach receptora ST2 w grupie pacjentów i osób zdrowych dla poszczególnych typów genotypów SNP w locus 9894 genu IL-33. Istotnie statystycznie różnice zostały zaobserwowane dla genotypów CT, TT, C (+), C (-), T (+). Brak istotności statystycznej dla genotypów CC i T (-) prawdopodobnie wynika ze zbyt małej grupy kontrolnej (n=2).

Wykres 6. Średnie poziomy receptora ST2 [pg/ml] dla poszczególnych polimorficznych genotypów SNP w locus 11877 genu IL-33.

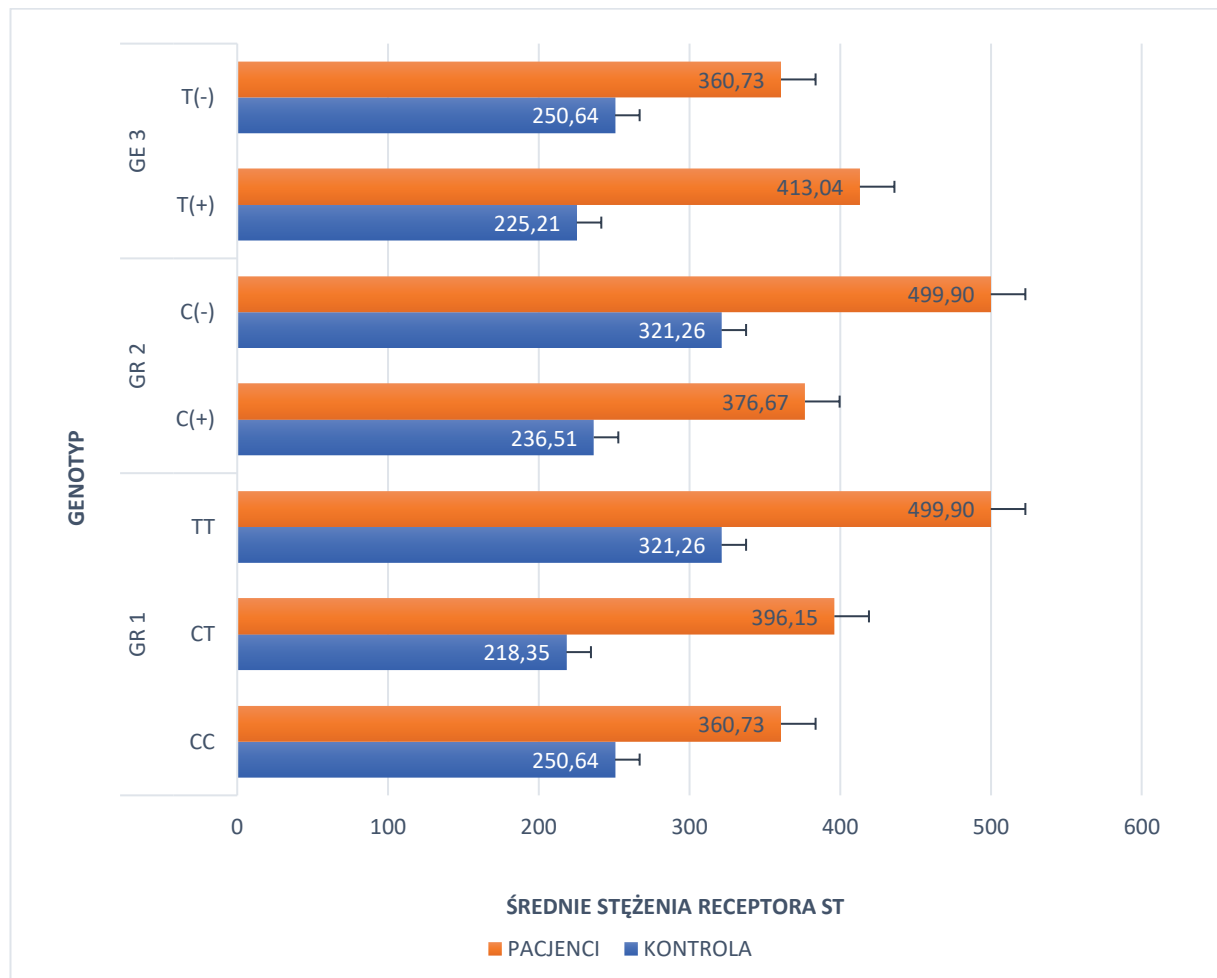


Tabela 23.. Średnie poziomy receptora ST2 [pg/ml] dla poszczególnych polimorficznych genotypów SNP w locus 11877 genu IL-33, porównanie grupy pacjentów i grupy kontrolnej (test Manna-Whitneya, wyniki istotne przy $p < 0,05$).

Podział	Genotyp	Kontrola					Pacjenci					Test U Manna-Whitneya wyniki istotne przy $p < 0,05$		
		Śr. poziom rST2	Odchylenie stand.	Mediana	Roz. ćw.	Liczba osób	Śr. poziom rST2	Odchylenie stand.	Mediana	Roz. ćw.	Liczba osób	U	Z	p
GR 1	CC	250,64	177,28	228,48	266,43	36	360,73	239,75	340,12	188,83	44	527,00	2,558	0,011
	CT	218,35	213,40	121,28	241,26	28	396,15	269,97	351,45	224,76	36	260,50	3,289	0,001
	TT	321,26	122,35	321,26	173,03	2	499,90	174,49	477,18	278,32	7	3,000	1,025	0,306
GR 2	C (+)	236,51	192,97	165,59	263,09	64	376,67	252,76	340,12	209,61	80	1507,00	4,231	0,000
	C (-)	321,26	122,35	321,26	173,03	2	499,90	174,49	477,18	278,32	7	3,00	1,025	0,306
GR 3	T (+)	225,21	208,80	123,13	298,86	30	413,04	258,04	370,91	237,43	43	321,50	3,621	0,000
	T (-)	250,64	177,28	228,48	266,43	36	360,73	239,75	340,12	188,83	44	527,00	2,558	0,011

Roz. ćw. – rozstęp ćwiartkowy; odchylenie stand. – odchylenie standardowe; śr. poziom rST2 – średni poziom rST2

Histogram i tabela przedstawiają różnice w poziomach receptora ST2 w grupie pacjentów i osób zdrowych dla poszczególnych typów genotypów SNP w locus 11877 genu IL-33. Istotnie statystycznie różnice zostały zaobserwowane dla genotypów CC, CT, C (+), T (+), T (-). Brak istotności statystycznej dla genotypów TT i C (-) wynika prawdopodobnie ze zbyt małej grupy kontrolnej (n=2).

Tabela 24. Związek pomiędzy poziomem IL-33 lub receptora ST2 w surowicy a różnymi typami genotypów w locus 9894 genu IL-33.

Poziom	vs.	Genotyp	Grupa	Genotyp			C (+) C (-)		T (+) T (-)		Test	Wartość testu		p
				CC	CT	TT	C (+)	C (-)	T (+)	T (-)				
IL-33	vs.	C (+), C (-)	Kontrola				30	36			M-W test	U = 770,000 Z = -1,614	0,575	
			Pacjenci				47	41			M-W test	U = Z =	0,106	
		CC, CT, TT	Kontrola	2	28	36						K-W test	H = 1,961	0,3752
			Pacjenci	7	40	41						K-W test	H = 2,828	0,2432
	T (+), T (-)	Kontrola						64	2		M-W test	U = 27,500 Z = -1,347	0,178	
		Pacjenci						81	7		M-W test	U = 283,000 Z = 0,000	1,000	
	Receptor ST2	vs.	C (+), C (-)	Kontrola				30	36			M-W test	U = 414,500 Z = -1,610	0,107
				Pacjenci				46	41			M-W test	U = 835,000 Z = 0,914	0,363
CC, CT, TT			Kontrola	2	28	36						K-W test	H = 2,616	0,270
			Pacjenci	7	39	41						K-W test	H = 0,955	0,620
T (+), T (-)		Kontrola						64	2		M-W test	U = 54,000 Z = 0,355	0,722	
		Pacjenci						80	7		M-W test	U = 243,000 Z = -0,570	0,569	

M-W test – test Manna-Whitneya; U, U, Z – wartości statystyki; K-W test – test Kruskala-Wallisa; H – wartość statystyki; p – poziom istotności, Testy są istotne statystycznie, jeżeli $p < 0,05$

W tabeli przedstawiono związek pomiędzy poziomem IL-33 lub stężeniem receptora ST2 a różnymi podziałami genotypów w locus 9894 genu IL-33. Oddzielnej analizie poddano grupę pacjentów i grupę osób zdrowych. Nie udało się stwierdzić istotnego statystycznie związku pomiędzy poziomem IL-33 lub receptora ST2 a genotypami IL-33 w locus 9894.

Tabela 25. Związek pomiędzy poziomem IL-33 lub receptora ST2 w surowicy a różnymi typami genotypów w locus 11877 genu IL-33.

Stężenia vs.	Genotyp	Grupa	CC	CT	TT	C (+)	C (-)	T (+)	T (-)	Test	Wartość testu	p	
IL-33	vs.	C (+), C (-)	Kontrola			64	2			M-W test	U = 56,500 Z = -0,262	0,793	
			Pacjenci			81	7			M-W test	U = 253,0000 Z = 0,46262	0,650	
	vs.	CC, CT, TT	Kontrola	36	28	2					K-W test	H = 1,082120	0,582
			Pacjenci	44	37	7					K-W test	H = 4,967610	<u>0,083</u>
	vs.	T (+), T (-)	Kontrola						74	80	M-W test	U = 432,5000 Z = 0,827619	0,408
			Pacjenci						29	59	M-W test	U = 739,0000 Z = -1,048	0,294
	Receptor ST2	vs.	C (+), C (-)	Kontrola			64	2			M-W test	U = 40,000 Z = -0,879	0,389
				Pacjenci			80	7			M-W test	U = 150,0000 Z = -2,0202	0,043
vs.		CC, CT, TT	Kontrola	36	28	2					K-W test	H = 2,296421	0,317
			Pacjenci	44	36	7					K-W test	H = 4,497712	0,106
vs.		T (+), T (-)	Kontrola						23	43	M-W test	U = 432,500 Z = 0,828	0,407
			Pacjenci						29	58	M-W test	U = 838,500 Z = 0,018	0,982

M-W test – test Manna-Whitneya; U, U, Z – wartości statystyki; K-W test – test Kruskala-Wallis; H – wartość statystyki; p – poziom istotności, testy są istotne statystycznie, jeżeli $p < 0,05$

W tabeli przedstawiono związek pomiędzy poziomem IL-33 lub stężeniem receptora ST2 a różnymi podziałami genotypów w locus 11877 genu IL-33. Oddzielnej analizie poddano grupę pacjentów i grupę osób zdrowych.

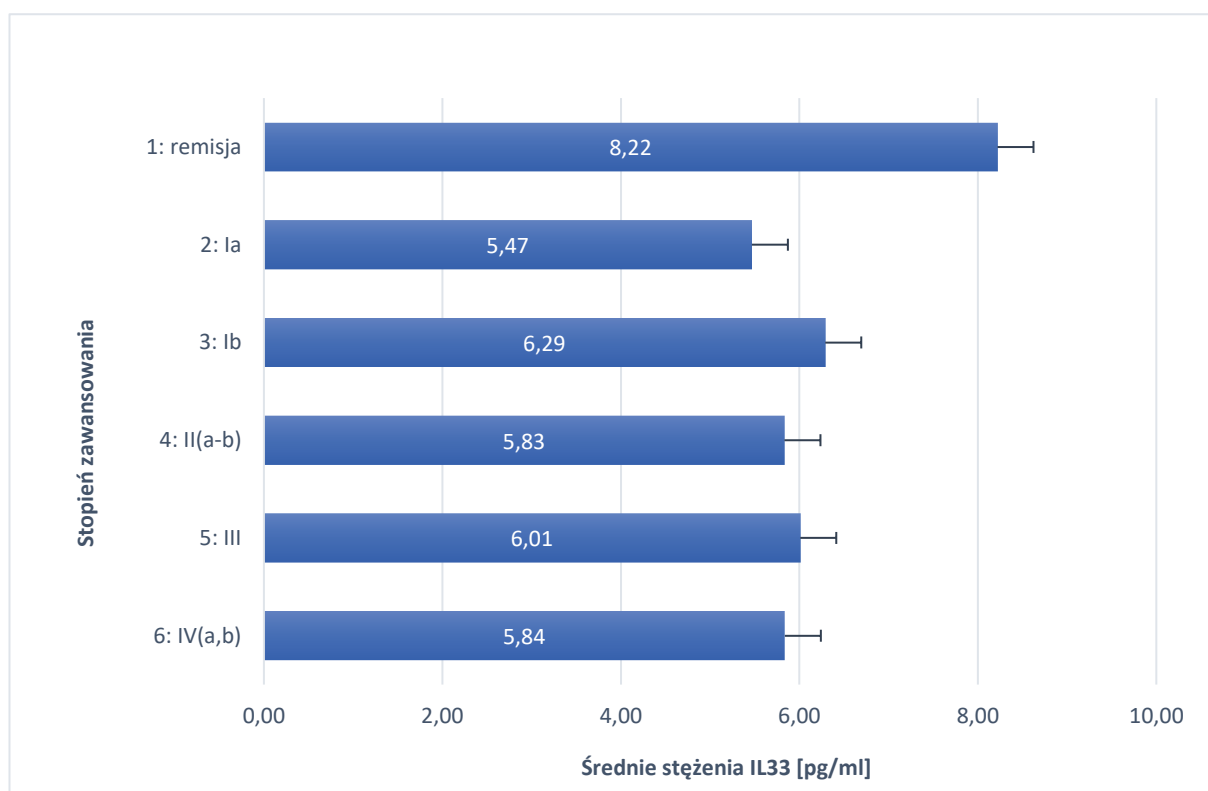
W badaniu został wykazany istotny statystycznie związek pomiędzy poziomem receptora ST2 a genotypami C (+) i C (-) w grupie pacjentów ($p=0,043$).

7.5 Analiza poziomów IL-33 i receptora ST2 w zależności od stadium ziarniniaka grzybiastego

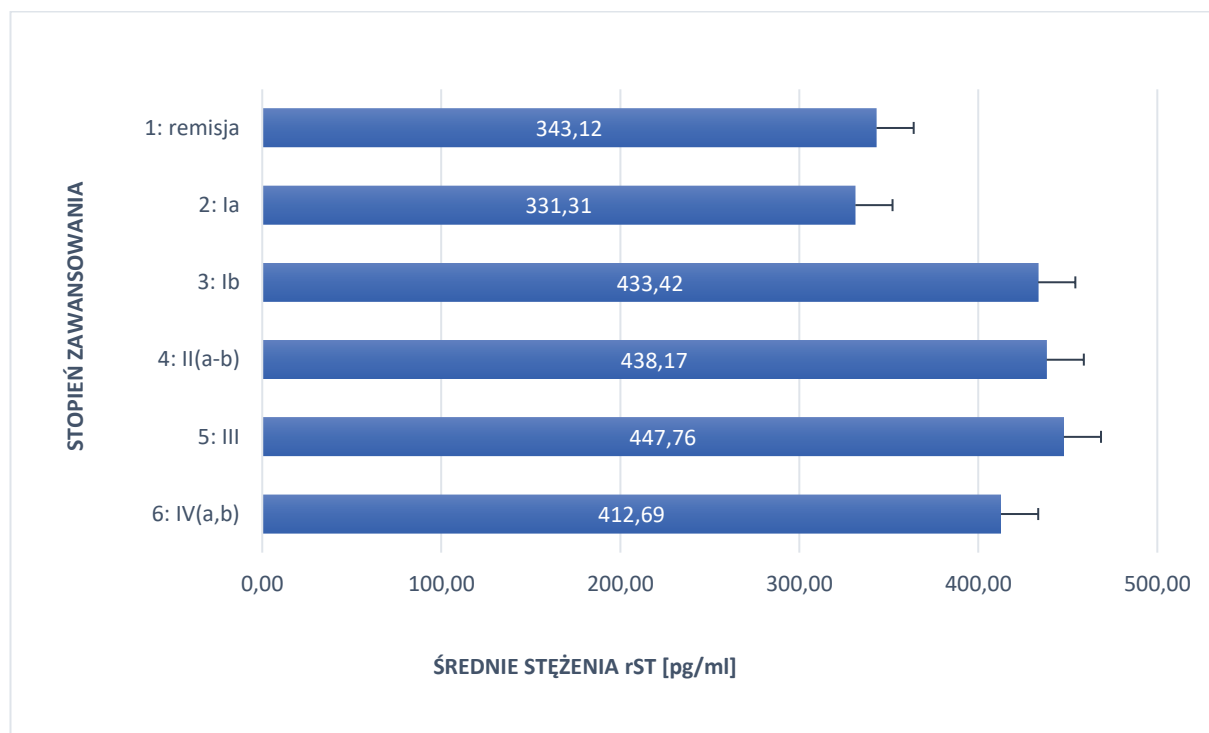
Tabela 26. Średnie poziomy IL-33 i rST w surowicy w poszczególnych stadiach choroby.

	L. os. IL-33	L. os rST2	Średnia IL-33	Średnia rST2	Odch. st. IL-33	Odch. st. rST2
1: remisja	6	6	8,22	343,12	4,24	203,64
2: Ia	31	30	5,47	331,31	1,43	282,08
3: Ib	24	24	6,29	433,42	4,16	284,82
4: II(a-b)	12	12	5,83	438,17	1,94	193,71
5: III	6	6	6,01	447,76	1,38	100,68
6: IV(alb)	7	7	5,84	412,69	0,85	169,55
Suma końcowa	86	85	6,01	390,98	2,76	249,52

Wykres 7. Średnie stężenia IL-33 w poszczególnych stadiach MF.



Wykres 8. Średnie stężenia rST2 w poszczególnych stadiach MF.



Najwyższy poziom IL-33 zaobserwowano u pacjentów, u których wystąpiła remisja. Niższy poziom receptora ST2 stwierdzono w stadium Ia I remisji.

Tabela 27. Analiza różnic częstości genotypów w zależności od stadium choroby.

Locus	Genotyp	Stadium	L. os.		Stadium	L. os.	Test statystyczny badający zależność	Wartość p
IL-33 9894	CC CT TT	Rem. + st. 1A-2B	64	vs	st. 2B-4B	23	Liczebność genotypów w poszczególnych stadiach wykluczała możliwość zastosowania testu χ^2	
		Rem. +1A	38	vs	st. 1B-4B	49		
		St. 1A	32	vs	Rem.	6		
	C (+) C (-)	Rem. + st. 1A-2B	64	vs	st. 2B-4B	23	Dokładny test Fishera	0,225
		Rem. +1A	38	vs	st. 1B-4B	49	Dokładny test Fishera	0,670
		St. 1A	32	vs	Rem.	6	Dokładny test Fishera	0,660
	T (+) T (-)	Rem. + st.1A-2B	64	vs	st. 2B-4B	23	Dokładny test Fishera	0,182
		Rem. +1A	38	vs	st. 1B-4B	49	Dokładny test Fishera	0,694
		St. 1A	32	vs	Rem.	6	Dokładny test Fishera	1,000
IL33 11877	CC CT TT	Rem. + st.1A-2B	64	vs	st. 2B-4B	23	Liczebność genotypów w poszczególnych stadiach wykluczała możliwość zastosowania testu χ^2	
		Rem. +1A	38	vs	st. 1B-4B	49		
		St. 1A	32	vs	Rem.	6		
	C (+) C (-)	Rem. + st.1A-2B	64	vs	st. 2B-4B	23	Dokładny test Fishera	0,182
		Rem. +1A	38	vs	st. 1B-4B	49	Dokładny test Fishera	1,000
		St. 1A	32	vs	Rem.	6	Dokładny test Fishera	0,412
	T (+) T (-)	Rem. + st.1A-2B	64	vs	st. 2B-4B	23	Dokładny test Fishera	0,145
		Rem. +1A	38	vs	st. 1B-4B	49	Dokładny test Fishera	0,198
		St. 1A	32	vs	Rem.	6	Dokładny test Fishera	1,000

Testy są istotne, jeżeli $p < 0,05$

Liczebność genotypów w poszczególnych stadiach wykluczała możliwość zastosowania testu χ^2 , dlatego porównano tylko częstości genotypów C (+) i C (-) oraz T (+) i T (-) przy użyciu dokładnego testu Fishera. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w częstościach genotypów pomiędzy poszczególnymi stadiami.

Tabela 28. Porównanie poziomów IL-33 oraz poziomów receptora ST2 w poszczególnych stadiach MF.

		Test Manna-Whitneya				Liczebność badanych grup		
		Rank Sum	Rank Sum	U	Z	p	L. os.	L. os.
REMISJA vs IA								
zmienna	REMISJA	IA					REMISJA	IA
IL-33	153,000	550,000	54,000	1,586	0,113	6	31	
rST2	125,000	541,000	76,000	0,573	0,567	6	30	
ZDROWI vs REMISJA								
	ZDROWI	REMISJA				ZDROWI	REMISJA	
IL-33	2339,500	288,500	128,500	-1,406	0,160	66	6	
rST2	2341,000	287,000	130,000	-1,375	0,169	66	6	
ZDROWI vs IA								
	ZDROWI	IA				ZDROWI	IA	
IL-33	3295,500	1457,500	961,500	0,472	0,637	66	31	
rST2	2927,500	1728,500	716,500	-2,158	0,031	66	30	
ZDROWI vs IB								
	ZDROWI	IB				ZDROWI	IB	
IL-33	2983,500	1111,500	772,500	-0,173	0,862	66	24	
rST2	2592,000	1503,000	381,000	-3,745	0,000	66	24	
ZDROWI vs IIA, B								
	ZDROWI	IIA, B				ZDROWI	IIA, B	
IL-33	2606,500	474,500	395,500	0,000	1,000	66	12	
rST2	2374,000	707,000	163,000	-3,220	0,001	66	12	
ZDROWI vs III								
	ZDROWI	III				ZDROWI	III	
IL-33	2356,000	272,000	145,000	-1,070	0,285	66	6	
rST2	2280,000	348,000	69,000	-2,618	0,009	66	6	
ZDROWI vs IVA, B								
	ZDROWI	IVA, B				ZDROWI	IVA, B	
IL-33	2409,500	291,500	198,500	-0,600	0,549	66	7	
rST2	2330,000	371,000	119,000	-2,089	0,037	66	7	
ZDROWI vs IA-IIA								
	ZDROWI	IA-IIA				ZDROWI	IA-IIA	
IL-33	4144,000	3482,000	1829,000	0,261	0,794	66	57	
rST2	3342,500	4160,500	1131,500	-3,679	0,000	66	56	
ZDROWI vs IIB-IVB								
	ZDROWI	IIB-IVB				ZDROWI	IIB-IVB	
IL-33	2874,000	1131,000	663,000	-0,895	0,371	66	23	
rST2	2528,000	1477,000	317,000	-4,138	0,000	66	23	
REMISJA vs IA-IVB								
	REMISJA	IA-IVB				REMISJA	IA-IVB	
IL-33	241,000	3414,000	220,000	-0,283	0,777	6	79	
rST2	356,000	3385,000	145,000	1,602	0,109	6	80	
REMISJA vs IA-IIA								
	REMISJA	IA-IIA				REMISJA	IA-IIA	
IL-33	261,500	1754,500	101,500	1,616	0,106	6	57	
rST2	189,000	1764,000	168,000	-0,012	0,991	6	56	
REMISJA vs IIB-IVB								
	REMISJA	IIB-IVB				REMISJA	IIB-IVB	
IL-33	115,500	319,500	43,500	1,346	0,178	6	23	
rST2	73,000	362,000	52,000	-0,888	0,374	6	23	
IA vs IIB-IVB								
	IA	IIB-IVB				IA	IIB-IVB	
IL-33	778,500	706,500	282,500	-1,286	0,199	31	23	
rST2	637,500	793,500	172,500	-3,087	0,002	30	23	

M-W test – test Manna-Whitneya; U, U, Z- wartości statystyki | K-W test – test Kruskala-Wallisa, H – wartość statystyki | p – poziom istotności, testy są istotne statystycznie, jeżeli $p < 0,05$

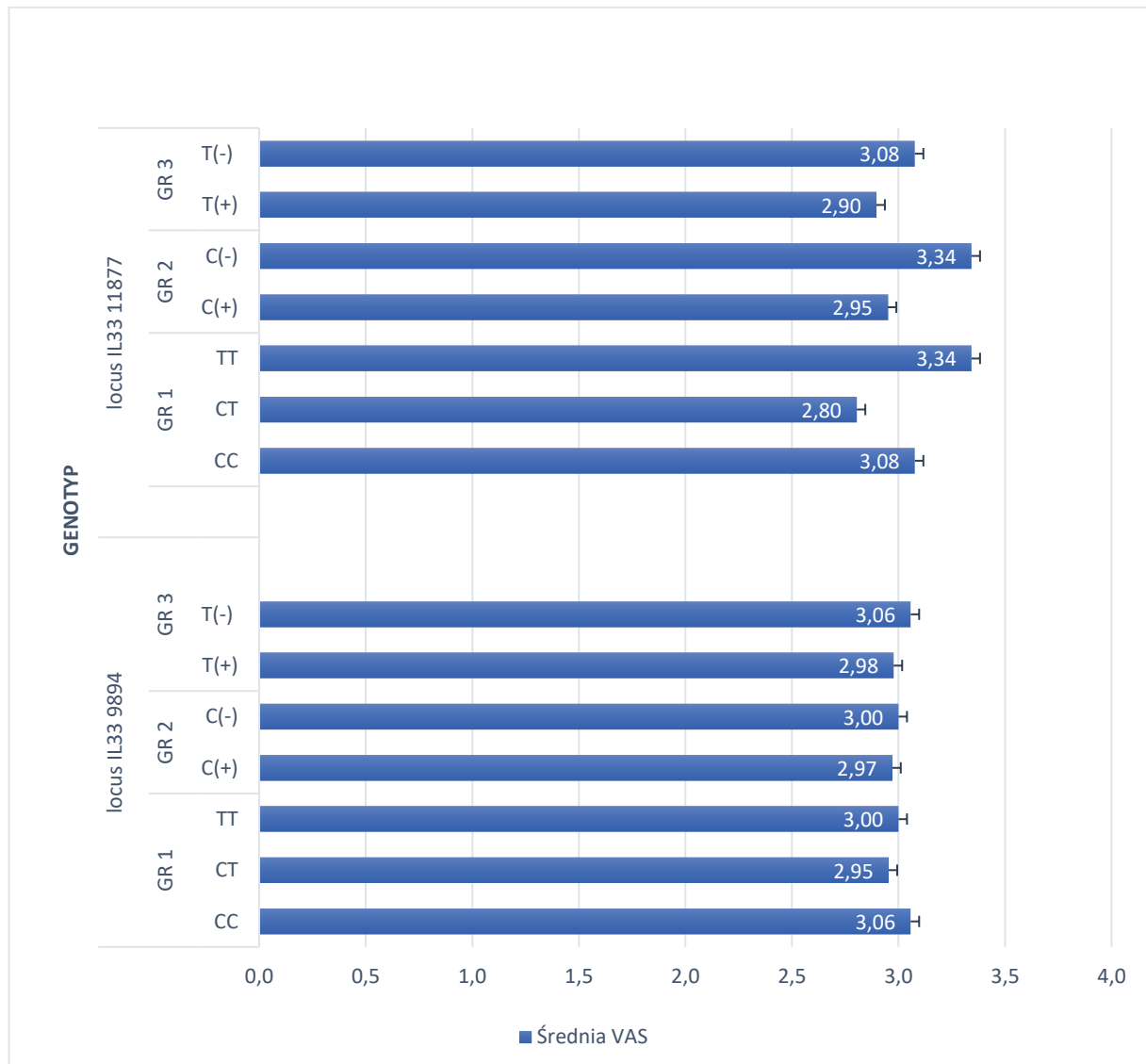
W analizie za pomocą testu Manna-Whitneya porównano poziomy IL-33 lub receptora ST2 w poszczególnych stadiach choroby. Istotne statystycznie różnice stwierdzono tylko dla receptora ST2. W badaniu istotnie różniły się następujące grupy: zdrowi vs IA ($p=0,031$), zdrowi vs IIA, B ($p=0,000$),

zdrowi vs IIA, B ($p=0,001$), zdrowi vs III ($p=0,009$), zdrowi vs IVA, B ($p=0,037$), zdrowi vs IA-IIA ($p=0,037$), IA vs IIB-IVB ($p=0,002$).

7.6 Analiza nasilenia świądu w zależności od genotypów SNP

Do oceny nasilenia świądu wykorzystano dwie skale: wizualną skalę analogową (VAS, ang. *Visual Analogue Scale*) oraz skalę numeryczną (NRS, ang. *Numeric Rating Scale*).

Wykres 9. Średnie poziomy VAS w zależności od polimorficznego genotypu w locus 9894 i 11877 genu IL-33.



Wykres przedstawia średnie poziomy VAS dla poszczególnych typów genotypów. Na podstawie analizy histogramu zaobserwowano niewielkie różnice w poziomie VAS dla locus 11877 (najwyższy poziom dla genotypu TT, a najniższy dla genotypu CC). W przypadku locus 9894 poziomy VAS były na podobnym poziomie.

Wykres 10. Średnie poziomy NRS w zależności od polimorficznego genotypu w locus 9894 i 11877 genu IL-33.

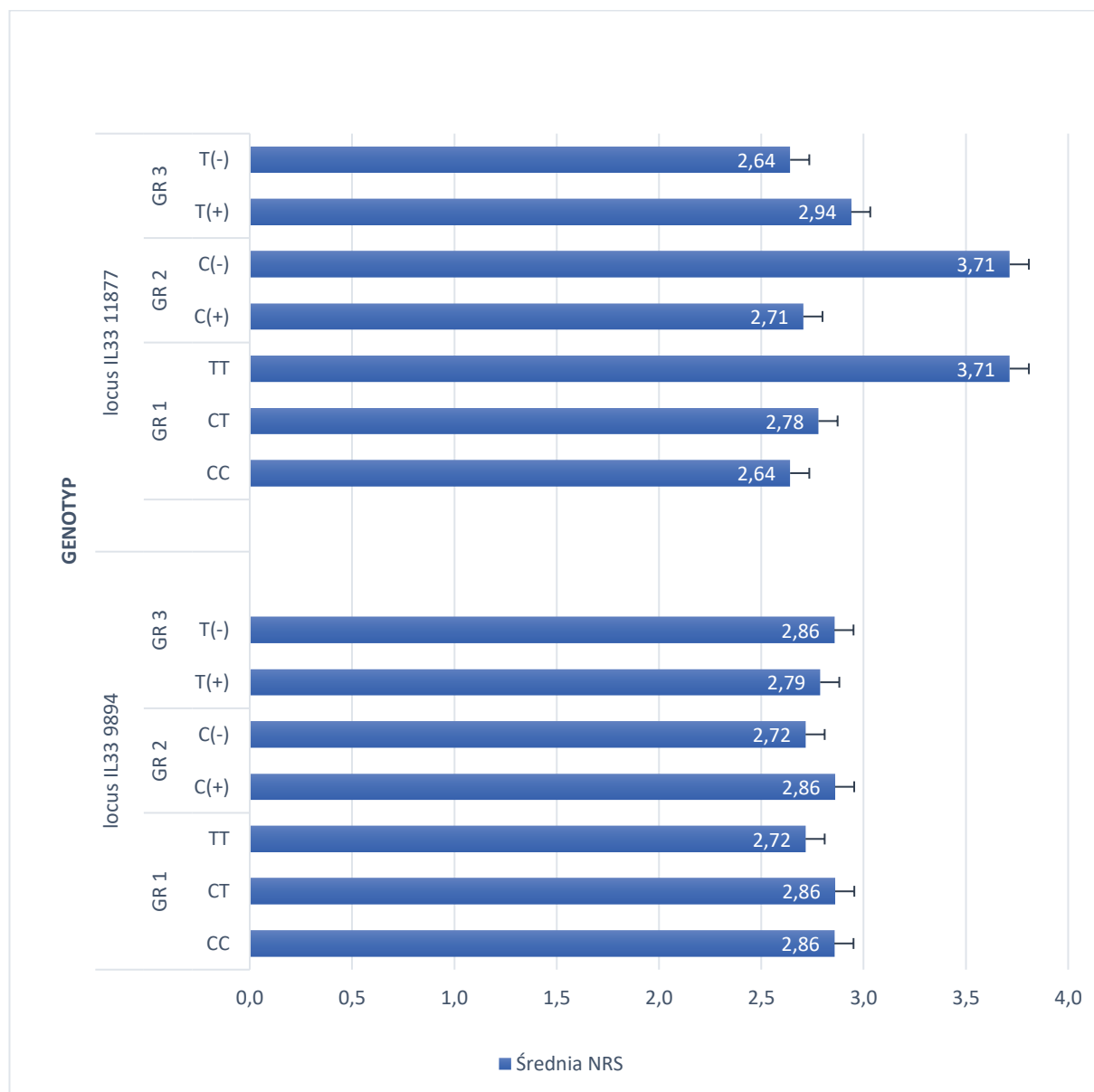


Tabela 29. VAS i NRS: porównanie pomiędzy genotypami SNP w locus 9894 i 11877 genu IL-33.

VAS NRS	vs	genotyp	Locus IL-33	CT	C (+)	TT (C-)	T (+)	CC (T-)	Test		Wartość testu	p	
Poziom VAS	vs	C (+), C (-)	9894		43	37			M-W test	U =	770,500	0,813	
									Z =	229,500			
		11877			73	7			M-W test	U =	229,500	0,665	
									Z =	-0,434			
		CC, CT, TT	9894	36		37		7	K-W test	H =	0,159	0,924	
			11877	34		7		39	K-W test	H =	0,338	0,845	
		T (+), T (-)	9894					73	7	M-W test	U =	234,000	0,726
										Z =	-0,358		
11877						41	39	M-W test	U =	777,500	0,836		
								Z =	-0,207				
Poziom NRS	vs	C (+), C (-)	9894		43	37			M-W test	U =	749,500	0,661	
									Z =	0,439			
		11877			73	7			M-W test	U =	205,000	0,403	
									Z =	-0,851			
		CC, CT, TT	9894	36		37		7	K-W test	H =	0,337	0,845	
			11877	34		7		39	K-W test	H =	0,770	0,680	
		T (+), T (-)	9894					73	7	M-W test	U =	228,000	0,652
										Z =	-0,460		
11877						41	39	M-W test	U =	771,000	0,789		
								Z =	0,270				

M-W test – test Manna-Whitneya; U, U, Z – wartości statystyki; K-W test – test Kruskala-Wallisa; H – wartość statystyki; p – poziom istotności, testy są istotne statystycznie, jeżeli $p < 0,05$

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w wartościach VAS i NRS pomiędzy poszczególnymi genotypami SNP w locus 9894 i 11877 genu IL-33.

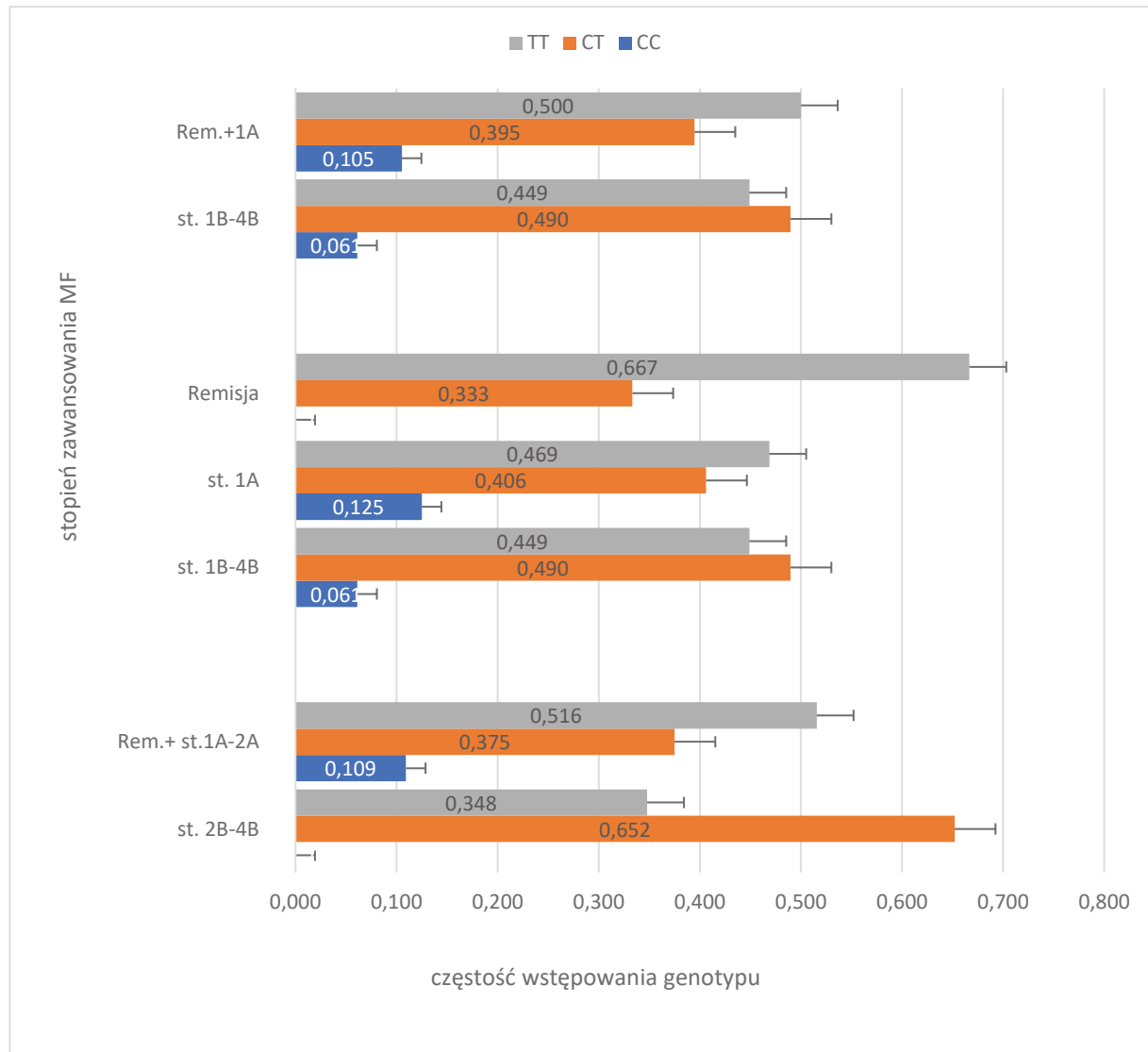
Tabela 30. Korelacje rang Spearmana między IL-33 a rST oraz między IL-33 lub rST a VAS lub NRS w grupie pacjentów.

	Liczba osób	R - współczynnik korelacji rang Spearmana	p
IL-33 vs rST	87	0,053	0,628
IL-33 vs VAS	80	0,002	0,989
IL-33 vs NRS	80	-0,011	0,922
rST vs VAS	79	0,025	0,829
rST vs NRS	79	0,018	0,872
VAS vs NRS	79	0,968	0,000

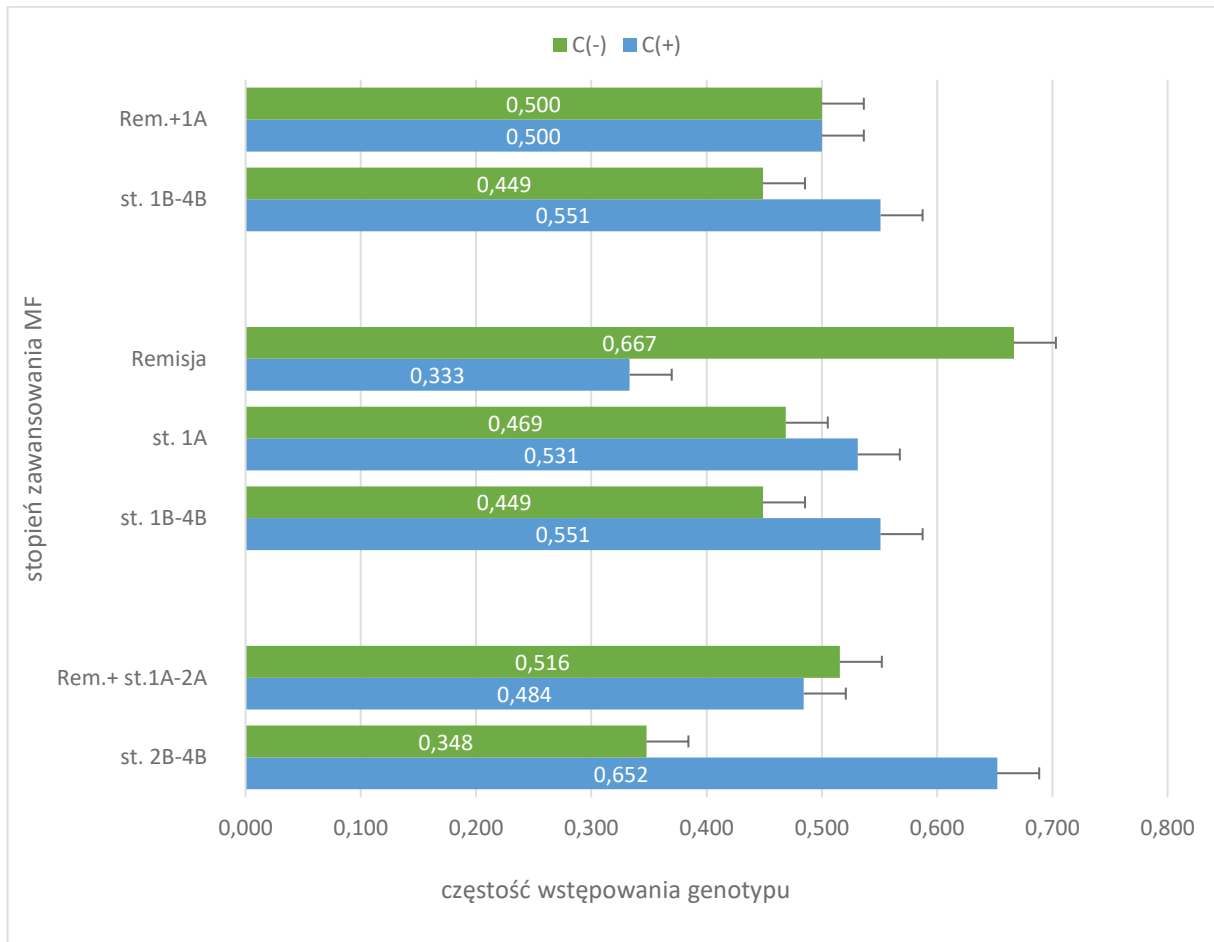
Istotne statystycznie korelacje ($p < 0,05$) wykazano pomiędzy średnimi wartościami VAS i NRS. Nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji między poziomem IL-33 a poziomem rST oraz między poziomem IL-33 lub rST a wartościami VAS lub NRS.

7.7 Analiza częstości występowania genotypów SNP w zależności od stadium ziarniniaka grzybiastego

Wykres 11. Częstość występowania genotypów w zależności od stopnia zaawansowania choroby dla locus 9894 genu IL-33 (grupowanie 1.: genotypy CC, CT, TT).



Wykres 12. Wykres 12. Częstość występowania genotypów w zależności od stopnia zaawansowania choroby dla locus 9894 genu IL-33 [grupowanie 2.: genotypy C (+), C (-)].



Wykres 13. Wykres 13. Częstość występowania genotypów w zależności od stopnia zaawansowania choroby dla locus 9894 genu IL-33 [grupowanie 3.: genotypy T (+), T (-)].

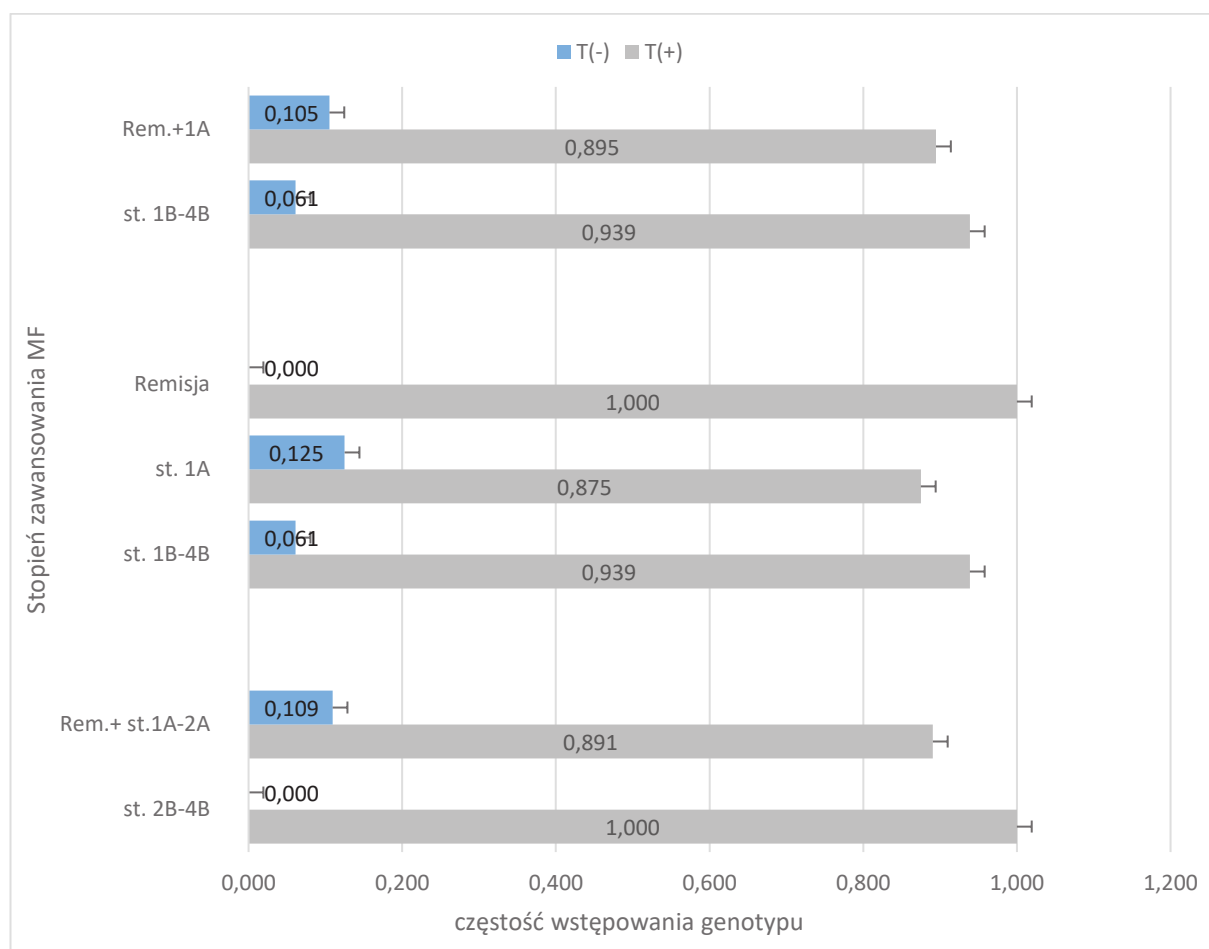
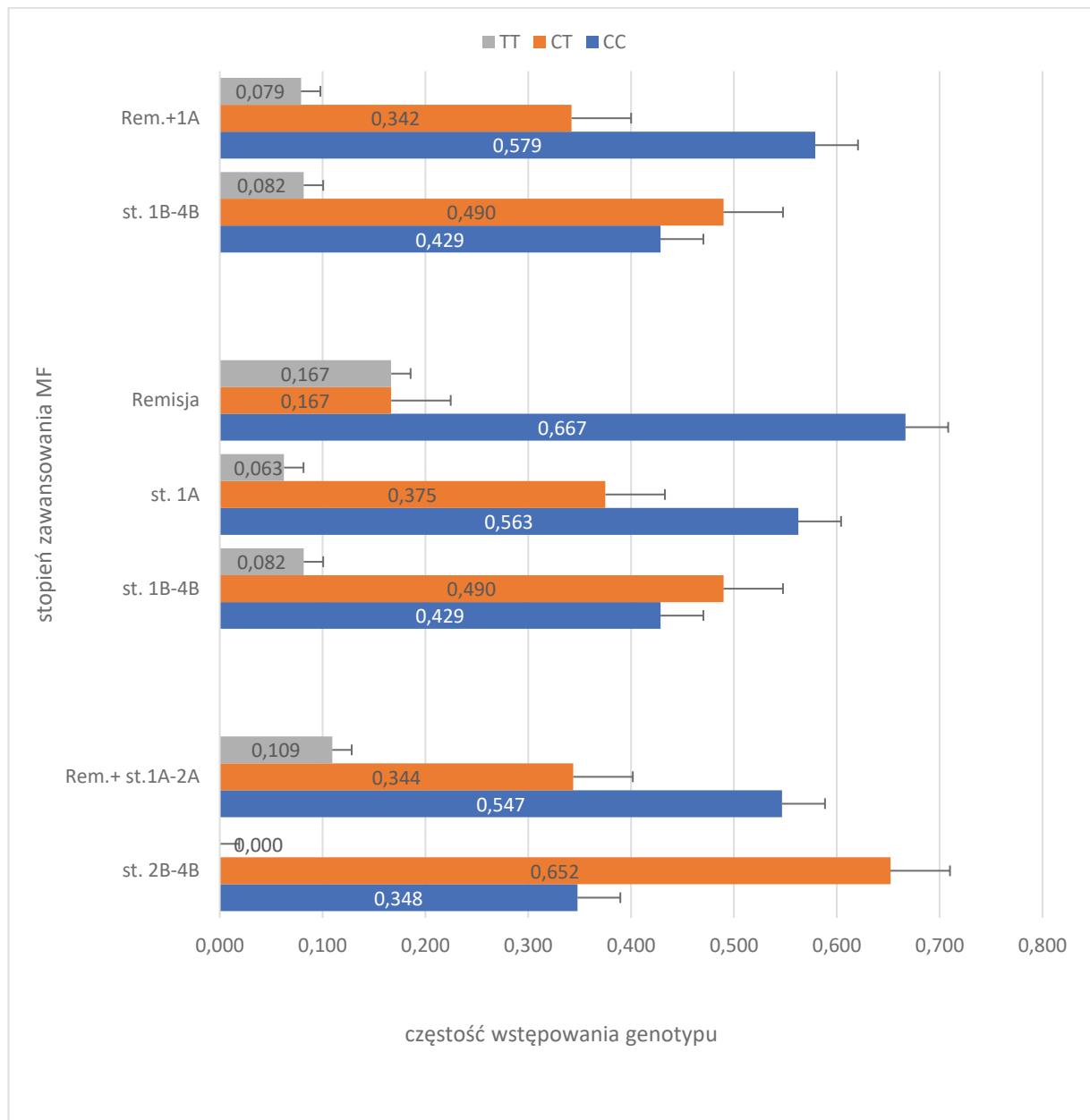


Tabela 31. Częstość występowania genotypów w zależności od stopnia zaawansowania choroby dla locus 9894 genu IL-33.

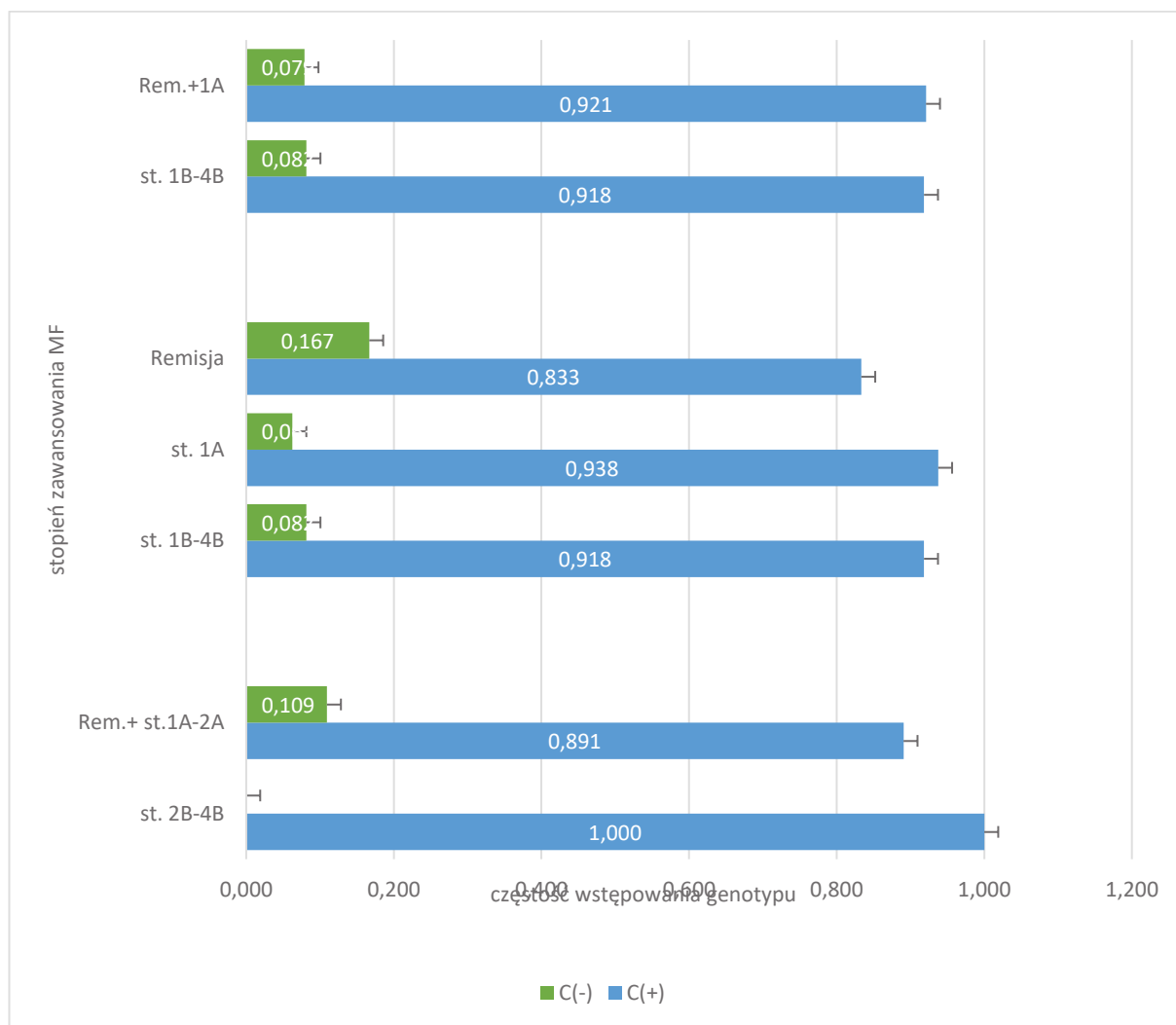
Genotyp	Rem. + st. 1A-2A	st. 2B-4B	Remisja	st. 1A	st. 1B-4B	Rem. +1A	st. 1B-4B
CC	0,109	0,000	0,000	0,125	0,061	0,105	0,061
CT	0,375	0,652	0,333	0,406	0,490	0,395	0,490
TT	0,516	0,348	0,667	0,469	0,449	0,500	0,449
C (+)	0,484	0,652	0,333	0,531	0,551	0,500	0,551
C (-)	0,516	0,348	0,667	0,469	0,449	0,500	0,449
T (+)	0,891	1,000	1,000	0,875	0,939	0,895	0,939
T (-)	0,109	0,000	0,000	0,125	0,061	0,105	0,061
L. os.	64	23	6	32	49	38	49

Na podstawie analizy histogramu stwierdzono brak genotypu CC u pacjentów, u których wystąpiła remisja. W stopniu 1B-4B i stopniu 2B-4B zaobserwowano najczęstsze występowanie genotypu CT.

Wykres 14. Częstość występowania genotypów w zależności od stopnia zaawansowania choroby dla locus 11877 genu IL-33 (grupowanie 1.: genotypy CC, CT, TT).



Wykres 15. Częstość występowania genotypów w zależności od stopnia zaawansowania choroby dla locus 11877 genu IL-33 [grupowanie 2.: genotypy C (+), C (-)].



Wykres 16. Częstość występowania genotypów w zależności od stopnia zaawansowania choroby dla locus 11877 genu IL-33 [grupowanie 3.: genotypy T (+), T (-)].

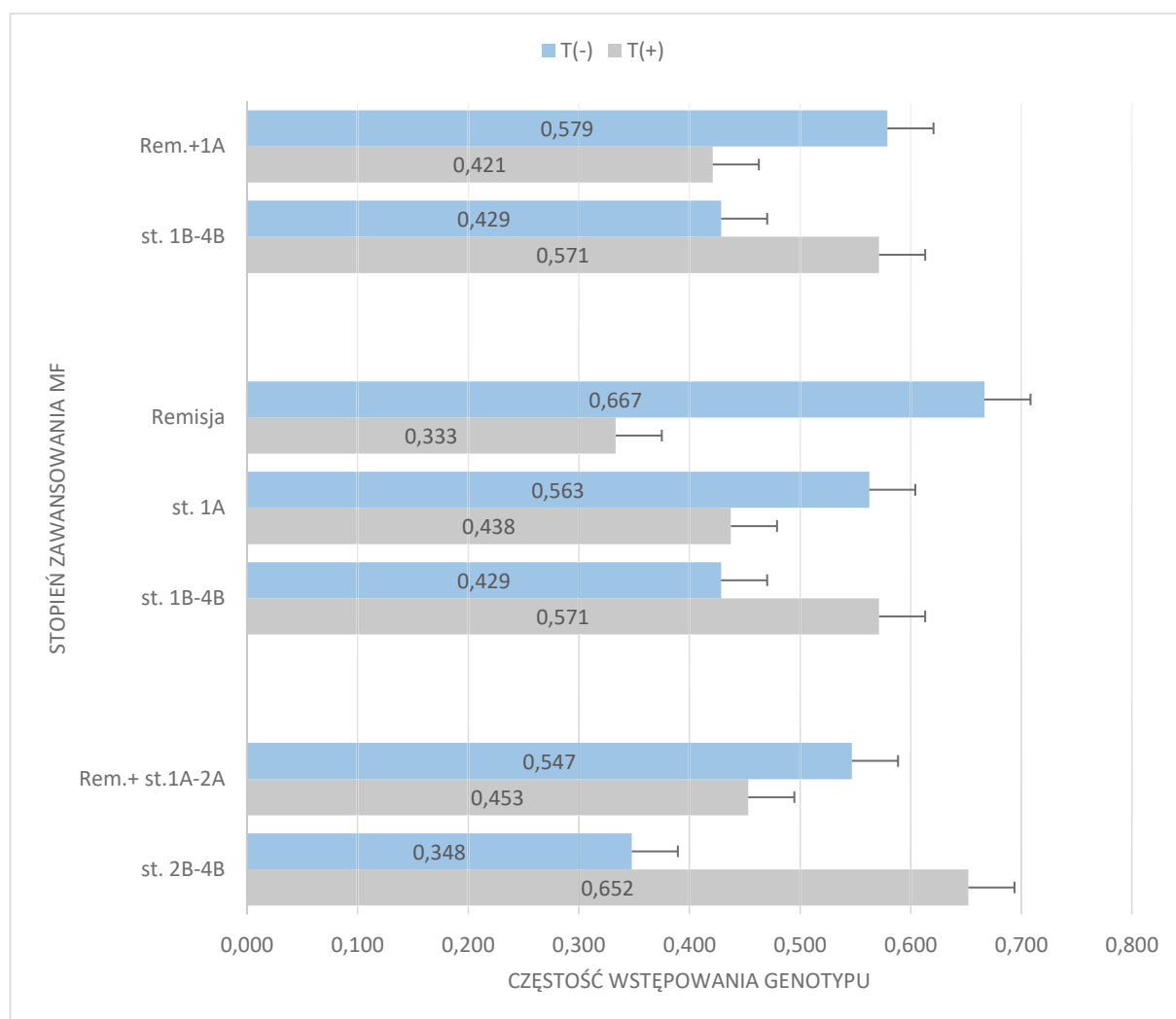


Tabela 32. Częstość występowania genotypów w zależności od stopnia zaawansowania choroby dla locus 11877 genu IL-33.

Genotyp	Rem. + st.1A-2A	st. 2B-4B	Remisja	st. 1A	st. 1B-4B	Rem. +1A	st. 1B-4B
CC	0,547	0,348	0,667	0,563	0,429	0,579	0,429
CT	0,344	0,652	0,167	0,375	0,490	0,342	0,490
TT	0,109	0,000	0,167	0,063	0,082	0,079	0,082
C (+)	0,891	1,000	0,833	0,938	0,918	0,921	0,918
C (-)	0,109	0,000	0,167	0,063	0,082	0,079	0,082
T (+)	0,453	0,652	0,333	0,438	0,571	0,421	0,571
T (-)	0,547	0,348	0,667	0,563	0,429	0,579	0,429
L. osób	64	23	6	32	49	38	49

Na podstawie analizy histogramu stwierdzono najczęstsze występowanie genotypu CC u pacjentów z remisją, a rzadsze u pacjentów w stadiach bardziej zaawansowanych. W przypadku genotypu CT wystąpiła odwrotna zależność.

7.8 Poziomy IL-33 i receptora ST2 w zależności od genotypu dla poszczególnych stadiów ziarniniaka grzybiastego

Wykres 17. Poziomy IL-33 dla poszczególnych genotypów w locus 9894 w zależności od stadium MF.

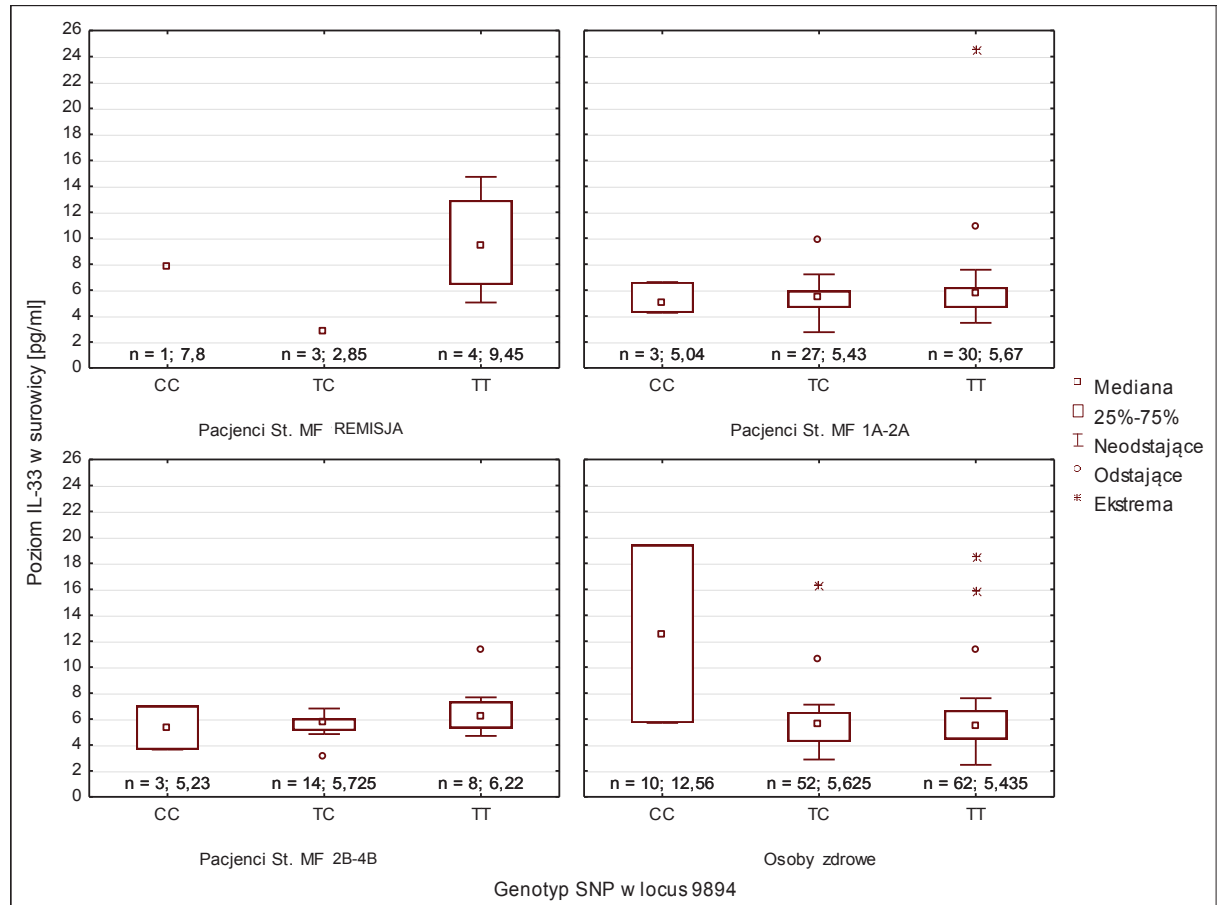


Tabela 33. Sprawdzenie, czy występują istotne statystycznie różnice w poziomie IL-33 (pg/ml) dla poszczególnych genotypów SNP w zależności od stadium choroby (test Kruskala-Wallis).

Grupa	Wartość statystyki	Wartość p
Grupa Pacjenci REMISJA	KW-H (2;6) = 2,2978;	p = 0,3170
Grupa Pacjenci st.1A-2A	KW-H (2;57) = 0,5545	p = 0,7578
Grupa Pacjenci st. 2B-4B	KW-H (2;23) = 1,8565	p = 0,3952
Grupa Osoby zdrowe	KW-H (2;66) = 1,9606	p = 0,3752

Testy są istotne statystycznie, jeżeli $p < 0,05$

Na podstawie analizy nie udało się stwierdzić istotnych statystycznie różnic w poziomach IL-33 pomiędzy genotypami SNP w locus 9894 CC, CT, TT.

Wykres 18. Poziomy receptora ST2 dla poszczególnych genotypów w locus 9894 w zależności od stadium MF.

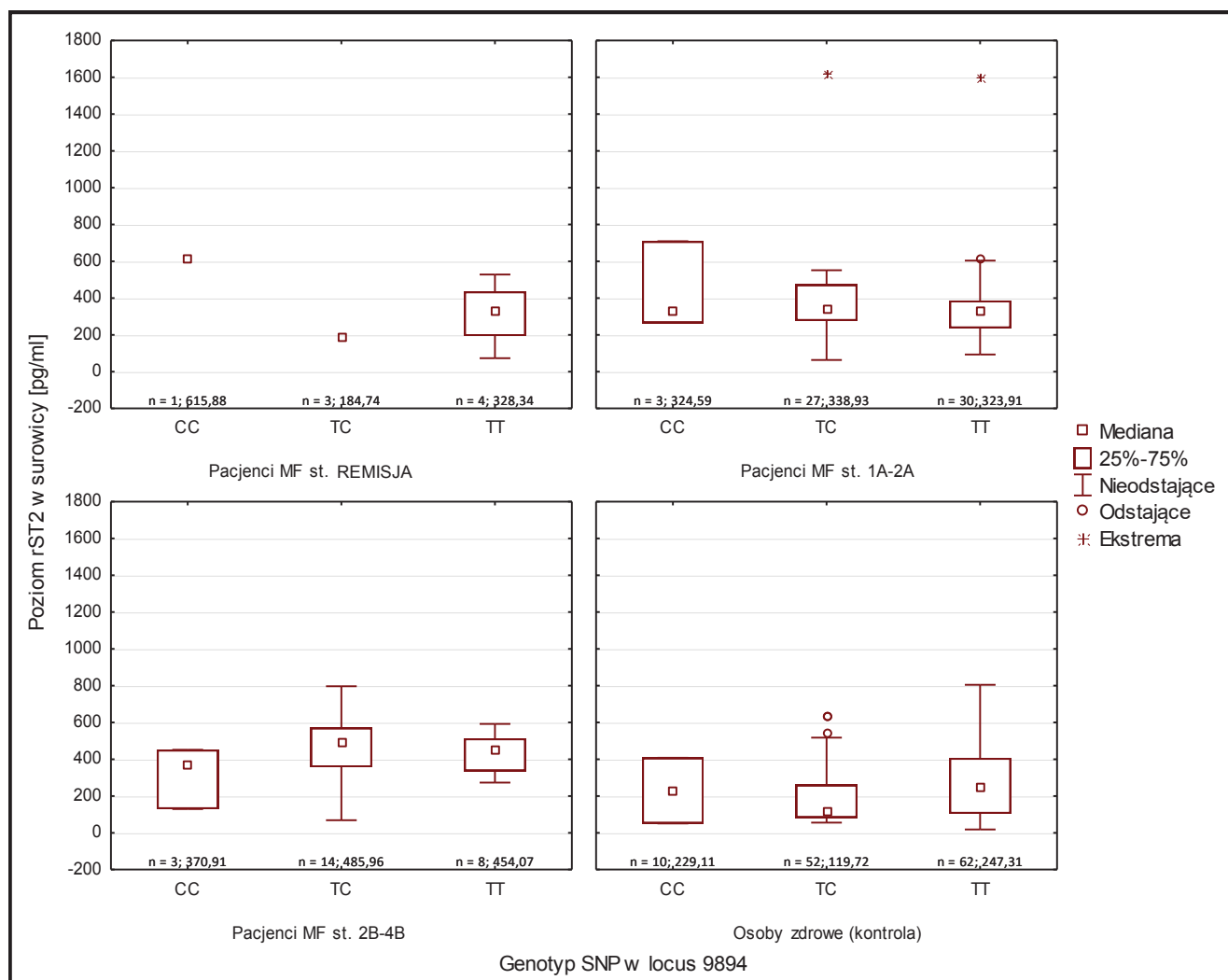


Tabela 34. Sprawdzenie, czy występują istotne statystycznie różnice w poziomie receptora ST2 (pg/ml) dla poszczególnych genotypów SNP w zależności od stadium choroby (test Kruskala-Wallis).

Grupa	Wartość statystyki	Wartość p
Grupa Pacjenci REMISJA	KW-H (2;6) = 2,5;	p = 0,2865
Grupa Pacjenci st.1A-2A	KW-H (2;56) = 0,8728	p = 0,6464
Grupa Pacjenci st. 2B-4B	KW-H (2;23) = 2,0507	p = 0,3587
Grupa Osoby zdrowe	KW-H (2;66) = 2,6161	p = 0,2703

Testy są istotne statystycznie, jeżeli $p < 0,05$

Na podstawie analizy nie udało się stwierdzić istotnych statystycznie różnic w poziomach receptora ST2 pomiędzy genotypami SNP w locus 9894 CC, CT, TT.

Wykres 19. Poziomy IL-33 dla poszczególnych genotypów w locus 11877 w zależności od stadium MF.

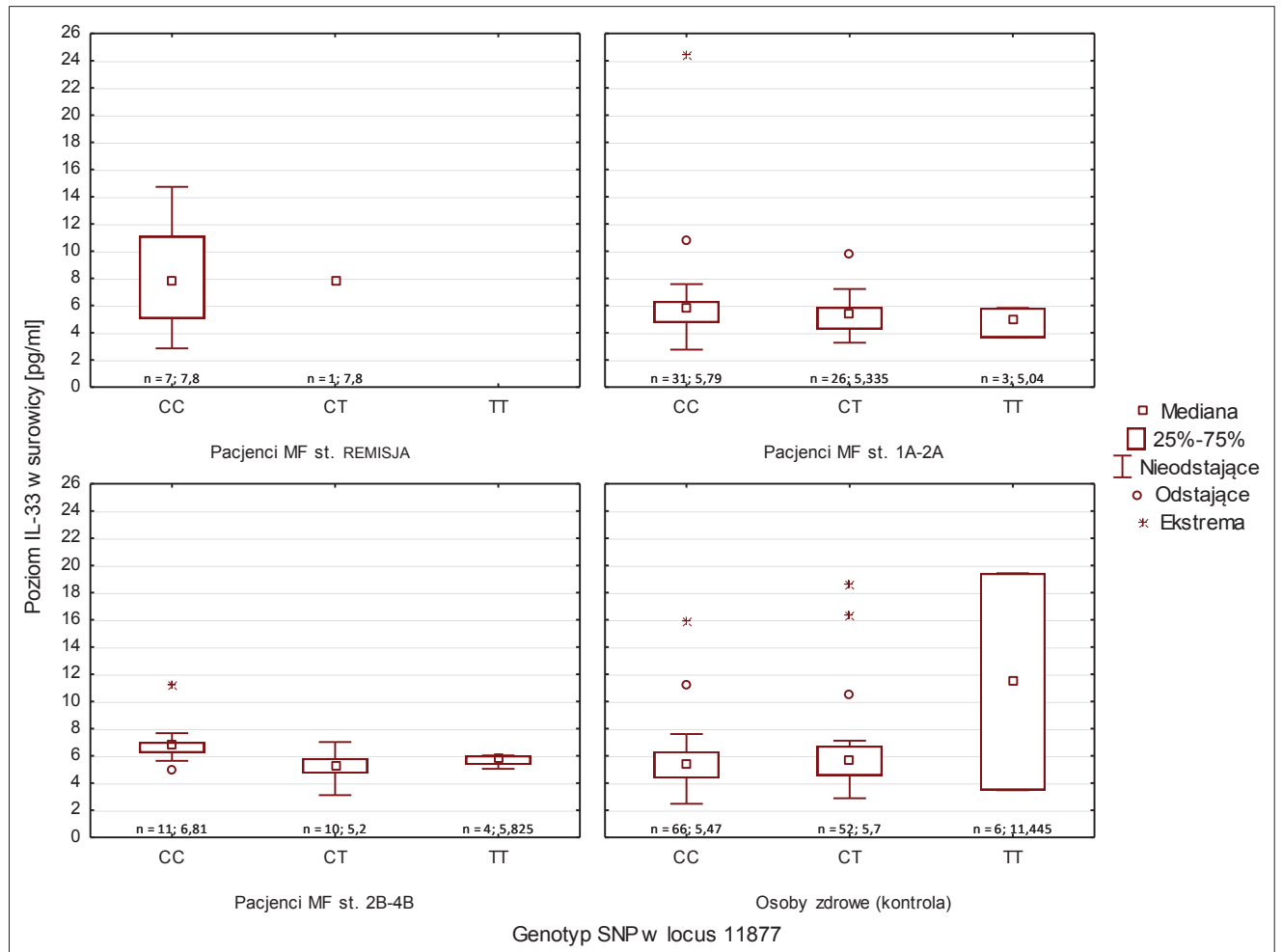


Tabela 35. Sprawdzenie, czy występują istotne statystycznie różnice w poziomie IL-33 (pg/ml) dla poszczególnych genotypów SNP w zależności od stadium choroby (Test Kruskala-Wallis).

Grupa	Wartość statystyki	Wartość p
Grupa Pacjenci REMISJA	KW-H (1;6) = 0	p = ---
Grupa Pacjenci st.1A-2A	KW-H (2;57) = 2,3162	p = 0,3141
Grupa Pacjenci st. 2B-4B	KW-H (2;23) = 8,0819;	p = 0,0176
Grupa Osoby zdrowe	KW-H (2;66) = 1,0821;	p = 0,5821

Testy są istotne statystycznie, jeżeli $p < 0,05$

Stwierdzono istotne statystycznie różnice w poziomach IL-33 dla stadium 2B-4B.

Wykres 20. Poziomy receptora ST2 dla poszczególnych genotypów w locus 11877 w zależności od stadium MF.

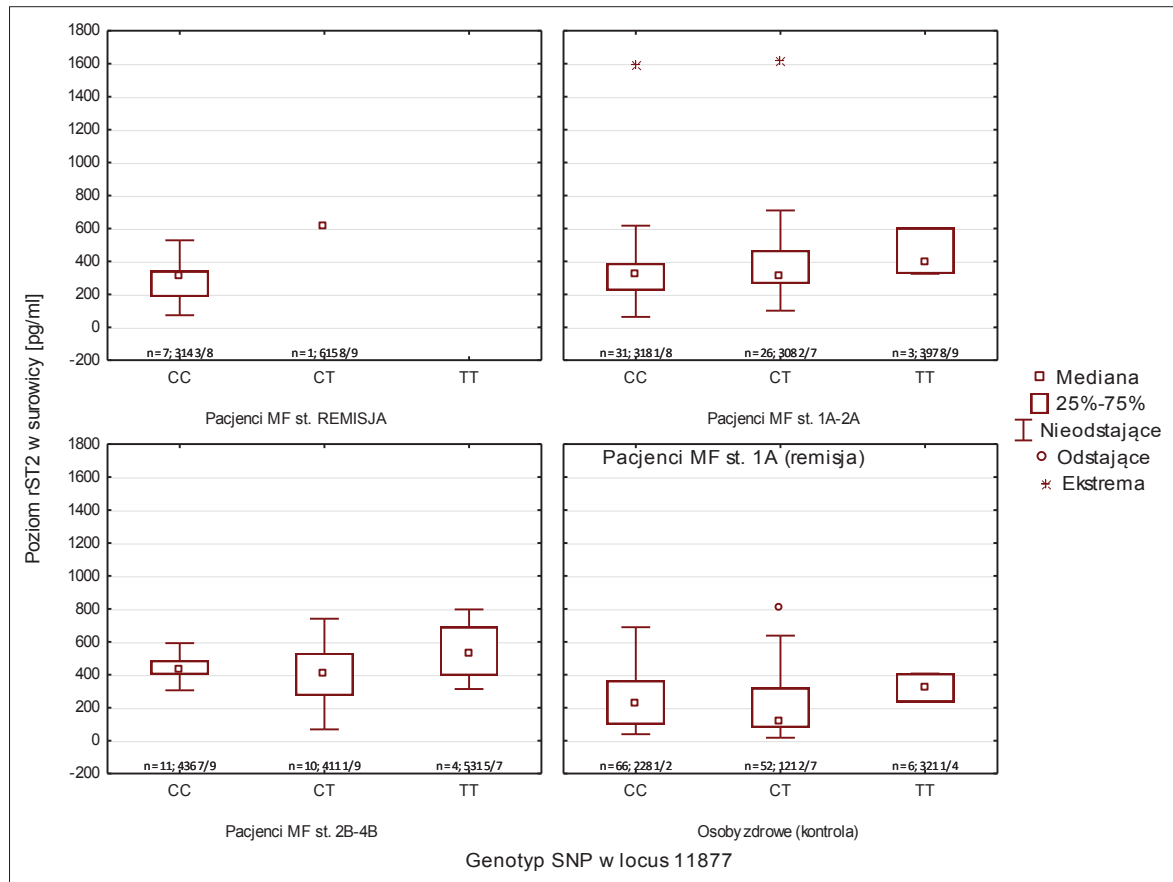


Tabela 36. Sprawdzenie, czy występują istotne statystycznie różnice w poziomie IL-33 (pg/ml) dla poszczególnych genotypów SNP w zależności od stadium choroby (test Kruskala-Wallis).

Grupa	Wartość statystyki	Wartość p
Grupa Pacjenci REMISJA	KW-H (1;6) = 2,1429	p = 0,1432
Grupa Pacjenci st.1A-2A	KW-H (2;56) = 2,1272	p = 0,3452
Grupa Pacjenci st. 2B-4B	KW-H (2;23) = 1,712;	p = 0,4249
Grupa Osoby zdrowe	KW-H (2;66) = 2,2964;	p = 0,3172

Testy są istotne statystycznie, jeżeli $p < 0,05$

Na podstawie analizy nie udało się stwierdzić istotnych statystycznie różnic w poziomach ST2 pomiędzy genotypami SNP w locus 11877 CC, CT, TT.

Tabela 37. Występowanie poszczególnych genotypów w locus 9894 genu IL-33 w zależności od stopnia zaawansowania MF (N=209).

Locus	Stadium choroby	T (+)	T (-)	C (+)	C (-)	CC	TC/CT	TT	%
IL-33 (9894)	REMISJA	0,80%	0,16%	0,32%	0,64%	0,16%	0,16%	0,64%	2,87%
	IA	4,94%	0,16%	2,39%	2,71%	0,16%	2,23%	2,71%	15,31%
	IB	3,51%	0,32%	2,07%	1,75%	0,32%	1,75%	1,75%	11,48%
	IIA, B	1,75%	0,16%	1,28%	0,64%	0,16%	1,12%	0,64%	5,74%
	III	0,80%	0,16%	0,32%	0,64%	0,16%	0,16%	0,64%	2,87%
	IVA, B	0,96%	0,16%	0,80%	0,32%	0,16%	0,64%	0,32%	3,35%
	ZDROWY	17,86%	1,59%	9,57%	9,89%	1,59%	7,97%	9,89%	58,37%
	%	30,62%	2,71%	16,75%	16,59%	2,71%	14,04%	16,59%	
IL-33 (11877)	REMISJA	0,32%	0,64%	0,96%	0,00%	0,80%	0,16%	0,00%	2,87%
	IA	1,75%	3,35%	5,10%	0,00%	2,55%	2,55%	0,00%	15,31%
	IB	1,28%	2,55%	3,35%	0,48%	1,75%	1,59%	0,48%	11,48%
	IIA, B	0,64%	1,28%	1,59%	0,32%	0,64%	0,96%	0,32%	5,74%
	III	0,32%	0,64%	0,96%	0,00%	0,64%	0,32%	0,00%	2,87%
	IVA, B	0,32%	0,80%	0,80%	0,32%	0,48%	0,32%	0,32%	3,35%
	ZDROWY	6,54%	12,92%	18,50%	0,96%	10,21%	8,29%	0,96%	58,37%
	%	11,16%	22,17%	31,26%	2,07%	17,07%	14,19%	2,07%	

8 Dyskusja

Ziarniniak grzybiasty jest najczęstszą postacią chłoniaka pierwotnie skórno wywodzącego się z komórek T. Częstość występowania MF w Stanach Zjednoczonych szacuje się na 0,36/100 000 osób rocznie (Weinstock i Reynes, 1999). W Polsce brakuje dokładnych danych statystycznych na ten temat, jednak wydaje się, że częstość występowania tego nowotworu znajduje się na podobnym poziomie (Sokołowska-Wojdyło i wsp., 2017). Obserwacje prowadzone w ośrodkach dermatologicznych, hematologicznych i onkologicznych na terenie kraju potwierdzają jednak stopniowy wzrost zachorowań na MF (Pawlaczyk i Filas, 2003). W grupie, która uczestniczyła w przedstawionym w pracy badaniu, stwierdzono przewagę mężczyzn (stosunek płci męskiej do żeńskiej – 1,9:1), a średni wiek chorych wynosił około 60 lat. Dane te zbliżone są do raportowanych w piśmiennictwie wartości dotyczących populacji polskiej (Lesiak i wsp., 2011; Malek i wsp., 2015) i innych krajów europejskich (Agar i wsp., 2010).

Pomimo intensywnych badań patogeneza MF nie została do końca poznana. Wiadomo, że w trakcie rozwoju choroby dochodzi do naciekania skóry przez komórki T pamięci CD4+ (tzw. *skin-homing*). W wyniku ich aktywacji i monoklonalnej ekspansji dochodzi do produkcji licznych cytokin i czynników wzrostu oddziałujących na keratynocyty, co prowadzi do rozwoju stanu zapalnego, a klinicznie manifestuje się wystąpieniem zmian skórnych (McGirt, 2017). W ziarniniaku grzybiastym, podobnie jak w innych rozrostach układu hematologicznego oraz w nowotworach litych, zmiany profilu cytokin w mikrośrodowisku komórek nowotworowych pełnią istotną rolę w rozwoju i progresji choroby (Rubio Gonzalez i wsp., 2016).

Interleukina-33, opisana w 2005 roku, należy do nadrodziny cytokin IL-1 (Schmitz i wsp., 2005). Coraz więcej badań wskazuje na jej wielokierunkowe działanie w procesach odporności nieswoistej i swoistej, wpływa ona m.in. na polaryzację naiwnych limfocytów T, indukcję dojrzewania komórek dendrytycznych, aktywację limfocytów T regulatorowych, limfocytów T cytotoksycznych i komórek NK (Bertheloot i Latz, 2017; Liew i wsp., 2016). Stąd rosnące zainteresowanie rolą IL-33 w chorobach przebiegających z dysregulacją układu immunologicznego, jak dotąd jednak znacznie mniej uwagi poświęcono plejotropowemu działaniu IL-33 w procesie rozwoju pierwotnie skórnych chłoniaków T-komórkowych. W badaniach zaprezentowanych w niniejszej pracy skupiono się na IL-33 z powodu wymienionych poniżej przesłanek.

Coraz większa liczba wyników badań doświadczalnych i klinicznych wskazuje na istotne znaczenie IL-33 w patogenezie atopowego zapalenia skóry (AZS) (Asahina i Maeda, 2017; Saluja i wsp., 2015). Jej zwiększone stężenie stwierdzono zarówno w surowicy pacjentów z AZS, jak i zmienionej chorobowo skórze (Savinko i wsp., 2012; Tamagawa-Mineoka i wsp., 2014). Stężenie IL-33 w surowicy dodatnio koreluje z nasileniem AZS (Tamagawa-Mineoka i wsp., 2014) i zmniejsza się pod wpływem leczenia

choroby (Savinko i wsp., 2012). Poza działaniem na układ immunologiczny IL-33 bezpośrednio wpływa na homeostazę bariery naskórkowej przez zmniejszenie ekspresji białek strukturalnych, np. filagryny (Nygaard i wsp., 2017; Ryu i wsp., 2016). W literaturze od lat trwa debata na temat potencjalnego związku AZS z większym ryzykiem rozwoju chłoniaków skórnych (Legendre i wsp., 2015). Komórki T pamięci CD4+, które naciekają skórę w MF, obserwowane są również w skórze pacjentów z AZS, co ze względu na podobieństwo obrazu klinicznego niektórych postaci tych chorób jest przyczyną istotnych trudności diagnostycznych (Miyagaki i Sugaya, 2011).

Kolejnym argumentem przemawiającym za znaczeniem IL-33 w chłoniakach skóry jest udział tej cytokiny w rozwoju chorób autoimmunologicznych. Zaangażowanie szlaku IL-33 i jej receptora ST2 zostało stwierdzone w reumatoidalnym zapaleniu stawów (Macedo i wsp., 2016), łuszczycy (Li i wsp., 2017), toczeniu rumieniowatym układowym (Guo i wsp., 2016) i zespole Sjögrena (Margiotta i wsp., 2016). Opisy przypadków oraz wyniki badań epidemiologicznych wskazują, że pacjenci z chorobami układowymi o podłożu autoimmunologicznym należą do grupy zwiększonego ryzyka wystąpienia nowotworów układu krwiotwórczego (Baecklund i wsp., 2014; Yadlapati i Efthimiou, 2016). Zwiększone ryzyko limfoproliferacji i aktywacja IL-33 w chorobach autoimmunologicznych stanowią kolejny argument za oceną znaczenia tej cytokiny w limfoproliferacji skórnej.

Znaczenie szlaku IL-33/ST2 jest w ostatnich latach częściej badane również w procesach rozrostowych zarówno układu krwiotwórczego, jak i w nowotworach niehematologicznych. Zwiększone stężenie IL-33 i ST2 stwierdzono w surowicy pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym (Bergis i wsp., 2013; Zhang i wsp., 2012), piersi (Yang i wsp., 2015), żołądka (Bergis i wsp., 2016; Sun i wsp., 2011) i jelita grubego. Zwiększona ekspresja szlaku IL-33/ST2 wiązała się z progresją nowotworu i tworzeniem przerzutów na dwóch drogach – bezpośrednio (aktywacji komórek nowotworowych) oraz pośrednio (modulacji przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej) (Wasmer i Krebs, 2016). Szlak IL-33/ST2 odgrywa również istotną rolę w nowotworach mieloproliferacyjnych. Zwiększone stężenie IL-33 potwierdzono w biopsjach szpiku kostnego pacjentów z nowotworami mieloproliferacyjnymi, u których dodatkowo stwierdzono zwiększoną ekspresję ST2 na powierzchni krwiotwórczych komórek macierzystych i progenitorowych (Levescot i wsp., 2014; Mager i wsp., 2015).

W trakcie trwania badań przedstawionych w niniejszej pracy zespół Duault i wsp. wykazał na modelu mysim, że IL-33 promuje proliferację komórek T z rearanżacją V γ 9V δ 2. Od pewnego czasu wiadomo, że limfocyty T V γ 9 wykazują efekt przeciwnowotworowy i mogą w przyszłości stanowić dobry cel dla immunoterapii dzięki hamowaniu limfoproliferacji (Duault i wsp., 2017). Ponadto zespół Ravichandran i wsp. także na modelu mysim wykazał, iż niski poziom IL-33 spowalnia wzrost guza (Ravichandran i wsp., 2017). Tak więc podjęcie badań nad tą interleukiną w CTCL jest zasadne.

Pomimo przytoczonych powyżej przesłanek dotychczas nie ma prac oceniających znaczenie IL-33 i jej receptora ST2 w patogenezie i progresji MF. Ponadto nieznane są czynniki rokownicze

pozwalające zróżnicować chorych z wieloletnim, stabilnym przebiegiem MF od tych, u których postęp choroby będzie gwałtowny. Dlatego też prezentowane w rozprawie badania skoncentrowano na ocenie znaczenia prognostycznego stężenia IL-33 w surowicy pacjentów z MF oraz zbadaniu, czy warianty polimorficzne, 9894 T/C i 11877 C/T, genu IL-33 mogą odpowiadać za odmienny przebieg MF u pacjentów. Uzyskane wyniki skorelowano również z nasileniem świądu, jednym z najczęstszych objawów MF.

8.1 Ocena, czy warianty polimorficzne – 9894 T/C i 11877 C/T – genu IL-33 odpowiadają za odmienny przebieg ziarniniaka grzybiastego oraz czy mogą stanowić czynnik prognostyczny choroby

Gen interleukiny 33 zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 9, w regionie 9p24.1, i ma 11 eksonów (Baekkevold i wsp., 2003). Dotychczas scharakteryzowano kilka polimorfizmów w obrębie genu dla IL-33 wpływających na poziom jego ekspresji. Oznaczone w rozprawie polimorfizmy dla genu IL-33: SNP 9894 T/C (NCBI rs1929992) oraz 11877 C/T (NCBI rs10975519), zostały wybrane na podstawie wyników badania genotypowego opublikowanego przez Sakashitę i wsp. w 2008 roku (Sakashita i wsp., 2008). Autorzy jako pierwsi wyselekcjonowali spośród polimorfizmów w genie IL-33 22 najczęściej występujące, a następnie do dalszej analizy wybrali następujące: 9894 T/C (rs1929992), zlokalizowany w intronie 3 genu IL-33, oraz 11877 C/T (rs10975519), zlokalizowany w egzonie 5 genu IL-33. W badaniu wykazano istotnie statystycznie wyższe stężenie IL-33 u pacjentów z alergicznym nieżytem nosa w stosunku do zdrowej kontroli ($p=0,00018$), a także stwierdzono związek pomiędzy polimorfizmem 9894 T/C a występowaniem nieżytu nosa ($p=0,048$) (Sakashita i wsp., 2008). W kolejnych pracach polimorfizmy genu IL-33 analizowane były przez różne zespoły badawcze w kontekście innych chorób. Wykazano związek pomiędzy polimorfizmami genu IL-33 a innymi chorobami alergicznymi (astma) (Queiroz i wsp., 2017), chorobami układu sercowo-naczyniowego (Guo i wsp., 2013), a także chorobami autoimmunologicznymi – reumatoidalnym zapaleniem stawów (Li i wsp., 2014), zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa (Fan i wsp., 2014), toczniem rumieniowatym układowym (Xu i wsp., 2016), twardziną układową (Koca i wsp., 2016) i nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit (Latiano i wsp., 2013).

W przeciwieństwie do przytoczonych badań nie odnaleźliśmy istotnego statystycznie związku pomiędzy stężeniem IL-33 i jej receptora ST2 a typami genotypów w locus 9894. Udało się nam natomiast potwierdzić istotne statystycznie różnice w stężeniu IL-33 pomiędzy pacjentami z genotypem IL-33 T (+) i T (-) w locus 11877 ($p=0,0027$). Ponadto wykazaliśmy związek pomiędzy genotypami C (+) i C (-) genu IL-33 w locus 11877 a stężeniem receptora ST2. Nie stwierdziliśmy

istotnych statystycznie różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów w zależności od stadium choroby.

Uzyskane wyniki nie są jednoznaczne, ale wskazują na możliwy wpływ polimorfizmu 11877 C/T na stężenie IL-33. Znaczenie tego locus może tłumaczyć jego lokalizacja w egzonie 5, co może mieć znaczenie funkcjonalne i wpływać na ekspresję i stabilność mRNA IL-33 (Sakashita i wsp., 2008).

Należy też zwrócić uwagę na to, że częstość występowania poszczególnych polimorfizmów może się różnić w zależności od badanej populacji, a stężenie IL-33 i ryzyko rozwoju chłoniaka może być związane z innymi polimorfizmami niż te stwierdzone w chorobach alergicznych. Ponadto coraz częściej w patogenezie i poszukiwaniu nowych metod terapeutycznych poza samymi polimorfizmami zwraca się uwagę na poszukiwanie interakcji geny–środowisko oraz określenie czynników biorących udział w epigenetycznej regulacji ekspresji genów (van Doorn i wsp., 2016).

8.2 Ocena wartości rokowniczej stężenia IL-33 w surowicy w ziarniniaku grzybiastym

Interleukina-33, należąca do nadrodziny cytokin IL-1, ulega konstytutywnej ekspresji w komórkach nabłonka barierowego skóry, przewodu pokarmowego i układu oddechowego, gdzie pełni funkcję tzw. alarminy (N. Martin i M. Martin, 2016). Ponadto uszkodzenie tkanek i proces zapalny może indukować syntezę IL-33 w komórkach zrębu (fibroblasty, mięśnie gładkie ściany naczyń) oraz komórkach układu immunologicznego (makrofagi, neutrofile) (Liew i wsp., 2016).

Początkowo działanie IL-33 wiązane było z indukcją odpowiedzi komórkowej typu Th2. IL-33 powoduje polaryzację naiwnych limfocytów T w kierunku fenotypu Th2, działa jako czynnik chemotaktyczny dla komórek Th2, stymuluje limfocyty Th2 do wydzielania IL-5 i IL-13, może aktywować limfocyty B, wyraźnie zwiększając produkcję przeciwciał (Komai-Koma i wsp., 2007; Schmitz i wsp., 2005; Zhu i wsp., 2017). Nowsze badania wskazują, że IL-33 może także indukować odpowiedź typu Th1 przez aktywację komórek i limfocytów NK oraz stymulację wydzielania czynnika martwicy nowotworów i interferonu gamma (Komai-Koma i wsp., 2016; Seltsmann i wsp., 2013). Poza wpływem na równowagę Th1/Th2 IL-33 moduluje aktywność limfocytów T regulatorowych, jest silnym aktywatorem makrofagów i induktorem dojrzewania komórek dendrytycznych (Dominguez i wsp., 2017; Matta i Turnquist, 2016; Seo i wsp., 2017). Polaryzacja limfocytów T w kierunku odpowiedzi immunologicznej typu Th1 lub Th2 przez kompleks białek IL-33/ST2 zależna jest od typu aktywowanych komórek, sieci cytokin oraz mikrośrodowiska (Martin, 2013).

W przypadku IL-33 nie udało się nam wykazać istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą pacjentów z MF a grupą kontrolną. Może to tłumaczyć szybki metabolizm białka w organizmie, tzw. turn-over. IL-33 jest szybko ubikwitynowana i ulega systematycznemu rozkładowi przez enzymy proteolityczne w proteasomach (Meephansan i wsp., 2012).

IL-33 może teoretycznie również wpływać na rozwój i progresję chłoniaka przez działanie jako czynnik parakryny w mikrośrodowisku nowotworu, bez istotnej zmiany stężenia we krwi. Wielu badaczy wskazuje na udział komórek mikrośrodowiska w rozwoju nowotworów. Stymulują one bezpośrednio wzrost chłoniaka przez wydzielane cytokiny oraz pośrednio przez nasilenie angiogenezy i hamowanie odpowiedzi przeciwnowotworowej (Rubio Gonzalez i wsp., 2016). W badaniach eksperymentalnych wykazywano zarówno pro-, jak i antynowotworowe właściwości IL-33. Najprawdopodobniej działanie tej cytokiny na komórki nowotworowe zależy od typu nowotworu (Wasmer i Krebs, 2016), a także, jak postulują Lu i wsp. (2016), źródła pochodzenia IL-33. Potwierdzono zwiększone stężenie IL-33 w komórkach zrębowych szpiku kostnego u pacjentów z zespołami mieloproliferacyjnymi. W eksperymentalnym mysim modelu choroby limfoproliferacyjnej rozrost nowotworu był opóźniony u osobników pozbawionych genu dla IL-33 (Mager i wsp., 2015).

Komórki układu odpornościowego mogą kontrolować i modyfikować mikrośrodowisko nowotworu. Do głównych komórek o właściwościach immunosupresyjnych w stosunku do guza należą niedojrzałe komórki pochodzenia mieloidalnego – komórki MDSC (Myeloid Derived – Suppressor Cells) oraz makrofagi typu M2 (Umansky i wsp., 2017). Najnowsze badania sugerują, że IL-33 jest jednym z głównych mediatorów w mikrośrodowisku guza, regulującym aktywność tych komórek. IL-33 zmniejsza apoptozę MDSC, indukuje autosekrecję czynników wzrostu, powoduje zwiększenie ekspresji arginazy-1 i aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w tych komórkach (Xiao i wsp., 2016). Cytokina ta jest również silnym czynnikiem indukującym powstawanie makrofagów M2 (Wang i wsp., 2017).

Czynnikiem ograniczającym w badaniach nad IL-33 są problemy metodologiczne. W kilku pracach wykazano, że zastosowanie dostępnych komercyjnie zestawów do oznaczenia stężenia IL-33 za pomocą metody ELISA obarczone jest dużym ryzykiem błędu. Wynika ono zarówno z niskiej czułości i specyficzności testów, jak również z możliwości interferencji IL-33 z białkami ludzkiej surowicy, co w znaczący sposób wpływa na ostateczne wyniki (Ketelaar i wsp., 2016; Nygaard i wsp., 2017; Rivière i wsp., 2016). Konieczne jest zatem poszukiwanie bardziej czułych i swoistych metod analizy. Ze względu na postulowany udział IL-33 w mikrośrodowisku guza w dalszych badaniach należałoby rozważyć oznaczanie stężenia tej cytokiny w wycinkach ze zmian skórnych w CTCL.

Ważną rolę w przekaźnictwie działania IL-33 odgrywa jej receptor ST2, który występuje w dwóch formach: przezbłonowej i wydzielniczej (Liew i wsp., 2016). IL-33 połączona z receptorem ST2 przyłącza dodatkowo koreceptor - białko towarzyszące receptorowi z rodziny IL-1 (IL-1RAcP) (Liu i wsp., 2013). W transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego tego heterkompleksu pośredniczą: białko adaptorowe MyD88, kinazy (IRAK-1/4, TRAF6 oraz MAP) i czynnik transkrypcyjny NF- κ B (Griesenauer i Paczesny, 2017). Pobudzenie szlaku IL-33 prowadzi do aktywacji komórek posiadających na powierzchni receptor ST2 (limfocyty pomocnicze, komórki dendrytyczne, mastocyty) oraz sekrecji szeregu cytokin (De la Fuente i wsp., 2015).

Wydzielnicza postać receptora ST2 służy jako tzw. receptor pułapka. Wychwytyjąc IL-33, hamuje tym samym jej aktywność biologiczną i stanowi fizjologiczny mechanizm zapobiegający nadmiernemu pobudzeniu szlaku (Kakkar i Lee, 2008).

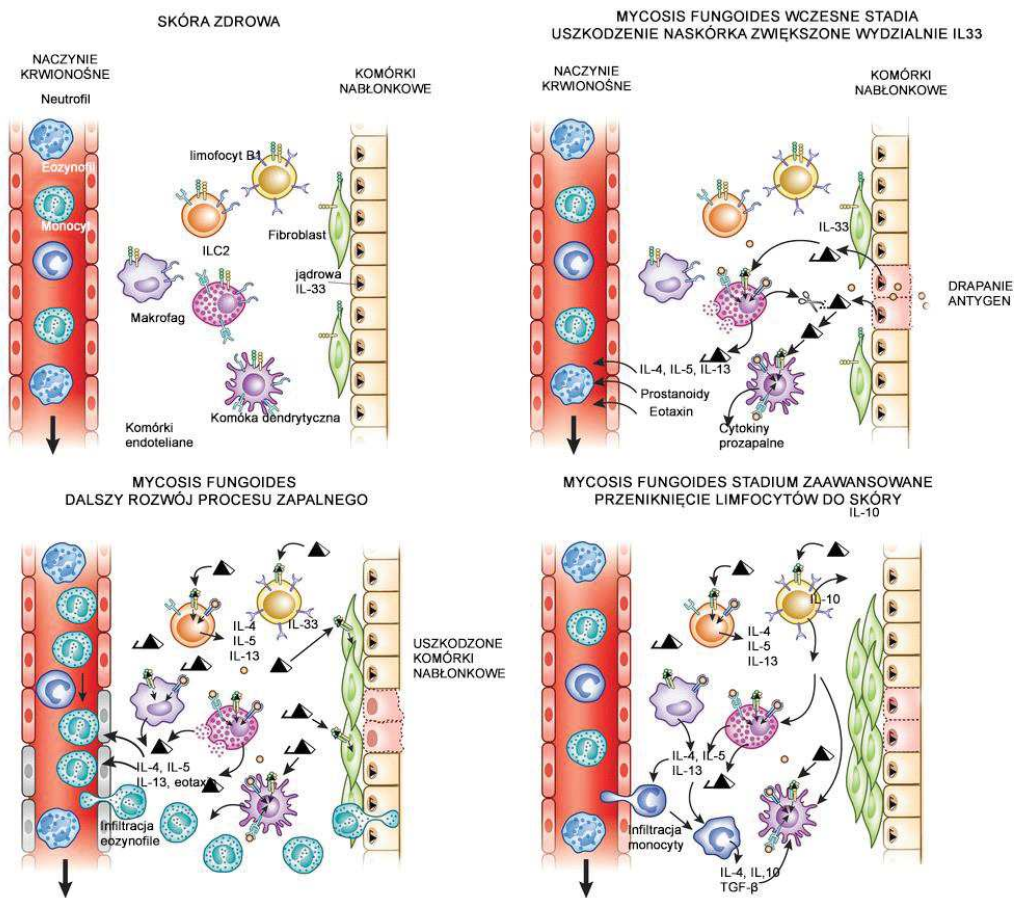
W przedstawionej pracy stwierdzono około 38% wyższe stężenie receptora ST2 w surowicy pacjentów z MF w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej, co jest w zgodzie z wcześniejszymi badaniami Yoshidy i wsp. (1995) oraz Tsuchiyi i wsp. (2004), które ujawniły zwiększoną ekspresję ST2 w białaczkach i chłoniakach T-komórkowych. Zwiększona synteza rozpuszczalnej formy receptora ST2 może wynikać ze stymulacji przez prozapalne cytokiny: TNF α i IL-6 (Milovanovic i wsp., 2012).

Kolejne badania, dotychczas głównie z zakresu kardiologii, dowodzą znaczenia stężenia receptora ST2 jako czynnika prognostycznego. Wykazano, że wysokie stężenie ST2 jest złym prognostycznie markerem w przezskórnej implantacji zastawki aortalnej (Stundl i wsp., 2017), niewydolności serca (Skali i wsp., 2016) i chorobie niedokrwiennej serca (Jenkins i wsp., 2017).

Analiza korelacji wartości stężeń IL-33 i receptora ST2 z poszczególnymi fazami MF wykazała obecność istotnych zmian w stężeniu analizowanych białek w zależności od nasilenia choroby. Podczas remisji choroby można było zaobserwować niższe stężenia IL-33 i ST2. Najwyższe stężenie cytokiny i jej receptora stwierdzono natomiast w pierwszych stopniach zaawansowania MF, co może świadczyć o tym, że procesy odpowiedzialne za wydzielanie IL-33 i ST2 zachodzą z większym nasileniem w początkowym etapie choroby.

Poszczególne fazy MF charakteryzują się dynamicznymi zmianami profilu cytokin, spowodowanymi naciekaniami skóry przez różne subpopulacje komórek układu odpornościowego. Szlak IL-33/ST2 może wykazywać plejotropowe działanie i przyczyniać się do rozwoju poszczególnych faz MF poprzez polaryzację limfocytów w kierunku odpowiedzi immunologicznej typu Th2 (odpowiedzi humoralnej) lub Th1 (odpowiedzi komórkowej). Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, najbardziej prawdopodobny przebieg procesu zapalnego w MF wydaje się przebiegać w następujący sposób (patrz rycina 4).

Rycina 4. Proces zapalny przebiegający z uwolnieniem IL-33. Ilustracja wykonana na podstawie *Nat Immunol.* 2 016; 19;17(2):122-31 Licence No 3841471257631



We wczesnych fazach zaawansowania MF (stadium I i II) IL-33 jest produkowana w keratynocytach jako jądrowy czynnik transkrypcyjny. Uszkodzenie mechaniczne komórek nabłonkowych powstałe np. podczas drapania wywołanego świądem powoduje uwolnienie IL-33 poza obręb komórek. Stymuluje to odpowiedź typu Th1, co manifestuje się zwiększoną ekspresją IFN- γ , IL-2 i IL-12, a także naciekiem złożonym z limfocytów T CD8+. Powstaje swoiste dodatnie sprzężenie zwrotne, ponieważ profil Th1 cytokin, w szczególności IFN- γ , może nasilać syntezę IL-33 w keratynocytach (Tsuda i wsp., 2017). Podczas dalszego rozwoju MF, aż do zaawansowanych stadiów (III, IV), dochodzi do stopniowego wygaszenia wytwarzania cytokin przez limfocyty Th1. IL-33 aktywuje subpopulację Th2 limfocytów i powoduje zwiększenie produkcji IL-4, IL-5, IL-10 oraz IL-13. W nacieku zmniejsza się udział limfocytów CD8+, zaczynają dominować limfocyty T CD4+ i dochodzi do uogólnienia choroby.

8.3 Ocena znaczenia IL-33 w patogenezie świądu u chorych z ziarniniakiem grzybiastym

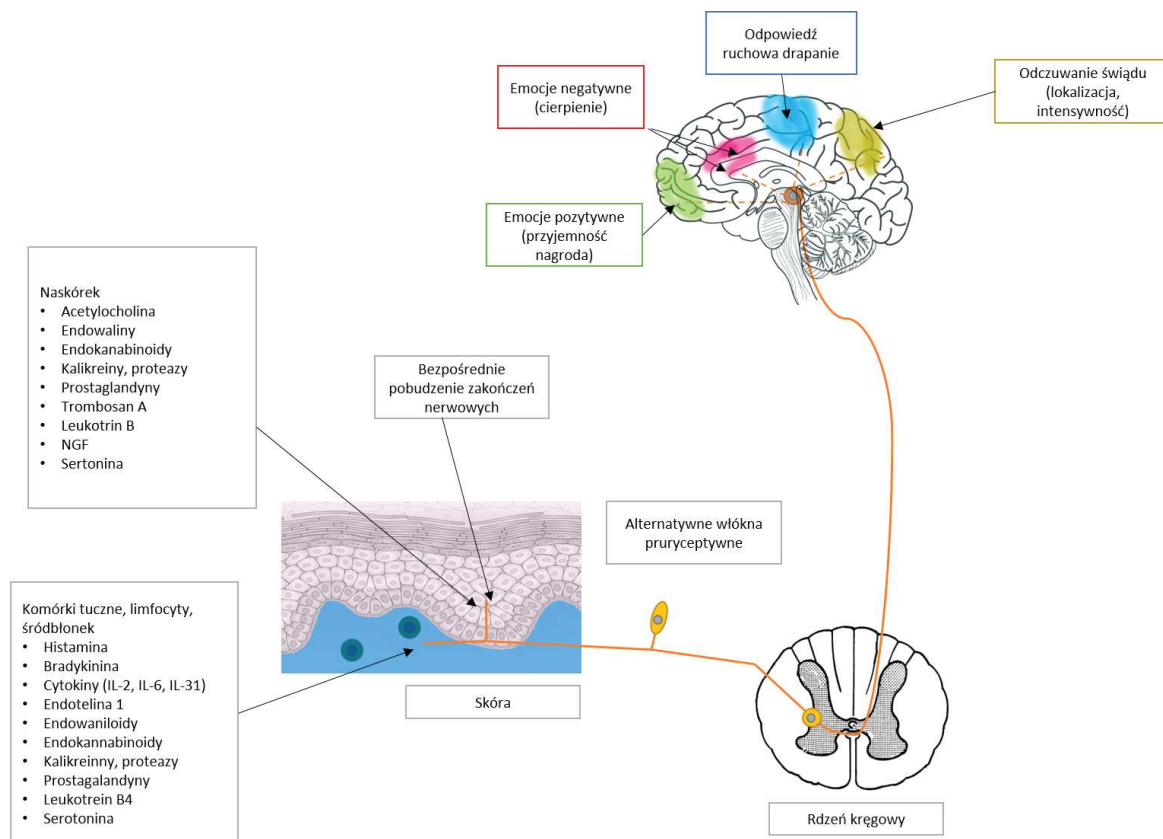
Przewlekły świąd, definiowany jako nieprzyjemne, subiektywne odczucie, które wywołuje potrzebę drapania i utrzymuje się ponad 6 tygodni, stanowi objaw często występujący w CTCL. Pomimo to dostępnych jest zaledwie kilka badań podejmujących próbę oceny epidemiologii świądu w tej grupie chorych. U pacjentów z MF częstość występowania świądu szacowana jest na 68-81% (Deonizio i wsp., 2016; Gerami i wsp., 2008; Lehman i wsp., 2010; Lesiak i wsp., 2011; Wieser i wsp., 2017). Nasilenie świądu zależy od stopnia zaawansowania i wariantu klinicznego choroby (Hodak i wsp., 2016; Suga i wsp., 2013; Vij i Duvic, 2012). U części chorych objaw może być związany z wydrapaniami na skórze i powstaniem zmian typu *prurigo nodularis* (Muniesa i wsp., 2010). W niektórych przypadkach świąd może być jedynym i pierwszym objawem choroby, poprzedzającym wystąpienie zmian skórnych i właściwą diagnozę, jak również może być objawem sygnalizującym nawrót MF (Deen i wsp., 2015; Meyer i wsp., 2010). Utrzymujący się przewlekłe świąd znacząco obniża jakość życia pacjentów, prowadzi do zaburzeń rytmu sen-czuwanie, zmęczenia, a nawet depresji (Demierre i wsp., 2005). Ponadto świąd uznany jest także za niezależny czynnik prognostyczny związany ze zwiększeniem ryzyka progresji MF (Green i wsp., 1981; Nikolaou i wsp., 2017).

Do oceny nasilenia świądu w badaniu wykorzystano dwie skale: wizualną skalę analogową VAS oraz skalę numeryczną NRS. Obie skale, ze względu na ich prostotę i bardzo krótki czas konieczny do uzyskania wyników, są jednymi z najczęściej stosowanych metod pomiaru świądu. Obiektywna ocena świądu, który jest subiektywnym odczuciem, wymaga zastosowania przynajmniej dwóch skal, których wyniki powinny ze sobą korelować. W prezentowanej pracy uzyskano istotny statystycznie współczynnik korelacji dla obu metod, a średnia wartość VAS była zbliżona do wartości raportowanych w innych badanych grupach (Malek i wsp., 2015).

Analizując całą grupę pacjentów z MF, nie wykazano bezpośredniego związku pomiędzy intensywnością świądu a stężeniem IL-33 i receptora ST2. Prawdopodobnie może to być spowodowane tym, że poziom IL-33 i receptora ST2 w procesie zapalnym ulega szybkim zmianom, a ograniczenia natury metodologicznej nie pozwalają na dokładniejsze oznaczenie cytokiny.

Zrozumienie dokładnego patomechanizmu świądu jest niezwykle ważne dla opracowania nowych, skutecznych metod terapii. Pomimo tego patofizjologia świądu w przebiegu MF nie jest w pełni poznana. Percepcję świądu przedstawiono schematycznie na rycinie 5.

Rycina 5. Percepcja świądu.



Kluczową rolę w powstawaniu świądu odgrywają mastocyty (komórki tuczne) i wydzielana przez nie histamina. Ograniczona skuteczność leków przeciwhistaminowych w terapii świądu w przebiegu MF świadczy o tym, że również inne substancje mogą być zaangażowane w ten proces. Należą do nich neuropeptydy, proteiny, neurotransmitery, a także cytokiny (Ahern i wsp., 2012).

Pomimo braku stwierdzenia zaangażowania IL-33 jako mediatora świądu w MF konieczne są dalsze badania na większej grupie pacjentów, z dłuższym okresem obserwacji, aby porównać stężenie IL-33 u pacjentów MF ze świądem i pozbawionych tego objawu. Wykazano, że IL-33 pobudza mastocyty do sekrecji związków nasilających świąd – leukotrienów, $TNF\alpha$, IL-6 oraz IL-31 (Enoksson i wsp., 2011; Gangemi i wsp., 2013; Musolino i wsp., 2015). Szczególnie istotna może okazać się interakcja właśnie z IL-31, której zablokowanie stanowi nowy cel terapii w chorobach zapalnych przebiegających ze świądem (Furie i wsp., 2017; Nattkemper i wsp., 2016).

9 Wnioski

Interleukina 33 (IL-33), zwana nabłonkową alarminą układu odpornościowego, wciąż jest słabo poznana. Spektrum działania IL-33 znacznie się zwiększa, gdy weźmie się pod uwagę, że pełni ona także rolę czynnika transkrypcyjnego i bezpośrednio wpływa na szlak sygnałowy NF- κ B. Jednym z celów niniejszej pracy badawczej było zbadanie, czy IL-33 i/lub jej receptor mogą pełnić rolę czynnika prognostycznego w MF. Niestety, na podstawie naszych wyników nie uzyskaliśmy jednoznacznej odpowiedzi na to pytanie. Z jednej strony widoczna jest rola IL-33 w patogenezie MF: wykryliśmy niższy poziom receptora ST2 w pierwszym stadium MF oraz wyższy poziom IL-33 w remisji w porównaniu do MF.

Z drugiej strony metoda ELISA okazała się niewystarczająca do uzyskania jednoznacznych wyników i konieczne jest użycie bardziej specyficznych metod analizy.

Głównym celem pracy było zbadanie polimorfizmów genu IL-33. W przeciwieństwie do japońskiego badania nie odnaleźliśmy istotnego statystycznie związku SNP 9894 T/C (NCBI rs1929992), stwierdziliśmy natomiast związek pomiędzy genotypami genu IL-33 C (+) i C (-) w locus 11877 a stężeniem receptora ST2 dla obydwu grup. Najprawdopodobniej ze względu na zbyt małą czułość metody ELISA i szybki rozkład przez enzymy proteolityczne IL-33 nie udało się nam zaobserwować związku pomiędzy poziomem IL-33 a typem polimorfizmu. Nie stwierdziliśmy też różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów w zależności od stadium choroby.

Jednak wspomniane w dyskusji najnowsze wyniki badań (z 2017 roku) na modelach mysich potwierdzające, że IL-33 odgrywa rolę w spowalnianiu wzrostu guza oraz sugerujące potencjalne znaczenie tej cytokiny i jej receptora w terapii chłoniaków (jako lek immunomodulujący) potwierdzają zasadność podjętego tematu i konieczność dalszych badań (Duault i wsp., 2017; Ravichandran i wsp., 2017).

10 Streszczenie po polsku

Ziarniniak grzybiasty (MF, *mycosis fungoides*) jest najczęstszym chłoniakiem pierwotnie skórny wywodzącym się z komórek T. Patogeneza MF jest nie do końca poznana. W trakcie rozwoju choroby dochodzi do naciekania skóry przez komórki T pamięci CD4+ (tzw. skin-homing). W wyniku ich aktywacji i monoklonalnej ekspansji dochodzi do produkcji licznych cytokin i czynników wzrostu oddziałujących na keratynocyty, co prowadzi do rozwoju stanu zapalnego, a klinicznie manifestuje się wystąpieniem zmian skórnych (McGirt, 2017). W ziarniniaku grzybiastym zmiany profilu cytokin w mikrośrodowisku komórek nowotworowych pełnią istotną rolę w rozwoju i progresji choroby (Rubio Gonzalez i wsp., 2016).

IL-33 jest cytokiną należącą do nadrodziny interleukiny 1. Wykazuje wielokierunkowe działanie w procesach odporności nieswoistej i swoistej, wpływa m.in. na polaryzację naiwnych limfocytów T, indukcję dojrzewania komórek dendrytycznych, aktywację limfocytów T regulatorowych, limfocytów T cytotoksycznych i komórek NK (Bertheloot i Latz, 2017; Liew i wsp., 2016). Coraz większa ilość badań wskazuje na istotne znaczenie IL-33 w patogenezie atopowego zapalenia skóry (AZS). Stężenie IL-33 w surowicy dodatnio koreluje z nasileniem AZS (Tamagawa-Mineoka i wsp., 2014) i zmniejsza się pod wpływem leczenia choroby (Savinko i wsp., 2012). W literaturze od lat trwa debata na temat potencjalnego związku AZS z większym ryzykiem rozwoju chłoniaków skórnych (Legendre i wsp., 2015). Komórki T pamięci CD4+, które naciekają skórę w MF, obserwowane są również w skórze pacjentów z AZS, co ze względu na podobieństwo obrazu klinicznego niektórych postaci tych chorób jest przyczyną istotnych trudności diagnostycznych (Miyagaki i Sugaya, 2011).

W 2008 zostało opublikowane badanie, w którym oceniono powiązanie polimorfizmów SNP w genie IL-33 z wystąpieniem japońskiego nieżytu nosa [Japanese cedar (JC) pollinosis], alergicznej reakcji modulowanej przez limfocyty Th2 (Sakashita i wsp., 2008). W badaniu wyselekcjonowano 22 polimorfizmy SNP najczęściej występujące w genie IL-33. Na analizy statystycznej wyodrębniono do genotypowania polimorfizmy: 9894 T/C (rs1929992) zlokalizowany w intronie 3 genu IL-33 oraz 11877 C/T (rs10975519) zlokalizowany w egzonie 5 genu IL-33. W badaniu wykazano istotne statystycznie wyższe stężenie IL-33 u pacjentów z alergicznym nieżytem nosa w stosunku do zdrowej kontroli ($p=0,00018$), a także stwierdzono związek pomiędzy polimorfizmem 9894 T/C a występowaniem nieżytu nosa ($p=0,048$) (Sakashita i wsp., 2008).

Głównym celem pracy było ocena, czy warianty polimorficzne – 9894 T/C i 11877 C/T – genu IL-33 mają wpływ na przebieg MF. Ponadto sprawdzono w pracy poziomy IL-33 i receptora ST2 u chorych z MF i oceniono ich wartość rokowniczą. U osób chorych został także oceniony poziom świądu i jego powiązanie z poziomami IL-33 i receptora ST2.

Badania przeprowadzono w latach 2012-2015 i włączono do nich grupę 88 pacjentów z MF będących pod opieką Poradni Dermatologicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku oraz grupę kontrolną składającą się z 66 zdrowych osób. Wśród pacjentów z MF było 30 kobiet w wieku od 35. do 78. roku życia i 58 mężczyzn w wieku od 20. do 86. roku życia. W grupie kontrolnej było 68 zdrowych kobiet w wieku 46 lat i 54 zdrowych mężczyzn w wieku 49,4 roku.

Od wszystkich osób (chorych i zdrowych) jednorazowo pobrano po 2 próbki krwi żyłnej. Z pierwszej próbki wyodrębniono surowicę, w której zostały oznaczone poziomy IL-33 i ST2 z drugiej wyizolowano genomowe DNA. Polimorfizmy genu IL-33 zostały oznaczone za pomocą allelospecyficznej łańcuchowej reakcji polimerazy (ARMS-PCR). Za pomocą metody ELISA oznaczono poziom IL-33 i receptora w surowicy pacjentów.

Do oceny nasilenia świądu w badaniu wykorzystano dwie skale: wizualną skalę analogową VAS oraz skalę numeryczną NRS.

Dla celów analizy statystycznej zastosowano 3 różne grupowania genotypów SNP: grupowanie 1. (genotypy: CC, CT, TT,) odpowiadające bezpośrednio uzyskanym danym z analizy laboratoryjnej; grupowanie 2., (genotypy: C (+), C (-)); grupowanie 3., genotypy (T (+), T (-)). Uzyskane wyniki opracowano za pomocą pakietu statystycznego StatSoft STATISTICA wersja 10. Za poziom istotności przyjęto $p < 0,05$.

W przeciwieństwie do japońskiego badania nie został odnaleziony istotnie statystycznie związek SNP 9894 T/C (NCBI rs1929992), stwierdzono związek pomiędzy genotypami genu IL-33 C (+) i C (-) w locus 11877 a stężeniem receptora ST2 dla obydwu grup. Najprawdopodobniej ze względu na zbyt małą czułość metody ELISA i szybki rozkład przez enzymy proteolityczne IL-33 nie udało się zaobserwować związku pomiędzy poziomem IL-33 a typem polimorfizmu. Nie udało się też stwierdzić różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów w zależności od stadium choroby.

W przypadku poziomów IL-33 nie udało się wykazać istotnie statystycznie różnic pomiędzy grupą pacjentów z MF a grupą kontrolną, co może być wytłumaczone szybkim metabolizmem białka w organizmie, tzw. turn-over. IL-33 jest szybko ubikwitynowana i ulega systematycznemu rozkładowi przez enzymy proteolityczne w proteasomach (Meehansan i wsp., 2012).

Czynnikiem ograniczającym w badaniach nad IL-33 są także problemy metodologiczne. W kilku pracach wykazano, że zastosowanie dostępnych komercyjnie zestawów do oznaczenia stężenia IL-33 za pomocą metody ELISA obarczone jest dużym ryzykiem błędu. Wynika ono zarówno z niskiej czułości i specyficzności testów, jak również z możliwości interferencji IL-33 z białkami ludzkiej surowicy, co w znaczący sposób wpływa na ostateczne wyniki (Ketelaar i wsp., 2016; Nygaard i wsp.,

2017; Rivière i wsp., 2016). Konieczne jest zatem poszukiwanie bardziej czułych i swoistych metod analizy.

W przedstawionej pracy stwierdzono około 38% wyższe stężenie receptora ST2 w surowicy pacjentów z MF w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej, co jest w zgodzie z wcześniejszymi badaniami Yoshidy i wsp. (1995) oraz Tsuchiyi i wsp. (2004), które ujawniły zwiększoną ekspresję ST2 w białaczkach i chłoniakach T-komórkowych. Zwiększona synteza rozpuszczalnej formy receptora ST2 może wynikać ze stymulacji przez prozapalne cytokiny: TNF α i IL-6 (Milovanovic i wsp., 2012).

W grupie pacjentów z MF, nie wykazano bezpośredniego związku pomiędzy intensywnością świądu a stężeniem IL-33 i receptora ST2. Może to być spowodowane tym, że poziom IL-33 i receptora ST2 w procesie zapalnym ulega szybkim zmianom, a ograniczenia natury metodologicznej nie pozwalają na dokładniejsze oznaczenie cytokiny.

Jednym z celów niniejszej pracy badawczej było zbadanie, czy IL-33 i/lub jej receptor mogą pełnić rolę czynnika prognostycznego w MF. Na podstawie wyników nie udało się uzyskać jednoznacznej odpowiedzi na to pytanie. Z jednej strony widoczna jest rola IL-33 w patogenezie MF: stwierdzono niższy poziom receptora ST2 w pierwszym stadium MF oraz wyższy poziom IL-33 w remisji w porównaniu do MF. Z drugiej strony metoda ELISA okazała się niewystarczająca do uzyskania jednoznacznych wyników i konieczne jest użycie bardziej specyficznych metod analizy.

11 Streszczenie po angielsku

Mycosis fungoides (MF, mycosis fungoides) is the most common cutaneous primary lymphoma derived from T-cells. Mycosis fungoides pathogenesis is not fully known. During the development of the MF disease the skin are infiltrated by the memory T cells CD4 + (ie. skin-homing cells). Activation and monoclonic expansion of CD4 + lymphocytes induces the production of numerous cytokines and cell growth factors interacting with keratinocytes, which contributes to the development of inflammation, which clinically obtains in skin lesions (McGirt, 2017). The cytokine profile changes in the tumor cell microenvironment of Mycosis fungoides play an important role in the development and progression of the disease (Rubio Gonzalez et al., 2016).

IL-33 belongs to the superfamily of interleukin 1. It manifests pleiotropic properties, it modulates the innate and adaptive immunity including polarization of naive T cells, induction of dendritic cell maturation, activation of regulatory T cells, cytotoxic T lymphocytes and NK cells (Bertheloot i Latz, 2017; Liew i wsp., 2016). An increasing amount of research shows the importance of IL-33 in the pathogenesis of Atopic dermatitis (AD). A concentration of IL-33 in serum positively correlates with the severity of atopic dermatitis symptoms (Tamagawa-Mineoka i wsp., 2014) and decreases due to the treatment (Savinko i wsp., 2012). In recent years, researchers are discussing on the association of AD with a higher risk of developing cutaneous lymphomas (Legendre et al., 2015). Memory T cells CD4 + cells, which infiltrate the skin in the MF, are also observed in the skin of patients with AD. Due to the clinical similarities in some forms of diseases, it is the cause of significant diagnostic difficulties (Miyagaki and Sugaya, 2011).

In the 2008 study, the association of SNP polymorphisms of the IL-33 gene with the occurrence Japanese cedar (JC) pollinosis, which is a type of allergic reaction of Th2 modulated lymphocytes, was examined (Sakashita i wsp., 2008). The study identified 22 SNPs polymorphisms, most frequently appearing in the IL-33 gene. As a result of statistical analysis, polymorphisms: 9894 T/C (rs1929992) located in intron 3 of IL-33 gene and 11877 C / T (rs10975519) located in exon 5 of the IL-33 gene were selected for genotyping.

A statistically significant higher concentration of IL-33 was found in patients with allergic rhinitis in relation to healthy control ($p = 0.00018$), and a correlation between polymorphism 9894 T / C and rhinitis was observed ($p = 0.048$) (Sakashita et al. ., 2008).

The main goal of this study was to investigate the influence of IL33 gene polymorphisms 9894 T / C and 11877 C / T - IL33 gene for the course of disease MF. Additionally, the IL-33 and ST2 levels

and their prognostic value were evaluated. In patients, the degree of pruritus and its relation to IL-33 levels and the ST2 receptor were examined.

The study was carried out in 2012-2015 on 88 patients with MF treated at the University Dermatological Ward, Clinical Center in Gdańsk and 66 healthy people (control group). In the group of patients were 30 women aged from 35 to 78 years and 58 men aged from 20 to 86 years. In the control group there were 68 healthy women with an average age of 46 years and 54 healthy men with an average age of 49 years. Two samples of blood were collected from ill and healthy people. Serum was isolated from the first sample, IL-33 and ST2 levels were determined in the serum and genomic DNA was isolated from the second sample. Polymorphisms of the IL-33 gene were determined by ARMS-PCR method. The level of IL-33 and the receptor in the serum of patients was determined using the ELISA method. Two scales were used to assess the severity of pruritus: the visual VAS analog scale and the NRS numerical scale.

For statistical analysis, three different groups of SNP genotypes were used: grouping 1. (genotypes: CC, CT, TT,) consistent with directly obtained data from laboratory analysis; grouping 2. (genotypes: C (+), C (-)) and grouping 3. (genotypes: T (+), T (-)). The results were analyzed using StatSoft STATISTICA version 10 statistical packages. The level of significance was $p < 0.05$.

In contrast to the Japanese study, no statistically significant association was found for the SNP 9894 T/C polymorphism (NCBI rs1929992), while the genotype IL-33 C (+) and C (-) genes were found at the 11877 locus and the concentration of the ST2 receptor for both groups. Probably due to the low sensitivity of the ELISA method and the rapid degradation of IL-33 by proteolytic enzymes, the relationship between the level of IL-33 and the type of polymorphism has not been observed. There were also no differences in the frequencies of the genotypes in the respective stages of MF. For IL-33 levels, there were no statistically significant differences between the group of patients and the control group, what may be explained by the turn-over process, which is a rapid metabolism of protein in the body. IL-33 is rapidly ubiquitinated and is systematically degraded in proteasomes by proteolytic enzymes (Meephansan et al., 2012). The limiting factor in IL-33 studies are also methodological problems. Several studies have shown that commercial ELISA kits for determining concentration levels of IL-33 have a high risk of error. The risk of error is due to the low sensitivity, specificity of the tests, and possible interference of IL-33 with human serum proteins, which may significantly influence for the final results of the study. (Ketelaar et al., 2016; Nygaard et al., 2017; Rivière et al., 2016). Therefore, it is necessary to look for more sensitive and specific methods of analysis. The presented study found about 38% higher concentration of ST2 receptor in the serum of patients compared to a healthy control group, the observation is consistent with previous studies by Yoshida et al. (1995) and Tsuchiyi et al.

(2004), which showed increased ST2 expression in leukemia and T-cell lymphomas. Increased synthesis of the soluble form of the ST2 receptor is probably a result of stimulation by the pro-inflammatory cytokines: TNF and IL-6. (Milovanovic et al., 2012).

In patients, no relationship was found between the severity of itching and the level of IL-33 and the ST2 receptor. Probably this observation may be explained by the fact that the level of IL-33 and the ST2 receptor in the inflammatory process is rapidly changing, and the limitations of methodological nature do not allow for a more precise cytokine determination.

One purpose of this study was to investigate whether IL-33 and / or its receptor ST2 may be prognostic factors in MF. For this question, no clear answers were obtained based on the results of this study. On the one hand, the role of IL-33 in the pathogenesis of MF is evident: lower level of ST2 receptor was found in the first stage of MF and a higher level of IL-33 was found in remission compared to patients with MF. On the other hand, the ELISA method proved to be insufficient to obtain good results and it is necessary to use more specific methods of analysis.

12 Piśmiennictwo

- Agar, N.S., Wedgeworth, E., Crichton, S., Mitchell, T.J., Cox, M., Ferreira, S., Robson, A., Calonje, E., Stefanato, C.M., Wain, E.M., Wilkins, B., Fields, P.A., Dean, A., Webb, K., Scarisbrick, J., Morris, S., Whittaker, S.J., 2010. Survival outcomes and prognostic factors in mycosis fungoides/Sézary syndrome: validation of the revised International Society for Cutaneous Lymphomas/European Organisation for Research and Treatment of Cancer staging proposal. *J. Clin. Oncol.* 28, 4730–4739. doi:10.1200/JCO.2009.27.7665
- Ahern, K., Gilmore, E.S., Poligone, B., 2012. Pruritus in cutaneous T-cell lymphoma: a review. *J. Am. Acad. Dermatol.* 67, 760–768. doi:10.1016/j.jaad.2011.12.021
- Akinbami, A.A., Osikomaiya, B.I., John-Olabode, S.O., Adediran, A.A., Osinaike, O., Uche, E.I., Ismail, A.K., Dosunmu, A.O., Odesanya, M., Dada, A., Okunoye, O., 2014. Mycosis fungoides: case report and literature review. *Clin. Med. Insights Case Rep.* 7, 95–98. doi:10.4137/CCRep.S15724
- Ali, S., Mohs, A., Thomas, M., Klare, J., Ross, R., Schmitz, M.L., Martin, M.U., 2011. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF- κ B to dampen NF- κ B-stimulated gene transcription. *J. Immunol.* 187, 1609–1616. doi:10.4049/jimmunol.1003080
- Asahina, R., Maeda, S., 2017. A review of the roles of keratinocyte-derived cytokines and chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis in humans and dogs. *Vet. Dermatol.* 28, 16-e5. doi:10.1111/vde.12351
- Baecklund, E., Smedby, K.E., Sutton, L.-A., Askling, J., Rosenquist, R., 2014. Lymphoma development in patients with autoimmune and inflammatory disorders--what are the driving forces? *Semin. Cancer Biol.* 24, 61–70. doi:10.1016/j.semcancer.2013.12.001
- Baekkevold, E.S., Roussigné, M., Yamanaka, T., Johansen, F.-E., Jahnsen, F.L., Amalric, F., Brandtzaeg, P., Erard, M., Haraldsen, G., Girard, J.-P., 2003. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am. J. Pathol.* 163, 69–79. doi:10.1016/S0002-9440(10)63631-0
- Bazin, E. (1807-1878), 1870. Leçons sur le traitement des maladies chroniques en général et des affections de la peau en particulier par l'emploi comparé des eaux minérales, de l'hydrothérapie et des moyens pharmaceutiques, professées à l'hôpital Saint-Louis, par le Dr E. Bazin,... rédigées et publiées par E. Maurel,... [WWW Document]. URL (dostęp 11.14.15).
- Bergis, D., Kassis, V., Radeke, H.H., 2016. High plasma sST2 levels in gastric cancer and their association with metastatic disease. *Cancer Biomark.* 16, 117–125. doi:10.3233/CBM-150547

- Bergis, D., Kassis, V., Ranglack, A., Koeberle, V., Piiper, A., Kronenberger, B., Zeuzem, S., Waidmann, O., Radeke, H.H., 2013. High Serum Levels of the Interleukin-33 Receptor Soluble ST2 as a Negative Prognostic Factor in Hepatocellular Carcinoma. *Transl. Oncol.* 6, 311–318.
- Bertheloot, D., Latz, E., 2017. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell. Mol. Immunol.* 14, 43–64. doi:10.1038/cmi.2016.34
- Bulek, K., Swaidani, S., Qin, J., Lu, Y., Gulen, M.F., Herjan, T., Min, B., Kastelein, R.A., Aronica, M., Kosz-Vnenchak, M., Li, X., 2009. The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response. *J. Immunol.* 182, 2601–2609. doi:10.4049/jimmunol.0802729
- Carriere, V., Roussel, L., Ortega, N., Lacorre, D.-A., Americh, L., Aguilar, L., Bouche, G., Girard, J.-P., 2007. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 282–287. doi:10.1073/pnas.0606854104
- Cherry, W.B., Yoon, J., Bartemes, K.R., Iijima, K., Kita, H., 2008. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 1484–1490. doi:10.1016/j.jaci.2008.04.005
- Courgnaud, V., Duthanh, A., Guillot, B., Sitbon, M., Dereure, O., 2009. Absence of HTLV-related sequences in skin lesions and peripheral blood of cutaneous T-cell lymphomas. *J. Invest. Dermatol.* 129, 2520–2522. doi:10.1038/jid.2009.123
- De la Fuente, M., MacDonald, T.T., Hermoso, M.A., 2015. The IL-33/ST2 axis: Role in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26, 615–623. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.017
- Deen, K., O'Brien, B., Wu, J., 2015. Invisible Mycosis Fungoides: Not to be Missed in Chronic Pruritus. *Dermatol. Ther.* 5, 213–216. doi:10.1007/s13555-015-0083-4
- Demierre, M.-F., Tien, A., Miller, D., 2005. Health-related quality-of-life assessment in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Arch. Dermatol.* 141, 325–330.
- Dempster, A.P., Laird, N.M., Rubin, D.B., 1977. Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 39, 1–38.
- Demyanets, S., Konya, V., Kastl, S.P., Kaun, C., Rauscher, S., Niessner, A., Pentz, R., Pfaffenberger, S., Rychli, K., Lemberger, C.E., de Martin, R., Heinemann, A., Huk, I., Gröger, M., Maurer, G., Huber, K., Wojta, J., 2011. Interleukin-33 induces expression of adhesion molecules and inflammatory activation in human endothelial cells and in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2080–2089. doi:10.1161/ATVBAHA.111.231431
- Deonizio, J.M.D., Ascef, R.D., Sanches, J.A., 2016. Folliculotropic mycosis fungoides: clinical and epidemiological evaluation in a single center in Brazil. *Int. J. Dermatol.* 55, e256-261. doi:10.1111/ijd.13149

- Dominguez, D., Ye, C., Geng, Z., Chen, S., Fan, J., Qin, L., Long, A., Wang, L., Zhang, Z., Zhang, Y., Fang, D., Kuzel, T.M., Zhang, B., 2017. Exogenous IL-33 Restores Dendritic Cell Activation and Maturation in Established Cancer. *J. Immunol.* 198, 1365–1375. doi:10.4049/jimmunol.1501399
- Duault C., Betous D., Bezombes C., Roga S., Cayrol C., Girard J.-P., Fournié J.-J., Poupot M., 2017. IL-33-expanded human V γ 9V δ 2 T cells have anti-lymphoma effect in a mouse tumor model. [Epub ahead of print], *Eur. J. Immunol.* doi: 10.1002/eji.201747093.
- Enoksson, M., Lyberg, K., Möller-Westerberg, C., Fallon, P.G., Nilsson, G., Lunderius-Andersson, C., 2011. Mast cells as sensors of cell injury through IL-33 recognition. *J. Immunol.* 186, 2523–2528. doi:10.4049/jimmunol.1003383
- Excoffier, L., Laval, G., Balding, D., 2003. Gametic phase estimation over large genomic regions using an adaptive window approach. *Hum. Genomics* 1, 7. doi:10.1186/1479-7364-1-1-7
- Fan, D., Ding, N., Yang, T., Wu, S., Liu, S., Liu, L., Hu, Y., Duan, Z., Xia, G., Xu, S., Xu, J., Ding, C., Pan, F., 2014. Single nucleotide polymorphisms of the interleukin-33 (IL-33) gene are associated with ankylosing spondylitis in Chinese individuals: a case-control pilot study. *Scand. J. Rheumatol.* 43, 374–379. doi:10.3109/03009742.2014.882408
- Furue, M., Yamamura, K., Kido-Nakahara, M., Nakahara, T., Fukui, Y., 2017. Emerging role of interleukin-31 and interleukin-31 receptor in pruritus in atopic dermatitis. *Allergy.* doi:10.1111/all.13239
- Gangemi, S., Franchina, T., Minciullo, P.L., Profita, M., Zanghì, M., David, A., Kennez, I., Adamo, V., 2013. IL-33/IL-31 axis: a new pathological mechanisms for EGFR tyrosine kinase inhibitors-associated skin toxicity. *J. Cell. Biochem.* 114, 2673–2676. doi:10.1002/jcb.24614
- Gerami, P., Rosen, S., Kuzel, T., Boone, S.L., Guitart, J., 2008. Folliculotropic mycosis fungoides: an aggressive variant of cutaneous T-cell lymphoma. *Arch. Dermatol.* 144, 738–746. doi:10.1001/archderm.144.6.738
- Green, S.B., Byar, D.P., Lamberg, S.I., 1981. Prognostic variables in mycosis fungoides. *Cancer* 47, 2671–2677.
- Griesenauer, B., Paczesny, S., 2017. The ST2/IL-33 Axis in Immune Cells during Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* 8, 475. doi:10.3389/fimmu.2017.00475
- Guo, J., Xiang, Y., Peng, Y.-F., Huang, H.-T., Lan, Y., Wei, Y.-S., 2016. The association of novel IL-33 polymorphisms with sIL-33 and risk of systemic lupus erythematosus. *Mol. Immunol.* 77, 1–7. doi:10.1016/j.molimm.2016.07.001

- Guo, L., Zhou, X., Guo, X., Zhang, X., Sun, Y., 2013. Association of interleukin-33 gene single nucleotide polymorphisms with ischemic stroke in north Chinese population. *BMC Med. Genet.* 14, 109. doi:10.1186/1471-2350-14-109
- Hodak, E., Amitay-Laish, I., Atzmony, L., Prag-Naveh, H., Yanichkin, N., Barzilai, A., Kershenovich, R., Feinmesser, M., 2016. New insights into folliculotropic mycosis fungoides (FMF): A single-center experience. *J. Am. Acad. Dermatol.* doi:10.1016/j.jaad.2016.03.009
- Hodak, E., Klein, T., Gabay, B., Ben-Amitai, D., Bergman, R., Gdalevich, M., Feinmesser, M., Maron, L., David, M., 2005. Familial mycosis fungoides: report of 6 kindreds and a study of the HLA system. *J. Am. Acad. Dermatol.* 52, 393–402. doi:10.1016/j.jaad.2003.12.052
- Hueber, A.J., Alves-Filho, J.C., Asquith, D.L., Michels, C., Millar, N.L., Reilly, J.H., Graham, G.J., Liew, F.Y., Miller, A.M., McInnes, I.B., 2011. IL-33 induces skin inflammation with mast cell and neutrophil activation. *Eur. J. Immunol.* 41, 2229–2237. doi:10.1002/eji.201041360
- Jenkins, W.S., Roger, V.L., Jaffe, A.S., Weston, S.A., AbouEzzeddine, O.F., Jiang, R., Manemann, S.M., Enriquez-Sarano, M., 2017. Prognostic Value of Soluble ST2 After Myocardial Infarction: A Community Perspective. *Am. J. Med.* 130, 1112.e9-1112.e15. doi:10.1016/j.amjmed.2017.02.034
- Jinno, N., Yamana, Y., Kawashima, M., Tsunemi, Y., 2015. Mycosis fungoides with psoriasiform lesions. *J. Dermatol.* 42, 227–229. doi:10.1111/1346-8138.12749
- Jovanovic, I., Radosavljevic, G., Mitrovic, M., Juranic, V.L., McKenzie, A.N.J., Arsenijevic, N., Jonjic, S., Lukic, M.L., 2011. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur. J. Immunol.* 41, 1902–1912. doi:10.1002/eji.201141417
- Kakkar, R., Lee, R.T., 2008. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 827–840. doi:10.1038/nrd2660
- Ketelaar, M.E., Nawijn, M.C., Shaw, D.E., Koppelman, G.H., Sayers, I., 2016. The challenge of measuring IL-33 in serum using commercial ELISA: lessons from asthma. *Clin. Exp. Allergy* 46, 884–887. doi:10.1111/cea.12718
- Krejsgaard T., Lindahl L.M., Mongan N.P., Wasik M.A., Litvinov I.V., Iversen L., Langhoff E., Woetmann A., Odum N., 2017. Malignant inflammation in cutaneous T-cell lymphoma—a hostile takeover. *Semin. Immunopathol.* 39, 269–282. doi: 10.1007/s00281-016-0594-9
- Koca, S.S., Pehlivan, Y., Kara, M., Alibaz-Oner, F., Oztuzcu, S., Yilmaz, N., Cetin, G.Y., Kisacik, B., Ozgen, M., Pamuk, O.N., Direskeneli, H., Sayarlioglu, M., Onat, A.M., 2016. The IL-33 gene is related to increased susceptibility to systemic sclerosis. *Rheumatol. Int.* 36, 579–584. doi:10.1007/s00296-015-3417-8

- Komai-Koma, M., Wang, E., Kurowska-Stolarska, M., Li, D., McSharry, C., Xu, D., 2016. Interleukin-33 promoting Th1 lymphocyte differentiation depends on IL-12. *Immunobiology* 221, 412–417. doi:10.1016/j.imbio.2015.11.013
- Komai-Koma, M., Xu, D., Li, Y., McKenzie, A.N.J., McInnes, I.B., Liew, F.Y., 2007. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 2779–2786. doi:10.1002/eji.200737547
- Krzakowski, M., Warzocha, K. (Eds.), 2014. Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych, 2013. Tom III. VM Media Sp z o.o. VM Group sp. k., Gdańsk.
- Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., Murphy, G., Corrigan, C.J., Ying, S., Pitman, N., Mirchandani, A., Rana, B., van Rooijen, N., Shepherd, M., McSharry, C., McInnes, I.B., Xu, D., Liew, F.Y., 2009. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J. Immunol.* 183, 6469–6477. doi:10.4049/jimmunol.0901575
- Latiano, A., Palmieri, O., Pastorelli, L., Vecchi, M., Pizarro, T.T., Bossa, F., Merla, G., Augello, B., Latiano, T., Corritore, G., Settesoldi, A., Valvano, M.R., D'Incà, R., Stronati, L., Annese, V., Andriulli, A., 2013. Associations between Genetic Polymorphisms in IL-33, IL1R1 and Risk for Inflammatory Bowel Disease. *PLOS ONE* 8, e62144. doi:10.1371/journal.pone.0062144
- Lefrançais, E., Roga, S., Gautier, V., Gonzalez-de-Peredo, A., Monsarrat, B., Girard, J.-P., Cayrol, C., 2012. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 1673–1678. doi:10.1073/pnas.1115884109
- Legendre, L., Barnette, T., Mazereeuw-Hautier, J., Meyer, N., Murrell, D., Paul, C., 2015. Risk of lymphoma in patients with atopic dermatitis and the role of topical treatment: A systematic review and meta-analysis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 72, 992–1002. doi:10.1016/j.jaad.2015.02.1116
- Lehman, J.S., Cook-Norris, R.H., Weed, B.R., Weenig, R.H., Gibson, L.E., Weaver, A.L., Pittelkow, M.R., 2010. Folliculotropic mycosis fungoides: single-center study and systematic review. *Arch. Dermatol.* 146, 607–613. doi:10.1001/archdermatol.2010.101
- Lesiak, A., Sobolewska, D., Sysa-Jędrzejowska, A., Narbutt, J., 2011. Retrospective analysis of clinical manifestation in patients with primary cutaneous lymphomas. *Przegląd Dermatol. Rev.* 98, 13–18.
- Levescot, A., Flamant, S., Basbous, S., Jacomet, F., Féraud, O., Anne Bourgeois, E., Bonnet, M.-L., Giraud, C., Roy, L., Barra, A., Chomel, J.-C., Turhan, A., Guilhot, F., Girard, J.-P., Gombert, J.-M., Herbelin, A., 2014. BCR-ABL-induced deregulation of the IL-33/ST2 pathway in CD34+ progenitors from chronic myeloid leukemia patients. *Cancer Res.* 74, 2669–2676. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2797

- Li, C., Mu, R., Guo, J., Wu, X., Tu, X., Liu, X., Hu, F., Guo, S., Zhu, J., Xu, H., Li, Z., 2014. Genetic variant in IL33 is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 16, R105. doi:10.1186/ar4554
- Li, J., Liu, L., Rui, W., Li, X., Xuan, D., Zheng, S., Yu, Y., Zhang, J., Kong, N., Zhu, X., Zou, H., Wan, W., Xue, Y., 2017. New Interleukins in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Patients: The Possible Roles of Interleukin-33 to Interleukin-38 in Disease Activities and Bone Erosions. *Dermatol. Basel Switz.* 233, 37–46. doi:10.1159/000471798
- Liew, F.Y., Girard, J.-P., Turnquist, H.R., 2016. Interleukin-33 in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 676–689. doi:10.1038/nri.2016.95
- Liu, X., Hammel, M., He, Y., Tainer, J.A., Jeng, U.-S., Zhang, L., Wang, S., Wang, X., 2013. Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 14918–14923. doi:10.1073/pnas.1308651110
- Lu, B., Yang, M., Wang, Q., 2016. Interleukin-33 in tumorigenesis, tumor immune evasion, and cancer immunotherapy. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 94, 535–543. doi:10.1007/s00109-016-1397-0
- Macedo, R.B.V., Kakehasi, A.M., Melo de Andrade, M.V., 2016. IL33 in rheumatoid arthritis: potential contribution to pathogenesis. *Rev. Bras. Reumatol.* 56, 451–457. doi:10.1016/j.rbre.2016.03.009
- Mager, L.F., Riether, C., Schürch, C.M., Banz, Y., Wasmer, M.-H., Stuber, R., Theocharides, A.P., Li, X., Xia, Y., Saito, H., Nakae, S., Baerlocher, G.M., Manz, M.G., McCoy, K.D., Macpherson, A.J., Ochsenbein, A.F., Beutler, B., Krebs, P., 2015. IL-33 signaling contributes to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *J. Clin. Invest.* 125, 2579–2591. doi:10.1172/JCI77347
- Malek, M., Gleń, J., Rębała, K., Kowalczyk, A., Sobjanek, M., Nowicki, R., Ruckemann-Dziurdzińska, K., Sokołowska-Wojdyło, M., 2015. IL-31 does not correlate to pruritus related to early stage cutaneous T-cell lymphomas but is involved in pathogenesis of the disease. *Acta Derm. Venereol.* 95, 283–288. doi:10.2340/00015555-1958
- Margiotta, D.P.E., Navarini, L., Vadacca, M., Lo Vullo, M., Pignataro, F., Basta, F., Afeltra, A., 2016. The IL33/ST2 axis in Sjogren syndrome in relation to disease activity. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20, 1295–1299.
- Martin, M.U., 2013. Special aspects of interleukin-33 and the IL-33 receptor complex. *Semin. Immunol.* 25, 449–457. doi:10.1016/j.smim.2013.10.006
- Martin, N.T., Martin, M.U., 2016. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat. Immunol.* 17, 122–131. doi:10.1038/ni.3370
- Matta, B.M., Turnquist, H.R., 2016. Expansion of Regulatory T Cells In Vitro and In Vivo by IL-33. *Methods Mol. Biol.* 1371, 29–41. doi:10.1007/978-1-4939-3139-2_3

- McGirt, L.Y., 2017. Latest insights into pathogenesis of mycosis fungoides and cutaneous T-cell lymphoma. *G. Ital. Dermatol. Venereol.* 152, 158–168. doi:10.23736/S0392-0488.16.05527-9
- Meehansan, J., Tsuda, H., Komine, M., Tominaga, S.-I., Ohtsuki, M., 2012. Regulation of IL-33 expression by IFN- γ and tumor necrosis factor- α in normal human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 132, 2593–2600. doi:10.1038/jid.2012.185
- Meyer, N., Paul, C., Misery, L., 2010. Pruritus in cutaneous T-cell lymphomas: frequent, often severe and difficult to treat. *Acta Derm. Venereol.* 90, 12–17. doi:10.2340/00015555-0789
- Miller, A.M., 2011. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J. Inflamm. Lond.* 8, 22. doi:10.1186/1476-9255-8-22
- Milovanovic, M., Volarevic, V., Radosavljevic, G., Jovanovic, I., Pejnovic, N., Arsenijevic, N., Lukic, M.L., 2012. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol. Res.* 52, 89–99. doi:10.1007/s12026-012-8283-9
- Miyagaki, T., Sugaya, M., 2011. Erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: how to differentiate this rare disease from atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* 64, 1–6. doi:10.1016/j.jdermsci.2011.07.007
- Morales-Suárez-Varela, M.M., Olsen, J., Johansen, P., Kaerlev, L., Guénel, P., Arveux, P., Wingren, G., Hardell, L., Ahrens, W., Stang, A., Llopis, A., Merletti, F., Aurrekoetxea, J.J., Masala, G., 2005. Occupational exposures and mycosis fungoides. A European multicentre case-control study (Europe). *Cancer Causes Control CCC* 16, 1253–1259. doi:10.1007/s10552-005-0456-6
- Morales-Suárez-Varela, M.M., Olsen, J., Johansen, P., Kaerlev, L., Guénel, P., Arveux, P., Wingren, G., Hardell, L., Ahrens, W., Stang, A., Llopis, A., Merletti, F., Aurrekoetxea, J.J., Masala, G., 2004. Occupational risk factors for mycosis fungoides: a European multicenter case-control study. *J. Occup. Environ. Med.* 46, 205–211.
- Muniesa, C., Estrach, T., Pujol, R.M., Gallardo, F., Garcia-Muret, P., Climent, J., Servitje, O., 2010. Folliculotropic mycosis fungoides: clinicopathological features and outcome in a series of 20 cases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 62, 418–426. doi:10.1016/j.jaad.2009.03.014
- Musolino, C., Allegra, A., Mannucci, C., Russo, S., Alonci, A., Maisano, V., Calapai, G., Gangemi, S., 2015. Possible Role of Interleukin-31/33 Axis in Imatinib Mesylate-Associated Skin Toxicity. *Turk. J. Haematol.* 32, 168–171. doi:10.4274/tjh.2014.0021
- Nattkemper, L.A., Martinez-Escala, M.-E., Gelman, A.B., Singer, E.M., Rook, A.H., Guitart, J., Yosipovitch, G., 2016. Cutaneous T-cell Lymphoma and Pruritus: The Expression of IL-31 and its Receptors in the Skin. *Acta Derm. Venereol.* 96, 894–898. doi:10.2340/00015555-2417
- Nikolaou, V., Papadavid, E., Patsatsi, A., Siakantaris, M., Economidi, A., Marinos, L., Koletsa, T., Georgiou, E., Pappa, V., Stratigos, A., Antoniou, C., 2017. Prognostic indicators for mycosis fungoides in a Greek population. *Br. J. Dermatol.* 176, 1321–1330. doi:10.1111/bjd.15000

- Novelli, M., Merlino, C., Ponti, R., Bergallo, M., Quaglino, P., Cambieri, I., Comessatti, A., Sidoti, F., Costa, C., Corino, D., Cavallo, R., Ponzi, A.N., Fierro, M.T., Bernengo, M.G., 2009. Epstein-Barr virus in cutaneous T-cell lymphomas: evaluation of the viral presence and significance in skin and peripheral blood. *J. Invest. Dermatol.* 129, 1556–1561. doi:10.1038/jid.2008.396
- Nygaard, U., van den Bogaard, E.H., Niehues, H., Hvid, M., Deleuran, M., Johansen, C., Vestergaard, C., 2017. The “Alarmins” HMBG1 and IL-33 Downregulate Structural Skin Barrier Proteins and Impair Epidermal Growth. *Acta Derm. Venereol.* 97, 305–312. doi:10.2340/00015555-2552
- Onda, H., Kasuya, H., Takakura, K., Hori, T., Imaizumi, T., Takeuchi, T., Inoue, I., Takeda, J., 1999. Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 1279–1288. doi:10.1097/00004647-199911000-00013
- Palmer, G., Gabay, C., 2011. Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 321–329. doi:10.1038/nrrheum.2011.53
- Pastorelli, L., Garg, R.R., Hoang, S.B., Spina, L., Mattioli, B., Scarpa, M., Fiocchi, C., Vecchi, M., Pizarro, T.T., 2010. Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8017–8022. doi:10.1073/pnas.0912678107
- Pawlaczyk, M., Filas, V., 2003. Mycosis fungoides - primary cutaneous T-cell lymphoma. *Contemp. Oncol. Onkol.* 6.
- Pinter-Brown, L.C., 2017. Cutaneous T-Cell Lymphoma. <https://emedicine.medscape.com/article/2139720-overview#a3> (dostęp 23.06.17)
- Pulte D., Weberpals J., Jansen L., Luttmann S., Holleczeck B., Nennecke A., Rensing M., Katalinic A., Brenner H.; GEKID Cancer Survival Working Group, 2017. Survival for patients with rare haematologic malignancies: Changes in the early 21st century. *Eur. J. Cancer.* 84, 81–87. doi:10.1016/j.ejca.2017.07.014
- Pushparaj, P.N., Tay, H.K., H'ng, S.C., Pitman, N., Xu, D., McKenzie, A., Liew, F.Y., 2012. Retraction. The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 13877. doi:10.1073/pnas.1210844109
- Queiroz, G.A., Costa, R.S., Alcantara-Neves, N.M., Nunes de Oliveira Costa, G., Barreto, M.L., Carneiro, V.L., Figueiredo, C.A., 2017. IL33 and IL1RL1 variants are associated with asthma and atopy in a Brazilian population. *Int. J. Immunogenet.* 44, 51–61. doi:10.1111/iji.12306
- Rankin, A.L., Mumm, J.B., Murphy, E., Turner, S., Yu, N., McClanahan, T.K., Bourne, P.A., Pierce, R.H., Kastelein, R., Pflanz, S., 2010. IL-33 induces IL-13-dependent cutaneous fibrosis. *J. Immunol.* 184, 1526–1535. doi:10.4049/jimmunol.0903306

- Ravichandran K., Holditch S., Brown C.N., Wang Q., Ozkok A., Weiser-Evans M.C., Nemenoff R.A., Miyazaki M., Thiessen-Philbrook H., Parikh C.R., Ljubanovic D., Edelstein C.L., 2017. IL-33 deficiency slows cancer growth but does not protect against cisplatin-induced AKI in mice with cancer. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* [Epub ahead of print] doi: 10.1152/ajprenal.00040.2017
- Reiter O., Ben Amitai D., Amitay-Laish I., Israeli M., Pavlovsky L., Hodak E., 2017. Pediatric mycosis fungoides: a study of the human leukocyte antigen system among Israeli Jewish patients. *Arch. Dermatol. Res.* 309, 851–856. doi: 10.1007/s00403-017-1783-7
- Rivière, E., Ly, B., Boudaoud, S., Chavez, H., Nocturne, G., Chanson, P., Miceli Richard, C., Mariette, X., 2016. Pitfalls for detecting interleukin-33 by ELISA in the serum of patients with primary Sjögren syndrome: comparison of different kits. *Ann. Rheum. Dis.* 75, 633–635. doi:10.1136/annrheumdis-2015-208557
- Rubio Gonzalez, B., Zain, J., Rosen, S.T., Querfeld, C., 2016. Tumor microenvironment in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Curr. Opin. Oncol.* 28, 88–96. doi:10.1097/CCO.0000000000000243
- Ryu, W.-I., Lee, H., Bae, H.C., Ryu, H.J., Son, S.W., 2016. IL-33 down-regulates filaggrin expression by inducing STAT3 and ERK phosphorylation in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 82, 131–134. doi:10.1016/j.jdermsci.2016.01.011
- Sakashita, M., Yoshimoto, T., Hirota, T., Harada, M., Okubo, K., Osawa, Y., Fujieda, S., Nakamura, Y., Yasuda, K., Nakanishi, K., Tamari, M., 2008. Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clin. Exp. Allergy* 38, 1875–1881. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03114.x
- Saluja, R., Khan, M., Church, M.K., Maurer, M., 2015. The role of IL-33 and mast cells in allergy and inflammation. *Clin. Transl. Allergy* 5, 33. doi:10.1186/s13601-015-0076-5
- Savinko, T., Matikainen, S., Saarialho-Kere, U., Lehto, M., Wang, G., Lehtimäki, S., Karisola, P., Reunala, T., Wolff, H., Lauerma, A., Alenius, H., 2012. IL-33 and ST2 in atopic dermatitis: expression profiles and modulation by triggering factors. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1392–1400. doi:10.1038/jid.2011.446
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., Gorman, D.M., Bazan, J.F., Kastelein, R.A., 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23, 479–490. doi:10.1016/j.immuni.2005.09.015
- Seltmann, J., Werfel, T., Wittmann, M., 2013. Evidence for a regulatory loop between IFN- γ and IL-33 in skin inflammation. *Exp. Dermatol.* 22, 102–107. doi:10.1111/exd.12076

- Seo, D.H., Che, X., Kwak, M.S., Kim, S., Kim, J.H., Ma, H.W., Kim, D.H., Kim, T.I., Kim, W.H., Kim, S.W., Cheon, J.H., 2017. Interleukin-33 regulates intestinal inflammation by modulating macrophages in inflammatory bowel disease. *Sci. Rep.* 7, 851. doi:10.1038/s41598-017-00840-2
- Shah, R.V., Januzzi, J.L., 2010. ST2: a novel remodeling biomarker in acute and chronic heart failure. *Curr. Heart Fail. Rep.* 7, 9–14. doi:10.1007/s11897-010-0005-9
- Skali, H., Gerwien, R., Meyer, T.E., Snider, J.V., Solomon, S.D., Stolen, C.M., 2016. Soluble ST2 and Risk of Arrhythmias, Heart Failure, or Death in Patients with Mildly Symptomatic Heart Failure: Results from MADIT-CRT. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 9, 421–428. doi:10.1007/s12265-016-9713-1
- Sokołowska-Wojdyło, M., 2015. Zasady postępowania w chłoniakach pierwotnie skórnych, in: Jędrzejczak, W.W., Robak, T., Podolak-Dawidziak, M. (Eds.), *Praktyka Hematologiczna*. Termedia, pp. 271–284.
- Sokołowska-Wojdyło, M., Lech-Marańda, E., Placek, W., Meder, J., Zaucha, J.M., Chłoniaków, J.W. w imieniu P.G.B., 2010. Leczenie pierwotnych chłoniaków skóry. Rekomendacje Sekcji Chłoniaków Skóry Polskiej Grupy Badawczej Chłoniaków (PLRG). *Onkol. W Prakt. Klin.* 6, 29–47.
- Sokołowska-Wojdyło, M., Maj, J., Robak, E., Placek, W., Wojas-Pelc, A., Jankowska-Konsur, A., Olek-Hrab, K., Gniadecki, R., Rudnicka, L., 2017. Primary cutaneous lymphomas – diagnostic and therapeutic guidelines of the Polish Dermatological Society. *Dermatol. Rev.* 104, 243–268. doi:10.5114/dr.2017.68774
- Sokołowska-Wojdyło, M., Roszkiewicz, J., 2010. *Pierwotne chłoniaki skóry*, 1st ed. Czelej.
- Sponheim, J., Pollheimer, J., Olsen, T., Balogh, J., Hammarström, C., Loos, T., Kasprzycka, M., Sørensen, D.R., Nilsen, H.R., Küchler, A.M., Vatn, M.H., Haraldsen, G., 2010. Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is preferentially expressed in ulceration-associated myofibroblasts. *Am. J. Pathol.* 177, 2804–2815. doi:10.2353/ajpath.2010.100378
- Stundl, A., Lünstedt, N.-S., Courtz, F., Freitag-Wolf, S., Frey, N., Holdenrieder, S., Zur, B., Grube, E., Nickenig, G., Werner, N., Frank, D., Sinning, J.-M., 2017. Soluble ST2 for Risk Stratification and the Prediction of Mortality in Patients Undergoing Transcatheter Aortic Valve Implantation. *Am. J. Cardiol.* 120, 986–993. doi:10.1016/j.amjcard.2017.06.033
- Suga, H., Sugaya, M., Miyagaki, T., Ohmatsu, H., Fujita, H., Kagami, S., Asano, Y., Tada, Y., Kadono, T., Sato, S., 2013. Association of nerve growth factor, chemokine (C-C motif) ligands and immunoglobulin E with pruritus in cutaneous T-cell lymphoma. *Acta Derm. Venereol.* 93, 144–149. doi:10.2340/00015555-1428

- Sun, P., Ben, Q., Tu, S., Dong, W., Qi, X., Wu, Y., 2011. Serum interleukin-33 levels in patients with gastric cancer. *Dig. Dis. Sci.* 56, 3596–3601. doi:10.1007/s10620-011-1760-5
- Talpur R., Bassett R., Duvic M., 2008. Prevalence and treatment of *Staphylococcus aureus* colonization in patients with mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Br. J. Dermatol.* 159, 105–12. doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08612.x
- Tamagawa-Mineoka, R., Okuzawa, Y., Masuda, K., Katoh, N., 2014. Increased serum levels of interleukin 33 in patients with atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 70, 882–888. doi:10.1016/j.jaad.2014.01.867
- Tsuchiya, T., Ohshima, K., Karube, K., Yamaguchi, T., Suefuji, H., Hamasaki, M., Kawasaki, C., Suzumiya, J., Tomonaga, M., Kikuchi, M., 2004. Th1, Th2, and activated T-cell marker and clinical prognosis in peripheral T-cell lymphoma, unspecified: comparison with AILD, ALCL, lymphoblastic lymphoma, and ATLL. *Blood* 103, 236–241. doi:10.1182/blood-2002-05-1352
- Tsuda, H., Komine, M., Tominaga, S.-I., Ohtsuki, M., 2017. Identification of the promoter region of human IL-33 responsive to induction by IFN γ . *J. Dermatol. Sci.* 85, 137–140. doi:10.1016/j.jdermsci.2016.11.002
- Umansky, V., Blattner, C., Fleming, V., Hu, X., Gebhardt, C., Altevogt, P., Utikal, J., 2017. Myeloid-derived suppressor cells and tumor escape from immune surveillance. *Semin. Immunopathol.* 39, 295–305. doi:10.1007/s00281-016-0597-6
- van Doorn, R., Sliker, R.C., Boonk, S.E., Zoutman, W.H., Goeman, J.J., Bagot, M., Michel, L., Tensen, C.P., Willemze, R., Heijmans, B.T., Vermeer, M.H., 2016. Epigenomic Analysis of Sézary Syndrome Defines Patterns of Aberrant DNA Methylation and Identifies Diagnostic Markers. *J. Invest. Dermatol.* 136, 1876–1884. doi:10.1016/j.jid.2016.03.042
- Vij, A., Duvic, M., 2012. Prevalence and severity of pruritus in cutaneous T cell lymphoma. *Int. J. Dermatol.* 51, 930–934. doi:10.1111/j.1365-4632.2011.05188.x
- Vonderheid, E.C., Bigler, R.D., Hou, J.S., 2005. On the possible relationship between staphylococcal superantigens and increased V β 5.1 usage in cutaneous T-cell lymphoma. *Br. J. Dermatol.* 152, 825–826; author reply 827. doi:10.1111/j.1365-2133.2005.06524.x
- Wang, C., Dong, C., Xiong, S., 2017. IL-33 enhances macrophage M2 polarization and protects mice from CVB3-induced viral myocarditis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 103, 22–30. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.12.010
- Wasmer, M.-H., Krebs, P., 2016. The Role of IL-33-Dependent Inflammation in the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* 7, 682. doi:10.3389/fimmu.2016.00682
- Weinstock, M.A., Reynes, J.F., 1999. The changing survival of patients with mycosis fungoides: a population-based assessment of trends in the United States. *Cancer* 85, 208–212.

- Whittemore, A.S., Holly, E.A., Lee, I.M., Abel, E.A., Adams, R.M., Nickoloff, B.J., Bley, L., Peters, J.M., Gibney, C., 1989. Mycosis fungoides in relation to environmental exposures and immune response: a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 1560–1567.
- Wieser, I., Wang, C., Alberti-Violetti, S., Lyons, G., Tran, C., Talpur, R., Duvic, M., 2017. Clinical characteristics, risk factors and long-term outcome of 114 patients with folliculotropic mycosis fungoides. *Arch. Dermatol. Res.* 309, 453–459. doi:10.1007/s00403-017-1744-1
- Wilcox, R.A., 2014. Cutaneous T-cell lymphoma: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.* 89, 837–851. doi:10.1002/ajh.23756
- Wooldridge, W.E., Lorenc, E., 1985. Mycosis fungoides in husband and wife. *Mo. Med.* 82, 201–202.
- Xiao, P., Wan, X., Cui, B., Liu, Y., Qiu, C., Rong, J., Zheng, M., Song, Y., Chen, L., He, J., Tan, Q., Wang, X., Shao, X., Liu, Y., Cao, X., Wang, Q., 2016. Interleukin 33 in tumor microenvironment is crucial for the accumulation and function of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology* 5, e1063772. doi:10.1080/2162402X.2015.1063772
- Xu, W., Liu, Y., Ye, D., 2016. Association between IL-33 Gene Polymorphisms (rs1929992, rs7044343) and Systemic Lupus Erythematosus in a Chinese Han Population. *Immunol. Invest.* 45, 575–583. doi:10.1080/08820139.2016.1193868
- Yadlapati, S., Efthimiou, P., 2016. Autoimmune/Inflammatory Arthritis Associated Lymphomas: Who Is at Risk? *BioMed Res. Int.* 2016, 8631061. doi:10.1155/2016/8631061
- Yanavitski, M., Givertz, M.M., 2011. Novel biomarkers in acute heart failure. *Curr. Heart Fail. Rep.* 8, 206–211. doi:10.1007/s11897-011-0065-5
- Yang, Q., Li, G., Zhu, Y., Liu, L., Chen, E., Turnquist, H., Zhang, X., Finn, O.J., Chen, X., Lu, B., 2011. IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 41, 3351–3360. doi:10.1002/eji.201141629
- Yang, Z.-P., Ling, D.-Y., Xie, Y.-H., Wu, W.-X., Li, J.-R., Jiang, J., Zheng, J.-L., Fan, Y.-H., Zhang, Y., 2015. The Association of Serum IL-33 and sST2 with Breast Cancer. *Dis. Markers* 2015, 516895. doi:10.1155/2015/516895
- Yasuoka, S., Kawanokuchi, J., Parajuli, B., Jin, S., Doi, Y., Noda, M., Sonobe, Y., Takeuchi, H., Mizuno, T., Suzumura, A., 2011. Production and functions of IL-33 in the central nervous system. *Brain Res.* 1385, 8–17. doi:10.1016/j.brainres.2011.02.045
- Yoshida, K., Arai, T., Yokota, T., Komatsu, N., Miura, Y., Yanagisawa, K., Tetsuka, T., Tominaga, S., 1995. Studies on natural ST2 gene products in the human leukemic cell line UT-7 using monoclonal antihuman ST2 antibodies. *Hybridoma* 14, 419–427.
- Zendri, E., Pilotti, E., Perez, M., Turci, M., Pinelli, S., Ronzi, P., Frontani, M., Faraggiana, T., De Panfilis, G., Casoli, C., 2008. The HTLV tax-like sequences in cutaneous T-cell lymphoma patients. *J. Invest. Dermatol.* 128, 489–492. doi:10.1038/sj.jid.5701034

- Zhang, P., Liu, X.-K., Chu, Z., Ye, J.C., Li, K.-L., Zhuang, W.-L., Yang, D.-J., Jiang, Y.-F., 2012. Detection of interleukin-33 in serum and carcinoma tissue from patients with hepatocellular carcinoma and its clinical implications. *J. Int. Med. Res.* 40, 1654–1661. doi:10.1177/030006051204000504
- Zhu, J., Xu, Y., Zhu, C., Zhao, J., Meng, X., Chen, S., Wang, T., Li, X., Zhang, L., Lu, C., Liu, H., Sun, X., 2017. IL-33 induces both regulatory B cells and regulatory T cells in dextran sulfate sodium-induced colitis. *Int. Immunopharmacol.* 46, 38–47. doi:10.1016/j.intimp.2017.02.006