



**Gdański Uniwersytet Medyczny**

**Dorota Purzycka-Bohdan**

**Ocena poziomu interleukiny 16 w surowicy krwi i skórze  
oraz znaczenia wybranych polimorfizmów genów  
interleukiny 16, MCP-1 i RANTES u chorych na łuszczycę.**

**ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH**

**Promotor:**

**dr hab. n. med. Aneta Szczerkowska-Dobosz**

**Gdańsk 2016**

Wydano za zgodą  
Dziekan Wydziału Lekarskiego

Pracę wykonano w Katedrze i Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii  
oraz Katedrze i Zakładzie Histologii  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

*Składam serdeczne podziękowania*

*Mojemu Promotorowi, Pani dr hab. n. med. Anecie Szczerkowskiej-Dobosz za okazane zaufanie i wsparcie oraz nieocenioną pomoc podczas powstawania niniejszej pracy.*

*Kierownikowi Katedry i Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii GUMed, Panu Profesorowi Romanowi Nowickiemu za możliwość prowadzenia badań naukowych oraz motywację do pracy.*

*Zespołowi Katedry i Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii GUMed, w szczególności Pani dr Monice Zabłotnej, Panu dr Bogusławowi Nedoszytko oraz Panu dr hab. n. med. Michałowi Sobjankowi za pomoc w realizacji badań oraz wsparcie merytoryczne.*

*Panu Profesorowi Michałowi Żmijewskiemu i Zespołowi Katedry i Zakładu Histologii GUMed za cenne wskazówki oraz pomoc przy tworzeniu pracy.*

*Moim Bliskim za ogromne wsparcie, wyrozumiałość i codzienną radość.*

*Wszystkim tym, którzy przyczynili się do powstania niniejszej pracy.*

***Pracę tę dedykuję moim Rodzicom, Mężowi i Synowi***



## SPIS TREŚCI

WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	7
WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY.....	9
WPROWADZENIE.....	11
CELE PRACY.....	12
MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ.....	13
OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY.....	15
WNIOSKI.....	22
STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU ANGIELSKIM.....	24
WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENNICTWA.....	36
PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY.....	39



## WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW

ARMS-PCR	<i>amplification refractory mutation system - polymerase chain reaction/</i> rodzaj allelospecyficznej reakcji łańcuchowej polimerazy
BSA	<i>body surface area/</i> wskaźnik powierzchni ciała
CD4	<i>cluster of differentiation 4/</i> antygen różnicowania komórkowego 4
CCR5	<i>C-C chemokine receptor 5/</i> receptor C-C chemokin typu 5
DLQI	<i>dermatology life quality index/</i> wskaźnik jakości życia zależny od dolegliwości skórnych
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay/</i> test immunoenzymatyczny
GWAS	<i>genome-wide association studies/</i> badania asocjacyjne całego genomu
HLA	<i>human leukocyte antigens/</i> ludzkie antygeny leukocytarne
IL-16	<i>interleukin 16/</i> interleukina 16
LCF	<i>lymphocyte chemoattractant factor/</i> czynnik chemotaktyczny dla limfocytów
MCP-1/CCL2	<i>monocyte chemotactic protein-1/ C-C chemokine ligand 2/</i> białko chemotaktyczne dla monocytów typu 1
MHC	<i>major histocompatibility complex/</i> główny układ zgodności tkankowej
mRNA	<i>messenger RNA/</i> informacyjny RNA
PASI	<i>psoriasis area and severity index/</i> wskaźnik rozległości i ciężkości zmian skórnych w łuszczycy
PCR	<i>polymerase chain reaction/</i> reakcja łańcuchowa polimerazy
PCR-RFLP	<i>polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism/</i> reakcja łańcuchowa polimerazy - analiza polimorfizmu długości

	fragmentów restrykcyjnych
PSORS	<i>psoriasis susceptibility locus/ locus podatności na łuszczycę</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction/ ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy</i>
RANTES/CCL5	<i>regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted/ C-C chemokine ligand 5/ β-chemokina CCL5</i>
SSP-PCR	<i>single specific primer-polymerase chain reaction/ amplifikacja DNA ze starterami swoistymi dla alleli</i>
Th	<i>T helper cells/ komórki T pomocnicze</i>

W tekście pracy symbole genów oznaczono czcionką pochyloną, a symbole białek czcionką prostą [1].



## WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

1. Marta Stawczyk-Macieja, Aneta Szczerkowska-Dobosz, Krzysztof Rębała, Dorota Purzycka-Bohdan. **Genetic background of skin barrier dysfunction in the pathogenesis of psoriasis vulgaris**. Post Dermatol Alergol 2015;32:123-126.

DOI: 10.5114/pdia.2014.44003

Impact Factor 1,342; Punktacja ministerstwa 15,000; Index Copernicus 163,45

2. Dorota Purzycka-Bohdan, Bogusław Nedoszytko, Michał Żmijewski, Aneta Szczerkowska-Dobosz, Monika Zabłotna, Roman Nowicki. **Rola interleukiny 16 w patogenezie wybranych chorób skóry**. Przegl Dermatol 2014;101:65-72.

DOI: 10.5114/dr.2014.41074

Impact Factor —; Punktacja ministerstwa 6,000; Index Copernicus 107,97

3. Dorota Purzycka-Bohdan, Aneta Szczerkowska-Dobosz, Monika Zabłotna, Justyna Wierzbicka, Anna Piotrowska, Michał A. Żmijewski, Bogusław Nedoszytko, Roman Nowicki. **Assessment of interleukin 16 serum levels and skin expression in psoriasis patients in correlation with clinical severity of the disease**. PLoS One 2016 Oct 27;11(10):e0165577.

DOI: 10.1371/journal.pone.0165577

Impact Factor 3,057; Punktacja ministerstwa 40,000; Index Copernicus —

4. Monika Zabłotna, Michał Sobjanek, Dorota Purzycka-Bohdan, Aneta Szczerkowska-Dobosz, Bogusław Nedoszytko, Roman Nowicki. **-2518 A/G MCP-1 and -403 G/A RANTES promoter gene polymorphisms are associated with psoriasis vulgaris**. Clin Exp Dermatol.

DOI:10.1111/ced.12937

Impact Factor 1,315; Punktacja ministerstwa 20,000; Index Copernicus —

Sumaryczny współczynnik Impact Factor: **5,714**

Sumaryczna punktacja ministerstwa: **81,000**

Sumaryczny Index Copernicus: **271,42**



## WPROWADZENIE

Łuszczyca jest przewlekłą, zapalną chorobą skóry. Kluczową rolę w patogenezie tej choroby odgrywa wzajemne oddziaływanie czynników genetycznych, immunologicznych i środowiskowych. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy łuszczycę określa się mianem choroby kompleksowej o wielogenowym modelu dziedziczenia [2]. Podłoże genetyczne łuszczycy nie budzi wątpliwości, jednak wciąż poszukuje się nowych wariantów polimorficznych genów, które mogą mieć wpływ na ryzyko rozwoju i przebieg łuszczycy.

Zmiany skórne w przebiegu łuszczycy wynikają z nadmiernej proliferacji komórek naskórka i skrócenia okresu przejścia keratynocytów z warstwy podstawnej do warstwy rogowej. W patogenezie tego schorzenia istotną rolę odgrywają zaburzenia immunologiczne, a w szczególności podkreślany jest wpływ limfocytów T na nadmierną proliferację keratynocytów [3,4]. Źródło toczącego się procesu zapalnego oraz przyczyna nasilonej aktywacji i migracji limfocytów T do skóry u chorych na łuszczycę pozostają nieokreślone. Istotne zatem wydają się badania nad rolą cytokin i chemokin, kontrolujących napływ komórek zapalnych do skóry.

Interleukina 16 (IL-16) jest cytokiną prozapalną o plejotropowym działaniu na komórki układu immunologicznego. Wykazuje ona chemotaktyczne właściwości w stosunku do limfocytów T CD4+, a także monocytów, eozynofili i komórek dendrytycznych [5,6]. Interleukina 16 uznawana jest za czynnik wzrostowy komórek Th1, a jej funkcja ściśle wiąże się z ekspresją receptora CD4 na komórkach docelowych [5]. Posiada ona także zdolność łączenia się z receptorem CCR5, co dodatkowo wzmacnia aktywację limfocytów Th1 [6]. Szerokie spektrum funkcji biologicznych IL-16 obejmuje również wpływ na wzrost produkcji innych prozapalnych cytokin oraz regulację cyklu komórkowego [7,8].

Chemokiny należące do cytokin chemotaktycznych stanowią niezwykle istotną grupę białek biorących udział w formowaniu ogniska zapalnego. W grupie tej na szczególną uwagę zasługują chemokiny MCP-1 (CCL2) oraz RANTES (CCL5), które poprzez wpływ na stymulację i migrację leukocytów z krwi do tkanek, modulują przebieg reakcji zapalnej [9].

Prozapalne właściwości IL-16, MCP-1 i RANTES wskazują na ich potencjalne znaczenie w powstawaniu zmian skórnych w przebiegu łuszczycy.

## **CELE PRACY**

### **IL-16**

1. Porównanie stężenia IL-16 w surowicy krwi w populacji chorych na łuszczycę oraz w grupie kontrolnej.
2. Ocena ekspresji *IL-16* na poziomie mRNA oraz lokalizacji białka IL-16 w obrębie struktur blaszki łuszczycowej oraz w skórze pozornie niezmienionej osób chorych na łuszczycę w porównaniu ze skórą osób z grupy kontrolnej.
3. Analiza potencjalnej zależności pomiędzy poziomem mRNA *IL-16* i mRNA *CD4* w skórze osób chorych na łuszczycę.
4. Ocena korelacji pomiędzy stężeniem IL-16 w surowicy krwi i poziomem mRNA *IL-16* w skórze, a klinicznymi wskaźnikami ciężkości łuszczycy.
5. Porównanie częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu -295 *T/C* promotora genu *IL-16* w grupie osób chorych na łuszczycę i w grupie kontrolnej.

### **MCP-1 i RANTES**

1. Porównanie częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmów -2518 *A/G* promotora genu *MCP-1* i -403 *G/A* promotora genu *RANTES* w grupie osób chorych na łuszczycę i w grupie kontrolnej oraz ocena wpływu powyższych polimorfizmów na ryzyko i przebieg łuszczycy.
2. Ocena poziomu chemokin MCP-1 i RANTES w surowicy krwi osób z grupy badanej i kontrolnej oraz korelacja uzyskanych wartości z ciężkością łuszczycy.
3. Analiza związku badanych polimorfizmów genów *MCP-1* i *RANTES* z poziomem kodowanych przez nie chemokin w surowicy krwi.

## MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badaniem dotyczącym IL-16 objęto 97 osób chorych na łuszczycę zwyczajną, pozostających pod opieką Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii oraz Poradni Przyklinicznej w Gdańsku, uwzględniając przyjęte kryteria włączenia i wyłączenia. Grupę kontrolną utworzyło 104 zdrowych niespokrewnionych ochotników bez wywiadu w kierunku łuszczycy i innych przewlekłych zapalnych chorób skóry oraz bez dodatniego rodzinnego wywiadu w kierunku łuszczycy. W toku prowadzonej pracy, grupy te poszerzono do 160 osób chorych i 160 osób z grupy kontrolnej, a w oparciu o zebrany materiał przeprowadzono badania nad MCP-1 i RANTES.

W grupie osób chorych na podstawie dokładnej oceny stanu skóry oszacowano wskaźnik rozległości i ciężkości zmian skórnych (PASI) oraz określono w procentach powierzchnię ciała zajęta przez zmiany łuszczycowe (BSA). Ponadto oceniono wskaźnik jakości życia zależny od dolegliwości skórnych (DLQI).

Pomiaru stężenia IL-16, MCP-1 oraz RANTES w surowicy krwi dokonano za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA), zaś ocenę ekspresji *IL-16* na poziomie mRNA w biopsjach skórnych przeprowadzono za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy DNA (qPCR). Lokalizację białka IL-16 określono na podstawie badań immunohistochemicznych. Oznaczenia polimorfizmów genów *IL-16*, *MCP-1* i *RANTES* wykonano odpowiednio za pomocą metody PCR-RFLP, ARMS-PCR i SSP-PCR.

Statystyczne opracowanie wyników przeprowadzono za pomocą programu STATISTICA z użyciem odpowiednich testów w zależności od charakteru rozkładu uzyskanych danych.

Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej uzyskały akceptację Niezależnej Komisji Bioetycznej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (nr zgody NKBBN/385/2013). Wszyscy uczestnicy wyrazili świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniu.

Wyniki pracy doktorskiej na kolejnych etapach jej realizacji doktorantka prezentowała podczas konferencji krajowych i zagranicznych:

- prezentacja ustna pracy pt. „*Interleukina 16 w łuszczycy*” podczas III Konferencji Łuszczycowej - Łuszczycy: wewnątrz widziane okiem dermatologa, Olsztyn 18-20.09.2014;

- III nagroda za prezentację ustną pracy pt. „*Znaczenie interleukiny 16 w łuszczycy*” podczas sesji konkursowej Forum Młodych Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego, Warszawa, 13-14.11.2014;

- prezentacja pracy pt. „*Increased serum and skin levels of interleukin-16 in psoriatic patients: correlation with disease intensity*” w formie plakatowej podczas 12th European Academy of Dermatology and Venereology Spring Symposium, Spain, Valencia, 5-8.03.2015;

- II nagroda podczas Sesji Sprawozdawczej Doktorantów 23. International Student Scientific Conference za prezentację ustną pracy pt. „*Rola interleukiny 16 w patogenezie łuszczycy*”, Gdańsk, 23-25.04.2015.

## OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

Na rozprawę doktorską składają się cztery prace, w tym dwa artykuły pogładowe, stanowiące wprowadzenie do tematyki genetyki i immunologii w łuszczycy. Kolejne dwie publikacje to prace oryginalne, w których zaprezentowano badania nad wybranymi cytokinami oraz wariantami polimorficznymi ich genów w łuszczycy.

W pracy pogładowej pt. „**Genetic background of skin barrier dysfunction in the pathogenesis of psoriasis vulgaris**” opublikowanej w *Postęпах Dermatologii i Alergologii* w 2015 roku przedstawiono bieżący stan wiedzy na temat wpływu czynników genetycznych na funkcjonowanie bariery naskórkowej u chorych z łuszczycą. Łuszczycę uważa się za chorobę kompleksową o wieloczynnikowym i wielogenowym modelu dziedziczenia, w której pojedyncze geny mają ograniczony wpływ na fenotyp. Badania asocjacyjne genomu (GWAS) ujawniły wiele potencjalnych genów wykazujących związek z łuszczycą. Szczególne znaczenie przypisywane jest rejonowi głównego układu zgodności tkankowej (MHC) na chromosomie 6p21 [10]. Najsilniejsze sprzężenie z chorobą wykazuje położony w tym rejonie *locus* PSORS1, z głównym allelem podatności na łuszczycę *HLA-Cw\*06*, odpowiedzialnym za 35–50% predyspozycji do łuszczycy wczesnej [11,12]. Obserwacja ta sugeruje, iż także inne warianty polimorficzne genów spoza układu MHC, razem z allelem *HLA-Cw\*06*, mogą mieć istotne znaczenie w patogenezie łuszczycy. W niniejszej pracy zwrócono uwagę na rolę koperty rogowej (wysoko wyspecjalizowanej struktury zlokalizowanej pod błoną komórkową keratynocyta w końcowym stadium różnicowania) oraz przedstawiono szczegółowy opis genów zaangażowanych w funkcjonowanie bariery naskórkowej. Na podstawie przeanalizowanej literatury wynika, iż jakiegokolwiek zaburzenia w ekspresji genów kodujących białka, biorące udział w tworzeniu koperty rogowej, mogą powodować nieprawidłowości na każdym z etapów różnicowania keratynocytów, co skutkuje zaburzeniem funkcji bariery naskórkowej. Zakres możliwych uwarunkowań genetycznych wpływających na rozwój łuszczycy jest niezwykle szeroki i nie w pełni zbadany. Mimo faktu uznawania łuszczycy za chorobę mediowaną immunologicznie, podłoże genetyczne ma niepodważalne znaczenie w jej patogenezie.

Wkład doktorantki w powstanie publikacji: udział w tworzeniu koncepcji pracy, zbiorze i analizie piśmiennictwa oraz redagowaniu manuskryptu.

Praca poglądowa pt. „**Rola interleukiny 16 w patogenezie wybranych chorób skóry**”, opublikowana w 2014 roku w *Przeglądzie Dermatologicznym*, stanowi przegląd dotychczasowej wiedzy na temat budowy i funkcji IL-16, ze szczególnym uwzględnieniem jej potencjalnego znaczenia w chorobach skóry, których istotą jest stan zapalny i naciek z limfocytów T CD4+. Interleukina 16 należy do cytokin prozapalnych o plejotropowym działaniu na komórki układu immunologicznego, choć jak podkreślono, jej właściwości biologiczne nie są jeszcze w pełni zbadane. Cytokina ta po raz pierwszy została opisana w 1982 roku przez Centera i Cruikshanka, badaczy z Uniwersytetu Medycznego w Bostonie [13]. W 1999 roku zidentyfikowano gen dla IL-16 na długim ramieniu chromosomu 15 (15q26.3) [14]. Początkowo określano ją mianem czynnika chemotaktycznego dla limfocytów (LCF) z uwagi na jej zdolność do aktywacji i rekrutacji limfocytów T [15]. Jednak kolejne badania ujawniły szerokie spektrum jej możliwych działań na komórki układu odpornościowego. Omawiana publikacja zawiera szczegółowy opis budowy IL-16 ze schematycznym przedstawieniem mechanizmu działania poszczególnych jej fragmentów. Prekursorem dla IL-16 jest pre-IL-16 – peptyd zbudowany z 631 aminokwasów, który w cytoplazmie komórek zostaje przecięty przez kaspazę 3 na fragmenty o długości 510 i 121 aminokwasów. Obydwa powstałe fragmenty są aktywne biologicznie i spełniają odmienne funkcje. Fragment N-końcowy o długości 510 aminokwasów przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie wywiera wpływ na regulację cyklu komórkowego. Natomiast złożony ze 121 aminokwasów fragment C-końcowy, uznawany za dojrzałą IL-16, ulega polimeryzacji i jest przechowywany w pęcherzykach wydzielniczych, a następnie zostaje uwolniony poprzez egzocytozę na zewnątrz komórki, gdzie wykazuje m.in. właściwości chemotaktyczne dla komórek posiadających receptory dla IL-16, w tym receptor CD4 [8]. Dołączenie IL-16 do receptora CD4 na komórce docelowej uruchamia transkrypcję genów oraz syntezę prozapalnych cytokin. Na podstawie przeanalizowanego w niniejszej pracy piśmiennictwa, okazuje się, że funkcje IL-16 mogą być odmienne w różnych typach komórek. Z uwagi na plejotropowość działania IL-16 stała się przedmiotem badań dotyczących patogenezy różnych jednostek chorobowych, w tym również schorzeń skóry. W pracy kolejno omówiono choroby dermatologiczne, w których prowadzono badania nad IL-16, takie jak atopowe zapalenie skóry, toczeń rumieniowaty układowy, pemfigoid pęcherzowy oraz chłoniaki T-komórkowe skóry. W rozwoju tych schorzeń znamienne rolę odgrywają limfocyty TCD4+. W oparciu o analizowane piśmiennictwo dotyczące poszczególnych dermatoz opisano możliwy wpływ IL-16 na rozwój zmian skórnych. Na zakończenie w pracy odniesiono się do problematyki łuszczycy z zaznaczeniem zasadności prowadzenia badań nad IL-16 także



w tej jednostce chorobowej. Choć jak dotąd w piśmiennictwie nie opisywano potencjalnego znaczenia IL-16 w łuszczycy, biorąc pod uwagę plejotropową aktywność tej cytokiny, jej bezpośredni wpływ na migrację i proliferację limfocytów T oraz zdolność do regulacji cyklu komórkowego, wydaje się, że mogłaby ona odgrywać rolę w patogenezie łuszczycy. We wnioskach pracy podkreślono, iż niezbędne są dalsze szczegółowe badania nad sposobem uwalniania i działania biologicznego tej cytokiny, które wyjaśnią jej znaczenie w skomplikowanym procesie reakcji immunologicznych leżących u podłoża wielu dermatoz, w tym łuszczycy.

Wkład doktorantki w powstanie publikacji: utworzenie koncepcji pracy; zbiór i analiza piśmiennictwa; napisanie pierwotnej wersji manuskryptu; przygotowanie ryciny; przygotowanie ostatecznej wersji publikacji; funkcja autora odpowiedzialnego za korespondencję z redakcją i czytelnikami.

W pracy oryginalnej pt. **„Assessment of interleukin 16 serum levels and skin expression in psoriasis patients in correlation with clinical severity of the disease”**, opublikowanej w 2016 roku w czasopiśmie *PLoS One*, podjęto próbę oceny obecności IL-16 w surowicy krwi i skórze osób chorych na łuszczycę i jej ewentualnego związku ze stopniem zaawansowania choroby. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano istotnie wyższe stężenie IL-16 w surowicy krwi osób chorych na łuszczycę w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto, poziom cytokiny we krwi istotnie dodatnio korelował ze stopniem ciężkości łuszczycy, ocenianym za pomocą wskaźnika PASI i BSA oraz był znacząco podwyższony u chorych z umiarkowaną i ciężką łuszczycą. Nie stwierdzono natomiast związku IL-16 z jakością życia w łuszczycy ocenianą za pomocą DLQI oraz różnic w stężeniach cytokiny w grupie chorych z wczesnym (< 40. roku życia) i późnym ( $\geq$  40. roku życia) początkiem łuszczycy. Obserwacje te przedstawiono za pomocą czterech wykresów oraz tabeli szczegółowo prezentujących wartości stężenia IL-16 w podgrupach wyodrębnionych na podstawie stopnia zaawansowania choroby i początku jej pojawienia się. Uzyskane wyniki odniesiono w części „dyskusja” do danych literaturowych. W piśmiennictwie dostępne są zaledwie trzy publikacje oceniające IL-16 w surowicy krwi chorych na łuszczycę [16-18]. Prace te dotyczyły głównie atopowego zapalenia skóry, stąd też poddane badaniu grupy chorych na łuszczycę stanowiły razem z grupą kontrolną jedynie odniesienie do głównej grupy osób z atopowym zapaleniem skóry oraz były mało liczne (12-20 chorych) i charakteryzowały się stosunkowo niską średnią wiekiem chorych (19,6-28,2 lat). Prezentowane w nich wyniki sugerowały istotnie wyższy poziom IL-16 u chorych na atopowe zapalenie

skóry w porównaniu z grupą łuszczycową i kontrolną. Niniejsza praca jest pierwszym doniesieniem oceniającym stężenie IL-16 w surowicy krwi w tak dużej grupie chorych na łuszczycę z podziałem na podgrupy w zależności od stopnia ciężkości choroby. Na podstawie otrzymanych danych, w prezentowanej pracy wysunięto wniosek, iż IL-16 oceniana w surowicy krwi mogłaby służyć jako potencjalny marker ciężkości łuszczycy. Podkreślono jednak, iż obserwacja ta wymaga dalszych badań, szczególnie w zakresie oceny czy osoby z łagodną łuszczycą, lecz wysokim poziomem surowiczej IL-16 są bardziej predysponowane do ciężkiego przebiegu choroby oraz czy poprawa stanu skóry po zastosowanym leczeniu przeciwłuszczycowym będzie wiązała się z obniżeniem poziomu IL-16. W publikacji zwrócono uwagę na potencjalne ograniczenie użycia IL-16 jako markera aktywności choroby, jakim jest współwystępowanie u chorych na łuszczycę innych przewlekłych, zapalnych schorzeń, które również mogą przebiegać ze wzrostem poziomu IL-16 w surowicy krwi. W kolejnym etapie pracy w celu określenia obecności IL-16 w skórze na poziomie mRNA oraz białkowym poddano ocenie fragmenty skóry okolicy pośladka pobrane od chorych na łuszczycę z dwóch miejsc – jeden z blaszki łuszczycowej a drugi z pozornie niezmienionej skóry wokół blaszki. W grupie kontrolnej pobierano jeden wycinek zdrowej skóry pośladka. Do badania wybrano tę samą okolicę ciała z uwagi na niewielką ekspozycję na promieniowania ultrafioletowe, efekt estetyczny związany z ryzykiem powstania drobnej blizny oraz możliwość precyzyjnej analizy porównawczej pobranych wycinków skóry. Z przeprowadzonych analiz wynika, iż ekspresję mRNA *IL-16* na najwyższym poziomie, podobnie jak najwyższą immunoreaktywność białka IL-16, odnotowano w obrębie pozornie niezmienionej skóry w bliskim sąsiedztwie blaszki łuszczycowej. Natomiast w obrębie samej blaszki zaobserwowano istotnie wyższą immunoreaktywność IL-16 w stosunku do grupy kontrolnej. Choć wzrost mRNA *IL-16* w strukturach blaszki łuszczycowej nie był znamieny statystycznie, istotnie korelował z odnotowanym zwiększonym poziomem mRNA *CD4* w zmienionej chorobowo skórze, co może sugerować potencjalną lokalną interakcję IL-16 z limfocytami T CD4<sup>+</sup> w procesie tworzenia blaszek łuszczycowych. Poziom mRNA *IL-16* zarówno w obrębie zdrowej jak i zmienionej chorobowo skóry nie korelował z poziomem stężenia IL-16 w surowicy krwi i stopniem zaawansowania łuszczycy (PASI). Uzyskane wyniki przedstawiono w formie graficznej, za pomocą wykresów. W publikacji posługując się obrazem mikroskopowym podjęto także próbę szczegółowej prezentacji rozmieszczenia IL-16 na poziomie białkowym w skórze. Dodatkowo uwzględniono lokalizację IL-16 w odniesieniu do struktur komórkowych. Z przeprowadzonych analiz wynika, iż lokalizacja jądrowa i okołojądrowa

IL-16 dominuje w skórze zmienionej łuszczycowo, zaś cytoplazmatyczna w skórze pozornie niezmienionej oraz skórze osób z grupy kontrolnej. Jak podkreślono w części wstępnej omawianej pracy, forma jądrowa IL-16 wykazuje zdolność regulacji cyklu komórkowego, zaś cytoplazmatyczna posiada właściwości chemotaktyczne, co jak zaznaczono mogłoby wpływać na proliferację keratynocytów i migrację komórek zapalnych do skóry. W celu pogłębienia wiedzy na temat związku IL-16 z łuszczycą, przeprowadzono ocenę częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu -295 T/C promotora genu *IL-16* w badanej grupie chorych. Polimorfizm ten wybrano ze względu na doniesienia literaturowe świadczące o jego wpływie na poziom surowiczej IL-16 oraz na ryzyko rozwoju chorób [19-21]. Powyższa praca jest pierwszym doniesieniem oceniającym polimorfizm genu *IL-16* w łuszczycy. Niemniej jednak z przeprowadzonych badań wynika, iż częstość występowania genotypów i alleli omawianego polimorfizmu nie różni się istotnie u osób chorych na łuszczycę i osób z grupy kontrolnej. Nie zaobserwowano również różnic w poziomie IL-16 w surowicy w zależności od genotypów oraz nie odnotowano istotnego związku badanego polimorfizmu z ciężkością choroby.

Wkład doktorantki w powstanie publikacji: tworzenie koncepcji pracy oraz opracowanie metodologii; koordynacja projektu; rekrutacja grupy badanej i kontrolnej; zbieranie wywiadu medycznego oraz przeprowadzanie badania fizykalnego z oceną ciężkości łuszczycy; pozyskiwanie materiału badawczego (próbek krwi i pobieranie wycinków skóry); udział w przeprowadzaniu badań laboratoryjnych i zbiorze danych; stworzenie bazy danych; analiza zebranych danych i przygotowanie rycin; zbiór i analiza piśmiennictwa; napisanie pierwotnej wersji manuskryptu; udział w redagowaniu pracy zgodnie z zaleceniami recenzentów i redakcji; pełnienie funkcji autora odpowiedzialnego za korespondencję z redakcją.

Praca oryginalna pt. „**-2518 A/G MCP-1 and -403 G/A RANTES promoter gene polymorphisms are associated with psoriasis vulgaris**”, opublikowana w 2016 roku w czasopiśmie *Clinical and Experimental Dermatology*, stanowi analizę wpływu ww. polimorfizmów na ryzyko i kliniczną manifestację łuszczycy. Zarówno MCP-1/CCL2 jak i RANTES/CCL5 należą do grupy najlepiej przebadanych chemokiny. Chemokiny to białka o niskiej masie cząsteczkowej, które z uwagi na rolę w rozwoju odpowiedzi immunologicznej zostały zaliczone do kręgu cytokin. Nazwa „chemokiny” nawiązuje do ich pierwotnie opisywanej funkcji czynnika chemotaktycznego. Kolejne badania ujawniły ich wielokierunkowe oddziaływanie w zależności od komórki docelowej [9,22]. Obydwie chemokiny, MCP-1 i RANTES, są zaangażowane w procesy zapalne m.in. poprzez wpływ

na migrację monocytów, limfocytów T oraz komórek dendrytycznych. Ustalono, iż poziomy stężenia MCP-1 i RANTES w surowicy krwi oraz polimorficzne warianty ich genów mogą mieć wpływ na ryzyko i ciężkość przebiegu chorób zapalnych [23,24]. Jak wykazały badania, zarówno polimorfizm -2518 A/G, jak i -403 G/A są zlokalizowane w regionie promotorowym genów odpowiednio *MCP-1* i *RANTES*, stąd też mają wpływ na ich ekspresję oraz mogą oddziaływać na poziom krążących chemokin, MCP-1 i RANTES [22]. W niniejszej pracy, badaniu poddano obydwie ww. polimorfizmy oraz oceniono surowicze stężenie odpowiadających im chemokin u chorych na łuszczycę oraz w grupie kontrolnej w populacji Polski Północnej. Na podstawie analizy częstości genotypów i alleli omawianych polimorfizmów genów *MCP-1* i *RANTES*, nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy grupą chorych na łuszczycę i grupą kontrolną, z wyjątkiem genotypu GG polimorfizmu -2518 A/G promotora genu *MCP-1*, który występował istotnie statystycznie częściej u chorych i wiązał się z dwukrotnie większym ryzykiem zachorowania na łuszczycę. Wyniki te w pracy przedstawiono w formie tabelarycznej. Przeprowadzając dalszą analizę z podziałem chorych z wczesnym i późnym początkiem łuszczycy oraz w zależności od ciężkości choroby ocenianej za pomocą wskaźnika PASI, stwierdzono, iż genotyp AA polimorfizmu -403 G/A promotora genu *RANTES* występuje częściej u chorych z późną łuszczycą, podczas gdy genotyp GG był istotnie rzadziej obserwowany w tej grupie pacjentów. Ponadto, obecność allelu A (genotyp AA lub AG) polimorfizmu *RANTES* wiązała się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju ciężkiej łuszczycy z PASI>15. Niniejsze badanie jest trzecim z dotychczas opublikowanych doniesień oceniających polimorfizm -2518 A/G *MCP-1* w łuszczycy, natomiast pierwszym analizującym polimorfizm -403 G/A *RANTES* w tej grupie chorych. W pracy przytoczono obydwie pozycje piśmiennictwa dotyczące badań nad omawianym polimorfizmem *MCP-1* [25,26]. Pierwsze z badań przeprowadzono w populacji chińskiej w grupie 507 osób z łuszczycą i 530 osób zdrowych, a na jego podstawie, podobnie jak w prezentowanym badaniu, wykazano związek łuszczycy z genotypem GG [25]. Druga praca nie potwierdzała związku polimorfizmu -2518 A/G *MCP-1* z łuszczycą, aczkolwiek badanie to przeprowadzono na stosunkowo małej grupie uczestników (30 osób chorych i 10 zdrowych) [26]. W niniejszej pracy kolejnym celem było podjęcie próby oceny poziomów chemokin MCP-1 i RANTES w surowicy krwi badanych osób oraz ich korelacji z analizowanymi polimorfizmami. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, iż w grupie chorych na łuszczycę stężenia obydwu chemokin w surowicy były istotnie wyższe w stosunku do grupy kontrolnej. Ponadto zaobserwowano, iż w ciężkiej łuszczycy z PASI >15 znamienne wzrastał poziom RANTES. Dane te w pracy przedstawiono w formie

graficznej. Nie odnotowano związku obecności badanych polimorfizmów genów *MCP-1* i *RANTES* z poziomem odpowiadających im chemokin w surowicy krwi. W dyskusji podkreślono, iż brak tej korelacji najprawdopodobniej wynika z faktu, iż wiele czynników genetycznych i epigenetycznych może mieć wpływ na poziom konkretnych białek. W publikacji omówiono także piśmiennictwo dotyczące znaczenia badanych chemokin w powstawaniu zmian skórnych i ich zmiennego poziomu pod wpływem zastosowanej terapii przeciwłuszczycowej. Na podstawie wniosków płynących z badania, a w szczególności zaobserwowanego wpływu polimorfizmu promotora genu *MCP-1* na ryzyko wystąpienia łuszczycy, związku polimorfizmu promotora genu *RANTES* z ciężkością choroby, stwierdzonego podwyższonego poziomu obydwu chemokin w surowicy krwi i istotnej korelacji poziomu *RANTES* w surowicy z ciężkością łuszczycy oraz danych z przytoczonego piśmiennictwa, warto rozważyć chemokiny *MCP-1* i *RANTES* jako potencjalny marker łuszczycy, a nawet cel terapeutyczny. Niezbędne są jednak dalsze badania by potwierdzić powyższe obserwacje i pogłębić wiedzę na temat tak małych, ale jakże istotnych białek.

Wkład doktorantki w powstanie publikacji: udział w tworzeniu koncepcji pracy; rekrutacja grupy badanej i kontrolnej oraz pozyskiwanie materiału badawczego (próbek krwi); zbieranie wywiadu medycznego oraz przeprowadzanie badania fizykalnego z oceną ciężkości łuszczycy; zbiór i analiza danych; współdziałł w zbiorze i analizie piśmiennictwa oraz napisaniu pierwotnej wersji manuskryptu; redagowanie pracy zgodnie z zaleceniami recenzentów i redakcji; funkcja autora odpowiedzialnego za korespondencję z redakcją i czytelnikami.

## WNIOSKI

### IL-16

1. Wyższe stężenie IL-16 w surowicy krwi w populacji chorych na łuszczycę w porównaniu do grupy kontrolnej wskazuje, że cytokina ta może odgrywać rolę w patogenezie łuszczycy.
2. Zwiększona ekspresja *IL-16* na poziomie mRNA oraz lokalizacja białka IL-16 w obrębie struktur blaszki łuszczycowej oraz w skórze pozornie niezmienionej u chorych na łuszczycę może wskazywać na rolę tej cytokiny w powstawaniu zmian łuszczycowych poprzez potencjalny wpływ na proliferację keratynocytów oraz migrację komórek układu odpornościowego do miejsca uszkodzenia skóry i tworzenia się nacieku zapalnego.
3. Istotna dodatnia korelacja pomiędzy poziomem mRNA *IL-16* i *CD4* w zmienionej chorobowo skórze może wskazywać na miejscową interakcję IL-16 z limfocytami T CD4+ w procesie tworzenia blaszek łuszczycowych.
4. Dodatnia korelacja poziomu IL-16 w surowicy krwi z klinicznymi wskaźnikami ciężkości choroby może wskazywać na rolę tej cytokiny jako potencjalnego markera ciężkości łuszczycy.
5. Polimorfizm -295 T/C promotora genu *IL-16* wydaje się nie mieć wpływu na rozwój i przebieg łuszczycy.

### MCP-1 i RANTES

1. Polimorfizmy -2518 A/G promotora genu *MCP-1* i -403 G/A promotora genu *RANTES* mogą odgrywać rolę w patogenezie łuszczycy. Z przeprowadzonych badań wynika, iż polimorfizm -2518 A/G promotora genu *MCP-1* wiąże się z wyższym ryzykiem zachorowania na łuszczycę, podczas gdy polimorfizm -403 G/A promotora genu *RANTES* wykazuje związek z ciężkością choroby wyrażoną w skali PASI.
2. Istotnie wyższe stężenia MCP-1 i RANTES w surowicy krwi osób chorych na łuszczycę w stosunku do grupy kontrolnej oraz wykazany związek RANTES z ciężkością choroby sugerują znaczenie obydwu chemokiny w rozwoju łuszczycy, ich potencjalnej funkcji markera nasilenia choroby, a nawet celu terapeutycznego.

3. Analizowane polimorfizmy genów *MCP-1* i *RANTES* wydają się nie mieć istotnego wpływu na poziom kodowanych przez nie chemokin w surowicy krwi.

## STRESZCZENIE PRACY W JEZYKU ANGIELSKIM

### INTRODUCTION

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease. The key role in pathogenesis of the disease is played by the interaction of genetic, immunological and environmental factors. According to the present knowledge, psoriasis is regarded as a complex disease of polygenic inheritance model [2]. The genetic origin of psoriasis raises no doubts, yet new gene polymorphisms that can affect the risk of development and the course of the disease are still being sought.

Lesions in the course of psoriasis result from excessive proliferation of epidermal cells and the shortening of the time of passage of keratinocytes from the basal cell layer to the cornified layer. In the pathogenesis of this condition, pivotal role is played by immunological disorders, and what is particularly emphasised is the influence of T lymphocytes on excessive proliferation of keratinocytes [3,4]. The source of an ongoing inflammatory process and the cause of intensified activation and migration of T lymphocytes into the skin in psoriasis sufferers remain undetermined. Hence, it seems significant that research on the role of cytokines and chemokines, which control the inflow of inflammatory cells into the skin, is conducted.

Interleukin 16 (IL-16) is a proinflammatory cytokine characterised by pleiotropic effect on the immune system cells. It has chemotactic properties in relation to T CD4<sup>+</sup> lymphocytes as well as monocytes, eosinophils and dendritic cells [5,6]. Interleukin 16 is considered as a growth factor of Th1 cells and its function is closely related to the expression of CD4 receptor on target cells [5]. The fact that it is also able to connect with CCR5 receptor additionally increases Th1 lymphocyte activation [6]. The vast spectrum of biological functions of IL-16 covers also its influence on the production of proinflammatory cytokines and regulation of the cell cycle [7,8].

The chemokines that belong to chemotactic cytokines constitute a very important group of proteins that participate in the formation of an inflammatory focus. In this group, special attention should be paid to MCP-1 (also known as CCL2) and RANTES (also known as CCL5), which through their effect on the stimulation and the migration of leukocytes from blood to tissues, modulate the course of the inflammatory reaction [9].

Proinflammatory properties of IL-16, MCP-1 and RANTES point to their possible significance in the formation of lesions in the course of psoriasis.



## **OBJECTIVES OF THE WORK**

### **IL-16**

1. Comparison of serum concentration of IL-16 in psoriasis patients and in the control group.
2. Evaluation of mRNA expression of *IL-16* and location of IL-16 protein within a psoriasis plaque and in seemingly unaffected skin of psoriasis patients compared to the skin of the controls.
3. Analysis of the possible relation between levels of *IL-16* mRNA and *CD4* mRNA in the skin of psoriasis sufferers.
4. Evaluation of the correlation between serum concentration of IL-16 and level of *IL-16* mRNA in the skin and the clinical indicators of psoriasis severity.
5. Comparison of genotype and allele frequencies for -295 *T/C IL-16* promoter gene polymorphism in the group of psoriasis patients and in the control group.

### **MCP-1 and RANTES**

1. Comparison of the genotype and allele frequencies for -2518 *A/G MCP-1* and -403 *G/A RANTES* promoter gene polymorphisms in the group of psoriasis patients and in the control group, and the evaluation of the effect of those polymorphisms on the risk and the course of psoriasis.
2. Assessment of the level of serum chemokines MCP-1 and RANTES in the studied group and in the control group, and correlation of the obtained results with psoriasis severity.
3. Analysis of the relation between the studied *RANTES* and *MCP-1* gene polymorphisms and the level of serum chemokines encoded by them.

## STUDY MATERIAL AND METHODOLOGY

The study of IL-16 was conducted on a group of 97 patients diagnosed with psoriasis vulgaris, who are under the care of the Department of Dermatology, Venereology and Allergology and the Out-patient Clinic in Gdansk, taking into account the inclusion and exclusion criteria. The control group was made up of 104 healthy, unrelated volunteers, with no psoriasis or any other chronic inflammatory skin diseases in patient's history and no positive family history for psoriasis. In the course of the study, the groups were expanded to include 160 patients and 160 controls, and the collected material was used for MCP-1 and RANTES studies.

In the group of patients, following a thorough analysis of the skin condition, the psoriasis area and severity index (PASI) was determined and the skin area affected by psoriasis (BSA) was expressed as a percentage. Moreover, the dermatology life quality index (DLQI) was calculated.

The measurement of serum concentration of IL-16, MCP-1 and RANTES was made using immunoenzymatic method (ELISA), while the expression of *IL-16* mRNA in skin biopsies was measured using quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The location of IL-16 protein was determined based on the immunohistochemical examination. The *IL-16*, *MCP-1* and *RANTES* gene polymorphisms were determined using PCR-RFLP, ARMS-PCR and SSP-PCR methods, respectively.

The statistical compilation of the results was conducted by means of STATISTICA programme, using appropriate tests depending on the character of the distribution of the obtained data.

The studies conducted for the purpose of this PhD dissertation were approved by the Independent Bioethical Committee at the Medical University of Gdańsk (approval no. NKBBN/385/2013). Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

At each stage of the doctoral research, the PhD applicant presented the results during national and international conferences:

- oral presentation entitled "*Interleukin-16 in psoriasis*" given at III Psoriasis Conference – Psoriasis: the inside as seen by a dermatologist, Olsztyn 18-20 Sept. 2014;

- III prize for the oral presentation entitled “*The role of interleukin-16 in psoriasis*” given at the contest session of the Youth Forum of the Polish Society of Dermatology, Warsaw, 13-14 Nov. 2014;
- poster presentation entitled “*Increased serum and skin levels of interleukin-16 in psoriatic patients: correlation with disease intensity*” at the 12th European Academy of Dermatology and Venereology Spring Symposium, Spain, Valencia, 5-8 March 2015;
- II prize at the Reporting Session of PhD students at the 23rd International Student Scientific Conference awarded for the oral presentation entitled “*The role of interleukin-16 in the pathogenesis of psoriasis*”, Gdańsk, 23-25 April 2015.

## **PRESENTATION OF THE PUBLICATIONS THAT FORM PART OF THE DISSERTATION**

The doctoral dissertation comprises four papers, including two review articles that constitute an introduction to the subject of genetics and immunology in psoriasis. The two other publications are original papers that present studies on selected cytokines and their gene polymorphisms in psoriasis.

The paper entitled “**Genetic background of skin barrier dysfunction in the pathogenesis of psoriasis vulgaris**”, published in *Advances in Dermatology and Allergology* in 2015, presents the current knowledge on the effect of genetic factors on the functioning of skin barriers in psoriasis. Psoriasis is regarded as a complex disease, characterised by multifactorial and polygenic inheritance, in which individual genes have limited effect on the phenotype. Genome wide association studies (GWAS) revealed numerous potential genes associations with psoriasis. The role of MHC region on chromosome 6p21 is particularly significant [10]. The strongest correlation with the disease is shown by *locus* PSORS1, located within the region, with the main psoriasis susceptibility allele *HLA-Cw\*06*, accountable for 35–50% predispositions to early psoriasis [11,12]. The observation suggests that other gene polymorphisms outside the MHC region, together with allele *HLA-Cw\*06*, may play a crucial role in the pathogenesis of psoriasis. This paper draws particular attention to the significance of the cornified envelope (highly specialized structure formed beneath the cell membrane during terminal differentiation of keratinocytes) and describes in detail the genes that are involved in the functioning of the skin barrier. According to the literature analysed in the course of the study, any abnormalities in the expression of genes encoding proteins that are a part of the envelope structure may result in disturbances at each of stages of keratinocyte differentiation, which then leads to a dysfunction of the epidermal barrier. The range of possible gene abnormalities that affect the development of psoriasis is vast and has not been fully researched. Although psoriasis is regarded as an immunologically mediated disorder, the genetic background is of indisputable significance for its pathogenesis.

Contribution of the PhD applicant towards the publication: participation in the creation of the concept of the paper, collection and analysis of the literature and drafting of the paper.

The review work entitled “**The role of interleukin-16 in the pathogenesis of selected skin diseases**” published in 2014 in *Dermatology Review*, is an overview of the current knowledge

on the structure and function of IL-16, with special reference being made to its possible significance in the skin diseases that consist in inflammation and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes infiltration. Interleukin-16 is one of the proinflammatory cytokines that have pleiotropic effect on the immune system cells. However, its biological characteristics have not been fully researched. The cytokine was first described in 1982 by Center and Cruikshank, researchers from Boston University School of Medicine [13]. In 1999, *IL-16* gene was identified on the long arm of chromosome 15 (15q26.3) [14]. Initially, it was referred to as lymphocyte chemoattractant factor (LCF) due to its ability to activate and recruit T lymphocytes [15]. However, further research revealed a vast spectrum of its possible effect on the immune system cells. The publication contains a detailed description of IL-16, with a schematic presentation of the mechanism of the operation of its particular fragments. A precursor of IL-16 is pre-IL-16 – a peptide made up of 631 amino acids, which in the cell cytoplasm is cleaved by caspase 3 into fragments 510 and 121 amino acid in length. Both resultant fragments are biologically active and perform different functions. The N-terminal fragment of 510 amino acids moves towards the cell nucleus, where it influences the cell cycle regulation. The C-terminal 121-amino acid fragment, on the other hand, which is considered a mature IL-16, undergoes polymerisation and is stored in the secretory vesicles and then released through exocytosis outside the cell, where it exhibits, among others, chemotactic properties for cells that possess receptors for IL-16, including CD4 receptor [8]. IL-16 binds to CD4 receptor on a target cell and in this way triggers gene transcription synthesis of proinflammatory cytokines. According to the literature analysed in the paper, the functions of IL-16 may vary in different types of cells. Because of its pleiotropic activity, IL-16 became the subject of research on the pathogenesis of different disease entities, including skin diseases. The paper discusses in turn dermatological diseases in which studies on IL-16 have been conducted, such as atopic dermatitis, systemic lupus erythematosus, bullous pemphigoid and T-cell lymphomas. The progression of the diseases is highly influenced by CD4<sup>+</sup> lymphocytes. Based on the analysed publications on particular dermatoses, the possible effect of IL-16 on the development of skin disorders was described. At the end, the paper refers to the problems of psoriasis and stresses that a study on IL-16 in this disease entity is also justifiable. Although the potential role of IL-16 in psoriasis has not yet been described in the literature, given the pleiotropic activity of that cytokine, its direct effect on the migration and proliferation of T lymphocytes and its ability to regulate the cell cycle, it seems that it could play a role in the pathogenesis of psoriasis. In the conclusions of the paper, it is stressed that further studies are needed on the release method and the biological effect of the cytokine,

which would explain its significance in the complex process of immunological reactions underlying numerous dermatoses, psoriasis included.

Contribution of the PhD applicant towards the paper: creation of the concept of the paper; collection and analysis of the literature, drafting of the paper; preparation of the figures; preparation of the final version of the paper; person responsible for mail contact with editors and readers.

The original paper entitled “**Assessment of interleukin 16 serum levels and skin expression in psoriasis patients in correlation with clinical severity of the disease**” published in 2016 in *PLoS One*, constitutes an attempt to evaluate the presence of IL-16 in the serum and the skin of psoriasis patients and its possible relation to the progression of the disease. Based on the conducted studies, it was shown that the IL-16 serum level was significantly higher in psoriasis sufferers than in controls. Moreover, the cytokine blood level correlated positively with psoriasis severity assessed using PASI and BSA, and was significantly increased in patients with moderate and severe psoriasis. However, no relationship between IL-16 and the quality of life assessed by DLQI and no differences in cytokine level between early-onset psoriasis (<age 40 years) and late-onset psoriasis ( $\geq$  age 40 years) were observed. The observations were represented in four graphs and a table, presenting in detail the values of IL-16 level in the subgroups distinguished on the basis of the progression of the disease and its onset. The obtained results were compared in the “discussion” part of the thesis with the data given in the literature. There are only three publications in which the IL-16 serum level in psoriasis patients has been assessed [16-18]. The papers refer mainly to atopic dermatitis, hence the group of psoriasis sufferers and the group of controls are combined there to constitute a point of reference for the main group of persons affected by atopic dermatitis; the groups are small (12-20 patients) and characterised by a relatively young age of the patients (age 19.6-28.2 years). The results presented in the paper suggested a significantly higher IL-16 level in patients suffering from atopic dermatitis compared to the psoriasis and control group. This paper is the first study assessing IL-16 serum level in such a large group of psoriasis patients, divided into subgroups based on the progression of the disease. Given the obtained results, a conclusion has been drawn in this paper that IL-16 serum levels could be used as a possible marker of psoriasis severity. However, it has been stressed that the observation requires further studies, in particular with regard to the assessment whether mild psoriasis sufferers with high IL-16 serum levels are more predisposed to develop severe course of the disease and whether the improvement in the skin condition following the applied

treatment will result in a decrease in IL-16 serum levels. The publication draws attention to the possible limitation in the use of IL-16 as a marker of disease activity, in view of the fact that psoriasis patients might suffer also from other chronic inflammatory diseases in the course of which IL-16 serum levels might increase. At a further stage of the research, in order to determine IL-16 presence in the skin at mRNA and protein levels, skin fragments were taken from two locations in a buttock area in psoriasis patients (one from psoriasis plaque and one from unaffected area around the plaque). In the control group, only one fragment of healthy buttock skin was taken. The choice of buttocks as the area for the biopsy was determined by the low exposition of the area to ultraviolet radiation, aesthetic effect related to the risk of occurrence of small scars, and the possibility to conduct precise comparative analysis of the biopsies. According to the conducted analyses, the highest level of mRNA *IL-16* as well as the highest immunoreactivity of IL-16 protein were observed within the area of the seemingly unaffected skin, close to the psoriasis plaque. Within the plaque itself, on the other hand, significantly higher immunoreactivity of IL-16 in relation to control group was noted. Although increase in mRNA *IL-16* in the psoriasis plaque structures was not statistically significant, it correlated significantly with the observed increased mRNA *CD4* level in the affected skin, which may suggest possible local interaction of IL-16 with T-lymphocytes CD4<sup>+</sup> in the process of psoriasis plaque formation. The level of mRNA *IL-16* both in the healthy skin and that affected by the disease did not correlate with the IL-16 serum level and the severity of psoriasis (PASI). The obtained results are presented in a graphic form. In the publication, using microscopy, an attempt was made to present in detail the distribution of IL-16 at protein level in the skin. Additionally, the location of IL-16 in relation to cell structures was considered. According to the conducted analyses, in the psoriasis affected skin the nuclear and perinuclear location of IL-16 dominate, while in the unaffected skin and biopsies taken from healthy controls – the cytoplasmic one. As has already been emphasized in the introductory part of the paper, nuclear IL-16 demonstrates the ability to regulate the cell cycle whereas cytoplasmic IL-16 possesses chemotactic properties, which, as has been emphasized, may influence keratinocytes proliferation and migration of inflammatory cells into the skin. To expand knowledge on the relation between IL-16 and psoriasis, an assessment of genotype and allele frequencies for -295 T/C *IL-16* promoter gene polymorphism was conducted in the studied group of patients. The choice of the polymorphism was influenced by the literature according to which it influences the IL-16 serum level and the risk of disease progression [19-21]. This paper is the first publication in which *IL-16* gene polymorphism in psoriasis is discussed. Nevertheless, according to the

conducted studies, the genotype and allele frequencies for the polymorphism discussed there do not differ significantly in psoriasis patients and in persons in the control group. No genotype-based differences have been observed at IL-16 serum level and no significant relation between the studied polymorphism and disease severity has been noted.

Contribution of the PhD applicant towards the publication: creation of the concept of the paper and preparation of the methodology; coordination of the project; recruitment of the study and the control groups; collecting patients' history and conducting physical examination combined with assessment of psoriasis severity; collection of sample for comparison (blood samples and skin biopsies); participation in laboratory tests and collection of data; creation of a database; analysis of the collected data and preparation of the figures; collection and analysis of the literature; drafting of the paper; participation in the final editing of the paper to comply with the recommendations of the reviewers and the editors; person responsible for mail contact with the editors.

The original paper entitled “**-2518 A/G MCP-1 and -403 G/A RANTES promoter gene polymorphisms are associated with psoriasis vulgaris**” which was published in 2016 in *Clinical and Experimental Dermatology*, provides analysis of the effect of the above mentioned polymorphisms on the risk and clinical manifestation of psoriasis. Both MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 are among the best-studied chemokines. Chemokines are proteins of low molecular weight which, due to their role in the development of immunological response, have been classified as cytokines. The name ‘chemokines’ refers to their first described function as chemotactic factors. Further studies have revealed their multidirectional effect depending on the target cell [9,22]. Both chemokines, MCP-1 and RANTES, are involved in the inflammatory processes through their influence on the migration of monocytes, T-lymphocytes and dendritic cells, among others. It has been established that the MCP-1 and RANES serum levels and gene polymorphisms may influence the risk and the severity of inflammatory disorders [23,24]. According to the research, both 2518 A/G as well as -403 G/A polymorphisms are located in the promoter region of the relevant genes – MCP-1 and RANTES, respectively – and that is why they influence their expression and may affect the level of the circulating chemokines, MCP-1 and RANTES [22]. In this paper, the two above-mentioned polymorphism were studied and the serum concentrations of their correspondent chemokines were assessed in psoriasis and in control groups in a population from northern Poland. The analysis of the frequencies of genotypes and alleles of the discussed MCP-1 and RANTES gene polymorphisms did not point to any



significant differences between the psoriasis group and the control group, except in the case of the *-2518 A/G MCP-1* GG genotype, which was actually statistically more frequent in patients and was associated with double the risk of developing psoriasis. In the paper, the results have been presented in tables. For further analysis, the patients were sub-grouped based on the onset of psoriasis (early or late) as well as the severity of the disease assessed using PASI. It has been determined that the presence of *-403 G/A RANTES* AA genotype was more frequent in patients with late-onset psoriasis whereas GG genotype was significantly more rarely observed in that group of patients. What is more, the presence of A allele (AA or AG) in *RANTES* promoter gene polymorphism was associated with an increased risk of severe psoriasis with PASI>15. This study is the third among the published ones in which *-2518 A/G MCP-1* polymorphism is assessed in psoriasis and the first that analyses *-403 G/A RANTES* polymorphism in that group of patients. The work refers to both of the two other publications regarding studies on the discussed *MCP-1* polymorphism [25,26]. The first of such studies was conducted on a Chinese population, on a group of 507 psoriasis patients and 530 healthy controls, and based on it, just like in the presented study, the association between psoriasis and GG genotype was demonstrated [25]. The second publication did not confirm that a linkage between *-2518 A/G MCP-1* and psoriasis existed, though the study was conducted on a relatively small group of participants (30 patients and 10 healthy controls) [26]. In this paper, another aim was to try to assess the level of MCP-1 and RANTES chemokines in the serum of the study subjects and their correlation with the analysed polymorphisms. Based on the conducted studies, it has been demonstrated that in the psoriasis group, the serum concentrations of the two chemokines were actually higher when compared with the control group. Moreover, it was observed that in severe psoriasis with PASI>15, the RANTES level increased significantly. In the paper, the data were presented in a graphical form. No association between the studied *MCP-1* and *RANTES* gene polymorphisms and the serum level of corresponding chemokines was found. In the discussion part of the paper it was emphasised that lack of such correlation results most probably from the fact that numerous genetic and epigenetic factors may affect the level of particular proteins. The publication discusses also the literature related to the role of the studied chemokines in the formation of skin lesions and their level, which is changing after the applied treatment for psoriasis. Given the conclusions inferred from the studies, and in particular the observed effect of *MCP-1* promoter gene polymorphism on the risk of psoriasis development, the relationship between *RANTES* promoter gene polymorphism and the severity of the disease, the observed increase in the serum level of both chemokines as well as significant correlation between RANTES

serum level and psoriasis severity, and the data from the literature that has been referred to, it is worth considering MCP-1 and RANTES chemokines as possible psoriasis markers, or even as a therapy target. Nevertheless, further studies are required to substantiate the above observations and to enhance the knowledge on those small, yet significant, proteins.

Contribution of the PhD applicant towards the publication: participation in the creation of the concept of the paper; recruitment of patients and controls and collection of study material (blood samples); collecting patients' history and conducting physical examination combined with the assessment of psoriasis severity; collection and analysis of the data; participation in the collection and analysis of the literature and the drafting of the paper; editing the paper to comply with the recommendations of the reviewers and the editors; person responsible for mail contact with the editors and readers.

## CONCLUSIONS

### IL-16

1. The higher IL-16 serum level in the population of psoriasis sufferers when compared with the control group indicates that the cytokine may play a role in the pathogenesis of psoriasis.
2. The increased mRNA *IL-16* expression and the location of IL-16 protein in psoriasis plaque and in the seemingly unaffected skin in psoriasis sufferers may point to the role of the cytokine in the development of psoriatic lesions through its possible effect on the proliferation of keratinocytes and the migration of the immune system cells to the location of skin damage and the formation of inflammatory infiltration.
3. A significant positive correlation between the mRNA *IL-16* and *CD4* levels in the disease affected skin may indicate local interaction of IL-16 with T CD4<sup>+</sup> lymphocytes in the process of psoriasis plaques formation.
4. Positive correlation of IL-16 serum level with the clinical indications of disease severity may be evidence of the role of the cytokine as a potential marker for psoriasis severity.
5. -295 T/C *IL-16* promoter gene polymorphism seems to have no effect on the progression and the course of psoriasis.

### MCP-1 and RANTES

1. -2518 A/G *MCP-1* promoter gene polymorphism and -403 G/A *RANTES* promoter gene polymorphism may play a role in the pathogenesis of psoriasis. According to the conducted studies, -2518 A/G *MCP-1* promoter gene polymorphism is correlated with higher risk of developing psoriasis while -403 G/A *RANTES* promoter gene polymorphism shows linkage with disease severity expressed in PASI.
2. Significantly higher MCP-1 and RANTES serum levels in psoriasis patients in relation to the control group and the established relationship between RANTES and the severity of the disease suggest the significance of the chemokines for the progression of psoriasis and their possible function as markers for the disease aggravation and even targets for therapy.
3. The analysed *MCP-1* and *RANTES* gene polymorphisms seem not to have a significant effect on the serum level of the chemokines they encode.

## WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENNICTWA

1. Wain HM, Bruford EA, Lovering RC, Lush MJ, Wright MW, Povey S. Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* 2002;79:464-470.
2. Griffiths CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 2007;370:263-271.
3. Prinz JC, Gross B., Vollmer S, Trommler P, Strobel I, Meurer M, Plewig G. T cell clones from psoriasis skin lesions can promote keratinocyte proliferation in vitro via secreted products. *Eur J Immunol* 1994;24:593-598.
4. Nedoszytko B. Znaczenie subpopulacji limfocytów T w patogenezie łuszczycy. *Post Dermatol Alergol* 2008;XXV,1:20-33.
5. Blaschke V, Reich K, Middel P, Letschert M, Sachse F, Harwix S, Neumann C. Expression of the CD4+ cell-specific chemoattractant interleukin-16 in mycosisfungoides. *J Invest Dermatol* 1999;113:658-663.
6. Lynch EA, Heijens CA, Horst NF, Center DM, Cruikshank WW. Cutting edge: IL-16/CD4 preferentially induces Th1 cell migration: requirement of CCR5. *J Immunol* 2003;171:4965-4968.
7. Mathy NL, Scheuer W, Lanzendörfer M, Honold K, Ambrosius D, Norley S, Kurth R. Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. *Immunology* 2000;100:63-69.
8. Richmond J, Tuzova M, Cruikshank W, Center D. Regulation of cellular processes by interleukin-16 in homeostasis and cancer. *J Cell Physiol* 2014;229:139-147.
9. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 2014;1843:2563-2582.
10. Sago GS, Tazi-Ahnini R, Barker JW, Elder JT, Nair RP, Samuelsson L, Traupe H, Trembath RC, Robinson DA, Iles MM. Meta-analysis of genome-wide studies of psoriasis susceptibility reveals linkage to chromosomes 6p21 and 4q28-q31 in Caucasian and Chinese Hans population. *J Invest Dermatol* 2004;122:1401-1405.
11. Capon F, Munro M, Barker J, Trembath R. Searching for the major histocompatibility complex psoriasis susceptibility gene. *J Invest Dermatol* 2002;118:745-751.

12. Szczerkowska-Dobosz A, Rębała K. Genetyka łuszczycy – od badań serologicznych antygenów zgodności tkankowej do badań asocjacyjnych całego genomu. *Przeegl Dermatol* 2011;98:377–383.
13. Center DM, Cruikshank WW. Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells. *J Immunol* 1982;128:2563-2568.
14. Kim HS. Assignment of human interleukin 16 (IL16) to chromosome 15q26.3 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet* 1999;84:93.
15. Schreiber S. Monocytes or T cells in Crohn's disease: does IL-16 allow both to play at that game? *Gut* 2001;49:747-748.
16. Nagy G, Gáspár K, Irinyi B, Gál M, Tumpek J, Gyimesi E, Sipka S, Remenyik É, Szodoray P, Szegedi A. Association between serum IL-16 levels and the degree of sensitization in patients with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;156:69-74.
17. Zheng HY, Zhao L, Li CX, Li SH. Correlation between serum IL-16 and atopic dermatitis. *Genet Mol Res* 2016;15(1).
18. Masuda K, Katoh N, Okuda F, Kishimoto S. Increased levels of serum interleukin-16 in adult type atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 2003;83:249-253.
19. Romani S, Hosseini SM, Mohebbi SR, Kazemian S, Derakhshani S, Khanyaghma M, Azimzadeh P, Sharifian A, Zali MR. Interleukin-16 gene polymorphisms are considerable host genetic factors for patients' susceptibility to chronic hepatitis B infection. *Hepat Res Treat* 2014;2014:790753.
20. Nakayama EE, Wasi C, Ajisawa A, Iwamoto A, Shioda T. A new polymorphism in the promoter region of the human interleukin-16 (IL-16) gene. *Genes Immun* 2000;1:293-294.
21. Xue H, Gao L, Wu Y, Fang W, Wang L, Li C, Li Y, Liang W, Zhang L. The IL-16 gene polymorphisms and the risk of the systemic lupus erythematosus. *Clin Chim Acta* 2009;403:223-225.
22. Nedoszytko B, Sokołowska-Wojdyło M, Ruckemann-Dziurdzińska K, Roszkiewicz J, Nowicki RJ. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. *Postepy Dermatol Alergol* 2014;31:84-91.
23. Li YW, Yang CQ, Xiao YL, Li J, Xie CX, Zhang SH, Yu Q, Wang HL, Lu WM, Chen MH. The -A2518G polymorphism in the MCP-1 gene and inflammatory bowel disease risk: A meta-analysis. *J Dig Dis* 2015;16:177-185.
24. Wen D, Du X, Nie SP, Dong JZ, Ma CS. Association between RANTES gene polymorphisms and asthma: a meta-analysis. *PLoS One* 2014;9(6):e90460.

25. Wang L, Yang L, Gao L, Gao TW, Li W, Liu YF. A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with psoriasis. *Int J Immunogenet* 2008;35:45-49.
26. Lembo S, Capasso R, Balato A, Cirillo T, Flora F, Zappia V, Balato N, Ingrosso D, Ayala F. MCP-1 in psoriatic patients: effect of biological therapy. *J Dermatolog Treat* 2014;25:83-86.