

**Ocena wybranych parametrów immunologicznych
u osób z atopią i astmą oskrzelową eksponowanych
na różne czynniki środowiskowe**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Paulina Dydak

**I Katedra i Klinika Pediatrii, Alergologii i Kardiologii
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu**

**Promotor: dr hab. n. med. Barbara Sozańska, profesor
UMed**

Wrocław 2022

Serdeczne podziękowania dla Pani promotor – Profesor Barbary Sozańskiej za życzliwą pomoc, liczne wskazówki merytoryczne, profesjonalizm i wyrozumiałość.

Mojej rodzinie dziękuję za systematyczną motywację, poświęcony czas, cierpliwość i nieustające wsparcie.

Spis treści

1. WYKAZ SKRÓTÓW	7
2. WSTĘP	9
2.1 Atopia	9
2.2 Astma oskrzelowa	9
2.3 Alergiczny nieżyt nosa.....	11
2.4 Epidemiologia chorób alergicznych	12
2.5 Czynniki wpływające na rozwój i przebieg chorób alergicznych.....	13
2.5.1 Wpływ kontaktu ze zwierzętami gospodarczymi na rozwój i przebieg chorób alergicznych	19
2.6 Immunologia chorób alergicznych - interleukina 13 i 33.....	22
2.7 Interleukina 13.....	23
2.7.1 Budowa, mechanizm działania i biologiczna rola IL-13.....	23
2.7.2 Rola IL-13 w atopii i astmie	25
2.8 Interleukina 33.....	28
2.8.1 Budowa, mechanizm działania i biologiczna rola IL-33	28
2.8.2 Rola IL-33 w atopii i astmie	31
3. CEL PRACY	35
4. PACJENCI I METODY.....	36
4.1 Pacjenci.....	36
4.2 Metody	42
4.2.1 Kwestionariusz.....	42
4.2.2 Punktowe testy skórne	43
4.2.3 Pomiary laboratoryjne	43
4.2.3.1 Oznaczanie stężenia IgE	44
4.2.3.2 Oznaczanie stężenia IL-13.....	44
4.2.3.3 Oznaczenie stężenia IL-33.....	45

4.2.4 Metody statystyczne.....	45
5. WYNIKI.....	48
5.1 Stężenie IgE u astmatyków, atopików i w grupie kontrolnej	48
5.2 Stężenie IgE a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania .	52
5.2.1 Stężenie IgE u osób z astmą a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania.....	52
5.2.2 Stężenie IgE u osób z atopią a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania.....	53
5.2.3 Stężenie IgE w grupie kontrolnej a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania	53
5.3 Stężenie IgE a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia	54
5.3.1 Stężenie IgE u osób z astmą a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia	54
5.3.2 Stężenie IgE u osób z atopią a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia	55
5.3.3 Stężenie IgE w grupie kontrolnej a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia	55
5.4 Stężenie IL-13 u astmatyków, atopików i w grupie kontrolnej.....	56
5.5 Stężenie IL-13 a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania	60
5.5.1 Stężenie IL-13 u osób z astmą a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania.....	60
5.5.2 Stężenie IL-13 u osób z atopią a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania.....	61
5.5.3 Stężenie IL-13 w grupie kontrolnej a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania	61
5.6 Stężenie IL-13 a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia	62

5.6.1 Stężenie IL-13 u osób z astmą a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia	62
5.6.2 Stężenie IL-13 u osób z atopią a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia	63
5.6.3 Stężenie IL-13 w grupie kontrolnej a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia	63
5.7 Stężenie IL-33 u astmatyków, atopików i w grupie kontrolnej.....	64
5.8 Stężenie IL-33 a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania	68
5.8.1 Stężenie IL-33 u osób z astmą a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania.....	69
5.8.2 Stężenie IL-33 u osób z atopią a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania.....	69
5.8.3 Stężenie IL-33 w grupie kontrolnej a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania	70
5.9 Stężenie IL-33 a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia	70
5.9.1 Stężenie IL-33 u osób z astmą a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia	71
5.9.2 Stężenie IL-33 u osób z atopią a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia	71
5.9.3 Stężenie IL-33 w grupie kontrolnej a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia	72
5.10 Podsumowanie.....	73
6. OMÓWIENIE	76
7. WNIOSKI	86
8. PIŚMIENICTWO	88
9. STRESZCZENIE	103
10. SUMMARY	105

1. WYKAZ SKRÓTÓW

AHR	(<i>ang. airway hyperresponsiveness</i>) nadreaktywność dróg oddechowych
ANN	alergiczny nieżyt nosa
AZS	atopowe zapalenie skóry
BAL	(<i>ang. bronchoalveolar lavage</i>) popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe
ECAP	Epidemiologia Chorób Alergicznych w Polsce
ECRHS	(<i>ang. The European Community Respiratory Health Survey</i>)
FEV1	(<i>ang. forced expiratory volume in 1 second</i>) natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa
ELISA	(<i>ang. enzyme-linked immunosorbent assay</i>) test immunoenzymatyczny
FVC	(<i>ang. forced vital capacity</i>) natężona pojemność życiowa
GABRIEL	(<i>ang. A Multidisciplinary Study to Identify the Genetic and Environmental Causes of Asthma in the European Community</i>) wielodyscyplinarne badanie mające na celu zidentyfikowanie genetycznych i środowiskowych przyczyn astmy oskrzelowej w społeczności europejskiej
GABRIELA	(<i>ang. A Multidisciplinary Study to Identify the Genetic and Environmental Causes of Asthma in the European Community Advanced</i>) zaawansowane wielodyscyplinarne badanie mające na celu zidentyfikowanie genetycznych i środowiskowych przyczyn astmy oskrzelowej w społeczności europejskiej
GINA	(<i>ang. Global Initiative for Asthma</i>) Światowa Inicjatywa na Rzecz Zwalczenia Astmy

GKS	glikokortykosteroidy
IgE	immunoglobulina E
IL	interleukina
ILC2	<i>(ang. innate lymphoid cells)</i> naturalne komórki limfoidalne
ISAAC	<i>(ang. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood)</i> Międzynarodowe Badania nad Astmą i Alergią u Dzieci
LPS	lipopolisacharyd
mRNA	<i>(ang. messenger ribonucleic acid)</i> matrycowy kwas rybonukleinowy
PEF	<i>(ang. peak expiratory flow)</i> szczytowy przepływ wydechowy
SNPs	<i>(ang. single nucleotide polymorphisms)</i> polimorfizm pojedynczego nukleotydu
SPT	<i>(ang. skin prick test)</i> skórne testy punktowe

2. WSTĘP

2.1 Atopia

Atopia to genetycznie uwarunkowana skłonność do nadmiernej produkcji przeciwciał klasy E w odpowiedzi na kontakt z alergenami występującymi powszechnie w środowisku (1,2). Jeszcze przed odkryciem immunoglobuliny E w 1968r. termin atopia został wprowadzony w pracy Coca i Cooke'a z 1923r. Autorzy odnieśli się do greckiego słowa „atopia” oznaczającego „coś nie na swoim miejscu, nietypowego” i nazwali nim katar sienny oraz astmę (2). Osoba z atopią znajduje się w grupie o zwiększonym ryzyku rozwoju jednej lub więcej chorób atopowych - atopowego zapalenia skóry, alergicznego nieżytu nosa, astmy, alergii pokarmowej. Jednak atopia może także oznaczać obecność przeciwciał E bez występowania objawów klinicznych (3). Historia naturalna schorzeń atopowych określana jest jako marsz alergiczny opisujący progresję od AZS i/lub alergii pokarmowej we wczesnym dzieciństwie do astmy i ANN w późniejszych latach. Należy zaznaczyć, że choroby z kręgu atopii podlegają wpływom czynników genetycznych oraz środowiskowych i co za tym idzie nie u każdego pacjenta przebiegają według powyższego schematu (4).

Celem potwierdzenia atopii wykonuje się punktowe testy skórne (Skin Prick Test - SPT), oznaczenie swoistych IgE skierowanych przeciwko znanym alergenom, oraz coraz częściej przeciwko określonym komponentom alergenowym (molekularna diagnostyka alergii, component-resolved diagnostics -CRD) (5).

2.2 Astma oskrzelowa

Astma jest heterogenną chorobą zazwyczaj charakteryzującą się przewlekłym zapaleniem dróg oddechowych. Jest definiowana przez zmienne ograniczenie przepływu wydechowego z towarzyszeniem takich objawów jak świsty (ang. wheeze), duszność, ucisk w klatce piersiowej i kaszel, których nasilenie zmienia się w czasie (wg GINA 2021).

Zmienną obturację oskrzeli prowokują swoiste i nieswoiste czynniki: wysiłek, kontakt z alergenem lub substancją drażniącą, infekcje wirusowe i bakteryjne, zmiany pogody, stres. Natomiast ustąpienie objawów może być samoistne lub stanowić odpowiedź na leczenie. Czasem pacjent pozostaje asymptotyczny przez miesiące a nawet lata, z

drugiej strony może doświadczać ciężkich zaostrzeń nawet zagrażających życiu. Właśnie z uwagi na to, że obturacja nie jest objawem występującym stale, a przewlekły stan zapalny dróg oddechowych jest trudny do weryfikacji i wymaga specjalistycznych procedur diagnostycznych, postawienie rozpoznania podczas wizyty lekarskiej także z wykonaniem spirometrii podlega ograniczeniom - należałoby ją przeprowadzić w trakcie trwania obturacji lub przeprowadzić próbę prowokacji. U młodszych dzieci diagnoza opiera się najczęściej na danych z wywiadu i ocenie odpowiedzi na leczenie. W większości badań epidemiologicznych astmę rozpoznaje się w oparciu o wyniki badań kwestionariuszowych (8,9).

Astma to heterogenna choroba z różnymi fenotypami różniącymi się między sobą wiekiem wystąpienia objawów, rodzajem odpowiedzi zapalnej, statusem alergicznym czy ciężkością choroby. Ze względu na rodzaj zapalenia w drogach oddechowych (oceniając na podstawie dominującego typu komórek zapalnych w płwocinie indukowanej) wyróżnia się: astmę eozynofilową (najczęstszą, dotyczącą około 40% pacjentów), astmę neutrofilową, astmę ubogokomórkową oraz astmę mieszaną granulocytową. Astma eozynofilowa ma najczęściej charakter alergiczny, natomiast neutrofilowa jest astmą niealergiczną (10,11,12).

Szacuje się, że w Polsce astma alergiczna stanowi 62% wszystkich rozpoznań astmy (8). Najczęściej cechuje się ona zapaleniem eozynofilowym, w którym biorą udział cytokiny typu 2 takie jak IL-4, IL-5, IL-13 - produkowane głównie przez limfocyty Th2 oraz naturalne komórki limfoidalne (innate lymphoid cells) ILC2. Eozynofile są jednymi z najważniejszych komórek fazy późnej reakcji alergicznej i przewlekłego procesu zapalnego w astmie oskrzelowej. Ich obecność w tkance wiąże się z utrzymywaniem się nacieku zapalnego, uszkodzeniem tkanek i remodelingiem. Wydzielają także szereg mediatorów prozapalnych takich jak eozynofilowe białko kationowe (ECP), peroksydaza eozynofilowa (EPO) oraz główne białko zasadowe (MBP). Eozynofile pochodzą głównie ze szpiku kostnego, część z nich dociera do dolnych dróg oddechowych jako dojrzałe komórki, a część jako prekursorzy szpikowe eozynofilów, które ulegają dojrzewaniu w miejscu zapalenia (13).

Pozostająca w mniejszości astma niealergiczna zazwyczaj zaczyna się w późniejszych latach życia (13). Może być powodowana przez długotrwałe narażenie na zanieczyszczenia środowiska, zanieczyszczenia w miejscu pracy, infekcje, natężony wysiłek fizyczny, otyłość. Te czynniki powodują stymulację mechanizmów odporności nieswoistej między innymi za pośrednictwem receptorów toll-podobnych

(Toll-like receptors, TLR) co prowadzi do rekrutacji i aktywacji neutrofilów w drogach oddechowych. Następuje zwrot w kierunku odpowiedzi typu Th1 i Th17, zwiększone wydzielanie IL-8, IL-17-A, elastazy neutrofilów oraz metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-9). Dochodzi do remodelingu ścian oskrzeli, obturacji oraz spadku FEV1 (14,15).

2.3 Alergiczny nieżyt nosa

Alergiczny nieżyt nosa (ANN) czyli zespół objawów klinicznych wywołanych przez IgE-zależną immunologiczną reakcję zapalną błony śluzowej nosa po ekspozycji na alergen należy do najczęstszych przewlekłych chorób układu oddechowego i dotyczy 10-40% populacji. Do głównych objawów ANN zalicza się: świąd nosa, wyciekanie wydzieliny i/lub upośledzenie jego drożności oraz kichanie, ponadto często występuje upośledzenie węchu, kaszel, świąd podniebienia oraz zaczerwienienie i świąd spojówek. Ze względu na czas trwania objawów wyróżnia się ANN okresowy - trwający nie dłużej niż 4 dni w tygodniu lub nie dłużej niż 4 kolejne tygodnie i przewlekły - nie spełniający tych kryteriów. Natomiast biorąc pod uwagę nasilenie objawów wyróżniamy łagodny i ciężki ANN, gdzie ciężki oznacza, że nasilenie objawów utrudnia codzienne funkcjonowanie, pracę, naukę, zaburza sen (16). Pojawienie się pierwszych objawów choroby najczęściej ma miejsce w dzieciństwie i wcześniej młodości - u 80% pacjentów przed 20 rokiem życia (17,18). W wieku dziecięcym wśród chorych obserwuje się przewagę płci męskiej, w okresie dojrzewania żeńskiej, a u osób dorosłych ANN występuje w podobnym odsetku u obu płci (19). Występowanie ANN u rodziców jest ważnym czynnikiem ryzyka rozwoju choroby - jeśli jeden z rodziców ma zdiagnozowany ANN ryzyko to wzrasta dwukrotnie (20).

W patomechanizmie wyróżniamy dwie fazy - wczesną i późną. Wczesna (trwająca 2-4 godzin) rozpoczyna się po pobudzeniu limfocytów Th2 przez alergen stykający się z błoną śluzową nosa, następnie dochodzi do stymulacji limfocytów B, produkcji przeciwciał IgE, degranulacji mastocytów, wystąpienia świądu, kichania, niedrożności nosa. W pojawiającej się kolejno fazie późnej obserwujemy napływ i aktywację licznych komórek zapalenia alergicznego, wydzielanie cytokin m.in IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, aktywację i uwalnianie mediatorów eozynofili, finalnie zatkanie nosa, zaburzenia węchu i smaku (21). Do postawienia diagnozy ANN konieczny jest prawidłowo zebrany wywiad oraz badanie przedmiotowe z rynoskopią lub endoskopią,

poszerzone o badania potwierdzające atopię. Wykonuje się także badanie cytologiczne wymazu z nosa, donosową próbę prowokacyjną, badanie drożności nosa. Diagnoza postawiona tylko na podstawie wywiadu jest trafna w 77% przypadków, a na podstawie wywiadu i jednego z badań dodatkowych: STP lub swoistych IgE w 99% przypadków (22).

Współistnienie ANN i astmy często określa się mianem „wspólnej choroby dróg oddechowych” („one airway one disease”). Naciek zapalny zarówno w astmie alergicznej jak i w ANN oparty jest na eozynofilach, zaangażowane są te same mediatory - cytokiny typu Th2, w obu przypadkach dochodzi do degranulacji komórek tucznych. U pacjentów z ANN, także bez rozpoznanej astmy, wykazano odpowiedź oskrzelową po ekspozycji na alergeny pyłków roślin, a po alergenowej prowokacji oskrzeli obserwowano występowanie stanu zapalnego, nacieków eozynofilowych i bazofilowych w nosie. Ponadto źle kontrolowany ANN może wywoływać zaostrzenia współistniejącej astmy, a skuteczne jego leczenie przyczynia się do zapobiegania rozwojowi lub zmniejszania objawów tej choroby. (16,23,24)

2.4 Epidemiologia chorób alergicznych

Astma oskrzelowa stanowi istotny problem kliniczny będąc jedną z najczęstszych chorób przewlekłych u dzieci i młodych dorosłych. Określa się, że na świecie jest około 300 milionów chorych, jednak z powodu mało precyzyjnej i nie wszędzie akceptowanej definicji liczba ta pozostaje szacunkowa. Dodatkowo w ostatnich dekadach w licznych badaniach epidemiologicznych notuje się wzrost częstości zachorowań (8). Bliższe poznanie epidemiologii astmy i chorób alergicznych umożliwiły dwa przeprowadzone w ostatnim trzyletniu przekrojowe badania epidemiologiczne: u dzieci The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) i wśród dorosłych The European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). Metodologia tych badań stała się standardem dla kolejnych badań epidemiologicznych w tej dziedzinie, oba opierały się na podobnych kwestionariuszach zawierających pytania o objawy astmy (głównie duszność w badaniu ECRHS i świszczący oddech, świsty, gwizdy w klatce piersiowej w badaniu ISAAC), alergicznego nieżytu nosa (problemy z kichaniem, ciekącym, zatkanym nosem niezależne od infekcji), wyprysku atopowego (swędzące zmiany skórne w miejscach typowych) oraz diagnozę postawioną przez lekarza. W Polsce, zgodnie z badaniem ISAAC, u dzieci w wieku 6-7 lat astma występowała z

częstością 10,9% i 13,6%, ANN 7,2% i 13,0%, wyprysk atopowy 6,3% i 11,5%-odpowiednio w latach 1994-1995 i 2001-2002, natomiast u dzieci w wieku 13-14 lat częstość astmy określono na 7,8% i 10,2%, ANN 8,8% i 18,9%, wyprysku atopowego 5,0% i 8,5% także odpowiednio w latach 1994-1995 i 2001-2002. (25). W ramach projektu ECRHS II przeprowadzonego w 18 państwach stwierdzono występowanie objawów astmy w zakresie od 4,1% w Bombaju (Indie) do 32,0% w Dublinie (Irlandia) (26).

W Polsce na podstawie kwestionariuszy ISAAC i ECRHS w latach 2006-2008 przeprowadzono badanie ECAP (Epidemiologia Chorób Alergicznych w Polsce) obejmujące ponad 20 tysięcy uczestników, którego celem było uzupełnienie informacji o epidemiologii chorób alergicznych w naszym kraju. Wykazano objawy atopowego zapalenia skóry u 38% (klinicznie zweryfikowane 6,5%), astmy u 15,7%, ANN u 22,6% badanych. U 73,6% pacjentów z astmą stwierdzono współwystępowanie ANN (27,28). Średnio 4,6% populacji deklarowało, że choruje na astmę, w mieście współczynnik ten wynosił 4,8%, a na wsi 2,9%. W kolejnej fazie tego badania, obejmującej uzupełniające badanie lekarskie niespełna 30% wszystkich uczestników, w oparciu o kryteria GINA astmę rozpoznano u 10,6% badanych (10,6% w mieście i 10,1% na wsi) (8).

Według dokumentu wydanego przez ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*) w 2016 roku u 15-38% pacjentów z ANN rozpoznano także astmę, a objawy nosowe są obecne u 6-85% pacjentów z astmą (16).

2.5 Czynniki wpływające na rozwój i przebieg chorób alergicznych.

Szacuje się, że udział czynników genetycznych w wystąpieniu astmy wynosi do 70% (29). Dotychczasowe dane pokazują, że w patogenezie astmy udział bierze wiele genów. Badania kliniczno - kontrolne oraz badania członków rodzin dotkniętych astmą pozwoliły zidentyfikować liczne regiony na chromosomach związane z podatnością na zachorowanie. Zauważono, na przykład, że gen odpowiedzialny za nadreaktywność (airway hyperresponsiveness - AHR) oskrzeli jest zlokalizowany niedaleko genu regulującego poziom IgE w surowicy i co za tym idzie dziedziczy się wspólnie z nim (30). Zidentyfikowano nie tylko geny predysponujące do rozwoju astmy, ale także mające związek z odpowiedzią na leczenie.

Kolejnym czynnikiem ryzyka może być płeć, jednak to, która zależne jest od wieku pacjentów. U dzieci przedszkolnych oraz szkolnych to chłopcy około dwukrotnie

częściej chorują na astmę, następnie różnica się zaciera, by w wieku dorosłym zachorowalność wśród kobiet była wyższa (30). Różnice te nie zostały w pełni wyjaśnione, bierze się pod uwagę zmienny rozmiar dróg oddechowych, które w początkowym okresie życia są mniejsze u chłopców, a następnie sytuacja się odwraca. Ponadto jako przyczynę częstszego występowania astmy u kobiet podaje się zmiany hormonalne zachodzące podczas cyklu miesiączkowego (31).

Zwraca się także uwagę na czynniki związane z życiem płodowym oraz porodem - niebezpieczeństwo rozwoju choroby jest większe u dzieci urodzonych przedwcześnie, z niską lub zbyt dużą masą urodzeniową. Czynniki oddziałujące w czasie ciąży takie jak status socjoekonomiczny, dostęp do opieki zdrowotnej, palenie tytoniu przez ciężarną, otyłość mogą mieć potencjalny wpływ na stres prenatalny i co za tym idzie rozwój astmy. Stres prenatalny może zaburzać równowagę immunologiczną płodu, promując odpowiedź Th2-zależną we wczesnym dzieciństwie. Wykazano, że dzieci urodzone z matek o wyższym poziomie stresu w trakcie trwania ciąży mają wyższe stężenie IgE we krwi pępowinowej (32). Analiza danych z projektu MeDALL (Mechanisms of the Development of Allergy) pozwoliła na wyciągnięcie wniosku, że ekspozycja na dym tytoniowy w czasie ciąży przede wszystkim zwiększa ryzyko astmy wczesnodziecięcej, a duża ekspozycja (co najmniej 10 papierosów dziennie) może skutkować także astmą przetrwałą. Palenie papierosów przez ciężarną powoduje trwałe modyfikacje epigenetyczne głównie w regionach regulujących aktywność genów odpowiedzialnych za stan zapalny dróg oddechowych oraz upośledzoną odpowiedź na patogeny wirusowe (33). Wcześniejsze obserwacje Grabenhenrich'a i wsp. z 2014 potwierdzają, że unikanie palenia tytoniu w trakcie ciąży może zmniejszyć ryzyko astmy (34). Zaobserwowano też, że istotny wpływ na rozwój astmy ma nie tylko zachowanie samej ciężarnej. Rzucenie palenia przez ojca dziecka znacząco redukuje ryzyko astmy u potomstwa (35).

Otyłość u dzieci predysponuje do cięższego przebiegu astmy, gorszej kontroli choroby oraz niższej jakości życia. Podobna zależność obserwowana jest u dorosłych. Otyłe osoby (których BMI przekracza 30 kg/m²), szczególnie te z otyłością brzuszną są bardziej narażone, prawdopodobnie jest to efekt - związanej z otyłością - złej mechaniki oddychania oraz indukcji stanu zapalnego. Nagromadzenie tkanki tłuszczowej w obrębie klatki piersiowej i jamy brzusznej prowadzi do zmniejszenia pojemności płuc szczególnie wpływając na objętość zalegającą oraz wydechową objętość zapasową. Obserwowano dodatnią korelację pomiędzy BMI a

nadreaktywnością dróg oddechowych. Dodatkowo istnieją liczne powiązania genetyczne, metaboliczne i immunologiczne pomiędzy otyłością a astmą. Takie geny jak CHI3L1, PRKCA, LEP wiązane są z oboma zaburzeniami. Dyslipidemia i podwyższone poziomy leptyny wytwarzanej w tkance tłuszczowej korespondują z AHR. Adipocyty produkują także inne czynniki prozapalne - $TNF\alpha$, IL-6, białko chemotaktyczne monocytów 1 - które są zdolne do aktywacji komórek Th1 oraz różnicowania komórek Th17. Ryzyko hospitalizacji otyłego pacjenta z astmą jest 4-6 krotnie większe niż szczupłego astmatyka (30,36,37,38).

Zgodnie z „hipotezą higieniczną” (ang. hygiene hypothesis) dzieci narażone w młodym wieku na liczne infekcje wirusowe, bakteryjne i pasożytnicze (związane głównie z życiem na wsi, uczęszczaniem do żłobków i przedszkoli, wychowywaniem w rodzinach wielodzietnych) są mniej predysponowane do rozwoju alergii czy astmy (39). Koncepcja ta została wysunięta w latach 80. XX w. przez dr Davida Strachana, a w roku 2010 zaproponowano przemianowanie jej na „hipotezę starych przyjaciół” (ang. „old friends” hypothesis) aby podkreślić protekcyjną rolę ekspozycji na mikroorganizmy symbiotyczne modulujące układ odpornościowy człowieka chroniąc przed jego nadreaktywnością. Komensale uruchamiają proliferację komórek T regulatorowych (T reg) produkujących IL-10 i $TGF-\beta$ (40). Znaczenie ma mikrobiom jelit, ale także skórny czy dróg oddechowych. Istnieją dowody, że do kolonizacji dochodzi już w trakcie życia płodowego, ale największe znaczenie mają pierwsze dni i lata życia. Na rodzaj bakterii wpływa także droga porodu, sposób karmienia, wczesna antybiotykoterapia (41,42). U noworodków urodzonych drogą cięcia cesarskiego kluczowe znaczenie ma brak ekspozycji na mikroorganizmy bytujące w drogach rodnych matki i bakterie kałowe, przez co wykrywa się u nich znacząco mniej kolonii *Bacteroides*, *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* w porównaniu z dziećmi urodzonymi siłami natury. Jednak z uwagi na liczne czynniki wpływające na konieczność przeprowadzenia cięcia cesarskiego trudno udowodnić prosty związek pomiędzy sposobem porodu a rozwojem chorób atopowych w tym astmy (43). Mleko matki zawiera zarówno czynniki prebiotyczne (oligosacharydy promujące wzrost specyficznych bakterii) jak i probiotyczne (zmiennie osobniczo, głównie *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Propionibacteria*, *Bifidobacterium*). Mikrobiota jelitowa dzieci karmionych piersią jest mniej zróżnicowana, z przewagą gatunków *Bifidobacterium* i zmniejszoną kolonizacją *E. coli* i *Clostridium difficile*, w porównaniu z dziećmi karmionymi mlekiem modyfikowanym.

Badania kohortowe są źródłem sprzecznych doniesień odnośnie wpływu karmienia piersią na rozwój atopii i alergii wziewnych (43).

Spożywanie surowego mleka krowiego uważa się za istotny czynnik prewencyjny w rozwoju astmy oskrzelowej i innych chorób alergicznych. Mleko surowe to niepoddane ani procesom przemysłowym takim jak sterylizacja UHT, pasteryzacja, ale też niegotowane/podgrzewane w warunkach domowych. Temperatura wpływa na skład fizykochemiczny produktu powodując denaturację, agregację i glikację termolabilnych białek serwatkowych (α -laktoalbuminy, β -laktoglobuliny, serum albuminy bydlęcej, immunoglobulin), spadek stężenia TGF- β i IL-10, redukcję zawartych w nim mikroorganizmów i endotoksyn. Bydlęca immunoglobulina G ma potencjał wiązania się z ludzkim wirusem RS bezpośrednio go neutralizując i zapoczątkowując proces fagocytozy; może też wiązać alergeny wziewne. Świeże mleko redukuje całkowitą ilość komórek zapalnych (eozynofilów, limfocytów, makrofagów, neutrofilów) w popłuczynach oskrzelopęcherzykowych, *ex vivo* obniża produkcję IL-5 i IL-13 w limfocytach T po stymulacji alergenami roztoczy kurzu domowego. Badania kohortowe takie jak PASTURE i GABRIELA wykazały, że spożycie surowego mleka w okresie wczesnego dzieciństwa koreluje z rzadszym występowaniem astmy u dzieci (44-47). Uważa się, że dzieci otrzymujące antybiotyki w pierwszym roku życia są bardziej narażone na zachorowanie na choroby atopowe. Wczesna ekspozycja na antybiotyki może prowadzić do powstania dysbiozy jelitowej co zwiększa prawdopodobieństwo rozwoju alergii w późniejszych latach życia (48). Istnieją jednak badania nie potwierdzające takiego związku (43). Paracetamol (acetaminofen) jest lekiem w którym także dopatruje się potencjalnego związku z rozwojem astmy. Zmniejsza on stężenie glutationu we krwi i pęcherzykach płucnych co może prowadzić do uszkodzenia tkanek, skurczu mięśniówki gładkiej i nadreaktywność oskrzeli. Obniżenie gorączki powoduje uwalnianie mniejszej ilości cytokin Th1 sprzyjając dominacji odpowiedzi Th2- zależnej. Wysokie dawki paracetamolu mają działanie cytotoksyczne na pneumocyty (49). W analizie dużej grupy dzieci w badaniu ISAAC, badaniu etiopskiej kohorty przez grupę Amberbira i badaniu przekrojowym przeprowadzonym w Hiszpanii w latach 2006-2007 znaleziono związek pomiędzy przyjmowaniem paracetamolu w pierwszych latach życia a występowaniem świstów/astmy, związek ten był zależny od dawki (50, 51, 52). Inne badanie Norweskich dzieci nie potwierdziło zależności, jednak było przeprowadzone na niewielkiej grupie (53). W wieku dorosłym także istnieje związek pomiędzy

przyjmowaniem acetaminofenu a objawami astmy oskrzelowej, jednak jest on słabszy (52).

Podwyższone miano przeciwciał przeciwko patogenom przenoszonym drogą pokarmową, wywołujących infekcje zwane często „chorobami brudnych rąk”, takim jak wirus zapalenia wątroby typu A, *Toxoplasma gondii* czy *Helicobacter pylori* jest czynnikiem ochronnym alergii układu oddechowego (astmy, alergicznego nieżytu nosa) (54). Wczesna infekcja *H. pylori* w badaniach na modelu mysim wykazywała protekcyjny efekt przeciwko rozwojowi astmy alergicznej poprzez wspomnianą wcześniej indukcję T reg oraz reprogramowanie komórek dendrytycznych (41). Postuluje się także, że zakażenie tęgoryjcem (*Necator americanus*) redukuje ryzyko rozwoju astmy (55). W badaniu przeprowadzonym w populacji zachodnioeuropejskiej (Niemcy, Austria, Szwajcaria) wykazano, że ekspozycja na lipopolisacharyd i gronkowcową enterotoksynę B blokowała ekspresję cytokin prozapalnych (TNF- α , IFN- γ , IL12) i regulatorowych (IL-10) i ujemnie korelowała z incydentami świstów na podłożu atopowym/astmą. Nie potwierdzono jednak związku pomiędzy narażeniem na powyżej wspomniane drobnoustroje a astmą nieatopową (40,54).

Uważa się, że dzieci posiadające starsze rodzeństwo mają mniejsze ryzyko rozwoju astmy i innych chorób alergicznych. Potwierdzają to liczne badania empiryczne prowadzone w populacjach na całym świecie gdzie wykazano, że astma występuje częściej u dziecka urodzonego jako pierwsze. Założenia „hipotezy higienicznej” zdają się niewystarczające do wyjaśnienia tej zależności, rozważa się udział programowania wewnątrzmacicznego i efektów hormonalnych (56).

Alergeny są powszechnie znanym czynnikiem wywołującym zaostrzenie astmy, jednak ich wpływ na sam rozwój choroby pozostaje niejednoznaczny. Wiadomo, że uczulenie na roztocze kurzu domowego, sierść psa i kota, grzyby pleśniowe jest czynnikiem rozwoju astmy, jednak jak ekspozycja wpływa na rozwój uczulenia, jak istotna jest dawka, czynniki genetyczne, wiek pacjenta pozostaje niejasne. Istnieją liczne sprzeczne badania odnośnie wpływu wczesnej ekspozycji na alergeny zwierząt domowych takich jak pies czy kot (30).

W 2005 roku rozpoczęto projekt URECA (The Urban Environment and Childhood Asthma) polegający na badaniu kohorty urodzeniowej w ubogich śródmieściach dużych miast Ameryki Północnej. Wśród 442 uczestników rozpatrywano związek pomiędzy prenatalną i wczesnodziecięcą ekspozycją na czynniki środowiskowe a

występowaniem astmy w wieku 7 lat. Zaobserwowano, że wyższe stężenie alergenów karalucha, myszy domowej i kota w kurzu pozyskanym ze środowiska domowego dzieci w wieku 3 miesięcy, 2 i 3 lat koreluje z niższym ryzykiem astmy w wieku 7 lat (57). W tej samej kohorcie stwierdzono zależność występowania nawracających świstów i czasu ekspozycji na alergeny: jeśli duża ekspozycja miała miejsce w pierwszym roku życia nawracający świszczący oddech w 3 roku życia obserwowano rzadziej, natomiast ekspozycja po 3 roku życia wiązała się ze zwiększonym ryzykiem sensytyzacji i nawracających świstów oddechowych (58). W innym badaniu, mającym miejsce dekadę wcześniej, także w Ameryce Północnej, obserwowano, że wśród dzieci z dodatnim rodzinnym wywiadem atopowym wczesna ekspozycja na wysokie poziomy alergenów roztoczy kurzu domowego wiąże się ze zwiększonym ryzykiem astmy w wieku 7 lat (59).

Ważną rolę w rozwoju astmy odgrywają infekcje, głównie wirusowe, w okresie dziecięcym (30). Szczególną uwagę zwraca się tutaj na zakażenie wirusem RS (respiratory syncytial virus), rynowirusem oraz wirusem paragrypy. Dzieci urodzone o czasie, które w pierwszym roku życia przeszły ciężką infekcję o etiologii RSV mają znaczące ryzyko rozwoju astmy w dzieciństwie (60). Ponadto w badaniu fińskim wykazano, że u dzieci z astmą, które w przeszłości przebyły ciężkie zapalenie oskrzeli spowodowane przez rynowirus istnieje konieczność jeszcze wcześniejszego włączenia leków przeciwastmatycznych oraz dłuższego ich stosowania niż w przypadku dzieci z astmą, które przebyły zakażenie wirusem RS (61).

Wpływ na rozwój oraz występowanie zaostrzeń astmy mają także zanieczyszczenia środowiska a wśród nich produkty spalania paliw kopalnych, głównie cząsteczki pyłu zawieszonego oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (62).

Źródłem potencjalnych alergenów jest także miejsce pracy. Zidentyfikowano ponad 300 substancji związanych z rozwojem astmy zawodowej. Do ekspozycji najczęściej dochodzi na farmach, uprawach rolniczych, w laboratoriach, fabrykach plastiku oraz podczas malowania, sprzątania. Choroba rozwija się po okresie latencji trwającym miesiące lub lata i pozostaje pomimo zaprzestania ekspozycji na wyzwalający czynnik (30).

2.5.1 Wpływ kontaktu ze zwierzętami gospodarczymi na rozwój i przebieg chorób alergicznych

Dorastanie w gospodarstwie rolnym uznawane jest za czynnik protekcyjny rozwoju astmy i innych chorób alergicznych. Za najważniejszą składową uważa się regularny kontakt ze zwierzętami gospodarczymi, a co za tym idzie z mikroorganizmami oraz endotoksynami. W badaniu obejmującym dużą grupę dzieci zamieszkujących farmy Europy Zachodniej (Niemcy, Szwajcarię, Austrię) wykazano, że dzieci, które miały kontakt ze zwierzętami hodowlanymi, stajniami, stodołami miały mniejszą skłonność do atopii i astmy oskrzelowej (63). Także badanie kanadyjskie dużej kohorty dostarczyło dowodów, że spędzenie dzieciństwa na farmie zapobiega incydentom astmy w okresie dojrzewania oraz dorosłości (64). W 2012r. Stein i wsp. przebadali dzieci z grupy Amiszów i Huterytów. Są to populacje rolnicze Ameryki Północnej o podobnym rodowodzie genetycznym, jednak ich podejście do pracy na roli jest znacząco różne. Amisze akceptują tylko tradycyjne sposoby upraw i hodowli, nie stosują żadnych technicznych udogodnień podczas gdy Huteryci korzystają z przemysłowych metod. Astma i atopia występowała 4-6 razy częściej u dzieci Huterytów co korespondowało z prawie 7 razy niższym stężeniem endotoksyn w ich kurzu domowym. Także średnie poziomy wybranych 23 cytokin uzyskanych z leukocytów krwi obwodowej hodowanych z LPS były znacząco niższe u Amiszów (65). Do trzeciej fazy badania ankietowego ISAAC dołączony był dodatkowy kwestionariusz zawierający pytania odnośnie wczesnej ekspozycji na zwierzęta hodowlane. Odpowiedzi dotyczące prawie 200 tysięcy dzieci w wieku 6-7 lat pozwoliły wyciągnąć wnioski odnośnie jej wyraźnego związku z występowaniem objawów astmy, ANN i wyprysku u osób z krajów o wysokim dochodzie narodowym, u dzieci zamieszkujących kraje biedniejsze takiego związku nie obserwowano (66). W 2007 roku wśród polskiej młodzieży przeprowadzono badanie mające na celu porównanie częstości występowania chorób alergicznych zależnie od zamieszkania na wsi lub w mieście. W populacji miejskiej astma występowała znacząco częściej w porównaniu z dziećmi mieszkającymi na wsi- odpowiednio 16,42% i 1,97%. Dodatni wynik testów skórnych miało 63,7% nastolatków z miasta i 22,7% ze wsi (67).

W roku 2003 (przed wstąpieniem Polski do Unii Europejskiej) i 2012 (8 lat po podpisaniu traktatu akcesyjnego) na terenach wiejskich Dolnego Śląska przeprowadzono badania poszukujące związku pomiędzy zamieszkiwaniem w

gospodarstwie rolnym i kontaktem ze zwierzętami hodowlanymi, a rozwojem chorób atopowych. Po wstąpieniu Polski do UE w 2004r. nastąpiły szybkie zmiany w sposobie uprawiania roli, z przyczyn ekonomicznych doszło do znacznej redukcji zwierząt hodowanych w małych gospodarstwach, nawet 6-krotnie zmniejszył się kontakt ludności wiejskiej z krowami, trzodą i drobiem, 4-krotnie zmniejszyło się także spożycie surowego mleka. Dane te pozyskano na podstawie kwestionariusza w części klinicznej opartego na tym używanym w badaniu ISAAC, następnie wykonywano testy skórne celem potwierdzenia lub wykluczenia atopii. Zaobserwowano prawie 3-krotny wzrost występowania atopii, 2-krotny ANN i nieistotny statystycznie astmy u osób mieszkających na wsi w okresie pomiędzy 2003 a 2012 rokiem, podczas gdy w u ludności miejskiej nie obserwowano w tym czasie istotnych różnic w częstości występowania tych chorób. W 2012 częstość atopii zarówno w populacji miejskiej jak i wiejskiej kształtowała się na poziomie 20%, ANN około 7% a astmy około 5 % (68). Kirjavainen i wsp. wykazali, że ryzyko astmy oskrzelowej u dzieci wychowujących się w środowisku skolonizowanym przez mikroby charakterystyczny dla gospodarstw rolnych (z niewielką ilością kolonii paciorkowców) jest podobne niezależnie od tego czy mieszkają ona na farmie czy też nie. Obserwacje te poczyniono analizując Fińską kohortę i następnie odtworzono w Niemczech. Niemieckie dzieci mieszkające poza farmą, ale otoczone mikrobiotą charakterystyczną dla fińskich gospodarstw miały obniżone ryzyko rozwoju astmy w porównaniu z zamieszkującymi z innymi mikroorganizmami (69).

Korzystając z danych pozyskanych w projekcie GABRIELA zlokalizowano miejsce zamieszkania ponad 2000 dzieci w Bawarii, obliczono jego odległość od najbliższej hodowli bydła oraz scharakteryzowano otoczenie. Następnie pobrano tam ponad pół tysiąca próbek celem zidentyfikowania mikrobioty. Ryzyko rozwoju astmy i atopii u dziecka było odwrotnie proporcjonalne do istnienia farmy w promieniu do 100m od jego miejsca zamieszkania. Największy protekcyjny efekt wywierały tradycyjne farmy gwarantujące ekspozycję na różnorodną florę bakteryjną (70). Mechanizm w którym środowiskowy mikrobiom wpływa na mikrobiom jelit, a co za tym idzie rozwój chorób alergicznych próbowali wyjaśnić Depner i wsp. wykazując, że koncepcja osi jelita-płuca u ludzi wiąże się z dojrzewaniem flory w jelitach oraz produktami jej metabolizmu. Opisano pozytywny wpływ ekspozycji na środowisko farm na zwolnione dojrzewanie mikrobiomu jelitowego oraz pojawianie się w nim takich bakterii produkujących

maślany jak *Roseburia* i *Coprococcus*; te natomiast uznano za czynniki protekcyjne dla rozwoju astmy. (71).

Badanie RHINE przeprowadzone w krajach Europy Północnej pozwoliło wyciągnąć wnioski, że wśród osób dorastających na farmie astma o późnym początku występuje istotnie rzadziej niż u osób pochodzących z miasta (72). Szwedzkie badanie ankietowe potwierdziło, że zamieszkiwanie na farmie w dzieciństwie redukuje ryzyko zdiagnozowanej przez lekarza astmy oraz stosowania leków oraz przyjmowania leków przeciwastmatycznych (73). Także w Szwecji na dużej (ponad milion uczestników) kohorcie także potwierdzono, że ekspozycja na zwierzęta gospodarcze (ale też psy) redukuje ryzyko astmy u dzieci w wieku 6 lat (74). Taki protekcyjny wpływ przebywania w otoczeniu żywego inwentarza może zależeć od gatunku hodowanych zwierząt. Dzieci dorastające na farmach trzody chlewnej nie doświadczają takich korzyści (75). Wydaje się, że ochronny wpływ kontaktu ze zwierzętami gospodarczymi nie podlega „dziedziczeniu”. Timm i wsp. w swoim badaniu opartym na projektach ECRHS i RHINESSA (Respiratory Health In Northern Europe, Spain and Australia) zaplanowanym tak aby sprawdzić wpływ miejsca w którym wychowywali się rodzice i dziadkowie na ryzyko rozwoju astmy u potomstwa nie dowiedli aby istniał związek pomiędzy zamieszkiwaniem starszych pokoleń na farmach a astmą oskrzelową (76). W badaniu na łożyskach pozyskanych w ramach projektu ALLADDIN (Assessment of Lifestyle and Allergic Disease During Infancy) obserwowano znacząco mniejszy stopień metylacji promotora *CD14* w łożyskach matek mieszkających w gospodarstwach rolnych w porównaniu z zamieszkującymi inne tereny. *CD14* to receptor mogący wiązać się z komponentami bakteryjnymi wyzwalając wrodzoną odpowiedź immunologiczną. Opisuje się zależność pomiędzy genem *CD14* a środowiskową ekspozycją na endotoksynę ale także pomiędzy genem dla TLR a czynnikami infekcyjnymi oraz pomiędzy genami *HLA* a alergenami. Różnice epigenetyczne także mogą stanowić wyjaśnienie ochronnego wpływu wychowywania się na farmie na ryzyko rozwoju astmy (77-78). W innym badaniu porównując DNA uzyskane z krwi pępowinowej a następnie w wieku 4,5 roku od dzieci rodzin rolniczych i nierolniczych wykazano istotną różnicę w poziomie metylacji genów z rodziny *ORMDL* czy genów związanych z regulacją IgE i różnicowaniem komórek Th2, szczególnie *RAD50* i *IL13*. We krwi pępowinowej noworodków z rodzin rolniczych regiony *RAD50* i *IL13* miały większy stopień metylacji co skutkuje zmniejszoną ekspresją tych genów (79)

2.6 Immunologia chorób alergicznych - interleukina 13 i 33.

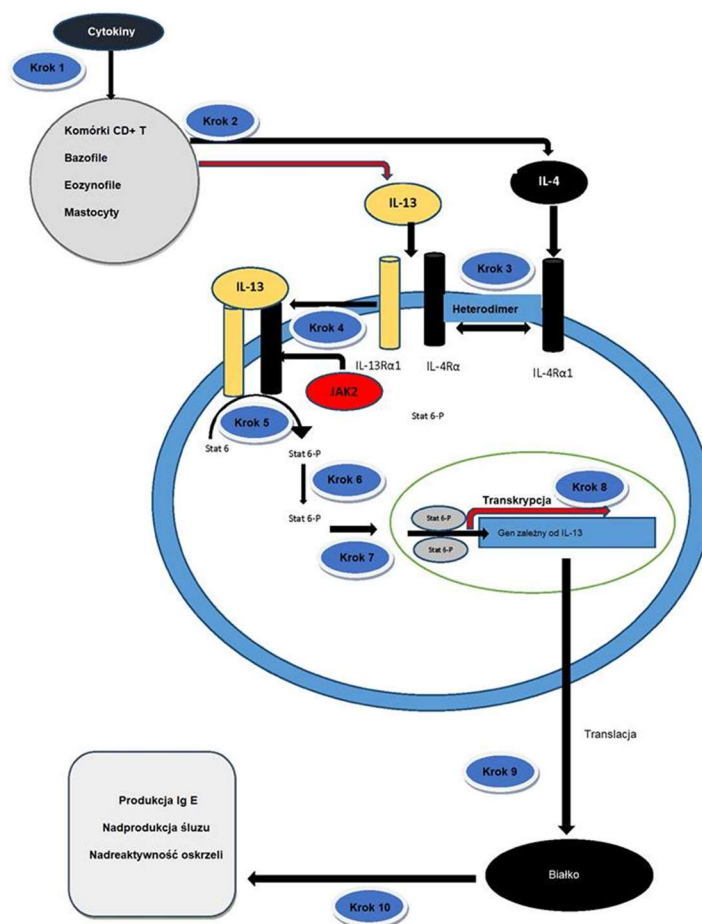
Etiologia chorób alergicznych, w tym astmy oskrzelowej, jest wieloczynnikowa lecz dużą uwagę przykładają się do nieprawidłowej odpowiedzi układu immunologicznego na czynniki z zaburzeniem równowagi pomiędzy odpowiedzią Th1 i Th2- zależną. Zasadniczo wyróżniamy dwa endotypy astmy: z dużym udziałem zapalenia typu 2 i niskim udziałem zapalenia typu 2 [type 2 (T2) high and T2 low inflammation]. Pierwszy z nich, związany z udziałem cytokin typu T2 (IL-4, IL-5, IL-13) jest najczęstszym i najlepiej poznany endotypem astmy (80). Po kontakcie z alergenem komórki prezentujące antygen przy udziale MHC klasy II kierują natywne limfocyty T CD4+ do dojrzewania w kierunku odpowiedzi Th2-zależnej i produkcji cytokin takich jak IL-4, IL-5, IL-13, następnie za ich pośrednictwem prowadzą do uwolnienia IgE, aktywacji receptora FcεR1 oraz dojrzewania, rekrutacji i aktywacji pierwotnych komórek efektorowych odpowiedzi alergicznej, mastocytów i eozynofów, następnie uwolnienia mediatorów (histaminy i leukotrienów) i w efekcie skurczu oskrzeli (80, 81). Mastocyty, eozynofile, bazofile, mogą być także aktywowane przez IL-33. Dodatkowo jej charakterystycznym punktem uchwytu są komórki ILC2 potęgujące reakcje Th2-zależne za pośrednictwem wydzielanych w dużych ilościach IL-4 i IL-5. IL-33 dzięki swoim plejotropowym właściwościom jest także modulatorem pomiędzy odpowiedzią Th1 i Th2 zależną (82).

Większość dotychczasowych prób dogłębnierzego opisu wpływu cytokin na rozwój odpowiedzi alergicznej skupia się na IL-4 oraz IL-5, głównie z uwagi na ich wpływ na syntezę IgE oraz zapalenie eozynofilowe. Jednak zainteresowanie wzbudzają także IL-13 i IL-33. Ich rolę w rozwoju chorób alergicznych potwierdzono między innymi w badaniach na modelach zwierzęcych, tkankach ludzkich in vitro. Zaobserwowano wpływ polimorfizmu genu dla IL-13 na podatność na zachorowanie na astmę oraz fakt że gen dla IL-33 i jej receptora jest jednym z najczęściej replikowanych loci dla podatności na astmę. (82, 83). Opracowuje się także nowe leki na astmę w oparciu o przeciwciała przeciwko IL-13 i IL-33 (81).

2.7 Interleukina 13

2.7.1 Budowa, mechanizm działania i biologiczna rola IL-13.

Interleukina 13 należy do I klasy cytokin, jest białkiem o strukturze trzeciorzędowej składającym się z 4 łańcuchów polipeptydowych (z których każdy jest hydrofobową α -helisą) produkowanym głównie przez limfocyty Th-2, ale także przez komórki NK, mastocyty oraz bazofile - ryc. 2.1, krok 2 (84). Aktywna biologicznie IL-13 jest nieglikozylowanym monomerem i zawiera dwa mostki dwusiarczkowe (85). Jej masa cząsteczkowa wynosi 12 kDa (86). Gen kodujący IL-13, składający się z 4 eksonów i 3 intronów, zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 5. W pobliżu, na tym samym chromosomie, umiejscowiony jest gen kodujący IL-4. Obie interleukiny w 25% mają taką samą sekwencję aminokwasową oraz spełniają podobne funkcje (87). Posiadają wspólny kompleks receptorowy na komórkach efektorowych. Składa się on z podjednostki $\alpha 1$ czyli receptora IL-13 oraz podjednostki α czyli receptora IL-4 (88). Dodatkowo częścią kompleksu jest IL-13R $\alpha 2$. W przeszłości twierdzono, że nie pełni on funkcji sygnałowej, a ma raczej za zadanie zmniejszać odpowiedź na IL-13 poprzez bycie tzw. wabikiem (ang. decoy) (89). Związane to było z brakiem regionu box 1, który ma pełnić kluczową rolę w przekazywaniu sygnału. Nowsze badania pokazują, że IL13R $\alpha 2$ może aktywować MAPK (mitogen-activated-protein-kinase) przez co przyczynia się do regulacji wielu procesów komórkowych przez IL-13 (89, 90).



Ryc. 2.1 Szlak przekazywania sygnału przez IL-13 (na podst. 101).

Zarówno podjednostka $\alpha 1$ jak i $\alpha 2$ należą do superrodziny receptora dla hematopoetyny i są homologiczne w 37% na poziomie aminokwasowym (88). IL-13R $\alpha 1$ jest białkiem, które wiąże IL-13 z niskim powinowactwem ale przy udziale receptora dla IL-4 siła wiązania znacznie wzrasta (88). Interakcja pomiędzy podjednostką α i $\alpha 1$ jest w pełni swoista gatunkowo co oznacza, że ludzki IL-13R $\alpha 1$ może wiązać się tylko z ludzkim IL-4 α tworząc funkcjonalny receptor (88). Połączenie odpowiednich cytokin z kompleksem receptorowym prowadzi do fosforylacji kinaz JAK (Janus kinase) - ryc. 2.1, krok 3 i 4. Aktywowana JAK rozpoczyna kaskadę wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału prowadząc do fosforylacji czynnika transkrypcyjnego STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) - ryc. 2.1, krok 5 (84). Czynniki STAT6 po fosforylacji działają jako czynniki transkrypcyjne - jego monomery łączą się tworząc homodimery i przemieszczają się do jądra komórkowego - ryc. 2.1, krok 6 i 7 (91). Dochodzi tam do transkrypcji genów nich od IL-13, a następnie, w cytoplazmie, powstania

białka - ryc. 2.1, krok 8 i 9. Szlak IL-13 jest regulowany na wielu poziomach: GATA3 oraz ścieżka sygnałowa „hedgehog” nasila jej produkcję i transkrypcję, a interferon 1 obniża (92).

Receptory dla IL-13 znajdują się na ludzkich komórkach B, bazofilach, eozynofilach, mastocytach, komórkach śródbłonna, fibroblastach, monocytach, makrofagach, komórkach nabłonka dróg oddechowych oraz komórkach mięśni gładkich (87,88). W warunkach homeostazy podjednostki receptorów dla IL-13 reprezentowane są niezbyt licznie, ich ilość jest regulowana poprzez hormony, stres oksydacyjny czy stan zapalny (93).

Warianty genetyczne IL-13 są związane z astmą i atopią. Udowodniono że zamiana argininy na glutaminę w pozycji 130 współistnieje ze podwyższonym stężeniem IgE i atopowym zapaleniem skóry w populacji japońskiej i europejskiej (94). Do funkcji interleukiny 13 należy: wpływ na produkcję IgE przez komórki B, aktywacja eozynofili, zwiększanie produkcji kolagenu przez fibroblasty, stymulacja proliferacji mięśniówki gładkiej, hamowanie produkcji mediatorów prozapalnych takich jak prostaglandyny czy reaktywne formy tlenu w makrofagach, oddziaływanie na hipersekrecję śluzu przez komórki nabłonka dróg oddechowych - ryc. 2.1, krok 10 (88). IL-13 wywiera podobny jednak znacznie słabszy efekt na ludzkie limfocyty B jak IL-4. (95). Pobudza ich proliferację, zwiększa produkcję IgE oraz indukuje ekspresję antygenów powierzchniowych (87). IL-13 bierze udział w procesie adhezji makrofagów i monocytów nasilając ekspresję niektórych integryn takich jak CD11b, CD11c, CD18 i CD29 (96). IL-13 wpływa bezpośrednio na eozynofile aktywując je, kierując do miejsca objętego stanem zapalnym oraz wydłużając ich przeżycie (97). Fibroblasty tkanki płucnej także podlegają regulacji przez IL-13, indukuje ona proces przebudowy i włóknienia (98). Badania wykazały, że IL-13 jest zaangażowana w regulację syntezy macierzy zewnątrzkomórkowej (extracellular matrix - ECM) (99). IL-13 bierze udział w różnego typu zapaleniach śluzówki - w takich chorobach jak astma oskrzelowa, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, eozynofilowe zapalenie przetyku czy szereg chorób, których istotą jest nasilone włóknienie (92).

2.7.2 Rola IL-13 w atopii i astmie

IL-13 jest produkowana w drogach oddechowych przez takie komórki jak eozynofile, mastocyty, bazofile, limfocyty-T. Ta produkcja jest stymulowana przez alergeny, inne

cytokiny m. in. IL-9 i IL-25, histaminę czy adenozyne. Działanie IL-13 rozpoczynane jest przez połączenie się jej z receptorem - co aktywuje czynnik transkrypcyjny STAT6. Konsekwencją tego są zmiany w komórkach nabłonka: hipersekrecja śluzu, nadreaktywność dróg oddechowych, rozwój stanu zapalnego oraz włóknienie. IL-13 przy udziale szeregu metaloproteinaz i szeregu chemokin takich jak białko chemotaktyczne monocytów 1 i 5 (monocyte chemoattractant protein - MCP) przyciąga komórki zapalne, wpływa także na uwalnianie mediatorów (leukotrienów, chitynaz, adenozyne) z komórek nabłonka dróg oddechowych, które indukują skurcz mięśniówki gładkiej. Omawiana cytokina zaburza produkcję tlenku azotu w drogach oddechowych, co prawdopodobnie prowadzi do wzrostu napięcia mięśniówki gładkiej. Wzmożona produkcja kolagenu przez makrofagi, proliferacja fibroblastów, skutkują włóknieniem podnabłonkowym - są to także procesy regulowane przez IL-13. (100) IL-13 pełni także ważną funkcję regulatorową indukując produkcję IL-5 w mięśniówce gładkiej dróg oddechowych regulując rekrutację eozynofiliów i ich napływ do oskrzeli i płuc. (101). Po 7 tygodniach prowokacji małymi dawkami alergenów wykazano znamienne wzrost mRNA kodującego IL-13 w BAL badanych pacjentów. Stwierdzono także dodatnią korelację pomiędzy zwiększoną ekspresją mRNA dla IL-13 a ilością eozynofiliów. Z badania wynika także, że IL-13 wybiórczo indukuje ekspresję białka adhezyjnego VCAM-1 (ang. vascular cell adhesion molecule 1) przyczyniając się do gromadzenia się komórek zapalnych (102). W innym badaniu z udziałem osób z ciężką astmą potwierdzono, że zawartość IL-13 w płwocinie u takich pacjentów jest zwiększona w stosunku do zdrowych. Ekspresja IL-13 w warstwie podsłuzowej oraz mięśniówce gładkiej dróg oddechowych zależy od nasilenia zapalenia eozynofilowego. Co za tym idzie wydzielanie IL-13 w drogach oddechowych osób z astmą nieeozynofilową oraz eozynofilową jest znamienne różnie, dowodzi to, że istnieją duże różnice w patogenezie obu typów astmy. W omawianym badaniu wykazano także, że poziom IL-13 w płwocinie koreluje ze stopniem kontroli astmy ocenianym wg kwestionariusza kontroli astmy ACQ (Asthma Control Questionnaire). Nie znaleziono jednak związku pomiędzy FEV1 a stężeniem IL-13 w płwocinie (103).

Zwiększone stężenie IL-13 we krwi pępowinowej wiąże się z większym ryzykiem ujawnienia atopii w wieku przedszkolnym. W przeprowadzonym w 2013r. badaniu kohortowym noworodki, u których stężenie IL-13 było wyższe, po 5 latach miały znacząco wyższe ryzyko potwierdzonej atopii w punktowych testach skórnych (104).

Inne badanie z udziałem pacjentów pediatrycznych z astmą uczulonych na roztocze kurzu domowego poddawanych immunoterapii ujawniło, że po rocznym stosowaniu tej metody leczniczej wraz z poprawą parametrów spirometrycznych (FVC, FEV1, PEF) obniża się stężenie IL-13 w surowicy. Dzieci, u których poprawa spirometryczna była mniej satysfakcjonująca miały także mniejszą zmianę stężenia omawianej cytokiny (105).

Przeprowadzono szereg badań dotyczących działania IL-13 przy wykorzystaniu modeli mysich. Wyłączenie działania IL-13 poprzez ludzkie przeciwciała sIL-13R α 2 w klasie IgG zmniejszyło nadreaktywność dróg oddechowych związaną z ekspozycją na alergeny wziewne, ale nie wpłynęło na nadreaktywność związaną z przewlekłym remodelingiem (106). Przygotowano także szczepionkę używając mysiego peptydu IL-13 wstrzykniętego do wirusowego białka nośnikowego, która prowadziła do produkcji przeciwciał IgG przeciwko IL-13 prowadząc do zahamowania ostrej reakcji dróg oddechowych związanej z ekspozycją na ovalbuminę (107). Ci sami badacze w późniejszym badaniu wykorzystali stworzoną szczepionkę do zmniejszenia stężenia IL-13 i eozynofilów, co przyczyniło się do zmniejszenia podnabłonkowego gromadzenia kolagenu i produkcji śluzu w popłuczynach pęcherzykowo-oskrzelowych. Obserwowano także, że szczepionka z IL-13 hamowała rozwój jednak nie miała wpływu na wycofywanie się już rozwiniętej nadreaktywności. IL-13 może być kluczowa w rozwoju AHR jednak prawdopodobnie nie ma wpływu na jej podtrzymanie (107,108).

Zablokowanie genu IL-13R α 2 lub przerwanie szlaku receptora IL-13R α 2 prowadzi do spadku produkcji TGF- β 1 oraz zmniejszenia gromadzenia się kolagenu. Po ekspozycji na roztocze kurzu domowego obserwowano osłabioną reakcję zapalną dróg oddechowych u myszy pozbawionych wyżej wymienionego receptora. W kolejnych badaniach z użyciem modelu mysiego stwierdzono, że obecność IL-13R α 1 jest niezbędna do podstawowej produkcji IgE, produkcji śluzu i eotaksyny. Dla porównania odpowiedź Th2 była niezależna od IL-13R α 1 (109).

W modelu astmy niealergiczej stworzonym w 2018 roku doprowadzono do nadekspresji podjednostki Fra2 białka aktywującego 1 (activator protein-1) co spowodowało rozwój stanu zapalnego, nadprodukcję śluzu, gromadzenie się kolagenu. Następnie przy użyciu przeciwciał neutralizujących zablokowano działanie IL-13 co skutkowało spadkiem fosforylacji STAT6, zmniejszeniem rozrostu komórek kubkowych i niewielkim zmniejszeniem grubości mięśniówki gładkiej. Następową analizą parametrów

funkcji płuc ujawniła zmniejszenie nadreaktywności oskrzeli u myszy poddanych działaniu przeciwciał przeciwko IL-13. Obserwowano także zmniejszenie całkowitej ilości komórek zapalnych, eozynofików i limfocytów T oraz zwiększenie liczby neutrofilów. Działanie anti-IL-13 wiązało się z rozwojem neutrofilii w drogach oddechowych zwierząt eksponowanych na alergeny jaja (110).

Manson i wsp. prowadzili badania używając zdrowej ludzkiej tkanki płucnej pozyskanej podczas zabiegów lobektomii, którą poddawano działaniu cytokin - w tym IL-13. Dowiedziono, że IL-13 wyzwała czynniki prowadzące do endogennego skurczu oskrzeli, a wraz z IL-4 dodatnio reguluje receptory dla histaminy oraz leukotrienów D4 (LTD4). Zwiększona wrażliwość na histaminę po ekspozycji na IL-13 jest związana właśnie z tym efektem receptorowym. Obserwowano także zwiększoną mobilizację jonów wapnia oraz ich wzmożony napływ do komórki. Potencjalny wpływ tych zmian na nadreaktywność mięśniówki gładkiej oskrzeli jest jeszcze wyraźniejszy w warunkach in vivo gdzie przepływ powietrza zależy od oporu w drogach oddechowych zgodnie z prawem Poiseuille'a i jest odwrotnie proporcjonalny do czwartej potęgi ich promienia (111).

Wskazuje się także na obecność polimorfizmu genu dla IL-13 (zarówno promotora jak i regionu kodującego). Wariant IL-13+1923 C/T jest wiązany z większym ryzykiem rozwoju astmy (109).

2.8 Interleukina 33

2.8.1 Budowa, mechanizm działania i biologiczna rola IL-33

IL-33 pierwszy raz została opisana w 1999 roku jako białko o nadmiernej ekspresji w tętnicach mózgu o zwiększonej kurczliwości u psów z krwawieniem podpajęczynówkowym. Następnie, w 2003 roku została scharakteryzowana na poziomie molekularnym. W 2005 roku zakwalifikowano ją do superrodziny IL-1. Nazwa została nadana tak, aby podkreślić, że nie jest ona jedynie funkcjonalną kopią IL-1 α i IL-1 β (112).

Budowa IL-33 jest w dużym stopniu homologiczna z innymi członkami tej rodziny. Podobnie jak IL-1 przyjmuje formę β -harmonijki. Składa się z 12 nici β formujących 3 pseudopowtarzające się jednostki - każda po 4 nici β z czego ostatnia i pierwsza nić układają się antyrównolegle, a druga i trzecia nić tworzą strukturę „spinki do włosów”. Dwie krótkie helisy (α 1 i α 2) w IL-33 poprzedzające nić β 8 i β 12 są zlokalizowane w

analogicznych miejscach co helisy w IL-1 β i IL-18. Porównanie modelu IL-33 o najniższej energii z IL-1 ujawniło, że jądro β -harmonijki jest rejonem konserwatywnym, różni się natomiast pętle. Szczególnie łącznik pomiędzy nicią β 1 i β 2 znajdujący się w strukturze IL-33 posiada 10-aminokwasową elastyczną pętlę, także pętle pomiędzy β 3- β 4 oraz β 11- β 12 i C-końcowy ogon są rejonem dynamicznym (113). Gen kodujący omawianą cytokinę jest zlokalizowany na ramieniu p chromosomu 9, zawiera ponad 42 kilobazy w tym osiem egzonów (zarówno u ludzi jak i u myszy). Ekson pierwszy i drugi dzieli intron 1 składający się z około 26 kb. Większość polimorfizmów jednokleotydotowych związanych z astmą lokalizuje się w rejonie promotora oraz intronu 1 (82).

IL-33 jest ligandem o wysokim powinowactwie receptora ST2 (tumorigenicity 2 receptor). W komórkach ludzkich są trzy izoformy ST2. Przekazywanie sygnału poprzez IL-33 odbywa się z udziałem formy ST2L, która posiada domenę związaną z błoną (transbłonową), część zewnątrzkomórkowa składająca się z trzech połączonych ze sobą modułów podobnych do przeciwciał oraz domenę cytozolową. Rozpuszczalna izoforma sST2 zawierająca jedynie część zewnątrzkomórkową posiadającą unikalną 9-aminokwasową sekwencję C-końcową działa jako „receptor-wabik” nie przekazując sygnału (112). Receptory ST2 są w przeważającej części eksponowane na komórkach układu odpornościowego takich jak mastocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne, eozynofile, bazofile, komórki NK, limfocyty T (w tym Treg) (112). Zwiążenie się IL-33 z ST2L prowadzi do interakcji z IL-1RAcP - ko-receptorem dla członków rodziny IL-1 (IL1 α , IL1 β , IL-36). Kompleks IL-33/ST2/IL1RAcP rozpoczyna przekazywanie sygnału poprzez białko MyD88, kinazy IRAK1 and IRAK4 oraz TRAF6 co ostatecznie prowadzi do aktywacji kinaz MAP i czynnika transkrypcyjnego NF κ B. Ścieżki sygnałowe rozpoczynane przez IL-33 są bardzo podobne do tych aktywowanych przez IL-1 i IL-18. To różnorodną ekspresję ST2, IL-1R, i IL-18R na komórkach docelowych uważa się za wyjaśnienie odmiennych skutków biologicznych wywieranych przez te cytokiny. Także w zależności od warunków ekspresji receptora ST2 na komórkach układu odpornościowego znajduje się wytłumaczenie dla faktu, iż IL-33 może pełnić kluczową rolę zarówno w odpowiedzi typu-1 jak i 2 (82).

W warunkach prawidłowych ludzka IL-33 jest głównie wydzielana i magazynowana w jądrach komórek śródbłonka i nabłonka (112). Do jej uwalniania konieczne wydaje się uszkodzenie tkanki lub nekroza. Po takim uszkodzeniu IL-33 wydziela się z jądra jako białko o pełnej długości (full length protein - IL-33FL), które następnie jest poddane

zewnątrzkomórkowej obróbce (rozcięciu) przez proteazy produkowane przez neutrofile czy mastocyty. IL-33FL jest biologicznie aktywna, jednak rozszczepienie prowadzi do powstania formy do 30 razy bardziej aktywnej. W rozszczepianiu bierze udział sześć odrębnych proteaz serynowych m.in. katepsyna G, elastaza, proteinaza 3, chymaza, tryptaza. Za główne dojrzałe formy ludzkie uważa się IL-3395-270 i IL-33109-270. Obróbka IL-33FL może odgrywać kluczową rolę w sytuacjach kiedy jest produkowana w bardzo małych ilościach. Fakt, że różne proteazy mogą brać udział w rozcinaniu formy o pełnej długości może świadczyć o tym, że proces dojrzewania jest ważnym etapem w regulacji aktywności biologicznej IL-33. Proteazy neutrofilowe mogą być odpowiedzialne za aktywację podczas infekcji i typ 1 odpowiedzi zapalnej a proteazy komórek tłuszczowych za typ 2 alergiczny. Przy użyciu modelu mysiego ostrego uszkodzenia płuc z gromadzeniem się neutrofilii w ścianie pęcherzyków wykazano, że IL-33 uwalnia się 2 godziny po zaistnieniu uszkodzenia. Infekcje wirusowe także mogą doprowadzić do uszkodzenia nabłonka płuc - zakażenie wirusem grypy, rinowirusem, RSV także wywoływało uwolnienie IL-33 (82).

IL-33 może także działać jako wewnątrzkomórkowa cząsteczka przekaźnikowa niezależna od receptora ST2. IL-33FL, która nie przeszła procesu rozcinania przez proteazy, w przeciwieństwie do form dojrzałych, jest w stanie wędrować do wnętrza jądra komórkowego i wiązać się z heterochromatyną. Uważa się, że w komórkach śródbłonka IL-33 pełni funkcję represora transkrypcji i jest wskaźnikiem uśpienia komórek, wkroczenia przez nie w fazę G1/G0 z jednoczesnym zanikiem ekspresji Ki-67 - markera proliferacji komórkowej. Wpływ na transkrypcję obserwowany jest także w innych typach komórek: keratynocytach skóry, mastocytach szpiku komórkowego, fibroblastach błony maziowej (114).

Ciekawą cechą IL-33, o której wspomniano już w powyższej, jest możliwość indukowania zarówno odpowiedzi zapalnej typu Th2 (co uważa się za częstsze) jak i Th1. IL-33 bierze udział w ukierunkowywaniu niedojrzałych limfocytów T w kierunku fenotypu Th2 i stymuluje je do produkcji IL-4, IL-5 i IL-13. Jest także selektywnym chemoatraktantem dla komórek Th2 (115). IL-33 aktywuje limfocyty B1 i pobudza je do syntezy przeciwciał IgM, IL-5 i IL-13 (116). Cytokina ta wywołuje produkcję IL-8 i anionu nadtlenkowego przez eozynofile, a także degranulację eozynofili. Badania pokazały, że IL-33 aktywuje mastocyty oraz bazofile powodując ich dojrzewanie, degranulację i syntezę wielu czynników prozapalnych takich jak IL-1 β , IL-4. Działa także na komórki dendrytyczne biorąc

udział w ich dojrzewaniu (117,118). Opisano także ekspresję receptora ST2 na komórkach NK i NKT oraz zwiększoną produkcję IFN- γ pod wpływem IL-33 co sugeruje jej udział w odpowiedzi zapalnej typu Th1. Odkryto szeroką obecność ST2 na komórkach cytotoksycznych typu I (type I cytotoxic -Tc1), którego ekspresja zależy głównie od głównego czynnika transkrypcyjnego komórek Th1 i Tc1. IL-13 współdziała w przekazywaniu sygnału z TCR i IL-12 prowadząc do produkcji IFN- γ przez komórki Tc1 oraz realizowania swoich funkcji przez komórki T CD81 (119).

Oś IL-33/ST2 jest zaangażowana w liczne procesy biologiczne tj. rozwój i regulację odpowiedzi immunologicznej oraz zachowanie homeostazy tkankowej poprzez udział w procesach gojenia i naprawy. Co za tym idzie jest opisywana jako element patogenezы wielu chorób dotyczących m.in. układu oddechowego, trawiennego, moczowopłciowego, sercowo-naczyniowego (112).

2.8.2 Rola IL-33 w atopii i astmie

IL-33 jest ważną cytokiną związaną z patogenezą astmy. Udowodniono korelację pomiędzy poziomem IL-33 w surowicy i w indukowanej płwocinie. Podwyższone (w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej) poziomy IL-33 obserwowano w BAL oraz w komórkach nabłonka i mięśniówki gładkiej dróg oddechowych pacjentów z astmą umiarkowaną i ciężką. Uważa się, że pod wpływem czynnika infekcyjnego lub środowiskowego (np. alergenu) IL-33, jako „alarmina”, jest produkowana przez nabłonek dróg oddechowych i jest czynnikiem mogącym prowadzić do rozwoju astmy. Omawiana cytokina może także dawać sygnał zwrotny będąc wydzielaną przez komórki już dotknięte procesem zapalnym (120). IL-33 może być także mediatorem spowodowanych przez infekcje wirusowe np. grypę zaostrzeń astmy. W takich sytuacjach za główne źródło IL-33 uważa się komórki rzęskowe i komórki pęcherzykowe typu II. Nasila ona nadreaktywność oraz stan zapalny dróg oddechowych poprzez hamowanie wrodzonej i nabytej odporności przeciwwirusowej, hamowanie reakcji cytotoksycznej, a także przez wpływ na komórki dendrytyczne i komórki nabłonkowe (121). W badaniach na modelu mysim także potwierdzono, że endogenna IL-33 i szlak IL-33/ST2 biorą udział w patogenezie astmy. Do eksperymentu włączono 3 grupy zwierząt: niemodyfikowane niesynteżujące IL-33 i pozbawione receptorów ST2. Podawano im IL-33 lub albuminę jaja kurzego (ovalbumin - OVA). U myszy niemodyfikowanych IL-33 i

OVA powodowały podobną nadreaktywność oraz eozynofilowe zapalenie dróg oddechowych. U tych niesyntezyjących IL-33 procesy te były znacząco mniej nasilone, a u pozbawionych receptora ST2 całkowicie zmniejszone (122). Inna obserwacja, także na modelu mysim, pozwoliła wyciągnąć wniosek, że narażenie na wysokie stężenia tlenu w okresie noworodkowym zwiększa produkcję IL-33 w płucach prowadząc do rozwoju charakterystycznych dla pacjentów z astmą mechanizmów takich jak nadreaktywność oskrzeli, nadprodukcja śluzu, zapalenie typu drugiego. Hyperoksja noworodkowa wyraźnie nasila odpowiedź na alergeny powietrzno pochodne m.in. roztozce kurzu domowego. Podwyższone stężenia IL-33, korelujące także z podwyższonym stężeniem IL-5 i IL-13 w surowicy, obserwowano w płucach przedwcześnie urodzonych zwierząt narażonych na stres oksydacyjny (123).

IL-33 może w sposób bezpośredni indukować różnicowanie eozynofilii z prekursorów w szpiku kostnym, stymulować je do zwiększonej produkcji cytokin i chemokin prozapalnych i wpływać na polaryzację makrofagów M2. Co za tym idzie cytokina ta może in vivo zaostrzać eozynofilowe zapalenie dróg oddechowych. Różnicowanie eozynofilii w szpiku kostnym odbywa się na drodze zależnej od IL-5 i niezależnej od IL-13 (124). IL-33 wzmacnia odpowiedź alergiczną mastocytów dróg oddechowych potęgując ich odpowiedź na antygeny. Działając synergistycznie z histaminą aktywuje mastocyty co można udowodnić poprzez zmierzenie uwalnianego przez nie wapnia i zawartych w ziarnistościach mediatorów takich jak β -heksoaminidaza. Wapń jest ważnym przekaźnikiem drugorzędowym i jego uwolnienie z retikulum endoplazmatycznego aktywuje liczne szlaki na przykład produkcję cytokin prozapalnych. Ponadto IL-33 zwiększa fosforylację cząsteczek sygnałowych - ERK, Akt i NF κ B w aktywowanych mastocytach (125).

Badanie asocjacyjne całego genomu (genome-wide association study - GWAS) wykazało istnienie wielu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (single nucleotide polymorphisms -SNPs) w genie IL-33, które biorą udział w podatności na astmę. Ponadto pacjenci z astmą będący nosicielami konkretnych SNPs prezentują oporność na leczenie glikokortykosteroidami (126). Pośród wszystkich zgłoszonych SNPs genu IL-33 związanych z astmą najszerzej, do tej pory, badanie były rs1342326 i rs3939286. W grupie pacjentów irańskich potwierdzono, że nosicielstwo jednego z powyższych wariantów sprzyja rozwojowi astmy. rs1342326 jest związany z astmą atopową, łagodną oraz o późnym początku oraz wyższym poziomem eozynofilii we krwi obwodowej, natomiast rs3939286 występuje częściej u osób z astmą umiarkowaną do ciężkiej,

nieatopową i rozpoczynającą się w dzieciństwie (127). Badając dzieci hospitalizowane z powodu zapalenia oskrzeli i następnie obserwowane do ukończenia 11-13 lat także zaobserwowano wstępne dowody, że wariant rs1342326 koreluje z ciężką astmą dziecięcą (128). Związek z tą chorobą ma nie tylko polimorfizm genu IL-33, ale także innych ważnych elementów szlaku IL-33-IL1RL1 takich jak białko dodatkowe receptora IL-1 czy TRAF6 (jeden z przekaźników sygnału prowadzący do aktywacji kinaz). Spekuluje się, że polimorfizm szlaku IL-33-IL1RL1 wpływa na rozwój świsłów wydechowych i następnie rozwój astmy (129).

W odpowiedzi na produkowaną przez nabłonek dróg oddechowych IL-33, IL-25 i TSLP naturalne komórki limfoidalne typu 2 produkują duże ilości cytokin typu 2: IL-4, IL-5 i IL-13. Zauważono, że aktywacja ILC2 przez IL-33 jest często oporna na leki glikokortykosteroidowe, co za tym idzie oś IL-33-ILC2-IL-5-eozynofile może być związana z kliniczną manifestacją astmy steroidoopornej (130).

Badanie przeprowadzone na grupie osób z ciężką astmą wykazało, że w surowicy stężenie IL-33 koreluje ze stężeniem przeciwciał IgE specyficznych dla roztoczy kurzu domowego. Pacjenci leczeni omalizumabem (przeciwciałem monoklonalnym anti-IgE) mieli znacząco niższe stężenie zarówno sIgE jak i IL-33, które korelowało także z ilością interwencji ratunkowych oraz długością hospitalizacji (131).

Przy użyciu modelu mysiego pokazano, że podwyższone stężenie IL-33 utrzymuje tkankę płucną w stanie nieustannego stanu zapalnego oraz postępującego remodelingu. Zablokowanie IL-33 za pomocą przeciwciał neutralizujących REGN3500 powodowało, w tym modelu, normalizację kluczowych mediatorów zapalnych zapobiegając progresji do ciężkiego zapalenia oraz cofało już istniejące cechy przebudowy tkankowej takie jak metaplazja komórek kubkowych czy zwiększona aktywność miofibroblastów mięszu płuca. Blokada IL-33 redukowała wyzwolone przez alergeny roztoczy kurzu domowego nacieki eozynofilii, komórek T ST2+ CD4+ i cytokin typu 2 oraz zmniejszała liczbę neutrofilii i prozapalnych cytokin takich jak IL-6, IL-1 β and TNF α w płucach. Końcowym punktem było zatrzymanie postępującej dysfunkcji płuc (132).

W badaniach prowadzonych na Łódzkim Uniwersytecie Medycznym wykazano dodatnią korelację pomiędzy domową ekspozycją na kota we wczesnym dzieciństwie i poziomem IL-33 w wieku przedszkolnym i szkolnym. Osoby z wykazaną w testach skórnych atopią na kota i inne wziewne alergeny miały wyższe stężenia IL-33 w surowicy (133).

IL-33 jest zaangażowana w patogenezę atopowego zapalenia skóry poprzez wiele mechanizmów. Skutecznie indukuje ona szybką ekspansję naturalnych komórek limfoidalnych, które produkują duże ilości cytokin takich jak IL-5, IL-13 powodujących akumulację eozynofili w zmianach skórnych. IL-33 zmniejsza ilość białek barierowych - filagryny i kładyny 1 spajających włókna keratynowe. Bierze także udział w powstawaniu świądu na drodze niezależnej od histaminy. Leukocyty, takie jak komórki Th2, stymulowane przez IL-33 syntezują IL-31, która indukuje świąd poprzez bezpośrednie działanie na neurony czuciowe. Opisywana cytokina pobudza produkcję histaminy bez udziału alergenu. Ponadto keratynocyty skóry uszkodzonej zadrapaniami uwalniają IL-33, co wzmacnia istniejący stan zapalny (134).

3. CEL PRACY

Astma oskrzelowa jest obecnie najczęstszą chorobą przewlekłą u dzieci i dorosłych poniżej 40 r.ż. stanowiąc istotny problem kliniczny. Często rozwija się na podłożu atopowym. W piśmiennictwie istnieją liczne doniesienia o podwyższonych stężeniach IL-13 i IL-33 w surowicy pacjentów z astmą i/lub atopią. Na szeroką skalę poszukuje się także związku tych cytokin z rozwojem innych chorób. Znaleziono pojedyncze doniesienia sugerujące istnienie zależności pomiędzy zamieszkiwaniem w gospodarstwie rolnym, ekspozycją na zwierzęta hodowlane a produkcją IL-13, jednak wnioski nie są jednoznaczne, a autorzy podkreślają konieczność dalszych badań (135,136). W dostępnym piśmiennictwie brak jest podobnych prac dotyczących IL-33. Brak też pracy kompleksowej, analizującej wiele aspektów życia na wsi (w gospodarstwie), a stężeniem powyższych cytokin, astmą i atopią, opartej na badaniu epidemiologicznym.

Celem pracy była ocena wybranych parametrów immunologicznych u dzieci i dorosłych z atopią i astmą oskrzelową zamieszkujących wieś lub miasto i co za tym idzie eksponowanych na różne czynniki środowiskowe.

Szczegółowe cele pracy:

- 1) Ocena i porównanie stężenia IgE całkowitej, IL-13 i IL-33 u dzieci i dorosłych z atopią, chorujących na astmę oskrzelową oraz w grupie zdrowych mieszkańców wsi i miasta.
- 2) Określenie czy poziom wybranych parametrów różni się w poszczególnych grupach: osoby z atopią, astmatycy z atopią, astmatycy bez atopii, zdrowi.
- 3) Próba odnalezienia związku pomiędzy wybranymi parametrami immunologicznymi a zróżnicowaną ekspozycją na czynniki typowe dla środowiska wiejskiego obecnie i we wczesnym dzieciństwie w badanej populacji
- 4) Rozważenie czy odkryte zależności mogą mieć wpływ na zapobieganie rozwojowi astmy oskrzelowej.

4. PACJENCI I METODY

4.1 Pacjenci

Do badania włączono grupę 174 osób (100 kobiet i 74 mężczyzn) w wieku od 9 do 75 lat (średnia $M=44,3$ lat; odchylenie standardowe $SD=19,1$ lat). Surowice od pacjentów zostały pozyskane w 2012 roku w ramach projektu badawczego pt. *Zmiany w środowisku wiejskim i ich wpływ na częstość występowania chorób alergicznych na obszarach wiejskich w Polsce*. Przebadano wtedy 1730 mieszkańców miasta Sobótka oraz 7 okolicznych wsi w wieku powyżej 5 lat uzyskując dane kwestionariuszowe i wyniki testów skórnych. Od każdego pobrano także próbkę krwi, porcje surowicy zamrożono. Do rozpoznania astmy i ANN użyto wystandaryzowanych pytań z kwestionariusza ISAAC i ECRHS. Astmę rozpoznawano u osób, które twierdząco odpowiedziały na jedno z pytań:

„Czy u Pana/Pani, (Pani dziecka) kiedykolwiek w przeszłości występował świszczący lub gwizdzący oddech w klatce piersiowej?”,

„Czy kiedykolwiek lekarz mówił Panu/Pani (o Pani dziecku), że ma Pan/Pani (Pani dziecko) astmę oskrzelową?”

„Czy u Pana/Pani, (Pani dziecka) występował świszczący lub gwizdzący oddech w klatce piersiowej w ciągu ostatnich 12 miesięcy?” (68,137-138) Natomiast atopię rozpoznawano u pacjentów z dodatnim wynikiem testów skórnych na co najmniej 1 z 4 badanych alergenów (roztocze kurzu domowego, sierść kota, mieszanina pyłków traw, mieszanina pyłków drzew). Jako kryterium dodatniego testu skórniego przyjęto odczyn w postaci bąbla pokrzywkowego o średnicy większej od 3 mm. Wykwalifikowane pielęgniarki asystowały przy wypełnianiu formularza, w przypadku dzieci poniżej 15 roku życia odpowiedzi udzielały matki.

Przed włączeniem pacjenta do badania w roku 2012 wyrażał on pisemną zgodę na udział w badaniu, a podpisywany formularz zgody zawierał informację, że pozyskana surowica będzie badana na obecność wskaźników mających związek z rozwojem alergii oraz może także zostać użyta w przyszłości do dalszych badań

Do opisywanego badania ze wszystkich uczestniczących w pierwotnym badaniu 1730 osób wybrano losowo grupę 58 astmatyków (wśród nich znajdują się 22 osoby z astmą atopową i 36 osób z astmą nieatopową), 58 pacjentów z atopią oraz 58 osobową grupę kontrolną. Grupy są podobne pod względem struktury płci i wieku. Astmatyków tworzą

33 kobiety i 25 mężczyzn ze średnią wieku 46 lat i medianą 48 lat, atopików 33 kobiety i 25 mężczyzn ze średnią wieku 41 lat i medianą 37 lat, grupę kontrolną 34 kobiety i 24 mężczyzn ze średnią wieku 46 lat i medianą 48,5 lat. Wszystkie trzy grupy osób są jednorodne nie tylko pod względem cech socjalno-demograficznych ale także miejsca zamieszkania (wieś –miasto), oraz częstości kontaktów ze zwierzętami gospodarczymi w chwili badania ($p > 0,05$). W grupie astmatyków taki kontakt dotyczy 14 osób (24,1%), atopików 15 osób (25,9%) i w grupie kontrolnej 18 osób (31%). Regularny kontakt z bydłem miało jedynie 0,6% wszystkich badanych, z trzodą chlewną 4,6%, z drobiem 17,8%, z owcami 1,7% a z końmi 0,6% badanych. Podstawowe statystyki cech charakteryzujących badane osoby zamieszczono w tabeli 1.

W pierwszym roku życia ponad połowa (51,7%) całej badanej populacji osób mieszkała w gospodarstwie rolnym. Kontakt ze zwierzętami hodowanymi w grupie astmatyków miało 40 osób (69%), atopików 36 osób (62,1%) i 45 osób (77,6%) w grupie kontrolnej. Biorąc pod uwagę wszystkich badanych kontakt z bydłem miało 48,3% respondentów, a z trzodą chlewną 52,9%. Różnice w częstości między trzema grupami były statystycznie nieistotne ($p > 0,05$). Kontakt z drobiem w pierwszym roku życia miało 55,8% badanych, istotnie częściej osoby z grupy kontrolnej niż osoby z atopią (67,2% vs 43,1%; $p = 0,009$). Kontakt z owcami w pierwszym roku życia miało 20,1% badanych, częściej osoby z astmą niż osoby z atopią (29,3% vs 10,3%; $p = 0,010$). Natomiast kontakt z końmi w pierwszym roku życia miało 29,3% badanych, częściej osoby z grupy kontrolnej od osób z atopią (41,4% vs 20,7%; $p = 0,016$). Charakterystykę populacji w 1 roku życia zamieszczono w tabeli 2.

Tabela 1. Ogólna charakterystyka badanych osób

Cecha (zmienna)	Wszyscy				ANOVA p
	Grupa 1 (Astma)	Grupa 2 (Atopia)	Grupa 3 (Kontrolna)		
Płeć, n (%)					0,977
Kobiety	100 (57,5)	33 (56,9)	33 (56,9)	34 (58,6)	
Mężczyźni	74 (42,5)	25 (43,1)	25 (43,1)	24 (41,4)	

Wiek (rok życia):					0,233
<i>M ± SD</i>	44,3 ±19,1	45,9 ±19,5	40,8 ±18,3	46,1 ±19,2	
<i>Me [Q1; Q3]</i>	45 [30; 62]	48 [31; 64]	37 [27; 56]	49 [30; 64]	
<i>Min - Max</i>	9 - 75	10 - 74	9 - 74	10 - 75	
Miejsce zamieszkania:					0,977
Wieś	101 (58,0)	33 (56,9)	34 (58,6)	34 (58,6)	
Miasto	73 (42,0)	25 (43,1)	24 (41,4)	24 (41,4)	
Mieszka w gospodarstwie rolnym:					0,587
Tak	50 (28,7)	14 (24,1)	17 (29,3)	19 (32,8)	
Nie	124 (71,3)	44 (75,9)	41 (70,7)	39 (67,2)	
Ma kontakt z bydłem:					0,404
Regularnie	1 (0,6)	0 (0,0)	1 (1,7)	0 (0,0)	
Czasami	3 (1,7)	2 (3,5)	0 (0,0)	1 (1,7)	
Wcale	170 (97,7)	56 (96,5)	57 (98,3)	57 (98,3)	
Ma kontakt z trzodą chlewną:					0,909
Regularnie	8 (4,6)	3 (5,2)	3 (5,2)	2 (3,5)	
Czasami	9 (5,2)	4 (6,9)	3 (5,2)	2 (3,5)	
Wcale	157 (90,2)	51 (87,9)	52 (89,7)	54 (93,0)	

Ma kontakt z drobiem:					0,472
Regularnie	31 (17,8)	7 (12,1)	12 (20,7)	12 (20,7)	
Czasami	8 (4,6)	4 (6,9)	3 (5,2)	1 (1,7)	
Wcale	135 (77,6)	47 (81,0)	43 (74,1)	45 (77,6)	
Ma kontakt z owcami:					0,404
Regularnie	3 (1,7)	1 (1,7)	2 (3,5)	0 (0,0)	
Czasami	1 (0,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,7)	
Wcale	170 (97,7)	57 (98,3)	56 (96,5)	57 (98,3)	
Ma kontakt z końmi:					0,734
Regularnie	1 (0,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,7)	
Czasami	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Wcale	173 (99,4)	58 (100)	58 (100)	57 (98,3)	
Doi krowy:					0,734
Regularnie	1 (0,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,7)	
Czasami	2 (1,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Wcale	171 (98,3)	58 (100)	58 (100)	57 (98,3)	

Czyści stajnię:					0,361
Regularnie	10 (5,7)	6 (10,3)	3 (5,2)	1 (1,7)	
Czasami	5 (2,9)	1 (1,7)	2 (3,4)	2 (3,5)	
Wcale	159 (91,4)	51 (87,9)	53 (91,4)	55 (94,8)	
Zbiera jajka:					0,398
Regularnie	20 (11,5)	5 (8,6)	5 (8,6)	10 (17,2)	
Czasami	12 (6,9)	5 (8,6)	5 (8,6)	2 (3,5)	
Wcale	142 (81,6)	48 (82,8)	48 (82,8)	46 (79,3)	
Ma kontakt ze zwierzętami gospodarczymi:					
Tak	47 (27)	14 (24,1)	15 (25,9)	18 (31)	
Nie	127 (73)	44 (75,9)	43 (74,1)	40 (69)	

Tabela 2. Charakterystyka badanych osób w pierwszym roku życia

W pierwszym roku życia	Wszyscy	Grupa 1 (Asthma)	Grupa 2 (Atopia)	Grupa 3 (Kontrolna)	ANOVA <i>p</i>
Mieszkał(a) w gospodarstwie rolnym, <i>n</i> (%)					0,051
Tak	90 (51,7)	29 (50,0)	24 (41,4)	37 (63,8)	
Nie	84 (48,3)	29 (50,0)	34 (58,6)	21 (36,2)	

Miał(a) kontakt z bydłem, <i>n</i> (%)					0,155
Tak	84 (48,3)	31 (53,4)	22 (37,9)	31 (53,4)	
Nie	90 (51,7)	27 (46,6)	36 (62,1)	27 (46,6)	
Miał(a) kontakt z trzodą chlewną, <i>n</i> (%)					0,076
Tak	92 (52,9)	32 (55,2)	24 (41,4)	36 (62,1)	
Nie	82 (47,1)	26 (44,8)	34 (58,6)	22 (37,9)	
Miał(a) kontakt z drobiem, <i>n</i> (%)					0,032
Tak	97 (55,7)	33 (56,9)	25 (43,1)	39 (67,2)	
Nie	77 (44,3)	25 (43,1)	33 (56,9)	19 (32,8)	
Miał(a) kontakt z owcami, <i>n</i> (%)					0,039
Tak	35 (20,1)	17 (29,3)	6 (10,3)	12 (20,7)	
Nie	139 (79,9)	41 (70,7)	52 (89,7)	46 (79,3)	
Miał(a) kontakt z końmi, <i>n</i> (%)					0,039
Tak	51 (29,3)	15 (25,9)	12 (20,7)	24 (41,4)	
Nie	123 (70,7)	43 (74,1)	46 (79,3)	34 (58,6)	

Miał(a) kontakt ze zwierzętami gospo-
darczymi, n(%):

Tak	121 (69,5)	40 (67)	36 (62,1)	45 (77,6)
Nie	53 (30,5)	18 (31)	22 (37,9)	13 (22,4)

4.2 Metody

Badanie uzyskało akceptację Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (nr: KB 105/2019/2019) i zostało sfinansowane z puli rezerwy statutowej Dziekana Wydziału Lekarskiego oraz środków własnych.

4.2.1 Kwestionariusz

Dane uzyskane w kwestionariuszach wypełnianych w 2012 roku użyto do pozyskania informacji o pacjentach. Na wstępie ogólnych, takich jak miejsce zamieszkania, wiek, płeć, osoby współzamieszkujące, następnie związanych z ewentualnym występowaniem chorób atopowych. Rozpoczynając od pytań o występowanie objawów oraz rozpoznanie astmy przez lekarza - przytoczonych powyżej - analogicznie skonstruowano kolejne pytania dotyczące ANN: „*W ciągu ostatnich 12 miesięcy czy u Pana/Pani (Pani dziecka) występowało kichanie lub wyciek z nosa lub upośledzenie drożności nosa lub swędzenie oczu w czasie kiedy nie był Pan/Pani (Pani dziecko) przeziębiony czy chorował na grypę?*” i „*Czy lekarz kiedykolwiek mówił Panu/Pani (o Pani dziecku), że ma katar sienny (pyłkowicę), katar alergiczny?*”. W przypadku AZS pytano tylko o deklarację rozpoznania przez lekarza: „*Czy lekarz kiedykolwiek mówił Panu/Pani (o Pani dziecku), że ma alergiczne zapalenie skóry, wyprysk alergiczny?*”. W kolejnej części pytano o kontakt ze zwierzętami żyjącymi w gospodarstwach. Udzielając odpowiedzi na pytanie: „*Czy Pan/Pani (Pani dziecko) ma bezpośredni kontakt ze zwierzętami w gospodarstwie?*” a także „*Czy wykonuje Pan/Pani (pani dziecko) następujące czynności?*” należało dla każdego z wymienionych („*krowy*”, „*świnie*”, „*drób*”, „*owce lub kozy*”, „*konie*” oraz „*dojenie krów*”, „*czyszczenie stajni, obory lub stodoły*”, „*zbieranie jajek*”) wybrać jedną z możliwości „*tak, regularnie*”, „*tak, ale tylko czasami*” lub „*nie, wcale*”.

Zapytano także „Czy Pan /Pani (pani dziecko) pije mleko bezpośrednio od krowy (nie-pasteryzowane)?” Takie same pytania o kontakty i zajęcia na farmie znajdowały się w sekcji dotyczącej pierwszego roku życia dziecka. W ostatniej części zbierano dane o rodzinie probanta, spędzaniu czasu wolnego czy paleniu papierosów.

4.2.2 Punktowe testy skórne

Grupa atopików została dobrana na podstawie dodatniego wyniku testów skórnych. Wykonywano je na przedramieniu. Po oczyszczeniu i zdezynfekowaniu okolicy nałożono na skórę kolejno: roztwór soli fizjologicznej jako kontrolę ujemną, roztwory fabrycznie przygotowanych alergenów: roztoczy kurzu domowego, mieszaniny traw, mieszaniny drzew i kota oraz histaminę jako kontrolę dodatnią (wyciągi alergenowe firmy ALK). Następnie przy użyciu jednorazowych lancetów (osobnych dla każdego nakłucia) nacięto skórę w obrębie każdej z kropli. Wyniki odczytywano po 20 minutach obserwując powstanie bąbla. Jak wcześniej wspomniano jako kryterium dodatniego testu skórniego przyjęto odczyn w postaci bąbla pokrzywkowego o średnicy większej niż 3 mm.

4.2.3 Pomiary laboratoryjne

Surowice zamrożone w 2012 roku przechowywane były w monitorowanej temperaturze -20 st.C w Laboratorium Naukowym Kliniki Pediatrii, Alergologii i Kardiologii. 174 próbki rozmrożono a następnie wykonano w nich oznaczenia metodą immunoenzymatyczną:

- stężenia IgE całkowitej przy użyciu zestawów Elabscience Human IgE (Immunoglobulin E) ELISA Kit
- stężenia IL-13 przy użyciu zestawów LEGEND MAX™ Human IL-13 ELISA Kit with Pre-coated Plates
- stężenia IL-33 przy użyciu zestawów LEGEND MAX™ Human IL-33 ELISA Kit with Pre-coated Plates

Badania zostały wykonane według procedur producentów.

4.2.3.1 Oznaczenie stężenia IgE

W ramach zestawu do ilościowego oznaczania IgE przygotowano bufor przemywający, roboczy roztwór koniugatu oraz standardowy roztwór roboczy o stężeniu 50ng/mL wraz z 6 kolejnymi dwukrotnie wzrastającymi jego rozcieńczeniami. W studzienkach umieszczono kolejno wszystkie rozcieńczenia, próbę kontrolną oraz badane próbki w ilości 50μL. Natychmiast dodano do nich po 50μL roztworu roboczego biotynowanych przeciwciał wykrywających, przykryto płytkę i inkubowano przez 90 minut w temperaturze 37°C. Wypłukano przy użyciu roztworu przemywającego. Do każdej ze studzienek dodano 100μL roztworu roboczego koniugatu HRP, uszczelniono, inkubowano 30 minut w 37°C. Przepłukano. Dodano po 90μL substratu ponownie przykryto i inkubowano w ciemności 20 minut w 37°C po czym w każdej ze studzienek umieszczono 50μL roztworu zatrzymującego. Od razu odczytano gęstość optyczną przy 450nm. Wykreślono krzywą logarytmiczną, w której na osi y umieszczono stężenia standardowe na osi x gęstość optyczną, korzystano z niej przy określaniu stężenia IgE w badanych próbkach.

4.2.3.2 Oznaczenie stężenia IL-13

Celem oznaczenia stężenia IL-13 po przygotowaniu reagentów oraz próbek i doprowadzeniu ich do temperatury pokojowej przystąpiono do właściwej procedury. Przygotowano 7-probówkową serię dwukrotnie wzrastających rozcieńczeń roztworu podstawowego używając buforu testowego A jako rozpuszczalnika. Czterokrotnie wypłukano płytkę ze studzienkami używając buforu przemywającego, na każdą studzienkę nałożono 50μL buforu testowego A oraz po 50μL rozcieńczeń standardowych lub próbek. Uszczelniono płytkę i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej na wirówce z 200 obrotami/minutę. Po tym czasie usunięto zawartość płytki i przepłukano. Do każdej studzienki nałożono 100μL roztworu przeciwciał do detekcji ludzkiej IL-13 i po raz drugi wstrząsając inkubowano w temperaturze pokojowej przez godzinę. Wypłukano. Następnie na każdą ze studzienek dodano 100μL roztworu Awidyny-HRP B, ponownie uszczelniono i wstrząsając inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej. Wylano zawartość i po raz ostatni dokładnie przepłukano. Na wszystkie studzienki nałożono 100μL roztworu substratu F i inkubowano w ciemności przez 15 minut. Po tym kroku zaobserwowano, że część roztworów przybrała mniej lub bardziej intensywny

niebieski odcień. Kolejno zatrzymano reakcję dodając po 100 μ L roztworu zatrzymującego. Widoczna była zmiana koloru z niebieskiego na żółty. W ciągu 30 minut odczytano absorbancję przy 450nm. Wykreślono krzywą logarytmiczną, w której na osi y zaznaczono stężenie IL-13 a na osi x absorbancję.

4.2.3.3 Oznaczenie stężenia IL-33

Oznaczając stężenie IL-33 przygotowano 7-probówkową serię dwukrotnie wzrastających rozcieńczeń roztworu podstawowego używając buforu testowego B jako rozpuszczalnika. Kilukrotnie wypłukano płytkę ze studzienkami używając buforu przemywającego, na każdą studzienkę nałożono 50 μ L buforu testowego A oraz po 50 μ L rozcieńczeń standardowych lub próbek. Uszczelniono płytkę i inkubowano w temperaturze 4°C. przez 18 godzin. Po tym czasie usunięto zawartość płytki i przepłukano. Do każdej studzienki nałożono 100 μ L roztworu przeciwciał do detekcji ludzkiej IL-33 i po raz drugi wstrząsając inkubowano w temperaturze pokojowej przez godzinę. Wypłukano i kolejno na każdą ze studzienek dodano 100 μ L roztworu Awidyny-HRP B, ponownie uszczelniono i wstrząsając inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej. Wylano zawartość i po raz ostatni dokładnie przepłukano. Na wszystkie studzienki nałożono 100 μ L roztworu substratu F i inkubowano w ciemności przez 30 minut. Po tym kroku zaobserwowano, że część roztworów przybrała mniej lub bardziej intensywny niebieski odcień. Następnie zatrzymano reakcję dodając po 100 μ L roztworu zatrzymującego. Widoczna była zmiana koloru z niebieskiego na żółty. W ciągu 30 minut odczytano absorbancję przy 450nm. Wykreślono krzywą logarytmiczną, w której na osi y zaznaczono stężenie IL-33 a na osi x absorbancję.

Wyniki oznaczeń IgE przedstawiano w nanogramach na mililitr (ng/ml), a IL-13 i IL-33 w pikogramach na mililitr (pg/ml).

4.2.4 Metody statystyczne

Wyniki badań ankietowych i klinicznych poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Statistica v.13 (TIBCO Software Inc.) oraz arkusza kalkulacyjnego EXCEL (MicroSoft). Dla wszystkich cech ilościowych (stężeń przeciwciał) sprawdzono zgodność ich rozkładu z rozkładem normalnym. Ocenę zgodności przeprowadzono, w zależności od liczności próby, testem Kołmogorowa-

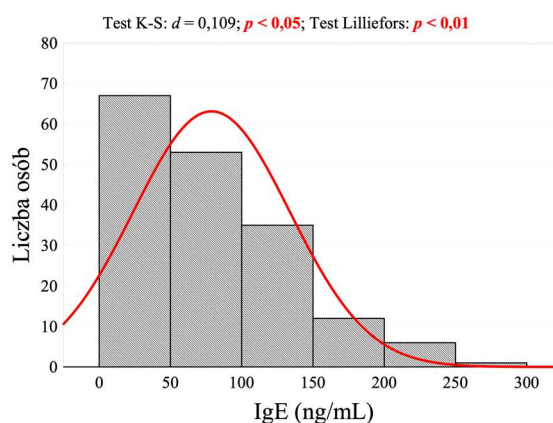
Smirnowa z poprawką Lillieforsa lub testem Shapiro-Wilka. Zmienne jakościowe mierzone na skalach nominalnych (np. *pleć*, *miejsce zamieszkania*) i porządkowych (*częstość kontaktów ze zwierzętami*) przedstawiono w tabelach wielodzielczych (kontyngencji) w postaci liczebności (n) i wskaźnika struktury (%), a do oceny siły związku między dwiema zmiennymi wykorzystano test niezależności chikwadrat Pearsona. W przypadkach, gdy liczebność oczekiwana przynajmniej w jednej komórce czteropolowej tablicy kontyngencji była mniejsza od 5, użyto dokładnego testu Fishera. Dla wszystkich cech ilościowych obliczono wartości średnie (M), odchylenia standardowe (SD), mediany (Me), kwartyle dolny (Q_1) i górny (Q_3) oraz zakres zmienności (Min) i (Max). Istotność różnic wartości średnich w dwóch grupach niezależnych dla zmiennych (cech) o rozkładzie normalnym i o jednorodnych wariancjach, sprawdzono testem t Studenta. Jednorodność wariancji sprawdzono testem Browna-Forsythe'a i testem Levene'a. Istotność różnic wartości średnich w dwóch grupach dla cech o rozkładzie istotnie odbiegającym od normalnego lub o niejednorodnych wariancjach, sprawdzono testem nieparametrycznym U Manna-Whitneya. Do porównania średnich kilku grup posłużono się jednoczynnikową analizą wariancji (ANOVA). Wcześniej sprawdzono, czy badana cecha w każdej z badanych grup miała rozkład normalny i jednakowe wariancje. Jeśli prawdopodobieństwo odpowiadające wartości statystyki F Snedecora było mniejsze od przyjętego poziomu istotności ($p < \alpha$), wówczas celem określenia, średnia której grupy w istotny sposób różni się od pozostałych, przeprowadzono testy porównań wielokrotnych (*post hoc*). Wykorzystano test Tukeya. Jeśli nie były spełnione podstawowe założenia jednoczynnikowej jednozmiennowej analizy wariancji (założenie o normalności rozkładu badanej cechy w każdej grupie i o jednorodności wariancji) do porównań wykorzystano test Kruskala-Wallis'a. Do oceny siły zależności monotonicznej (rosnącej lub malejącej, niekoniecznie liniowej) między dwiema cechami (mierzonymi co najmniej na skali porządkowej ale o rozkładzie różnym od normalnego) wykorzystano współczynnik korelacji rang ρ Spearmana. Do oceny wpływu poszczególnych predyktorów (zmiennych niezależnych) na zmienną zależną (opisywaną) wykorzystano regresję liniową. W modelach regresji wielokrotnej współczynniki regresji b_i poddano standaryzacji, tak aby ich wartości były niezależne od zakresu, w jakim zmienia się zmienna losowa związana z tym współczynnikiem. Do opisu zależności między wartościami zmiennych objaśniających (czynnikami ryzyka) a prawdopodobieństwem wystąpienia badanego zdarzenia wykorzystano regresję

logistyczną. Wartości współczynników regresji logistycznej oszacowano metodą największej wiarygodności wykorzystując metodę eliminacji wstecznej. Dla każdej zmiennej jakościowej podano iloraz szans (*odds ratio*) dla poszczególnych kategorii tej zmiennej w odniesieniu do kategorii zadeklarowanej jako kategoria odniesienia (referencyjna). Ponadto oszacowano wartości 95% przedziału ufności dla ilorazu szans. We wszystkich wykorzystanych testach statystycznych przyjęto poziom istotności $\alpha = 0,05$. Wynik testu uznano za istotny gdy prawdopodobieństwo testowe wynosiło $p < 0,05$. Wyniki analiz statystycznych przedstawiono w formie graficznej bądź tabelarycznej.

5. WYNIKI

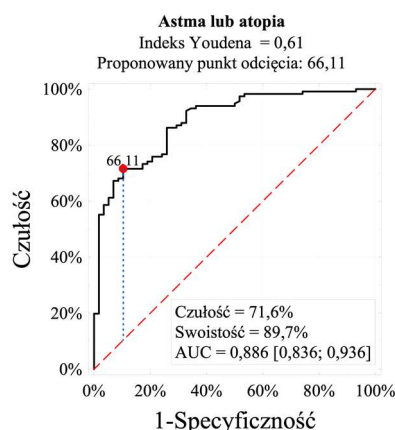
5.1 Stężenie IgE u astmatyków, atopików i w grupie kontrolnej

W badanej grupie 174 osób rozkład poziomu IgE w surowicy krwi odbiegał istotnie od rozkładu normalnego (ryc. 5.1) dlatego w dalszej analizie statystycznej posługiwano się statystykami pozycyjnymi: medianą (Me) i rozstępem kwartylowym ($Q1;Q3$) a do porównań korzystano z testów nieparametrycznych.

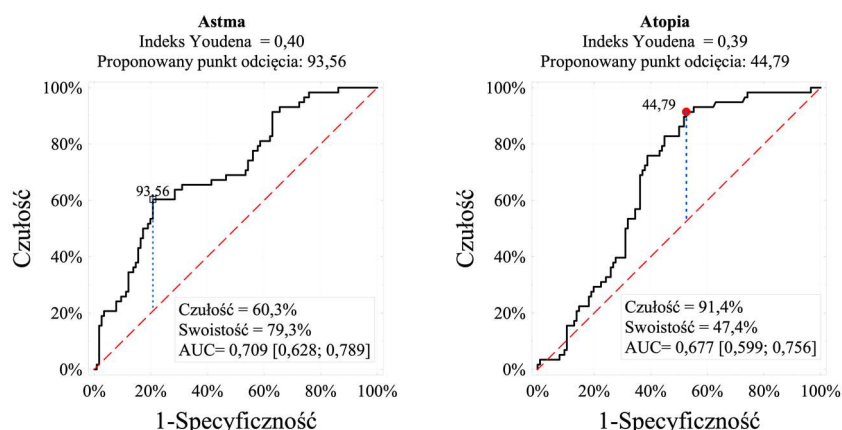


Ryc. 5.1 Histogram wyników pomiaru stężenia IgE w surowicy krwi badanych osób na tle rozkładu normalnego i wyniki testów normalności (Kolmogorowa-Smirnowa i Lillieforsa)

Do oszacowania wartości odcinającej stężenia IgE rozgraniczającej osoby zdrowe od osób z astmą lub atopią wykorzystano krzywą ROC i wskaźnik Youdena (ryc. 5.2, 5.3). Dla stężenia IgE $\geq 66,11$ ng/mL czułość testu wynosi 71,6%, swoistość 89,7%, iloraz wiarygodności LR+ = 6,92.



Ryc. 5.2 Krzywa ROC dla wyników pomiaru stężenia IgE w surowicy krwi badanych osób i pole pod krzywą AUC oraz czułość i swoistość dla wartości odcinającej IgE $\geq 66,11$ ng/mL



Ryc. 5.3 Krzywe ROC dla wyników pomiaru stężenia IgE w surowicy krwi osób z astmą i osób z atopią oraz pola pod krzywą AUC, czułości i swoistości dla wartości odcinających

Mediana stężenia IgE u wszystkich badanych osób wynosiła 67 ng/mL, u pacjentów z astmą 108 ng/mL, natomiast u pacjentów z atopią 88 ng/mL. Różnice te są istotne statystycznie, $p < 0,001$ (tab. 5.1, ryc. 5.4). Także niezależnie od płci, wieku i miejsca zamieszkania osoby z astmą i atopią osiągają istotnie statystycznie wyższe stężenia IgE niż grupa kontrolna. Natomiast zarówno kobiety jak i mężczyźni, młodszy i starsi, mieszkający na wsi i w mieście należący do tej samej grupy (atopicy, astmatycy, grupa kontrolna) mieli podobne stężenia tej immunoglobuliny. Co ciekawe stężenie IgE u astmatyków mieszkających w gospodarstwie rolnym było niższe niż u astmatyków nie mieszkających w gospodarstwie (tab. 5.2).

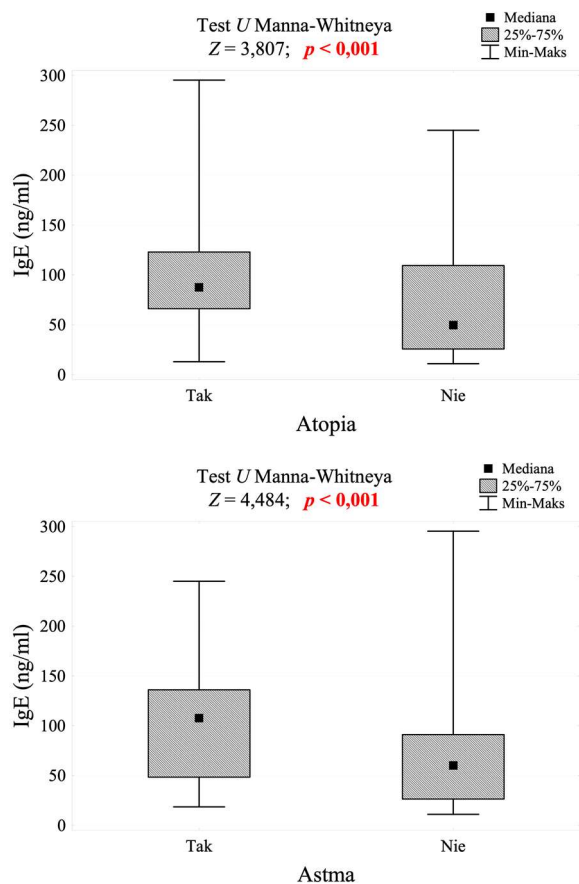
Tabela 5.1 Stężenie IgE w surowicy w poszczególnych grupach

	Wszyscy $N = 174$	Grupa 1 (Astma)	Grupa 2 (Atopia)	Grupa 3 (Kontrolna)	ANOVA p
IgE (ng/mL):					<0,001
$M \pm SD$	78,8 \pm 55,0	104,3 \pm 57,9	96,0 \pm 49,0	36,2 \pm 24,7	
Me [Q1; Q3]	67 [34; 111]	108 [48; 136]	88 [66; 123]	28 [18; 53]	
$Min - Max$	11 - 295	18 - 245	13 - 295	11 - 138	

M – średnia arytmetyczna; SD – odchylenie standardowe; Me – mediana (50%); $Q1$ – kwartył dolny (25%); $Q3$ – kwartył górny (75%); Min – wartość najmniejsza; Max – wartość największa; p – poziom istotności analizy wariancji (ANOVA)

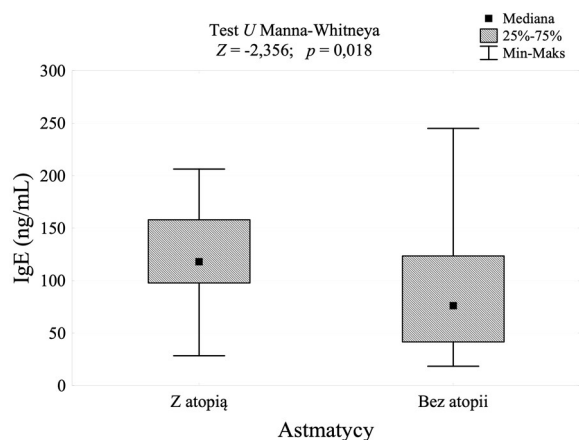
Tabela 5.2 Podstawowe statystyki [mediana i przedział kwartyłowy] stężenia IgE w surowicy krwi (ng/ml)

	Grupa 1 (Astma)	Grupa 2 (Atopia)	Grupa 3 (Kontrolna)	Wynik testu
Płeć:				
Kobiety	109 [52; 141]	86 [68; 123]	24 [16; 35]	$p < 0,001$
Mężczyźni	106 [47; 126]	90 [61; 111]	33 [24; 59]	$p < 0,001$
Wynik testu	$p = 0,643$	$p = 0,615$	$p = 0,107$	×
Wiek:				
≤ 57 lat	108 [65; 132]	90 [63; 114]	28 [20; 55]	$p < 0,001$
> 57 lat	105 [38; 136]	86 [68; 133]	30 [16; 42]	$p < 0,001$
Wynik testu	$p = 0,405$	$p = 0,641$	$p = 0,917$	×
Miejsce zamieszkania:				
Wieś	109 [51; 138]	93 [66; 135]	31 [19; 57]	$p < 0,001$
Miasto	106 [48; 132]	85 [64; 108]	27 [17; 37]	$p < 0,001$
Wynik testu	$p = 0,925$	$p = 0,339$	$p = 0,801$	×
Mieszka w gospodarstwie rolnym:				
Tak	87 [53; 123]	93 [66; 133]	32 [16; 57]	$p < 0,001$
Nie	110 [48; 148]	85 [66; 111]	26 [18; 53]	$p < 0,001$
Wynik testu	$p = 0,368$	$p = 0,632$	$p = 0,836$	×



Ryc. 5.4 Stężenia IgE w grupach osób różniących się występowaniem atopii i astmy oraz wyniki testów istotności

W grupie astmatyków osoby u których przy pomocy testów skórnych rozpoznano atopię miały wyższe stężenie IgE niż osoby bez atopii (mediana 118,0 vs 76,1 ng/mL; $p = 0,018$) (ryc. 5.5, tab. 5.3).



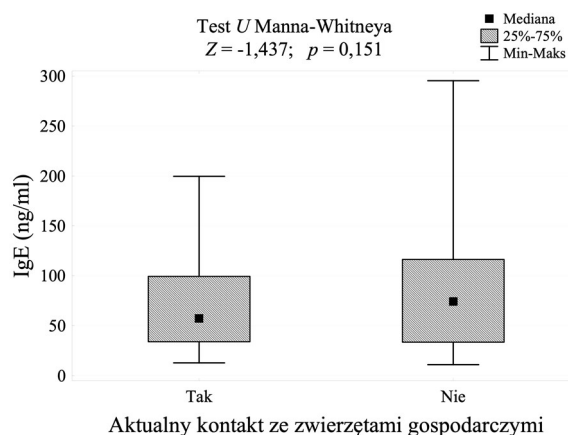
Ryc. 5.5 Stężenie IgE u osób z astmą atopową i nieatopową

Tab. 5.3 Podstawowe statystyki stężenia IgE w surowicy krwi osób z astmą atopową i nieatopową (ng/mL)

	Z atopią N = 36	Bez atopii N = 22
IgE (ng/mL)		
M ±SD	126,4 ±49,1	90,8 ±59,3
Me [Q1; Q3]	118,0 [97,7; 158,0]	76,1 [41,6; 123,5]
Min - Max	28,4 – 206,3	18,5 – 245,1

5.2 Stężenie IgE a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania

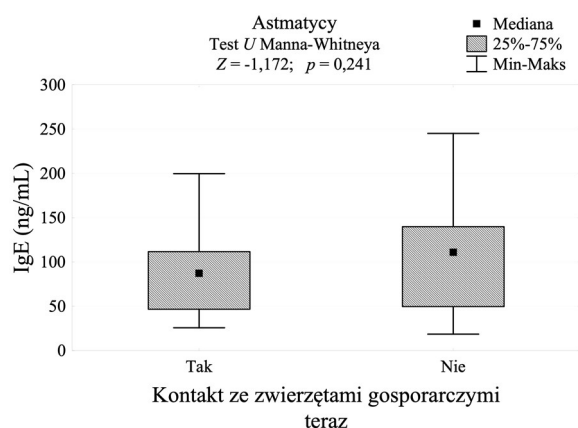
Stężenie IgE u osób, które miały kontakt ze zwierzętami było niższe niż u osób, które takiego kontaktu nie miały, jednak różnica nie była istotna statystycznie (57 vs. 74 ng/mL; $p = 0,151$) (ryc. 5.5).



Ryc. 5.5 Stężenia IgE w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi aktualnie oraz wyniki testów istotności

5.2.1 Stężenie IgE u osób z astmą a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania

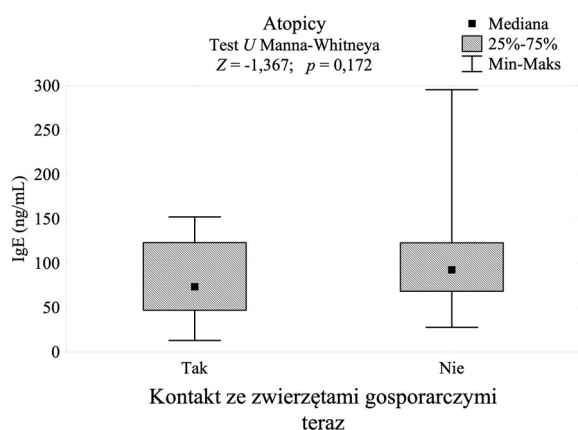
Wśród badanych z rozpoznaną astmą oskrzelową stężenie IgE w surowicy osób zgłaszających kontakt ze zwierzętami żyjącymi na farmie było niższe niż u osób nie zgłaszających takich kontaktów (bez istotności statystycznej) (80,6 vs 110,7 ng/mL, $p = 0,241$) (ryc.5.6).



Ryc. 5.6 Stężenia IgE u astmatyków w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi aktualnie oraz wyniki testów istotności

5.2.2 Stężenie IgE u osób z atopią a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania

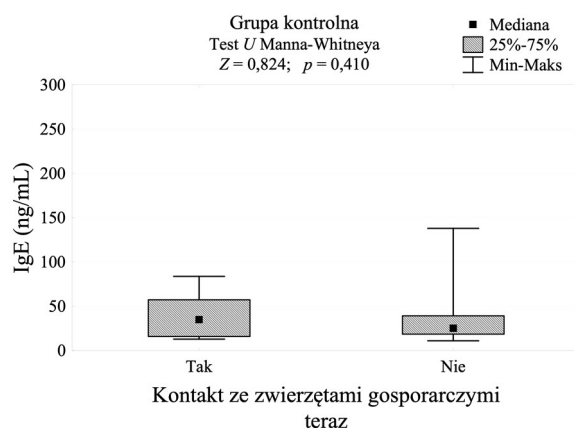
W grupie atopików, która zadeklarowała kontakt ze zwierzętami gospodarczymi stężenie IgE w surowicy było niższe niż wśród niedeklarujących kontaktu (73,4 vs 92,5 ng/mL), jednak różnica nie osiąga progu istotności statystycznej ($p = 0,172$) (ryc. 5.7).



Ryc. 5.7 Stężenia IgE u atopików w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi aktualnie oraz wyniki testów istotności

5.2.3 Stężenie IgE w grupie kontrolnej a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania

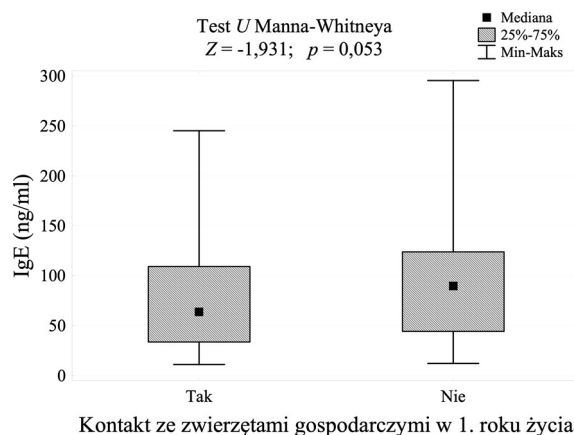
W grupie kontrolnej styczność ze zwierzętami nie wpłynęła w sposób statystycznie istotny na różnice stężeń IgE w surowicy (34,8 vs 25,2 ng/mL, $p = 0,410$) (ryc. 5.8).



Ryc. 5.8 Stężenia IgE w grupie kontrolnej w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi aktualnie oraz wyniki testów istotności

5.3 Stężenie IgE a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia

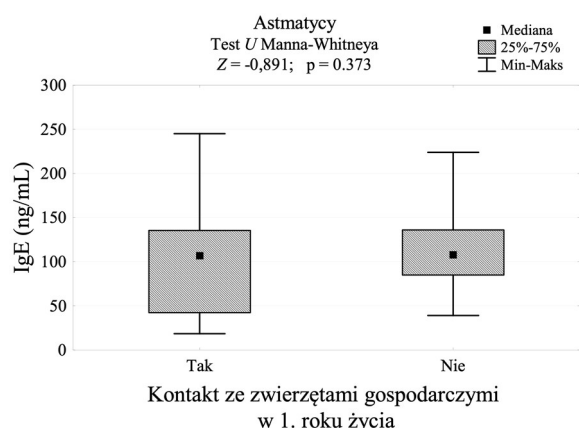
W całej badanej próbie stężenie IgE u osób, które miały kontakt ze zwierzętami w 1. roku życia było niższe niż u badanych, którzy takiego kontaktu nie mieli (64 vs. 90 ng/mL; $p = 0,053 > 0,05$) (ryc 5.9).



Ryc. 5.9 Stężenia IgE w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi w 1. roku życia oraz wyniki testów istotności

5.3.1 Stężenie IgE u osób z astmą a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia

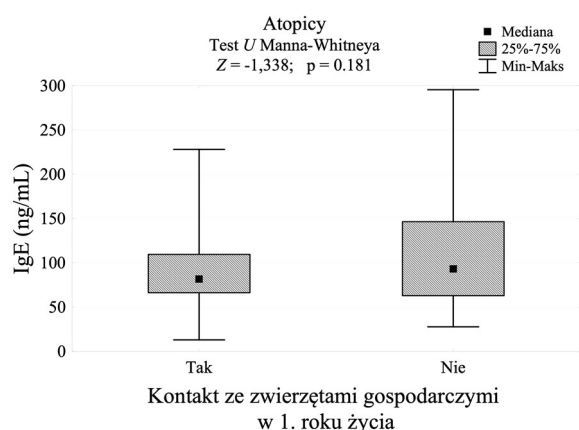
Wyłącznie w grupie pacjentów z astmą kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia nie wpływał na stężenie IgE w surowicy (107,7 vs 106,6 ng/mL; $p = 0,373$) (ryc. 5.10).



Ryc. 5.10 Stężenia IgE u astmatyków w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi w 1. roku życia oraz wyniki testów istotności

5.3.2 Stężenie IgE u osób z atopią a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia

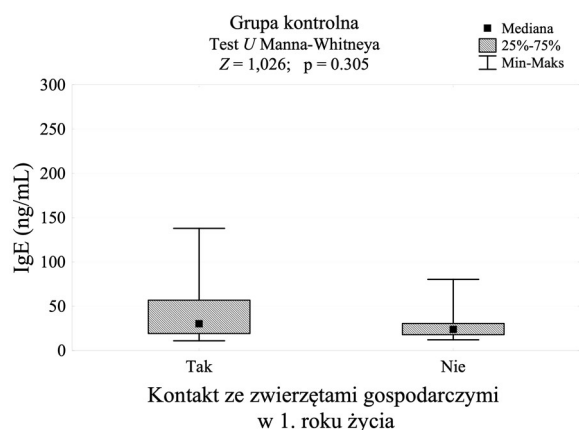
W grupie atopików kontakt w pierwszym roku życia ze zwierzętami żyjącymi na farmie korelował z niższym stężeniem IgE w surowicy (różnice jednak nie osiągnęły wartości statystycznie istotnej) (81,6 vs 93,1 ng/mL $p = 0,181$) (ryc. 5.11).



Ryc. 5.11 Stężenia IgE u atopików w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi w 1. roku życia oraz wyniki testów istotności

5.3.3 Stężenie IgE w grupie kontrolnej a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia

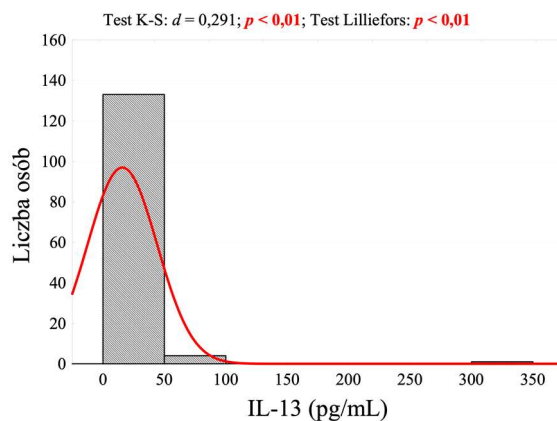
Mediany stężeń IgE na poziomie 30,1 oraz 23,8 ng/mL odpowiednio w grupie kontrolnej mającej i niemającej kontaktu ze zwierzętami hodowlanymi nie pozwalają stwierdzić korelacji ($p = 0,305$) (ryc. 5.12).



Ryc. 5.12 Stężenia IgE w grupie kontrolnej w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi w 1. roku życia oraz wyniki testów istotności

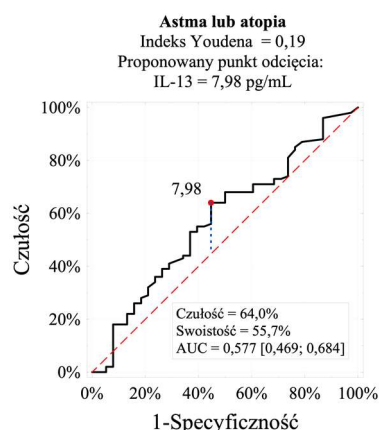
5.4 Stężenie IL-13 u astmatyków, atopików i w grupie kontrolnej

W badanej grupie 174 osób rozkład poziomu IL-13 w surowicy krwi odbiegał istotnie od rozkładu normalnego (ryc. 5.13), dlatego podobnie jak w przypadku IgE w dalszej analizie statystycznej korzystano ze statystyk pozycyjnych oraz testów nieparametrycznych.

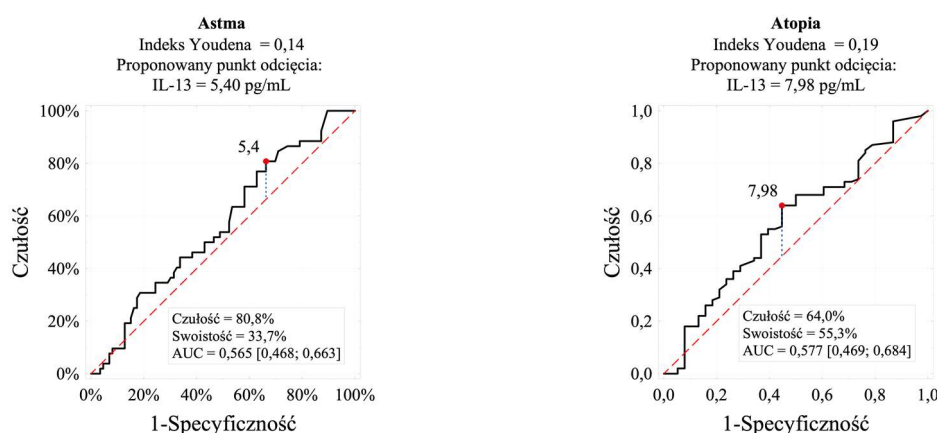


Ryc. 5.13 Histogram wyników pomiaru stężenia IL-13 w surowicy krwi badanych osób na tle rozkładu normalnego i wyniki testów normalności (Kolmogorowa-Smirnowa i Lillieforsa)

Do oszacowania wartości odcinającej stężenia IL-13 rozgraniczającej osoby zdrowe od osób z astmą lub atopią wykorzystano krzywą ROC i wskaźnik Youdena (ryc. 5.14, 5.15). Dla stężenia IL-13 $\geq 7,98$ pg/mL czułość testu wynosi 64,0%, swoistość 55,7%, iloraz wiarygodności LR+ = 1,43.



Ryc. 5.14 Krzywa ROC dla wyników pomiaru stężenia IL-13 w surowicy krwi badanych osób i pole pod krzywą AUC oraz czułość i swoistość dla wartości odcinającej IL-13 $\geq 7,89$ pg/mL



Ryc. 5.15 Krzywe ROC dla wyników pomiaru stężenia IL-13 w surowicy krwi osób z astmą i osób z atopią oraz pola pod krzywą AUC, czułości i swoistości dla wartości odcinających

Wartość diagnostyczna stężenia IL-13 jako testu na obecność astmy i atopii jest nie-satysfakcjonująca. Wprawdzie pole pod krzywą AUC jest większe od 0,5, ale jej 95% przedział ufności obejmują tę wartość (dolna granica przedziału ufności jest mniejsza od 0,5).

Mediana stężenia IL-13 w całej grupie 174 osób wynosiła 10 pg/mL, kwartył dolny 4 pg/mL, a kwartył górny 19 pg/mL, w grupie astmatyków były to wartości odpowiednio: 11 pg/mL, 6 pg/mL i 23 pg/mL, atopików: 11 pg/ml, 3 pg/mL, 19 pg/mL, kontrolnej: 7 pg/mL, 3 pg/mL, 15 pg/mL. (tab. 5.4). Wśród astmatyków widoczne jest istotnie niższe stężenie IL-13 w grupie kobiet niż mężczyzn (7,7 vs 17,4 pg/mL), natomiast w grupie kontrolnej osoby młodsze miały niższe stężenia tej cytokiny w surowicy w porównaniu z osobami powyżej 57 roku życia (5,5 vs 9,8 pg/mL). Ponadto stężenia IL-13 u mężczyzn były najwyższe u astmatyków, niższe u atopików a najniższe w grupie kontrolnej. (tab. 5.5).

Tabela 5.4 Stężenie IL-13 w surowicy w poszczególnych grupach

Stężenie w surowicy	Wszyscy N = 174	Grupa 1 (Asthma)	Grupa 2 (Atopia)	Grupa 3 (Kontrolna)	ANOVA p
IL-13 (pg/mL):					0,297
<i>M</i> ± <i>SD</i>	15,8 ±28,4	14,8 ±12,8	14,1 ±14,0	19,2 ±49,9	
<i>Me</i> [Q1; Q3]	10 [4; 19]	11 [6; 23]	11 [3; 19]	7 [3; 15]	
<i>Min</i> - <i>Max</i>	0,1 - 308	0,4 - 57	0,1 - 64	0,1 - 308	

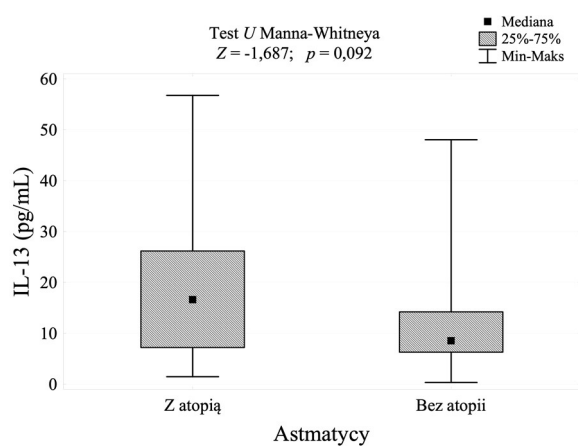
M – średnia arytmetyczna; *SD* – odchylenie standardowe; *Me* – mediana (50%); Q1 – kwartył dolny (25%); Q3 – kwartył górny (75%); *Min* – wartość najmniejsza; *Max* – wartość największa; *p* – poziom istotności analizy wariancji (ANOVA)

Tabela 5.5 Podstawowe statystyki [mediana i przedział kwartyłowy] stężenia IL-13 w surowicy krwi (pg/mL)

	Grupa 1 (Asthma)	Grupa 2 (Atopia)	Grupa 3 (Kontrolna)	Wynik testu
Płeć:				
Kobiety	7,7 [4,5; 14,1]	11,6 [3,9; 17,3]	7,5 [6,1; 14,1]	<i>p</i> = 0,723
Mężczyźni	17,4 [9,0; 26,2]	9,6 [3,4; 19,1]	5,5 [1,9; 16,0]	<i>p</i> = 0,081
Wynik testu	<i>p</i> = 0,015	<i>p</i> = 0,892	<i>p</i> = 0,463	×
Wiek:				
≤ 57 lat	11,2 [7,2; 23,1]	12,1 [3,5; 19,0]	5,4 [1,9; 15,0]	<i>p</i> = 0,062
> 57 lat	10,3 [6,3; 17,4]	8,0 [1,9; 13,1]	9,8 [6,7; 18,8]	<i>p</i> = 0,393
Wynik testu	<i>p</i> = 0,630	<i>p</i> = 0,239	<i>p</i> = 0,030	×

Miejsce zamieszkania:				
Wieś	12,4 [6,3; 26,2]	13,1 [3,5; 19,8]	11,1 [1,9; 16,0]	$p = 0,408$
Miasto	9,0 [6,3; 17,4]	11,1 [3,3; 13,1]	6,7 [5,5; 11,2]	$p = 0,663$
Wynik testu	$p = 0,259$	$p = 0,493$	$p = 0,872$	×
Mieszka w gospodarstwie rolnym:				
Tak	7,2 [4,5; 13,3]	13,6 [3,5; 31,2]	3,9 [1,9; 17,7]	$p = 0,454$
Nie	12,4 [6,3; 23,8]	11,1 [3,3; 16,0]	7,6 [5,5; 15,0]	$p = 0,168$
Wynik testu	$p = 0,110$	$p = 0,314$	$p = 0,452$	×

Badani z rozpoznaną astmą atopową cechowali się wyższym (ale bez istotności statystycznej) stężeniem IL-13 w surowicy w porównaniu z astmatykami nieatopowymi (16,6 vs 8,6 pg/mL; $p = 0,092$) (ryc. 5.16, tab. 5.6).



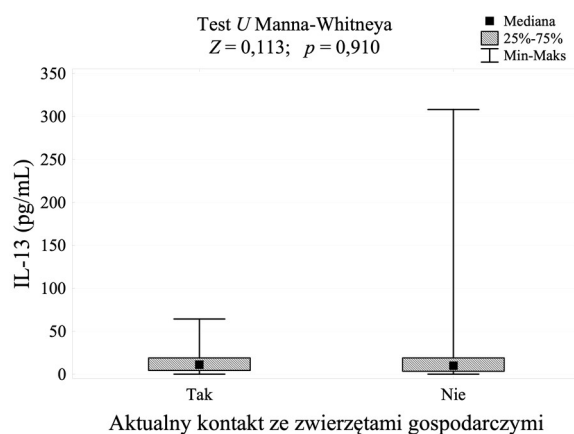
Ryc. 5.16 Stężenie IL-13 u osób z astmą atopową i nieatopową

Tab 5.6 Podstawowe statystyki stężenia IL-13 w surowicy krwi osób z astmą atopową i nieatopową (pg/mL)

	Z atopią N = 36	Bez atopii N = 22
IL-13 (pg/mL)		
M ±SD	18,5 ±14,3	12,2 ±11,1
Me [Q1; Q3]	16,6 [7,2; 26,2]	8,6 [6,3; 14,2]
Min - Max	1,5 – 56,8	0,4 – 48,1

5.5 Stężenie IL-13 a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania

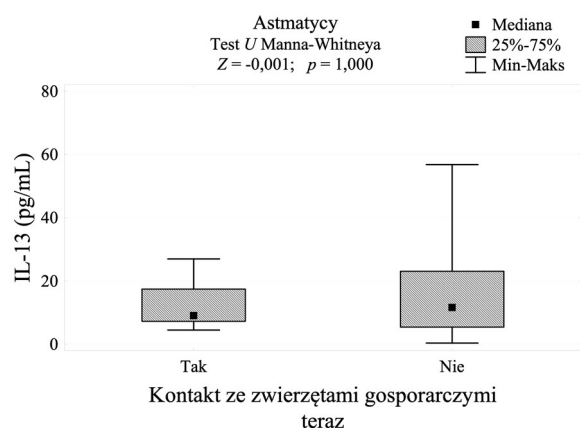
Stężenie IL-13 u osób, które miały kontakt ze zwierzętami było na podobnym poziomie jak u osób, który takich kontaktów nie miały (11 vs. 10 pg/mL; $p = 0,910$) (ryc. 5.16).



Ryc. 5.16 Stężenia IL-13 w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi aktualnie oraz wyniki testów istotności

5.5.1 Stężenie IL-13 u osób z astmą a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania

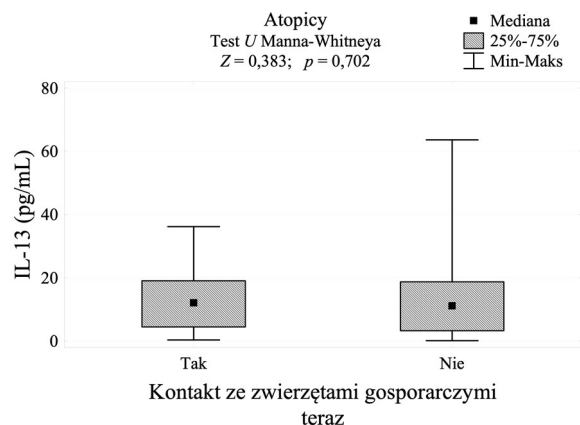
Także wśród badanych z astmą oskrzelową kontakt ze zwierzętami nie wpływał istotnie na stężenie IL-13 w surowicy (8,6 vs 9,0 pg/mL, $p = 1,00$) (ryc. 5.17).



Ryc. 5.17 Stężenia IL-13 u astmatyków w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi aktualnie oraz wyniki testów istotności

5.5.2 Stężenie IL-13 u osób z atopią a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania

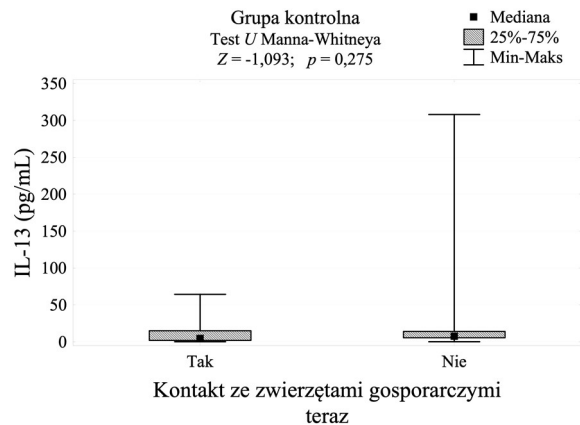
W grupie osób z atopią stężenie badanej cytokiny kształtowało się na podobnym poziomie niezależnie od raportowania przez nie kontaktu ze zwierzętami gospodarczymi (11,1 vs 8,1 pg/mL, $p = 0,702$) (ryc. 5.18).



Ryc. 5.18 Stężenia IL-13 u atopików w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi aktualnie oraz wyniki testów istotności

5.5.3 Stężenie IL-13 w grupie kontrolnej a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania

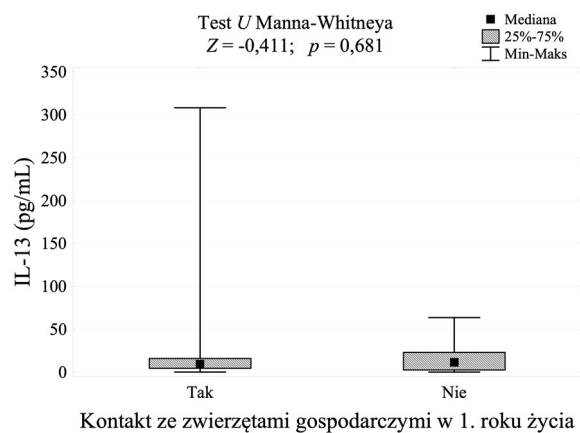
Biorąc pod uwagę tylko badanych z grupy kontrolnej styczność ze zwierzętami żyjącymi na farmie nie miała znaczącego wpływu na stężenie IL-13 w surowicy (4,5 vs 7,5 pg/mL, $p = 0,275$) (ryc. 5.19).



Ryc. 5.19 Stężenia IL-13 w grupie kontrolnej w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi aktualnie oraz wyniki testów istotności

5.6 Stężenie IL-13 a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia

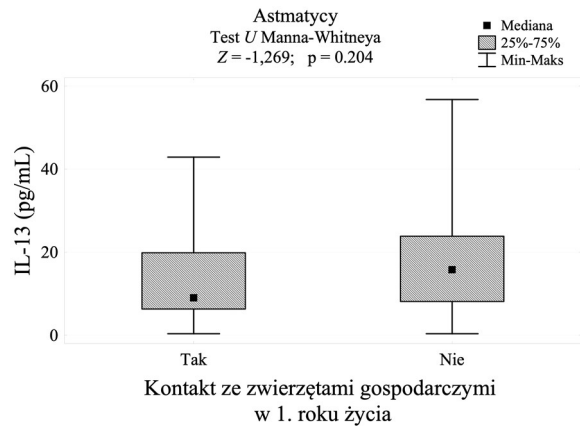
Stężenie IL-13 u osób, które miały kontakt ze zwierzętami w 1. roku życia było podobne jak u osób, który takich kontaktów nie miały (9 vs. 11 pg/mL; $p = 0,681$) (ryc. 5.20).



Ryc. 5.20 Stężenia IL-13 w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi w 1. roku życia oraz wyniki testów istotności

5.6.1 Stężenie IL-13 u osób z astmą a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia

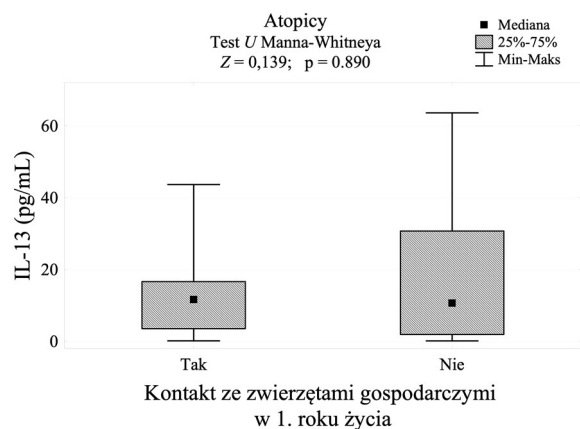
Wyłącznie wśród pacjentów z astmą stężenie IL-13 było niższe u badanych raportujących kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia niż u badanych bez takiego kontaktu, jednak różnice nie osiągnęły istotności statystycznej (7,7 vs 14,5 pg/mL, $p = 0,204$) (ryc. 5.21).



Ryc. 5.21 Stężenia IL-13 u astmatyków w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi w 1. roku życia oraz wyniki testów istotności

5.6.2 Stężenie IL-13 u osób z atopią a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia

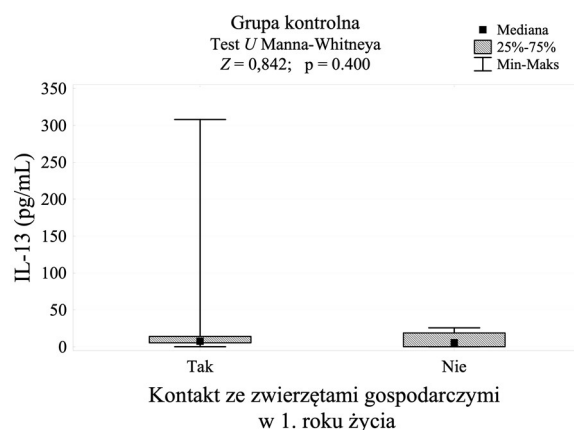
W grupie atopików nie wykazano związku pomiędzy kontaktem z żywym inwentarzem a stężeniem IL-13 w surowicy (8,6 vs 7,9 pg/mL, $p = 0,890$) (ryc. 5.22).



Ryc. 5.22 Stężenia IL-13 u atopików w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi w 1. roku życia oraz wyniki testów istotności

5.6.3 Stężenie IL-13 w grupie kontrolnej a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia

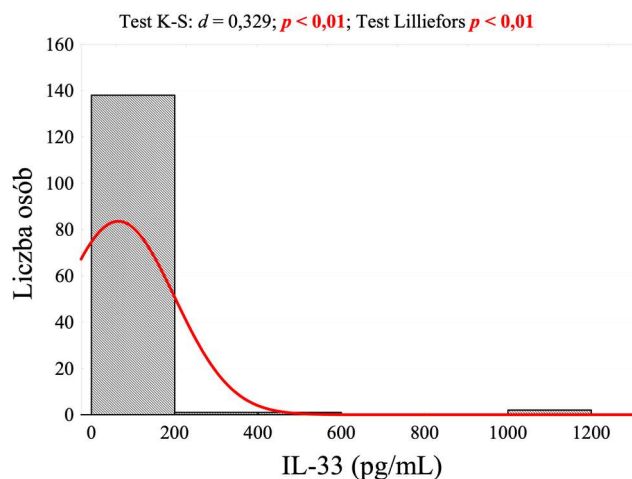
Wśród badanych stanowiących grupę kontrolną także nie obserwowano takiej zależności – kontakt ze zwierzętami gospodarczymi nie wpływał na stężenie IL-13 w surowicy (7,5 vs 5,5 pg/mL, $p = 0,400$) (ryc. 5.23).



Ryc. 5.23 Stężenia IL-13 w grupie kontrolnej w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi w 1. roku życia oraz wyniki testów istotności

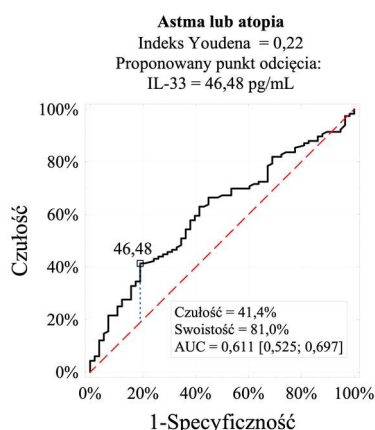
5.7 Stężenie IL-33 u astmatyków, atopików i w grupie kontrolnej

W badanej grupie 174 osób rozkład poziomy IL-33 w surowicy krwi odbiegał istotnie od rozkładu normalnego (ryc. 5.24), dlatego w tym przypadku także w dalszej analizie statystycznej korzystano ze statystyk pozycyjnych i testów nieparametrycznych.

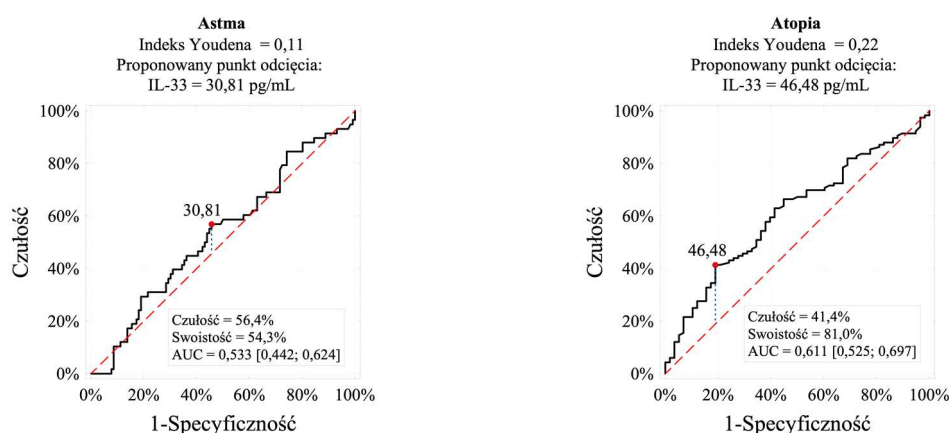


Ryc. 5.24. Histogram wyników pomiaru stężenia IL-33 w surowicy krwi badanych osób na tle rozkładu normalnego i wyniki testów normalności (Kolmogorowa-Smirnowa i Lillieforsa)

Do oszacowania wartości odcinającej stężenia IL-33 rozgraniczającej osoby zdrowe od osób z astmą lub atopią wykorzystano krzywą ROC i wskaźnik Youdena (ryc. 5.25, 5.26). Dla stężenia IL-33 $\geq 46,5$ pg/mL czułość testu wynosi 41,4%, swoistość 81,0%, iloraz wiarygodności $LR+ = 2,18$.



Ryc. 5.25 Krzywa ROC dla wyników pomiaru stężenia IL-33 w surowicy krwi badanych osób i pole pod krzywą AUC oraz czułość i swoistość dla wartości odcinającej IL-33 \geq 46,5 ng/mL



Ryc. 5.26 Krzywe ROC dla wyników pomiaru stężenia IL-33 w surowicy krwi osób z astmą i osób z atopią oraz pola pod krzywą AUC, czułości i swoistości dla wartości odcinających

Wartość diagnostyczna stężenia IL-33 jako testu na obecność astmy jest niesatysfakcjonująca. Wprawdzie pole pod krzywą AUC jest większe od 0,5, ale jej 95% przedział ufności obejmują tę wartość (dolna granica przedziału ufności jest mniejsza od 0,5). Stężenie IL-33 powyżej 46,5 pg/mL jest istotnym testem na obecność atopii. Pole pod krzywą ROC wynosi AUC = 0,611, a jego dolna granica 95% przedziału ufności jest większa niż 0,5.

Mediana stężenia IL-33 w całej badanej grupie wynosiła 29 pg/mL, kwartył dolny 16 pg/mL, a kwartył górny 63 pg/mL, w grupie astmatyków były to wartości odpowiednio: 32 pg/mL, 16 pg/mL i 76 pg/mL, atopików: 34 pg/mL, 17 pg/mL, 83 pg/mL, kontrolnej: 22 pg/mL, 14 pg/mL, 44 pg/mL. Zarówno atopicy jak i astmatycy osiągnęli wyższe stężenia IL-33 w surowicy niż osoby z grupy kontrolnej, jednak nie przekroczone poziomu istotności statystycznej ($p = 0,049$) (tab. 5.7). Przy dodatkowym podziale badanej populacji na grupy zależnie od płci, wieku, miejsca zamieszkania obserwuje się podobną

tendencję do najniższych stężeń IL-33 w grupie kontrolnej a najwyższych w grupie pacjentów atopowych, najbardziej zaznaczoną u osób poniżej 57 roku życia ($p = 0,006$). Biorąc pod uwagę całą badaną grupę nie wykazano istotnych zależności pomiędzy płcią, wiekiem i miejscem zamieszkania (wieś lub miasto) a stężeniem IL-33 w surowicy, jednak można zauważyć że u badanych zamieszkujących w gospodarstwie rolnym IL-33 osiągała niższe stężenia niż u zamieszkujących poza nim. Natomiast analizując tylko osoby młodsze niż 57 lat obserwuje się istotnie niższe stężenie IL-33 w grupie kontrolnej (19,0 vs 28,9 i 45,9 pg/mL). U atopików badani, którzy nie przekroczyli 57 roku życia cechowali się istotnie wyższym stężeniem IL-33 w surowicy (45,9 vs 17,2 pg/mL) (tab. 5.8).

Tabela 5.7 Stężenie IL-33 w surowicy w poszczególnych grupach

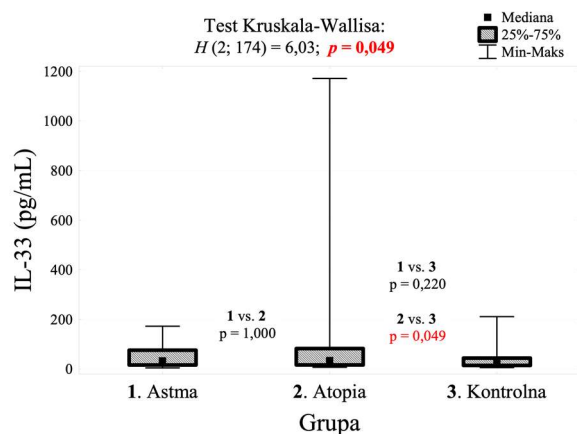
	Wszyscy $N = 174$	Grupa 1 (Astma)	Grupa 2 (Atopia)	Grupa 3 (Kontrolna)	ANOVA p
IL-33 (pg/mL):					0,049
$M \pm SD$	65,9 \pm 143,5	50,4 \pm 44,8	110,5 \pm 236,1	36,8 \pm 39,8	
Me [Q1; Q3]	29 [16; 63]	32 [16; 76]	34 [17; 83]	22 [14; 44]	
$Min - Max$	4 - 1171	4 - 173	7 - 1171	6 - 211	

M – średnia arytmetyczna; SD – odchylenie standardowe; Me – mediana (50%); $Q1$ – kwartył dolny (25%); $Q3$ – kwartył górny (75%); Min – wartość najmniejsza; Max – wartość największa; p – poziom istotności analizy wariancji (ANOVA)

Tabela 5.8 Podstawowe statystyki [mediana i przedział kwartyłowy] stężenia IL-33 w surowicy krwi (pg/mL)

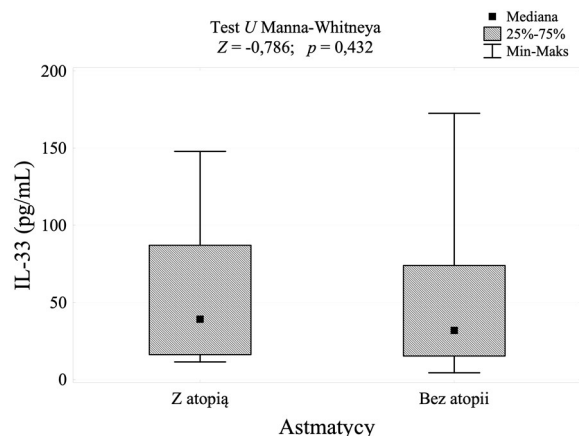
	Grupa 1 (Astma)	Grupa 2 (Atopia)	Grupa 3 (Kontrolna)	Wynik testu
Płeć:				
Kobiety	31,6 [16; 76]	38,9 [23; 91]	24,2 [13; 53]	$p = 0,237$
Mężczyźni	34,1 [16; 73]	28,7 [15; 63]	20,5 [15; 37]	$p = 0,105$
Wynik testu	$p = 0,615$	$p = 0,520$	$p = 0,444$	\times

Wiek:				
≤ 57 lat	28,9 [15; 77]	45,9 [24; 92]	19,0 [13; 42]	p = 0,006
> 57 lat	33,7 [22; 76]	17,2 [9; 31]	26,9 [17; 53]	p = 0,154
Wynik testu	p = 0,466	p = 0,027	p = 0,294	×
Miejsce zamieszkania:				
Wieś	32,5 [16; 52]	35,9 [17; 62]	22,1 [13; 46]	p = 0,256
Miasto	31,6 [16; 79]	34,0 [19; 106]	22,2 [15; 39]	p = 0,215
Wynik testu	p = 0,944	p = 0,758	p = 0,987	×
Mieszka w gospodarstwie rolnym:				
Tak	28,7 [14; 44]	31,4 [17; 66]	15,5 [10; 42]	p = 0,288
Nie	33,3 [16; 80]	34,6 [17; 91]	22,7 [16; 46]	p = 0,161
Wynik testu	p = 0,256	p = 0,838	p = 0,217	×



Ryc. 5.27 Stężenie IL-33 w surowicy krwi osób w porównywanych grupach i wyniki testów istotności

Astmatycy atopowi i nieatopowi cechowali się podobnym stężeniem IL-33 w surowicy (39,1 vs 31,8 pg/mL; $p = 0,432$) (ryc. 5.26, tab. 5.9).



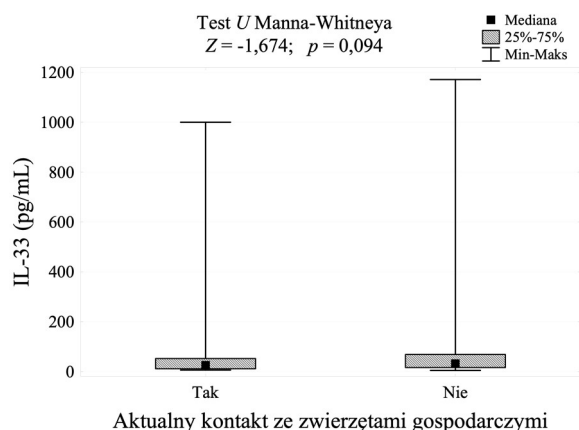
Ryc. 5.26 Stężenie IL-33 u astmatyków atopowych i nieatopowych

Tab 5.9 Podstawowe statystyki stężenia IL-33 w surowicy krwi osób z astmą atopową i nieatopową (pg/mL)

	Z atopią N = 36	Bez atopii N = 22
IL-33 (pg/mL)		
M ±SD	53,5 ±43,8	48,5 ±46,0
Me [Q1; Q3]	39,1 [16,1; 87,0]	31,8 [15,3; 73,9]
Min - Max	11,4 – 147,8	4,4 – 172,5

5.8 Stężenie IL-33 a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania

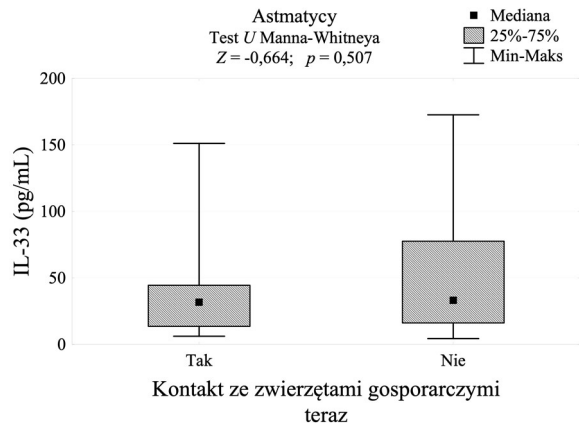
Stężenie IL-33 u osób, które miały kontakt ze zwierzętami było niższe niż u osób, którzy takich kontaktów nie miały, jednak różnica ta jest nieistotna statystycznie (25 vs. 32 pg/mL; $p = 0,094$) (ryc. 5.28).



Ryc. 5.28 Stężenia IL-33 w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi aktualnie oraz wyniki testów istotności

5.8.1 Stężenie IL-33 u osób z astmą a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania

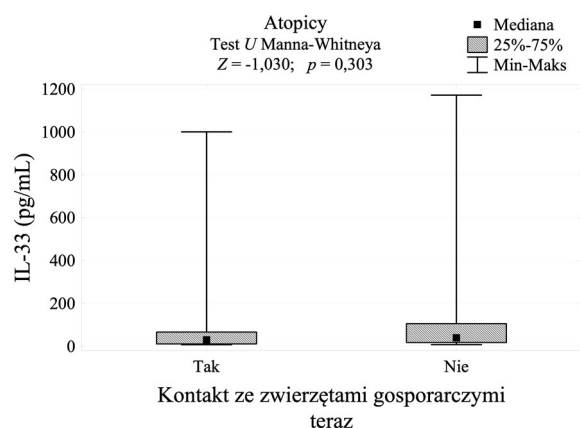
Wyłącznie w podgrupie astmatyków stężenie IL-33 okazało się być podobne u osób zgłaszających i niezgłaszających kontaktów z żywym inwentarzem (31,6 vs 34,1 pg/mL, $p = 0,507$) (ryc. 5.29).



Ryc. 5.29 Stężenia IL-33 u atopików w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi aktualnie oraz wyniki testów istotności

5.8.2 Stężenie IL-33 u osób z atopią a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania

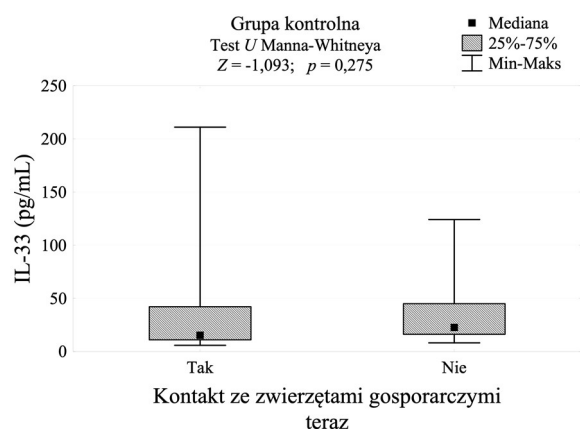
Stężenie IL-33 w surowicy atopików było niższe u mających niż niemających styczność ze zwierzętami żyjącymi na farmie, ale bez istotności statystycznej (29,1 vs 38,9 pg/mL, $p = 0,303$) (ryc. 5.30).



Ryc. 5.30 Stężenia IL-33 u atopików w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi aktualnie oraz wyniki testów istotności

5.8.3 Stężenie IL-33 w grupie kontrolnej a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w momencie badania

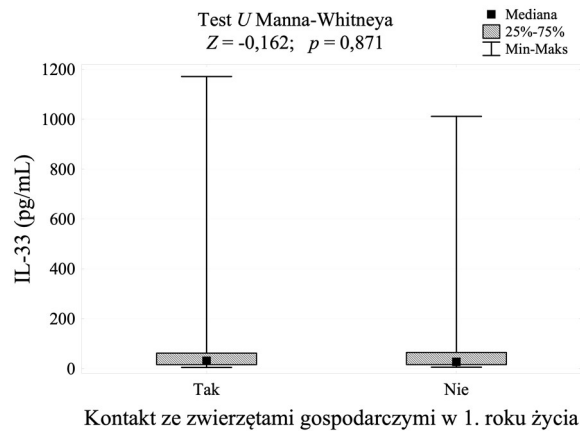
Obserwowano także podobne stężenia tej cytokiny w surowicy osób z grupy kontrolnej raportujących i nie raportujących ekspozycji na zwierzęta gospodarcze. (15,2 vs 22,6 pg/mL, $p = 0,275$) (ryc. 5.31).



Ryc. 5.31 Stężenia IL-33 w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi aktualnie oraz wyniki testów istotności

5.9 Stężenie IL-33 a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia

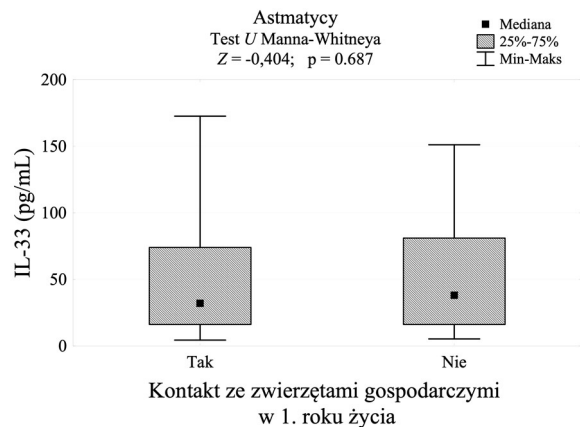
Stężenie IL-33 u osób, które miały kontakt ze zwierzętami w 1. roku życia było na podobnym poziomie jak u osób, które takiego kontaktu nie miały (31 vs 27 pg/mL; $p = 0,871$) (ryc. 5.32).



Ryc. 5.32 Stężenia IL-33 w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi w 1. roku życia oraz wyniki testów istotności

5.9.1 Stężenie IL-33 u osób z astmą a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia

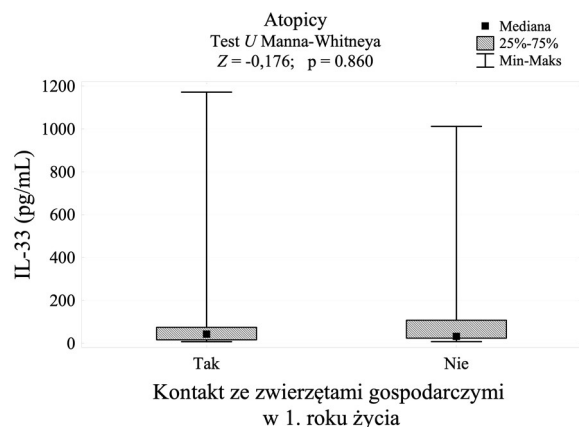
Wyłącznie w grupie astmatyków kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia nie wpływał znacząco na stężenie IL-33 w surowicy (32,1 vs 38 pg/mL; $p = 0,687$) (ryc. 5.33).



Ryc. 5.33 Stężenia IL-33 u astmatyków w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi w 1. roku życia oraz wyniki testów istotności

5.9.2 Stężenie IL-33 u osób z atopią a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia

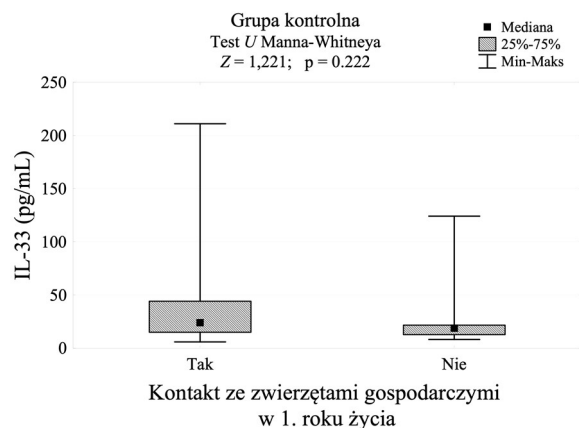
W grupie osób z atopią stężenie IL-33 w surowicy było na zbliżonym poziomie niezależnie od ich kontaktu ze zwierzętami w pierwszym roku życia (42,4 vs 31,3 pg/mL; $p = 0,860$) (ryc. 5.34).



Ryc. 5.34 Stężenia IL-33 u atopików w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi w 1. roku życia oraz wyniki testów istotności

5.9.3 Stężenie IL-33 w grupie kontrolnej a kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia

W grupie kontrolnej stężenie IL-33 w surowicy osób, które miały kontakt ze zwierzętami zamieszkującymi na farmie w pierwszym roku życia nie różniło się istotnie od stężenia u osób bez takich kontaktów (23,8 vs 18,7 pg/mL; $p = 0,222$) (ryc. 5.35).



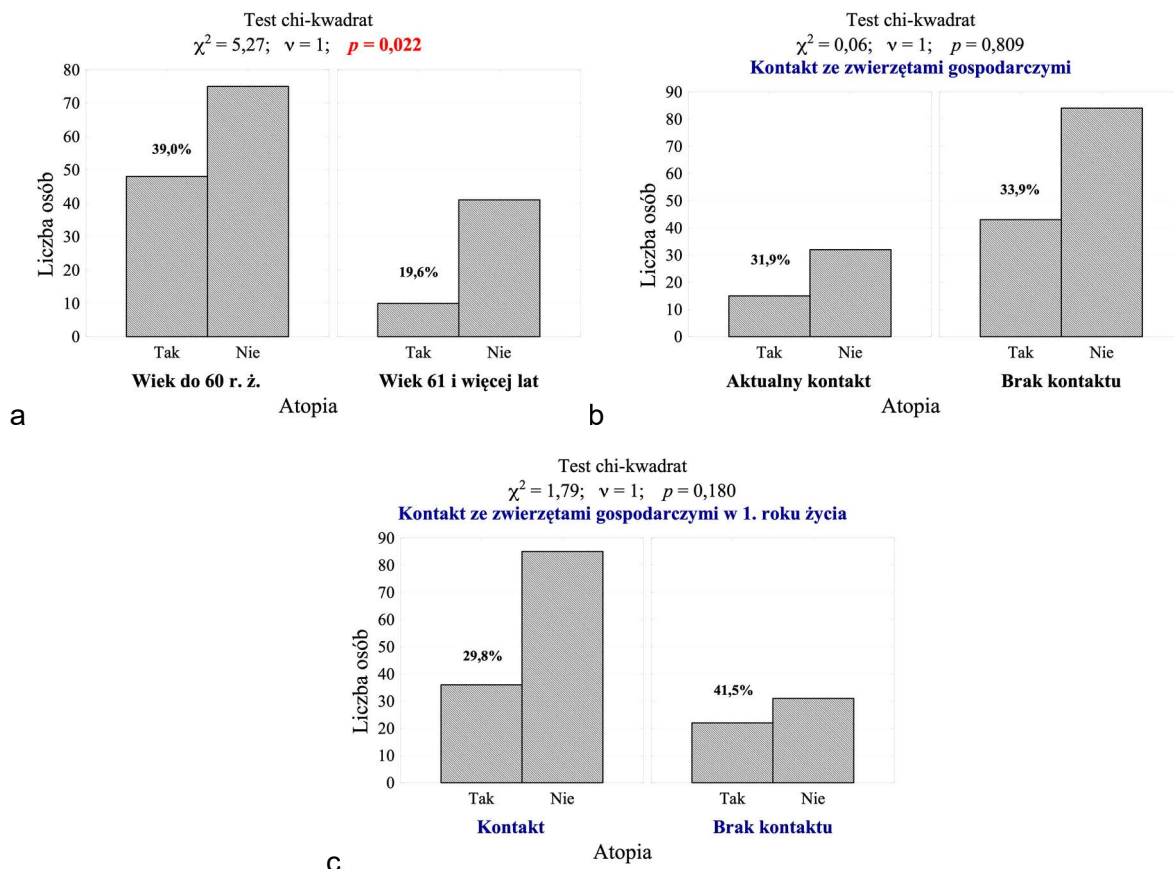
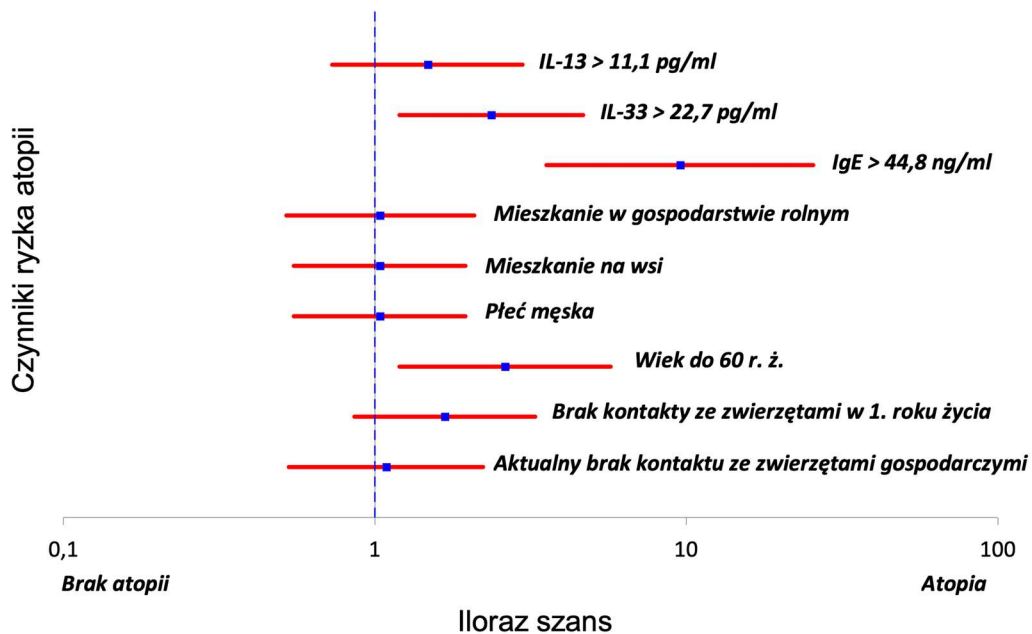
Ryc. 5.35 Stężenia IL-33 w grupie kontrolnej w grupach osób różniących się kontaktami ze zwierzętami gospodarczymi w 1. roku życia oraz wyniki testów istotności

5.10 Podsumowanie

Tabela 5.10 Ilorazy szans atopii dla analizowanych czynników ryzyka

Czynniki ryzyka atopii	Surowe		Skorygowane	
	OR _{crude}	95% CI	OR _{adj.}	95% CI
Aktualny brak kontaktu ze zwierzętami gospodarczymi	1,09	0,53 – 2,23	0,98	0,47 – 2,04
Brak kontaktu ze zwierzętami gospodarczymi w 1 r.ż.	1,68	0,86 – 3,28	1,31	0,65 – 2,66
Wiek do 60 r. ż.	2,62	1,20 – 5,73	2,63	1,20 – 5,77
Płeć męska	1,04	0,55 – 1,96	0,92	0,48 – 1,77
Mieszkanie na wsi	1,04	0,55 – 1,96	0,98	0,51 – 1,88
Mieszkanie w gospodarstwie rolnym	1,04	0,52 – 2,09	1,08	0,53 – 2,20
IgE ≥ 44,79 ng/ml	9,56	3,56 – 25,6	9,01	3,34 – 24,3
IL-33 ≥ 22,7 pg/ml	2,37	1,20 – 4,68	2,55	1,27 – 5,12
IL-13 ≥ 11,12 pg/ml	1,48	0,73 – 2,99	1,42	0,70 – 2,91

Niezależnymi predyktorami atopii okazały się jedynie wiek do 60 roku życia, poziom IgE ≥ 44,8 ng/ml oraz IL-33 ≥ 22,7 pg/ml. Brak kontaktu ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia nie jest istotny. Wprawdzie szansa wystąpienia atopii u osób, które nie miały w pierwszym roku życia kontaktu z żadnymi zwierzętami gospodarczymi jest ponad półtora razy większa niż u osób, które w pierwszym roku życia miały kontakt z jakimkolwiek gatunkiem (OR = 1,68), ale dolna granica 95% przedziału ufności dla ilorazu szans jest mniejsza od 1, co należy interpretować, że szanse na atopię są jednakowe w obu grupach. Po skorygowaniu ilorazu szans o wiek, płeć i pozostałe analizowane czynniki iloraz szans zmalał jeszcze bardziej (OR_{adj.} = 1,31).



Ryc. 5.36 Liczba (odsetek) osób w grupach różniących się obecnością atopii oraz wiekiem (a), aktualnym kontaktem ze zwierzętami gospodarczymi (b) i kontaktem ze zwierzętami gospodarczymi w 1. roku życia (c) i wyniki testów niezależności

U osób w wieku do 60 lat atopia występowała istotnie częściej (ryc. 5.36a). Z wykresu 5.36c wynika natomiast, że brak kontaktu ze zwierzętami w dzieciństwie wpływa na wzrost przypadków atopii, ale różnica (41,5% vs. 29,8%) nie jest istotna statystycznie ($p = 0,180$). Moc testu niezależności chi kwadrat wynosi $1 - \beta = 0,628$. Aby obserwowana różnica była istotna na poziomie $p < 0,05$, a moc testu była nie mniejsza niż 0,8, liczność próby powinna wynosić co najmniej $N = 262$.

Tabela 5.11 Ilorazy szans astmy dla analizowanych czynników ryzyka

Czynniki ryzyka astmy	Surowe		Skorygowane	
	OR _{crud} e	95% CI	OR _{adj.}	95% CI
Brak kontaktu ze zwierzętami gospodarczymi	1,25	0,61 – 2,58	0,91	0,42 – 1,96
Brak kontaktu ze zwierzętami gospodarczymi w 1 r.ż.	1,04	0,53 – 2,06	0,92	0,34 – 2,49
Wiek powyżej 60 r. ż.	1,44	0,73 – 2,85	1,29	0,56 – 2,99
Płeć męska	1,04	0,55 – 1,96	1,07	0,56 – 2,07
Mieszkanie w mieście	1,07	0,57 – 2,03	0,83	0,38 – 1,81
Mieszkanie w gospodarstwie rolnym	0,71	0,34 – 1,45	0,67	0,25 – 1,80
IgE \geq 93,56 ng/ml	5,83	2,92 – 11,7	5,90	2,72 – 12,8
IL-33 \geq 30,81 pg/ml	1,57	0,83 – 2,96	1,30	0,60 – 2,81
IL-13 \geq 5,4 pg/ml	2,14	0,94 – 4,86	1,75	0,71 – 4,31

Jedynym czynnikiem ryzyka wystąpienia astmy jest poziom IgE \geq 93,56 ng/ml.

6. OMÓWIENIE

Podwyższone stężenie IgE całkowitej w surowicy jest charakterystyczne dla osób z atopią (1,2). W pracy własnej średni poziom IgE w surowicy u osób z uprzednio stwierdzoną na podstawie testów skórnych atopią kształtował się na poziomie 96 ng/ml (39,3 IU/mL), a w grupie kontrolnej 36,2 ng/ml (14,8 IU/mL), natomiast mediana wynosiła odpowiednio 88 ng/ml (38 IU/mL) i 28ng/ml (11,5 IU/mL). Wykazano, że poziom IgE \geq 44,8 ng/ml (18 IU/mL) jest niezależnym predyktorem atopii (współgra z atopią stwierdzaną w STP).

Zaobserwowano także, że u osób przed 60 rokiem życia atopia występowała istotnie częściej. Dla osób w wieku do 60 lat było to 39,0% w porównaniu do 19,6% dla osób starszych. Podobnie w pracy Arbes i wsp. analizującej dane pozyskane w badaniu NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) atopia była najrzadsza w grupie \geq 55 roku życia (34.9% versus 47,0; 51,8; 42,4% odpowiednio dla grup 6-17, 18-40, 41-54 lata) (139).

W mojej pracy wykazałam także, że poziom IgE równy lub wyższy 93,56 ng/ml (26,05 IU/mL) jest czynnikiem ryzyka wystąpienia astmy. Według Burrows'a i wsp. którzy zakwalifikowali do swojego badania 2657 osób średnia geometryczna poziomu IgE w surowicy u pacjentów z astmą wynosiła 224 IU/mL, 117 IU/mL, 56 IU/ml odpowiednio dla grup wiekowych 6-34 lat, 35-54 lat i >54 lat w porównaniu z grupą kontrolną odpowiednio: 43 IU/mL, 26 IU/mL, 18 IU/mL (140). Obserwacje te są zgodne z moimi wynikami - stężenie IgE u astmatyków przekracza 26,05 IU/mL, a starsi osiągają znacznie niższe stężenie IgE co także jest w zgodzie z moimi obserwacjami. W pracy Momen'a i wsp. badani astmatycy osiągnęli stężenie IgE na średnim poziomie 169.8 IU/mL, natomiast grupa kontrolna 108.42 IU/mL (141). Badacze amerykańscy w 1980 roku stwierdzili, że IgE poniżej 80 IU/mL ma 18% badanych astmatyków i 73% zdrowych osób, podczas gdy IgE >320 IU/mL miało 55% astmatyków i jedynie 2% osób z grupy kontrolnej (142). W grupie pacjentów badanych przez Borish'a i wsp. z astmą ciężką i oporną na leczenie średnie stężenie IgE wynosiło 106.6 IU/mL (143).

Zarówno u pacjentów z astmą jak i zdrowych wpływ na stężenie IgE całkowitej w surowicy mają takie czynniki jak płeć, rasa, pochodzenie etniczne, palenie tytoniu; obserwuje się także pik u dzieci pomiędzy 8 a 12 rokiem życia (143). W pracy własnej nie stwierdzono różnic w stężeniu IgE w zależności od płci czy miejsca zamieszkania,

natomiast w każdej z badanych grup: kobiety, mężczyźni, mieszkańcy miasta, mieszkańcy wsi, osoby do i powyżej 57 roku życia była istotna statystycznie różnica pomiędzy astmatykami, atopikami i grupą kontrolną.

W pracy własnej analizowano także czy kontakt ze zwierzętami gospodarczymi koreluje ze stężeniem IgE całkowitej w surowicy. Wykazano, że stężenie to było niższe u osób, które taki kontakt miały, jednak różnica stężeń jest nieistotna statystycznie (74 vs. 57 ng/ml; $p = 0,151$). W holenderskiej pracy oceniano czy zamieszkanie w pobliżu farm ma związek z atopią. Atopię, czyli stężenie IgE całkowitej powyżej 100 IU/mL i/lub sIgE $\geq 0,35$ IU/mL, stwierdzono u 29,8% spośród 2443 badanych osób. Uczestnicy mieszkający w niewielkiej odległości od farm (<327 m) mieli mniejszą szansę na atopię w porównaniu z osobami mieszkającymi dalej niż 527 m od najbliższej farmy. Skorygowany iloraz szans wynosił OR = 0.79. Także zagęszczenie farm w pobliżu miejsca zamieszkania okazało się mieć związek z atopią (144). W przekrojowym badaniu PAR-SIFAL przeprowadzonym w krajach Europy Zachodniej na grupie kilkunastu tysięcy dzieci w wieku 5-13 lat wykazano, że dorastanie na farmie wykazuje efekt ochronny przed rozwojem atopii rozumianej jako podwyższone stężenie IgE specyficznych dla mieszaniny powszechnych alergenów oddechowych i pokarmowych. Skorygowany iloraz szans dla uczulenia atopowego wyniósł 0,53 dla dzieci wychowujących się na farmie w porównaniu do próby kontrolnej (145). W Polsce w ramach projektu GABRIEL także wyciągnięto podobne wnioski. Na grupie 2586 dzieci stwierdzono zmniejszone ryzyko atopii (definiowanej jako podwyższone stężenie specyficznej IgE dla alergenów wziewnych) - skorygowany iloraz szans wynosił 0,72 (146). Jako część projektu GABRIELA u 8023 dzieci w wieku od 6 do 12 lat przeprowadzono badanie mające na celu ocenę związku pomiędzy ekspozycją na farmę oraz ilością posiadanego rodzeństwa a poziomem IgE specyficznych (atopią). Stwierdzono, że kontakt ze środowiskiem gospodarczym jest niezależnym czynnikiem ochronnym rozwoju atopii (147). Związek pomiędzy życiem na farmie i kontaktem ze zwierzętami gospodarczymi a rozwojem atopii zauważyli także Riedler i wsp. badając dzieci austriackie. Te mieszkające na farmie rzadziej uzyskiwały dodatnie wyniki testów skórnych w kierunku alergenów wziewnych (18,8 vs 32,7%, $p = 0,001$). Wśród dzieci na co dzień mieszkających poza farmą, ale mających regularny kontakt z żywym inwentarzem częstość dodatnich testów skórnych także była mniejsza (13,5 vs 34,8%, $p = 0,01$) (148). Wiele z opisywanych badań zostało przeprowadzonych w krajach Europy Zachodniej czy Środkowej w

regionach gdzie rolnictwo jest głównym źródłem utrzymania, a mieszkający tam ludzie trudnią się nie tylko hodowlą zwierząt ale także uprawą roli. Nierzadko pomieszczenia gospodarcze i hodowlane znajdują się pod jednym dachem z lokalami mieszkalnymi. Dzieci i kobiety, także te będące w ciąży, często aktywnie uczestniczą w pracach rolniczych (149). We wsiach zamieszkiwanych przez uczestników mojego badania małe rodzinne wielozadaniowe farmy zastępowane są przez duże gospodarstwa nastawione na jeden rodzaj działalności rolniczej, pracują w nich nie całe rodziny ale wykwalifikowani pracownicy.

W piśmiennictwie można znaleźć także prace, których autorzy wyciągnęli wnioski nie-spójne z moimi. Związku pomiędzy gospodarskim trybem życia a występowaniem atopii (rozumianej jako dodatni wynik SPT dla co najmniej jednego z badanych alergenów wziewnych) nie stwierdził zespół badaczy brytyjskich. Nie wykazali oni także w swoim Badaniu Astmy i Alergii w Shropshire, że ekspozycja na zwierzęta hodowlane czy spędzanie czasu na zabawach w oborach i stajniach ma statystycznie istotny ochronny wpływ na rozwój atopii (150).

W pracy własnej analizowano także stężenie IgE u osób różniących się kontaktami z poszczególnymi gatunkami zwierząt: krowami, świniami, drobiem, owcami i końmi oraz wykonujących takie prace w gospodarstwie jak dojenie krów, czyszczenie stajni czy zbieranie jajek. W żadnej z grup nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu IgE u osób różniących się częstością kontaktów ze zwierzętami i czynnościami w gospodarstwie rolnym ($p > 0,05$). Zwraca uwagę, że niewiele osób miało styczność z krowami, owcami czy końmi, jedynie zajmowanie się drobiem i zbieranie jajek było raportowane przez większą ilość badanych. Kiedy weźmiemy pod uwagę tylko te grupy, widać tendencję do wyższych stężeń IgE całkowitej w surowicy osób niezgłaszających kontaktu z drobiem i zbierania jaj. Gautam i wsp. badali odpowiedź immunologiczną u osób pracujących przy hodowli kurczaków. Zakwalifikowali 29 rolników oraz 14 pracujących w biurze ochotników dopasowanych strukturą płci i wieku. Hodowcy kurczaków mieli 3-rzy wyższy poziom IgE w surowicy, ale nie osiągnięto poziomu istotności statystycznej. Różnica ta wynikała jedynie z dużej dysproporcji w grupie mężczyzn, natomiast kobiety pracujące na farmie jak i w biurze miały zbliżone stężenia IgE. Ograniczeniem tego badania, na które zwracają także uwagę jego autorzy jest niewielka liczebność badanych grup. (136).

W moim badaniu stężenie IgE u osób, które nie miały kontaktu ze zwierzętami w 1. roku życia było większe niż u osób, który taki kontakt miały, różnica stężeń znalazła się na granicy istotności statystycznej (90 vs. 64 ng/mL; $p = 0,053$). Podobne wyniki otrzymali Riedler i wsp. przeprowadzając badanie z udziałem 2618 dzieci zamieszkujących obszary wiejskie Europy Zachodniej. U uczestników eksponowanych w pierwszym roku życia na zwierzęta gospodarcze i stajnie stwierdzono znacząco mniejsze ryzyko atopii (określanej jako stężenie IgE specyficznej powyżej 3,5kU/L sIgE dla co najmniej jednego z alergenów powietrzno pochodnych) oraz astmy. Atopię rozwinęło 12-21% dzieci eksponowanych oraz 15-33% dzieci nieeksponowanych natomiast astmę odpowiednio 1-6% oraz 6-12% (63). Także Illi i wsp. prowadząc badania w ramach projektu GABRIEL i mierząc specyficzne IgE dla alergenów wziewnych stwierdzili mniejsze rozpowszechnienie atopii wśród dzieci zamieszkujących na farmie w pierwszych latach życia w porównaniu do pochodzących spoza farm - skorygowany iloraz szans wynosił 0,54 (151). Pod koniec XX w. w Dani przeprowadzono badanie z udziałem słuchaczy szkół rolniczych, sprawdzano czy dorastanie i życie na farmie ma związek z mniejszym ryzykiem atopii. Poziom całkowitej IgE w surowicy był znacząco niższy u rolników, którzy spędzili dzieciństwo na farmie (IgE powyżej 100 kU/L - uzyskało 43% takich uczestników) zarówno w porównaniu z rolnikami wychowującymi się poza gospodarstwem (57%) jak i z osobami ze wsi nigdy nie mieszkającymi na farmie (58%) (152). Analizując dane zebrane od 3229 osób w Ameryce Północnej House i wsp. stwierdzili istotny statystycznie związek pomiędzy ekspozycją na środowisko gospodarcze w pierwszych 3 latach po urodzeniu a mniejszym ryzykiem rozwinięcia atopii w dorosłym życiu (czyli w przypadku tego badania także dodatnim wynikiem na obecność IgE specyficznych dla co najmniej jednego z badanych alergenów). (153). W pracy, o której wspominałam w poprzednim akapicie bazującej na populacji holenderskiej zauważono także, że osoby żyjące w dzieciństwie na farmie miały mniejszą szansę rozwinąć atopię niż uczestnicy mieszkający w oddaleniu. (iloraz szans OR = 0.61) (143). von Hertzen i wsp. badając populacje Finlandii i Rosji oparte na dwóch pokoleniach wykazali, że praca rodziców dziecka na farmie w jego pierwszym roku życia wykazuje ochronny efekt dla rozwoju atopii. W Finlandii był on bardziej zaznaczony (iloraz szans OR = 0,53, $p = 0,047$) natomiast w Rosji na granicy istotności statystycznej (OR = 0,47, $p = 0,059$). Różnicę tą pomiędzy krajami można prawdopodobnie wiązać z dużo rzadszym występowaniem samej atopii w Rosji (154). W powyższym badaniu atopia była definiowana jako dodatni wynik punktowych testów skórnych

(w kierunku co najmniej jednego z badanych alergenów inhalacyjnych lub pokarmowych), w piśmiennictwie czasem uznaje się badanie stężenia IgE w surowicy oraz wykonanie testów skórnych za równoważne metody diagnostyczne uczulenia atopowego (155). Ojwang i wsp. przeanalizowali przypadki 3781 dzieci w wieku 5 lat wykorzystując wystandaryzowany kwestionariusz ISAAC (taki sam jak w badaniu, na którym opiera się moja praca) oraz mierząc stężenie IgE specyficznego dla alergenów pokarmowych i wziewnych. Nie wykazali związku pomiędzy ekspozycją na zwierzęta gospodarcze lub wizytami w budynkach gdzie się je hoduje w pierwszym roku życia a ryzykiem astmy lub alergii. W tym samym badaniu wykazano, że posiadanie psa w domu w pierwszym roku życia koreluje z mniejszym ryzykiem uczulenia (definiowanego jako podwyższone stężenie IgE przeciwko co najmniej jednemu z badanych alergenów) w wieku do 5 lat (156). Ekspozycja na środowisko gospodarcze we wczesnym okresie życia okazuje się mieć większe znaczenie ochronne przed rozwojem atopii. Ege i wsp. wykazali nawet, że największy wpływ ma ekspozycja prenatalna (157). Ochrona uzyskana dzięki wczesnej ekspozycji może trwać przez całe życie i zmieniać przebieg chorób alergicznych (158,159). Także moje badanie pozwala wyciągnąć podobne wnioski. Na niewielkiej grupie osób (174 osoby w porównaniu z często kilkutysięcznymi grupami u innych badaczy) udało się zbliżyć do progu istotności statystycznej dla kontaktu w pierwszym roku życia, natomiast dla kontaktu na późniejszym etapie życia istotność statystyczna obserwowanej tendencji nie została osiągnięta.

W badaniu własnym sprawdzałam także związek pomiędzy kontaktem ze zwierzętami gospodarczymi a stężeniem IgE w surowicy w poszczególnych grupach: astmatycy, atopicy i grupa kontrolna. Badani z atopią, którzy raportowali styczność ze zwierzętami żyjącymi na farmie, zarówno w momencie badania jak i w pierwszym roku życia, mieli niższe stężenia IgE w surowicy od osób bez takich kontaktów, jednak różnica nie była istotna statystycznie (odpowiednio $p = 0,169$ i $0,181$). Podobnej zależności nie udowodniono w pozostałych grupach. W dostępnym piśmiennictwie nie udało się autorce wyszukać podobnych prac.

W badaniu własnym nie obserwowano różnic w stężeniu IL-13 w surowicy pomiędzy astmatykami, atopikami a zdrowymi ochotnikami z grupy kontrolnej. Jedynie w grupie osób poniżej 57 roku życia stężenie IL-13 było niższe w grupie kontrolnej (mediana 5,4 pg/mL) w porównaniu z astmatykami i atopikami (mediana odpowiednio 12,2 pg/mL i 12,1 pg/mL), $p = 0,062$. Do podobnych wniosków doszedł Davoodi i wsp. także nie

stwierdzając istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą kontrolną a astmatykami (160). Natomiast Dimitrowa i wsp. obserwowali związek pomiędzy podwyższonym stężeniem IL-13 w surowicy a astmą oskrzelową. Medianę stężeń IL-13 u pacjentów z astmą oskrzelową określili oni na 1,08 pg/mL, a u zdrowych na 0,31, $p = 0,014$ (161). Można podejrzewać, że odmiennie od moich wyniki tego badania są związane z inną kwalifikacją pacjentów, Dimitrowa i wsp. rekrutowali jedynie osoby z astmą ciężką i umiarkowaną, wyłączając te z astmą łagodną. Badacze koreańscy zastosowali jeszcze inny sposób włączania pacjentów do swojej pracy, wydzielili grupy osób z zaostrzeniem astmy, bezobjawowych astmatyków oraz grupę kontrolną. Zaobserwowali, że poziom IL-13 był istotnie najwyższy wśród astmatyków będących w trakcie zaostrzenia choroby wynosząc średnio 50.85 pg/mL (162). Kalinauskaite-Zukauske i wsp. porównywali zmianę poziomu cytokin u astmatyków uczulonych na roztozce kurzu domowego i zdrowych ochotników po prowokacji tym alergenem. Wyjściowe stężenie IL-13 było znacznie wyższe w grupie astmatyków (średnio 889.1 vs. 218.5 pg/mL), także jedynie w tej grupie obserwowano wzrost poziomu cytokiny po prowokacji alergenem (1121.0 vs. 230.6 pg/mL) (163). Związku atopii z podwyższonym poziomem IL-13 poszukiwali polscy badacze. Analizując grupę 30 dzieci z alergią na białko mleka krowiego odkryli, że podwyższone stężenie IgE koreluje z podwyższonym stężeniem IL-13 w surowicy. Ponadto zaobserwowali że poprawa kliniczna po 6 miesiącach od wprowadzenia diety eliminacyjnej wiąże się ze spadkiem IL-13 (164). Duża brytyjska kohorta pozwoliła Maier i wsp. uzyskać dowody na związek pomiędzy całkowitym poziomem IgE a wariantami genu IL-13 (165). Podobne wnioski odnośnie polimorfizmu *IL-13* wyciągnięto w Dani w dwóch niezależnych badaniach (166, 167). W pracy własnej stężenie IL-13 w surowicy osób z astmą atopową było wyższe niż u badanych z astmą nieatopową. Hussein i wsp. wyciągnęli podobne wnioski dzięki badaniu 480 egipskich dziewczynek, mediana stężenia IL-13 wśród tych mających astmę atopową wynosiła 15.8 ± 2.1 pg/mL natomiast u astmatyczek nieatopowych 6 ± 1.4 pg/mL co było zbliżone także do grupy kontrolnej (5.8 ± 1.2 pg/ml) (168).

Kontakt ze zwierzętami gospodarczymi nie miał związku ze stężeniem IL-13 u badanych osób. Zależność taką zauważyli jednak Kääriö i wsp. oceniając profil cytokin komórek jednojądrzastych krwi obwodowej u 88 4,5-letnich dzieci z fińskiej kohorty PASTURE. Ekspozycja na stajnie z sianem była związana ze zwiększoną spontaniczną

produkcją IL-13, która to, co ciekawe, korelowała z produkcją IFN- γ . Pozwoliło to wyciągnąć wnioski, że ochronny efekt, który spełnia kontakt ze środowiskiem gospodarczym na rozwój chorób alergicznych nie może być wyjaśniony jedynie przez równowagę pomiędzy odpowiedzią Th1- i Th2-zależnej ale także przez inne mechanizmy takie jak kontrola odpowiedzi Th-2 zależnej i zapobieganie efektom wywołanym przez IL-13 przez komórki T regulatorowe oraz dendrytyczne (135). W badaniu własnym nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu IL-13 wśród osób różniących się częstością kontaktów z poszczególnymi gatunkami zwierząt i czynnościami w gospodarstwie rolnym ($p > 0,05$). Kiedy weźmie się pod uwagę tylko osoby mające kontakt z drobiem lub zbierające jaja można zaobserwować tendencję do niższych stężeń IL-13 w surowicy u pacjentów zgłaszających takie czynności. Stwierdza się także, że częsty kontakt predysponuje do niższych stężeń IL-13 niż kontakt sporadyczny. Gautam i wsp. w swojej pracy dotyczącej hodowców kurczaków wspomnianej powyżej mierzyli także wydzielaną przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej interleukinę 13. Spontaniczna produkcja tej cytokiny nie różniła się pomiędzy grupą farmerów a pracowników biurowych. Po stymulacji była znacznie większa, a wyraźniejszy wzrost obserwowano w grupie nie-farmerów. (136). Wyniki tego badania są tylko częściowo spójne z moimi, wydaje się, że głównym problemem pozostaje zbyt mała liczba włączonych osób. Prawdopodobnie do dokładniejszej oceny potrzebne są dalsze badania obejmujące co najmniej kilkutyśniczną kohortę.

W pracy własnej nie stwierdzono aby kontakt ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia miał związek ze stężeniem IL-13 w surowicy. Do tożsamyh wniosków doszli Yu i wsp. którzy badali cytokiny komórek jednojądrzastych, co prawda krew nie pochodziła od dzieci w pierwszym roku życia, ale była pozyskiwana z pępowiny w trakcie porodu, a ekspozycja dotyczyła kobiet będących w ciąży. Nie wykazano istotnych różnic w wydzielaniu IL-13. Noworodki mam żyjących na farmie ujawniały jednak tendencję do zmniejszonej sekrecji IL-13 po próbie z peptydoglikanami i LPS, ale nie była ona istotna statystycznie. W przeciwieństwie do badania opisywanego w powyższym akapicie niższa produkcja IL-13 wiązała się ze zwiększoną produkcją IFN- γ co za tym idzie współczynnik IFN- γ /IL-13 po ekspozycji komórek na PPG i LPS wzrósł istotnie w grupie kobiet żyjących w gospodarstwie (169).

Porównywano także związek pomiędzy stężeniem IL-13 w surowicy u poszczególnych grup badanych osób: astmatycy, atopicy i grupa kontrolna a kontaktem ze zwierzętami

w momencie badania oraz w pierwszym roku życia. Nie stwierdzono żadnych istotnych zależności.

Stężenie IL-33 w surowicy atopików osiągało znacząco wyższe wartości niż u astmatyków oraz zdrowych ochotników. W pierwszej z grup wyniosło średnio 110,5 pg/mL, w drugiej 50,4 pg/mL, a w trzeciej 36,8 pg/mL. Stężenie IL-33 powyżej 46,5 pg/mL okazało się istotnym testem na obecność atopii. Do podobnych wniosków doszli Voloshyna i wsp. badając grupę 50 pacjentów, w tym połowę z atopią. Uzyskali wyższe stężenia IL-33 w surowicy atopików - 106.7 ± 95 pg/mL, niż w grupie kontrolnej - 53.4 ± 23 pg/mL, różnica była istotna statystycznie (170). Także chorzy na atopowe zapalenie skóry prezentują wyższe poziomy IL-33 (mediana 71,0 pg/mL) niż osoby z pokrzywką idiopatyczną, łuszczycą czy zdrowi (mediana 5,9 pg/mL). Ponadto IL-33 korelowała z nasileniem AZS w skali EASI (171). Istotną statystycznie zależność pomiędzy stężeniem IgE a stężeniem IL-33 w surowicy potwierdzają wyniki badań chińskich (172).

Liczne publikacje dowodzą związku podwyższonych poziomów IL-33 z zachorowaniem na astmę. W badaniach własnych również obserwowano taką tendencję jednak była ona poniżej istotności statystycznej ($p = 0,22$). W pracy Momen'a i wsp. średnia koncentracja IL-33 w populacji astmatyków wyniosła 322,6 pg/mL i była znacząco wyższa niż w grupie kontrolnej (139,7 pg/mL) (142). Taki sam trend obserwowali badacze indyjscy, uzyskując średnie stężenie IL-33 u astmatyków na poziomie 79.10 ± 20.62 pg/ml a w grupie kontrolnej 0.51 ± 0.26 pg/mL (173). Ahmadi i wsp. także wykazali, że stężenie IL-33 jest istotnie wyższe w surowicy pacjentów z astmą w porównaniu z osobami zdrowymi (174). Bahrami Mahneh i wsp. metodą ELISA badali stężenie IL-33 w surowicy dzieci z astmą oraz ich zdrowych rówieśników. Dzieci ze zdiagnozowaną astmą miały istotnie wyższe stężenie IL-33 (15.17 vs. 0.61 pg/mL; $p = 0.028$). Dodatkowo zaobserwowano, że pacjentów z umiarkowaną i ciężką astmą cechowały wyższe stężenia IL-33 w porównaniu do pacjentów z astmą lekką (175). Kalinauskaite-Zukauske i wsp. w badaniu opisywanym powyżej mierzyli stężenie IL-33 przed i po kontakcie z alergenem. Wyjściowe stężenie IL-33 w surowicy było znacząco wyższe w grupie osób z astmą niż u zdrowych ochotników i średnio wynosiło odpowiednio 65.7 pg/mL i 37.8 pg/mL, natomiast po prowokacji nie odnotowano wzrostów w żadnej z grup (163).

Chociaż wszystkie opisywane badania prowadzone były przy użyciu metody ELISA zwracają uwagę różnice w wartościach stężenia IL-33, obserwuje się nawet inne rzędy wielkości zależnie od prowadzonego badania i użytego zestawu. W Norwegii, przy użyciu surowic pozyskanych od astmatyków, oceniano 4 różne zestawy do określania poziomu IL-33 w surowicy metodą ELISA. Ujawniono trudności w wykryciu IL-33 co tłumaczono brakiem wystarczającej czułości i specyficzności użytych testów, zasugerowano, że IL-33 osiąga bardzo niskie stężenia w surowicy, ma różne izoformy związane z modyfikacją posttranslacyjną oraz może interferować z takimi czynnikami jak IL-1RL1-a co ogranicza możliwości badań nad tą cytokiną (176).

Wykazano, że stężenie IL-33 u osób które mają kontakt ze zwierzętami gospodarczymi było niższe niż w grupie nie mającej takiego kontaktu i wynosiło odpowiednio 25 ng/mL i 32 ng/mL. Różnica nie spełnia jednak wymogów istotności statystycznej; $p = 0,094$. Nie zaobserwowano także istotnej statystycznie różnicy w stężeniu IL-33 wśród osób różniących się częstością kontaktów z poszczególnymi zwierzętami (krowy, konie, owce, świnie, drób) i czynnościami w gospodarstwie rolnym ($p > 0,05$). Kiedy wyszczególniono grupy astmatyków, atopików oraz zdrowych ochotników także nie obserwowano istotnych różnic w stężeniach tej cytokiny w surowicy zależnie od raportowania ekspozycji na zwierzęta gospodarcze.

Średnie stężenie interleukiny 33 w surowicy nie zależało od kontaktu ze zwierzętami żyjącymi na farmach w pierwszym roku życia, także dla poszczególnych 58 osobowych grup: astmatycy, atopicy czy grupa kontrolna nie obserwowano żadnej istotnej zależności.

Otrzymane wyniki, głównie dotyczące stężenia IgE w surowicy mogą potwierdzić tezę o protekcyjnym wpływie kontaktów ze zwierzętami gospodarczymi we wczesnym okresie życia na rozwój chorób alergicznych. Opisane badania nie potwierdziły aby taki ochronny efekt był mediowany poprzez IL-13 lub IL-33.

Podsumowanie

Choroby atopowe oraz astma oskrzelowa, stanowią istotny problem w praktyce klinicznej. Istnieją liczne doniesienia, że czynnikiem ochronnym dla ich rozwoju jest życie w środowisku wiejskim i kontakt ze zwierzętami gospodarczymi. Do tej pory nie udało się z całą stanowczością stwierdzić jakie mechanizmy immunologiczne odpowiadają za to zjawisko. Ponieważ zwiększona produkcja interleukin 13 i 33 często wiązana jest z

astmą i atopią postanowiono ocenić związek pomiędzy ich stężeniem w surowicy a kontaktem ze zwierzętami gospodarczymi. Dodatkowo oceniono stężenie immunoglobuliny E. Według wiedzy autora jest to pierwsza tego typu praca w polskiej populacji.

Chociaż badanie stężenia interleukin 13 i 33 w surowicy jest powszechnie stosowane i analizowane w różnych jednostkach chorobowych, dużą trudnością wydaje się być istnienie wielu zmiennych, które na to stężenie mogą wpływać. W przypadku astmy oskrzelowej ważny może być nie tylko stopień zaawansowania choroby ale także moment w którym została pobrana próbka - czy pacjent był w okresie zaostrzenia czy bezobjawowym. Niestety w przypadku tej pracy nie dysponowano takimi danymi. Analizując dostępne piśmiennictwo można uważać, że byłyby one szczególnie cenne w przypadku oceny IL-13. Należy także zwrócić uwagę, że badanie stężenia tych cytokin w surowicy jest tylko jedną z metod oceny ich produkcji w organizmie. Dostępne publikacje niejednokrotnie wskazują na to, że warto zwrócić uwagę na ich poziom np. w płuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych czy tkance płucnej. Dużym ograniczeniem jest także fakt, że badana populacja miała niewielką ilość kontaktów z innymi niż drób gatunkami zwierząt gospodarczych. Przeszkodą w osiągnięciu istotności statystycznej i co za tym idzie wyciągnięciu bardziej precyzyjnych wniosków wydaje się być zbyt mała grupa osób włączonych do badania. Należy przypuszczać, że dalsze badania zakrojone na szerszą skalę z większą liczbą uczestników pozwolą jeszcze dokładniej zbadać wpływ kontaktów gospodarczych na stężenie IL-13 i IL-33. Nie bez znaczenia pozostaje także problem z samym precyzyjnym wykonywaniem pomiarów laboratoryjnych. Czułość i swoistość dostępnych na rynku testów bywa poddawana w wątpliwość.

Jeśli chodzi o ocenę stężenia IgE w surowicy badanych pacjentów udało się wyciągnąć wnioski spójne z bardzo licznymi publikacjami potwierdzającymi jej niższe poziomy u osób z kontaktem z gospodarstwem rolnym. Używane testy są dobrze wystandaryzowane i umożliwiają precyzyjne pomiary.

7. WNIOSKI

1. Zgodnie z oczekiwaniami w badanej populacji wysokie stężenie immunoglobuliny E występowało u osób z atopią oraz astmą oskrzelową, niezależnie od płci, wieku i zamieszkania w mieście lub na wsi. Stężenia IgE w ogólnej populacji było wyższe u młodych niż starszych osób. Niższe stężenia IgE występowały u pacjentów z astmą oskrzelową zamieszkujących w gospodarstwie rolnym, co może potwierdzać protekcyjny wpływ środowiska wiejskiego na zmniejszanie produkcji IgE u astmatyków.

2. Tendencję do niższych stężeń IgE w surowicy obserwuje się wśród osób mających na bieżąco styczność z żywym inwentarzem w całej badanej populacji oraz osobno w grupie astmatyków i atopików, co potwierdza, że czynnikiem ochronnym dla atopii w środowisku wiejskim może być aktualny kontakt ze zwierzętami w gospodarstwie.

3. Raportowanie kontaktu ze zwierzętami gospodarczymi w pierwszym roku życia wiązało się z niższymi stężeniami IgE niż w grupie bez takiej ekspozycji, taka zależność nie była jednak widoczna u pacjentów z astmą oskrzelową, co może wskazywać na mniejsze znaczenie takiej ekspozycji w pierwszym roku życia na rozwój astmy oskrzelowej niż samej atopii.

4. W badanej grupie nie udało się potwierdzić istotnej różnicy stężeń IL-13 w surowicy osób z astmą, atopią i w grupie kontrolnej, jednie wśród mężczyzn wyższe stężenia IL-13 u astmatyków niż w grupie kontrolnej były na granicy istotności statystycznej. Ta ciekawa obserwacja dotycząca innego rozkładu stężeń IL-13 u obu płci wymaga dalszych badań.

5. Aktualny kontakt ze zwierzętami z gospodarstwa oraz ekspozycja w pierwszym roku życia nie różnicowały stężenia IL-13 w badanych podgrupach, poza nieco niższym stężeniem IL-13 u astmatyków z historią kontaktu w pierwszym roku życia w porównaniu z astmatykami bez takiej ekspozycji, wpływ ekspozycji wiejskiej na rolę IL-13 w rozwoju astmy i atopii wymagałby badań na większej populacji.

6. Stężenia IL-33 były najwyższe w grupie atopowej, niższe u astmatyków i najniższe w grupie kontrolnej. Te różnice były najwyraźniej widoczne u młodszych badanych poniżej 57 roku. Wyniki te potwierdzają udział tej cytokiny w rozwoju atopii i astmy oskrzelowej.

7. Stężenie IL-33 w surowicy osób zgłaszających aktualny kontakt ze zwierzętami żyjącymi na farmie było nieistotnie niższe niż u osób bez takiej ekspozycji, kontakt w

pierwszym roku życia nie wpływał znacząco na różnice stężeń tej cytokiny w badanych grupach, co nie potwierdza znaczenia ekspozycji wiejskiej na produkcję tej cytokiny w atopii i astmie oskrzelowej w badanej populacji.

8. PIŚMIENNICTWO

1. Pawliczak R, Patofizjologia. W: Fal AM (red), Alergia, choroby alergiczne, astma Tom I (57-59). 2010, Kraków.
2. Bellanti JA, Settipane RA. The atopic disorders and atopy ... "strange diseases" now better defined! *Allergy and Asthma Proc.* 2017;38:241–242.
3. Thomsen SF. Epidemiology and natural history of atopic diseases. *Eur Clin Respir J.* 2015;2:1,24642.
4. Zheng T. The Atopic March: Progression from Atopic Dermatitis to Allergic Rhinitis and Asthma. *J Clin Cell Immunol.* 2014;5:2.
5. Oppenheimer J, Durham S, Nelson H, *et al.* Allergy diagnostic testing. 2014 [online]. Dostępny w internecie: http://www.worldallergy.org/professional/allergic_diseases_center/allergy_diagnostic/
6. Kim J, Kim BE, Leung D. Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications. *Allergy Asthma Proc.* 2019;40:84–92.
7. Illi S, von Mutius E, Lau S, *et al.* The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:925-931.
8. Komorowski J. Epidemiologia astmy w Polsce w oparciu o badania ECAP. Praca na stopień doktora nauk medycznych. Warszawa 2012.
9. Pekkanen J, Sunyer J, Antó JM, *et al.* Operational definitions of asthma in studies on its etiology. *Eur Respir J.* 2005;26:28–35.
10. Schleich FN, Manise M, Sele J, *et al.* Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation. *BMC Pulm Med.* 2013;13:2–9.
11. Manise M, Bakayoko B, Schleich F, *et al.* IgE mediated sensitisation to aeroallergens in an asthmatic cohort: relationship with inflammatory phenotypes and disease severity. *Int J Clin Pract.* 2016;70:596–605.
12. Fal AM, Kopeć A. W: Fal AM (red), Alergia, choroby alergiczne, astma. Tom I (390-397). 2010, Kraków.
13. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med.* 2012;18:716–725.
14. Esteban-Gorgojo I, Antolín-Amérigo D, Domínguez-Ortega J, *et al.* Non-eosinophilic asthma: current perspectives. *J Asthma Allergy.* 2018;11:267–281.

15. Panettieri RA. Neutrophilic and Pauci-immune Phenotypes in Severe Asthma. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2016;36:569–579.
16. Brożek JL, Bousquet J, Agache I, *et al.* Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines—2016 revision. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140:950–958.
17. Thomsen SF. Epidemiology and natural history of atopic diseases. *Eur Clin Respir J.* 2015;2:10.
18. von Mutius E, Martinez FD. Natural history, development, and prevention of allergic disease in childhood. W: Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW, Bochner B, Holgate ST, Simons FER, eds. *Middleton’s allergy: principles and practice* (4th edn). St Louis: Mosby, 2003:1169–1174.
19. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N, *et al.* Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108:147–334
20. Wheatley LM, Togias A. Clinical practice. Allergic rhinitis. *N Engl J Med.* 2015;372:456– 46
21. Samoliński B, Sybilski A. Alergiczny nieżyt nosa. W: Fal AM (red), *Alergia, choroby alergiczne, astma* Tom (256-257). 2010, Kraków.
22. Crobach MJ, Hermans J, Kaptein AA, *et al.* The diagnosis of allergic rhinitis: how to combine the medical history with the results of radioallergosorbent tests and skin prick tests. *Scand J Prim Health Care.* 1998;16:30–36.
23. Serrano C, Valero A, Picado C. Rhinitis and Asthma: One Airway, One Disease. *Archivos de Bronconeumología (English Edition),* 2005;41:569–578.
24. Duong-Quy S, Vu-Minh T, Hua-Huy T, *et al.* Study of nasal exhaled nitric oxide levels in diagnosis of allergic rhinitis in subjects with and without asthma. *J Asthma Allergy.* 2017;10:75–82.
25. Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, *et al.* Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *The Lancet.* 2006;368:733-743.
26. Burney P, Chinn S, Jarvis D, *et al.* Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *Eur Respir J.* 1996;9:687-695

27. Sybilski AJ, Raciborski F, Lipiec A, *et al.* Atopic dermatitis is a serious health problem in Poland. Epidemiology studies based on the ECAP study. *Postepy Dermatol Alergol.* 2015;32:1-10
28. Samoliński B, Sybilski A, Raciborski F, *et al.* Prevalence of asthma in children, adolescents and young adults in Poland - Results of the ECAP study. *Alergia Astma Immunologia.* 2009;14:27-34.
29. Kuna P, Kupryś-Lipińska I. Astma u dorosłych. W: Fal AM (red), *Alergia, choroby alergiczne, astma* Tom (283-284). 2010, Kraków.
30. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2021 update).
31. Pignataro FS, Bonini M, Forgiione A, *et al.* Asthma and gender: The female lung. *Pharmacol Res.* 2017;119:384–390.
32. Medsker B, Forno E, Simhan H, *et al.* Prenatal Stress, Prematurity, and Asthma. *Obstet Gynecol Surv.* 2015;70:773–779.
33. Thacher JD, Gehring U, Gruzieva O, *et al.* Maternal Smoking during Pregnancy and Early Childhood and Development of Asthma and Rhinoconjunctivitis – a MeDALL Project. *Environ Health Perspect.* 2018;126:1-13.
34. Grabenhenrich LB, Gough H, Reich A, *et al.* Early-life determinants of asthma from birth to age 20 years: A German birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133:979–988.
35. Harju M, Keski-Nisula L, Georgiadis L, *et al.* Parental smoking and cessation during pregnancy and the risk of childhood asthma. *BMC Public Health.* 2016;16.
36. Peters U, Dixon AE, Forno E. Obesity and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141:1169–1179.
37. Holguin F, Bleecker ER, Busse W. *et al.* Obesity and asthma: An association modified by age of asthma onset. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:1486–1493.
38. Carpaij OA, van den Berge M. The asthma–obesity relationship. *Curr Opin Pulm Med.* 2018;24:42–49.
39. Brooks C, Pearce N, Douwes J. The hygiene hypothesis in allergy and asthma: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013;13:70-77.
40. Van Tilburg Bernardes E, Arrieta MC. Hygiene Hypothesis in Asthma Development: Is Hygiene to Blame? *Arch Med Res.* 2017;48:717–726.
41. Sozańska B. Microbiome in the primary prevention of allergic diseases and bronchial asthma. *Allergol Immunopathol.* 2018;47:79-84.

42. Shimojo N, Izuhara K. Old friends, microbes, and allergic diseases. *Allergol Int.* 2017;66:513–514.
43. Kim H, Sitarik AR, Woodcroft K, *et al.* Birth Mode, Breastfeeding, Pet Exposure, and Antibiotic Use: Associations With the Gut Microbiome and Sensitization in Children. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2019;19:22.
44. Sozańska B. Raw Cow's Milk and Its Protective Effect on Allergies and Asthma. *Nutrients.* 2019;11:469.
45. Abbring S, Hols G, Garssen J, *et al.* Raw cow's milk consumption and allergic diseases – the potential role of bioactive whey proteins. *Eur J Pharmacol.* 2018;843:55-65.
46. Perdijk O, van Splunter M, Savelkoul HFJ, *et al.* Cow's Milk and Immune Function in the Respiratory Tract: Potential Mechanisms. *Front Immunol.* 2018;9:143
47. Van Neerven RJJ, Savelkoul HFJ. The Two Faces of Cow's Milk and Allergy: Induction of Cow's Milk Allergy vs. Prevention of Asthma. *Nutrients.* 2019;11:1945.
48. Branco PTBS, Alvim-Ferraz MCM, Martins FG, *et al.* Asthma in urban and rural pre- and primary school children according to the latest GINA definition. *Allergy.* 2020;00:1-5
49. Lourido-Cebreiro T, Salgado FJ, Valdes L, *et al.* The association between paracetamol and asthma is still under debate. *J Asthma.* 2016;54:32-38.
50. Beasley RW, Clayton TO, Crane J, *et al.* Association between paracetamol use in infancy and childhood, and risk of asthma, rhinoconjunctivitis, and eczema in children aged 6-7 years: analysis from Phase Three of the ISAAC programme. *Lancet.* 2008;372:1039–1048.
51. Beasley RW, Clayton TO, Crane J, *et al.* Acetaminophen use and risk of asthma, rhinoconjunctivitis and eczema in adolescents: ISAAC Phase Three. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183:171–178.
52. González-Barcala FJ, Pertega S, Pérez Castro T, *et al.* Exposure to paracetamol and asthma symptoms. *Eur J Public Health.* 2013;23:706–710.
53. Bakkeheim E, Mowinckel P, Carlsen KH, *et al.* Paracetamol in early infancy: the risk of childhood allergy and asthma. *Acta Paediatr.* 2011;100:90–96
54. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, *et al.* Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med.* 2002;347:869-877.

55. Leonardi-Bee J, Pritchard D, Britton J. Asthma and current intestinal parasite infection: systematic review and meta-analysis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:514-23.
56. Karmaus W, Botezan C. Does a higher number of siblings protect against the development of allergy and asthma? A review. *J Epidemiol Community Health,* 2002;56:209–217.
57. O'Connor GT, Lynch SV, Bloomberg GR, *et al.* Early-life home environment and risk of asthma among inner-city children. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141:1468–1475.
58. Lynch SV, Wood RA, Boushey H, *et al.* Effects of early-life exposure to allergens and bacteria on recurrent wheeze and atopy in urban children. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134:593-601.
59. Celedon JC, Milton DK, Ramsey CD, *et al.* Exposure to dust mite allergen and endotoxin in early life and asthma and atopy in childhood. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120:144-149.
60. Mejias A, Wu B, Tandon N, *et al.* Risk of childhood wheeze and asthma after respiratory syncytial virus infection in full-term infants. *Pediatr Allergy Immunol.* 2020;31:47-65.
61. Bergroth E, Aakula M, Elenius V, *et al.* Rhinovirus Type in Severe Bronchiolitis and the Development of Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019;8:588-595.
62. Wang IJ, Karmaus WJJ, Yang CC. Polycyclic aromatic hydrocarbons exposure, oxidative stress, and asthma in children. *Int Arch Occup Environ Health.* 2017; 90:297–303.
63. Riedler J, Braun-Fahrländer C, Eder W, *et al.* Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *The Lancet.* 2001;358:1129–1133.
64. Parsons M A, Beach J, Senthilselvan A, *et al.* Association of living in a farming environment with asthma incidence in Canadian children. *J Asthma.* 2017;54:239–249.
65. Stein MM, Hrusch CL, GozdzJ, *et al.* Innate Immunity and Asthma Risk in Amish and Hutterite Farm Children. *N Engl J Med.* 2016;375:411–421.
66. Brunekreef B, Von Mutius E, Wong GK, *et al.* Early life exposure to farm animals and symptoms of asthma, rhinoconjunctivitis and eczema: an ISAAC Phase Three Study. *Int J Epidemiol.* 2012;41:753–761.

67. Majkowska–Wojciechowska B, Pełka J, Korzon L, *et al.* Prevalence of allergy, patterns of allergic sensitization and allergy risk factors in rural and urban children. *Allergy*. 2007;62:1044-1050.
68. Sozańska B, Błaszczuk M, Pearce N, *et al.* Atopy and allergic respiratory disease in rural Poland before and after accession to the European Union. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:1347–1353.
69. Kirjavainen PV, Karvonen AM, Adams RI, *et al.* Farm-like indoor microbiota in non-farm homes protects children from asthma development. *Nat Med*. 2019;25:1089-1095.
70. Müller-Rompa SEK, Markevych I, Hose AJ, *et al.* GABRIELA Study Group. An approach to the asthma-protective farm effect by geocoding: Good farms and better farms. *Pediatr Allergy Immunol*. 2018;29:275-282.
71. Depner M, Taft DH, Kirjavainen PV, *et al.* Maturation of the gut microbiome during the first year of life contributes to the protective farm effect on childhood asthma. *Nat Med*. 2020;26:1766-1775.
72. Timm S, Frydenberg M, Janson C, *et al.* The Urban-Rural Gradient In Asthma: A Population-Based Study in Northern Europe. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;13:93.
73. Wennergren G, Ekerljung L, Alm B, *et al.* Asthma in late adolescence--farm childhood is protective and the prevalence increase has levelled off. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010;21:806-13.
74. Fall T, Lundholm C, Örtqvist AK, *et al.* Early Exposure to Dogs and Farm Animals and the Risk of Childhood Asthma. *JAMA Pediatr*. 2015;169:e153219.
75. Merchant JA, Naleway AL, Svendsen ER, *et al.* Asthma and farm exposures in a cohort of rural Iowa children. *Environ Health Perspect*. 2005;113:350-6.
76. Timm S, Svanes C, Frydenberg M, *et al.* Does parental farm upbringing influence the risk of asthma in offspring? A three-generation study. *Int J Epidemiol*. 2021;49:1874-1882.
77. Slaats GGG, Reinius LE, Alm J, *et al.* DNA methylation levels within the CD14 promoter region are lower in placentas of mothers living on a farm. *Allergy*. 2012;67:895–903.
78. Lee J-U, Kim JD, Park C-S. Gene-Environment Interactions in Asthma: Genetic and Epigenetic Effects. *Yonsei Med J*. 2015;56:877.

79. Michel S, Busato F, Genuneit J, *et al.* Farm exposure and time trends in early childhood may influence DNA methylation in genes related to asthma and allergy. *Allergy*. 2013;68:355–364.
80. Salter B, Lacy P, Mukherjee M. Biologics in Asthma: A Molecular Perspective to Precision Medicine. *Front Pharmacol*. 2022;12:793409.
81. Gans MD, Gavrilova T. Understanding the immunology of asthma: Pathophysiology, biomarkers, and treatments for asthma endotypes. *Paediatr Respir Rev*. 2020;36:118-127.
82. Cayrol C, Girard J-P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev*. 2017;281:154–168.
83. Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2004;4:123-31.
84. Nguyen J K, Austin E, Huang A, *et al.* The IL-4/IL-13 axis in skin fibrosis and scarring: mechanistic concepts and therapeutic targets. *Arch Dermatol Res*. 2019;312:81-92.
85. Tsarbopoulos A, Varnerin J, Cannon-Carlson S, *et al.* Mass spectrometric mapping of disulfide bonds in recombinant human interleukin-13. *J Mass Spectrom*. 2000;35:446-453.
86. Izuhara K, Shirakawa T. Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy. *Int J Mol Med*. 1999;3:3–10.
87. Tomasiak-Łozowska M, Bodzenta-Łukaszyk A, Tomasiak M, *et al.* Rola interleukin 13 i 5 w astmie. *Postepy Hig Med Dosw*. 2010;64:146-155.
88. Hershey GK. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:677-690.
89. Liu J, Li YY, Andiappan AK, Yan Y, *et al.* Role of IL-13R α 2 in modulating IL-13-induced MUC5AC and ciliary changes in healthy and CRSwNP mucosa. *Allergy*. 2018;73:1673-1685.
90. Lee CM, He CH, Nour AM, *et al.* IL-13R α 2 uses TMEM219 in chitinase 3-like-1-induced signalling and effector responses. *Nat Commun*. 2016;7:12752.
91. Chomarat P, Banchereau J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int Rev Immunol*. 1998;17:1–52.
92. Mannon P., Reinisch W. Interleukin 13 and its role in gut defence and inflammation. *Gut*. 2012 Dec;61(12):1765-73.

93. McCormick SM, Heller NM. Commentary: iL-4 and IL-13 receptors and signaling. *Cytokine*. 2015;75:38–50.
94. Graves PE, Kabesch M, Halonen M, *et al*. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105:506–513.
95. de Vries JE. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;102:165–169.
96. Zurawski G, de Vries JE. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today*. 1994;15:19–26.
97. Horie S, Okubo Y, Hossain M, *et al*. Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. *Intern Med*. 1997;36:179–185.
98. Malavia NK, Mih JD, Raub CB, *et al*. IL-13 induces a bronchial epithelial phenotype that is profibrotic. *Respir Res*. 2008;9:27.
99. Moriya C, Jinnin M, Yamane K, *et al*. Expression of matrix metalloproteinase-13 is controlled by IL-13 via PI3K/Akt3 and PKC- δ in normal human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 2011;131:655-661.
100. Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev*. 2004;202:175–190.
101. Ramireddy S, Raghuraman P, Khandelwal P, *et al*. A molecular simulation analysis of vitamin D targets interleukin 13 (IL13) as an alternative to mometasone in asthma. *3 Biotech*. 2018;8:373.
102. Prieto J, Lensmar C, Roquet A, *et al*. Increased interleukin-13 mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells of atopic patients with mild asthma after repeated low-dose allergen provocations. *Respir Med*. 2000;94:806–814.
103. Saha SK, Berry MA, Parker D, *et al*. Increased sputum and bronchial biopsy IL-13 expression in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:685–691.
104. Uzuner N, Babayigit Hocaoglu A, Olmez Erge D, *et al*. Raised interleukin-13 levels in cord blood increases the risk of allergic sensitization at 5 years of age. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2013;12:107-114.
105. Chen ZG, Li M, Chen YF, *et al*. Effects of dermatophagoides pteronyssinus allergen-specific immunotherapy on the serum interleukin-13 and pulmonary functions in asthmatic children. *Chin Med J*. 2009;122:1157–1161.

106. Leigh R, Ellis R, Wattie J, *et al.* Is interleukin-13 critical in maintaining airway hyperresponsiveness in allergenchallenged mice? *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:851–856.
107. Ma Y, HayGlass KT, Becker AB, *et al.* Novel recombinant interleukin-13 peptide-based vaccine reduces airway allergic inflammatory responses in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176:439–445.
108. Ma Y, Halayko AJ, Basu S, *et al.* Sustained suppression of IL-13 by a vaccine attenuates airway inflammation and remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013;48:540–549.
109. Marone G, Granata F, Pucino V, *et al.* The Intriguing Role of Interleukin 13 in the Pathophysiology of Asthma. *Front Pharmacol.* 2019;10:1387.
110. Gungl A, Biasin V, Wilhelm J, *et al.* Fra2 Overexpression in Mice Leads to Non-allergic Asthma Development in an IL-13 Dependent Manner. *Front Immunol.* 2018;9:2018.
111. Manson ML, Säfholm J, James, A, *et al.* IL-13 and IL-4, but not IL-5 nor IL-17A, induce hyperresponsiveness in isolated human small airways. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;145:808-817.
112. Kotsiou OS, Gourgoulisanis KI, Zarogiannis SG. IL-33/ST2 Axis in Organ Fibrosis. *Front Immunol.* 2018;9:2432.
113. Lingel A, Weiss TM, Niebuhr M, *et al.* Structure of IL-33 and Its Interaction with the ST2 and IL-1RAcP Receptors—Insight into Heterotrimeric IL-1 Signaling Complexes. *Structure.* 2009;17:1398–1410.
114. Hodzic Z, Schill EM, Bolock AM, *et al.* IL-33 and the intestine: The good, the bad, and the inflammatory. *Cytokine.* 2017;100:1–10.
115. Komai-Koma M, Xu D, Li Y, *et al.* IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol.* 2007;37:2779-2786.
116. Komai-Koma M, Gilchrist DS, McKenzie AN, *et al.* IL-33 activates B1 cells and exacerbates contact sensitivity. *J Immunol.* 2011;186:2584-2591.
117. Czyżewska-Buczyńska A, Żuk N, Romanowska-Micherda K, *et al.* Biologiczna rola interleukiny 33 i znaczenie w patofizjologii układu sercowo-naczyniowego. *Postepy Hig Med Dosw.* 2014;68:834-841.
118. Smithgall MD, Comeau MR, Park Yoon B-R, *et al.* IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK Cells. *Int Immunol.* 2008;20:1019–1030.

119. Yang Q, Li G, Zhu Y, *et al.* IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8⁺T cells. *Eur J Immunol.* 2011;41:3351–3360.
120. Hamzaoui A, Berraies A, Kaabachi W, *et al.* Induced sputum levels of IL-33 and soluble ST2 in young asthmatic children. *J Asthma.* 2013;50:803–809.
121. Ravanetti L, Dijkhuis A, Dekker T, *et al.* IL-33 drives influenza-induced asthma exacerbations by halting innate and adaptive anti-viral immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143:1355-1370.
122. Magat JM, Thomas JL, Dumouchel JP, *et al.* Endogenous IL-33 and Its Autoamplification of IL-33/ST2 Pathway Play an Important Role in Asthma. *J Immunol.* 2020;204:1592-1597.
123. Cheon IS, Son YM, Jiang L, *et al.* Neonatal hyperoxia promotes asthma-like features through IL-33-dependent ILC2 responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142:1100-1112.
124. Stolarski B, Kurowska-Stolarska M, Kewin P, *et al.* IL-33 Exacerbates Eosinophil-Mediated Airway Inflammation. *J Immunol.* 2010;185:3472–3480.
125. Parveen S, Saravanan DB, Saluja R, *et al.* IL-33 mediated amplification of allergic response in human mast cells. *J Recept Signal Transduct Res.* 2019;39:359-367.
126. Mofatt MF, Gut IG, Demenais F *et al.* A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med,* 2010;363:1211–1221.
127. Matloubi M, Ranjbar M, Assarehzadegan M, *et al.* The Impact of Interleukin (IL)-33 Gene Polymorphisms and Environmental Factors on Risk of Asthma in the Iranian Population. *Lung.* 2020;198:105–112.
128. Korppi M, Teräsjarvi J, Lauhkonen E, *et al.* IL33 rs1342326 gene variation is associated with allergic rhinitis at school age after infant bronchiolitis. *Acta Paediatr.* 2020;109:2112-2116
129. Savenije OE, Mahachie John JM, Granell R, *et al.* Association of IL33–IL-1 receptor–like 1 (IL1RL1) pathway polymorphisms with wheezing phenotypes and asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134:170–177.
130. Nabe T. Steroid-Resistant Asthma and Neutrophils. *Biol Pharm Bull.* 2020;43:31-35.

131. Yalcin AD, Uzun R. Anti-IgE Significantly Changes Circulating Interleukin-25, Vitamin-D and Interleukin-33 Levels in Patients with Allergic Asthma. *Curr Pharm Des.* 2019;25:3784-3795
132. Allinne J, Scott G, Lim WK, *et al.* IL-33 blockade impacts mediators of persistence and exacerbation in a model of chronic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144:1624-1637.
133. Smejda K, Borkowska A, Jerzynska J, *et al.* IL-33 is associated with allergy in children sensitized to the cat. *Allergol Immunopathol.* 2020;48:130-136.
134. Imai Y. Interleukin-33 in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2019;96:2-7.
135. Kääriö H, Huttunen K, Karvonen AM, *et al.* Exposure to a farm environment is associated with T helper 1 and regulatory cytokines at age 4.5 years. *Clin Exp Allergy.* 2016;46:71-7.
136. Gautam R, Heo Y, Lim G, *et al.* Altered immune responses in broiler chicken husbandry workers and their association with endotoxin exposure. *Ind Health.* 2018;56:10-19.
137. Asher MI, Keil U, Anderson HR, *et al.* International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J.* 1995;8:483-91.
138. Asher MI, García-Marcos L, Pearce NE, *et al.* Trends in worldwide asthma prevalence. *Eur Respir J.* 2020;24;56:2002094.
139. Arbes SJ, Calatroni A, Mitchell HE, *et al.* Age-dependent interaction between atopy and eosinophils in asthma cases: results from NHANES 2005-2006. *Clin Exp Allergy.* 2013;43:544-551.
140. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, *et al.* Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med.* 1989;320:271–277
141. Momen T, Ahanchian H, Reisi M, *et al.* Comparison of Interleukin-33 Serum Levels in Asthmatic Patients with a Control Group and Relation with the Severity of the Disease. *Int J Prev Med.* 2017;8:65.
142. Wittig HJ, Belloit J, De Fillippi I, *et al.* Age-related serum immunoglobulin E levels in healthy subjects and in patients with allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 1980;66:305–313.

143. Borish L, Chipps B, Deniz Y, *et al.* Total serum IgE levels in a large cohort of patients with severe or difficult-to-treat asthma. *AnnAllergy Asthma Immunol*. 2005;95:247–253.
144. Borlée F, Yzermans CJ, Krop EJM, *et al.* Residential proximity to livestock farms is associated with a lower prevalence of atopy. *Occup Environ Med*. 2018;75:453–460.
145. Alfven T, Braun-Fahrlander C, Brunekreef B, *et al.* Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle - the PARSIFAL study. *Allergy*. 2006;61: 414–421.
146. MacNeill SJ, Sozanska B, Danielewicz H, *et al.* Asthma and allergies: is the farming environment (still) protective in Poland? The GABRIEL Advanced Studies. *Allergy*. 2013;68:771–779.
147. Genuneit J, Strachan DP, Büchele G, *et al.* The combined effects of family size and farm exposure on childhood hay fever and atopy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013;24:293–298.
148. Riedler J, Eder W, Oberfeld G, *et al.* Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin Exp Allergy*. 2000;30:194–200.
149. Von Mutius E, Vercelli D. Farm living: effects on childhood asthma and allergy. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:861–868.
150. Perkin M, Strachan D. Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy? *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1374–1381.
151. Illi S, Depner M, Genuneit J, *et al.* Protection from childhood asthma and allergy in Alpine farm environments—the GABRIEL Advanced Studies. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:1470–1477.
152. Portengen L, Sigsgaard T, Omland O, *et al.* Low prevalence of atopy in young Danish farmers and farming students born and raised on a farm. *Clin Exp Allergy*. 2002;32:247–53.
153. House JS, Wyss AB, Hoppin JA, *et al.* Early-life farm exposures and adult asthma and atopy in the Agricultural Lung Health Study. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140:249–256.

154. vonHertzen L, MAKELA M, PETAYS T, *et al.* Growing disparities in atopy between the Finns and the Russians: A comparison of 2 generations. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:151–157.
155. Rogala B, Gluck J, Testy skórne. W: Fal AM (red), Alergia, choroby alergiczne, astma. Tom I (185-194). 2010, Kraków.
156. Ojwang V, Near BI, Takkinen HM, *et al.* Early exposure to cats, dogs and farm animals and the risk of childhood asthma and allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2020;31:265-272.
157. Ege MJ, Bieli C, Frei R, *et al.* Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:817–23.
158. Leynaert B, Neukirch C, Jarvis D, *et al.* Does living on a farm during childhood protect against asthma, allergic rhinitis, and atopy in adulthood? *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1829–34.
159. Radon K, Windstetter D, Eckart J, *et al.* Farming exposure in childhood, exposure to markers of infections and the development of atopy in rural subjects. *Clin Exp Allergy.* 2004;34:1178–83
160. Davoodi P, Mahesh PA, Holla AD, *et al.* Serum levels of interleukin-13 and interferon-gamma from adult patients with asthma in Mysore. *Cytokine.* 2012;60:431-7.
161. Dimitrova D, Youroukova V, Ivanova-Todorova E, *et al.* Serum levels of IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 and IL-17A in pre-defined groups of adult patients with moderate and severe bronchial asthma. *Resp Med.* 2019;154:144–154.
162. Lee YC, Lee KH, Lee HB, *et al.* Serum Levels of Interleukins (IL)-4, IL-5, IL-13, and Interferon- γ in Acute Asthma. *J Asthma.* 2001;38:665–671.
163. Kalinauskaite-Zukauske V, Janulaityte I, Januskevicius A, *et al.* Serum levels of epithelial-derived mediators and interleukin-4/interleukin-13 signaling after bronchial challenge with *Dermatophagoides pteronyssinus* in patients with allergic asthma. *Scand J Immunol.* 2019;90:e12820.
164. Bała G, Swincow G, Odrowaz-Sypniewska G, *et al.* Badania stężenia interleukiny 13 i 18 w surowicy krwi u dzieci z nadwrażliwością na mleko krowie [Interleukin 13 and 18 serum concentration in children with cow milk hypersensitivity]. *Med Wieku Rozwoj.* 2004;8:33-42.

165. Maier LM, Howson JM, Walker N, *et al.* Association of IL13 with total IgE: evidence against an inverse association of atopy and diabetes. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:1306-13.
166. Howard TD, Whittaker PA, Zaiman AL, *et al.* Identification and association of polymorphisms in the interleukin-13 gene with asthma and atopy in a Dutch population. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;25:377-84.
167. Hummelshoj T, Bodtger U, Datta P, *et al.* Association between an interleukin-13 promoter polymorphism and atopy. *Eur J Immunogenet.* 2003;30:355-9.
168. Hussein YM, El-Tarhouny SA, Shalaby SM, *et al.* Interleukin-13 receptor A1 gene polymorphism and IL-13 serum level in atopic and non-atopic Egyptian children. *Immunol Invest.* 2011;40:523-34.
169. Yu J, Liu X, Li Y, *et al.* Maternal exposure to farming environment protects offspring against allergic diseases by modulating the neonatal TLR-Tregs-Th axis. *Clin Transl Allergy.* 2018;8:34.
170. Voloshyna I, Mucci T, Sher J, *et al.* Plasma IL-33 in atopic patients correlates with pro-inflammatory cytokines and changes cholesterol transport protein expression: a surprising neutral overall impact on atherogenicity. *Clin Exp Allergy.* 2015;45:1554-65.
171. Tamagawa-Mineoka R, Okuzawa Y, Masuda K, *et al.* Increased serum levels of interleukin 33 in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70:882-8.
172. Yang DX, Li N, Zhang XL, *et al.* [Serum interleukin 18 and 33 levels and its clinical significance in asthma patients]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 2012;35:493-6.
173. Raeiszadeh Jahromi S, Mahesh PA, Jayaraj BS, *et al.* Serum levels of IL-10, IL-17F and IL-33 in patients with asthma: a case-control study. *J Asthma.* 2014;51:1004-13.
174. Ahmadi M, Fathi F, Fouladi S, *et al.* Serum IL-33 Level and IL-33, IL1RL1 Gene Polymorphisms in Asthma and Multiple Sclerosis Patients. *Curr Mol Med.* 2019;19:357-363.
175. Bahrami Mahneh S, Movahedi M, Aryan Z, *et al.* Serum IL-33 Is Elevated in Children with Asthma and Is Associated with Disease Severity. *Int Arch Allergy Immunol.* 2015;168:1–196.

176. Ketelaar ME, Nawijn MC, Shaw DE, *et al.* The challenge of measuring IL-33 in serum using commercial ELISA: lessons from asthma. *Clin Exp Allergy*. 2016;46:884-7.

9. STRESZCZENIE

Astma oskrzelowa stanowi istotny problem kliniczny będąc jedną z najczęstszych chorób przewlekłych u dzieci i młodych dorosłych. W licznych badaniach epidemiologicznych prowadzonych na przestrzeni ostatnich lat notuje się wzrost częstości zachorowań nie tylko na astmę ale także inne choroby alergiczne. Ich rozwój i przebieg determinują czynniki endogenne oraz egzogenne takie jak środowisko życia, infekcje, przyjmowane leki, narażenie na alergeny. Dorastanie w gospodarstwie rolnym i kontakt ze zwierzętami gospodarczymi, szczególnie w pierwszych latach życia, uznawane jest za czynnik protekcyjny rozwoju astmy i innych chorób alergicznych. Regularna styczność z mikroorganizmami i endotoksynami może modulować układ odpornościowy człowieka chroniąc przed jego nadreaktywnością.

Kluczową rolę w patogenezie astmy i nieprawidłowej odpowiedzi układu immunologicznego odgrywa subpopulacja limfocytów pomocniczych dojrzewających w kierunku odpowiedzi Th2-zależnej i produkujących charakterystyczny profil cytokin (IL-4, IL-5, IL-13) prowadzących do wytwarzania IgE przez limfocyty B, wzrostu, różnicowania i aktywacji eozynofili i mastocytów, uwolnienia mediatorów i w efekcie skurczu oskrzeli. IL-13 poprzez promowanie produkcji IgE, nadreaktywności oskrzeli, hipersekrecji śluzu i włóknienia odgrywa dominującą rolę w rozwoju i podtrzymaniu zapalenia alergicznego.

IL-33 jest alarminą produkowaną pod wpływem czynnika infekcyjnego lub środowiskowego przez komórki nabłonka i śródbłonka. Nasila ona nadreaktywność oraz stan zapalny dróg oddechowych poprzez hamowanie wrodzonej i nabytej odporności przeciwwirusowej, hamowanie reakcji cytotoksycznej, a także przez wpływ na komórki dendrytyczne i komórki nabłonkowe.

Celem pracy była ocena stężenia IgE, IL-13 i IL-33 w surowicy dzieci i dorosłych z astmą oskrzelową, atopią i grupie kontrolnej w odniesieniu do ekspozycji na czynniki środowiskowe typowe dla zamieszkania w gospodarstwie rolnym aktualnie i w pierwszym roku życia.

Do badania włączono grupę 174 osób w wieku od 9 do 75 lat, w tym 58 astmatyków, 58 atopików i 58-osobową grupę kontrolną. Surowice od pacjentów zostały pozyskane w 2012 roku w ramach projektu badawczego pt. *Zmiany w środowisku wiejskim i ich wpływ na częstość występowania chorób alergicznych na obszarach wiejskich w Polsce*. Do rozpoznania astmy i ANN użyto wystandaryzowanych pytań z

kwestionariusza ISAAC i ECRHS, a w dalszej części ankiety pozyskiwano informacje o pacjentach i ich kontaktach ze zwierzętami gospodarczymi. Oznaczenia stężenia parametrów immunologicznych dokonano metodą immunoenzymatyczną, a wyniki badań ankietowych i laboratoryjnych poddano analizie statystycznej.

Wysokie stężenie immunoglobuliny E występowało u osób z atopią oraz astmą oskrzelową. Tendencję do niższych stężeń IgE w surowicy obserwuje się wśród osób mających na bieżąco styczność ze zwierzętami gospodarczymi zarówno w całej badanej populacji oraz osobno w grupie astmatyków i atopików. Podobna tendencja do niższych stężeń IgE w surowicy była obserwowana wśród osób raportujących kontakt żywym inwentarzem w pierwszym roku życia ale tylko w całej badanej populacji.

Nie wykazano różnicy stężeń IL-13 w surowicy osób z astmą, atopią i w grupie kontrolnej oraz nie potwierdzono wpływu styczności ze zwierzętami żyjącymi na farmie na stężenie IL-13 wśród uczestników badania.

Stężenia IL-33 były najwyższe w grupie atopowej, niższe u astmatyków i najniższe w grupie kontrolnej. W surowicy osób zgłaszających aktualny kontakt ze zwierzętami żyjącymi na farmie stężenie IL-33 było nieistotnie niższe niż u osób bez takiej ekspozycji.

Kontakty ze zwierzętami gospodarczymi, także we wczesnym okresie życia, mogą mieć protekcyjny wpływ na rozwój chorób alergicznych. Nie można jednoznacznie potwierdzić wpływu ekspozycji na zwierzęta gospodarcze na stężenie IL-13 i IL-33 w surowicy.

10. SUMMARY

Assessment of selected immunological parameters in children and adults with atopy and asthma exposed to various environmental factors

Bronchial asthma being one of the most common chronic diseases in children and young adults is a significant clinical problem. The increase in the prevalence of allergic diseases, including asthma, was well documented in many epidemiological studies over the last years. Endogenous and exogenous factors such as residential environment, infections, medications taken and exposure to allergens determine their development and course. Growing up on farm and contact with farm animals, especially in the first years of life, is considered to be a protective factor in the development of asthma and other allergic diseases. Regular exposure to microorganisms and endotoxins can modulate the human immune system protecting against hyper-reactivity.

The crucial role in the pathogenesis of asthma and the abnormal immunological response is played by a T helper cells maturing into Th2-dependent response and producing a characteristic cytokine profile (IL-4, IL-5, IL-13) leading to IgE production by B lymphocytes, growth, differentiation and activation of eosinophils and mast cells, release of mediators and as a consequence bronchospasm.

IL-13 by promoting IgE production, bronchial hyper-reactivity, overproduction of mucus and fibrosis plays a predominant role in development and maintenance of allergic inflammation.

IL-33 was shown to act as an epithelial and endothelial alarmin in allergic and inflammatory diseases produced after the contact with infectious or environmental factor. Inhibiting antiviral immunity and the cytotoxic reaction and affecting dendritic and epithelial cells IL-33 enhances hyperresponsiveness and airway inflammation.

The aim of the study was to evaluate IgE, IL-13 and IL-33 serum level in people with bronchial asthma, atopy and in control group depending on their exposure to farm animals currently and in the first year of life.

174 people including 58 asthmatics, 58 atopics and 58 controls were enrolled to this study, age range 9 to 75. Sera from patients were obtained in 2012 as a part of the research project *Changes in the rural environment and their impact on the prevalence of allergic diseases in rural areas in Poland*.

For the diagnosis of asthma and AR, standardized questions from the ISAAC and EC-RHS questionnaires were used, further information about patients and their contacts with farm animals was also obtained in the questionnaire. To evaluate immunological parameters serum levels the enzyme linked immunosorbent assays was performed, the results of the questionnaire and laboratory tests were analyzed statistically.

High levels of immunoglobulin E were characteristic for patients with atopy and bronchial asthma. Among people having present contact with farm animals, both in the entire study population and separately in the groups of asthmatics and atopics, tendency to lower serum IgE levels was observed. A similar tendency to lower serum IgE levels, but only in the entire study population, was observed among people reporting contact with livestock in the first year of life.

There was no difference in serum IL-13 levels in patients with asthma, atopy and controls, and no effect of exposure to farm animals on the concentration of IL-13 among the participants was found.

IL-33 levels were highest in the atopic group, lower in asthmatics, and lowest in the control group. Participants reporting current contact with farm animals were likely to have insignificantly lower IL-33 serum level in the comparison to people without such exposure.

Exposure to livestock, also early in first years of life, may have a protective effect on the development of allergic diseases. Correlation between IL-13 and IL-33 serum levels and contact with farm animals is unclear.