

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND

BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

**Interleukiin-18 ja -31 määramine seerumist ning interleukiin-18 ja ICOS geenide
ekspressioon vererakkudes atoopilise dermatiidi ja tsöliaakiaga lastel**

Magistritöö (40 EAP)

Biomeditsiin

Piret Mihkelson

Juhendajad

Tamara Vorobjova, PhD

Sulev Ingerpuu, PhD

TARTU 2018

INFOLEHT

Interleukiin-18 ja -31 määramine vereseerumist ning interleukiin-18 ja ICOS geenide ekspressioon vererakkudes atoopilise dermatiidi ja tsöliaakiaga lastel

Magistritöös käsitleti atoopilise dermatiidi (AD) ja tsöliaakia (CD) seoseid tsütokiinide IL-18 ja IL-31 tasemega vereseerumis ning *IL-18* ja *ICOS* geenide ekspressiooni tasemega. Valimi moodustasid 192 poissi ja tüdrukut keskmise vanusega $6,88 \pm 0,35$ aastat. IL-18 ja IL-31 kontsentratsioonid haigete ja kontrollgrupi laste seerumis määrati Luminex meetodiga ning *ICOS* ja *IL-18* geeniekspressiooni reaalaaja-PCR-i abil. Töö tulemusena leiti, et IL-18 tase on kõrgem AD ja AD haigetel kaasneva tsöliaakiaga (AD+AD+CD grupis) võrreldes kontrollgrupiga. IL-18 geeniekspressioon oli statistiliselt oluliselt madalam AD+CD ja AD+AD+CD grupis võrreldes kontrollgrupiga. Statistiliselt olulisi seoseid *ICOS* geeniekspressiooni, *ICOS* geeni polümorfismide, IgE-m80 ja IgE-m81 esinemisega erinevates uuritavates gruppides ei esinenud. IL-31 väärtused jäid valitud metoodikat kasutades alla määramispiiri ($<46,3$ pg/ml), mille tõttu pole selles töös vastavaid andmeid esitatud.

Märksõnad: atoopiline dermatiit, tsöliaakia, IL-18, IL-31, ICOS

CERCS teaduseriala: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

Levels of serum interleukin-18 and -31 and whole blood gene expression of interleukin-18 and ICOS in children with atopic dermatitis and celiac disease

The aim of this study was to investigate the associations between cytokine levels of IL-18 and IL-31, and gene expression of IL-18 and ICOS in children with atopic dermatitis and/or celiac disease. This study comprised of 192 subjects (95 boys, 97 girls) with average age $6,88 \pm 0,35$ years. Luminex method was used to measure cytokine IL-18 and IL-31 levels in serum and real-time-PCR for gene expression of IL-18 and ICOS. Significantly higher values of cytokine IL-18 values were found in AD+AD+CD group compared to controls. Gene expression of IL-18 was significantly lower in AD+CD and AD+AD+CD group compared to controls. No statistically significant associations were found in gene expression of *ICOS*, *ICOS* gene polymorphism CTIC154_1C/T (rs10932037), IgE-m80, IgE-m81 and different study groups. Cytokine IL-31 levels remained below limit of detection and therefore no data is given.

Keywords: atopic dermatitis, celiac disease, IL-18, IL-31, ICOS

CERCS research project: B500 Immunology, serology, transplantation

SISUKORD

INFOLEHT	2
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	7
1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE	9
1.1 Atoopiline dermatiit.....	9
1.2 Tsöliaakia.....	11
1.3 Atoopilise dermatiidi ja tsöliaakia koosinemine	12
1.4 Interleukiin-18	13
1.5 Interleukiin-31	15
1.6 Indutseeritav T-raku kostimulaator (<i>ICOS</i>).....	17
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	18
2.1 Töö eesmärgid:	18
2.2 Materjal ja meetodika.....	18
2.2.1 Luminex-testi meetodika.....	21
2.2.2 RNA eraldamine ja pöördtranskriptsioon	22
2.2.3 Reaalaja-PCR	22
2.2.4 Dissotsiatsioonikõvera analüüs	23
2.2.5 mRNA taseme suhteline kvantiteerimine	24
2.3 TULEMUSED.....	25
2.3.1 Tsütokiinide IL-18 ja IL-31 taseme määramine.....	25
2.3.2 <i>IL-18</i> ja <i>ICOS</i> geeniekspressioon.....	29
2.3.3 <i>ICOS</i> geeni polümorfism CTIC154_1C/T	30
2.3.4 Stafülokoki enterotoksiini A ja B vastased IgE antikehad	31
2.4 ARUTELU	33
KOKKUVÕTE.....	38
Summary	40
KIRJANDUSE LOETELU	41

KASUTATUD VEEBIALLIKAD	49
KASUTATUD RAAMATUD	49
TÄNUAVALDUSED	50
LIHTLITSENTS	51

KASUTATUD LÜHENDID

ACTB – β -aktiin

AD – atoopiline dermatiit (ingl k. *atopic dermatitis*)

AGA-IgA – gliadiinivastased IgA antikehad (ingl k. *immunoglobulin A anti-gliadin antibody*)

AGA-IgG – gliadiinivastased IgG antikehad (ingl k. *immunoglobulin G anti-gliadin antibody*)

APC – antigeeni esitlev rakk (ingl k. *antigen presenting cell*)

CD – tsöliaakia (ingl k. *celiac disease*)

CI – usalduspiir (ingl k. *confidence interval*)

Ct – lävetsükkel

CTLA-4 – tsütotoksilise T-lümfotsüüdi antigeen-4 (ingl k. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*)

DAMP – koekahjustusele iseloomulikud molekulid (ingl k. *damage-associated molecular patterns*)

ELISA – ensüüm-immuunsorptsioonmeetod (ingl k. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ESPGHAN – Euroopa laste gastroenteroloogia, hepatoloogia ja toitumise ühingu (ingl k. *European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*.)

IgE – immunoglobuliin E (ingl k. *immunoglobulin E*)

FasL – (ingl k. *first apoptosis signal ligand*)

FLG – filagriin (ingl k. *filaggrin*)

GAPDH – glütseeraldehüüd-3 fosfaadi dehüdrogenaas

GM-CSF – granulotsüütide-monotsüütide kasvufaktor (ingl k. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

HLA – inimese peamine koesobivuskompleks (ingl k. *human leukocyte antigen*)

ICOS – indutseeritav T-raku kostimulaator (ingl k. *inducible T-cell co-stimulator*)

IFN- γ – interferoon gamma (ingl k. *intereron gamma*)

IgE-m80/81 – stafülokoki enterotoksiini A/B spetsiifilised IgE antikehad (ingl k. *Staphylococcal enterotoxin A/B-specific immunoglobulin E antibodies*)

I κ B – tuumafaktor kapp B inhibiitor (ingl k. *inhibitor of kappa B*)

IL-18 – interleukiin-18

IL-31 – interleukiin-31

IRAK – interleukiin-1 retseptorseoseline kinaas (ingl k. *interleukin-1 receptor-associated kinase*)

JAK – Janus kinaasid (ingl k. *Janus kinase*)

MAPK – mitogeen aktiveeritud proteiini kinaas (ingl k. *mitogen-activated protein kinase*)

MHC – peamine koosobivuskompleks (ingl k. *major histocompatibility complex*)

MyD88 – ingl k. *myeloid differentiation primary response 88*

NF- κ B – tuumafaktor kapp B (ingl k. *nuclear factor kappa B*)

NK-rakk – loomulik tapja-T-rakk (ingl k. *natural killer T cell*)

OR – šansside suhe (ingl k. *odds ratio*)

OSMR – onkostatiin M retseptor (ingl k. *oncostatin M receptor*)

PAMP – patogeeni molekulaarne muster (ingl k. *pathogen-associated molecular patterns*)

PI3K/AKT – fosfoinositiid-3 kinaas/proteiin kinaas B (ingl k. *phosphatidylinositide 3-kinases/protein kinase B*)

PRR – patogeeni äratundvad retseptorid (ingl k. *pattern recognition receptors*)

STAT3 - signaali transduktsiooni ja transkriptsiooni aktivaator 3 (ingl k. *signal transducer and activator of transcription 3*)

TCR – T-raku retseptor (ingl k. *T-cell receptor*)

Th-rakk – abi-T-rakk (ingl k. *helper T cell*)

T_m – sulamistemperatuur

TNF- α – tuumori nekroosifaktor- α (ingl k. *tumor necrosis factor- α*)

TRAF6 – nekroosifaktori retseptorseoseline faktor-6 (ingl k. *tumor necrosis factor receptor associated factor 6*)

TSLP – tüümuse strooma lümfoepoetiin (ingl k. *thymic stromal lymphopoietin*)

tTGA-IgA – koe transglutaminaaside vastased IgA antikehad (ingl k. *tissue transglutaminase immunoglobulin A antibody*)

tTGA-IgG – koe transglutaminaaside vastased IgG antikehad (ingl k. *tissue transglutaminase immunoglobulin G antibody*)

SISSEJUHATUS

Atoopiline dermatiit (AD) ja tsöliaakia (CD) on immuunsüsteemi häiretest põhjustatud haigused, mis arenevad sageli välja lapseas. AD on krooniline põletikuline nahahaigus, mida iseloomustab kuiv, lööbeline ja sügelev nahk. Haiguse avaldumist mõjutavad geneetiline taust, keskkonnafaktorid ja immunoloogilised mehhanismid. Tsöliaakia on autoimmuunhaigus, mille korral tekib päriliku eelsoodumusega inimestel gluteeni tarbimise tagajärjel peensoole limaskesta kahjustus. Tsöliaakia avaldub tavaliselt juba varases lapseas tuues endaga kaasa kroonilise kõhulahtisuse, ainevahetus- ja arenguhäired. Varasemalt on näidatud (Zauli jt., 2000; Ress, 2014), et sageli esinevad tsöliaakia ja atoopiline dermatiit koos, kuid pole täielikku selgust, kas nende haiguste põhjuseid juhivad samad immuunmehhanismid.

AD ja CD patogeneesi arvatakse põhjustavat interleukiinide (IL)-18 ja -31 kontsentratsiooni muutused veres ning stafülokoki enterotoksiini A ja B vastaste IgE antikehade olemasolu. Varasemalt on näidanud, et AD-haigetel on vereseerumis tõusnud IL-18 kontsentratsioon võrreldes kontrollgrupiga ning haiguse raskusaste korreleerub IL-18 kontsentratsiooniga seerumis nii lastel kui täiskasvanutel. Allergeenid, nagu tolmulestad ja lenduv õietolm, kutsuvad esile IL-18 taseme tõusu. On kindlaks tehtud ka, et *Staphylococcus aureus* enterotoksiini A ja B eraldumisel verre tõuseb oluliselt IL-18 tase. Tsöliaakia puhul on uuritud *IL-18* geeni ekspressiooni taset peamiselt lokaalselt kahjustunud peensoole limaskesta biopsiast, kuid mõnedes uuringutes on hinnatud tsütokiinide väärtusi ka perifeerses verest. Näiteks on leitud, et tsöliaakiaga isikutel on vere seerumis kõrgem IL-18 tase kui kontrollgrupis. Siiani pole uuritud seerumist määratud tsütokiinide väärtusi asümptomaatilise tsöliaakiaga indiviididel, kelle puhul võiks oodata erinevaid tulemusi sümptomaatilise tsöliaakiaga uuritavatest. On teada, et asümptomaatiline tsöliaakia vorm on üsna levinud ning potentsiaalsete pikajaliste komplikatsioonide vältimiseks kroonilise põletiku tõttu, oleks vajalik teada, kas süsteemne põletik muudab tsirkuleerivate tsütokiinide taset.

IL-31 tase on vereseerumis tõusnud erinevate nahahaiguste, sh atoopilise dermatiidi, aga ka näiteks Crohni tõve ja haavandilise koliidi korral. AD üks peamisi sümptomeid on nahasügelus, mille korral on seerumis tõusnud IL-31 tase ning see on korrelatsioonis haiguse aktiivsuse ja raskusastmega. On kindlaks tehtud, et AD isikutel stimuleerib stafüloki enterotoksiin B IL-31 mRNA ekspressiooni taseme tõusu perifeerse vere mononukleaarsetes rakkudes. Ka loomkatsete põhjal on kindlaks tehtud, et *Staphylococcus aureus*'e

enterotoksiinid indutseerivad IL-31 mRNA ekspressiooni atoopilistel hiirtel *in vivo*, viidates sellele, et *S. aureuse* kolonisatsioon ja superinfektsioon võivad panustada sügeluse tekkesse ja põletikulistesse muutustesse AD-ga isikutel. Kuigi IL-31 ja teatavate seedetrakti põletikuliste haiguste vahel on leitud seoseid, vajab IL-31 ja tsöliaakia vahelised võimalikud seosed veel uurimist.

Mõningaid indutseeritava T-raku kostimulaatori (*ICOS*) geeni polümorfisme on seostatud atoopiliste haigustega. Varasemalt on näidatud, et *ICOS* geeni promootorpiirkonnas asuvad kaks polümorfismi piirkonda on seotud sensibiliseerumisega õhu kaudu levivatele allergeenidele ning sellega seonduvalt on tõusnud ka IgE ja Th2 tsütokiinide tootmine. Kuid tulemused on siiski vastuolulised. Selles töös uuriti *ICOS* geeni promootorpiirkonnas paiknevat polümorfismi CTIC154_1C/T (rs10932037), mis võib mõjutada B-rakkude diferentseerumist ja IgE tootmist.

Käesoleva töö hüpoteesi kohaselt võiks AD ja CD-ga lastel oodata IL-18 ja ka võimalikku IL-31 taseme tõusu vereseerumis ning vastavate geenide ekspressioonitaseme tõusu vererakkudes. Me oletasime, et AD diagnoosiga uuritavatel võiks *S. aureuse* enterotoksiini A ja B vastaste IgE antikehade esinemise korral olla tõusnud AD diganoosiga uuritavatel tõusnud IL-18 ja IL-31 tase vereseerumis ning samuti võiks *ICOS* geeni promootorpiirkonna polümorfism CTIC154_1C/T (rs10932037) olla seotud AD patogeneesiga.

Hüpoteesidest lähtuvalt oli töö eesmärgiks võrrelda IL-18 ja IL-31 taset vereseerumis atoopilise dermatiidiga, tsöliaakiahaigetel ja kontrollgrupi lastel, määrata *IL-18* ja *ICOS* geenide ekspressiooni tase vererakkudes atoopilise dermatiidiga, tsöliaakiahaigetel ja kontrollgrupi lastel, võrrelda tsütokiinide IL-18 ja IL-31 taset ning *ICOS* ja *IL-18* geenide ekspressiooni taset stafülokoki enterotoksiini A ja B vastaste IgE määramistulemustega, leida, kas *ICOS* geeni polümorfism CTIC154_1C/T (rs10932037) esineb atoopilise dermatiidiga uuritavatel sagedamini kui kontrollgrupis.

Magistritöö eksperimentaalne osa teostati Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini Instituudi immunoloogia osakonnas. Töö teema on seotud Eesti Teadusfondi poolt finantseeritud uurimistoetusega projektile „Tsöliaakia ja atoopiline dermatiit. Koosinemine ja immunoloogilised aspektid“, Haridus- ja Teadusministeeriumi sihtfinantseeringuga projektile "Autoimmuunsuse molekulaarsed ja rakulised mehhanismid: autoimmuunse diabeedi ja kaasnevate haiguste uuring" ja institutsionaalse uurimistoetusega.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Atoopiline dermatiit

Atoopiline dermatiit (AD) on krooniline nahahaigus, mille peamiseks sümptomiteks on lööbeline, kuiv ja sügelev nahk (Weidinger ja Novak, 2015; McPherson, 2016). AD esineb sageli samaaegselt koos immuunglobuliin E (IgE) sõltuvate nn. atoopiliste haigustega, nagu bronhiaalastma, allergiline riniit ja toiduallergiad (Boguniewicz ja Leung, 2011), kuid ka tsöliaakiaga (Gallo jt., 1992; Uibo jt., 1996; Ress jt., 2014). AD algab enamasti varases lapseas, kuid välistatud pole ka haiguse teke noorukitel või täiskasvanutel (Weidinger ja Novak, 2015; McPherson, 2016). Enne kuuendat eluaastat on AD esinemissagedus poiste ja tüdrukute hulgas võrdne, kuid hiljem on täheldatud AD kõrgemat esinemissagedust tüdrukute hulgas võrreldes poistega (Grize jt., 2006). 60% juhtudest tekivad lastel AD sümptomid esimesel ja 90% juhtudest enne viiendat eluaastat (Spergel, 2010). AD sümptomid taanduvad 40–80% juhtudest viiendaks ja 60–90% juhtudest 15-daks eluaastaks (Spergel, 2010). Atoopiline dermatiit on kompleksne haigus, mille teke sõltub naha kaitsebarjääri efektiivsuse, immuunsüsteemi, geneetiliste ja keskkonnafaktorite omavahelistest mõjudest (McPherson, 2016). AD patogeneesi ei mõisteta veel täielikult, seega püütakse aru saada erinevate tegurite rollist ja nende omavaheliste seoste mõjust haiguse tekkele ja arengule.

Esmane immuunsüsteemi kaitseliin on nahk, mille paljude funktsioonide hulgas on ka organismi kaitsmine väliskeskkonna bioloogiliste, keemiliste ja füüsikaliste tegurite suhtes (McPherson, 2016). AD patogenees põhjustab naha kaitsebarjääri funktsiooni langust, kus olulisteks teguriteks on naha mikrofloora ning geneetiliste ja immunoloogiliste tegurite mõju filagriini (ingl. k. *filaggrin*, *FLG*) geeniekspressioonile epiteelirakkudes (Smith jt., 2006). *FLG* geen kodeerib filagriini valgu tootmist, mis mõjutab keratinotsüütide diferentseerumist küpseteks rakkudeks, vastutab sarvkihi intaktsuse ja metabolismi eest (Smith jt., 2006). Interleukiin (IL)-4, IL-13 ja IL-25 inhibeerivad *FLG* geeni ekspressiooni keratinotsüütides (Peng ja Novak, 2015). Filagriini funktsiooni häirumisel mängib rolli tuumuse strooma lümfoetiin (ingl. k. *thymic stromal lymphopoietin*, TSLP), mille toime suureneb naha epidermises madalmolekulaarsete ainete läbilaskvus ja allergeenide läbitungimine (Weidinger ja Novak, 2016). Mutatsioonid *FLG* geenis esinevad sagedamini lastel, kellel on atoopilised ekseemid, seal hulgas 25–50% AD diagnoosiga patsientidest (Palmer jt., 2006), ning seda on seostatud AD varjase alguse ja raske kuluga, allergeenide suhtes sensibiliseerumisega, IgE-vahendatud toiduallergiatega ning astma ja allergilise riniidi tekkega (McPherson, 2016). Suur

hulk on ka neid indiviide, kellel AD ei arene, kuigi esinevad mutatsioonid *FLG* geenis, mis tähendab, et haiguse patogenees on palju keerulisem (Irvine ja McLean, 2006; Brown ja McLean, 2009). On leitud, et *FLG* ekspressiooni epidermises inhibeerivad Th2-rakkude (abi-T-rakk, ingl. k. *helper-T-cell*) poolt sekreteeritud tsütokiinid, pH taseme tõus ja bakteriaalsed infektsioonid (Bieber, 2008; Howell jt., 2009).

On kindlaks tehtud, et AD korral väheneb naha normaalse mikrofloora mitmekesisus ja suureneb potentsiaalsete patogeenide hulk (Leyden jt., 1974; Kong jt., 2012). Lõhenenud nahk ja sage kratsimine panustavad naha kaitsebarjääri funktsiooni langusesse, mis suurendab võimalust nahainfektsioonide tekkeks (McPherson, 2016). Uuringute põhjal on leitud, et infektsioone põhjustab sageli *Staphylococcus aureus*, mille kandlust esineb ligi 90% AD-ga indiviididest (Bieber, 2008). *S. aureus* toodab eksotoksiine A, B, D ja toksilise šoki sündroomi toksiin-1, mis võivad käituda ka superantigeenidena, ja aktiveerivad Th2-rakkude vahendatud immuunvastust (Egawa ja Weninger, 2015). Th2-rakkude poolt sekreteeritud tsütokiinid IL-4 ja IL-13 inhibeerivad antimikroobsete valkude tootmist naha pinnal, mis soodustab infektsioonide teket (Guttman-Yassky jt., 2017).

AD patogeneesis vahelduvad akuutne (ägenemise) ja krooniline faas, kus domineerivad vastavalt Th1- ja Th2- vahendatud immuunvastus, kuid mõlemas faasis on roll ka Th17- ja Th22-rakkudel (Egawa ja Weninger, 2015). AD akuutse faasi patogeneesi kaskaad algab antigeeni kokkupuutel naha epiteelirakkudega, mille tagajärjel hakkavad viimased tootma tsütokiine IL-25, IL-33 ja lümfopoetiini TSLP (Guttman-Yassky jt., 2017). TSLP on lokaalne põletikumediaator, mille funktsiooniks on meelitada põletikukoldesse müeloidseid ja antigeeni esitlevaid rakke, nagu dendriittrakud, Langerhansi rakud, eosinofiilid ja basofiilid (Uibo jt., 2015). IL-25, IL-33 ja TSLP suunavad T-rakke diferentseeruma Th2-rakkudeks (Guttman-Yassky jt., 2017). Antigeenid stimuleerivad ka nuumrakke vabastama põletikumediaatoreid, nagu histamiin, IL-6, IL-8, tuumori nekroosifaktor- α (ingl. k. *tumor necrosis factor- α* , TNF- α) ja IL-31, millest viimast on AD patogeneesis seostatud sügeluse tekkega (Peng ja Novak, 2015). Langerhansi ja dendriittrakud migreeruvad lümfisõlme ja esitlevad oma pinnal antigeene seal paiknevatele naiivsetele T-rakkudele (Peng ja Novak, 2015; Guttman-Yassky jt., 2017). Th2-rakud migreeruvad koos Th17- ja Th22-rakkudega lümfisõlmest põletikukoldesse, kus nad sekreteerivad tsütokiine IL-4, IL-5, IL-13 (Peng ja Novak, 2015). IL-4 ja IL-13 säilitavad positiivse tagasiside mehhanismi kaudu Th2-rakkude tootmist (Peng ja Novak, 2015). B-lümfotsüütide ja teiste immuunrakkude pinnal ekspresseerub IL-4 retseptori α -subühik, mis mõjutab B-rakke tootma IgE-antikehi (Egawa ja Weninger, 2015). Spetsiifilised IgE antikehad osalevad antigeeni esitlemisel IgE Fc-retseptori

kaudu epidermaalsetele Langerhansi rakkudele (Mudde jt., 1990). AD kroonilises faasis domineerib Th1 immuunvastus, mida aktiveerivad Langerhansi ja dendriitrakkude poolt sekreteeritud IL-12 ja IL-18 (Peng ja Novak, 2015). Th1-rakud sekreteerivad IFN- γ , mis indutseerib keratinotsüütide apoptoosi (Peng ja Novak, 2015).

Keskkonnanafaktoritest mõjutavad kõige enam AD teket ja progresseerumist õhu kaudu levivad allergeenid, toiduallergeenid ja mikroorganismid, mille vastu on paljudel lastel tekkinud ka spetsiifilised IgE-antikehad (McPherson, 2016), kuid olulised on ka stress, kliimategurid (Nowicki jt., 2015). Uuringutes on leidnud kinnitust, et statistiliselt 20–40% AD diagnoosiga imikutel ja väikelastel on samaaegselt diagnoositud ka toiduallergia, kõige sagedamini lehmapiima, munade, kala, maapähkli, sojaubade ja nisu vastu (Nowicki jt., 2015). AD-ga imikud ja väikelapsed on kõige sagedamini allegilised lehmapiimavalgu ja munavalge suhtes, kuid vanemad lapsed, noorukid ja täiskasvanud on täheldatud allergiaid pigem loomsete ja lenduvate allergeenide suhtes (Nowicki jt., 2015). Ligi 50% AD-ga väikelastel tekib lööbe ägenemine pärast ühe või rohkema toiduallergeeni tarbimist (Nowicki jt., 2015).

1.2 Tsöliaakia

Tsöliaakia (ingl. k. *celiac disease*, CD) on multifaktoriaalne autoimmuunhaigus, mis põhjustab teraviljavalkude tarbimisel peensoole limaskesta kahjustust geneetilise eelsoodumusega inimestel (Murch jt., 2013). Peamised teraviljavalgud on gluteen nisus, hordeiin odras ja sekaliin rukkis (Kagnoff, 2005). Gluteen on valkude segu, milles on kaks peamist valku, gliadiin ja gluteeniin, mis sisaldavad rohkesti aminohappeid glutamiini ja proliini (Kagnoff, 2005). Kõrge proliini sisaldus muudab gluteeni vastupidavaks seedetrakti proteolüütiliste ensüümide toimele HLA-DR3DQ2 või HLA-DR4DQ8 haplotüüpidega indiviididel (Kagnoff, 2005; Murch jt., 2013).

Ligi 97% inimestel, kellel on geneetiline eelsoodumus tsöliaakiale, esinevad antigeeni esitlevate rakkude pinnal (ingl. k. *antigen presenting cell*, APC) inimese peamise koesobivuskompleksi (HLA) II klassi DQ2 (HLA-DR3DQ2) või DQ8 (HLA-DR4DQ8) molekulid (Mantegazza jt., 2015). Gluteeni tarbimise järel, gliadiinifragmendid läbivad peensoole epiteelikihi ning sisenevad limaskesta päris kihti, kus gliadiin deamineeritakse koetransglutaminaaside poolt (De Re jt., 2017). Gliadiin seostub antigeeni esitlevate rakkude pinnal DQ2 või DQ8 molekulidega, mida esitletakse T-rakkudele peensoole limaskesta *lamina propria*s. Vastusena sekreteerivad T-rakud IL-18 toimeel põletikumediaatoreid IFN- γ

ja IL-21 (De Re jt., 2017) ning B-rakud toodavad spetsiifilisi antikehi koetransglutaminaaside, endomüüsiumi- ja deamineeritud gliadiinipeptiidide vastu (Mantegazza jt., 2015; De Re jt., 2017). Põletikureaktsiooni tõttu on suurenenud intraepiteliaalsete lümfotsüütide hulk peensoole limaskestas (Paul jt., 2015) ning uute tsütokiinide vabanemine aktiveerib tsütotoksilisi T-rakke, mis põhjustab peensoole limaskesta kahjustust, soolekrüptide hüperplaasiat ja -hattude atroofiat (De Re jt., 2017). Muutused peensoole epiteelis vähendavad toitainete, rasvlahustuvate vitamiinide ja mineraalide imendumist, kutsudes esile tervisehäireid ja suurenenud riski sooleväliste sümptomite esinemiseks (Murch jt., 2013).

Tsöliaakia diagnoos põhineb kliinilisel pildil, seroloogilistel skriiningtestidel ja peensoole biopsial (Marsh, 1992). Skriiningtestidega hinnatakse immuunglobuliin A, koe transglutaminaaside vastaste IgA- ja IgG-tüüpi autoantikehade (tTGA-IgA, tTGA-IgG) ning gliadiinivastaste IgA- ja IgG-tüüpi autoantikehade (AGA-IgA, AGA-IgG) taset seerumis. Tsöliaakiasse haigestumine on tõenäolisem kui esimese astme sugulasel on nimetatud haigus leitud või esineb mõni järgnevatest haigusseisunditest, nagu esimest tüüpi diabeet, autoimmuunne türeoidiit, maksahaigus või herpetiforme dermatiit (Marsh, 1992). Tsöliaakia korral ületab koe transglutaminaaside vastaste autoantikehade tase üle kümne korra normaalväärtust ning riskigruppi kuuluvatele patsientidele tehakse ka peensoole biopsia (Marsh, 1992). Oluline on diagnoosida tsöliaakiat võimalikult varajases staadiumis, et vältida ulatuslikku peensoole limaskesta kahjustust.

Tsöliaakia korral võib kliiniline pilt olla varieeruv. Lastel esinevad sageli gastrointestinaalsed sümptomid, nagu kõhuvalu, kõhulahtisus ja kaalulangus (Paul jt., 2015). Lisaks on täheldatud sooleväliste sümptomitena rauapuudusaneemiat, vitamiin D defitsiiti, kasvupeetust, maksahaigusi, haavandeid suus, lihasnõrkust, osteoporoosi, hambaemali defekte, hilisemas eas ka viljatust (Murch jt., 2013). Tsöliaakia võib esineda ka asümptomaatiliseks ning selle tõttu jääb lastel ligi 90% juhtudest diagnoosimata (Paul jt., 2015).

1.3 Atoopilise dermatiidi ja tsöliaakia koosesinemine

Atoopiline dermatiit ja tsöliaakia on multifaktoriaalsed kroonilised haigused, mida põhjustavad geneetilised, immunoloogilised ja keskkonnategurid. Nimetatud haigused esinevad sageli samaaegselt (Gallo jt., 1992; Uiho jt., 1996; Ress jt., 2014), kuid siiani pole täielikku selgust, kas need kaks haigust on omavahel seotud ja milline võiks see seos olla. Tsöliaakia kliiniline pilt võib varieeruda kliinilisest subkliiniliseni (Murch jt., 2013; Paul jt., 2015) ning mõned teadlased on jõudnud seisukohale, et selle asümptomaatiline vorm esineb

sagedamini kui algselt arvatud ning see võib olla kaasuvaks haiguseks nii autoimmuun- kui ka mitteautoimmuunhaiguste korral (Collin jt., 1994).

On leitud, et tsöliaakia esineb sageli isikutel, kellel on varasemalt diagnoositud mõni atoopiline haigus võrreldes nende uuritavatega, kellel atoopilisi haigusi pole. Eestis läbi viidud uuringu põhjal selgus, et 0,9%-l atoopilise dermatiidi haigetest esines tsöliaakia (Uibo jt., 1996). Ress jt (2014) leidsid, et 1,4% varasema atoopilise dermatiidi diagnoosiga uuritavatel esines tsöliaakia, mis on neli korda kõrgem kui kontrollgrupis. Itaalias tehtud uuringus (Zauli jt., 2000) selgus, et atoopiaga uuritavate hulgas oli tsöliaakia esinemissagedus 1%, seevastu vastav näitaja kogu Itaalia populatsioonis on 0,2%. Mitmed autorid (Zauli jt., 2000; Ress jt., 2014) peavad atoopilisi haigusi tsöliaakia riskiteguriteks ning nendele patsientidele tuleks regulaarselt teha skriiningteste tsöliaakiale spetsiifiliste autoantikehade suhtes.

1.4 Interleukiin-18

Interleukiin-18 (IL-18) kuulub IL-1 perekonna tsütokiinide hulka, mille funktsiooniks on indutseerida põletikuvastaste mediaatorite tootmist (Lee jt., 2015). IL-18 sünteesi määrav geen paikneb inimesel 11. kromosoomis, mis arvatakse olevat üks võimalik kandidaatgeen atoopiliste haiguste tekkes (Kruse jt., 2003). IL-18 on pleiotroopne tsütokiin, mis sõltuvalt tsütokiini ümbritsevast keskkonnast, aktiveerib Th1- või Th2- immuunvastuse (Tanaka jt., 2001; Kruse jt., 2003; Kim jt., 2007). IL-12 või IL-15 toimel mõjutab IL-18 T-rakke diferentseeruma Th1 suunas, indutseerides interferoon- γ (ingl. k. *interferon- γ* , IFN- γ) ja inhibeerib IgE sekretsiooni (Lee jt., 2015). IL-2 või IL-4 toimel mõjutab IL-18 T-rakke diferentseeruma Th2 suunas, indutseerides immuunoglobuliin E (IgE), IL-4 ja IL-13 tootmist (Lee jt., 2015).

IL-18 bioloogiliselt aktiivne vorm tekib inaktiivsest IL-18 eellasest (pro-IL-18) kaspas-1 proteolüütilise toime kaudu (Lee jt., 2015). Kaspas-1 aktivatsioonis mängib olulist rolli inflamasoom – valgukompleks, mis vahendab kaasasündinud immuunvastuse teket (Lee jt., 2015). Inflamasoom aktiveerub teatud stiimulite, nagu patogeeni molekulaarsete mustrite (ingl. k. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) või koekahjustusele iseloomulike molekulide (ingl.k. *damage-associated molecular patterns*, DAMP) ära tundmisel vastavate patogeeni äratundvate retseptorite (ingl.k. *pattern-recognition receptors*, PRR) kaudu (Lee jt., 2015). IL-18 võivad lisaks kaspas-1 aktiveerida veel kümaas, gransüüm B ja neutrofiilidest

pärinev proteinaas-3 (Lee jt., 2015). Pro-IL-18 on leitud mitmesugustest rakkudest, seal hulgas keratinotsüütidest, dentriitrakkudest, Kupfferi rakkudest, astrotsüütidest, mikrogliaast, peensoole epiteelirakkudest ja osteoblastidest (Shikano jt., 2001; Dinarello, 2006; Imboden jt., 2006; Sugama ja Conti, 2008; Lee jt., 2015). Interleukiin-18 retseptor (IL-18R) on heterodimeer, mis koosneb α - ja β -ahelast. α -ahel seondub rakuväliselt IL-18-ga ja β -ahel vastutab signaalkompleksi moodustumise eest (Thompson ja Humphries, 2007). IL-18R on leitud T-rakkudest, NK-rakkudest, B-rakkudest, makrofaagidest, neutrofiilidest, basofiilidest, endoteelirakkudest, silelihasrakkudest, kondrotsüütidest, keratinotsüütidest, fibroblastidest, melanotsüütidest ja mitmetest epiteelirakkudest (Dinarello, 2006; Lee jt., 2015).

IL-18 signaaliülekanerajas seostub interleukiin-18 IL-18R-ga ning moodustub signaalkompleks. Seejärel rakusisene Toll/IL-1 retseptor (TIR) seondub adaptervalgu MyD88 (ingl. k. *myeloid differentiation primary response 88*, MyD88) ja IL-1 retseptorseoselise kinaasiga ((ingl. k. *interleukin-1 receptor-associated kinase*, IRAK) (Lee jt., 2015). Tuumafaktor kapp B (ingl. k. *nuclear factor kappa B*, NF- κ B) signaalirajas fosforüleeritud IRAK seondub tuumori nekroosifaktori retseptorseoselise faktor 6-ga (ingl. k. *tumor necrosis factor receptor associated factor 6*, TRAF6), mis degradeerib tuumafaktori NF- κ B inhibiitori (ingl. k. *inhibitor of kappa B*, I κ B) ning NF- κ B vabaneb (Lee jt., 2015). NF- κ B reguleerib üles IL-18 ekspressiooni, mis mõjutab erinevate tsütokiinide, näiteks IL-4, IL-13 ja IFN- γ tootmist (Lee jt., 2015). IL-18 tootmine võib toimuda ka signaali transduktsiooni ja transkriptsiooni aktivaator 3 (ingl. k. *signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3) ja mitogeen aktiveeritud proteiini kinaasi (ingl. k. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) raja kaudu (Lee jt., 2015).

IL-18 on seotud mitmete põletikuliste nahahaiguste, nagu psoriaas, atoopiline dermatiit ja urtikaaria esinemisega (Ohta jt., 2001; Ohnishi jt., 2003; Puxeddu jt., 2013), aga ka näiteks tsöliaakiaga (Lettesjö jt., 2005). AD korral vahendab IL-18 Th-rakkude diferentseerumist Th2 või Th1 suunas. Uuringud on näidanud, et AD-haigetel on vereseerumis tõusnud IL-18 kontsentratsioon võrreldes kontrollgrupiga ning haiguse raskusaste korreleerub IL-18 kontsentratsiooniga seerumis nii lastel kui täiskasvanutel (Ohnishi jt., 2003; Trzeciak jt., 2011; Kou jt., 2012). Allergeenid, nagu tolmulestad ja lenduv õietolm, kutsuvad esile IL-18 ekspressiooni. On kindlaks tehtud, et *S. aureuse* enterotoksiini A ja B sekretsiooni korral on IL-18 tase oluliselt tõusnud (Terada jt., 2006, Suwarsa jt., 2017).

Tsöliaakia puhul uuritakse tsütokiinide esinemist peamiselt lokaalselt kahjustunud peensoole limaskestast biopsiast, kuid mõnedes uuringutes on hinnatud tsütokiinide väärtusi ka

perifeersest verest (Manavalan jt., 2010). Björck jt (2015) leidsid oma uuringus, et tsöliaakiahaigetel olid perifeerses veres tõudnud IFN- γ ja IL-12 tasemed, võrreldes kontrollgrupiga. Ootamatu tulemusena olid kontrollgrupiga võrreldes tsöliaakiahaigetel kõrgemad IL-5, IL-10 ja IL-13 väärtused, mis on iseloomulikud Th2-rakkude sekreteeritavad tsütokiinid (Björck jt., 2015). Siiani pole uuritud seerumist määratud tsütokiinide väärtusi asümptomaatilise tsöliaakiagaga indiviididel, kelle puhul võiks oodata erinevaid tulemusi sümptomaatilise tsöliaakiagaga uuritavatest (Björck jt., 2015). On teada, et asümptomaatiline tsöliaakia vorm on üsna levinud ning potentsiaalsete pikajaliste komplikatsioonide vältimiseks kroonilise põletiku tõttu, oleks vajalik teada, kas süsteemne põletik muudab tsirkuleerivate tsütokiinide väärtusi (Björck jt., 2015; Paul jt., 2015).

IL-18 ekspresseerub seedetraktis põletikuliste haiguste korral (Pizarro jt., 1999; Mazzarella jt., 2003). Crohni tõbe põdevatel inimestel oli IL-18 ekspressioonitase kõrgem nii limaskesta kahjustuskolletes kui ka tsütokiin IL-18 tase seerumis võrreldes kontrollgrupiga (Pizarro jt., 1999). IL-18 roll tsöliaakia patogeneesis on indutseerida IFN- γ tootmist ning IL-12 toimel aktiveerida Th1-rakke (Mazzarella, 2015). IL-18 toimib kostimulaatorina Th1-rakkudele, et suurendada granulotsüütide-monotsüütide kasvufaktori (ingl. k. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), IL-2 ja IL-2R- α hulka ning T- ja loomulike tapja-T-rakkude (ingl. k. *natural killer T cell*, NK-rakk) küpsemist (Mazzarella, 2015). On kindlaks tehtud, et gluteenivaba dieedi järgselt IL-18 tase tsöliaakiat põdevate inimeste seerumis langeb (Monteleone jt., 1999). IFN- γ ja IL-18 stimuleerivad makrofaage sekreteerima TNF- α , FasL ja IL-1 β , mis algatavad põletikuvastuse, viidates sellele, et IL-18 võib olla potentsiaalne peensoole limaskesta lümfotsüüte aktiveeriv faktor (Mazzarella, 2015). Mazzarella jt (2003) jõudsid järeldusele, et IL-18 kontsentratsioon seerumis võib lastel olla seotud tsöliaakia raskusastmega, kuid see vajab veel selgitamist.

1.5 Interleukiin-31

IL-31 kuulub IL-6 perekonna tsütokiinide hulka, mille geen paikneb inimese 12. kromosoomis (Cornelissen jt., 2012). IL-31 ekspresseerub aktiveeritud Th2 CD4⁺ T-rakkudel ja CD45RO CLA⁺ T-rakkudel, aga ka luuüdi rakkudel, lihasrakkudel, tüümuses, peensooles, trahheas ja spinaalganglionis (Zhang jt., 2008). IL-31 funktsiooniks on inhibeerida eosinofiilide apoptoosi ja stimuleerida eosinofiile sekreteerima proinflammatoorseid tsütokiine, nagu IL-1 β , IL-6 ning atoopilise dermatiididiga seotud kemokiine CXCL1, CXCL8, CCL2 ja CCL18 (Rabenhorst ja Hartmann, 2014). IL-31 retseptor (IL-31R) on

heterodimeer, mis kuulub tüüp I tsütokiini retseptorite perekonda (Zhang jt., 2008). IL-31 edastab oma signaali IL-31R- α -subühiku ja onkostatiin M retseptori (ingl. k. *oncostatin M receptor*, OSMR) kompleksi kaudu (Cornelissen jt., 2012). IL-31R- α on transmembraanne ja rakusisene domeen, millest viimane seostub Janus kinaaside (ingl. k. *Januse kinase*, JAK) perekonna kinaasidega, mis on vajalikud signaali vahendamiseks (Cornelissen jt., 2012). IL-31 retseptorkompleksi ekspresseerivad aktiveeritud monotsüüdid, makrofaagid, eosinofiilid, basofiilid, keratinotsüüdid ja spinaalganglioni närvirakud. IFN- γ ja lipopolüsahhariidid indutseerivad IL-31R ekspressiooni monotsüütidel (Zhang jt., 2008; Rabenhorst ja Hartmann, 2014).

JAK/STAT signaalirajas seondub IL-31 IL-31R-ga, mille tulemusel aktiveeruvad JAK1 ja JAK2 signaalmolekulid. JAK1 ja JAK2 stimuleerivad signaali ülekande ja STAT3, STAT5 ja STAT1 fosforüülimist, mille järel viimased aktiveeruvad, liiguvad rakutuuma ja indutseerivad sihtmärkgeenide ekspressiooni (Zhang jt., 2015). IL-31 võib kasutada lisaks JAK/STAT signaalirajale ka fosfoinositiid-3 kinaas/proteiin kinaas B (ingl. k. *phosphatidylinositide 3-kinases/protein kinase B*, PI3K/AKT) või MAPK rada (Zhang jt., 2015).

IL-31 tase on vereseerumis tõusnud erinevate nahahaiguste, sh atoopilise dermatiidi, aga ka näiteks Crohni tõve ja haavandilise koliidi korral (Rabenhorst ja Hartmann, 2014). AD üks peamisi sümptomeid on nahasügelus, kuid ravi antihistamiinidega on sageli ebaefektiivne ning viitab, et sügelust vahendavad teised mediaatorid, näiteks tsütokiinid või neuropeptiidid (Boguniewicz ja Leung, 2011). Nahasügeluse korral on seerumis tõusnud IL-31 tase ning on tõendeid, et see on korrelatsioonis haiguse aktiivsuse ja raskusastmega (Raap jt., 2008; Kim jt., 2011). Eksperimendis, kus uuriti *IL-31* mRNA ekspressioonitaset nahasügelust tekitava ja nahasügelust mitte tekitava AD ning kontrollgrupi isikutel, selgus, et *IL-31* mRNA ekspressioonitase oli oluliselt kõrgem nahasügelusega AD grupis, võrreldes teiste gruppidega (Sonkoly jt., 2006). On kindlaks tehtud, et AD isikutel stimuleerib stafüloki enterotoksiin B *IL-31* mRNA ekspressiooni perifeerse vere mononukleaarsetes rakkudes (Sonkoly jt., 2006). Nimelt, on *IL-31* mRNA ekspressioonitase kõrgem AD grupis võrreldes kontrollgrupiga. Stafülokoki enterotoksiinide mõjul on *IL-31R- α* ekspressioon monotsüütidel ja makrofaagidel üles reguleeritud nii mRNA kui valgu tasemel ning IL-31 aktiveerib monotsüütides ja makrofaagides IL-1 β , IL-6 ja IL-18 sekretsiooni (Kasraie jt., 2010). Ka loomkatsete põhjal on kindlaks tehtud, et *Staphylococcus aureus*'e enterotoksiinid indutseerivad *IL-31* mRNA ekspressiooni atoopilistel hiirtel *in vivo*, viidates sellele, et *S. aureus*e kolonisatsioon ja

superinfektsioon võivad panustada sügeluse tekkesse ja põletikulistesse muutustesse AD-ga isikutel (Dillon jt., 2004).

1.6 Indutseeritav T-raku kostimulaator (*ICOS*)

T-rakkude aktiveerimiseks peab T-raku retseptoriga (ingl. k. *T-cell receptor*, TCR) seostuma antigeen, mida esitleb oma pinnal antigeeni esitlev rakk (ingl. k. *antigen-presenting cell*, APC) T-rakule peamise koesobivuskompleksi (ingl. k. *major histocompatibility complex*, MHC) kaudu. Naiivsete T-rakkude aktivatsiooniks on vajalik tugev kostimulaatorne signaal, mida vahendavad CD28 või tsütotoksilise T-lümfotsüüdi antigeen-4 (ingl. k. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*, CTLA-4). Aastal 1999 avastati indutseeritav T-raku kostimulaator (ingl. k. *inducible T-cell costimulator*, *ICOS*), mis kuulub CD28 kostimulaatorsete tsütokiinide hulka (Hutloff jt., 1999). Erinevalt CD28-st, mis on naiivsete T-rakkude pinnal konstitutiivselt ekspresseeritud, ekspresseeritakse *ICOS* pärast T-raku aktivatsiooni *de novo* (Hutloff jt., 1999). *ICOS*, mis paikneb inimese 2. kromosoomis, on 55-60 kDa homodimeer ja koosneb kahest alaühikust, 27 ja 29 kDa (Beier jt., 2000). *ICOS* geeni funktsiooniks on kostimuleerida mitmete T-rakkude poolt sekreteeritavate tsütokiinide, nagu IL-4 ja IL-10 sünteesi (Beier jt., 2000). *ICOS*-ligand (*ICOS-L*) kuulub B7 retseptorite perekonda (Aicher jt., 2000). *ICOS-L* ekspresseerub aktiveeritud B-rakkudel, makrofaagidel, dendriitrakkudel ja epireelirakkudel (Aicher jt., 2000).

CD28, *ICOS* ja *CTLA-4* geenid 2. kromosoomis sisaldavad lookusi, mille polümorfismid võivad olla eelsoodumuseks autoimmuunhaiguste tekkel, nagu näiteks tsöliaakia, Gravesi tõbi ja esimest tüüpi diabeet (Gough jt., 2005). Mõningaid *ICOS* geeni polümorfisme on seostatud atoopiliste haigustega, kuid tulemused on siiski vastuolulised. Varasemalt on väidetud, et *ICOS* geeni promootorpiirkonnas asuvad kaks polümorfismi piirkonda (g.1-1413G>A, g.1-693G>A) on seotud sensibiliseerumisega õhu kaudu levivatele allergeenidele ning sellega seondult on tõusnud ka IgE ja Th2 tsütokiinide tootmine (Shilling jt., 2005). Beier jt (2009) uurisid lisaks kahele nimetatud polümorfismile veel nelja *ICOS*-e polümorfismi (g.1-2144C>T, g.1-2419T>C, g.20065C>G, g.22126G>T), mille seost atoopiliste haigustega polnud veel uuritud. Üksi eelnevalt nimetatud polümorfismidest polnud seotud atoopiliste haiguste, sh atoopilise dermatiidi, tekkega. *ICOS* geeni promootorpiirkonnas paiknevat polümorfismi CTIC154_1C/T (rs10932037) on seostatud esimest tüüpi diabeediga, kuid Douroudis jt (2009) uuringus see kinnitust ei leidnud.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid:

- 1) võrrelda IL-18 ja IL-31 taset vereseerumis atoopilise dermatiidiga, tsöliaakiahaigetel ja kontrollgrupi lastel;
- 2) määrata *IL-18* ja *ICOS* geenide ekspressioonitase vererakkudes atoopilise dermatiidiga, tsöliaakiahaigetel ja kontrollgrupi lastel;
- 3) võrrelda tsütokiinide IL-18 ja IL-31 taset ning *ICOS* ja *IL-18* geenide ekspressioonitaset stafülokokki enterotoksiini A ja B vastaste IgE määramistulemustega;
- 4) leida, kas *ICOS* geeni polümorfism CTIC154_1C/T (rs10932037) esineb atoopilise dermatiidiga uuritavatel sagedamini kui kontrollgrupis.

2.2 Materjal ja metoodika

Käesoleva magistritöö raames kasutatud uuringumaterjalid on kogutud dr. Krista Ressi poolt aastatel 2008-2012 Tallinna Lastehaiglas. Uuringusse kaasati 351 atoopilise dermatiidiga (AD) last Tallinna Lastehaiglast, 28 histoloogiliselt kinnitatud tsöliaakiahaiget last Tallinna Lastehaiglast ja Tartu Ülikooli Kliinikumi Lastekliinikust. Nende hulgast viiel lapsel esines korraga nii atoopiline dermatiit kui tsöliaakia. Kontrollgrupi moodustasid kokku 117 uuritavat, neist 56 last Tallinna Lastehaiglast, kellel muudel põhjustel teostatud gastroskopia abil tuvastati histoloogiliselt normaalne limaskest, ja 61 last Tartu Ülikooli Kliinikumi Lastekliinikust. Kontrollgruppi kuuluvatel lastel ei leitud eelnevalt teostatud uuringute tulemusena autoimmuunset ega ägedat põletikulist haigust (Ress, 2014). Uuritavate üldandmed on esitatud tabelis 1.

Tabel 1. Uuritavate arv erinevates uuringugruppides, vanus ja sooline koosseis (Ress, 2014).

	Atoopiline dermatiit	Tsöliaakia	Kontrollgrupp
Uuritavate arv	351 (42,4 % tüdrukud)	28 (64,3% tüdrukud)	117 (44,4% tüdrukud)
Vanus , aastat (mediaan; min; max)	5,8 (0,5; 18,8)	6,2 (1,0; 16,5)	7,95 (0,5; 17,7)

Eksperimentaalses töös kasutas autor dr. Krista Ressi poolt kogutud andmetest 192 erineva uuritava andmeid ja proovimaterjale. Uuritavate valim, kellel määrati tsütokiinid IL-18 ja IL-

31 on vaid osaliselt kattuv valimiga, kellel määrati ICOS ja IL-18 geenide ekspressioon. Magistritöös kasutatud erinevate valimite üldandmed on esitatud tabelis 2.

Tabel 2. Uuritavate arv, sooline koosseis, keskmine vanus.

	Uuritavate arv, n	Poisid, n	Tüdrukud, n
Tsütokiinide määramine	157	85	72
Vanus, aastat (keskväärtus; ± SE)	6,93 ±0,39	5,61 ±0,47	8,48 ±0,59
Geeniekspressiooni määramine	115	52	63
Vanus, aastat (keskväärtus; ± SE)	7,91 ±0,45	6,19 ±0,62	9,30 ±0,59
Kokku	192	95	97
Vanus, aastat (keskväärtus; ± SE)	6,88 ±0,35	5,50 ±0,44	8,22 ±0,50

157-st uuritavast, kellel määrati tsütokiinid IL-18 ja IL-31, esines AD 90 isikul, tsöliaakia 9 isikul, AD ja tsöliaakia samaaegselt 4 isikul ning kontrollgrupi moodustasid 54 uuritavat. ICOS ja IL-18 geeniekspressioon määrati 115 uuritaval, kellest AD diagnoos esines 49 isikul, tsöliaakia 9 isikul, AD ja tsöliaakia samaaegselt 5 isikul ning kontrollgrupi moodustasid 53 uuritavat.

Atoopilise dermatiidi diagnoosimise aluseks võeti patsiendi haiguslugu, objektiivne leid ja vastavus atoopilise dermatiidi diagnostilistele kriteeriumitele (Williams jt., 1994). Lisaks võeti uuritavatel vereanalüüs, mille põhjal määrati tsöliaakia esinemissagedus atoopilise dermatiidiga patsientidel, üld-IgE ja allergeenspetsiifilised IgE antikehad, stafülokoki enterotoksiini A ja B spetsiifilised IgE antikehad ning ICOS geeni promootorpiirkonnas paiknev polümorfism CTIC154_1C/T (rs10932037).

Kõikide uuritavate seerumeid säilitati –20 °C juures või madalam temperatuuril kuni analüüside tegemiseni. Kõik uuritavad, nende vanemad või eestkostjad allkirjastasid informeerimise ja uuringus osalemise nõusolekulehe. Uuringu läbiviimiseks toatleti luba Tartu Ülikooli Inimuuringute Eetika Komiteelt ning see oli kooskõlas Helsinki Deklaratsiooniga.

Tsöliaakia kindlaks tegemiseks atoopilise dermatiidiga patsientidel testiti uuritavate seerumeid koe transglutaminaaside vastaste IgA- ja IgG-tüüpi autoantikehadega (vastavalt tTGA-IgA, tTGA-IgG) ning deamineeritud gliadiinivastaste IgA- ja IgG-tüüpi antikehade (vastavalt AGA-IgA, AGA-IgG) määramist fluoroensüüm-immuunmeetria meetodil, kasutades vastavalt *ImmunoCAP EliA Gliadin DP* (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Rootsi) ja *ImmunoCAP EliA Celikey* süsteemi (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Rootsi). Tootja soovitude kohaselt hinnati mõlema süsteemi korral antikeha väärtused ≥ 10 EliA U/mL

positiivseks ja väärtused alla < 7 EliA U/mL negatiivseks. 7 ja 10 EliA U/mL vahele jäävad, nõ piiripealsed väärtused, hinnati negatiivseks. Uuritavatelt, kellel oli kahtlus tsöliaakiale või kelle tTGA-IgA oli seropositiivne, võeti peensoole biopsia diagnoosi kinnitamiseks. Selleks lähtuti Euroopa laste gastroenteroloogia, hepatoloogia ja toitumise ühingu (ingl. k. *European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*, ESPGHAN) (Walker-Smith jt., 1990) diagnostilistest kriteeriumitest ja peensoole limaskestast seisundit hinnati vastavalt Marsh'i klassifikatsioonile (Marsh, 1992).

Kõikidel uuritavatel määrati üld-IgE antikehad kemoluminescentsents-meetodil (*Roche Diagnostics*, Burgess Hill, UK; *Siemens Healthcare Diagnostics Inc*, Tarrytown, USA) ja tulemusi võrreldi tootja poolt antud vanusepõhiste referentsväärtustega. Lisaks määrati ka toiduallergeenide vastased IgE antikehad paneelide fx5 (munavalge, piim, nis, tursk, maapähkel, soja) ja fx20 (nisu, rukis, oder, riis) suhtes kasutades *ImmunoCAP Specific IgE* süsteemi (*Thermo Fisher Scientific*, Uppsala, Rootsi). Vastavalt tootja soovitudele hinnati väärtused $\geq 0,35$ kU/L positiivseks.

Stafülokoki enterotoksiini A ja B spetsiifilised IgE antikehad (vastavalt IgE-m80 ja IgE-m81) määrati kõikidel uuritavatel fluoroensüüm-immuunmeetria meetodil kasutades *ImmunoCAP Specific IgE* süsteemi (*Thermo Fisher Scientific*, Uppsala, Rootsi). Vastavalt tootja soovitudele hinnati väärtused, mis olid $\geq 0,35$ kU/L, positiivseks. 306 uuritaval määrati nii IgE-m80 kui IgE-m81, kellest 304 oli diagnoositud atoopiline dermatiit ja kahel atoopiline dermatiit samaaegselt tsöliaakiaga. Valimis oli IgE-m80 positiivne 15 uuritaval ja IgE-m81 21 uuritaval. Magistritöös võrreldi tsütokiini IL-18 ning *ICOS* ja *IL-18* geeni ekspressioonitaset IgE-80 ja IgE-m81 vastaste IgE antikehade olemasolu alusel. Käesolevas töös kasutati tsütokiin IL-18 väärtuste võrdlemisel 84 uuritava andmeid, neist 13 olid IgE-m80 positiivsed ja 71 negatiivsed ning 18 IgE-m81 positiivsed ja 66 negatiivsed. *IL-18* ja *ICOS* geeniekspressiooni suhteliste kvantitatiivsete väärtuste võrdlemisel kasutati 41 uuritava andmeid, kellest kaks olid IgE-m80 positiivsed ja 39 negatiivsed ning neli IgE-m81 positiivsed ja 37 negatiivsed.

ICOS geeni promootorpiirkonna polümorfism CTIC154_1 C/T (rs10932037) määrati kasutades *TagMan SNP Genotyping* süsteemi (*Thermo Fisher Scientific*, Uppsala, Rootsi) ning järgiti tootja protokollit (*TagMan SNP Genotyping Assays*, tootja juhend). *ICOS* geeni polümorfismi rs10932037 genotüübid ja alleelisagedused määrati kokku 411 uuritaval, kellest 341 kuulusid AD, 5 AD+CD, 9 CD ja 56 kontrollgruppi.

Töö autor kasutas varasemalt kogutud ja määratud andmeid (sugu, vanus, diagnoos, tTGA-IgA, tTGA-IgG, AGA-IgA, AGA-IgG, üld-IgE, IgE fx5 ja fx20, IgE-m80, IgE-m81, ICOS-geeni polümorfismid), määras ise IL-18 ja IL-31 väärtused täisverest ja *IL-18* ja *ICOS* geenide ekspressioonitaseme kasutades vastavalt *Magnetic Luminex Human Premixed Multi-Analyte Kit*'i (R&D Systems, Minneapolis, USA) ja reaalaaja-PCR meetodikat ning tegi andmete statistilise analüüsi.

Andmetöötluks kasutati programme *Microsoft Office Excel 2007* ja *GraphPad Prism 6* (San Diego, California, USA) tarkvara. Andmete statistiliseks analüüsimiseks kasutati gruppide võrdlemisel mitteamvuliste parameetrite korral χ^2 -testi, arvulise normaaljaotuse korral *Student's t*-testi, mittenormaaljaotuse puhul Mann-Whitney testi. Statistilise olulisuse nivooks oli $p < 0,05$.

2.2.1 Luminex-testi meetodika

Magnetic Luminex Assay Multiplex Kit'e kasutatakse biomarkerite väärtuste määramiseks erinevatest inimese proovimaterjalidest ning see võimaldab ühest proovist samaaegselt tuvastada mitut erinevat analüüti. Töö autor määras tootja protokoll (*Magnetic Luminex Assay*, tootja juhend) alusel *Human Premixed Multi-Analyte Kit*'i kasutades IL-18 ja IL-31 tasemed uuritavate seerumist.

Kasutatakse erineva värviga märgistatud magnetiliste omadustega mikropartikleid, mille külge on eelnevalt seotud analüüdispetsiifilised antikehad. Uuritav materjal ja magnetkuulikesed kantakse mikrokannudesse, kus magnetkuulikeste külge seotud antikehad seostuvad uuritavate valgumolekulidega. Seejärel lisatakse igasse kannu biotinüleeritud antikehad, mis seostuvad uuritavatele valgumolekulidele, ning streptavidiini-fükoerütriini konjugaat, mis omakorda seostub biotinüleeritud antikehadele. Tulemused analüüsitakse kasutades *Luminex xMap Technology Luminex 200TM* (*Luminex Corporation*, Austin, Texas, USA) analüsaatorit, mis kasutab voolutsütomeetria meetodit. Analüsaatoris on kaks erinevat lainepikkusel valgust emiteerivat diodi (*Light Emitting Diode, LED*), mis valgustavad mikropartikleid. Üks *LED* identifitseerib detekteeritud analüüdi ja teine *LED* määrab ära fükoerütriinilt pärineva signaali suurusjärgu, mis on otseses seoses seondunud analüüdi hulga. Tootjapoolne IL-18 määramispiirkond oli vahemikus 54,6–13 260 pg/ml ja IL-31 määramispiirkond oli vahemikus 46,3–11 260 pg/ml.

2.2.2 RNA eraldamine ja pöördtranskriptsioon

RNA oli eelnevalt eraldatud täisverest kasutades *Tempus Blood RNA Tube and Tempus Spin RNA Isolation Kit* (Applied Biosystems, Kalifornia, USA). RNA puhtuse taset ja kontsentratsiooni hinnati neeldusmisspektri alusel NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetril (Kisker Biotech, Steinfurt, Saksamaa). RNA neeldumisspekter registreeriti lainepikkuste vahemikus 260–280 nm. RNA neeldumismaksimum on 260 nm juures.

Töö autor sünteesis RNA-lt cDNA kasutades *FIREScript RT DNA Synthesis Mix with Oligo (dt) and Random Primers* (Solis BioDyne, Tartu, Eesti) järgides tootja protokoll (FIREScript RT cDNA Synthesis Mix, tootja juhend). Ühe proovi reaktsioonisegu kogumaht 20 µL sisaldas 1,5 µL *FIREScript Enzyme Mix*, 2 µL 10x *RT Reaction Premix with Oligo and Random Primers*, RNA-d ja nukleasivaba vett. Sünteesitud cDNA-d säilitati -20 °C juures reaalaaja-PCR-i tegemiseni.

2.2.3 Reaalaja-PCR

Reaalaja-PCR võimaldab kvantifitseerida fluorestsentsi järgi produkti tekkimist reaajas. Käesoleva eksperimendi tegemisel kasutati 5x *HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix-i* (Solis BioDyne, Tartu, Eesti). Reaktsioonisegu kogus ühe PCR-plaadi süvendi kohta oli 10 µL. Kuna kõiki proove lisati plaadile kolme paralleelina, tehti ühe proovi kohta 34,5 µL reaktsioonisegu, mis sisaldas 25,8 µL nukleasivaba vett, 7,2 µL 5x *HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix-i*, 1,5 µL 5 µM praimerite töölahust. Sellele reaktsioonisegule lisati 1,5 µL uuritavat cDNA-d. Igale PCR-plaadile lisati ka standard- ja kontrollproovid. Reaktsioonisegu ettevalmistamisel järgiti tootja soovitusi (5x *HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix*, tootja juhend). Fluorestsentsi signaali annab reaktsioonisegus *EvaGreen* värv, mis seondub kaheaheelalise cDNA-ga. Fluorestsentsi signaal kasvab iga tsükliga ning on korrelatsioonis tekkinud amplikonide hulgaga. Töö tegemisel kasutatud geenispetsiifilised praimerid (*Metabion International AG*, Planegg, Saksamaa) ja amplikonide pikkused on esitatud tabelis 3.

Reaalaja-PCR-i tegemiseks kasutati analüsaatorit *ViiA 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Kalifornia, USA), mille juurde kuulus ka tarkvara *ViiA 7 Software v1.1*.

Reaalaja-PCR tööprotokollit tegemisel järgiti tootja soovitusi (5x *HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix Data Sheet*). *HOT FIREPol DNA* polümeraas aktiveerub 12 minutilisel inkubeerimisel 95 °C juures. Töö autor kasutas 40 tsükli:

1. denaturatsioon 95 °C juures 15 sekundit;
2. praimerite seondumine 60 °C juures 30 sekundit;
3. DNA süntees 72 °C 30 sekundit.

Tabel 3. Tabelis on esitatud päri- ja vastassuunaliste praimerite nukleotiidne järjestus ja ampliconi pikkus aluspaarides.

Geen	Liik	Praimeri järjestus 5' →3'	Ampliconi pikkus (bp)
ACTB	<i>Homo sapiens</i>	AAGATCAAGATCATTGCTCCTC	118
		ACTCGTCATACTCCTGCT	
GAPDH	<i>Homo sapiens</i>	CAACTACATGGTTTACATCTTCCAATATG	127
		GGGATCTCGCTCCTGGAAG	
IL-18	<i>Homo sapiens</i>	GACGCATGCCCTCAATCC	106
		CTAGAGCGCAATGGTGCAATC	
ICOS	<i>Homo sapiens</i>	GACTCACAGATGTGACCC	132
		GTATGTAGTTAAGTCAGACTCTCC	

2.2.4 Dissotsiatsioonikõvera analüüs

PCR-i käigus võib toimuda praimerite dimeriseerumine ja mittespetsiifiline seostumine, mis annab fluorestsentsi signaali nagu ka praimerite spetsiifiline seostumine. Reaalaja-PCR-i analüsaator registreerib fluorestsentsi kogu reaktsiooni vältel ning graafikut on võimalik PCR-i järgselt analüüsida. Dissotsiatsioonikõver annab informatsiooni reaalaja-PCR-i reaktsioonide spetsiifilisuse kohta kirjeldades fluorestsentsi signaali tugevuse muutusi sõltuvalt temperatuuri muutumisest: kui fluorestsentsmärgisega kaheahelaline DNA dissotsieerub üheaahelaliseks DNA-ks oma sulamistemperatuuri (T_m) saavutades ehk temperatuuri tõusmisel, fluorestsentsi signaal langeb. Temperatuuri, mille juures 50% DNA-st on denatureerunud, nimetatakse dissotsiatsiooni- ehk sulamistemperatuuriks (T_m). Kuna nukleiinhapete sulamistemperatuur on mõjutatud mitmetest faktoritest, nt ahela pikkusest, GC-sisaldusest ja komplementaarsusest, saab erinevaid PCR-i produkte sageli eristada nende sulamistemperatuuri järgi. Näiteks on dimeriseerunud praimeritel madalam sulamistemperatuur kui ampliconil.

2.2.5 mRNA taseme suhteline kvantiteerimine

mRNA taseme suhtelised kvantitatiivsed väärtused arvutati kasutades $2^{-\Delta\Delta Ct}$ meetodit (Livak ja Schmittgen, 2001). Suhteline kvantiteerimine kirjeldab muutusi uuritava geeni ekspressioonis võrreldes referentsgeeniga. Meetod eeldab, et geeniekspressioon peab jääma muutumatuks erinevates eksperimentaalsetes tingimustes. Reaktsiooni edenemise käigus ületab fluorestsents määratud lävendit. Tsükli, millal lävendit ületatakse, nimetatakse lävetsükliks (Ct). Ct-d kasutatakse suhtelise geeniekspressiooni arvutamiseks uuritava ja referentsgeeni vahel, mille tulemusena leitakse ΔCt ($\Delta Ct = Ct$ (uuritav geen) – Ct (referentsgeen)). Kuna kõiki proove kanti PCR-plaadile kolme paralleelina, leiti enne ΔCt arvutamist Ct aritmeetiline keskmine. Igale PCR-plaadile kanti kontrollproovid ja standardproovi cDNA. $\Delta\Delta Ct$ on uuritava geeni ΔCt ja standardproovi ΔCt vahe. Kõikide proovide $\Delta\Delta Ct$ -väärtused arvutati vastava plaadi standardproovi suhtes. Referentsgeenidena kasutati β -aktiini (ACTB) ja glütseeraldehüd-3-fosfaat dehüdrogenaasi (GAPDH).

2.3 TULEMUSED

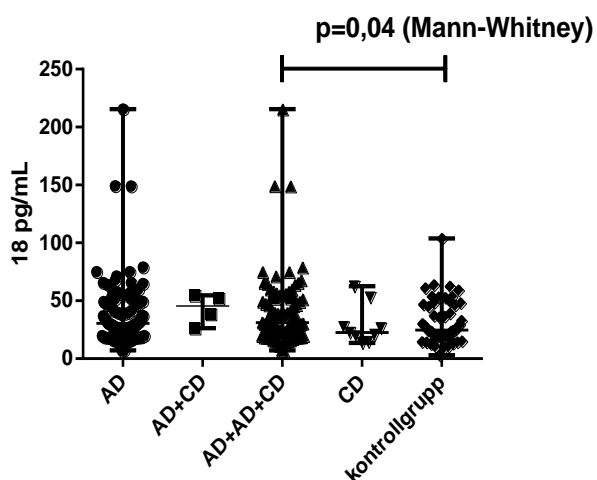
2.3.1 Tsütokiinide IL-18 ja IL-31 taseme määramine

IL-18 ja IL-31 tasemed määrati uuritavate vereseerumist. IL-18 taseme väärtused erinevates haigusgruppides ja kontrollgrupis on esitatud tabelis 4. Tabelist ilmneb, et võrreldes kontrollgrupiga on AD+AD+CD grupis, kuhu kuuluvad atoopilise dermatiidi (AD) ning atoopilise dermatiidi ja tsöliaakiahaiged (AD+CD) uuritavad, IL-18 väärtused statistiliselt oluliselt kõrgemad ($p=0,04$, Mann-Whitney; joonis 1). Teiste uuritavate gruppide vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud. Samuti polnud statistiliselt olulisi erinevusi samade uuritavate gruppide vahel eraldi poiste ega tüdrukute grupis ($p > 0,05$). IL-31 tase ei olnud kasutatud meetodiga määratav.

Tabel 4. Seerumist määratud IL-18 taseme keskväärtused ja mediaanid AD (uuritavad, kellel on atoopiline dermatiit), CD (uuritavad, kellel on tsöliaakia), AD+CD (uuritavad, kellel esineb samaaegselt atoopiline dermatiit ja tsöliaakia), AD+AD+CD (grupp, kus on kokku pandud AD-ga ja AD+CD-ga uuritavad) ja kontrollgrupis kogu valimis.

	AD	AD+CD	AD+AD+CD	CD	Kontroll-grupp
Uuritavate arv	90	4	94	9	54
IL-18, pg/mL (keskväärtus; \pm SE)	39,92 \pm 3,23	42,98 \pm 6,57	40,05 \pm 3,10	28,99 \pm 5,71	31,52 \pm 2,55
IL-18, pg/mL (mediaan; min; max)	30,57 (7,16; 215,4)	45,49 (26,33; 54,63)	31,14 ¹ (7,16; 215,4)	22,54 (13,67; 62,56)	24,68 ¹ (3,04; 103,9)

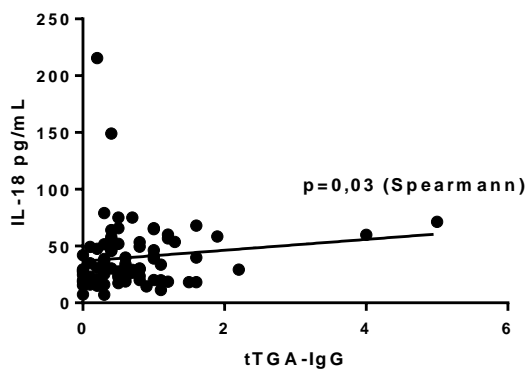
¹ $p=0,04$ (Mann-Whitney)



Joonis 1. Seerumist määratud IL-18 väärtused erinevates haigusgruppides ja kontrollgrupis. Statistiliselt oluliselt kõrgem IL-18 tase esines AD+AD+CD grupis võrreldes kontrollgrupiga.

Kõikidel uuritavatel võrreldi IL-18 taset positiivsete üld-IgE, toiduallegeenide vastaste IgE antikehade paneneelide fx20 ja fx 5 (vastavalt sIgE fx20 ja sIgE fx5) ja samade parameetrite negatiivsete määramistulemuste korral, kuid statistiliselt olulisi erinevusi IL-18 taseme vahel uuritavatel ei esinenud (tabel 5). Nimelt, IL-18 tase ei olnud kõrgem nendel uuritavatel, kellel esinesid üld-IgE, sIgE fx20 ja sIgE fx5 antikehad, võrreldes nende uuritavatega, kellel üld-IgE, sIgE fx20 ja sIgE fx5 antikehi ei esinenud. Samuti ei esinenud statistiliselt olulisi erinevusi IL-18 väärtustes samade parameetrite korral poiste (tabel 6) ega tüdrukute grupis (tabel 7).

Lineaarsel korrelatsioonianalüüsil otsiti IL-18 võimalikke seoseid üld-IgE, koe transglutaminaaside vastaste IgA- ja IgG-tüüpi (vastavalt tTGA-IgA ja tTGA-IgG) autoantikehade ning gliadiinivastaste IgA- ja IgG-tüüpi (vastavalt AGA-IgA ja AGA-IgG) antikehade ning sIgE fx20 ja sIgE fx5 vahel (tabel 8). Statistiliselt oluline seos leiti IL-18 ja tTGA-IgG vahel atoopilise dermatiidiga uuritavate grupis ($p=0,03$, Spearman) ning AD+AD+CD grupis ($p=0,02$, Spearman). Joonis 2 kirjeldab korrelatsiooni IL-18 ja tTGA-IgG vahel AD grupis. Teiste parameetrite ja IL-18 vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei esinenud (tabel 8).



Joonis 2. Korrelatsioon IL-18 ja tTGA-IgG taseme vahel AD-grupis.

Tabel 5. IL-18 tasemed üld-IgE, IgE fx20 ja IgE fx5 antikehade esinemise (pos) ja mitteesinemise (neg) korral kogu valimis.

	Üld-IgE pos	Üld-IgE neg	sIgE fx20 pos	sIgE fx20 neg	sIgE fx5 pos	sIgE fx5 neg
Uuritavate arv=157	86	71	28	129	57	100
IL-18, pg/mL (keskväärtus; ± SE)	35,85 ±3,85	37,24 ±3,12	39,94 ±7,36	35,73 ±2,01	38,59 ±4,01	35,28 ±2,38
IL-18, pg/mL (mediaan; min; max)	28,77 (7,16; 215,4)	28,83 (3,04; 149,2)	29,87 (7,16; 215,4)	28,31 (3,04; 149,2)	30,40 (7,16; 215,4)	28,23 (3,04; 149,2)
Mann-Whitney, p	0,78		0,92		0,55	
T-test, p	0,74		0,44		0,45	

Tabel 6. IL-18 väärtused poistel, kellel esinevad (pos) üld-IgE, sIgE fx20 ja sIgE fx5 antikehad võrreldes poistega, kellel on vastavaid antikehi ei esine (neg).

	Üld-IgE pos	Üld-IgE neg	sIgE fx20 pos	sIgE fx20 neg	sIgE fx5 pos	sIgE fx5 neg
Uuritavate arv=85	51	34	19	66	38	47
IL-18, pg/mL (keskväärtus; ± SE)	37,55 ±4,28	46,97 ±5,65	44,94 ±10,07	40,27 ±3,39	40,98 ±5,52	41,59 ±4,38
IL-18, pg/mL (mediaan; min; max)	29,50 (11,42; 215,4)	43,75 (10,95; 149,2)	34,27 (11,42; 215,4)	30,97 (10,95; 149,2)	31,95 (13,67; 215,4)	31,54 (10,95; 149,2)
Mann-Whitney, p	0,15		0,75		0,93	
T-test, p	0,18		0,57		0,93	

Tabel 7. IL-18 väärtused tüdrukutel, kellel esinevad (pos) üld-IgE, sIgE fx20 ja sIgE fx5 antikehad võrreldes tüdrukutega, kellel on vastavaid antikehi ei esine (neg).

	Üld-IgE pos	Üld-IgE neg	sIgE fx20 pos	sIgE fx20 neg	sIgE fx5 pos	sIgE fx5 neg
Uuritavate arv=72	35	37	9	63	19	53
IL-18, pg/mL (keskväärtus; ± SE)	33,38 ±3,23	28,31 ±2,17	29,38 ±8,13	30,97 ±1,92	33,81 ±4,80	29,69 ±2,00
IL-18, pg/mL (mediaan; min; max)	28,31 (7,16; 72,02)	24,26 (3,04; 61,08)	24,42 (7,16; 75,02)	26,59 (3,04; 75,00)	27,37 (7,16; 75,02)	26,33 (3,04; 64,02)
Mann-Whitney, p	0,38		0,37		0,67	
T-test, p	0,19		0,35		0,35	

Tabel 8. Seerumist määratud IL-18 taseme lineaarne korrelatsioonanalüüs üld-IgE, tTGA-IgA, tTGA-IgG, AGA-IgA, AGA-IgG, sIgE fx20 ja sIgE fx5 vahel AD, AD+AD+CD, CD ja kontrollgrupis. Tabelis on esitatud p-väärtused.

		IL-18, pg/mL						
Uuritavate arv=157		Üld-IgE	tTGA-IgA	tTGA-IgG	AGA-IgA	AGA-IgG	sIgE fx20	sIgE fx5
AD, p	90	0,41	0,98	0,03	0,91	0,13	0,57	0,62
AD+AD+CD, p	94	0,42	0,83	0,02	0,72	0,09	0,58	0,55
CD, p	9	0,16	0,64	0,13	0,52	0,49	0,18	0,25
Kontrollgrupp, p	54	0,39	0,67	0,89	0,80	0,71	0,77	0,25

2.3.2 *IL-18* ja *ICOS* geeniekspressioon

IL-18 ja *ICOS* geeniekspressiooni kvantitatiivseid tulemusi võrreldi erinevate haigusgruppide ja kontrollgrupi vahel kogu valimis. Tulemused on esitatud tabelis 9. *IL-18* ekspressioonitase β -aktiini suhtes erineb statistiliselt oluliselt AD+CD ja kontrollgrupi vahel. Nimelt, on *IL-18* $2^{-\Delta\Delta CT}$ väärtused madalamad AD+CD grupis võrreldes kontrollgrupi $2^{-\Delta\Delta CT}$ väärtustega ($p=0,03$, Mann-Whitney). *IL-18* ekspressioonitase GAPDH suhtes erineb statistiliselt oluliselt AD+AD+CD ja kontrollgrupi vahel. *IL-18* $2^{-\Delta\Delta CT}$ väärtused on madalamad AD+AD+CD grupis võrreldes kontrollgrupi $2^{-\Delta\Delta CT}$ väärtustega ($p=0,04$, Mann-Whitney). *ICOS* geeni ekspressioonitaseme osas erinevates uuritavates gruppides statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud.

Tabel 9. *IL-18* ja *ICOS* geenide ekspressioonitaseme kvantitatiivsed väärtused vererakkudest β -aktiini ja GAPDH suhtes erinevates haigusgruppides ja kontrollgrupis kogu valimis.

	AD	AD+CD	AD+AD+CD	CD	Kontroll-grupp
Uuritavate arv=117	49	5	54	9	54
<i>IL-18</i>, β-aktiin; (keskväärtus; \pm SE)	1,11 \pm 0,33	0,48¹ \pm 0,07	1,05 \pm 0,30	1,08 \pm 0,27	0,82¹ \pm 0,09
<i>IL-18</i>, β-aktiin; (mediaan; min; max)	0,7 (0,22; 16,49)	0,42 (0,37; 0,76)	0,68 (0,22; 16,49)	0,89 (0,26; 2,70)	0,62 (0,30; 4,27)
<i>IL-18</i>, GAPDH; (keskväärtus; \pm SE)	0,85 \pm 0,08	0,69 \pm 0,07	0,83 \pm 0,07	1,05 \pm 0,17	0,90 \pm 0,05
<i>IL-18</i>, GAPDH; (mediaan; min; max)	0,74 (0,30; 3,19)	0,70 (0,48; 0,91)	0,71² (0,30; 3,19)	0,91 (0,43; 1,98)	0,86² (0,18; 1,77)
<i>ICOS</i>, β-aktiin; (keskväärtus; \pm SE)	0,97 \pm 0,22	0,46 \pm 0,07	0,92 \pm 0,20	0,60 \pm 0,12	0,59 \pm 0,03
<i>ICOS</i>, β-aktiin; (mediaan; min; max)	0,69 (0,27; 8,56)	0,52 (0,20; 0,58)	0,60 (0,20; 8,56)	0,49 (0,24; 1,47)	0,55 (0,22; 1,15)
<i>ICOS</i>, GAPDH; (keskväärtus; \pm SE)	0,73 \pm 0,05	0,69 \pm 0,12	0,73 \pm 0,04	0,69 \pm 0,10	0,71 \pm 0,04
<i>ICOS</i>, GAPDH; (mediaan; min; max)	0,70 (0,27; 1,53)	0,73 (0,24; 0,91)	0,72 (0,24; 1,53)	0,74 (0,17; 1,08)	0,70 (0,19; 1,47)

¹ $p=0,03$ (t-test); ² $p=0,04$ (Mann-Whitney)

Uuritavatel võrreldi *IL-18* ja *ICOS* $2^{-\Delta\Delta CT}$ väärtusi üld-IgE, IgE fx20 ja IgE fx5 antikehade esinemise (pos) ja mitteesinemise (neg) korral kogu valimis. Ilmnes, et *IL-18* geeni ekspressioonitase GAPDH suhtes erineb sIgE fx20 grupis (tabel 10), kus *IL-18* $2^{-\Delta\Delta CT}$ väärtused on madalamad sIgE fx20 antikehade olemasolu korral võrreldes nende uuritavatega,

kellel sIgE fx20 antikehi ei esine (p=0,03, Mann-Whitney). *ICOS* geeni ekspressioonitaseme osas samade parameetrite korral statistiliselt olulisi erinevusi ei esinenud.

Tabel 10. *IL-18* ekspressioon vererakkudes GAPDH suhtes kõigil uuritavatel positiivsete ja negatiivsete üld-IgE, sIgE fx20 ja sIgE fx5 antikehade alusel.

	üld-IgE		IgE fx20		IgE fx5	
	pos	neg	pos	neg	pos	neg
Uuritavate arv=117	54	63	22	95	25	92
<i>IL-18, GAPDH;</i> (keskväärtus; ± SE)	0,86 ±0,06	0,91 ±0,06	0,71¹ ±0,07	0,93¹ ±0,05	0,80 ±0,07	0,92 ±0,05
<i>IL-18, GAPDH;</i> (mediaan; min; max)	0,80 (0,30; 2,33)	0,80 (0,18; 3,19)	0,65 (0,30;1,40)	0,83 (0,18; 3,91)	0,73 (0,32; 1,98)	0,81 (0,18; 3,19)

¹p=0,03 (Mann-Whitney)

IL-18 ja *ICOS* geenide ekspressioonitasemeid võrreldi eraldi ka poiste ja tüdrukute gruppides üld-IgE, IgE fx20 ja IgE fx5 antikehade olemasolu alusel. *ICOS* geeni ekspressioonitase GAPDH suhtes erineb poistel sIgE fx20 grupis (tabel 11), kus *ICOS* geeni $2^{-\Delta\Delta CT}$ väärtused on kõrgemad positiivsete sIgE fx20 antikehadega grupis võrreldes negatiivse sIgE fx20 antikehadega grupist (p=0,041, T-test). Poistel *IL-18* ja tüdrukutel nii *IL-18* kui *ICOS* geenide ekspressioonitasemete osas statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud.

Tabel 11. *ICOS* geeni ekspressioonitase vererakkudes GAPDH suhtes poistel positiivsete või negatiivsete üld-IgE, sIgE fx20 ja sIgE fx5 antikehade korral.

	üld-IgE		IgE fx20		IgE fx5	
	pos	neg	pos	neg	pos	neg
N=52	29	23	11	41	16	36
<i>ICOS, GAPDH;</i> (keskväärtus; ± SE)	0,76 ±0,06	0,57 ±0,05	0,85¹ ±0,13	0,64¹ ±0,04	0,79 ±0,09	0,64 ±0,05
<i>ICOS, GAPDH;</i> (mediaan; min; max)	0,65 (0,36; 1,51)	0,58 (0,17; 0,98)	0,60 (0,36; 1,51)	0,60 (0,17; 1,26)	0,72 (0,27; 1,51)	0,58 (0,17; 1,37)

¹p=0,04 (t-test)

2.3.3 *ICOS* geeni polümorfism CTIC154_1C/T

Statistiliselt olulisi erinevusi *ICOS* geeni polümorfismi CTIC154_1C/T (rs10932037) genotüüpide ja alleelisageduste suhtes AD ja kontrollgrupi vahel ei esinenud (tabel 12).

Tabel 12. ICOS geeni polümorfismi CTIC154_1C/T genotüüpide ja alleelisageduste esinemine AD- ja kontrollgrupis.

Genotüübid ja alleelid	AD (%), n=341	Kontrollgrupp (%), n=56	OR (95% CI)	χ^2 -test (Yates), p
CC	79,8%	85,7%	0,63 (0,27-1,46)	0,39
CT	18,5%	12,5%	1	
TT	1,7%	1,8%	0,67 (0,07-6,37)	Df < 5
C-alleel	89,1%	91,9%	0,81 (0,30-2,15)	0,84
T-alleel	10,9%	8,1%	1,24 (0,47-3,31)	0,84

OR – šansside suhe; IR - usalduspiir

2.3.4 Stafülokoki enterotoksiini A ja B vastased IgE antikehad

IL-18 väärtused seerumis IgE-m80 ja IgE-m81 antikehade olemasolu korral uuritavatel kogu valimis statistiliselt oluliselt ei erinenud võrreldes uuritavatega, kellel IgE-m80 ja IgE-m81 antikehi ei esinenud (tabel 13). Stafülokoki enterotoksiini A ja B vastaste IgE antikehade esinemist erinevates haigusgruppides polnud võimalik võrrelda uuritavate gruppide väikse valimi tõttu.

Tabel 13. IL-18 tase seerumis IgE-m80 ning IgE-m81 antikehadega uuritavatel kogu valimis võrreldes uuritavatega, kellel vastavaid antikehi ei esine.

	IgE-m80		IgE-m81	
	pos	neg	pos	neg
Uuritavate arv=84	13	71	18	66
IL-18, pg/mL (keskväärtus; \pm SE)	38,32 \pm 4,91	38,23 \pm 3,09	34,62 \pm 4,73	39,24 \pm 3,21
IL-18, pg/μL (mediaan; min; max)	32,18 (16,22; 75,02)	29,5 (7,16; 149,2)	29,7 (7,16; 75,02)	31,63 (7,4; 149,2)
Mann-Whitney, p	0,48		0,59	
T-test, p	0,99		0,48	

IL-18 geeni ekspressioonitase β -aktiini ja GAPDH suhtes IgE-m80 ja IgE-m81 antikehade suhtes positiivsetel uuritavatel kogu valimis võrreldes IgE-m80 ja IgE-m81 antikehade suhtes negatiivsete uuritavatega statistiliselt oluliselt ei erinenud (tabel 14).

Tabel 14. *IL-18* geeniekspressioon β -aktiini ja GAPDH suhtes IgE-m80 ning IgE-m81 antikehade suhtes positiivsetel uuritavatel kogu valimis võrreldes vastavate parameetrite antikehade suhtes negatiivsete uuritavatega.

	IgE-m80		IgE-m81	
	pos	neg	pos	neg
Uuritavate arv=41	2	39	4	37
<i>IL-18, β-aktiin;</i> (keskväärtus; \pm SE)	0,75 \pm 0,04	0,82 \pm 0,09	0,73 \pm 0,16	0,82 \pm 0,09
<i>IL-18, β-aktiin;</i> (mediaan; min; max)	0,75 (0,71; 0,78)	0,68 (0,22; 3,13)	0,78; (0,29; 1,05)	0,68; (0,22; 3,13)
Mann-Whitney, p	0,65		0,90	
T-test, p	0,85		0,72	
<i>IL-18, GAPDH;</i> (keskväärtus; \pm SE)	0,68 \pm 0,17	0,79 \pm 0,07	0,86 \pm 0,20	0,77 \pm 0,07
<i>IL-18, GAPDH ;</i> (mediaan; min; max)	0,68 (0,51; 0,85)	0,73 (0,30; 2,40)	0,82 (0,41; 1,40)	0,69 (0,30; 2,40)
Mann-Whitney, p	0,97		0,53	
T-test, p	0,72		0,68	

ICOS geeni ekspressioonitase β -aktiini ja GAPDH suhtes IgE-m80 ja IgE-m81 positiivsete antikehadega uuritavatel kogu valimis võrreldes IgE-m80 ja IgE-m81 antikehade suhtes negatiivsete uuritavatega statistiliselt oluliselt ei erine (tabel 15).

Tabel 15. *ICOS* geeni ekspressioonitase β -aktiini ning GAPDH suhtes uuritavatel, kellel esinevad IgE-m80 ja IgE-m81 antikehad võrreldes uuritavatega, kellel vastavaid antikehi ei esine

	IgE-m80		IgE-m81	
	pos	neg	pos	neg
Uuritavate arv=41	2	39	4	37
<i>ICOS, β-aktiin;</i> (keskväärtus; \pm SE)	0,61 \pm 0,18	0,66 \pm 0,05	0,57 \pm 0,13	0,67 \pm 0,05
<i>ICOS, β-aktiin;</i> (mediaan; min; max)	0,61 (0,43; 0,79)	0,69 (0,27; 1,58)	0,60 (0,27; 0,82)	0,69 (0,28; 1,58)
Mann-Whitney, p	0,94		0,64	
T-test, p	0,79		0,49	
<i>ICOS, GAPDH;</i> (keskväärtus; \pm SE)	0,52 \pm 0,01	0,71 \pm 0,05	0,67 \pm 0,15	0,71 \pm 0,05
<i>ICOS, β-aktiin;</i> (mediaan; min; max)	0,52 (0,51; 0,52)	0,68 (0,27; 1,51)	0,64 (0,36; 1,06)	0,60 (0,27; 1,51)
Mann-Whitney, p	0,38		0,79	
T-test, p	0,36		0,83	

2.4 ARUTELU

Pikka aega on otsitud head biomarkerit atoopilise dermatiidi haiguskulu jälgimiseks. Teadlaste huviorbiidis on mitmeid erinevaid valke, nende hulgas ka IL-18. Selles töös leiti, et uuritavate grupis, kus on atoopilise dermatiidi ning atoopilise dermatiidi ja tsöliaakia samaaegne esinemine (AD+AD+CD grupis), on IL-18 näitajad statistiliselt oluliselt kõrgemad võrreldes kontrollgrupiga. IL-18 väärtused on kõrgemad ka AD ja AD+CD-ga uuritavatel võrreldes tsöliaakia- ja kontrollgrupiga, kuid erinevus pole statistiliselt oluline, kuigi võiks eeldada vastupidist. Kuigi AD+CD grupp on küll väike (5 isikut), on nende IL-18 tasemed kõrgemad ja tõstab seeläbi AD grupi IL-18 keskmist väärtust. Varasemalt on näidatud (Lettesjö jt., 2005; Trzeciak jt., 2011), et nii atoopiline dermatiit kui tsöliaakia mõjutavad IL-18 taset ning see võib olla põhjus, miks kõrgemad väärtused esinevad just atoopilise dermatiidi ja tsöliaakia (AD+CD) grupis. Ohnishi jt (2003) uurisid IL-18 seost AD ja haiguse raskusastmega. Uuringust selgus, et AD diagnoosiga lastel oli IL-18 tase plasmas tõusnud ning mida raskemalt kulges haigus, seda kõrgem oli ka IL-18 tase. Sarnaseid tulemusi on saadud ka teistes uuringutes (Trzeciak jt., 2011; Kou jt., 2012). Seega võiks IL-18 olla potentsiaalne biomarker AD haiguskulu jälgimisel.

Kõrgem IL-18 kontsentratsioon esineb selles töös AD- ja CD-gruppides võrreldes kontrollgrupiga ning sarnane tendents esineb ka geeniekspressiooni korral, kuigi *IL-18* geeniekspressiooni tase uuritavate gruppide vahel pole statistiliselt oluline. AD+CD-grupis on *IL-18* ekspressioon oluliselt madalam võrreldes kontrollgrupiga (tabel 9), mis ei olnud oodatud tulemus, kuid seda võib mõjutada AD+CD grupi väike valim (5 isikut).

Varasemalt on arvatud, et üld-IgE on seoses IL-18 taseme ja AD raskusastmega, kuid tulemused on vastuolulised (Johnson jt., 1974; Wütrich, 1978). Töö autor ei leidnud korrelatsiooni AD ja üld-IgE taseme vahel. Samuti polnud erinevusi IL-18 väärtustes isikutel positiivse ja negatiivse üld-IgE antikehade korral. Sarnaseid tulemusi on saadud ka teistes uuringutes (Kou jt., 2012; Tanaka jt., 2001; Shida jt., 2001; Hon jt., 2004). Vastupidiselt eelnevale on osa autoreid leidnud seose IL-18 ja üld-IgE vahel (Trzeciak jt., 2011; Ohnishi jt., 2011; Ando ja Shima, 2007; Kim jt., 2007). Nimelt, AD korral olid IL-18 ja üld-IgE tase positiivses korrelatsioonis. Lisaks sellele leidsid Trzeciak jt (2011) korrelatsiooni ka üld-IgE ja AD raskusastme vahel.

Mitmed teadlased, kes on uurinud AD, üld-IgE ja IL-18 vahelisi seoseid, on leidnud valimist väikse osa uuritavaid, kelle üld-IgE väärtused on normilähedased, kuid IL-18 tõusnud ning

neil esineb AD-le iseloomulik ekseem (Ohnishi jt., 2003; Ando jt., 2007; Trzeciak jt., 2011). Nagu jooniselt 1 näha, on ka selles töös kolmel uuritaval AD-grupisiseselt kõrgemad IL-18 väärtused kui ülejäänud grupis. Neist kahel isikul on üld-IgE väärtus normipärane, ühel uuritaval tõusnud. On teada, et allergilise ja mitteallergilise AD patogenees on mõneti erinev (Tokura, 2010). Nimelt, allergilise AD korral on T-rakud diferentseerunud Th2 suunas ja IgE tase on tõusnud, kuid mitteallergilist AD-d iseloomustab Th1 immuunvastus ja normipärased IgE väärtused. Th1 rakud sekreteerivad tsütokiini IFN- γ , mille tase on negatiivses korrelatsioonis üld-IgE-ga. Seega, ei sobi üld-IgE AD monitoorimiseks, kuna selle väärtused pole AD korral alati tõusnud. Sõltuvalt AD tüübist võivad AD, üld-IgE ja IL-18 vahelised seosed erineda ning oluline oleks määrata ära patsiendi AD fenotüüp, mis annab uuringutes täpsemaid tulemusi.

Erinevalt IL-18 jäid IL-31 kontsentratsioonid kõikides uuritavates proovides alla tuvastamisiiri (<46,3 pg/ml). Tsütokiinide IL-18 ja IL-31 määramist teostati paralleelselt neljal erineval päeval 157 uuritavast seerumist. Me kasutasime kontrolliks ka tühje ja kuut standardproovi, mille väärtused vastasid ootustele. Uuritavaid seerumeid oli varasemalt korduvalt sulatatud ja külmutatud, mis võib kaasa tuua valkude denaturatsiooni ja agregatsiooni. Lee jt (2015) uurisid korduva sulatamise-külmutamise mõju mõningatele tsütokiinidele (IFN- γ , IL-8, IL-15, IL-17A jt) plasmas ja seerumis. Pärast mitmekordset külmutamise-sulatamise tsüklit IL-8 kontsentratsioon seerumis oluliselt ei muutunud, kuid IL-15 ja IL-17A kontsentratsioon oli langenud. Plasmas püsis nende interleukiinide kontsentratsioon samade tingimuste korral stabiilsena. Valkudele avaldab mõju ka säilitamistemperatuur. Pikaajaliseks säilitamiseks on soovitatav seerumit ja plasmat hoida -80°C juures (Lee jt., 2010). Seerumi säilitamisel 4°C juures 48-96 tunni jooksul toimuvad valkude struktuuris ja funktsioonis muutused, kuid seerumi säilitamisel -80°C juures kolme kuu vältel valkude struktuur ja funktsioon ei muutunud (Hsieh jt., 2006).

Selles töös kasutatud proovimaterjalid olid kogutud aastatel 2008-2010 ning osa neist säilitati sellest ajast alates -20°C juures. Eelneva põhjal võib järeldada, et sellised säilitamistingimused, kus proove mitu korda külmutati ja sulutati, võivad erinevatele tsütokiinidele avaldada erinevat mõju ning olla põhjuseks, miks IL-31 tase jäi alla tuvastusläve ning IL-18 tulemused olid mõõdetavad. Eksperimendi teostamine mitmel erineval päeval ning tühjade ja standardproovide kasutamine, viitab inimfaktori minimaalsele mõjule ja töökorras reagentidele. Töö autor võrdles enda määratud ja teiste autorite poolt esitatud IL-18 väärtusi AD korral (tabel 16). Selgus, et varasemates töödes esitatud IL-18

keskväärtused kontrollgrupis ja AD korral, on kordades kõrgemad kui kõnealuse magistritöö käigus saadud keskväärtused ($39,92 \pm 3,23$ pg/mL). See viitab võimalusele, et pikaajaline säilitamine on avaldanud valkudele mõju ning meie puhul jäid saadud IL-18 kontsentratsioonid madalamaks, kuid siiski ületasid kontrollgrupi väärtusi. Teised autorid kasutasid IL-18 taseme määramiseks seerumis ELISA meetodit, mis võib anda ka erinevaid tulemusi võrreldes meie poolt kasutatud Luminex meetodiga.

Tabel 16. Tabelis on esitatud mõned näited varem publitseeritud AD- ja kontrollgrupi keskväärtustest IL-18 korral seerumis võrdlemaks kõnealuses magistritöö ja teiste autorite esitatud andmeid.

IL-18, pg/mL			
Autor(id)	Metoodika	AD-grupp	Kontrollgrupp
Mihkelson	Luminex	$39,92 \pm 3,23$	$31,52 \pm 2,55$
Trzeciak jt (2011)	ELISA	$155,68 \pm 192,92$	$65,73 \pm 61,66$
Kou jt (2011)	ELISA	240 (180; 370) (mediaan)	130 (110; 170) (mediaan)
Ohnishi jt (2003)	ELISA	508 ± 238	174 ± 87

AD- ja AD+AD+CD-grupis esines positiivne korrelatsioon IgG tüüpi koetransglutaminaasi ja seerumi IL-18 väärtuste vahel. Töö autorile teadaolevalt, pole üheski teaduspublikatsioonis sarnast seost kirjeldatud. Võib arvata, et AD+AD+CD-grupis esinev korrelatsioon on põhjustatud sellest, et osadel isikutel esines samaaegselt AD-ga ka tsöliaakia. On teada, et CD korral produtseeritakse tsütokiine, mis mõjutavad T-rakke diferentseeruma Th1 suunas (Lee jt., 2015). IL-18 on oluline faktor Th1-rakkude elulemuseks ja jagunemiseks (Uibo jt., 2015). Samuti on CD korral teadaolevalt tõusnud IgG-tüüpi koetransglutaminaasi vastaste antikehade hulk (Marsh, 1992), mis seletada positiivset korrelatsiooni IL-18 ja tTGA-IgG vahel AD+AD+CD-grupis. Kuid siis võiks esineda CD grupis korrelatsioon ka IL-18 ja tTGA-IgA vahel, mis on väga spetsiifiline CD biomarker, kuid statistiliselt olulist seost me siiski ei tuvastanud. tTGA-IgG-d määratakse pigem sekundaarselt, kui patsiendil esineb IgA defitsiit. Kuna valim CD-grupis on väike, 9 uuritavat, siis oodatavat seost ei pruugi ilmned.

AD+CD gruppi kuulus vaid neli uuritavat ning nagu tabelist 5 näha, esineb korrelatsioon IL-18 ja tTGA-IgG vahel ka AD-grupis, mis tähendab, et korrelatsioon pole seotud CD-ga. Kuid teise võimalusena võib oletada, et CD esineb osal AD-uuritavatest diagnoosimata asümptomaatilise kaasuva haigusena. Uuringutes on leidnud kinnitust, et AD-haigetel esineb CD sagedamini võrreldes ülejäänud populatsiooniga ning haiguse kulg võib olla nii sümptomaatiline kui asümptomaatiline (Gallo jt., 1992; Uibo jt., 1996; Ress jt., 2014; Paul jt.,

2015). Kirjanduse põhjal saab väita, et CD korral on IL-18 ja koetransglutaminaaside väärtused tõusnud (Marsh, 1992; León jt., 2006), mis oleks võinud meie uuringus anda positiivse korrelatsiooni.

CD diagnoosimiseks määratakse seroloogilisel IgA- ja IgG-tüüpi koetransglutaminaasi vastased antikehad ja deamineeritud gliadiini vastased IgA- ja IgG-antikehad ning võetakse peensoole biopsia. Algandmete visuaalsel analüüsil (algandmeid pole selles töös esitatud) selgus, AD-grupi tTGA-IgA tTGA-IgG tulemuste hulgas pole ühtegi ning AGA-IgA ja AGA-IgG tulemuste hulgas on üks positiivne väärtus, kuid selle uuritava biopsia leid oli negatiivne. Seega pole olemasolevate andmete põhjal alust arvata, et AD-grupis võiks esineda CD osal uuritavatest kaasuva haigusena. Võib ka oletada, et positiivne korrelatsioon IL-18 ja t-TGA-IgG vahel oli juhuslik, sest meie poolt kasutatud allikates sarnast seost ei ole leitud.

ICOS on T-raku kostimulaator ning on kõrgelt ekspresseerunud aktiveeritud T-rakkudel (Beier jt., 2000). On näidatud, et *ICOS* võib mõjutada Th-rakke diferentseeruma Th2 suunas (Beier jt., 2000). AD korral on immuunvastus vahendatud peamiselt Th2-rakkude poolt, mis tähendab, et *ICOS* geeni ekspressioonitase võiks olla AD korral kõrgem (Egawa ja Weninger, 2015). Selles töös on *ICOS* geeni ekspressioonitaseme keskväärtused kõrgemad AD grupis võrreldes kontrollgrupiga, kuid tulemus pole statistiliselt oluline. *ICOS* geeni ekspressioonitase on kõrgem uuritavatel positiivsete IgE fx20 antikehade suhtes võrreldes nende uuritavatega, kelle IgE fx20 antikehi ei esine. Katsed hiirtega on näidanud, et *ICOS/ICOS-L* signaalirada on oluline T- ja B-rakkude vahelise koostöö reguleerimisel teatud antikehade, sh IgE, produktsioonil (Kallinich jt., 2007).

AD-ga uuritavatel ei leitud seost *ICOS* geeni polümorfismi CTIC154_1C/T genotüüpide ja alleelisageduste vahel võrreldes kontrollgrupiga. Ka Beier jt (2009) ei leitud atoopiliste haiguste, sh atoopilise dermatiidi, ja kuue erineva *ICOS* geeni polümorfismi vahel seoseid. Cheng jt (2014) on metaanalüüsis uurinud ka *IL-18* geeni polümorfismide seost AD-ga. *IL-18* promootori polümorfism positsioonis -137G/C on statistiliselt oluliselt seotud väiksema AD riskiga retsessiivse (CC vs CG+GG: OR=0.30, 95% CI=0.15–0.60, $P < 0.001$) ja homosügootse (CC vs GG: OR=0.26, 95% CI=0.12–0.53, $P < 0.001$) mudeli puhul. -137G/C positsioonis on C nukleotiidi korral promootori transkriptsiooniline aktiivsus madal ja G nukleotiidi puhul kõrge. *IL-18* geeni polümorfisme pole selle töö raames uuritud, aga edaspidi võiks määrata, et saada juurde andmeid seaduspärasuste leidmiseks AD ja *IL-18* polümorfismide vahel.

Muutused naha mikrobioomis võivad viia suurenenud *S. aureuse* kolonisatsioonile ja AD tekkele (Kong jt., 2012). Tomi jt (2005) leidis oma uuringus, et 50% uuritavatel esines *S. aureus*'e kolonisatsioon. Varasemalt on näidatud, et *S. aureus*'e enterotoksiin stimuleerib IL-18 sekretsiooni (Terada jt., 2006; Suwarsa jt., 2017), kuid on saadud ka vastupidiseid tulemusi (Kou jt., 2012). Ka selles töös polnud IL-18 väärtused kõrgemad neil uuritavatel, kellel olid stafülokoki enterotoksiini A ja B vastased IgE antikehad olemas, võrreldes nendega, kellel need puudusid.

Käesoleva töö põhjal võib teha järgmised järeldused:

- 1) IL-18 kontsentratsioon on kõrgem AD+AD+CD grupi vereseerumis, võrreldes kontrollgrupiga. Kõrgemad keskvaartused esinevad ka AD ja AD+CD grupis võrreldes kontrollgrupiga, kuid tulemused pole statistiliselt olulised. CD grupis on IL-18 keskvaartus sarnane kontrollgrupi keskvaartusega. IL-31 kontsentratsiooni ei olnud võimalik kasutatud meetodiga määrata.
- 2) *IL-18* ja *ICOS* geenide ekspressioon AD-grupis on β -aktiini geeniekspressiooni suhtes kõrgem kui kontrollgrupis, kuid tulemused pole statistiliselt olulised.
- 3) *ICOS* geeni polümorfismi genotüübid ja alleelisagedused ei esine AD-grupis sagedamini võrreldes kontrollgrupiga.
- 4) Uuritavatel, kellel esinesid vereseerumis stafülokoki enterotoksiini A ja/või B vastased IgE antikehad, ei olnud IL-18 väärtused kontrollgrupiga võrreldes kõrgemad.

KOKKUVÕTE

Selles magistritöös uuriti atoopilise dermatiidi (AD) ja tsöliaakia (CD) haigete tsütokiinide taset (IL-18, IL-31) ning *IL-18* ja *ICOS* geenide ekspresioonitaset ning püüti leida nende geenide võimalikku seost eelnimetatud haigustega.

IL-18 ja IL-31 kontsentratsioonid uuritavate vereseerumis määrati Luminex meetodiga ning *ICOS* ja *IL-18* geenide ekspresiooni tase reaalka-PCR-i abil. Nende andmete andme põhjal: 1) võrreldi tsütokiinide väärtusi atoopilise dermatiidi, tsöliaakia ja kontrollgrupis, 2) määrati *IL-18* ja *ICOS* geenide ekspresioonitase kõikidel uuritavatel, 3) võrreldi tsütokiinide IL-18 ning *ICOS* ja *IL-18* geenide ekspresioonitaset stafülokoki enterotoksiini A ja B vastaste IgE antikehade olemasolu korral vereseerumis, 4) püüti leida võimalikku seost *ICOS* geeni polümorfismi CTIC154_1C/T (rs10932037) genotüüpide ja alleelisageduste ning atoopilise dermatiidi vahel.

IL-31 kontsentratsiooni väärtused jäid Luminex meetodikat kasutades alla tuvastamispiiri (<46,3 pg/ml), mille tõttu selle tsütokiini andmeid käesolevas töös ei esitata.

IL-18 kontsentratsioon on oluliselt kõrgem AD+AD+CD grupis, võrreldes kontrollgrupiga. Samuti on IL-18 väärtused kõrgemad AD ja AD+CD gruppides, kuid selgus, et erinevused pole statistiliselt olulised. CD grupis on IL-18 keskvärtus sarnane kontrollgrupi keskvärtusega.

IL-18 ja *ICOS* geenide ekspresioonitaseme keskvärtused on kõrgemad AD, AD+AD+CD ja CD grupis võrreldes kontrollgrupiga, kuid leitud erinevused pole siiski statistiliselt olulised. *IL-18* ja *ICOS* geenide ekspresioonitase ei erinenud oluliselt isikutel, kellel tuvastati stafülokoki enterotoksiini A ja B vastased IgE antikehad võrreldes nendega, kellel nimetatud antikehi ei esinenud. *ICOS* geeni polümorfismi CTIC154_1C/T genotüüpide ja alleelisageduste esinemise vahel polnud statistiliselt olulist seost AD haigetel ja kontrollgrupis.

Osa käesoleva töö tulemusi toetavad teiste autorite varem saadud tulemusi, kuid osa meie tulemusi ei lange varasemate tulemustega kokku. Varasemalt on näidatud, et IL-18 kõrgem kontsentratsioon vereseerumis ja *IL-18* geeni ekspresioonitaseme tõus on seotud atoopilise dermatiidi esinemisega. Kuid samas pole leitud seoseid *ICOS* geeni polümorfismi CTIC154_1C/T ja AD vahel, mida täheldasime ka oma töös. Vastupidiselt varasematele leidudele ei tuvastanud me AD korral *ICOS* geeni ekspresioonitaseme tõusu ning puudus ka

seos *ICOS* ja *IL-18* geenide ekspressiooni ning stafülokoki enterotoksiini A ja B IgE vastaste antikehade esinemise või puudumise vahel uuritava veres.

AD ja CD on immuunvahendatud kroonilised haigused, mis võivad sageli ka koos esineda. Selle töö käigus püüdis autor leida kinnitust, mõningate tsütokiinide, geenide ja nimetatud haiguste vahelist ühisosa, kuid kõik oodatavad seosed ei leidnud kinnitust.

Kuna mõlema haiguse puhul esineb mitu kliiniliselt erinevat haigusvormi, siis teatud määral erinevad ka nende laboratoorsed parameetrid. AD kliinilisi fenotüüpe on põhjalikult kirjeldatud ning praeguseks hetkeks on juba olemas rohkem informatsiooni kindlate AD fenotüüpide molekulaarsetest mehhanismidest. Selle töö autor toetab arvamust Cabanillas jt (2017) seisukohta, et AD puhul võiks täpsemalt uurida biomarkereid, mis iseloomustavad kindlat AD fenotüüpi ja sellest tulenevalt saab patsiendi ravimisel kasutada haigusvormile spetsiifilist ravimeetodit. CD puhul võiks uurida, millised biomarkerid iseloomustavad asümptomaatilist tsöliaakiat, mis esineb sagedamini kui algselt arvatud. Kuna selle haigusvormiga kaasneb ka peensoole limaskesta kahjustus, on haiguse varajane avastamine väga oluline.

Levels of serum interleukin-18 and -31 and whole blood gene expression of interleukin-18 and ICOS in children with atopic dermatitis and celiac disease

Piret Mihkelson

Summary

Atopic dermatitis (AD) and celiac disease (CD) are immune-mediated chronic diseases, which often occur during childhood. AD is inflammatory skin disease characterized by rash, dry, itchy and scaly skin (Peng ja Novak, 2015). CD is autoimmune disease, characterized by an altered immune response in subjects with genetic predisposition to ingested gluten and its component gliadin which leads to inflammation and atrophy of small bowel mucosa. (Murch jt., 2013). CD can develop in early childhood and its clinical manifestations include chronic diarrhea, metabolic and developmental disorders (Paul jt., 2015). Both of these diseases are multifactorial, depending on genetic, environmental and immunological factors (Peng ja Novak, 2015). It has been previously shown (Zauli jt., 2000; Ress, 2014), that AD and CD often coexist, but it is still not clear, whether these diseases have similar immunemechanisms.

The aim of this study was to investigate the associations between cytokine levels of IL-18 and IL-31 in serum, and gene expression of IL-18 and ICOS in whole blood cells in children with AD and/or CD. Luminex method was used to measure cytokine IL-18 and IL-31 levels in serum and real-time-PCR for gene expression of IL-18 and Inducible T-cell costimulator (ICOS). This study comprised of 192 subjects (95 boys, 97 girls) with average age $6,88 \pm 0,35$ years. All the participants were divided into study groups based on their diagnose (AD, CD, AD+CD) or control group.

Significantly higher values of cytokine IL-18 values were found in AD+AD+CD group compared to controls ($p=0,04$, Mann-Whitney). Gene expression of IL-18 in AD group have a tendency to be higher. ICOS gene expression was higher in AD-group, but results were not statistically significant. No statistically significant results were found between ICOS gene polymorphisms, IgE-m80, IgE-m81 and different study groups. Cytokine IL-31 levels remained below limit of detection and therefore no data is given.

In conclusion, cytokine IL-18 levels were higher in subjects with AD and CD compared to controls, but no significant associations between ICOS gene polymorphisms and AD diagnosis was found.

KIRJANDUSE LOETELU

Aicher, A., Hayden-Ledbetter, M., Brady, W. A., Pezzutto, A., Richter, G., Magaletti, D., Buckwalter, S., Ledbetter, J. A., Clark, E. A. (2000). Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *Journal of Immunology*. 164 (9): 4689–96.

Ando, M., Shima, M. (2007). Serum interleukins 12 and 18 and immunoglobulin E concentration and allergic symptoms In Japanese schoolchildren. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 17: 14–19.

Beier, K. C., Hutloff, A., Dittrich, A. M., Heuck, C., Rauch, A., Büchner, K., Ludewig, B., Ochs, H. D., Mages, H. W., Kroczeck, R. A. (2000). Induction, binding specificity and function of human ICOS. *European Journal of Immunology*. (12): 3707–3717.

Beier, K. C., Humberdros, S., Witt, H., Illi, S., Rüschemdorf, F., Nickel, R., Lee, Y. A., Lau, S., Wahn, U., Hamelmann, E. (2009). ICOS-gene variants are not associated with atopic disease susceptibility in European children. *Pediatric Allergy and Immunology*. 20 (3): 242–5.

Bieber T. (2008). Atopic Dermatitis. *The New England Journal of Medicine*. 358 (14): 1483–1494

Björck, S., Lindehammer, S. R., Fex, M., Agardh, D. (2015). Serum cytokine pattern in young children with screening detected coeliac disease. *Clinical and Experimental Immunology*. 179 (2): 230–235.

Boguniewicz, M and Leung, D. Y. M. (2011). Atopic Dermatitis: A Disease of Altered Skin Barrier and Immune Dysregulation. *Immunological Reviews*. 242 (1): 233–246.

Brown, S. J., McLean, W. H. (2009). Eczema genetics: current state of knowledge and future goals. *Journal of Investigating Dermatology*. 129 (3): 543–552.

Cabanillas, B., Brehler, A.-C., Novak, N. (2017). Atopic dermatitis phenotypes and the need for personalized medicine. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 17(4): 309–315.

Cheng, D., Hao, Y., Zhou, W., Ma, Y. (2014). The Relationship between Interleukin-18 Polymorphisms and Allergic Disease: A Meta-Analysis. *BioMed Research International*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/290687>

- Collin, P., Reunala, T., Pukkala, E., Laippala, P., Keirilainen, O., Pasternack, A. (1994).** Coeliac disease, associated disorders and survival. *Gut*. 35: 1215–8.
- Cornelissen, C., Lüscher-Firzlaff, J., Baron, J. M., Lüscher, B. (2012).** Signaling by IL-31 and functional consequences. *European Journal of Cell Biology*. 91 (6-7): 552–566.
- De Re, V., Magris, R., Cannizzaro, R. (2017).** New Insights into the Pathogenesis of Celiac Disease. *Frontiers in Medicine*. 4: 137.
- Dillon, S. R., Sprecher, C., Hammond, A., ... Gross, J. A. (2004).** Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nature Immunology*. 5: 752–760.
- Dinarello, C. A. (2006).** Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2: 447–455.
- Douroudis, K., Laine, A-P., Heinonen, M., ... Kisand, K. (2009).** Association of *CTLA4* but not *ICOS* polymorphisms with type 1 diabetes in two populations with different disease rates. *Human Immunology*. 70 (7): 536-439.
- Egawa, G., Weninger, W. (2015).** Pathogenesis of Atopic Dermatitis: A Short Review. *Cogent Biology*. 1: 1103459.
- Gallo, C., Vighi, G., Schroeder, J., Strozzi, M., Scibilia, J., Colafrancesco, M., Rota, E., Ortolani, C., Brusamolino, R., Barberis, M. (1992).** Chronic Urticaria, Atopic Dermatitis and Celiac Disease. *American Journal of Gastroenterology*. 87 (11): 1684.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C. (2001).** An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. 25 (4): 386–401.
- Gough, S. C. L., Walker, L. S. K., Sansom, D. M. (2005).** CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunological Reviews*. 204: 102–115.
- Grize, L., Gassner, M., Wüthrich, B., Bringolf-Isler, B., Takken-Sahli, K., Sennhauser, F.H., Stricker, T., Eigenmann, P.A., Braun-Fahrländer, C. (2006).** Trends in prevalence of asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis in 5-7-year old Swiss children from 1992 to 2001. *Allergy*. 61 (5): 556–62.
- Guttman-Yassky, E., Waldman, A., Ahluwalia, J., Ong, P.Y., Eichenfield, L. (2017).** Atopic dermatitis: pathogenesis. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. 36: 100–103.

Hsieh, S. Y., Chen, R. K., Pan, Y. H., Lee, H. L. (2006). Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling. *Proteomics*. 6 (10): 3189–98.

Imboden, M., Nicod, L., Nieters, A., Glaus, E., Matyas, G., Bircher, A. J., Ackermann-Liebrich, U., Berger, W., Probst-Hensch, N. M., SAPALDIA Team. (2006). The common G-allele of interleukin 18- single nucleotide polymorphism is a genetic risk factor for atopic asthma. The Spaldia Cohort Study. *Clinical and Experimental Allergy*. 36: 211–218.

Irvine, A.D., McLean, W.H. (2006). Breaking the (un)sound barrier: filaggrin is a major gene for atopic dermatitis. *Journal of Investigating Dermatology*. 126 (6): 1200–1202.

Hon, K. L., Leung, T. F, Ma, K. C., Wong, C. K., Wan, H., Lam, C. W. (2004). Serum concentration of IL-18 correlates with disease extent in young children with atopic dermatitis. *Pediatric Dermatology*. 21: 619–622.

Howell, M.D., Kim, B.E., Gao, P., Grant, A.V., Boguniewicz, M., DeBenedetto, A., Schneider, L., Beck, L.A., Barnes, K.C., Leung, D.Y. (2009). Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 124: R7–R12.

Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., Kroczeck, R. A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*. 397 (6716): 263–6.

Johnson, E. E., Irons, J. S., Patterson, R., Roberts, M. (1974). Serum IgE concentration in atopic dermatitis. Relationship to severity of disease and presence of atopic respiratory disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 54:94–99.

Kallinich, T., Beier, K. C., Wahn, U., Stock, P., Hamelmann, E. (2007). T-cell co-stimulatory molecules: their role in allergic immune reactions. *European Respiratory Journal*. 29: 1246–1255.

Kasraie, S., Niebuhr, M., Werfel, T. (2010). Interleukin (IL)-31 induces proinflammatory cytokines in human monocytes and macrophages following stimulation with staphylococcal exotoxins. *Allergy*. 65 (6): 712–21.

- Kim, E., Lee, J. E., Namkung, J. H., Park, J. H., Kim, S., Shin, E. S., Cho, E. Y., Yang, J. M. (2007).** Association of the single nucleotide polymorphism and haplotype of the interleukin 18 gene with atopic dermatitis in Koreans. *Clinical and Experimental Allergy*. 37, 865–871.
- Kim, S., Kim, H. J., Yang, H. S., Kim, E., Huh, I. S., Yang, J. M. (2011).** IL-31 Serum Protein and Tissue mRNA Levels in Patients with Atopic Dermatitis. *Annals of Dermatology*. 23 (4): 468–73.
- Kagnoff, M. F. (2005).** Overview and Pathogenesis of Celiac Disease. *Gastroenterology*. 128: S10-S18.
- Kong, H. H., Oh, J., Deming, C., ... Murray, P. R. (2012).** Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Research*. 22: 850–859.
- Kou, K., Aihara, M., Matsunaga, T., Chen, H., Taguri, M., Morita, S., Fujita, H., Yamaguchi, Y., Kambara, T., Ikezawa, Z. (2012).** Association of serum interleukin-18 and other biomarkers with disease severity in adults with atopic dermatitis. *Archives of Dermatology Research*. 304 (4): 305–12.
- Kruse, S., Kuehr, J., Moseler, M., Kopp, M. V., Kurz, T., Deichmann, K. A., Foster, P. S., Matter, J. (2003).** Polymorphisms in the *IL-18* gene are associated with specific sensitization to common allergens and allergic rhinitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 11: 117–122.
- Lee, D. H., Kim, J. W., Jeon, S. Y., Park, B. K., Han, B. G. (2010).** Proteomic analysis of the effect of storage temperature on human serum. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 40 (1): 61–70.
- Lee, J. E., Kim, S. Y., Shin, S. Y. (2015).** Effect of Repeated Freezing and Thawing on Biomarker Stability in Plasma and Serum Samples. *Osong Public Health and Research Perspectives*. 6 (6): 357–62.
- Lee, J. H., Cho, D. H., Park, H. J. (2015).** IL-18 and Cutaneous Inflammatory Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 16 (12): 29357–29369.
- León, A. J., Garrote, J. A., Blanco-Quirós, A., Calvo, C., Fernández-Salazar, L., Del Villar, A., Barrera, A., Arranz, E. (2006).** Interleukin 18 maintains a long-standing

inflammation in coeliac disease patients. *Clinical and Experimental Immunology*. 146 (3): 479-485.

Lettesjö, H., Hansson, T., Bergqvist, A., Grönlund, J., Dannaeus, A. (2005). Enhanced interleukin-18 levels in the peripheral blood of children with coeliac disease. *Clinical and Experimental Immunology*. 139 (1): 138–143.

Leyden, J. J., Marples, R. R., Kligman, A. M. (1974). Staphylococcus aureus in the lesions of atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*. 90: 525–525.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25 (4): 402–8.

Manavalan, J. S., Hernandez, L., Shah, J. G., Konikkara, J., Naiyer, A. J., Lee, A. R., Ciaccio, E., Minaya, M. T., Green, P. H., Bhagat, G. (2010). Serum cytokine elevations in celiac disease: association with disease presentation. *Human Immunology*. 71 (1): 50–57.

Mantegazza, C., Zuccotti, G. V., Dilillo, D., Koglmeyer, J. (2015). Celiac Disease in Children: A Review. *International Journal of Digestive Diseases*. 1 (19).

Marsh, M. N. (1992). Gluten, Major Histocompatibility Complex, and the Small Intestine. A Molecular and Immunobiologic Approach to the Spectrum of Gluten Sensitivity („celiac sprue“). *Gastroenterology*. 102: 330–354.

Mazzarella, G., MacDonald, T. T., Salvati, V. M., ... Monteleone, G. (2003). Constitutive Activation of the Signal Transducer and Activator of Transcription Pathway in Celiac Disease Lesions. *American Journal of Pathology*. 162 (6): 1845–1855.

Mazzarella, G. (2015). Effector and suppressor T cells in celiac disease. *World Journal of Gastroenterology*. 21 (24): 7349–7356.

McPherson, T. (2016). Current Understanding in Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Indian Journal of Dermatology*. 61 (6): 649–655.

Monteleone, G., Trapasso, F., Parrello, T., Biancone, L., Stella, A., Iuliano, R., Lizza, F., Fusco, A., Pallone, F. (1999). Bioactive interleukin-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *Journal of Immunology*. 163: 143–147.

- Mudde, G.C., Von Reijssen, F.C., Boland, G.J., Gast, G.C., Bruinzeel, P.L., Bruinzeel-Koomen, C.A (1990).** Allergen presentation by epidermal Langerhans cells from patients with atopic dermatitis is mediated by IgE. *Immunology*. 69: 335–341.
- Murch, S., Jenkins, H., Auth, M., Thorpe, M. (2013).** Joint BSPGHAN and Coeliac UK guidelines for the diagnosis and management of coeliac disease in children. *Archives of Disease in Childhood*. 98 (10): 806–811.
- Nowicki, R., Trzeciak, M., Wilkowska, A., ... Petranjuk, A. (2015).** Atopic dermatitis: current treatment guidelines. Statement of the experts of the Dermatological Section, Polish Society of Allergology, and the Allergology Section, Polish Society of Dermatology. *Advances in Dermatology and Allergology*. (4): 239–249.
- Ohnishi, H., Kato, Z., Watanabe, M., Fukutomi, O., Inoue, R., Teramoto, T., Kondo, N. (2003).** Interleukin-18 is associated with the severity of atopic dermatitis. *Allergology International*. 52: 123–130.
- Ohta, Y., Hamada, Y., Katsuoka, K. (2001).** Expression of IL-18 in psoriasis. *Archives of Dermatological Research*. 293 (7): 334–342.
- Palmer, C.N., Irvine, A.D., Terron-Kwiatkowski, A., ... McLean, W.H. (2006).** Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature Genetics*. 38 (4): 441–446.
- Paul, S.P., McVeigh, L., Gil-Zaragozano, E., Basude, D. (2015).** Celiac disease in children. *Nursing Standard*. 29 (49); 36–41.
- Peng, W., Novak, N. (2015).** Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy*. 45: 566–574.
- Pizarro, T. T., Michie, M. H., Bentz, M., Woraratanadharm, J., Smith, M. F. Jr, Foley, E., Moskaluk, C. A., Bickston, S. J., Cominelli, F. (1999).** IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: Expression and localization in intestinal mucosal cells. *Journal of Immunology*. 162: 6829–6835.
- Puxeddu, I., Italiani, P., Giungato, P., Pratesi, F., Panza, F., Bartaloni, D., Rocchi, V., Del Corso, I., Boraschi D., Migliorini P. (2013).** Free IL-18 and IL-33 cytokines in chronic spontaneous urticaria. *Cytokine*. 61 (3): 741–743.

- Raap, U., Wichmann, K., Bruder, M., Ständer, S., Wedi, B., Kapp, A., Werfel, T. (2008).** Correlation of IL-31 serum levels with severity of atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 122 (2): 421–423.
- Rabenhorst, A., Hartmann, K. (2014).** Interleukin-31: A Novel Diagnostic Marker of Allergic Diseases. *Current Asthma and Allergy Reports*. 14 (4): 423.
- Ress, K., Annus, T., Putnik, U., Luts, K., Uibo, R., Uibo, O. (2014).** Cealiac Disease in Children with Atopic Dermatitis. *Peadiatric Dermatology*. 31 (4): 483-488.
- Shida, K., Koizumi, H., Shiratori, I., Matsumoto, M., Kikkawa, S., Tsuji, S., Begum, N. A., Fukumori, Y., Toyoshima, K., Seya, T. (2001).** High serum levels of additional IL-18 forms may be reciprocally correlated with IgE levels in patients with atopic dermatitis. *Immunology Letters*. 7: 16–75.
- Shikano, H., Kato, Z., Kaneko, H., Watanabe, M., Inoue, R., Kasahara, K., Takemura, M., Kondo, N. (2001).** IFN-gamma production in response to IL-18 or IL-12 stimulation by peripheral blood mononuclear cells of atopic patients. *Clinical and Experimental Allergy*. 8: 1263–1270.
- Shilling, R. A., Pinto, J. M., Decker, D. C., Schneider, D. H., Bandukwala, H. S., Schneider, J. R., Camoretti-Mercado, B., Ober, C., Sperling, A. I. (2005).** Cutting edge: polymorphisms in the ICOS promoter region are associated with allergic sensitization and Th2 cytokine production. *Journal of Immunology*. 175 (4): 2061–5.
- Smith, F.J., Irvine, A.D., Terron-Kwiatkowski, A., ... McLean, W.H. (2006).** Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nature Genetics*. 38: 337–42.
- Sonkoly, E., Muller, A., Lauerma, A. I., ... Homey, B. J Allergy Clin Immunol. (2006).** IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 117 (2): 411–7.
- Spergel, J.M. (2010).** From atopic dermatitis to asthma: the atopic march. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 105: 99–106.
- Stephan Weidinger, Natalija Novak. (2015).** Atopic dermatitis. *The Lancet*. 387: 1109-1122.
- Sugama, S., Conti, B. (2008).** Interleukin 18 and stress. *Brain Research Reviews*. 58: 85–9.

- Suwarsa, O., Adi, S., Idjradinata, P., Sutedja, E., Avriyanti, E., Asfara, A., Gunawan, H. (2017).** Interleukin-18 correlates with interleukin-4 but not interferon- γ production in lymphocyte cultures from atopic dermatitis patients after staphylococcal enterotoxin B stimulation. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*. 35 (1): 54–59.
- Zauli, D., Grassi, A., Granito, A., Foderaro, S., De Franceschi, L., Ballardini, G., Bianchi, F.B., Volta, U. (2000).** Prevalence of silent coeliac disease in atopics. *Digestive and liver disease official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 32 (9): 775–9.
- Zhang, Q., Putheti, P., Zhou, Q., Liu, Q., Gao, W. (2008).** Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. 19 (5-6): 347–56
- Tanaka, T., Tsutsui, H., Yoshimot, T., ... Suemura, M. (2001).** Interleukin 18 is elevated in the sera from patients with atopic dermatitis and from atopic dermatitis model mice, NC/Nga. *International Archives of. Allergy and Immunology*. 125: 236–240.
- Terada, M., Tsutsui, H., Imai, Y., Yasuda, K., Mizutani, H., Yamanishi, K., Kubo, M., Matsui, K., Sano, H., Nakanishi, K. (2006).** Contribution of IL-18 to atopic-dermatitis-like skin inflammation induced by *Staphylococcus aureus* product in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (23): 8816–8821.
- Thompson, S. R., Humphries, S. E. (2007).** Interleukin-18 genetics and inflammatory disease susceptibility. *Genes and Immunity*. 8: 91–9.
- Tokura, Y. (2010).** Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Science*. 58 (1): 1-7.
- Tomi, N. S., Kränke, B., Aberer, E. (2005).** Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 53 (1): 67–72.
- Trzeciak, M., Gleń, J., Bandurski, T., Sokołowska-Wojdyło, M., Wilkowska, A., Roszkiewicz, J. (2011).** Relationship between serum levels of interleukin-18, IgE and disease severity in patients with atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Dermatology*. 36 (7): 728–32.
- Uibo, O., Metsküla, K., Kukk, T., Rägo, T., Uibo, R. (1996).** Results of coeliac disease screening in Estonia in 1990-1994. *Acta Paediatrica*. 412: 39–41.

Walker-Smith, J. A., Guandalini, S., Schmitz, J., Shmerling, D. H., Visakorpi, J. K. (1990). Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. Archives of Disease in Childhood. 65: 909–911.

Weidinger S and Novak N. (2016). Atopic dermatitis. Lancet. 387: 1109–22.

Williams, H.C., Burney, O. G. J., Pembroke, A. C., Hay, R. J. (1994). The UK Working Party's diagnostic criteria for atopic dermatitis. III. Independent hospital validation. The British Journal of Dermatology. 131: 406–416.

Wütrich, B. (1978). Serum IgE in atopic dermatitis: Relationship to severity of cutaneous involvement and course of disease as well as coexistence of atopic respiratory diseases. Clinical & Experimental Allergy. 8 (3): 241–248.

KASUTATUD VEEBIALLIKAD

5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix, tootja juhend.

https://www.sbd.ee/pics/7723_Data_Sheet_HOT_FIREPol_EvaGreen_qPCR_Supermix.pdf
(15.04.18)

FIREScript RT cDNA Synthesis MIX, tootja juhend.

[https://www.sbd.ee/pics/7690_Data_Sheet_FIREScript_RT_cDNA_Synthesis_MIX_with_Oligo_\(dT\)_and_Random_primers.pdf](https://www.sbd.ee/pics/7690_Data_Sheet_FIREScript_RT_cDNA_Synthesis_MIX_with_Oligo_(dT)_and_Random_primers.pdf) (15.04.18)

Magnetic Luminex Assay, tootja juhend.

<https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/lxsahm.pdf> (25.02.18)

TagMan SNP Genotyping Assays, tootja juhend.

https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0009593_TaqManSNP_UG.pdf (10.04.18)

KASUTATUD RAAMATUD

Uibo, R., Kisand, K., Peterson, P., Reimand, K. 2015. Immunoloogia. Õpik kõrgkoolidele. Tartu Ülikooli Kirjastus, Tartu.

TÄNUAVALDUSED

Magistritöö finantseeriti järgmiste projektide raames:

1. Eesti Teadusfondi uurimistoetus projektile ETF8334 „Tsöliaakia ja atoopiline dermatiit. Koosinemine ja immunoloogilised aspektid“,
2. Haridus- ja Teadusministeeriumi sihtfinantseering projektile SF0180035s08 "Autoimmuunsuse molekulaarsed ja rakulised mehhanismid: autoimmuunse diabeedi ja kaasnevate haiguste uuring“
3. Institutsionaalne uurimistoetus IUT20-43.

Täna dr. Krista Ressi Ida-Tallinna Keskhaiglast kogutud proovimaterjali ja uuritavate andmete eest.

Täna Kristi Alneki Tartu ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi immunoloogia osakonnast, kes eraldas RNA vererakkudest, määras ICOS geeni polümorfismid ning Stafülokoki enterotoksiini A ja B spetsiifilised IgE antikehad.

Täna Kristi Alneki ja Helis Janson-Tasat tTGA-IgA, tTGA-IgG, AGA-IgA, AGA-IgG, üld-IgE, IgE fx5 ja fx20 määramise eest.

Täna Tartu ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi immunoloogia osakonna teadurit Aili Tagomat *Magnetic Luminex Assay Multiplex* meetodi õpetamise eest.

Suur aitäh minu juhendajatele Tamara Vorobjovale ja Sulev Ingerpuule igakülgse abi ja asjalike nõuannete eest.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Piret Mihkelson, (sünnikuupäev: 29.08.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Interleukiin-18 ja -31 määramine seerumist ja interleukiin-18 ja ICOS geenide ekspressioon täisvererakkudes atoopilise dermatiidi ja tsöliaakiaga lastel“,

mille juhendajad on Tamara Vorobjova ja Sulev Ingerpuu,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.08.2018