

Vilniaus Universitetas

Anželika Chomičienė

**AUTOREAKTYVUMO RODIKLIŲ DIAGNOSTINĖ  
REIŠMĖ SERGANT LĖTINE DILGĖLINE**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (07B)

Vilnius, 2009

Disertacija rengta 2005–2009 metais Vilniaus universitete

Mokslinis vadovas:

Prof. dr. Marek L. Kowalski (Lodzės Medicinos Universitetas, Imunologijos, reumatologijos ir alergologijos klinika, biomedicinos mokslai, medicina – 07B)

## TURINYS

<b>SANTRUMPOS</b> .....	<b>5</b>
<b>1 ĮVADAS</b> .....	<b>6</b>
<b>2 TYRIMO TIKSLAS</b> .....	<b>10</b>
<b>3 TYRIMO UŽDAVINIAI</b> .....	<b>10</b>
<b>4 MOKSLINĖ DARBO REIKŠMĖ IR NAUJUMAS</b> .....	<b>11</b>
<b>5 GINAMIEJI TEIGINIAI</b> .....	<b>11</b>
<b>6 LITERATŪROS APŽVALGA</b> .....	<b>12</b>
6.1 ISTORINIAI FAKTAI.....	12
6.2 LĒTINĖ AUTOIMUNINĖ DILGĒLINĖ SUKELIANTYS AUTOANTIKŪNAI.....	12
6.3 GALIMI PUTLIJŲ LĀSTELIŲ BEI BAZOFILŲ AKTYVACIJOS MECHANIZMAI (NAUJOS KONCEPCIJOS).....	16
6.4 BAZOFILAI IR PUTLIOSIOS LĀSTELĒS – PAGRINDINĒS LĀSTELĒS-TAIKINIAI, DALYVAUJANĀIOS LĒTINĒS AUTOIMUNINĒS DILGĒLINĒS MECHANIZME .....	18
6.5 LĒTINĒS AUTOIMUNINĒS DILGĒLINĒS IR AUTOIMUNINIO TIROIDITO BEI KITŲ AUTOIMUNINIŲ LIGŲ RYĖYS .....	20
6.6 LĒTINĒS AUTOIMUNINĒS DILGĒLINĒS IR PADIDĒJUSIO JAUTRUMO NESTEROIDINIAMS VAISTAMS NUO UŖDEGIMO RYĖYS .....	23
6.7 AUTOANTIKŪNŲ, DALYVAUJANĀIŲ LĒTINĒS AUTOIMUNINĒS DILGĒLINĒS MECHANIZME, NUSTATYMAS.....	23
6.7.1 ODOS TESTAS NAUDOJANT AUTOLOGINIŲ SERUMĀ .....	23
6.7.2 LABORATORINIAI AUTOANTIKŪNŲ NUSTATYMO METODAI.....	25
6.7.2.1 TYRIMAI, PANAUDOJANT SURIĖANĀIUOSIUS ANTIKŪNUS.....	25
6.7.2.2 HISTAMINO ATPALDAVIMO TESTAS.....	25
6.8 BAZOFILŲ AKTYVACIJOS TESTAI .....	27
<b>7 TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODIKA</b> .....	<b>34</b>
7.1 TIRIAMIEJI .....	34
7.2 TYRIMAI .....	34
7.2.1 TYRIMAI, PATVIRTINANTYS LĒTINĒS AUTOIMUNINĒS DILGĒLINĒS DIAGNOZĒ .....	34
7.2.2 KITŲ AUTOIMUNIZACIJOS RODIKLIŲ TYRIMAI .....	34
7.3 KLAUSIMYNAS.....	35
7.4 DARBO METODIKA .....	35
7.4.1 ODOS TESTO SU AUTOLOGINIŲ SERUMU METODIKA .....	35
7.4.2 BAZOFILŲ AKTYVACIJOS TESTŲ METODIKA .....	36
7.4.2.1 CD203C PAVIRĖIAUS EKSPRESIJOS TYRIMAS .....	37
7.4.2.2 CD63 PAVIRĖIAUS EKSPRESIJOS TYRIMAS .....	39
7.5 DUOMENŲ STATISTINĒ ANALIZĒ.....	42
<b>8 TYRIMŲ REZULTATAI</b> .....	<b>44</b>
8.1 CD63 IR DC203C ŖYMENŲ EKSPRESIJOS TYRIMŲ REZULTATAI.....	44
8.2 RIBINĒS VERTĒS PASIRINKIMAS.....	47
8.3 ODOS TESTO NAUDOJANT AUTOLOGINIŲ SERUMĀ TYRIMŲ REZULTATAI .....	51
8.4 TYRIMŲ KORELIACIJA .....	51
8.5 KITŲ AUTOIMUNIZACIJOS RODIKLIŲ TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ KORELIACIJA SU LĒTINĒS AUTOIMUNINĒS DILGĒLINĒS TESTAIS .....	57

8.5.1	ANTIŲŲNAI PRIEŠ SKYDLIAUKĖS MIKROSOMŲ PEROKSIDAZĖ IR TIROTROPINIS HORMONAS .....	57
8.5.2	ANTIŲŲNAI PRIEŠ BRANDUOLIŲ ANTIGENUS IR ANTIŲŲNAI PRIEŠ NEUTROFILŲ CITOPLAZMOS ANTIGENUS .....	60
8.6	KLAUSIMYNAS.....	62
8.6.1	LIGOS AKTYVUMAS .....	62
8.6.2	LIGOS TRUKMĖ.....	65
8.6.3	ANGIOEDEMA.....	67
8.6.4	JAUTRUMO NESTEROIDINIAMS VAISTAMS NUO UŹDEGIMO VERTINIMAS .....	68
8.6.5	GYDYMO VEIKSMINGUMAS .....	71
<b>9</b>	<b>REZULTATŲ APTARIMAS.....</b>	<b>73</b>
<b>10</b>	<b>IŠVADOS.....</b>	<b>79</b>
<b>11</b>	<b>REKOMENDACIJOS.....</b>	<b>80</b>
<b>12</b>	<b>PRIEDAI.....</b>	<b>81</b>
<b>13</b>	<b>LITERATŲROS SARAŠAS.....</b>	<b>87</b>
<b>14</b>	<b>SPAUDINTI DARBAI.....</b>	<b>99</b>

## Santrumpos

Santrumpos	Paaiškinimas
ANA	antikūnai prieš branduolių antigenus
ANCA	antikūnai prieš neutrofilų citoplazmos antigenus
ATPO	antikūnai prieš skydliaukės mikrosomų peroksidazę
Anti-FcεRI antikūnai	antikūnai prieš didelio afiniškumo IgE receptorius
Anti-IgE antikūnai	antikūnai prieš imunoglobuliną E
ASST	angl. <i>autologous serum skin test</i> – odos testas naudojant autologinį serumą
BSB	bazofilų stimuliacinis buferis
CD	angl. <i>cluster of differentiation</i> (ląstelių paviršiaus žymuo)
EAACI	Europos alergologijos ir klinikinės imunologijos akademija
ELISA	imunofermentinis antikūnų nustatymo metodas
E-NPP	ektonukleotidų pirofosfatazė/fosfodiesterazė (transmembraniniai proteinais)
FITS	fluoresceino-izotiocianato fluorochromas
fMLP	Formil-Met-Leu-Phe chemotaktinis peptidas naudojamas teigiamai testo kontrolei
HLA DR, DQ	angl. <i>human leucocyte antigens</i> – žmogaus leukocitų antigenai; sinonimas – žmogaus pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas (HLA DR ir DQ tai HLA II klasės genai)
IgE	imunoglobulinas E
IgG	imunoglobulinas G
IgM	imunoglobulinas M
ITAM	angl. <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> – imuninio atpažinimo receptoriaus
IVIG	intraveninis imunoglobulinas
LAMP-3	su lizosomomis susijęs membranos baltymas
LAD	lėtinė autoimuninė dilgėlinė
LD	lėtinė dilgėlinė
NVNU	nesteroidiniai vaistai nuo uždegimo
PBS	angl. <i>phosphate buffered saline</i> – tirpalas, naudojamas neigiamai testo kontrolei
PE	fikoeritrino fluorochromas
PerCP	peridin-chlorofilproteinas
ROC	angl. <i>receiver operator characteristic</i> – gautų duomenų efektyvumą charakterizuojančios kreivės
SD	angl. <i>standart deviation</i> – standartinis nuokrypis
TME	angl. <i>total misclassification error</i> – bendros klasifikacijos paklaidos
Th	T limfocitai helperiai
TTH	tirotropinis hormonas

# 1 Įvadas

Įvairių specialybių gydytojai savo praktikoje dažnai susiduria su lėtine dilgėline (LD). Dilgėlinė priklauso nevienalyčių ligų (sutrikimų/būklių) grupei, kuriai būdingas vienodas odos reakcijos tipas – bėrimas pūkšlėmis su angioedema ar be jos. LD būdingi bėrimai, spontaniškai (be aiškios priežasties) atsirandantys odoje ir trunkantys ilgiau nei 6 savaites [1]. Apie pusę LD atvejų bėrimus lydi angioedema [2, 3].

Nepaisant atliekamų įvairių klinikinių ir laboratorinių tyrimų, apie 75% atvejų LD priežastis [4] lieka neaiški. Tuomet nustatoma lėtinės idiopatinės dilgėlinės diagnozė. Gydytojai, konsultuojantys pacientus, sergančius LD, neretai atsiduria aklavietėje bandydami nustatyti ligą sukėlusią priežastį. Nepaisant daugelio pacientų ir šeimos gydytojų vilčių, alergija išoriniams veiksniams – labai retai nustatoma LD priežastis [5-7].

LD serga 0,5–1% visos žmonių populiacijos [8]. Daugiau nei 50% pacientų ši liga tęsiasi apie 1 metus, ilgiau nei 20 metų – net 20% pacientų [9]. Blogėja pacientų gyvenimo kokybė, simptomai turi įtakos jų fizinei ir emocinei būklei [10-14]. Pacientų, sergančių LD, gyvenimo kokybės sutrikimas panašus į sergančiųjų psoriaze ar sunkia koronarine širdies liga [12, 15].

Nustatyta, kad svarbiausias vaidmuo atsirasti dilgėlinei tenka putliosioms odos ląstelėms ir bazofilams [16-18]. Degranuliuojant putliosioms ląstelėms ir bazofilams, iš jų atsipalaiduoja pagrindinis mediatorius histaminas, sukeliantis odos kraujagyslių išsiplėtimą ir didesnę jų pralaidumą. Dilgėlinės patofiziologiniame mechanizme taip pat dalyvauja ir kitos, vietinį uždegimą sukeliančios medžiagos (prostaglandinai, leukotrienai, citokinai ir chemokinai), kurias gamina įvairios putliosios ląstelės ir bazofilai aktyvacijos metu. Šios medžiagos lemia simptomų polimorfizmą [19].

Pacientų, sergančių LD, odos biopstatuose randamas didesnis T limfocitų, eozinofilų, bazofilų ir makrofagų kiekis. Pokyčiai yra panašūs į lėto tipo odos alerginę reakciją, bet vyrauja Th0 (nulinio T helperių limfocitų tipo), o ne Th2 (antro T helperių limfocitų tipo) išskiriami citokinai [20].

Pagal išsivystymo mechanizmą dilgėlinė skirstoma į imuninę ir neimuninę. Imuninis, I tipo (pagal P.G.H. Gell ir R.R.A. Coombs) nuo IgE ir alergeno sąveikos priklausomas mechanizmas retai būna LD priežastimi. Neseniai nustatyta, kad autoantikūnų prieš imunoglobuliną E (IgE) arba jo receptorių putliųjų ląstelių paviršiuje sąveika netgi 50% pacientų lemia LD atsiradimą (II tipo padidėjusio jautrumo reakcijos). Putliųjų ląstelių aktyvacija taip pat gali vykti pagal III tipo padidėjusio jautrumo reakcijų mechanizmą. Šiuo atveju cirkuliuojantys imuniniai kompleksai prisijungia prie putliųjų ląstelių ekspresuojamų Fc imunoglobulino G (IgG) arba imunoglobulino M (IgM) receptorių. IV tipo padidėjusio jautrumo reakcijos vyksta T limfocitams sukėlus putliųjų ląstelių aktyvaciją. Neimuninis LD mechanizmas aiškinamas putliųjų ląstelių aktyvacija per membranos receptorių, priklausančius įgimtam imuniniam atsakui (pavyzdžiui komplemento, *Tool-like*, citokinų/chemokinių receptorių) [19].

Moksliniuose straipsniuose dažniausiai minimos šios LD priežastys: lėtinė infekcija, nealerginė reakcija į maistą ir autoimuninė ligos prigimtis.

Pacientams, sergantiems LD labai dažnai nustatoma lėtinė infekcija, bet įrodyti jos įtaka LD atsiradimui yra sudėtinga, trūksta įrodymais pagrįstų tyrimų, nors manoma, kad ryšys egzistuoja. Aprašyta LD sąsaja su virusine infekcija (A, B ir C hepatitu), bakterine viršutinių kvėpavimo takų infekcija (streptokokine, stafilokokine), žarnyno kandidoze, jersinioze [6, 21, 22]. Su *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infekcija susijęs gastritas – viena iš dažniausiai nurodomų infekcinių LD priežasčių [23-27]. Iki šiol neaišku, ar tai priežastinis, ar atsitiktinis ryšys. Trūksta dvigubai aklų placebo kontroliuojamų tyrimų, patvirtinančių eradikacinio *H. pylori* gydymo efektyvumą. Yra duomenų, kad *H. pylori* infekcija gali sukelti autoimuninį LD mechanizmą [28].

Dauguma pacientų, sergančių LD, viliasi, kad jų odos bėrimų priežastis – „alergija maistui“, tačiau I tipo (pagal P.G.H. Gell ir R.R.A. Coombs) IgE sukeltos reakcijos į maistą yra labai retos [3, 29, 30, 22, 31]. Placebo kontroliuojamų dvigubai aklų klinikinių tyrimų duomenimis iki 39% pacientų nustatyta padidėjusio jautrumo (nealerginė) reakcija maisto priedams (pvz., azoto

dažams, benzoatams, nitritams) arba dar dažniau į maiste esančius natūraliai atsirandančius aromatinius junginius. Tik pusei šių pacientų dilgėlinės simptomai visiškai išnyksta taikant eliminacinę dietą. Tai rodo, kad egzistuoja kiti veiksniai, atsakingi už LD patofiziologinį mechanizmą ir yra galima kelių veiksnių sąveika [22]. Zuberbier ir bendraautorai nustatė, kad dalis pacientų, kuriems nustatytos pseudoalerginės reakcijos maistui, turi autoantikūnų prieš imunoglobulino E receptorius [32]. Autoriai mano, kad šių dviejų veiksnių sąveika gali lemti LD simptomų atsiradimą.

Pastaraisiais metais nuo 30 iki 50% LD atvejų siejama su autoimunine ligos prigimtimi [33], netgi atsirado atskiras terminas – “autoimuninė dilgėlinė”. Vaikams taip pat dažnai patvirtinama autoimuninė LD priežastis (30–47% atvejų) [34, 35].

Pacientų, sergančių lėtine autoimunine dilgėline (LAD) kraujyje randami dviejų tipų antikūnai: nukreipti prieš epitopus, ekspresuojamus didelio afiniškumo IgE receptoriaus (FcεRI) α-grandinėje (anti-FcεRIα), ir nukreipti prieš patį IgE (anti-IgE). LAD neturi aiškių skiriamųjų klinikinių požymių palyginus su lėtine idiopatine dilgėline [36], bet jai būdinga:

- sunkesnė eiga [37, 38];
- dažniau odos biopsijose randami neutrofilai [39-42];
- sumažėjęs bazofilų kiekis periferiniame kraujyje ir sumažėjęs bazofilų histamino atpalaidavimas per FcεRI aktyvacijos kelią [43-45];
- asociacija su HLA-DR ir HLA-DQ alelėmis, kurios būdingos autoimuninėms ligoms – DRB\*04 (DR4), DQB1\*0302 (DQ8) [46].

Pacientų sergančių LAD, įprastinis dilgėlinės gydymas antihistamininiais preparatais dažnai būna neveiksmingas [3]. Tokiems pacientams neretai naudojamas imunosupresinis gydymas (vadinamoji imunoterapija), vartojant geriamus kortikosteroidų preparatus [17, 25], ciklosporiną A [47-50], intraveninį imunoglobuliną (IVIG) [51, 52], metotreksatą [53, 54], azatiopriną [55], taikant anti-IgE terapiją (omalizumab) [56, 57], plazmaferezę [58], autohemoterapiją [59, 60]. Deja, tik ciklosporinas A turi antro lygio veiksmingumo patvirtinimą (rekomendacijos laipsnis – C) pagal SIGN (angl. *Randomized Controlled Trials*



*of the Scottish Intercollegiate Guidelines Network* – Škotijos tarpuniversitetinių nuostatų sistema randomizuotiems kontroliuojamiems klinikiniais tyrimams) ir gali būti pagrįstai skiriamas pacientams, sergantiems LD, kuriems įprastinis gydymas yra neveiksmingas [61]. Tačiau šiuo metu trūksta klinikinių tyrimų, patvirtinančių kitų gydymo metodų veiksmingumą.

LAD diagnozuojama odos testu naudojant autologinį serumą (angl. *autologous skin serum test* – ASST) ir laboratoriniais autoantikūnų tyrimais [36]. ASST leidžia įtarti, bet LAD diagnozės nepatvirtina. Jis yra nespecifinis ir nurodo, kad kraujo serume yra bet kokių histaminą atpalaiduojančių veiksnių, bet nebūtinai autoantikūnų [62]. Laboratoriniai *Western blot* analizės [63-65] ir imunofermentinis (angl. *enzyme linked immunosorbent assay* – ELISA) [66, 32] metodai leidžia aptikti antikūnus prieš IgE receptorių ar patį IgE, neatskirdami funkciškai aktyvių antikūnų nuo funkciškai neaktyvių (nesukeliančių bazofilų degranuliacijos), t.y. šiais metodais negalime nustatyti ar antikūnai yra patogeneziški.

LD sergančio paciento kraujo serume funkciškai aktyvius antikūnus galima patvirtinti naudojant histamino atpalaidavimo testą [67-69] ir bazofilų aktyvacijos žymenų tyrimą tėkmės citometrijos būdu [70-75]. Šiuo metu histamino atpalaidavimo iš donoro bazofilų testas išlieka auksiniu standartu diagnozuojant LAD, tačiau šis testas yra sudėtingas ir užimantis daug laiko. Įvairūs praktiniai ir techniniai jo trūkumai riboja jo taikymą klinikinėje praktikoje [3]. Pastaruoju metu LAD diagnozei patvirtinti bandoma atrasti alternatyvių testų, kurie galėtų būti naudojami LD sergančių pacientų atrankinei patikrai. Daug vilčių teikiama bazofilų aktyvacijos, naudojant tėkmės citometriją, testams. Tik 2000 metais paskelbta darbų apie LAD diagnostikai taikomus bazofilų aktyvacijos tyrimus nustatant CD63 ir CD203c (angl. *cluster of differentiation* – CD, t. y. leukocitų diferenciacijos antigenai) žymenų ekspresiją donoro bazofilų paviršiuje.

Nustatyti LAD diagnozę yra svarbu parenkant tolimesnę gydymo taktiką bei įvertinant ligos prognozę.

Apie autoreaktyvumo rodiklių tyrimus, naudojamus pacientams, sergantiems LD, Lietuvoje iki šiol neskelbta.

## **2 Tyrimo tikslas**

Nustatyti autoreaktyvumo rodiklių diagnostinę reikšmę ir jų tarpusavio ryšį pacientams, sergantiems lėtine dilgėline.

## **3 Tyrimo uždaviniai**

1. Palyginti CD63 ir CD203c žymenų ekspresiją donoro bazofilų, paveiktų sergančių LD ir sveikų asmenų kraujo serumu, paviršiuje.
2. Nustatyti bazofilų CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų optimalią ribinę vertę diagnozuojant lėtinę autoimuninę dilgėlinę.
3. Nustatyti bazofilų CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų jautrumą, specifiškumą bei jų reikšmę diagnozuojant lėtinę autoimuninę dilgėlinę.
4. Įvertinti sergančiųjų LD bazofilų CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų tarpusavio koreliaciją bei koreliaciją su odos testu naudojant autologinį serumą.
5. Įvertinti sergančiųjų LD bazofilų CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų, ASST ir kitų autoimunizacijos rodiklių (skydliaukės antikūnų prieš mikrosomų peroksidazę (ATPO), antikūnų prieš branduolių antigenus (ANA), antikūnų prieš neutrofilų citoplazmos antigenus (ANCA)) tarpusavio ryšį.
6. Įvertinti autoreaktyvumo rodiklių ryšį su LD aktyvumu, jos trukme, angioedemos pasireiškimu, jautrumu nesteroidiniams vaistams nuo uždegimo (NVNU) ir įprastinio gydymo veiksmingumu.

## **4 Mokslinė darbo reikšmė ir naujumas**

1. Ištirta sergančiųjų LD bazofilų CD63 ir CD203c žymenų ekspresija ir palyginti tyrimų rezultatai.
2. Įvertintas bazofilų CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų jautrumas ir specifiškumas, naudojant skirtingas ribines vertes.
3. Nustatyta bazofilų CD63, CD203c žymenų ekspresijos tyrimų ir ASST koreliacija bei jų diagnostinė reikšmė diagnozuojant lėtinę autoimuninę dilgėlinę.
4. Įvertinta bazofilų CD63, CD203c žymenų ekspresijos tyrimų ir ASST koreliacija su kitais autoimunizacijos rodikliais.
5. Įvertintas autoreaktyvumo rodiklių ryšys su ligos aktyvumu, trukme, angioedemos pasireiškimu, jautrumu NVNU ir gydymo veiksmingumu.

## **5 Ginamieji teiginiai**

1. Bazofilų CD63 ir CD203c žymenų ekspresija reikšmingai didesnė LD sergančiųjų, palyginus su kontroline grupe.
2. Optimalus bazofilų CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos testų jautrumas ir specifiškumas pasiekiamas, naudojant 10% abiejų tyrimų ribinę vertę autoimuninės dilgėlinės kilmei nustatyti.
3. Bazofilų CD63 žymens ekspresijos tyrimas pasižymi geresnėmis prognostinėmis savybėmis, palyginti su CD203c tyrimu. Jis patikimai koreliuoja su ASST ir gali būti naudojamas LAD diagnozuoti.
4. Patikimos ASST, bazofilų CD63, CD203c žymenų ekspresijos tyrimų koreliacijos su kitais autoimunizacijos rodikliais (ATPO, ANA, ANCA) bei ligos aktyvumu, trukme, angioedemos pasireiškimu bei jautrumu NVNU nenustatyta.
5. Sergančiųjų LD, kurių ASST teigiamas, įprastinis gydymas antihistamininiais preparatais yra mažiau veiksmingas nei pacientų, kuriems ASST neigiamas.

## 6 Literatūros apžvalga

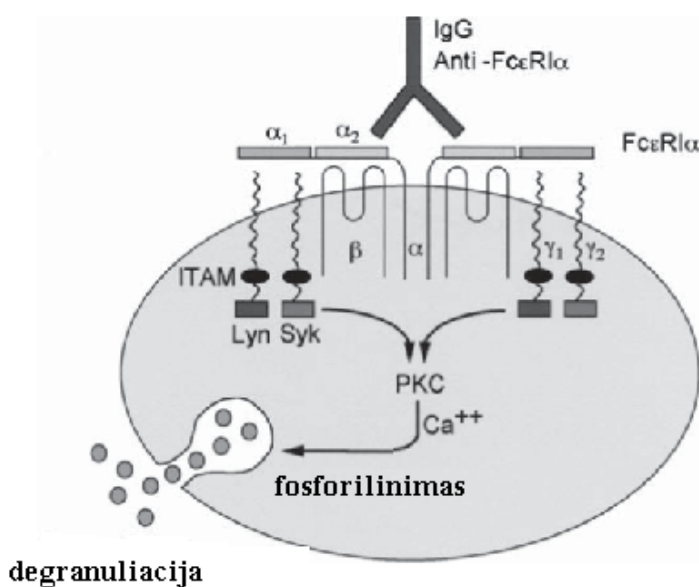
### 6.1 Istoriniai faktai

Pirmasis 1983 metais autoimuninę dilgėlinės kilmės teoriją paskelbė A. Leznoff, pastebėjęs ryšį tarp LD ir skydliaukės ligų [76]. Tuomet buvo pasiūlytas naujas "autoimuninės skydliaukės ligos ir LD sindromo" terminas. 1986 m. C.E. Grattan ir bendraautoriai paskelbė straipsnį, kuriame aprašomas serumo faktorius, kuris kai kuriems pacientams, sergantiems LD sukelia odos pabrinkimą, kai paciento serumas suleidžiamas jam į odą [77]. 1988 metais B.L. Gruber ir bendraautoriai atrado anti-IgE antikūnus. Dalis jų pasirodė funkciškai aktyvūs. B.L. Gruber pirmasis nustatė, kad šie antikūnai gali būti dilgėlinės atsiradimo priežastis [78]. C.E. Grattan ir bendraautoriai 1991 metais įrodė kraujo serumo anti-IgE antikūnų histaminą atpalaiduojantį poveikį ir vėliau patvirtino, kad didžiąją jų dalį sudaro anti-FcεRI antikūnai [79]. 1993 metais M. Hide ir bendraautoriai sergančiųjų LD kraujo serume nustatė IgG klasės antikūnus prieš FcεRI α-grandį [80]. Vėliau (1998 metais) buvo įrodyta, kad šie antikūnai yra funkciškai aktyvūs, matuojant *in vitro* histamino atpalaidavimą iš bazofilų ir odos putliųjų ląstelių [66]. R.A. Sabroe ir bendraautoriai 1999 metais nustatė, kad asmenys, sergantys LD, ir kurių kraujyje randama histaminą atpalaiduojančių autoantikūnų, kenčia nuo sunkesnių LD simptomų palyginus su kitais sergančiais LD [38]. Beveik tuo pačiu metu įrodyta, kad histamino išsiskyrimą iš bazofilų, kurie aktyvuojami anti-FcεRI autoantikūnais, skatina komplemento sistemos aktyvacija per C5a komponentą [81, 17, 82, 83].

### 6.2 Lėtinę autoimuninę dilgėlinę sukeliantys autoantikūnai

LAD sukeliantys antikūnai prisijungia prie FcεRI arba paties IgE putliųjų ląstelių ir bazofilų paviršiuje. FcεRI – tai molekulinis kompleksas, susidedantis iš keturių subvienietų: α-grandinės, β-grandinės ir γ-grandinių dimero. α-grandinė prijungia IgE, o β- ir γ-grandinės dalyvauja perduodant viduląstelinį signalą. Citoplazminė FcεRI dalis susideda iš tirozino ir leucino liekanų, kurios sudaro

imuninio atpažinimo receptorių ITAM (angl. *immunoreceptor tyrosine – based activation motif*). FcεRI susijęs su tirozinkinazėmis (*lyn, syk*), dalyvaujančiomis jo fosforilinimo procese. Šio receptoriaus aktyvinimas skatina antrinių imuninio signalo perdaviklių gamybą dėl kurių vyksta tolimesnis ląstelių aktyvinimas ir degranuliacija [19] (1 paveikslas). FcεRI tetrameras ( $\alpha\beta\gamma_2$ ) ekspresuojamas žmogaus bazofilų ir putliųjų ląstelių paviršiuje, o trimerinis kompleksas ( $\alpha\gamma_2$ ) yra ir kitų ląstelių (monocitų, Langerhanso, dentrynių ląstelių) paviršiuje [84].



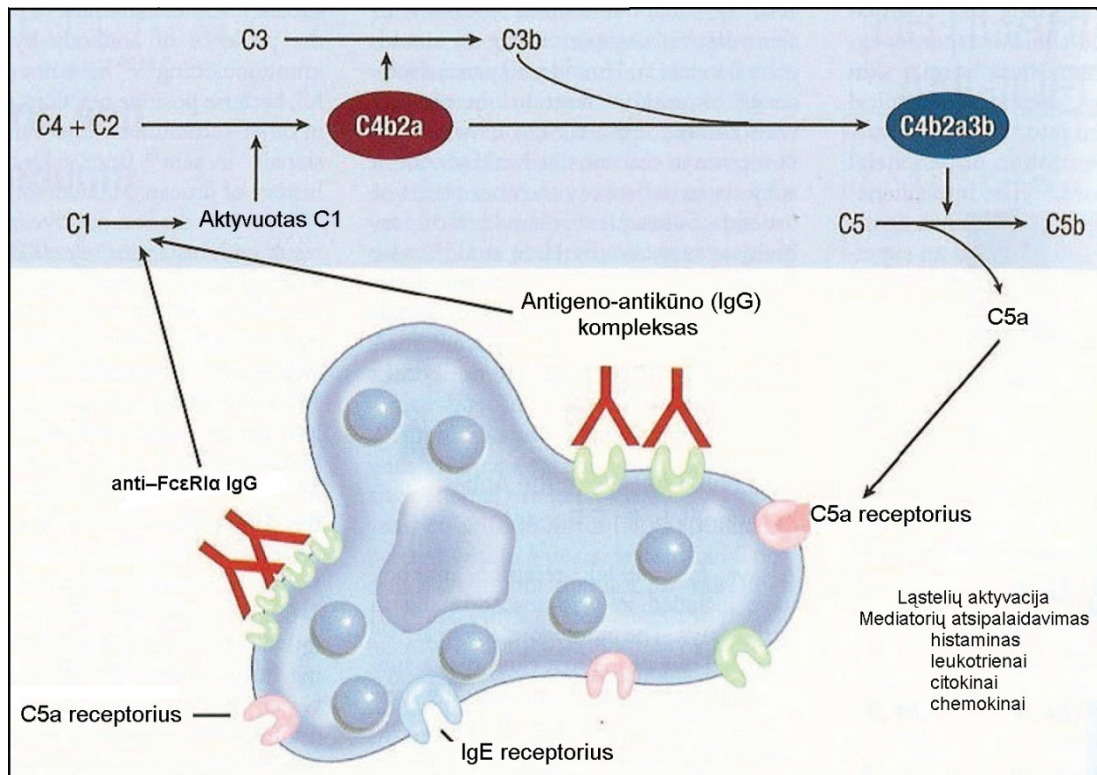
**1 pav.** IgG klasės autoantikūno prisijungimas prie FcεRIα (pagal [36])

(PKC – proteinkinazė C)

Dabar žinoma, kad IgG klasės antikūnai prieš FcεRI α-grandinės epitopus randami 35–40% LD atvejų [85, 80, 65, 86], nukreipti prieš patį IgE – 5–10% atvejų [79, 78, 17]. Įrodyta, kad egzistuoja ne viena antikūnų prisijungimo prie receptorių vieta, nes tik apie 30% autoantikūnų susijungia su epitopais, randamais IgE prisijungimo vietoje. Likę autoantikūnai reaguoja su kitais α-grandinės epitopais ir veikia bazofilų aktyvaciją nepriklausomai ar yra IgE ar nėra [80, 64]. Šis mechanizmas įrodytas pašalinus IgE nuo bazofilų receptorių (naudojant pieno rūgštį) arba įjautrinant juos IgE. Autoantikūnai, kurie susijungia su IgE prisijungimo vietoje esančiais epitopais, vadinami konkuruojančiais su IgE antikūnais.

Funkciškai aktyvūs antikūnai dažniausiai priklauso IgG1 ir IgG3 klasėms, rečiau – IgG4 klasei, funkciškai neaktyvūs – IgG2 klasei [66, 17, 33, 87].

Kai autoantikūnai prisijungia prie ląstelių receptorių, komplemento sistema aktyvuojama klasikiniu būdu. Komplemento sistemos aktyvacijos produktas – C5a komponentas prisijungia prie putliųjų ląstelių receptorių, padidindamas histamino sekreciją [17]. Šis procesas pavaizduotas 2 paveiksle. Skirtingų organizmo organų putliosios ląstelės skiriasi komplemento sistemos receptorių ekspresija, pvz., odos putliosios ląstelės ekspresuoja C5a receptorių, o plaučių putliosios ląstelės – ne. Šie duomenys paaiškina kodėl komplemento sistemos dalyvavimas skatina būtent odos putliųjų ląstelių aktyvaciją [88]. Komplemento sistemos aktyvacija klasikiniu keliu ir C5a komponento susidarymas yra svarbūs ne tik odos putliųjų ląstelių aktyvinimui, bet ir pritraukiant bei kaupiant kitas ląsteles pažeistoje odos srityje, kadangi C5a yra neutrofilų ir eozinofilų chemoatraktantas [89].



**2 pav.** Odos putliųjų ląstelių aktyvacija per receptorių antikūnus su tolimesniu komplemento sistemos aktyvinimu, C5a susidarymu ir putliųjų ląstelių mediatorių atpalaidavimo sustiprinimu (pagal [90])

Kad anti-FcεRIα ir anti-IgE antikūnai yra patogeniniai sergantiesiems LD, patvirtina šie duomenys [36]:

- autoantikūnai sukelia histamino atpalaidavimą iš odos putliųjų ląstelių ir bazofilų;
- šių histaminą atpalaiduojančių antikūnų nerandama sveikų žmonių serume;
- sumažėjęs bazofilų kiekis ir histamino atpalaidavimas per IgE mechanizmą šiems pacientams;
- taikant imunoterapinį gydymą (plazmaferezę ir IVIG) gaunamas geras klinikinis efektas ir sumažėja autoantikūnų.

Histamino atpalaidavimo iš bazofilų nesukeliančių anti-FcεRIα autoantikūnų randama ir kai kurių sergančiųjų kitomis autoimuninės prigimties ligomis kraujyje: paprastąja pūsline, dermatomiozitu, sisteme raudonąja vilklige, pūsliu pemfigoidu. Šie antikūnai priklauso IgG4 ir IgG2 klasėms, kurios dažniausia neaktyvina ar silpnai aktyvina komplemento sistemos [66]. Panašių

funkciškai neaktyvių anti-IgE antikūnų aptikta ir sergančiųjų urtikariniu vaskulitu bei šalčio provokuojama dilgėline [78], atopiniu dermatitu [91, 92] ir sveikų asmenų kraujyje [93]. Šių autoantikūnų reikšmė yra nežinoma.

### **6.3 Galimi putliųjų ląstelių bei bazofilų aktyvacijos mechanizmai (naujos koncepcijos)**

Pastarojo dešimtmečio moksliniuose straipsniuose pateikiama duomenų, jog sveikų asmenų kraujo serume randami natūralūs, pirmiausia IgM klasės, antikūnai prieš IgE receptoriaus  $\alpha$ -grandinę [94-97]. Šie antikūnai tampa funkciškai aktyvūs *in vitro* tik pašalinus IgE nuo IgE receptorių. Tokie antikūnai dalyvauja įgimto imuninio atsako procesuose. Tam tikromis aplinkybėmis natūralūs autoantikūnai gali tapti patogeniniais ir tai priklauso nuo prisijungusių prie Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  IgE molekulių kiekio (receptorių „užimtumo“) (M.P. Horn ir bendraautoriai [95]). Autorių nuomone LD išsivysto dėl to, kad pakinta jau anksčiau atsiradusių natūralių autoantikūnų prisijungimas prie audinių ląstelių, bet ne dėl naujų antikūnų susidarymo. Jie teigia, kad bet koks poveikis odai (fiziniai veiksniai ir kiti dirgikliai) gali sukelti didesnę Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  ekspresiją, skatinančią putliųjų ląstelių degranuliaciją. Kiek anksčiau M.P. Horn ir bendraautoriai nustatė autoantikūnus prieš Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  ne tik sergančiųjų LD, bet ir sveikų asmenų kraujyje, taip pat jie buvo aptinkami gydymui naudojamu IVIG preparatuose. IVIG rasti autoantikūnai nesukėlė histamino atpalaidavimo, bet kryžmiškai reagavo su stabligės toksoidu, atliekant imunoblot analizę. Autoriai daro prielaidą, kad anti-Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  gali priklausyti natūralių organizmo antikūnų prieš stabligės toksoidą atsiradusių dėl imunizacijos, grupei [98]. T. Bobrzynski ir bendraautorių nuomone IVIG randami autoantikūnai – tai mutavę natūralūs įgimto imuninio atsako IgG klasės antikūnai, kurie pasižymi silpnesniu afiniškumu IgE receptoriui [94]. A.P. Kaplanui ir bendraautoriams nepavyko pakartoti M.P. Horn ir bendraautorių eksperimento ir absorbuoti serumo antikūnais stabligės toksoidą. Jų nuomone, jeigu tokie antikūnai yra mūsų įgimto imuniteto dalis, tuomet jokie išorės dirgikliai nereikšmingi [17]. A.P. Kaplan nuomone, nežinomi dirgikliai arba sutrikę imuninės reguliacijos kontrolės



mechanizmai gali sukelti patogeninių IgG klasės autoantikūnų gamybą [17]. Reikalingi tolesni tyrimai, kurie patvirtintų, ar natūralūs antikūnai gali tapti patogeniniais, ar kiti veiksniai (epitopų specifiškumas, imunoglobulinų poklasės, komplemento fiksacija) yra svarbesni išsivystant LAD.

Manoma, kad yra ir kiti serumo veiksniai, skatinantys atpalaiduoti histaminą, bet nepriklausantys autoantikūnų grupei. Nustatyta, kad 5–10% pacientų, sergančių LD, serumas sukelia histamino atpalaidavimą tik iš putliųjų odos ląstelių, o ne bazofilų [99, 64]. Šis, tik putliosios ląstelės būdingas, didesnis nei 30 kDa histaminą atpalaiduojantis specifinis veiksnys nepriklauso IgG klasei ir yra tik dalinai ištirtas [100, 101, 45, 65].

Kitas, galimas histamino atpalaidavimą skatinantis veiksnys – tai periferinio kraujo mononuklearinių ląstelių sintezuojamas citokinas, kuris sustiprina histamino atpalaidavimą iš bazofilų ir veikia bazofilų, eozinofilų, T ląstelių citokinų gamybą [102-104].

Pateikta hipotezė, kad ląstelinis ar net subląstelinis veiksnys labiau nei humoralinis, atsakingas už LD atsiradimą. R. Confino-Cohen ir bendraautoriai pacientų, sergančių LD periferinio kraujo mononuklearinėse ląstelėse nustatė sutrikusią p21 Ras veiklą [105]. p21 Ras – tai protoonkogeninis produktas, o taip pat pagrindinis reguliacinis baltymas, keičiantis daugybę užląstelinį signalų, aktyvuojantis membranos receptorių ir skatinantis ląstelių augimą bei diferenciaciją. Šis baltymas atsakingas už T ląstelių ir interleukino-2 (IL-2) receptorių aktyvaciją. p21 Ras veiklos sutrikimas nustatomas tik LD sergantiems pacientams, kuriems teigiamas ASST. Panašūs pokyčiai nustatomi pacientams, sergantiems I tipo cukriniu diabetu bei sisteminė raudonąja vilklige. Taigi, autorių išvada, šis radinys dar kartą patvirtina autoimuninę LD prigimtį.

E. Toubi ir bendraautoriai sergančiųjų LD aktyvuotų T limfocitų paviršiuje nustatė didesnę CD40L (T limfocitų ligando) ekspresiją, palyginus su sveikais asmenimis ir pacientais, sergančiais kontaktiniu dermatitu [106]. Autoriai teigia, kad sergant LD yra stipresni kostimuliaciniai signalai B limfocitams, skatinantys jų aktyvaciją, polikloninę proliferaciją ir antikūnų gamybą. Taip pat pacientams, kurių LD eiga sunkesnė T ir B ląstelių paviršiuje nustatoma didesnė Bcl-2

baltymo ekspresija . Bcl baltymas apsaugo B ląsteles nuo apoptozės, šios ląstelės išlieka ir proliferuoja. Šie duomenys taip pat patvirtina, jog LD priklauso autoimuninių ligų grupei.

Visiškai neseniai R. Asero ir bendraautorių atliktų tyrimų dėka pateikta duomenų, kad LD gali būti susijusi su kraujo krešėjimo sistema. Sergančiųjų LD yra spartesnė trombino gamyba dėl išorinio krešėjimo sistemos kelio aktyvacijos ir fibrinolizės požymiai – padidėjęs D-dimerų kiekis kraujyje [107, 108]. Trombinas gali sukelti odos pabrinkimą didindamas kraujagyslių pralaidumą, skatindamas putliųjų ląstelių aktyvaciją ir degranuliaciją bei komplemento sistemos komponento C5a anafilatoksino gamybą [109]. Iki šiol lieka neaišku, ar autoantikūnų sukelta putliųjų ląstelių bazofilų aktyvacija ir išorinės kraujo krešėjimo grandies aktyvacija yra skirtingi LD sukeltys mechanizmai, ar galimas jų sinergistinis poveikis.

#### **6.4 Bazofilai ir putliosios ląstelės – pagrindinės ląstelės-taikiniai, dalyvaujantys lėtinės autoimuninės dilgėlinės mechanizme**

1961 metais H. Rorsman ir bendraautoriai pirmą kartą sergančiųjų LD kraujyje nustatė mažesnę cirkuliuojančių bazofilų kiekį [110]. Jie nenustatė, kad kaulų čiulpuose sumažėjo bazofilų gamyba ar padidėjo bazofilų sankaupos pūkšlėse ir padarė išvadą, kad bazofilų degranuliacija ar jų irimas kraujyje ar pažeistoje odoje gali būti bazopenijos priežastis. F. Kern ir bendraautoriai 1976 metais ištyrė, kad sergančiųjų LD bazofilai silpniau reaguoja į anti-IgE stimuliaciją [43]. Šie duomenys buvo patvirtinti ir kitų autorių [44]. Sergantiesiems LAD nustatytas ligos ryšys su bazopenija [111]. Pacientų, sergančių LD, bazofilai taip pat silpniau reaguoja į monokloninius anti-FcεRIα antikūnus ir standartinius eksperimentinius imunologinius dirgiklius, bet jų reakcija į neimuninę degranuliaciją sukeliančią medžiagą – FMLP (Formil-Met-Leu-Phe chemotaktinis peptidas) nepakitusi [44]. Gauti rezultatai grindžiami bazofilų desensibilizacija cirkuliuojančiais autoantikūnais *in vivo* per FcεRIα. Neseniai paskelbta nauja teorija, kuri bazofilų histamino išsiskyrimo per FcεRI kelią slopinimą aiškina sudėtingais molekulių, atsakingų už imuninio signalo

perdavimą po IgE receptoriaus aktyvacijos, ekspresijos mechanizmų sutrikimu [112]. Nustatyti skirtingi bazofilų degranuliacijos fenotipai, kurie susiję su FcεRI reguliuojančių fosfatazių disbalansu [113].

Bazofilai randami pažeistoje ir nepažeistoje sergančių LD odoje ir tai leidžia daryti prielaidą, jog bazofilai aktyviai migruoja į odą [40, 20]. C.E. Grattan ir bendraautorius nustatyta neigiama linijinė koreliacija tarp kraujo bazofilų skaičiaus ir ligos aktyvumo sutampa su hipoteze, kad ligos metu kraujo bazofilai plūsta lokaliai į bėrimo elementus [114]. Patvirtinta, kad bazopenija sergant LD koreliuoja su ligos aktyvumu [111, 44].

A.P. Kaplan ir bendra autoriai nustatė, kad stimuliuojant sergančių LD bazofilus savo paties serumu ar kito LD sergančio paciento serumu, histamino atpalaidavimas padidėja, palyginti su sveikais kontrolinės grupės asmenimis, nors sergančių LD atsakas į anti-IgE yra silpnesnis [17, 115]. Tai būdinga ir pacientams, sergantiems idiopatine ir autoimunine LD. Didesnio histamino atpalaidavimo priežastis bei jį sukeliantis serumo veiksnys yra nežinomi.

Svarbius tyrimo duomenis pateikė K. Vasagar ir vėliau F.D. Lourenco ir bendra autoriai [116, 117]. K. Vasagar ir bendra autoriai nustatė, kad pacientų, sergančių LD, bazofilų aktyvacijos CD63 žymens ekspresija yra didesnė palyginti su sveikų. Panaši CD63 žymens ekspresija būdinga pacientams, sergantiems alerginėmis ligomis. CD203c žymens ekspresijos skirtumų tarp tiriamųjų grupių autoriai nerado. F.D. Lourenco ir kolegos, ištyrę didesnę LD sergančių pacientų grupę, nustatė, kad ir CD63 ir CD203c bazofilų aktyvacijos žymenų ekspresija, o taip pat FcεRIα ekspresija yra didesnė sergančiųjų LD. Tai suteikia pagrindą manyti, kad sergančių LD bazofilai yra stimuliuojami *in vivo*. Įdomu, jog pacientų, kuriems patvirtinta LAD diagnozė (teigiamu ASST, bazofilų histamino išsiskyrimo testu, imunoblot tyrimu) CD63 ir CD203c žymenų ekspresija nebuvo intensyvesnė nei pacientų, kuriems autoantikūnų nenustatyta. Didesnė IL-3 receptoriaus ekspresija bazofilų paviršiuje nustatyta tik tiems pacientams, kuriems ASST buvo teigiamas. Pacientų, sergančių LD, bazofilus stimuliuojant IL-3, palyginti su sveikųjų grupe nustatyta didesnė CD203c žymens ekspresija taip pat greitas stipresnis atsakas į anti-IgE.

Sergančiųjų LD odoje nerandama didesnio putliųjų ląstelių kiekio [118]. Sergančiųjų LD putliųjų ląstelių tyrimų, kurie padėtų nustatyti jų funkcinius pokyčius, yra atlikta mažai (galbūt dėl sudėtingos didesnio kiekio putliųjų ląstelių izoliacijos). Visi tyrėjai pastebi, kad putliosios ląstelės labiau reaguoja į neimuninę stimuliaciją [5]. Neimuniniai dirgikliai – medžiaga 48/80 ir kodeino sulfatas, esant aktyviam ligos periodui, sukelia didesnę histamino išsiskyrimą iš odos putliųjų ląstelių. Ligos remisijos metu tai būdinga tik kodeino sulfatui [119, 120]. Imuninių dirgiklių įtaką nagrinėjo T. Zuberbier ir bendraautorai, paveikdami sergančių LD putliąsias ląsteles anti-IgE. Autoriai nenustatė mažesnio histamino išsiskyrimo palyginti su bazofilais [121]. Naujo, dar neskelbto spaudoje tyrimo duomenys rodo, kad histamino išsiskyrimas iš sergančiųjų LD putliųjų ląstelių padidėja sensibilizuojant jas IgE. Tai rodo, kad IgE kiekis turi įtakos putliųjų ląstelių IgE receptorių funkcijai ir patvirtina LD sergančių pacientų anti-IgE terapijos prasmingumą [112].

## **6.5 Lėtinės autoimuninės dilgėlinės ir autoimuninio tiroidito bei kitų autoimuninių ligų ryšys**

C. Monge ir bendraautorių 2007 metais paskelbto tyrimo duomenimis, nuo 3 iki 6% bendros populiacijos asmenų kraujyje yra nustatomi antikūnai prieš skydliaukės audinį [122]. Tai vienas iš dažniausių organui būdingų autoimuninių procesų.

A. Leznoff ir bendraautorai pirmieji padarė prielaidą, kad LD gali būti autoimuninės kilmės, kadangi sergančiųjų LD pacientų kraujyje rasdavo didesnę ATPO kiekį, palyginti su didesniu ATPO kiekiu bendroje populiacijoje. Autorių duomenimis, 12% šių pacientų (palyginti su 6% kontrolinėje grupėje) sirgo autoimunine skydliaukės liga [76]. Kito, tų pačių autorių didelės apimties tyrimo (624 pacientai) duomenimis, 14% sergančiųjų LD buvo nustatyti antimikrosominiai ir antitiroglobulininiai antikūnai. Moterims skydliaukės antikūnų nustatyta dažniau nei vyrams (moterų ir vyrų santykis 7:1) [123].

Kitų autorių duomenimis sergančiųjų LD antimikrosominių ir antitiroglobulininių antikūnų dažnis svyruoja tarp 12 ir 33%, bei dažniau

nustatomi skydliaukės antimikrosominiai antikūnai [124-128]. B.F. O' Donnell ir bendraautoriai, tirdamas 182 LD sergančius pacientus, dažniau nustatė didesnę skydliaukės antikūnų kiekį tiems pacientams, kuriems ASST buvo teigiamas [125]. Panašius rezultatus gavo N. Bakos ir bendraautoriai, ištyrę 48 pacientus [28] bei A. Fusari ir bendraautoriai, ištyrę 82 pacientus [129].

Paskelbta hipotezė, kad ląstelinio imuniteto reakcijos, prasidėjusios skydliaukėje, gali paskatinti dilgėlinių odos bėrimų atsiradimą. Sergančių LD odos bioptatuose, ir pacientų, sergančių Hašimoto tiroiditu, skydliaukės bioptatuose buvo randamos mažos grupelės su Vβ8 regionu susijusių T limfocitų. Manoma, kad šie limfocitai, išskirdami chemokinus, gali dalyvauti LD patogenezėje, bet galutinai tai nėra patvirtinta [122].

Neįrodyta, kad skydliaukės antikūnai patys savaime sukelia LD atsiradimą. Manoma, kad tai gali būti atskiri, bet tarpusavyje susiję autoimuniniai susirgimai [130, 131], o skydliaukės autoantikūnai atlieka tik autoimunizacijos žymens vaidmenį, ir uždegiminiai citokinai, išskiriantys dėl autoimuninio skydliaukės uždegimo, sumažina putliųjų ląstelių „slenkstį“ įvairiems endogeniniams ir egzogeniniams veiksniams [132].

Daugumai pacientų, sergančių LD, kuriems padidėjęs skydliaukės antikūnų kiekis, skydliaukės hormonų koncentracija yra normali. Daliai pacientų pasireiškia klinikiniai hipotirozidizmo simptomai ir labai mažai dalių – hipertirozė (ankstyvoje skydliaukės uždegimo fazėje) [17]. Literatūros šaltinių duomenimis, apie 19% sergančių LD turi sutikusios skydliaukės funkcijos požymių [133, 82].

Kai kurie autoriai pacientams, kuriems įprastinis LD gydymas yra neveiksmingas, siūlo skirti L-tiroksiną, net jei jiems nustatoma eutirozė. Tokio gydymo tikslas – sumažinti bazinį tirotropinio hormono (TTH) kiekį, kadangi jis turi daug citokinams būdingų savybių ir gali dalyvauti reguliuojant imuninį atsaką, veikdamas T ir B limfocitų bei dendritinių ląstelių aktyvaciją. Nors daugumai L-tiroksinu gydytų pacientų pasiekama pilna arba dalinė LD remisija, trūksta klinikinių tyrimų, patvirtinančių šio gydymo veiksmingumą [134, 135, 122, 132]. Daugumos autorių nuomone, visi pacientai, sergantys LD, turėtų būti

tiriami dėl autoimuninio tiroidito ir skydliaukės funkcijos sutrikimo [89, 126, 8, 131, 128].

Moksliniuose straipsniuose aprašomas LD ryšys ir su kitomis autoimuninėmis ligomis: vitiligo, reumatoidiniu artritu, megaloblastine anemija, nuo insulino priklausančiu cukriniu diabetu, celiakija ir opininiu kolitu [136, 137, 55, 138, 139]. Sergant sisteminė raudonąja vilklige taip pat kartais pasireiškia LD [140-142]. Tačiau tik mažos dalies LD sergančių pacientų ligos priežastis gali būti sisteminė jungiamojo audinio liga [6]. Manoma, kad sisteminės jungiamojo audinio ligos dažniausiai susijusios su urtikariniu vaskulitu, kuriam būdingi dilgėliniai arba purpuros tipo bėrimai, išliekantys odoje ilgiau nei 24 val. Jie neretai būna skausmingi ir palieka pigmentaciją [143-146]. Sergantiems sisteminė raudonąja vilklige [147] ir Sjogreno sindromu kartais pasireiškėdavo urtikarinis vaskulitas [148]. Vaikams, rečiau nei suaugusiems pastebimas LD ryšys su autoimuniniu tiroiditu, juveniliniu reumatoidiniu artritu, sisteminė raudonąja vilklige, nuo insulino priklausančiu cukriniu diabetu ir celiakija [149, 150]. LD gali atsirasti dar iki pasireiškiant autoimuninei ligai, jai atsiradus, bei praėjus kuriam laikui po autoimuninio susirgimo diagnozės nustatymo [90]. Kai kurie autoriai sergantiems LD siūlo periodiškai kartoti autoimuninių ligų atrankinės patikros testus [90]. Kitų autorių nuomone, šiuos testus tikslinga atlikti tik esant klinikiškai sisteminių ligų požymiams [8].

## **6.6 Lėtinės autoimuninės dilgėlinės ir padidėjusio jautrumo nesteroidiniams vaistams nuo uždegimo ryšys**

21–30% pacientų LD paūmėja pradėjus vartoti aspiriną ar kitą NVNU [151, 152]. Tai aiškinama vaistų nuo uždegimo poveikiu arachidono rūgšties apykaitai, prostaglandinų sintezės slopinimu ir aktyvesne leukotrienų sinteze [30]. Kryžminės reakcijos įvairiems NVNU (t. y. reakcijos į kelis chemiškai skirtingus NVNU preparatus) būna vienam trečdaliui pacientų, kuriems LD gerai kontroliuojama ir dviem trečdaliams pacientų, kuriems LD nekontroliuojama [153]. Yra duomenų, kad kryžminės reakcijos į NVNU būdingos pacientams, kuriems teigiamas ASST arba odos testas su autologine plazma. Šie testai teigiami daugiau nei 90% pacientų, sergančių LD, kuriems pasireiškė kryžminės reakcijos į NVNU [154, 151, 155]. R. Asero ir bendraautorių duomenimis padidėjusio jautrumo reakcijos į NVNU gali atsirasti anksčiau nei LD [156]. Jų tirtųjų pacientų jautrumas NVNU atsirado 10 metų laikotarpyje iki pasireiškiant LD (LD atsirado 30% pacientų, kuriems padidėjęs jautrumas vienam NVNU ir 37% pacientų, kuriems padidėjęs jautrumas keliems NVNU). Nėra visiškai aišku, kodėl sergantiems LD pacientams kartais yra padidėjęs jautrumas NVNU. Manoma, kad NVNU aktyvuoja arba sustiprina nežinomo cirkuliuojančio histaminą atpalaiduojančio faktoriaus poveikį, sukeldami LD paūmėjimą.

## **6.7 Autoantikūnų, dalyvaujančių lėtinės autoimuninės dilgėlinės mechanizme, nustatymas**

### **6.7.1 Odos testas naudojant autologinį serumą**

Autoantikūnų buvimą *in vivo* galima įtarti esant teigiamam ASST [67, 129, 3, 89, 157]. Testas atliekamas suleidžiant pacientui į odą 50 μl nucentrifuguoto jo paties kraujo serumo. Neigiamai kontrolei naudojamas izotoninis 0,9% NaCl tirpalas, teigiamai – histamino tirpalas. Serumo sukeltos pūkšlės dydis vertinamas po 30–60 min., jos padidėjimas lyginamas su neigiama kontrole. Kol kas tai vienintelis nespecifinis atrankinės patikros testas. R.A. Sabroe ir bendraautorių duomenimis palyginti su histamino atpalaidavimo testu, šio testo jautrumas siekia

71%, o specifiškumas – 81% [157]. Teigiamas ASST nustatomas 30–60% pacientų, sergančių LD [17, 64].

Teigiamas ASST rezultatas koreliuoja su ligos sunkumu, jos trukme ir priepuolių intensyvumu [158, 129, 159, 160]. Remiantis daugelio autorių patirtimi, ASST būna neigiamas sveikiems žmonėms ir pacientams, nesergantiems LD [151, 161, 100, 105, 162, 101, 77, 99, 157].

Pastaruoju metu paskelbti moksliniai duomenys, kad ASST yra teigiamas 30–50% suaugusių žmonių, sergančių alerginiu rinitu, nealerginėmis kvėpavimo takų ligomis ir 40–45% sveikų asmenų [163-167]. Pacientams, sergantiems LD jie nustatė mažą ASST jautrumą ir specifiškumą, todėl ASST siūlo vertinti kritiškiau. Šių prieštaringų duomenų reikšmė yra neaiški.

Neseniai nustatyta, kad vietoj serumo naudojant autologinę plazmą padidėja teigiamo įodinio testo atsako tikimybė [107, 168]. Manoma, kad krešėjimo proceso metu sunaudojamas plazmos veiksnys, galbūt atsakingas už teigiamą odos testą su autologine plazma. Tai patvirtina krešėjimo sistemos dalyvavimą LD procese. Nėra nustatyta ryšio, kad esant autoantikūnų gaunamas teigiamas odos testo su autologine plazma rezultatas [112]. Šis testas dar nėra siūlomas plačiai taikyti LAD diagnozuoti.

2006 metais vykusio Europos alergologų ir klinikinių imunologų draugijos (angl. EAACI), Europos sąjungos GA<sup>2</sup>LEN tinklo specialistų, Europos dermatologų forumo (angl. EDF) priimtose ir 2008 metais Berlyne vykusio susitikimo dar kartą peržiūrėtose bei patvirtintose rekomendacijose dėl dilgėlinės diagnostikos, klasifikacijos ir gydymo, ASST šiuo metu išlieka vieninteliu atrankinei pacientų patikrai siūlomu naudoti testu [1].

ASST dažnai naudojamas kaip „auksinis standartas“ laboratorinių tyrimų, patvirtinančių LAD diagnozę, jautrumui ir specifiškumui įvertinti bei jų standartizavimui, kadangi šis testas įrodo esant pacientų serume endogeninių histaminą atpalaiduojančių veiksnių (tarp jų ir autoantikūnų) [71, 69].



## **6.7.2 Laboratoriniai autoantikūnų nustatymo metodai**

### **6.7.2.1 Tyrimai, panaudojant surišančiuosius antikūnus**

*In vitro* antikūnų buvimą galima patvirtinti Western blot (sin. *imunoblot*) analizės, imunoprecipitacijos ir ELISA metodais [36]. Šie metodai leidžia pacientų serume nustatyti funkciškai aktyvius ir neaktyvius autoantikūnus. Dėl mažo imunoblot'o metodo specifiškumo antikūnų tyrimai šiuo metodu klinikinėje praktikoje naudojami nedažnai. Teigiami jo rezultatai gaunami esant ir kitiems autoimuniniams susirgimams [66], kartais ir sveikiems asmenims [63]. Kai kurių autorių tyrimų rezultatai rodo silpną koreliaciją tarp imunoblot'o metodo ir funkcinį histamino atpalaidavimo testų [63, 82, 87]. Iki šiol nėra sukurta ir pakankamai specifinio ELISA, vis bandoma patobulinti šį metodą. Visiškai neseniai (2008 metais) J.A. Eckman ir bendraautoriai antikūnų tyrimams panaudojo jautresnį IEMA (imunofermentinį) metodą. Naudojant šį metodą fermento aktyvumui nustatyti naudojamos ir fluorescentinės, ir chemiluminiscentinės medžiagos. Tačiau metodas taip pat nėra specifinis, nes tiriant pacientus, sergančius LD, ir sveikus kontrolinės grupės asmenis nustatyti panašūs IgG klasės anti-FcεRIα bei anti-IgE antikūnų titrai [113].

Taigi, imunoblot'o ir ELISA metodai, kurie dažnai naudojami moksliniams tyrimams, negali būti taikomi kasdieninei LAD diagnostikai, kadangi šiais metodais negalime nustatyti, ar antikūnai yra patogeneziniai. Šie metodai gali būti naudingi autoantikūnų specifiškumui nustatyti.

### **6.7.2.2 Histamino atpalaidavimo testas**

Iki šiol histamino atpalaidavimo iš donoro bazofilų testas dažniausiai naudojamas ir laikomas „auksiniu standartu“ patvirtinti ar yra funkciškai aktyvių autoantikūnų [67, 79, 68, 30, 69, 44, 157, 86].

Šis metodo esmė yra histamino kiekio, atsipalaidavusio iš donoro bazofilų, paveiktų paciento, sergančio LD, serumu, matavimu. Kai kurie autoriai kaip ląstelių aktyvacijos rodiklį naudoja žiurkių bazofilinės leukemijos ląstelių liniją, matuodami beta-heksaminidazę [65].

Naudodami pirmą kartą šį testą, A.M. Marsland ir bendraautoriai *in vitro* nustatė imunitetą slopinančių preparatų blokuojantį poveikį histamino atpalaidavimui, preinkubuodami bazofilus su kalcineurino inhibitoriais (ciklosporinu ir askomicinu) [169]. Šis tyrimas patvirtino imunosupresinio gydymo naudojimo galimybę sergantiems LD pacientams.

R. Asero ir bendraautorių nuomone, histamino atpalaidavimo testas mažiau jautrus nei ASST [67]. M.H. Platzer ir bendraautoriai nustatė, kad šio testo jautrumas ir specifiškumas siekia 75% palyginti su ASST [69]. Kitų autorių duomenimis, histamino atpalaidavimo iš donoro bazofilų testas silpnai koreliuoja su imunoblot'o autoantikūnų nustatymo metodu [82]. Įvairių tyrimų duomenimis, teigiamas histamino atpalaidavimo testas nustatomas 25–50% pacientų, sergančių LD [5, 17].

Kai kurie autoriai teigia, kad, vietoj donoro bazofilų naudojant paciento putliasias ląsteles dažniau gaunamas teigiamas histamino atpalaidavimo testo rezultatas [67], nors kiti panašūs tyrimai šio fakto nepatvirtina [64].

M. Ferrer ir bendraautoriai rado stiprų ryšį tarp histamino atpalaidavimo testų tiek naudojant donoro bazofilus, tiek ir donoro putliasias ląsteles [63]. Šie autoriai pastebėjo, kad papildomai naudojant interleukiną-3 (IL-3), padidėja histamino atpalaidavimo testo jautrumas, bet IL-3 nepadidina teigiamų tyrimų rezultatų kiekio [170].

R.A. Sabroe ir bendraautoriai nustatė, kad histamino atpalaidavimas per anti-FcεRIα mechanizmą tampriai susijęs su IgE tankiu bazofilų paviršiuje [64]. Skirtingų donorų bazofilai gali skirtingai reaguoti į imuninius stimulus: atopinio donoro bazofilai gali reaguoti į anti-IgE ir nekonkuruojančius anti-FcεRI antikūnus, tačiau konkuruojantys su IgE autoantikūnai prieš FcεRIα gali likti neprisijungę prie receptorių ir atvirkščiai – bazofilai, kuriems nuo paviršiaus pašalinti IgE, prijungia konkuruojančius ir nekonkuruojančius anti-FcεRIα antikūnus, bet ne anti-IgE antikūnus [5]. Taigi, tyrimui naudojami donoro bazofilai turėtų būti paveikti pieno rūgštimi, siekiant pašalinti IgE (nustatyti anti-FcεRIα autoantikūnus) ir būti įjautrinti IgE (nustatyti anti-IgE) [45].

Dauguma tyrėjų, atlikdami histamino atpalaidavimo testą, naudoja paciento serumą, o ne išvalytą IgG, todėl negalima atmesti neimuninės bazofilų stimuliacijos arba sąveikos su natūraliais IgM klasės autoantikūnais bei šių faktorių įtakos testo rezultatui [5].

K. Vasagar ir bendraautoriai keliems pacientams, nesergantiems atopinėmis ligomis ir dilgėline, stipriai išreikštą teigiamą histamino atpalaidavimo testą. Šio fakto autoriai nepaaiškino [117].

Kadangi histamino atpalaidavimo testas turi nemažai trūkumų, dažnai naudojamos skirtingos šio testo metodikos, todėl ekspertų nuomone LAD diagnostikai reikalingas patogesnis, jautresnis ir specifiškesnis atrankinės patikros laboratorinis metodas funkciškai aktyviems autoantikūnams nustatyti [89, 45, 33].

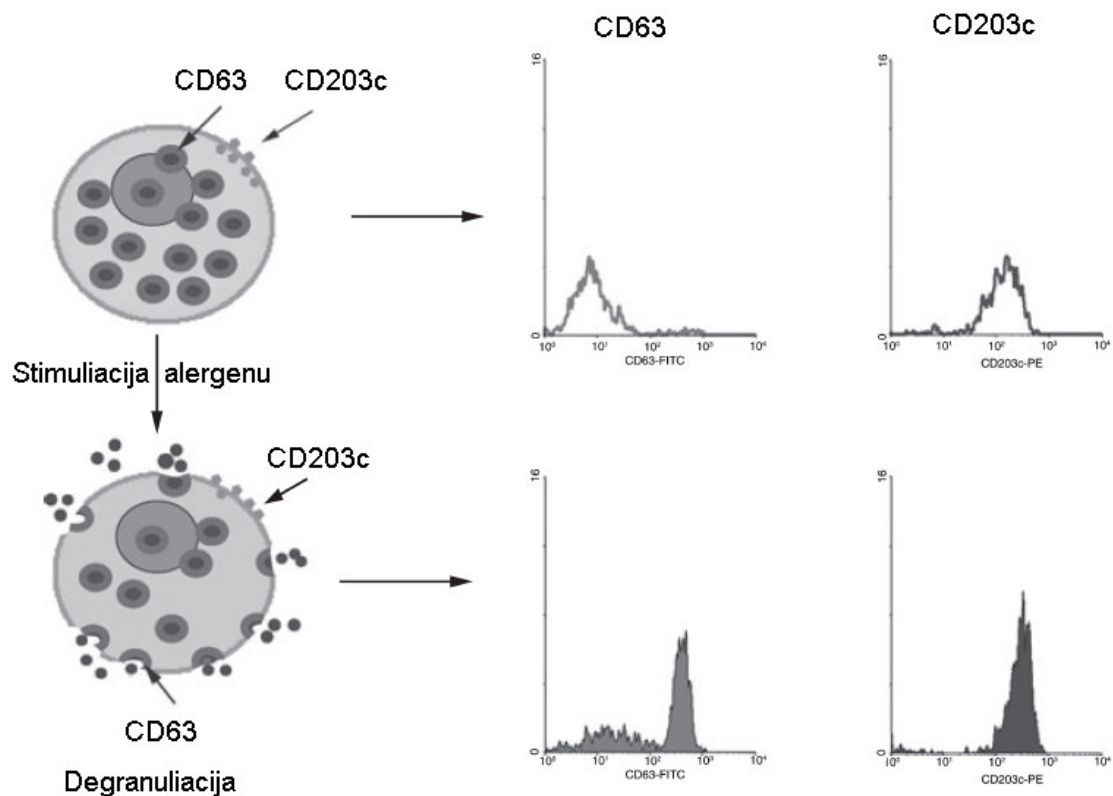
## 6.8 Bazofilų aktyvacijos testai

Bazofilų aktyvacijos žymens CD63 atradimas paskatino mokslininkus sukurti naują bazofilų aktyvacijos, veikiant alergenu, metodą naudojant tėkmės citometriją. J. Sainte-Laudy ir bendraautoriai [171, 172], o vėliau A. Sabbah ir bendraautoriai [173, 174] sukūrė bazofilų aktyvacijos testą, kurį atliekant naudojami anti-IgE ir anti-CD63 antikūnai. Nuo to laiko šis testas plačiai naudojamas klinikiniuose ir moksliniuose tyrimuose.

Tėkmės citometrijos metodas, padedantis vertinti periferinio kraujo bazofilų aktyvaciją *in vitro*, pagrįstas bazofilų aktyvacijos žymenų ekspresijos pokyčiais, paveikus juos specifiniu alergenu. Tiriant elektroniniu mikroskopu nustatyta, kad bazofilų aktyvacija vyksta dviem keliais: (a) anafilaksine degranuliacija, kuriai būdingi greitai morfologiniai pokyčiai, viduląstelių granulių egzocitozė ir granulėse esančių mediatorių išsiskyrimas ir (b) palaiptam vykstančia degranuliacija, kuriai būdingi lėti morfologiniai pokyčiai be granulių egzocitozės. Po stimuliacijos specifiniu alergenu, kuris prisijungia prie IgE, sujungto su FcεRI, bazofilai ne tik pradeda išskirti ir gaminti gausybę bioaktyvių mediatorių, bet pasikeičia ir jų aktyvacijos žymenų ekspresija. Šie pokyčiai gali būti

nustatomi įvairiaspalvės tėkmės citometrijos metodu, naudojant specifinius monokloninius antikūnus.

Šiuo metu taikant tėkmės citometrijos metodą bazofilų aktyvacijos tyrimams dažniausiai naudojami CD63 ir CD203c antigenai [175]. 3 paveiksle pavaizduota CD63 ir CD203c žymenų ekspresija bazofilų paviršiuje esant jiems ramybėje ir po stimuliacijos alergenu.



**3 pav.** CD63 ir CD203c ekspresija esant bazofilams ramybėje ir po jų aktyvacijos alergenu (pagal [175])

Ląstelių paviršiaus žymuo CD63 (glikoproteinas 53 arba su lizosomomis susijęs membranos baltymas (LAMP)-3) priklauso tetraspanų superšeimai. Jo funkcija nėra visiškai aiški. Esant ramybės būsenai šis žymuo silpnai ekspresuojamas bazofilų membranos paviršiuje (didesnė jo dalis būna prisitvirtinusi prie citoplazmos viduje esančių granulių). Po stimuliacijos per IgE mechanizmą CD63 bazofilų paviršiuje atsiranda 10 min. bėgyje, susiliejus

granulėms su išorine membrana. Po aktyvacijos CD63 ekspresija būna ryški (pikas atsiranda po 20–40 min.). CD63 ekspresuojamas ne tik bazofilų, bet ir kitų ląstelių paviršiuje (audinių putliųjų ląstelių, makrofagų ir trombocitų) [175, 71-75].

CD203c (neuralinių ląstelių paviršiaus diferenciacijos antigenas E-NPP3 arba PD-I $\beta$ , B10, gp130RB13-6) priklauso II transmembraninių baltymų, daugiafunkcinių ektoenzimų, vadinamųjų ektonukleotidų, pirofosfatazės/fosfodiesterazės (E-NPP) multigenų, kurie katalizuoja kai kurių molekulių skilimą, šeimai. CD203c randamas išskirtinai tik bazofilų/putliųjų ląstelių paviršiuje. Jis nustatomas ir ląstelių ramybės būsenoje. Šis žymuo labai greitai (per 5 min.) atsiranda kaip atsakas į alergeno – anti-IgE ir anti-Fc $\epsilon$ RI – stimuliaciją. Jo aktyvacijos pikas stebimas po 5–15 min. CD203c ekspresijos tankis bazofilų paviršiuje yra žymiai mažesnis palyginti su CD63 [175, 176, 75].

Nustatyta, kad apie 5–10% tirtų žmonių bazofilai neekspresuoja CD63 ir CD203c žymenų per IgE tipo bazofilų aktyvaciją. Šie ypatumai dažnai pamirštami vertinant bazofilų aktyvacijos testų rezultatus. Tai aiškinama, kad žmonėms, kurių bazofilai neekspresuoja CD63 ir CD203c, nėra tirozin kinazių (*lyn* ir *syk*) arba jų sumažėja [175, 17]. Tačiau, preinkubuojant bazofilus IL-3, šią problemą pavyksta išspręsti [177].

Aktyvuotų bazofilų tyrimai tėkmės citometrijos būdu gali būti taikomi naudojant ne paties paciento, o alergiško arba nealergiško donoro bazofilus. Tai buvo pavadinta pasyvaus įjautrinimo (sensibilizacijos) procedūra. Iki paveikiant juos alergenu, nealerginio donoro bazofilai inkubuojami su paciento serumu [178, 179]. Specifinių IgE prieš įvairius alergenus nustatymas pasyvios sensibilizacijos būdu yra sudėtingas metodas. Jį sunku standartizuoti ir jo rezultatai labai priklauso nuo individualaus donoro bazofilų gebėjimo išskirti histaminą [175].

Bazofilų aktyvacijos testai naudojami ne tik nuo IgE priklausančio padidėjusiam jautrumui įvairiems alergenams patikslinti, bet ir autoantikūnams prieš IgE molekulę arba prieš  $\alpha$  grandį didelio afiniškumo Fc $\epsilon$ RI bazofilų paviršiuje nustatyti [175, 180]. Pastarojo atveju naudojami ne paties paciento, bet donoro (atopinio arba neatopinio) bazofilai, kurie yra stimuliuojami paciento,

sergančio LD, serumu. Ateityje LAD diagnostikai taikant tėkmės citometrijos metodą galvojama panaudoti chimerinių ląstelių linijas, ekspresuojančias FcεRIα, [5, 30].

Šiuo metu yra paskelbti 6 moksliniai darbai, kuriuose nagrinėjamas bazofilų žymenų ekspresijos tyrimų taikymas diagnozuojant lėtinę autoimuninę dilgėlinę.

Pirmas B. Wedi ir bendraautorių [74] straipsnis paskelbtas spaudoje 2000 metais. Autoriai tyrė vaistų nuo uždegimo poveikį histamino atpalaidavimui, CD63 ekspresijai donorų bazofilų paviršiuje ir leukotrienų produkcijai. Buvo ištirta 40 pacientų, sergančių LD (20, kuriems ASST teigiamas bei 20, kuriems ASST neigiamas) ir 20 kontrolinės grupės asmenų (10 sveikų bei 10 sergančių atopinėmis ligomis). Naudojant atopinio donoro bazofilus, nustatyta padidėjusi CD63 ekspresija 70% pacientų, kuriems ASST buvo teigiamas, 45% – kuriems neigiamas ir 35% kontrolinės grupės asmenų. Gautas reikšmingas skirtumas tarp pacientų, kuriems ASST buvo teigiamas ir pacientų, kuriems jis buvo neigiamas ( $p < 0,001$ ). Įrodyta, kad atopinio donoro bazofilai žymiai geriau ekspresuoja CD63, palyginti su neatopinio donoro bazofilais.

2004 metais E. Gyimesi ir bendraautoriai [72] paskelbė tyrimo rezultatus, įrodančius bazofilų CD63 žymens ekspresijos tyrimo naudą lėtinės autoimuninės dilgėlinės diagnostikai, kai naudojami atopinio donoro bazofilai. Autoriai ištyrė 30 pacientų, sergančių LD. Kontrolinę grupę sudarė 12 sveikų asmenų. Eksperimente buvo naudojami 2 atopinių ir 1 neatopinio donoro bazofilai. Tyrimo ribine verte buvo pasirinkta kontrolinės grupės CD63 teigiamų rezultatų vidurkis + 2 SD (angl. *standard deviation*). 46% pacientų nustatyta padidėjusi CD63 žymens ekspresija. 40% pacientų ASST buvo teigiamas. Buvo nustatyta stipri koreliacija tarp šių tyrimo metodų. Inkubavus atopinio donoro bazofilus su neskiestu pacientų, sergančių LD serumu, gauta žymiai didesnė CD63 žymens ekspresija ASST teigiamų pacientų grupėje palyginus su ASST neigiama grupe ( $p < 0,001$ ).

A. De Swert ir bendraautoriai 2005 metais [70] ištyrė 61 LD sergantį pacientą ir 23 sveikus asmenis. Tyrime taip pat buvo naudojami atopinio donoro bazofilai. Šio tyrimo ribine verte pasirinkta sveikųjų kontrolinės grupės CD63

teigiamų rezultatų vidurkis + 3 SD. 51% pacientų buvo teigiamas bazofilų aktyvacijos testas, 36% pacientų – teigiamas ASST. Pacientų, kurių ASST teigiamas, bazofilų CD63 žymens ekspresija buvo nustatoma dažniau nei pacientų, kurių ASST neigiamas (atitinkamai 68% ir 41%,  $p=0,0416$ ).

A. Fezzolini ir bendraautorai [71], naudodami trispalvės tėkmės citometrijos metodą, įvertino pacientų, sergančių LD CD63 žymens ekspresiją. Jie ištyrė 64 pacientus (22 ASST buvo teigiamas, 42 – neigiamas) ir 10 sveikųjų. Tyrimui naudoti atopinio ir neatopinio donorų bazofilai. 15% ribinė vertė pasirinkta, remiantis ROC (angl. *receiver operating characteristic*) kreivės analize ir esant geriausiems jautrumo (95%) ir specifiškumo (91%) rodikliams. Įrodyta, kad atopinio donoro bazofilai žymiai geriau ekspresuoja CD63 palyginti su neatopinio donoro bazofilais. 21% pacientų, kuriems ASST buvo teigiamas ir 4% pacientų, kuriems ASST buvo neigiamas, nustatyta padidėjusi bazofilų CD63 žymens ekspresija (gautas statistiškai patikimas skirtumas tarp šių pacientų grupių,  $p<0,001$ ).

A. Szegedi ir bendraautorai [73] paskelbė duomenis apie CD63 žymens ekspresijos ir histamino atpalaidavimo testų, naudojamų pacientams, sergantiems LD, koreliaciją. Autoriai ištyrė 72 LD sergančius pacientus ir 20 sveikų kontrolinės grupės asmenų. Tyrimui naudoti atopinio ir neatopinio donoro bazofilai. Ribinė vertė šiame tyrime buvo pasirinkta 95-as procentilis nuo kontrolinės grupės CD63 žymens ekspresijos tyrimų rezultatų. Nustatyta, kad naudojant atopinio donoro bazofilus, gaunama didesnė CD63 žymens ekspresija, nei naudojant neatopinio donoro bazofilus (atitinkamai 57% ir 28%). Šiame tyrime įrodyta koreliacija tarp CD63 žymens ekspresijos ir histamino atpalaidavimo testo ( $p<0,001$ ), o taip pat ir ASST rezultatų ( $p<0,05$ ).

K.M. Yasnovsky su bendraautorais (2006) [75] pirmą kartą donoro bazofilų paviršiaus CD203c žymens ekspresijos tyrimui panaudojo jų stimuliavimui pacientų, sergančių LD, kraujo serumą. Iširti 32 pacientai ir 11 sveikų kontrolinės grupės asmenų. Šiam tyrimui buvo naudoti atopinio donoro bazofilai. Tyrimo vertinimui buvo pasirinkta 5% ribinė vertė. Pacientams, kurių ASST buvo teigiamas, nustatyta gerokai didesnė CD203c žymens ekspresija (77%) nei

pacientų, kurių ASST buvo neigiamas (20%),  $p=0,006$ . Kaip „auksinį standartą“ naudojant histamino išsiskyrimo testą buvo nustatytas tyrimo jautrumas 77% ir specifiškumas – 82%.

Visuose minėtuose tyrimuose LD sergančių tiriamųjų skaičius buvo nedidelis (nuo 30 iki 72 pacientų) ir visi autoriai naudojo skirtingas ribines tyrimų vertes. Taip pat skyrėsi tyrimų metodika – vieni autoriai naudojo izoliuotus donoro leukocitus, o ne visą kraują, ne visi bazofilų stimuliacijai naudojo IL-3. Todėl vienareikšmiškai lyginti šių tyrimų rezultatų negalima.

Iki šiol nėra palyginamųjų tyrimų, įrodančių CD63 ir CD203c bazofilų aktyvacijos žymenų tyrimo reikšmę diagnozuojant lėtinę autoimuninę dilgėlinę. Tokie tyrimai jau yra atlikti alergijos lateksui, vabzdžių nuodams, medikamentams įvertinti, tačiau jų rezultatai yra priešaringi. 2003 metais tiriant alergiją lateksui [181], buvo nustatytas didesnis CD203c žymens ekspresijos tyrimo jautrumas (75%), palyginti su CD63 žymens ekspresijos tyrimu (50%), bei nustatytas 100% abiejų tyrimų specifiškumas. Kiek vėliau, 2006 metais, tiriant alergiją vabzdžių nuodams [182], taip pat gautas nežymiai didesnis CD203c žymens ekspresijos tyrimo jautrumas, palyginti su CD63 tyrimu (97% *versus* 89%). CD63 žymens ekspresijos tyrimo specifiškumas buvo didesnis, palyginti su CD203c (100% *versus* 89%). Tuo tarpu, tiriant alergiją raumenų relaksantams [183], nustatytas didesnis CD63 žymens ekspresijos tyrimo jautrumas (79%), palyginti su CD203c (36%). Abiejų tyrimų specifiškumas buvo 100%.

Yra nustatytos bazofilų aktyvacijos tyrimų ribinės vertės (atitinkančios geriausią metodų jautrumą ir specifiškumą pagal ROC kreivių analizę), naudojant stimuliaciją įvairiais alergenais: inhaliaciniais ir maisto alergenais >15%; latekso ir vabzdžių nuodų alergenais >10%;  $\beta$ -laktaminiais antibiotikams >5% ir SI >2; metamizoliui >5% ir SI >5; aspirinui ir NVNU >5% ir SI >2 (SI: stimuliacijos indeksas = stimuliacija alergenų/bazinė stimuliacija arba neigiama kontrolė) [184]. Diagnozuoti LAD tik A. Fezzolini ir bendraautoriai [71], remdamiesi trispalvės tėkmės citometrijos tyrimo rezultatais, kaip „auksinį



standartą“ bazofilų aktyvacijos metodo įvertinimui naudodami ASST, nustatė bazofilų CD63 žymens ekspresijos testo ribinę vertę.

Ateityje būtina standartizuoti tyrimų atlikimo metodikas ir nustatyti vieningus jų vertinimo kriterijus. Taip pat reikėtų palyginti bazofilų aktyvacijos žymenų CD63 ir CD203c ekspresijos tyrimus, siekiant nustatyti, kuris iš šių tyrimų turi didesnę jautrumą bei specifiškumą ir gali būti naudingesnis diagnozuoti LAD.

## **7 Tiriamieji ir tyrimo metodika**

### **7.1 Tiriamieji**

Vilniaus Universiteto ligoninės Santariškių klinikų Pulmonologijos ir alergologijos centre 2006–2008 metais buvo ištirti 128 pacientai, sergantys lėtine dilgėline: 26 vyrai ir 102 moterys. Pacientų amžiaus vidurkis buvo  $43 \pm 13$  metai (nuo 20 iki 78 metų). Pacientai vien tik su fizinių veiksnių sukeliama dilgėline nebuvo įtraukiami į tyrimą.

Kontrolinę grupę sudarė 30 sąlygiškai sveikų asmenų: 15 vyrų ir 15 moterų, amžiaus vidurkis  $30 \pm 7$  metai (nuo 22 iki 51 metų).

Dalyviai prieš įtraukiant juos į tyrimą pasirašė Lietuvos Bioetikos komiteto patvirtintą sutikimo formą.

### **7.2 Tyrimai**

Laboratoriniai tyrimai atlikti Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Laboratorinės diagnostikos centre.

#### **7.2.1 Tyrimai, patvirtinantys lėtinės autoimuninės dilgėlinės diagnozę**

LD sergantiems pacientams ir 10 kontrolinės grupės tiriamųjų buvo atliktas ASST. Visiems tiriamiesiems atlikti bazofilų CD203c ir CD63 žymenų ekspresijos testai.

#### **7.2.2 Kitų autoimunizacijos rodiklių tyrimai**

- Tiriamiesiems, sergantiems LD, ATPO kiekis buvo nustatytas imunochemiliuminescentiniu metodu (reagentai ABBOTT *Diagnostics*, JAV). Siekiant įvertinti skydliaukės funkciją imunochemiliuminescentiniu metodu (reagentai ABBOTT *Diagnostics*, JAV) buvo nustatyta tirootropinio hormono koncentracija kraujyje (TTH) pacientams, kurių ATPO koncentracija buvo padidėjusi ir 48 pacientams, kurių ATPO koncentracija buvo normali.

- 83 pacientams netiesioginės imunifluorescentinės analizės metodu (reagentai IMMCO *Diagnostics*, JAV) ištirti ANA ir ANCA.

### 7.3 Klausimynas

116 pacientų atsakė į anketą (21 klausimas), sudarytą pagal EAACI/GA<sup>2</sup>LEN/EDF klausimyną sergantiesiems LD, apie ligą provokuojančius veiksnius ir svarbius ligos aspektus bei įvertino bėrimų ir niežulio intensyvumą pagal rekomenduojamą 3 balų sistemą (žr. 1, 2 priedus). Šiame darbe pateikiame tik LD aktyvumo, trukmės ir angioedemos ryšį su LAD rodikliais (ASST ir bazofilų CD203c ir CD63 žymenų ekspresijos testais)

Pacientai buvo papildomai apklausti dėl jautrumo NVNU ir įprastinio gydymo II kartos antihistaminiais preparatais veiksmingumo. Gydymo veiksmingumas buvo vertintas pavartojus ne trumpiau nei 1 mėnesį paskirtą antihistamininį preparatą.

### 7.4 Darbo metodika

#### 7.4.1 Odos testo su autologiniu serumu metodika

Atliekant ASST, pagal įprastinius kraujo ėmimo reikalavimus buvo paimama 5 ml paciento veninio kraujo ir leidžiama jam nusistovėti 30 min. kambario temperatūroje. Po to kraujas buvo centrifuguojamas 500×g 15 min. 50 µl gauto autologinio serumo ir toks pat kiekis 0,9% sterilaus izotoninio NaCl tirpalo injekuojami į odą vidiniame dilbio paviršiuje 3–5 cm atstumu vienas nuo kito.

Likusi serumo dalis buvo tuoj pat užšaldoma ir laikoma šaldiklyje (–80° temperatūroje) iki atliekant bazofilų aktyvacijos testą.

Teigiamai kontrolei (odos reaktyvumui įvertininti) buvo naudojamas odos dūrio mėginys su histaminu 10 mg/ml (*Stallergens*, Prancūzija). Vengta injekuoti į odos plotą, kuriame per pastarąsias 24 val. matomas dilgėlinis bėrimas.

Mėginys vertintas po 30 ir, jei reikia, po 60 min. Injekcijų vietose buvo atuojami 2 skersiniai diametrai ir apskaičiuotas jų vidurkis.

Mėginys vertintas kaip teigiamas, jeigu serumo sukelta papulė buvo ne mažiau kaip 1,5 mm didesnė už izotoninio tirpalo sukeltą papulę (neigiamą kontrolę). Vieno iš mūsų tirtųjų pacientų teigiamas testas pavaizduotas 4 paveiksle.

Jeigu negaudavome atsako į histaminą (teigiama kontrolė), mėginys laikytas neinformatyviu ir buvo kartojamas po 24 val. ar vėliau.

Prieš atliekant odos mėginį su autologiniu serumu antihistamininių preparatų ir Doxepino vartojimas buvo nutraukiamas vėliausiai prieš 5 dienas iki atliekant mėginį.



**4 pav.** Teigiamas ASST (serumo suleidimo vietoje pūkšlė didesne nei neigiamos kontrolės suleidimo vietoje)

#### **7.4.2 Bazofilų aktyvacijos testų metodika**

Bazofilų aktyvacijos testai buvo atliekami naudojant heparinizuotą donoro kraują 3–4 val. laikotarpyje paėmus kraujo. Donorė: 38 metų moteris, serganti atopiniu dermatitu, alergine bronchų astma ir alerginiu rinitu, bei vartojanti tik inhaliacinius preparatus (Seretide 50/250 µg du kartus per dieną) bronchų astmai

gydyti. Bendras jos IgE kiekis – 1350 U/ml, nustatytas jautrumas namų dulkių erkių, medžių, žolių ir piktžolių žiedadulkių alergenams. Donorė pasirašė Bioetikos komiteto patvirtintą sutikimo dalyvauti tyrime formą. Kraujas (8 ml) tyrimams buvo imamas ne dažniau kaip 1 kartą per savaitę.

Vieno bazofilų aktyvacijos tyrimo metu išstirdavome 8–10 LD sergančių pacientų serumus.

#### 7.4.2.1 CD203c paviršiaus ekspresijos tyrimas

##### *Aktyvacija*

- Testui naudota 40 µl paciento, sergančio LD, arba sveiko kontrolinės grupės tiriamojo kraujo serumo. Į mėgintuvėlį su serumu buvo pilama 40 µl bazofilų stimuliacinio buferio (BSB) (*Becton Dickinson*, JAV). Neigiamai kontrolei naudota 40 µl fosfatinio buferio (PBS) (angl. *phosphate buffered saline*), teigiamai kontrolei – 40 µl 1 µM fMLP (Sigma, JAV) ir 40 µl 1:50 praskiedimu anti-FcεRIα receptoriaus antikūno (Upstade, JAV), skiesto PBS be Ca<sup>2+</sup> ir Mg<sup>2+</sup> jonų PBS tirpale.
- 200 µl heparinizuoto donoro kraujo buvo pilama į visus stimuliuojamus mėgintuvėlius, supurtoma purtykle ir inkubuojama 37°C vandens vonioje 20 min.
- Reakcija sustabdoma 5 min. laikant mėgintuvėlius ant ledo.

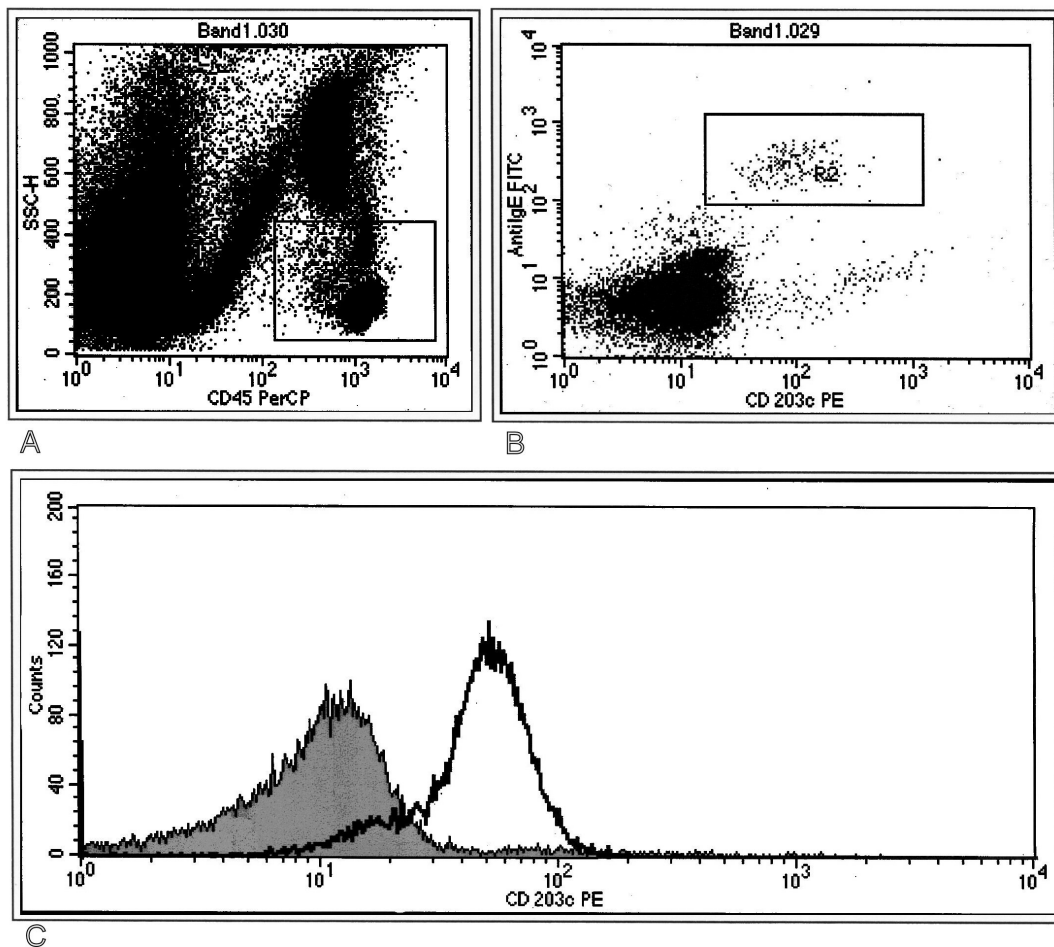
##### *Žymėjimas ir fiksacija*

- Į kiekvieną mėgintuvėlį buvo pilama 20 µl monokloninių antikūnų kokteilio: prieš žmogaus CD45 PE (fikoeritrino fluorochromas) (*Becton Dickinson*, JAV), prieš žmogaus CD203c PerCP (peridin-chlorofilproteinai) (*Immunotech*, JAV) ir prieš žmogaus IgE FITC (fluoresceino-izotiocianatas) (*Invitrogen*, JAV), supurtoma purtykle ir inkubuojama 30 minučių tamsoje kambario temperatūroje.
- Eritrocitai lizuojami 10 min. kambario temperatūroje tamsoje, naudojant 2 ml FACS<sup>TM</sup> lizuojančio skysčio (*Becton Dickinson*, JAV).

- Mėginiai buvo centrifuguojami 250×g 5 min. ir aspiruojamas viršnuosėdinis skystis. Po to plaunami 2 ml PBS, juos centrifuguojant 250×g 5 min.
- Fiksacijai į kiekvieną mėgintuvėlį buvo pridedama 0,3 ml 0,5% paraformaldehido.

Mėginiai analizuoti FACSCalibur tėkmės citometru (*Becton Dickinson, JAV*), naudojant *CellQuest* programinę įrangą. Bazofilų aktyvacija vertinta surenkant 1000 bazofilų.

Paciento histogramų pavyzdžiai pateikti 5 paveiksle.



**5 pav.** Aktyvuotų bazofilų nustatymas ir CD203c ekspresija, paveikus juos paciento, sergančio LD, serumu

**A:** CD45 ekspresuojančios ląstelės. Apibrėžtame taškinės diagramos lauke bazofilai pasiskirstę tarp monocitų ir limfocitų debesėlių.

**B:** Apibrėžtame taškinės diagramos lauke bazofilai atpažinti pagal didelę IgE ir CD203c ekspresiją.

**C:** bazofilai, savo membranose neturintys CD203c žymens, paveikus juos neigiama kontrole (užtušuotas pikas) ir aktyvinti bazofilai paciento serumu (b spalvis pikas), ekspresuojantys CD203c molekules.

#### 7.4.2.2 CD63 paviršiaus ekspresijos tyrimas

Tyrimas atliktas naudojant standartinę *Becton Dickinson, JAV FastImmune* rinkinį.

##### *Aktyvacija*

- Testui naudota 100  $\mu$ l paciento, sergančio LD, arba sveiko kontrolinės grupės tiriamojo kraujo serumo. Į mėgintuvėlį su serumu buvo pilama 20

µl BSB. Neigiamai kontrolei naudota 100 µl PBS tirpalo, teigiamai – 100 µl 1 µM koncentracijos fMLP.

- 100 µl heparinizuoto donoro kraujo buvo pilama į visus stimuliuojamus mėgintuvėlius, supurtoma purtykle ir inkubuojama 37°C vandens vonioje 20 min.
- Degranuliacija sustabdoma perkeliant mėgintuvėlius 5 min. ant ledo.

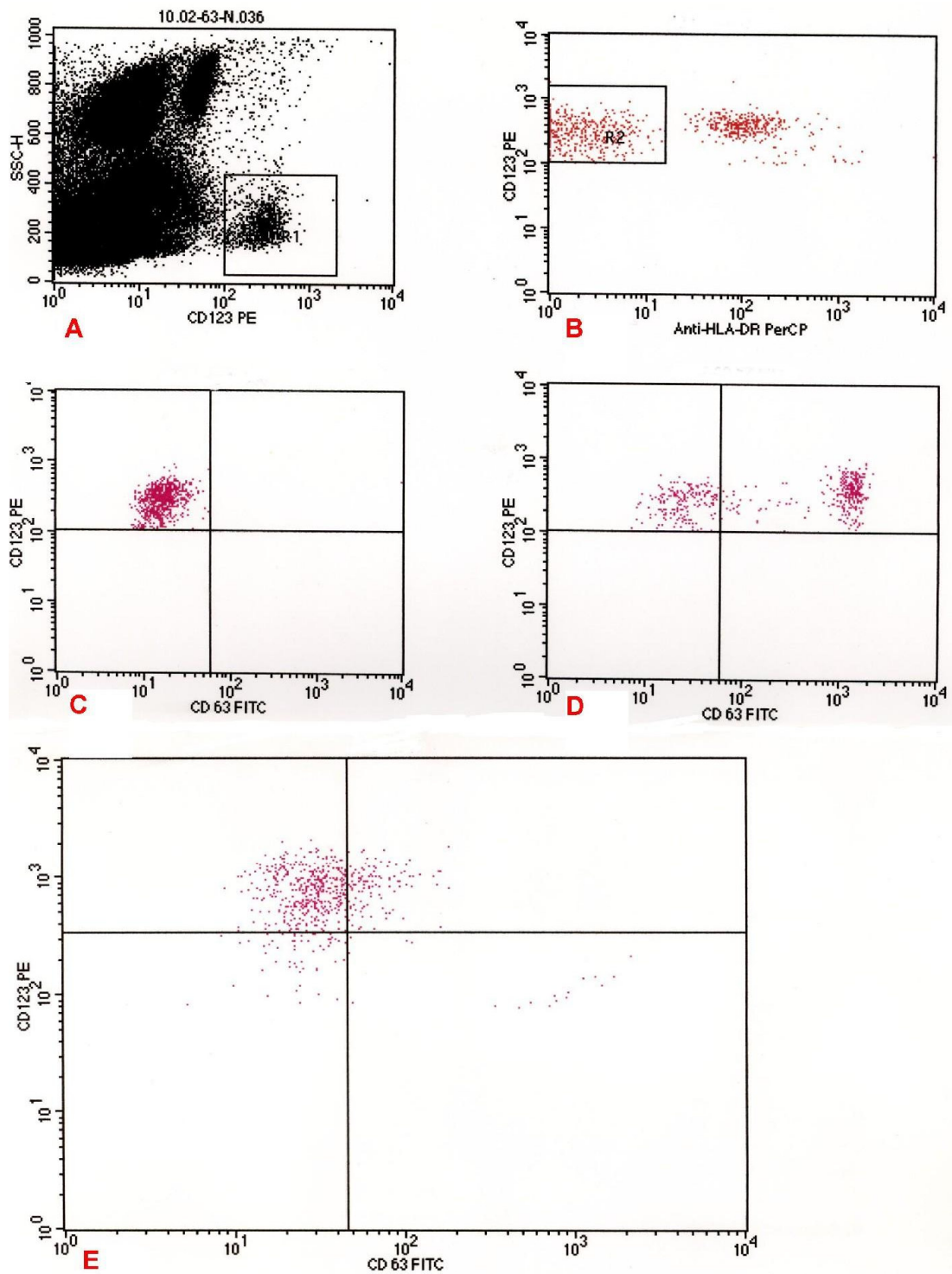
#### *Žymėjimas ir fiksacija*

- Į kiekvieną mėgintuvėlį buvo pilama 20 µl CD63 FITS/ CD123 PE/ Anti-HLA DR PerCP monokloninių antikūnų kokteilio, supurtoma purtykle ir inkubuojama 30 min. tamsoje kambario temperatūroje.
- Eritrocitai buvo lizuojami 10 min. kambario temperatūroje, naudojant 2 ml FACS<sup>TM</sup> lizuojančio skysčio.
- Pavyzdžiai buvo centrifuguojami 250×g 5 min. ir aspiruojamas viršnuosėdinis skystis. Po to mėginiai plauti su 2 mL PBS, juos centrifuguojant 250×g 5 min.
- Fiksacijai į kiekvieną pavyzdį buvo pilama 0,3 ml 0,5% paraformaldehido.

Mėginiai analizuoti *FACSCalibur* tėkmės citometru (*Becton Dickinson*, JAV), naudojant *CellQuest* programinę įrangą. Bazofilų aktyvacija vertinta surenkant 1000 bazofilų.

Paciento histogramų pavyzdžiai pateikti 6 paveiksle.





**6 pav.** Aktyvuotų bazofilų atpažinimas naudojant CD63 monokloninį antikūną

(A) ir (B) bazofilai (apibrėžtame lauke) nustatomi kaip CD123 teigiamos ir HLA-DR neigiamos ląstelės. Bazofilai, membranose neturintys CD63, paveikus juos neigiama kontrole (C); bazofilai, ekspresuojantys CD63 molekules, paveikus juos teigiama kontrole (D); bazofilai, negausiai ekspresuojantys CD63 molekules, paveikus juos paciento, sergančio LD, serumu (E).

## 7.5 Duomenų statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant „MS Excel for Windows“ bei SPSS 15.0 for Windows programų paketus.

Kiekybiniam duomenų vertinimui (pvz., amžius, ligos trukmė) pateiktas bendras stebėjimų skaičius (n), vidurkis, standartinis nuokrypis, mediana ir minimali (Min) bei maksimali (Max) reikšmės. Kategoriniams kintamiesiems (pvz., lytis, kraujo tyrimo rezultatas) pateiktas kintamojo tam tikros kategorijos pasirodymo dažnis ir to dažnio pasirodymo procentinės reikšmės (n, %).

Duomenų skirstinio tipui įvertinti naudojome Kolmogorovo-Smirnovo kriterijų. Abiejų naudotų testų (CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos) atveju p buvo lygus 0.00. Tai reiškia, kad testų duomenys nėra pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį. Taip pat viename grafike nubrėžėme CD63 ir CD203c kintamųjų histogramas ir teorines normaliąsias kreives (3 priedas, 21 paveikslas). Grafike matyti, kad abiejų parametrų duomenys neatitinka normaliojo skirstinio. Todėl šių parametrų priklausomybės nuo kitų rodiklių tyrimui, tolimesnei analizei taikėme neparametrinį Mann-Whitney testą.

Vidurkių lygybės hipotezei tikrinti buvo naudojamas Wilcoxon-Mann-Whitney testas. Kiekybinių kintamųjų koreliacijai vertinti buvo skaičiuojamas Spearmano koreliacijos koeficientas. Lyginant skirtingas nominaliųjų kintamųjų arba ranginių kintamųjų reikšmių grupes buvo sudaromos požymių dažnių lentelės (angl. *crosstabs*). Neparametrinis kriterijus – Chi-kvadrato testas ( $\chi^2$ , angl. *Chi-Square*) buvo naudojamas dviejų kintamųjų nepriklausomumui tikrinti.

Statistiškai reikšmingais laikyti skirtumai, jei  $p < \alpha$ , reikšmingumo lygmenimi pasirenkant  $\alpha = 0,05$ .

Bazofilų CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos testų jautrumui ir specifiškumui apskaičiuoti naudojome Galen-Gambino formulę. Jautrumas: TP/(TP+FN); specifiškumas: TN/(FP+TN). TP (angl. *true positive*) – tikrai teigiami testai, TN (angl. *true negative*) – tikrai neigiami testai, FP (angl. *false positive*) – klaidingai teigiami, FN (angl. *false negative*) – klaidingai neigiami testai. ASST

testas buvo naudojamas kaip „auksinis standartas“, pagal kurį vertinome CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų rezultatus. Tyrimų klasifikacijos tikslumui vertinti buvo naudojamas Youden'o indeksas ir bendras tikslumo rodiklis. Testo paklaidai vertinti buvo naudojami TME rodikliai (angl. *total misclassification error*, t. y. bendros klasifikacijos paklaidos): TME0 – „atvirkštinis“ Youden'o indeksas ir TME1 – „atvirkštinis“ bendras tikslumas. Youden'o indeksas: jautrumas+specifiškumas–1. Bendras tikslumo rodiklis: (TP+TN)/N. N – bendras tyrimų skaičius.  $TME0 = FN / (TP + FN) + FP / (FP + TN)$ .  $TME1 = (FN + FP) / N$ .

## 8 Tyrimų rezultatai

### 8.1 CD63 ir DC203c žymenų ekspresijos tyrimų rezultatai

Buvo ištirti 128 pacientai, sergantys LD. Pacientų ir kontrolinės grupės bazofilų aktyvacijos tyrimų, naudojant CD63 ir CD203c žymenų ekspresiją, rezultatai (procentais) pateikti 1 lentelėje.

**1 lentelė.** Pacientų ir kontrolinės grupės bazofilų aktyvacijos tyrimų rezultatai (%)

	Pacientai (N=128)		Kontrolinė grupė (N=30)	
	CD203c	CD63	CD203c	CD63
Vidurkis	11,8	10,8	1,8	3,1
Standartinis nuokrypis (angl., SD)	12,4	10,9	0,5	1,5
Mediana	8,2	8,1	1,7	3,0
Mažiausia reikšmė	0,6	0,1	1,0	0,7
Didžiausia reikšmė	65,8	60,5	2,7	6,9

Pacientų CD63 žymens ekspresijos tyrimo rezultatai (vidurkis  $\pm$  SD): 10,8% $\pm$ 10,9%, CD203c: 11,8% $\pm$ 12,4%, kontrolinės grupės – CD63: 3,1% $\pm$ 1,5%, CD203c: 1,8% $\pm$ 0,5%.

Pacientų ir kontrolinės grupės CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų rezultatų palyginimas pateiktas 2 lentelėje.

**2 lentelė.** CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų palyginimas pacientų ir kontrolinėse grupėse (Mann-Whitney testas)

	CD203c	CD63
Mann-Whitney U	777,500	883,500
Wilcoxon W	1242,50	1348,50
Z statistika	-5,066	-4,595
Reikšmingumo lygmuo (p reikšmė)	0,000	0,000

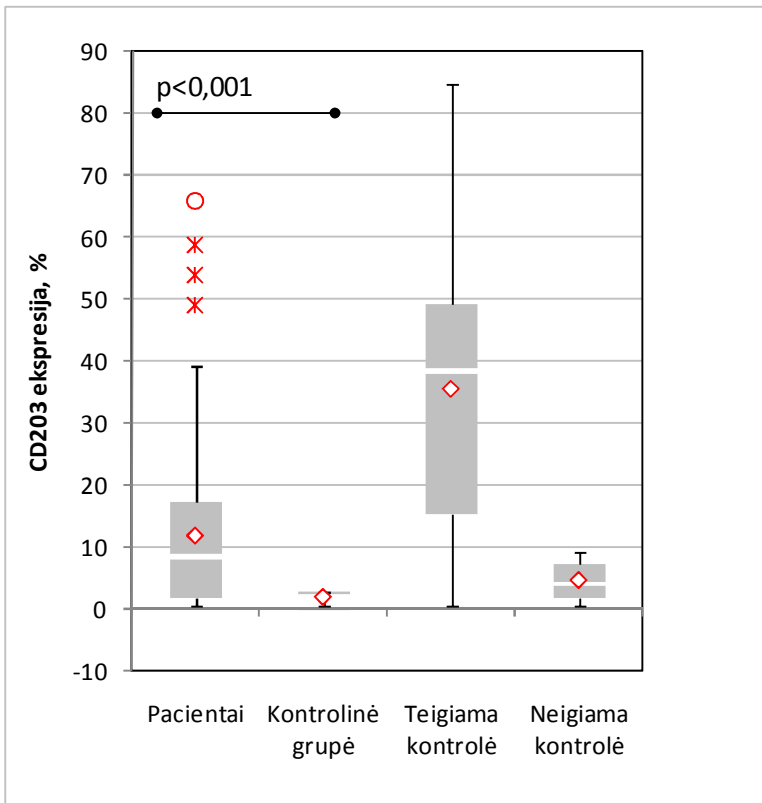
Mann-Whitney testas parodė, kad bazofilų aktyvacijos tyrimas, vertinant tiek CD203c, tiek CD63 žymens ekspresiją, reikšmingai skiriasi pacientų ir kontrolinės grupės asmenų ( $p < 0,001$ ) (2 lentelė).

Apskaičiavome teigiamos ir neigiamos kontrolės bazofilų aktyvacijos žymenų ekspresijos vidurkius (3 lentelė).

**3 lentelė.** Teigiamos ir neigiamos kontrolės bazofilų aktyvacijos testų vertinimo duomenys (%).

	CD63 (N=16)		CD203c (N=16)	
	Teigiama kontrolė	Neigiama kontrolė	Teigiama kontrolė	Neigiama kontrolė
Vidurkis	40,0	4,4	35,6	4,6
Standartinis nuokrypis (angl., SD)	4,3	0,6	5,7	0,8
Mediana	38,1	4,2	38,4	4,0
Mažiausia reikšmė	11,8	1,4	9,3	1,1
Didžiausia reikšmė	70,8	8,5	84,7	9,2

Bendras bazofilų aktyvacijos tyrimų, vertinant CD203c ir CD63 žymenų ekspresiją, rezultatų vaizdas (vidurkis, išsibarstymas, simetriškumas, išsiskiriančios, maksimalios ir minimalios reikšmės) pacientų ir kontrolinėse grupėse, o taip pat teigiamos ir neigiamos kontrolės reikšmės yra matomas stačiakampėse diagramose (angl., *Box-whisker plot*) (7 ir 8 paveikslai).



### Diagramoje naudoti

#### simboliai:

Stačiakampis–Q1-Q3 kvartilis

Brūkšny – mediana

◇ – vidurkis

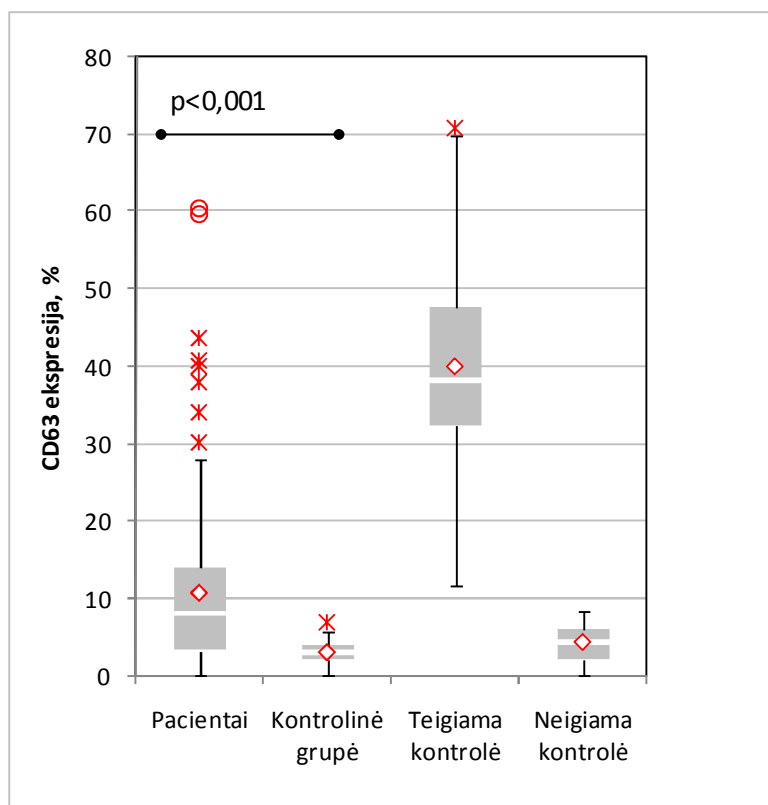
⊤ –maksimali reikšmė

⊥ – minimali reikšmė

○ – ekstremalios reikšmės

\*–išsiskiriančios reikšmės

**7 pav.** CD203c žymens ekspresija (%) ligonių ir kontrolinėje grupėje, bei teigiama ir neigiama kontrolė



### Diagramoje naudoti

#### simboliai:

Stačiakampis–Q1-Q3 kvartilis

Brūkšny – mediana

◇ – vidurkis

⊢ – maksimali reikšmė

⊥ – minimali reikšmė

○ – ekstremalios reikšmės

\* – išsiskiriančios reikšmės

**8 pav.** CD63 žymens ekspresija (%) ligonių ir kontrolinėje grupėje, bei teigiama ir neigiama kontrolė

## 8.2 Ribinės vertės pasirinkimas

Apskaičiavome septynias literatūros duomenimis dažniausiai naudojamas ribines vertes:

- kontrolinės grupės vidutinė reikšmė +2 standartiniai nuokrypiai
- kontrolinės grupės vidutinė reikšmė +3 standartiniai nuokrypiai
- 5%
- 10%
- 15%
- 2x neigiama kontrolė
- 95 kontrolinės grupės procentilis

Ribinės vertės ir jų skaitinė išraiška pateikti 4 lentelėje.

**4 lentelė.** CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų rezultatų ribinės vertės ir jų skaitinė išraiška

Nr.	Ribinė vertė	CD203c	CD63
1	Kontrolinės grupės vidurkis +2 SD	2,88	6,04
2	Kontrolinės grupės vidurkis +3 SD	3,40	7,52
3	15%	15	15
4	10%	10	10
5	5%	5	5
6	2x neigiama kontrolė	NA	NA
7	95 procentilis	2,700	6,262

NA: negalima išreikšti skaitine išraiška.

CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų jautrumo ir specifiškumo duomenys ir teigiamų tyrimų rezultatų skaičiaus procentinė išraiška, priklausomai nuo ribinės vertės, pateikti 5 ir 6 lentelėse.

**5 lentelė.** CD63 žymens ekspresijos tyrimo jautrumo ir specifiškumo duomenys

Nr.	Ribinė vertė	CD63 (teigiamų, %)	jautrumas	specifiškumas
1	Kontrolinės grupės vidurkis+2 SD	61,7	74,42	44,71
2	Kontrolinės grupės vidurkis+3 SD	56,3	74,42	52,94
3	15%	21,9	37,21	85,88
4	10%	36,7	55,81	72,94
5	5%	65,6	79,07	41,18
6	2x neigiama kontrolė	49,2	67,44	60,00
7	95 procentilis	60,9	74,42	45,88

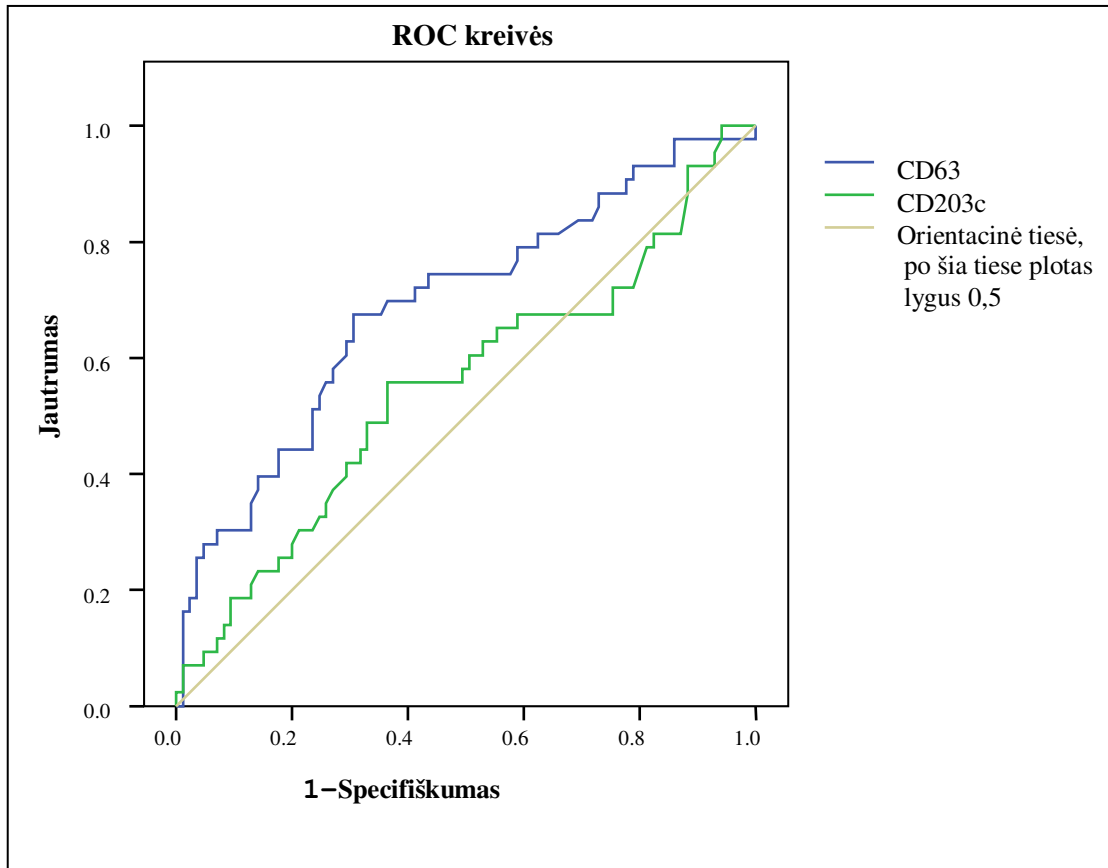
**6 lentelė.** CD203c žymens ekspresijos tyrimo jautrumo ir specifiškumo duomenys

Nr.	Ribinė vertė	CD203c (teigiamų, %)	jautrumas	specifiškumas
1	Kontrolinės grupės vidurkis +2 SD	64,1	67,4	37,6
2	Kontrolinės grupės vidurkis +3 SD	63,3	67,4	38,8
3	15%	33,6	41,9	70,6
4	10%	45,3	55,8	60,0
5	5%	59,4	65,1	43,5
6	2x neigiama kontrolė	39,1	44,2	63,5
7	95 procentilis	64,8	67,4	36,4



Optimali ribinė vertė papildomai buvo įvertinta, naudojant gautų duomenų efektyvumą charakterizuojančias kreives (ROC) (9 paveikslas) bei apskaičiuojant po jomis esantį plotą (7 lentelė).

ROC kreivės koordinatės pateiktos 4 priede.



**9 pav.** CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos ROC kreivės

**7 lentelė.** Plotas, apskaičiuotas po ROC kreive

	Plotas	Standartinė paklaida	Reikšmingumo lygmuo	95% pasikliautinis intervalas	
				Viršutinė riba	Apatinė riba
CD63	0,691	0,051	0,000	0,591	0,791
CD203c	0,552	0,056	0,339	0,442	0,662

Kadangi CD203c žymens tyrimo plotas po kreive yra artimas 0,5 ir p reikšmė  $>0,05$ , galima daryti išvadą, kad šis tyrimas nepasižymi geromis prognostinėmis savybėmis.

Ribinė vertė turėtų būti parenkama taip, kad testo klasifikacijos tikslumas būtų didžiausias, o paklaida mažiausia. Youden'o indekso ir TME rodiklių rezultatai bazofilų CD63 žymens tyrimui pateikti 8 lentelėje.

**8 lentelė.** Yodeno indekso ir TME rodiklių rezultatai (%)

Nr.	Ribinė vertė	CD63 (teigiamų %)	jautrumas	specifiškumas	Youden indeksas	bendrasis tikslumas	TME <sub>0</sub>	TME <sub>1</sub>
1	Kontrolinės grupės vidurkis+2 SD	61,7	74,42	44,71	19,13	54,68	80,9	45,3
2	Kontrolinės grupės vidurkis+3 SD	56,3	74,42	52,94	27,36	60,2	72,6	39,8
3	15%	21,9	37,21	85,88	23,09	69,5	76,9	30,5
4	<b>10%</b>	<b>36,7</b>	<b>55,81</b>	<b>72,94</b>	<b>28,75</b>	<b>67,2</b>	<b>71,2</b>	<b>32,8</b>
5	5%	65,6	79,07	41,18	20,25	53,9	79,8	46,1
6	2x neigiama kontrolė	49,2	67,44	60,00	27,44	62,5	72,6	37,5
7	95 procentilis	60,9	74,42	45,88	20,3	55,5	79,7	44,5

Youden'o indeksas įgijo maksimalią reikšmę, esant 10% ribinei vertei (29%), o bendro tikslumo rodiklio maksimali reikšmė buvo esant 15% ribinei reikšmei. Mažiausia TME<sub>0</sub> rodiklio reikšmė (71%) buvo pasiekama esant 10% ribinei reikšmei, o mažiausia TME<sub>1</sub> (30,5%) rodiklio reikšmė buvo esant 15% ribinei reikšmei.

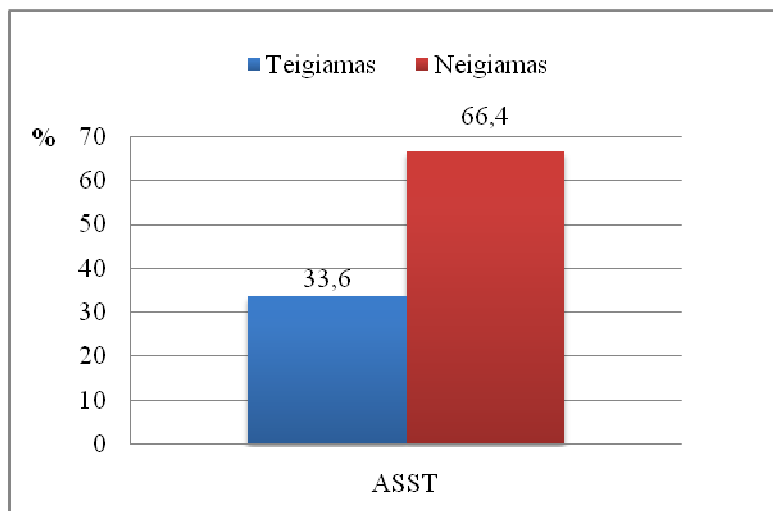
Remiantis gautais duomenimis (jautrumo ir specifiškumo skaičiavimais, esant aukščiausiam Youden'o indeksui, mažiausiam TME<sub>0</sub> rodikliui), pasirinkome 10% CD63 tyrimo ribinę vertę. Ši 10% ribos pasirinkimą patvirtino ir ROC kreivės analizė (žr. 4 priedą). Iš šio tyrimo matyti, kad didžiausias CD63 tyrimo jautrumas ir specifiškumas pasiekiamas, kai ribinė CD63 vertė didesnė nei 8,95%. Kadangi 8,95% ribinė vertė nepatogi naudojimui, buvo pasirinkta artimiausia, dažniausiai naudojama 10% ribinė vertė.

Kaip parodė anksčiau atliktas ROC kreivės tyrimas, CD203c nėra tinkamas rodiklis, tačiau eksperimentiniams tikslams jis ir toliau buvo naudojamas

analizėje. Visiems skaičiavimams toliau naudojome 10% CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų ribinę vertę.

### 8.3 Odos testo naudojant autologinį serumą tyrimų rezultatai

Iš ištirtų 128 ligonių, sergančių LD, 43 (33,6%) ASST buvo teigiamas, 85 (66,4%) – neigiamas (rezultatai pavaizduoti 10 paveiksle). Visiems kontrolinės grupės (n=10) asmenims ASST buvo neigiamas.



10 pav. Pacientų pasiskirstymas pagal ASST

### 8.4 Tyrimų koreliacija

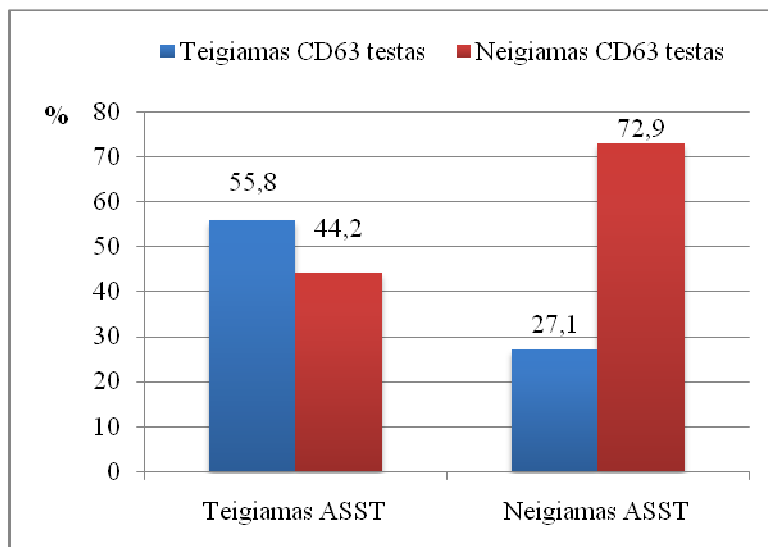
#### *Odos testo su autologiniu serumu ir bazofilų aktyvacijos testų koreliacija*

Pateiktoje 9 lentelėje parodyta CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimo ir ASST rezultatai bei jų tarpusavio ryšys.

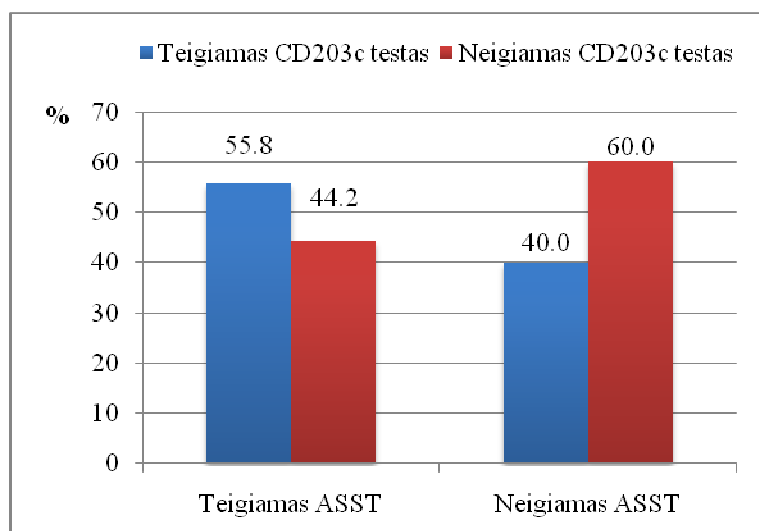
**9 lentelė.** CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos ir ASST tyrimų rezultatai

	ASST					
	Teigiamas		Neigiamas		Iš viso	
	N	%	N	%	N	%
<b>CD203c: slenkstis 10%</b>						
Teigiamas	24	55,8%	34	40,0%	58	45,3%
Neigiamas	19	44,2%	51	60,0%	70	54,7%
Iš viso	43	100,0%	85	100,0%	128	100,0%
<b>CD63: slenkstis 10%</b>						
Teigiamas	24	55,8%	23	27,1%	47	36,7%
Neigiamas	19	44,2%	62	72,9%	81	63,3%
Iš viso	43	100,0%	85	100,0%	128	100,0%

11 ir 12 paveiksluose grafiškai pavaizduotas ASST ir bazofilų žymenų ekspresijos rezultatų ryšys



**11 pav.** ASST ir CD63 žymens ekspresijos ryšys



**12 pav.** ASST ir CD203c žymens ekspresijos ryšys

CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų ir ASST rezultatų koreliacijos įvertinimui apskaičiuotas Spearmano koreliacijos koeficientas (10 lentelė).

**10 lentelė.** CD63, CD203c žymenų ekspresijos tyrimų ir ASST koreliacija (Spearmano koeficientas)

		ASST
CD63: slenkstis (10%)	Koreliacijos koeficientas	0,282(**)
	Reikšmingumo lygmuo (p reikšmė)	0,001
	Skaičius	128
CD203c: slenkstis 10%)	Koreliacijos koeficientas	0,150
	Reikšmingumo lygmuo (p reikšmė)	0,091
	Skaičius	128

\*\*Koreliacija yra reikšminga, kai  $p \leq 0,01$

Įvertinus CD63 ekspresijos ir ASST ryšį, nustatyta patikima koreliacija ( $r = 0,282$ ,  $p = 0,001$ ), tačiau įvertinus CD203c ekspresijos ir ASST ryšį ( $r = 0,150$ ,  $p = 0,091$ ) gautas priešingas rezultatas. Taigi, CD203c ekspresijos ir ASST tyrimai nekoreliuoja tarpusavyje.

Lygindami CD63 ir CD203c ekspresijos tyrimų negrupuotus duomenis, priklausomai nuo ASST rezultato, taikėme Mann-Whitney testą (11 lentelė).

**11 lentelė.** CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų palyginimas ASST teigiamoje ir neigiamoje grupėse (Mann-Whitney testas)

	CD63	CD203c
Mann-Whitney U	1130,000	1638,000
Wilcoxon W	4785,000	5293,000
Z	-3,519	-0,956
Reikšmingumo lygmuo (p reikšmė)	0,000	0,339

Gavome, kad CD63 žymens ekspresija reikšmingai skiriasi ASST teigiamoje ir neigiamoje tiriamųjų grupėse, tuo tarpu CD203c žymens ekspresijos rezultatas abiejose ASST grupėse reikšmingai nesiskiria.

Patikrinome CD63 ir CD203c ekspresijos testų ir ASST nepriklausomumą pagal Chi-kvadrato kriterijų. Lyginami rodikliai pateikti 12 lentelėje. Chi-kvadrato testo rezultatai – 13 lentelėje.

**12 lentelė.** CD63 žymens ekspresijos ir ASST tyrimų rezultatai

	ASST		Iš viso
	Teigiamas	Neigiamas	
<b>CD63: slenkstis 10%</b>			
Teigiamas	24	23	47
Neigiamas	19	62	81
Iš viso	43	85	128

**13 lentelė.** CD63 žymens ekspresijos tyrimo ir ASST koreliacija (Chi-kvadrato testai)

	$\chi^2$ Reikšmė	DF (laisvės laipsnių skaičius)	Reikšmingumo lygmuo (p reikšmė)
Pearsono Chi-kvadrato kriterijus	10,161	1	0,001
Tikėtinumo santykio kriterijus	10,024	1	0,002

Reikšmingumo lygmens p-reikšmė ir pagal Pearsono formulę, ir pagal tikėtinumo santykio formulę (angl. *likelihood ratio*) yra panaši ir neviršija reikšmingumo lygmens (0,05). Vadinas, hipotezę, kad ASST nepriklauso nuo CD63, galima atmesti, pasirinkus reikšmingumo lygmenį  $\alpha=0,05$ . Tai dar kartą

patvirtina ryšį tarp CD63 žymens ekspresijos testo ir abiejų ASST grupių (teigiamos ir neigiamos).

Tie patys skaičiavimai taikyti CD203c žymens tyrimui. Jie pateikti 14 ir 15 lentelėse.

**14 lentelė.** CD203c žymens ekspresijos tyrimo ir ASST rezultatai

CD203c: slenkstis 10%:	ASST				Iš viso	
	Teigiamas		Neigiamas			
	N	%	N	%	N	%
Teigiamas	24	55,8	34	40,0	58	45,3
Neigiamas	19	44,2	51	60,0	70	54,7
Iš viso	43	100,0	85	100,0	128	100,0

**15 lentelė.** CD203c žymens ekspresijos tyrimo ir ASST koreliacija (Chi-kvadrato testai)

	$\chi^2$ Reikšmė	DF (laisvės laipsnių skaičius)	Reikšmingumo lygmuo (p reikšmė)
Pearsono Chi-kvadrato kriterijus	2,882	1	0,09
Tikėtinumo santykio kriterijus	2,879	1	0,09

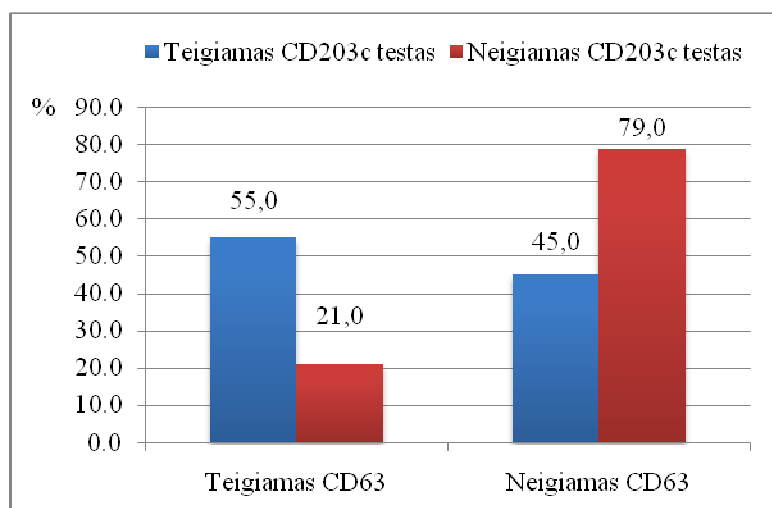
Vertinant CD203c žymens ekspresijos ir ASST rezultatų ryšį, nustatyta, kad reikia priimti hipotezę apie šių testų nepriklausomybę ( $\chi^2=2,882$ ,  $p=0,09$ ). Vadinasi, tarp ASST rezultato (neigiamas, teigiamas) ir CD203c rezultato nėra sąryšio.

#### ***CD63 ir CD203c testų koreliacija***

Palyginome tarpusavyje CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų rezultatus (duomenys pateikti 16 lentelėje ir 13 paveiksle).

**16 lentelė.** CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų rezultatai

CD63: slenkstis 10%	CD203c: slenkstis (10%)				Iš viso	
	Teigiamas		Neigiamas			
	N	%	N	%	N	%
Teigiamas	32	55,2	15	21,4	47	36,7
Neigiamas	26	44,8	55	78,6	81	63,3
Iš viso	58	100,0	70	100,0	128	100,0



**13 pav.** CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos ryšys

Patikrinome CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos testų nepriklausomumą pagal Chi-kvadrato kriterijų (17 lentelė).

**17 lentelė.** CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų koreliacija (Chi-kvadrato testai)

	$\chi^2$ Reikšmė	DF (laisvės laipsnių skaičius)	Reikšmingumo lygmuo (p reikšmė)
Pearsono Chi-kvadrato kriterijus	15,543	1	0,000
Tikėtinumo santykio kriterijus	15,781	1	0,000

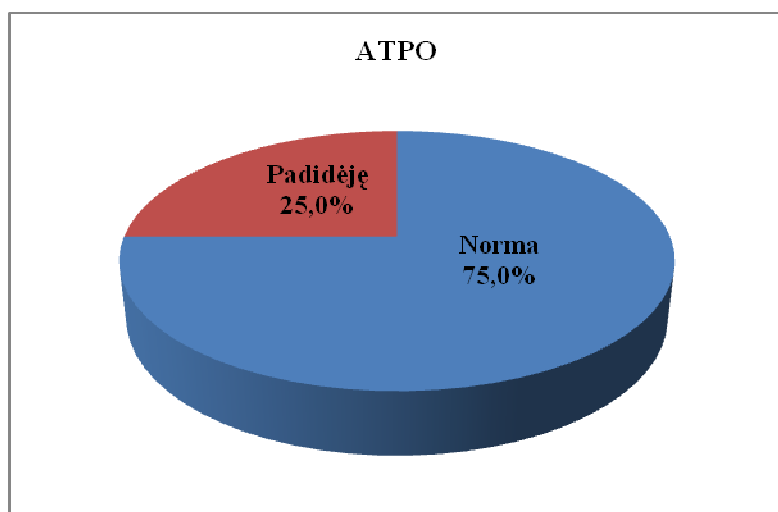
Šiuo atveju (17 lentelė) reikšmingumo lygmuo  $p$  labai mažas ( $p=0,000$ ), todėl hipotezę, kad CD63 žymens ekspresijos testo rezultatas nepriklauso nuo CD203c žymens ekspresijos testo rezultato, esant reikšmingumo lygmeniui  $\alpha=0,05$ , galima atmesti. Vadinasi, šių dviejų matavimų testų rezultatai yra priklausomi.



## 8.5 Kitų autoimunizacijos rodiklių tyrimų rezultatai ir jų koreliacija su lėtinės autoimuninės dilgėlinės testais

### 8.5.1 Antikūnai prieš skydliaukės mikrosomų peroksidazę ir tirotropinis hormonas

ATPO buvo ištirti visiems (128) LD sergantiems pacientams, 32 pacientams (25,0%) jis buvo padidėjęs (10 paveikslas).



14 pav. Pacientų pasiskirstymas pagal ATPO

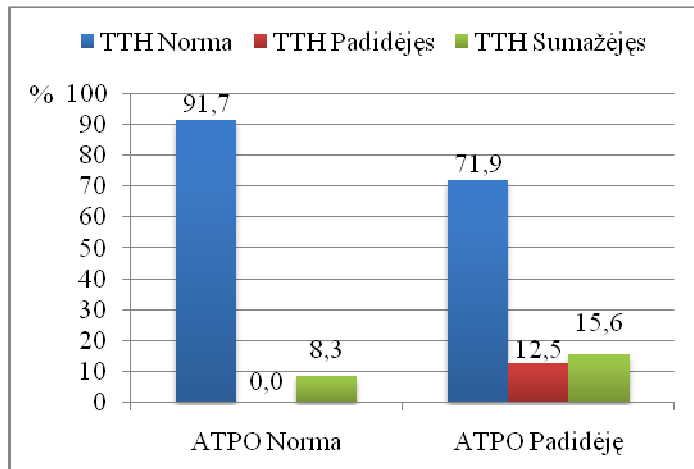
TTH tyrimo rezultatai, priklausomai nuo ATPO rezultato, pateikti 18 lentelėje ir 15 paveiksle.

18 lentelė. TTH ir ATPO tyrimų rezultatai

TTH:	ATPO				Iš viso	
	Norma		Padidėjęs			
	N	%	N	%	N	%
Norma	44	91,7%	23	71,9%	67	83,8%
Padidėjęs	0	0,0%	4	12,5%	4	5,0%
Sumažėjęs	4	8,3%	5	15,6%	9	11,3%
Iš viso	48	100,0%	32	100,0%	80	100,0%

Didesnė TTH koncentracija, rodanti skydliaukės hipofunkciją, nustatyta tik tiems pacientams, kuriems ATPO kiekis buvo padidėjęs – 12,5%. Skydliaukės hiperfunkcija (sumažėjęs TTH) nustatyta abiejose (padidėjusių ir normalių

ATPO) tiriamųjų grupėse – 15,6% ir 8,3% pacientų atitinkamai. Tai grafiškai pavaizduota 15 paveiksle.



**15 pav.** Pacientų pasiskirstymas pagal ATPO ir TTH

Įvertinome ATPO ir ASST, CD63 bei CD203c žymenų ekspresijos rezultatų koreliaciją. Naudojome CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos vertinimą, taikant 10% ribinę vertę. Duomenys pateikti 19–22 lentelėse.

**19 lentelė.** ATPO ir ASST rezultatai

ASST:	ATPO				Iš viso	
	Norma		Padidėjęs		N	%
	N	%	N	%		
Neigiamas	65	67,7%	20	62,5%	85	66,4%
Teigiamas	31	32,3%	12	37,5%	43	33,6%
Iš viso	96	100,0%	32	100,0%	128	100,0%

**20 lentelė.** ATPO ir CD203c žymens ekspresijos tyrimo rezultatai

CD203c: Slenkstis (10%):	ATPO				Iš viso	
	Norma		Padidėjęs		N	%
	N	%	N	%		
Neigiamas	49	51,0%	21	65,6%	70	54,7%
Teigiamas	47	49,0%	11	34,4%	58	45,3%
Iš viso	96	100,0%	32	100,0%	128	100,0%

**21 lentelė.** ATPO ir CD63 žymens ekspresijos tyrimo rezultatai

CD63: slenkstis (10%):	ATPO				Iš viso	
	Norma		Padidėjęs			
	N	%	N	%	N	%
Neigiamas	64	66,7%	17	53,1%	81	63,3%
Teigiamas	32	33,3%	15	46,9%	47	36,7%
Iš viso	96	100,0%	32	100,0%	128	100,0%

**22 lentelė.** ATPO ir ASST, ATPO ir CD63, CD203c žymenų ekspresijos tyrimų koreliacijos (Chi-kvadrato testas)

Pearsono Chi-kvadrato kriterijus	$\chi^2$ Reikšmė	DF (laisvės laipsnių skaičius)	Reikšmingumo lygmuo (p reikšmė)
ATPO ir ASST	0,292	1	0,589
ATPO ir CD63	1,894	1	0,169
ATPO ir CD203c	2,060	1	0,151

Kadangi reikšmingumo lygmuo p visais atvejais buvo didesnis nei 0,05 (22 lentelė), statistiškai reikšmingo ryšio tarp ATPO ir LAD rodiklių (ASST, CD63, CD203c) negavome.

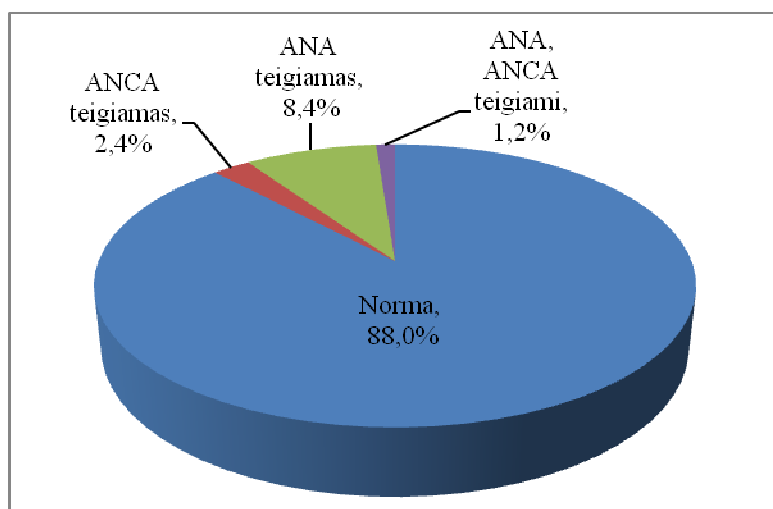
## 8.5.2 Antikūnai prieš branduolių antigenus ir antikūnai prieš neutrofilų citoplazmos antigenus

Žemiau esančioje 23 lentelėje ir 16 paveiksle pateikti 83 pacientų ANA, ANCA tyrimų rezultatai.

**23 lentelė.** ANA, ANCA tyrimų rezultatai

ANA, ANCA									
ANA teig.		ANA ir ANCA teig.		ANCA teig.		Norma		Iš viso	
N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
7	8,4%	1	1,2%	2	2,4%	73	88,0%	83	100,0%

Pacientams, sergantiems LD, dažniau buvo nustatomi ANA (o ne ANCA). Keliems pacientams stebėjome tik laikinai esant ANA (pakartojus, tyrimas buvo normalus). Vienas iš pacientų, kuriam nustatyti teigiami ANA, sirgo sisteminė raudonąja vilklige, vienam buvo įtariama kolagenozė, dviem pacientams nustatytas padidėjęs ATPO kiekis, o trys turėjo lėtinės infekcijos židinius. Pacientai, kuriems buvo teigiamas ANCA, kitų susirgimų neturėjo.



**16 pav.** Pacientų pasiskirstymas pagal ANA, ANCA

Įvertinome ANA, ANCA ir ASST, CD63 bei CD203c žymenų ekspresijos rezultatų koreliaciją.

Duomenys pateikti 24–27 lentelėse.

**24 lentelė.** ANA, ANCA ir ASST rezultatai

ANA, ANCA:	ASST				Iš viso	
	Teigiamas		Neigiamas			
	N	%	N	%	N	%
ANA teig.	6	12,0	1	3,0	7	8,4
ANA teig. , ANCA teig.	0	0,0	1	3,0	1	1,2
ANCA teig.	0	0,0	2	6,1	2	2,4
Norma	44	88,0	29	87,9	73	88,0
Iš viso	50	100,0	33	100,0	83	100,0

**25 lentelė.** ANA, ANCA ir CD63 žymens ekspresijos tyrimo rezultatai

ANA, ANCA:	CD63: slenkstis (10%)				Iš viso	
	Teigiamas		Neigiamas			
	N	%	N	%	N	%
ANA teig.	5	9,3	2	6,9	7	8,4
ANA teig., ANCA teig.	0	0,0	1	3,4	1	1,2
ANCA teig.	2	3,7	0	0,0	2	2,4
Norma	47	87,0	26	89,7	73	88,0
Iš viso	54	100,0	29	100,0	83	100,0

**26 lentelė.** ANA, ANCA ir CD203c žymens ekspresijos tyrimo rezultatai

ANA, ANCA:	CD203c: slenkstis (10%)				Iš viso	
	Teigiamas		Neigiamas			
	N	%	N	%	N	%
ANA teig.	4	8,2	3	8,8	7	8,4
ANA teig. , ANCA teig.	0	0,0	1	2,9	1	1,2
ANCA teig.	1	2,0	1	2,9	2	2,4
Norma	44	89,8	29	85,3	73	88,0
Iš viso	49	100,0	34	100,0	83	100,0

**27 lentelė.** ANA, ANCA ir ASST, ANA, ANCA ir CD63, CD203c žymenų ekspresijos tyrimų koreliacijos (Chi-kvadrato testas)

Pearsono Chi-kvadrato kriterijus	$\chi^2$ Reikšmė	DF (laisvės laipsnių skaičius)	Reikšmingumo lygmuo (p reikšmė)
ANA, ANCA ir ASST	6,442	3	0,092
ANA, ANCA ir CD63	3,076	3	0,380
ANA, ANCA ir CD203c	1,565	3	0,667

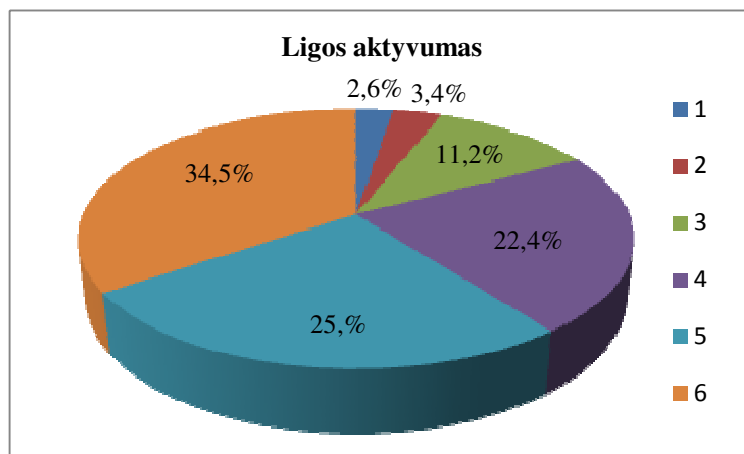
Pagal visus apskaičiuotus rodiklius statistiškai patikimo ryšio tarp ANA, ANCA rezultatų ir LAD rodiklių (ASST, bazofilų žymenų ekspresijos testų) negavome, kadangi reikšmingumo lygmuo p visais atvejais buvo didesnis nei 0,05 (27 lentelė).

## 8.6 Klausimynas

### 8.6.1 Ligos aktyvumas

Ligos aktyvumo įvertinimas (bėrimų ir niežulio įvertinimo pagal 3 balų sistemą suma) pateiktas 17 paveiksle.

Tik 3 (2,6%) pacientai įvertino ligos aktyvumo laipsnį “1” (kaip labai žemą); 4 (3,4%) pacientai įvertino “2”; 13 (11,2%) – “3”; 26 (22,4%) – “4”. Dauguma pacientų įvertino ligos aktyvumą “5” – 30 (25,9%) arba “6” – 40 (34,5%).



**17 pav.** Pacientų pasiskirstymas pagal ligos aktyvumo vertinimą

Ligos aktyvumo ir LAD rodiklių (ASST, bazofilų žymenų ekspresijos testų) koreliacijos duomenys pateikti 28–31 lentelėse.

**28 lentelė.** Ligos aktyvumo ir ASST rezultatai

Ligos aktyvumas	ASST				Iš viso	
	Teigiamas		Neigiamas			
	N	%	N	%	N	%
1	3	3,8%	0	0,0%	3	2,6%
2	4	5,1%	0	0,0%	4	3,4%
3	8	10,3%	5	13,2%	13	11,2%
4	14	17,9%	12	31,6%	26	22,4%
5	21	26,9%	9	23,7%	30	25,9%
6	28	35,9%	12	31,6%	40	34,5%
Iš viso	78	100,0%	38	100,0%	116	100,0%

**29 lentelė.** Ligos aktyvumo ir CD63 žymens ekspresijos tyrimo rezultatai

Ligos aktyvumas	CD63: slenkstis (10%)				Iš viso	
	Teigiamas		Neigiamas			
	N	%	N	%	N	%
1	3	4,2%	0	0,0%	3	2,6%
2	3	4,2%	1	2,3%	4	3,4%
3	6	8,3%	7	15,9%	13	11,2%
4	17	23,6%	9	20,5%	26	22,4%
5	17	23,6%	13	29,5%	30	25,9%
6	26	36,1%	14	31,8%	40	34,5%
Iš viso	72	100,0%	44	100,0%	116	100,0%

**30 lentelė.** Ligos aktyvumo ir CD203c žymens ekspresijos tyrimo rezultatai

Ligos aktyvumas	CD203c: slenkstis (10%)				Iš viso	
	Teigiamas		Neigiamas			
	N	%	N	%	N	%
1	1	1,6%	2	3,8%	3	2,6%
2	4	6,3%	0	0,0%	4	3,4%
3	7	11,1%	6	11,3%	13	11,2%
4	11	17,5%	15	28,3%	26	22,4%
5	18	28,6%	12	22,6%	30	25,9%
6	22	34,9%	18	34,0%	40	34,5%
Iš viso	63	100,0%	53	100,0%	116	100,0%

**31 lentelė.** Ligos aktyvumo ir ASST, ligos aktyvumo ir CD63, CD203c žymenų ekspresijos tyrimų koreliacijos (Chi-kvadrato testas)

Pearsono Chi-kvadrato kriterijus	$\chi^2$ Reikšmė	DF (laisvės laipsnių skaičius)	Reikšmingumo lygmuo (p reikšmė)
Ligos aktyvumas ir ASST	5,962	5	0,310
Ligos aktyvumas ir CD63	4,155	5	0,527
Ligos aktyvumas ir CD203c	5,807	5	0,325

Pagal visus apskaičiuotus rodiklius statistiškai patikimo ryšio tarp ligos aktyvumo ir LAD rodiklių (ASST, bazofilų žymenų ekspresijos testų) negavome, kadangi reikšmingumo lygmuo p visais atvejais buvo didesnis nei 0,05 (31 lentelė).



## 8.6.2 Ligos trukmė

Ligos trukmės duomenys pateikti 32 lentelėje.

**32 lentelė.** Ligos trukmė

Ligos trukmė (mėnesiais)	Statistinė reikšmė
N	116
Vidurkis	38
Standartinis nuokrypis	70
Mediana	8
Minimali reikšmė	2
Maksimali reikšmė	480

Ligos trukmės vidurkis – 38 mėn.  $\pm$  70 mėn. (nuo 2 mėn. iki 40 metų). Ligos trukmės ir LAD (ASST, bazofilų žymenų ekspresijos testų) rodiklių koreliacijos duomenys pateikti 33–36 lentelėse.

**33 lentelė.** Ligos trukmės ir ASST tyrimo rezultatai

	ASST		Iš viso
	Neigiamas (N=78)	Teigiamas (N=38)	
Ligos trukmė (mėnesiais)	Statistinė reikšmė	Statistinė reikšmė	Statistinė reikšmė
Vidurkis	41	33	38
Standartinis nuokrypis	78	52	70
Mediana	9	6	8
Maksimali reikšmė	480	240	480
Minimali reikšmė	2	3	2

**34 lentelė.** Ligos trukmės ir CD63 žymens ekspresijos testo rezultatai

	CD63: slenkstis (10%)		Iš viso
	Neigiamas (N=72)	Teigiamas (N=44)	
Ligos trukmė (mėnesiais)	Statistinė reikšmė	Statistinė reikšmė	Statistinė reikšmė
Vidurkis	34	45	38
Standartinis nuokrypis	58	87	70
Mediana	8	7	8
Maksimali reikšmė	240	480	480
Minimali reikšmė	2	2	2

**35 lentelė.** Ligos trukmės ir CD203c ekspresijos testo rezultatai

	CD203c: slenkstis (10%)		Iš viso
	Neigiamas (N=63)	Teigiamas (N=53)	
Ligos trukmė (mėnesiais)	Statistinė reikšmė	Statistinė reikšmė	Statistinė reikšmė
Vidurkis	42	34	38
Standartinis nuokrypis	80	57	70
Mediana	12	6	8
Maksimali reikšmė	480	240	480
Minimali reikšmė	2	3	2

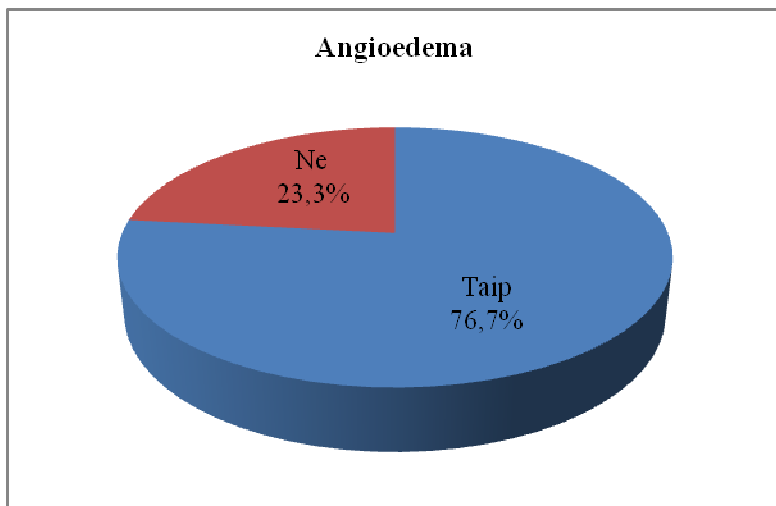
**36 lentelė.** Ligos trukmės palyginimas LAD rodiklių grupėse (Mann-Whitney testas)

	Ligos trukmė (mėn.) ir		
	ASST	CD63: slenkstis (10%)	CD203c: slenkstis (10%)
Mann-Whitney U	1359,500	1536,500	1412,500
Wilcoxon W	2100,500	2526,500	2843,500
Z statistika	-0,723	-0,271	-1,429
Reikšmingumo lygmuo (p reikšmė)	0,470	0,786	0,153

Statistiškai patikimo ryšio tarp ligos trukmės ir LAD rodiklių (ASST, bazofilų žymenų ekspresijos testų) negavome, kadangi reikšmingumo lygmuo p visais atvejais buvo didesnis nei 0,05 (36 lentelė).

### 8.6.3 Angioedema

Angioedemos epizodus turėjo net 89 (76,7% ) iš 116 pacientų (18 pav.).



**18 pav.** Angioedemos dažnis

Angioedemos ir LAD rodiklių (ASST, bazofilų žymenų ekspresijos testų) duomenys pateikti 37 – 40 lentelėse.

**37 lentelė.** Angioedemos ir ASST rezultatai

Angioedema	ASST				Iš viso	
	Teigiamas		Neigiamas			
	N	%	N	%	N	%
Ne	20	25,6%	7	18,4%	27	23,3%
Taip	58	74,4%	31	81,6%	89	76,7%
Iš viso	78	100,0%	38	100,0%	116	100,0%

**38 lentelė.** Angioedemos ir CD63c žymens ekspresijos tyrimo rezultatai

Angioedema	CD63: slenkstis (10%)				Iš viso	
	Teigiamas		Neigiamas			
	N	%	N	%	N	%
Ne	20	27,8%	7	15,9%	27	23,3%
Taip	52	72,2%	37	84,1%	89	76,7%
Iš viso	72	100,0%	44	100,0%	116	100,0%

**39 lentelė.** Angioedemos ir CD203c žymens ekspresijos tyrimo rezultatai

Angioedema	CD203c: slenkstis (10%)				Iš viso	
	Teigiamas		Neigiamas			
	N	%	N	%	N	%
Ne	17	27,0%	10	18,9%	27	23,3%
Taip	46	73,0%	43	81,1%	89	76,7%
Iš viso	63	100,0%	53	100,0%	116	100,0%

**40 lentelė.** Angioedemos ir ASST, angioedemos ir CD63, CD203c žymenų ekspresijos tyrimų koreliacijos (Chi-kvadrato testas)

Pearsono Chi-kvadrato kriterijus	$\chi^2$ Reikšmė	DF (laisvės laipsnių skaičius)	Reikšmingumo lygmuo (p reikšmė)
Angioedema ir ASST	0,746	1	0,388
Angioedema ir CD63	2,154	1	0,142
Angioedema ir CD203c	1,062	1	0,303

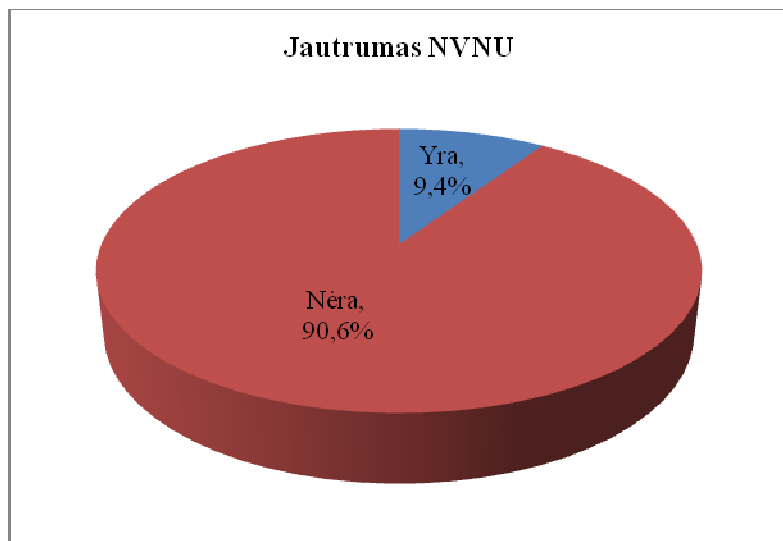
Kadangi reikšmingumo lygmuo p visais atvejais buvo didesnis nei 0,05 (40 lentelė), statistiškai reikšmingo ryšio tarp angioedemos ir LAD rodiklių (ASST, CD63, CD203c žymenų ekspresijos) negavome.

#### 8.6.4 Jautrumo nesteroidiniams vaistams nuo uždegimo vertinimas

Jautrumą NVNU nurodė 12 (9,4%) iš 128 ištirtų pacientų (19 paveikslas).

Visi pacientai, kurių anamnezėje buvo pažymėtas padidėjęs jautrumas NVNU, nurodė greito tipo reakcijas į šiuos vaistus (visiems paūmėjo dilgėlinė ir/arba angioedema, vienam kartu atsirado bronchospazmo ir rinito simptomai).

Dauguma pacientų nurodė jautrumą vienam NVNU preparatui, tik 2 pacientai buvo jautrūs keliems NVNU.



**19 pav.** Pacientų pasiskirstymas pagal jautrumą NVNU

Pacientų jautrumo NVNU su LAD rodikliais koreliacijos (ASST, bazofilų žymenų ekspresijos testu) duomenys pateikti 41–44 lentelėse.

**41 lentelė.** Jautrumo NVNU ir ASST rezultatai

Jautrumas NVNU	ASST				Iš viso	
	Teigiamas		Neigiamas			
	N	%	N	%	N	%
Yra	6	14,0%	6	7,1%	12	9,4%
Nėra	37	86,0%	79	92,9%	116	90,6%
Iš viso	43	100,0%	85	100,0%	128	100,0%

**42 lentelė.** Jautrumo NVNU ir CD63 žymens ekspresijos tyrimo rezultatai

Jautrumas NVNU	CD63: slenkstis (10%)				Iš viso	
	Teigiamas		Neigiamas			
	N	%	N	%	N	%
Yra	6	12,8%	6	7,4%	12	9,4%
Nėra	41	87,2%	75	92,6%	116	90,6%
Iš viso	47	100,0%	81	100,0%	128	100,0%

**43 lentelė.** Jautrumo NVNU ir CD203c žymens ekspresijos tyrimo rezultai

Jautrumas NVNU	CD203c: slenkstis (10%)				Iš viso	
	Teigiamas		Neigiamas			
	N	%	N	%	N	%
Yra	7	12,1%	5	7,1%	12	9,4%
Nėra	51	87,9%	65	92,9%	116	90,6%
Iš viso	58	100,0%	70	100,0%	128	100,0%

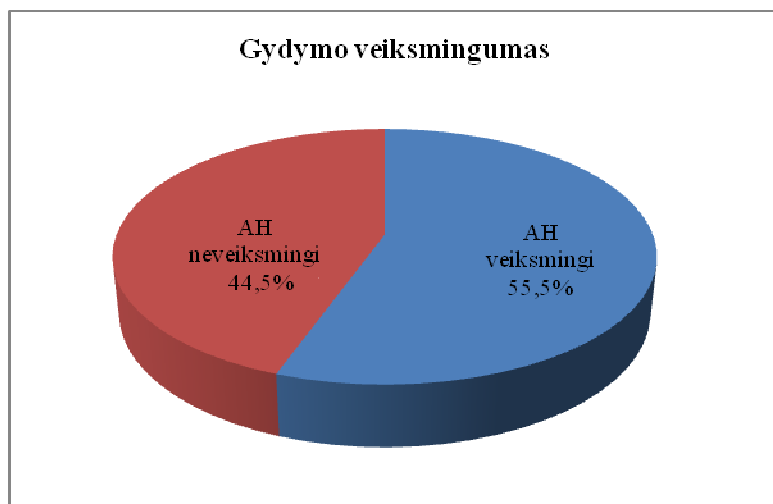
**44 lentelė.** Jautrumo NVNU ir ASST, jautrumo NVNU ir CD63, CD203c žymenų ekspresijos tyrimų koreliacijos (Chi-kvadrato testas)

Pearsono Chi-kvadrato kriterijus	$\chi^2$ Reikšmė	DF (laisvės laipsnių skaičius)	Reikšmingumo lygmuo (p reikšmė)
jautrumas NVNU ir ASST	1,598	1	0,206
jautrumas NVNU ir CD63	1,005	1	0,316
jautrumas NVNU ir CD203c	0,906	1	0,341

Pagal visus apskaičiuotus rodiklius statistiškai patikimo ryšio tarp jautrumo NVNU ir LAD rodiklių (ASST, bazofilų žymenų ekspresijos testų) negavome, kadangi reikšmingumo lygmuo p visais atvejais buvo didesnis nei 0,05 (44 lentelė).

### 8.6.5 Gydomo veiksmingumas

Iš 128 tirtųjų 57 pacientams (44,5%) įprastinis gydymas II kartos antihistamininiais vaistais buvo neveiksmingas (20 paveikslas).



**20 pav.** Gydomo antihistamininiais preparatais (AH) veiksmingumas

Gydymo veiksmingumo ir LAD rodiklių koreliacijos duomenys pateikti 45–48 lentelėse.

**45 lentelė.** Gydomo antihistamininiais preparatais veiksmingumo ir ASST rezultatai

Gydymas	ASST				Iš viso	
	Teigiamas		Neigiamas			
	N	%	N	%	N	%
Veiksmingas	18	41,9%	53	62,4%	71	55,5%
Neveiksmingas	25	58,1%	32	37,6%	57	44,5%
Iš viso	43	100,0%	85	100,0%	128	100,0%

**46 lentelė.** Gydomo antihistamininiais preparatais veiksmingumo ir CD63 žymens ekspresijos testo rezultatai

Gydymas	CD63: slenkstis (10%)				Iš viso	
	Teigiamas		Neigiamas			
	N	%	N	%	N	%
Veiksmingas	46	56,8%	25	53,2%	71	55,5%
Neveiksmingas	35	43,2%	22	46,8%	57	44,5%
Iš viso	81	100,0%	47	100,0%	128	100,0%

**47 lentelė.** Gydomo antihistamininiais preparatais veiksmingumo ir CD203c žymens ekspresijos testo rezultatai

Gydymas	CD203c: slenkstis (10%)				Iš viso	
	Teigiamas		Neigiamas			
	N	%	N	%	N	%
Veiksmingas	41	58,6%	30	51,7%	71	55,5%
Neveiksmingas	29	41,4%	28	48,3%	57	44,5%
Iš viso	70	100,0%	58	100,0%	128	100,0%

**48 lentelė.** Gydomo veiksmingumo ir ASST, gydymo veiksmingumo ir CD63, CD203c žymenų ekspresijos tyrimų koreliacijos (Chi-kvadrato testas)

Pearsono Chi-kvadrato kriterijus	$\chi^2$ Reikšmė	DF (laisvės laipsnių skaičius)	Reikšmingumo lygmuo (p reikšmė)
Gydymo veiksmingumas ir ASST	<b>4,855</b>	<b>1</b>	<b>0,028</b>
Gydymo veiksmingumas ir CD63	0,156	1	0,693
Gydymo veiksmingumas ir CD203c	0,602	1	0,438

Gavome statistiškai reikšmingą gydymo antihistamininiais preparatais veiksmingumo skirtumą ASST teigiamoje ir neigiamoje tiriamųjų grupėje ( $\chi^2=4,855$ ,  $df=1$ ,  $p=0,028$ ). Gydymo veiksmingumas antihistamininiais preparatais ASST teigiamoje tiriamųjų grupėje dažniau buvo nepakankamas, palyginus su ASST neigiama grupe. Tai reiškia, kad pacientams, kuriems ASST teigiamas, dažniau teko skirti gydymą alternatyviais preparatais, taikyti imunoterapiją.



## 9 Rezultatų aptarimas

Tyrimas buvo atliktas siekiant nustatyti autoreaktyvumo rodiklių diagnostinę reikšmę sergantiesiems LD. Funkciškai aktyvius autoantikūnus sergantiems LD patvirtinome tik neseniai šiam tikslui pradėtai naudoti bazofilų aktyvacijos tyrimais. Mūsų žiniomis, *PubMed* duomenų bazėje iki šiol nebuvo skelbta duomenų apie sergančiųjų LD CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų palyginimą LAD diagnostikai. Dauguma tyrėjų naudojo CD63 žymens ekspresiją ir tik viena tyrėjų grupė [75] – CD203c žymens ekspresiją donoro bazofilų paviršiuje. Jie ištyrė negausią 32 pacientų grupę. Mes pirmą kartą palyginome CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų rezultatus atopinio donoro bazofilų paviršiuje, paveikę juos serumu, gautu iš ligonių, sergančių LD. Ištyrėme didelę – 128 LD sergančių pacientų, grupę ir 30 sveikų kontrolinės grupės tiriamųjų.

Bazofilų aktyvacijos tyrimams pasirinkome atopinėmis ligomis sergantį donorą, kurio kraujyje buvo nustatytas padidėjęs IgE kiekis. Tokį donoro pasirinkimą lėmė mūsų atliktų eksperimentų serija. Palyginę kelių neatopinių ir atopinių donorų CD63 ir CD203c žymenų ekspresiją nustatėme, kad atopinio donoro bazofilai geriau ekspresuoja CD63 ir CD203c žymenis kai jie aktyvinami LD sergančių pacientų serumu, nei neatopinio donoro. Tokius pat duomenis yra pateikę ir kiti tyrėjai [71, 73, 74].

Nustatėme, kad mūsų pacientų, sergančių LD, CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimo rezultatai reikšmingai skyrėsi nuo kontrolinės sveikųjų asmenų grupės. Sergančių LD pacientų grupėje CD63 žymens ekspresija (vidurkis $\pm$ SD) buvo: 10,8% $\pm$ 10,9%, CD203c: 11,8% $\pm$ 12,4%, kontrolinėje grupėje – CD63: 3,10% $\pm$ 1,5%, CD203c: 1,84% $\pm$ 0,5% ( $p < 0,001$ ). Šis faktas leido įtarti esant sergančių LD pacientų serume autoantikūnų, kurie aktyvuoja donoro bazofilus.

Pagal ROC kreivės, Yoden'o indekso ir TME rodiklių skaičiavimus LAD diagnostikai pasirinkome optimaliausią bazofilų aktyvacijos tyrimų ribinę vertę – 10%.

Iki šiol ROC kreivės rodiklių vertinimą naudojo tik A. Frezzolini ir bendraautoriai, ištyrę CD63 žymens ekspresiją trispalvės citometrijos metodu [71]. Pritaikę ROC kreivės analizę ir panaudoję ASST kaip vertinimo standartą, autoriai pasirinko 15% ribinę vertę. Pagal ją jų tyrimo jautrumo (95,5%) ir specifiškumo (90,5%) rodikliai buvo didesni nei mūsų: CD63 žymens tyrimo testo jautrumas – 55,8% ir specifiškumas – 72,9%, CD203c testo jautrumas – 55,8%, specifiškumas – 60,0%. A. Frezzolini ir bendraautorių gauti didesni jautrumo ir specifiškumo rodikliai gali būti susiję su trispalvės, o ne dvispalvės (naudotos mūsų tyrime) citometrijos metodo naudojimu. K.M. Yasnowsky su bendraautoriais [75], atlikę sergančių LD CD203c žymens ekspresijos tyrimus, nustatė 77% tyrimo jautrumą ir 82% specifiškumą. Jie naudojo histamino išsiskyrimo testą iš bazofilų kaip „auksinį standartą“ ir pritaikė 5% ribinę vertę. Šių autorių gauti didesni jautrumo ir specifiškumo rodikliai gali būti susiję su kitų vertinimo kriterijų pasirinkimu.

Panaudoję 10% ribinę vertę, nustatėme, kad sergančių LD CD63 žymens ekspresijos tyrimas buvo teigiamas 36,7% pacientų, CD203c – 45,3%. 32% pacientų buvo teigiami abu – CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimai.

24 (55,8%) pacientams, kuriems ASST buvo teigiamas, ir net 23 (27,1%), kuriems jis buvo neigiamas, gauta padidėjusi CD63 žymens ekspresija. 24 (55,8%) pacientų, kuriems ASST buvo teigiamas ir net 34 (40%), kuriems šis testas buvo neigiamas, radome padidėjusią CD203c žymens ekspresiją. Šiuos rezultatus būtų galima paaiškinti didesniu bazofilų aktyvacijos testų jautrumu, palyginus su ASST arba klaidingai neigiamu ASST dėl sergančiųjų LD odos putliųjų ląstelių „desensibilizacijos“ serumo injekcijos vietoje [70]. Taip pat neatmetamas ir kito, nežinomo veiksnio, sukeliančio bazofilų aktyvaciją ir CD63 arba CD203c žymenų ekspresiją, egzistavimas paciento serume [75].

Neigiama CD63 ir CD203c žymenų ekspresija, gauta 19 (44,2%) pacientų, kuriems ASST buvo teigiamas, gali būti paaiškinta tik putliosios ląstelės būdingo histaminą atpalaiduojančio faktoriaus egzistavimu [64] arba klaidingai teigiamu ASST dėl bradikinino ar C5a atsiradimo krešėjimo proceso metu [70]. Taip pat galimas PE (fikoeritrino fluorochromo), naudojamo anti-IgE žymėjimui

atliekant bazofilų aktyvacijos tyrimus, poveikis anti-IgE antikūnams (galbūt PE neleidžia susijungti antikūnams su IgE) [70]. Šis faktorius gali turėti įtakos klaidingai neigiamiems bazofilų aktyvacijos testų rezultatams.

Mūsų tyrime teigiamas ASST nustatytas 43 (33,6%) pacientams, sergantiems LD. Tai atitinka kitų autorių duomenis, kai ASST buvo teigiamas 30–60% LD sergančių pacientų [17, 64]. Kontrolinės grupės atstovams visais atvejais ASST buvo neigiamas.

Tarp CD63 žymens ekspresijos tyrimo ir ASST gavome statistiškai patikimą koreliaciją ( $r=0,285$ ,  $p=0,001$ ). CD63 rezultatas reikšmingai skyrėsi ASST teigiamoje ir neigiamoje grupėse. Panašius rezultatus skirtingose ASST grupėse pateikia ir kiti autoriai, tyrę sergančiųjų LD donoro bazofilų paviršiuje CD63 ir CD203c žymenų ekspresiją [70-75]. CD203c žymens ekspresijos tyrimo rezultatai nekoreliavo su ASST ( $r=0,150$ ,  $p=0,091$ ). Skirtingas ASST ir CD63 bei ASST ir CD203c koreliacijas galima paaiškinti skirtingais CD203c ir CD63 žymens aktyvacijos mechanizmais bei skirtingu šių žymenų tankiu bazofilų paviršiuje. Šiems rezultatams galėjo turėti įtakos ir tyrimų atlikimo metodikų skirtumai (CD63 žymens ekspresijos tyrimą atlikome pagal standartinę BD *Fastimmune* rinkinio tyrimo metodiką, o CD203c žymens tyrimui pritaikėme K.M. Yasnowsky ir bendraautorių naudotą metodiką [75]).

Geresnį CD63 žymens ekspresijos tyrimo jautrumo rezultatą, lygindami CD63 ir CD203c žymenų tyrimus, gavo P.S. Sudheer ir bendraautoriai, tyrę padidėjusį jautrumą raumenų relaksantams [183].

Nustatyta patikima koreliacija tarp CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų ( $p<0,001$ ). Tačiau CD203c žymens ekspresijos testo plotas po ROC kreive buvo artimas 0,5 ir  $p$  reikšmė  $>0,05$ , todėl padarėme išvadą, kad šis tyrimas nepasižymi geromis prognostinėmis savybėmis. Tokio rezultato nesitikėjome, nes žinoma, kad CD203c yra tik bazofilams ir putliosioms ląstelėms būdingas žymuo. Taigi, jis turėtų geriau rodyti bazofilų aktyvaciją nei CD63 žymens, kuris randamas ir kitų ląstelių paviršiuje, nustatymas. Manome, kad ateityje sergantiems LD CD203c žymens ekspresijos tyrimus reikėtų pratęsti, padidinant tiriamųjų pacientų skaičių ir patobulinant CD203c žymens ekspresijos tyrimo

atlikimo metodiką, siekiant gauti geresnius jautrumo ir specifiškumo rodiklių rezultatus. Vertėtų palyginti bazofilų aktyvacijos testų ir histamino atpalaidavimo testų rezultatus. Būtina pacientams, sergantiems LD, standartizuoti naudojamus bazofilų aktyvacijos donoro bazofilų paviršiuje testų atlikimo ir vertinimo metodikas. Testų standartizaciją apsunkina tai, kad LAD diagnostikai naudojamų testų (ASST, histamino atpalaidavimo testo) jautrumas ir specifiškumas yra nedidelis, o jie naudojami kaip atskaitos taškas kitų testų įvertinimui.

Padidėjusį ATPO kiekį radome 32 (25,0%) pacientams iš 128 tiriamųjų, sirgusių LD. Tai žymiai didesnis skaičius nei nurodomas bendroje populiacijoje (6%) [122] ir sutampa su kitų autorių duomenimis, rodančiais, kad skydliaukės antikūnai randami 12–33% pacientų, sergančių LD [124-128]. 9 (28,1%) pacientams kuriems buvo padidėję ATPO, nustatėme skydliaukės funkcijos sutrikimą: hipotirozę – 4 (12,5%), hipertirozę – 5 (15,6%) pacientams. Įdomu, jog hipertirozė nustatyta ir 4 (8,3%) pacientams, kuriems ATPO kiekis buvo normalus. Tai rodo, kad pacientams, sergantiems LD, reikia tirti ne tik skydliaukės antikūnus, bet ir skydliaukės funkciją, nepriklausomai ar rasta antikūnų ar ne. Kitaip nei kai kurie autoriai [28, 129, 125], mes neradome statistiškai reikšmingo ryšio tarp ATPO ir ASST, o taip pat tarp ATPO ir bazofilų aktyvacijos rodiklių (CD63, CD203c žymenų ekspresijos). E. Nettis ir bendraautoriai taip pat nenustatė statistiškai patikimo skirtumo tarp skydliaukės antikūnų ASST teigiamoje ir neigiamoje grupėse [185].

83 pacientams ištyrėme ANA ir ANCA. 7 (8,4%) pacientams nustatėme ANA, 2 (2,4%) – ANCA ir 1 pacientui buvo aptikti abu antikūnai. ANA buvo nustatyti pacientams, kuriems be LD diagnozuotos sisteminės jungiamojo audinio ligos, lėtiniai infekciniai susirgimai ar autoimuninis tiroiditas. Vienas iš šių pacientų sirgo sisteminė raudonąja vilklige, vienam buvo įtariama kolagenozė, dviem pacientams nustatytas padidėjęs ATPO kiekis, trims – lėtinės infekcijos židiniai. Keliems pacientams ANA buvo atsiradę laikinai, o tai galėjo būti susiję su infekciniu procesu. ANCA buvo nustatomi rečiau ir nebuvo susiję su kitomis ligomis. Y.A. Buss ir bendraautoriai, ištyrę 339 pacientus, ANA nustatė žymiai mažiau – 3,5% ir nerado su šiais antikūnais susijusių lydinčių autoimuninių

susirgimų [186]. Panašų ANA dažnį – (4%) tarp tirtųjų pacientų nurodo E. Toubi ir bendraautorai [160]. Mūsų pacientų grupėje nenustatėme patikimo ryšio tarp ANA ir ANCA bei LAD rodiklių (ASST, CD63, CD203c žymenų ekspresijos). A. De Swerdt ir bendraautorai [70] tyrė pacientus, kuriems buvo teigiamas ASST arba CD63 ekspresijos testas, žymiai dažniau rasdavo vieną ar daugiau kitų autoantikūnų (jie tyrė ANA, ATPO, antitiroglobuliną ir antiparietalinius antikūnus), palyginus su pacientais, kuriems LAD diagnostiniai testai buvo neigiami.

Dauguma mūsų pacientų įvertino ligos aktyvumą “5” arba “6” balais – pagal 6 balų skalę. Kitaip nei kiti tyrėjai [158, 159], neradome statistiškai patikimo ryšio tarp ligos aktyvumo ir ASST, o taip pat ir bazofilų aktyvacijos rodiklių (CD63, CD203c žymenų ekspresijos). E. Nettis ir bendraautorai taip pat nerado ryšio tarp ligos aktyvumo ir ASST [185].

Mūsų tiriamųjų pacientų labai skyrėsi ligos trukmė (nuo 2 mėn. iki 40 metų). Statistiškai patikimo ryšio tarp ligos trukmės ir autoreaktyvumo rodiklių (ASST, CD63, CD203c žymenų ekspresijos) negavome. E. Toubi ir bendraautorai nustatė ryšį tarp ligos trukmės ir teigiamo ASST [160], tuo tarpu R. A. Sabroe ir bendraautorai tokio ryšio nerado [64, 38].

Angioedema mūsų tirtiesiems pacientams buvo gana dažna. Ji pasireiškė daugiau nei pusei visų tirtų pacientų (76,7%). Angioedema nebuvo dažnesnė LAD sergantiems pacientams, lyginant su kitais, kuriems ASST ir bazofilų aktyvacijos testai buvo neigiami. Daug tyrėjų nurodo, jog apie pusę LD atvejų lydi angioedema [2, 3, 187]. R.A. Sabroe ir bendraautorai nustatė LD ir angioedemos derinį net 85% ištirtų pacientų [38]. E. Nettis ir bendraautorai pacientams, kuriems ASST buvo teigiamas nustatė žymiai didesnę angioedemos dažnį [185].

9,4% mūsų apklaustų pacientų nurodė padidėjusį jautrumą NVNU. Tai perpus mažesnis skaičius, nei paprastai pateikiama mokslo darbuose [151, 152]. Panašų jautrumo NVNU dažnį (10%) nustatė E. Nettis ir bendraautorai, tyrė 562 pacientus, sergančius dilgėline [4]. Mes neatlikome provokacinių testų su NVNU, o jautrumą šiems preparatams nustatėme remiantis anamneze. Visiems mūsų

pacientams jautrumas NVNU pasireiškė greito tipo reakcijomis (dažniausiai tik dilgėlinės/angioedemos paūmėjimu). Dauguma pacientų (83,3%) buvo jautrūs tik vienam NVNU preparatui. Mokslo darbuose nurodoma, kad kryžminės reakcijos NVNU būdingos pacientams, kuriems ASST yra teigiamas [154, 151, 155]. Mes neradome statistiškai patikimo skirtumo tarp jautrumo NVNU pacientams, kuriems buvo teigiami arba neigiami ASST, CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimai.

Netgi 44,5% mūsų tirtų pacientų įprastinis gydymas vien II-os kartos antihistamininiais preparatais nebuvo veiksmingas. B. Wedi nurodo, jog gydant LD sergančius ligonius antihistamininiais preparatais, trečdaliui jų nebuvo pasiektas geras gydymo efektas [25]. Šis nedidelis skirtumas su mūsų tyrimo rezultatais gali būti paaiškinamas tuo, kad savo pacientams skyrėme įprastines arba, nesant efekto, dvigubas antihistamininių preparatų dozes, bet nedidinome jų iki 4 kartų (kaip rekomenduoja Europos alergologų ir klinikinių imunologų akademijos ekspertai). Mes nustatėme reikšmingą gydymo antihistamininiais preparatais veiksmingumo skirtumą ( $p=0,028$ ) tarp tų pacientų, kuriems ASST buvo teigiamas ir kuriems jis buvo neigiamas. Teigiamo ASST grupės pacientų gydymo veiksmingumas antihistamininiais preparatais dažniau buvo nepakankamas palyginti su neigiamo ASST grupe. Tai įrodo, kad pacientams, kurių serume yra histaminą atpalaiduojančių faktorių, LD eiga agresyvesnė ir jiems dažniau tenka skirti gydymą alternatyviais preparatais.

## 10 Išvados

1. Bazofilų aktyvacijos žymenų ekspresija (CD203c ir CD63) reikšmingai didesnė sergantiesiems lėtine dilgėline, palyginti su sveikais asmenimis. Tai leidžia įtarti, kad sergančiųjų lėtine dilgėline kraujo serume yra histaminą atpalaiduojančių faktorių (galbūt funkciškai aktyvių autoantikūnų).

2. Optimali bazofilų CD63 ir CD203c žymenų ekspresijos tyrimų ribinė vertė yra 10%.

3. Naudojant 10% ribinę vertę autoimuninei lėtinės dilgėlinės kilmei nustatyti, bazofilų CD63 žymens ekspresijos tyrimo jautrumas buvo 55,8%, specifiškumas – 72,9%, o CD203c tyrimo jautrumas – 55,8%, specifiškumas – 60,0%.

4. Bazofilų CD63 žymens ekspresijos tyrimo rezultatai patikimai koreliuoja su odos testu naudojant autologinį serumą ir su CD203c žymens ekspresijos testo rezultatais. Patikimos CD203c žymens koreliacijos su odos testu naudojant autologinį serumą neradome.

5. Bazofilų CD63 žymens ekspresijos tyrimas, nustatant autoimuninę dilgėlinės kilmę, pasižymi geresnėmis prognostinėmis savybėmis, palyginti su CD203c žymens ekspresijos tyrimu, todėl gali būti naudojamas lėtinei autoimuninei dilgėlinei diagnozuoti.

6. Patikimos koreliacijos tarp odos testo naudojant autologinį serumą, bazofilų CD63 bei CD203c žymenų ekspresijos tyrimų ir kitų autoimunizacijos rodiklių (ATPO, ANA, ANCA) nenustatyta.

7. Reikšmingos sąsajos tarp odos testo naudojant autologinį serumą, bazofilų CD63 bei CD203c žymenų ekspresijos tyrimų ir ligos aktyvumo, jos trukmės, angioedemos pasireiškimo, padidėjusio jautrumo nesteroidiniams vaistams nuo uždegimo nerasta.

8. Nustatėme, kad įprastinis gydymas antihistamininiais preparatais yra mažiau veiksmingas pacientams, kuriems odos testas naudojant autologinį serumą teigiamas.

## 11 Rekomendacijos

Pacientams, sergantiems lėtine dilgėline, rekomenduojama tirti autoreaktyvumo rodiklius, nes lėtinė dilgėlinė dažnai susijusi su autoimuniniu ligos išsivystymo mechanizmu. Tai svarbu ligos prognozei įvertinti ir gydymui parinkti. Pacientams, sergantiems lėtine dilgėline, nenustačius tiesioginės ligos priežasties, rekomenduojame atlikti odos testą su autologiniu serumu.

CD63 žymens ekspresijos atopinio donoro bazofilų paviršiuje tyrimą siūlome naudoti lėtinei autoimuninei dilgėlinei diagnozuoti. Tyrimo vertinimui siūlome taikyti 10% ribinę vertę. Šis tyrimas neinvazinis, o rezultatas sužinomas per kelias valandas. Paruoštą paciento serumą galima užšaldyti ir tyrimą atlikti patogiu laiku. Tyrimas ypač naudingas tais atvejais, kai įodinio testo atlikti neįmanoma, pavyzdžiui, nesant galimybės nutraukti gydymo antihistaminiais preparatais; esant ryškiam dermografizmui; mažiems vaikams.

Visiems pacientams, sergantiems lėtine dilgėline, siūlome tirti antikūnus prieš skydliaukės mikrosomų peroksidazę (ATPO) dėl autoimuninio tiroidito. Taip pat visiems pacientams rekomenduojame tirti TTH, nes skydliaukės funkcijos sutrikimas gana dažnas sergant lėtine dilgėline, netgi esant normaliam ATPO kiekiui ir gali turėti įtakos ligos eigai.

ANA, ANCA siūlome atlikti, kai yra sisteminėms ligoms būdingi klinikiniai požymiai.



## 12 Priedai

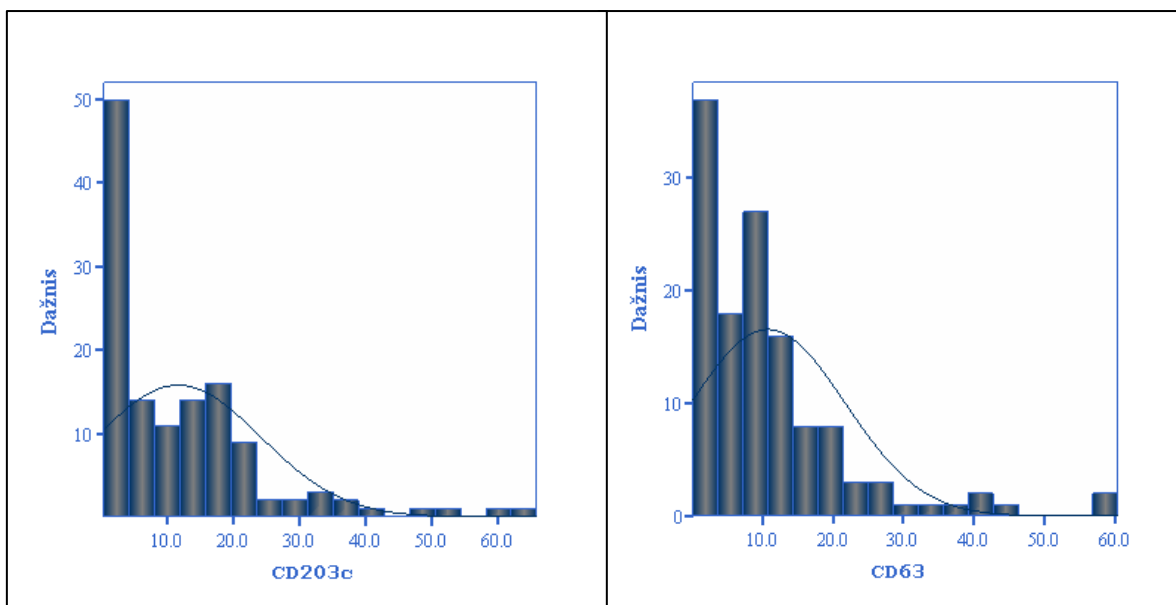
### 1 Priedas. Dilgēlinēs aktyvumo vertinimas [188]

Balai	Pūkšļu pobūdis	Niežulys
0	Nēra	Nēra
1	Lengvos eigos (<20 pūkšļu/24 val.)	Nedidelis
2	Vidutinio sunkumo (21–50 pūkšļu/ 24 val.)	Vidutinis
3	Intensyvus (>50 pūkšļu/ 24 val. ar didelēs susiliejānčios)	Stiprus

## **2 Priedas. Sergančiojo dilgėline klausimynas [188]**

1. Ligos pradžia.
2. Pūkšlių dažnis, trukmė.
3. Bėrimų pokytis per parą.
4. Pūkšlių forma, dydis, išsidėstymas.
5. Angioedema.
6. Subjektyvūs gretutiniai simptomai (niežėjimas, skausmas, kiti).
7. Šeiminė anamnezė: dilgėlinė, atopinės ligos.
8. Anksčiau persirgtos ar esamos ligos: alergija, infekcija, vidaus ligos, kitos.
9. Fizinio veiksnio ar krūvio įtaka.
10. Vartojami vaistai: NVNU, injekcijos, imunizacija, hormonai, vidurių  
laisvinamieji, žvakutės, lašai į akis, ausis, alternatyvūs.
11. Maisto įtaka, ypatybės.
12. Rūkymas.
13. Darbo pobūdis.
14. Hobis.
15. Ryšys su savaitgaliais, švenčių ar išvykų dienomis.
16. Chirurginiai implantantai.
17. Reakcija į vabzdžių įgėlimą.
18. Ryšys su menstruacijomis.
19. Atsakas į gydymą.
20. Stresas.
21. Dilgėlinės nulemti gyvenimo kokybės pokyčiai.

**3 Priedas.** CD203c ir CD63 tyrimų histogramos ir normaliojo skirstinio kreivės



**21 pav.** CD203c ir CD63 tyrimų histogramos ir normaliojo skirstinio kreivės

#### 4 Priedas. ROC kreivēs koordinātēs

CD63			CD203c		
Testas teigiamas jeigu ≥ uż	Jautrumas	1 –Specifiškumas	Testas teigiamas jeigu ≥ uż	Jautrumas	1 – Specifiškumas
-0,860	1,000	1,000	-0,420	1,000	1,000
0,170	0,977	1,000	0,860	1,000	0,988
0,300	0,977	0,988	1,170	1,000	0,976
0,435	0,977	0,976	1,215	1,000	0,965
0,515	0,977	0,965	1,235	1,000	0,953
0,650	0,977	0,953	1,245	1,000	0,941
0,765	0,977	0,941	1,275	0,977	0,941
0,795	0,977	0,929	1,320	0,953	0,929
0,835	0,977	0,918	1,370	0,930	0,929
0,875	0,977	0,906	1,415	0,930	0,906
0,885	0,977	0,894	1,440	0,930	0,882
0,975	0,977	0,882	1,470	0,907	0,882
1,065	0,977	0,871	1,495	0,884	0,882
1,085	0,977	0,859	1,510	0,814	0,871
1,165	0,953	0,859	1,525	0,814	0,859
1,240	0,930	0,859	1,540	0,814	0,847
1,275	0,930	0,847	1,575	0,814	0,835
1,400	0,930	0,824	1,605	0,814	0,824
1,565	0,930	0,812	1,630	0,791	0,824
1,765	0,930	0,800	1,675	0,791	0,812
1,925	0,930	0,788	1,705	0,721	0,788
2,045	0,907	0,788	1,720	0,721	0,776
2,220	0,907	0,776	1,765	0,721	0,765
2,400	0,884	0,776	1,850	0,721	0,753
2,600	0,884	0,765	1,950	0,674	0,753
2,800	0,884	0,753	2,035	0,674	0,741
2,950	0,884	0,741	2,135	0,674	0,729
3,050	0,884	0,729	2,300	0,674	0,706
3,150	0,860	0,729	2,450	0,674	0,671
3,215	0,837	0,718	2,550	0,674	0,659
3,270	0,837	0,706	2,665	0,674	0,635
3,455	0,837	0,694	2,815	0,674	0,624
3,700	0,814	0,659	3,150	0,674	0,612
3,850	0,814	0,647	3,730	0,674	0,588
3,925	0,814	0,635	4,380	0,651	0,588
3,985	0,814	0,624	4,750	0,651	0,576

CD63			CD203c		
Testas teigiamas jeigu $\geq$ už	Jautrumas	1 –Specifiškumas	Testas teigiamas jeigu $\geq$ už	Jautrumas	1 – Specifiškumas
4,260	0,791	0,624	5,050	0,651	0,565
4,510	0,791	0,612	5,600	0,651	0,553
4,560	0,791	0,600	6,000	0,628	0,553
5,050	0,791	0,588	6,200	0,628	0,529
5,650	0,767	0,588	6,400	0,605	0,529
5,880	0,744	0,576	6,650	0,605	0,518
5,985	0,744	0,565	7,000	0,605	0,506
6,120	0,744	0,553	7,300	0,581	0,506
6,315	0,744	0,541	7,550	0,581	0,494
6,500	0,744	0,529	7,750	0,558	0,494
6,625	0,744	0,506	7,930	0,558	0,482
6,775	0,744	0,494	8,180	0,558	0,471
7,200	0,744	0,482	8,450	0,558	0,459
7,550	0,744	0,471	8,650	0,558	0,447
7,675	0,744	0,435	8,950	0,558	0,435
7,775	0,721	0,435	9,550	0,558	0,424
7,850	0,721	0,412	10,200	0,558	0,400
7,960	0,698	0,412	10,550	0,558	0,388
8,060	0,698	0,400	10,650	0,558	0,376
8,150	0,698	0,388	10,950	0,558	0,365
8,300	0,698	0,376	11,450	0,535	0,365
8,500	0,698	0,365	11,900	0,512	0,365
8,645	0,674	0,353	12,200	0,488	0,365
8,695	0,674	0,341	12,450	0,488	0,353
8,750	0,674	0,329	13,000	0,488	0,341
8,850	0,674	0,318	13,600	0,488	0,329
<b>8,955</b>	<b>0,674</b>	<b>0,306</b>	13,850	0,442	0,329
9,080	0,651	0,306	14,000	0,442	0,318
9,275	0,628	0,306	14,250	0,419	0,318
9,450	0,628	0,294	14,550	0,419	0,306
9,650	0,605	0,294	14,950	0,419	0,294
9,850	0,581	0,271	15,250	0,395	0,294
10,250	0,558	0,271	15,800	0,372	0,271
10,750	0,558	0,259	16,400	0,349	0,259
10,950	0,535	0,247	16,600	0,326	0,259
11,200	0,512	0,247	16,800	0,326	0,247
11,500	0,512	0,235	17,050	0,302	0,235
11,700	0,465	0,235	17,350	0,302	0,224
11,900	0,442	0,235	17,550	0,302	0,212

CD63			CD203c		
Testas teigiamas jeigu $\geq$ už	Jautrumas	1 –Specifiškumas	Testas teigiamas jeigu $\geq$ už	Jautrumas	1 – Specifiškumas
12,100	0,442	0,224	17,800	0,279	0,200
12,300	0,442	0,212	18,150	0,256	0,200
12,450	0,442	0,200	18,550	0,256	0,176
12,850	0,442	0,188	18,850	0,233	0,176
13,250	0,442	0,176	19,000	0,233	0,165
13,600	0,419	0,176	19,500	0,233	0,153
14,000	0,395	0,176	20,000	0,233	0,141
14,200	0,395	0,165	20,150	0,209	0,129
14,450	0,395	0,153	20,450	0,186	0,129
14,650	0,395	0,141	20,750	0,186	0,118
15,050	0,372	0,141	21,000	0,186	0,094
15,750	0,349	0,129	22,200	0,163	0,094
16,200	0,326	0,129	24,550	0,140	0,094
16,350	0,302	0,129	26,350	0,140	0,082
16,900	0,302	0,118	27,975	0,116	0,082
17,750	0,302	0,106	29,925	0,116	0,071
18,200	0,302	0,094	31,300	0,093	0,071
18,500	0,302	0,082	32,750	0,093	0,059
18,900	0,302	0,071	33,650	0,093	0,047
19,400	0,279	0,071	34,830	0,070	0,047
20,150	0,279	0,059	37,280	0,070	0,035
20,850	0,279	0,047	38,900	0,070	0,024
21,150	0,256	0,047	44,150	0,070	0,012
21,850	0,256	0,035	51,550	0,047	0,012
22,800	0,233	0,035	56,350	0,023	0,012
23,900	0,209	0,035	62,250	0,023	0,000
25,150	0,186	0,035	66,800	0,000	0,000
26,750	0,186	0,024			
27,950	0,163	0,024			
29,150	0,163	0,012			
32,135	0,140	0,012			
35,935	0,116	0,012			
38,950	0,093	0,012			
40,350	0,070	0,012			
42,200	0,047	0,012			
51,650	0,023	0,012			
60,050	0,000	0,012			
61,500	0,000	0,000			

## 13 Literatūros sąrašas

1. Zuberbier T, Bindslev-Jensen C, Canonica W, Grattan CE, Greaves MW, Henz BM, et al. EAACI/GA2LEN/EDF guideline: definition, classification and diagnosis of urticaria. *Allergy*. 2006 Mar;61(3):316-20.
2. Bindslev-Lensen C, Finzi A, Greaves M, Camarasa J, Ortonne JP, Schopf E, et al. Chronic urticaria: diagnostic recommendations. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2000 May;14(3):175-80.
3. Greaves M. Chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Apr;105(4):664-72.
4. Nettis E, Pannofino A, D'Aprile C, Ferrannini A, Tursi A. Clinical and aetiological aspects in urticaria and angio-oedema. *Br J Dermatol*. 2003 Mar;148(3):501-6.
5. Grattan CE. Autoimmune urticaria. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2004 May;24(2):163-81, v.
6. Wai YC, Sussman GL. Evaluating chronic urticaria patients for allergies, infections, or autoimmune disorders. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2002 Oct;23(2):185-93.
7. Wedi B. Urticaria. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2008 Apr;6(4):306-17.
8. Powell RJ, Du Toit GL, Siddique N, Leech SC, Dixon TA, Clark AT, et al. BSACI guidelines for the management of chronic urticaria and angio-oedema. *Clin Exp Allergy*. 2007 May;37(5):631-50.
9. Kontou-Fili K. Clinical advantages of dual activity in urticaria. *Allergy*. 2000;55 Suppl 64:28-33.
10. Baiardini I, Giardini A, Pasquali M, Dignetti P, Guerra L, Specchia C, et al. Quality of life and patients' satisfaction in chronic urticaria and respiratory allergy. *Allergy*. 2003 Jul;58(7):621-3.
11. Grob JJ, Revuz J, Ortonne JP, Auquier P, Lorette G. Comparative study of the impact of chronic urticaria, psoriasis and atopic dermatitis on the quality of life. *Br J Dermatol*. 2005 Feb;152(2):289-95.
12. O'Donnell BF, Lawlor F, Simpson J, Morgan M, Greaves MW. The impact of chronic urticaria on the quality of life. *Br J Dermatol*. 1997 Feb;136(2):197-201.
13. Pasaoglu G, Bavbek S, Tugcu H, Abadoglu O, Misirligil Z. Psychological status of patients with chronic urticaria. *J Dermatol*. 2006 Nov;33(11):765-71.
14. Staubach P, Eckhardt-Henn A, Dechene M, Vonend A, Metz M, Magerl M, et al. Quality of life in patients with chronic urticaria is differentially impaired and determined by psychiatric comorbidity. *Br J Dermatol*. 2006 Feb;154(2):294-8.
15. Poon E, Seed PT, Greaves MW, Kobza-Black A. The extent and nature of disability in different urticarial conditions. *Br J Dermatol*. 1999 Apr;140(4):667-71.
16. Brodell LA, Beck LA, Saini SS. Pathophysiology of chronic urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008 Apr;100(4):291-7; quiz 7-9, 322.
17. Kaplan AP. Chronic urticaria: Pathogenesis and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:465-74.
18. Vonakis BM, Saini SS. Basophils and mast cells in chronic idiopathic urticaria. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2005 Jul;5(4):270-6.

19. Hennino A, Berard F, Guillot I, Saad N, Rozieres A, Nicolas JF. Pathophysiology of urticaria. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2006 Feb;30(1):3-11.
20. Ying S, Kikuchi Y, Meng Q, Kay AB, Kaplan AP. TH1/TH2 cytokines and inflammatory cells in skin biopsy specimens from patients with chronic idiopathic urticaria: comparison with the allergen-induced late-phase cutaneous reaction. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Apr;109(4):694-700.
21. Wedi B, Raap U, Kapp A. Chronic urticaria and infections. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004 Oct;4(5):387-96.
22. Zuberbier T. Urticaria. *Allergy*. 2003 Dec;58(12):1224-34.
23. Gaig P, Garcia-Ortega P, Enrique E, Papo M, Quer JC, Richard C. Efficacy of the eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic urticaria. A placebo-controlled double blind study. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2002 Sep-Oct;30(5):255-8.
24. Schnyder B, Helbling A, Pichler WJ. Chronic idiopathic urticaria: natural course and association with *Helicobacter pylori* infection. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999 May;119(1):60-3.
25. Wedi B, Kapp A. Evidence-based therapy of chronic urticaria. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2007 Feb;5(2):146-57.
26. Wedi B, Kapp A. *Helicobacter pylori* infection and skin diseases. *J Physiol Pharmacol*. 1999 Dec;50(5):753-76.
27. Wedi B, Kapp A. *Helicobacter pylori* infection in skin diseases: a critical appraisal. *Am J Clin Dermatol*. 2002;3(4):273-82.
28. Bakos N, Hillander M. Comparison of chronic autoimmune urticaria with chronic idiopathic urticaria. *Int J Dermatol*. 2003 Aug;42(8):613-5.
29. Juhlin L. Recurrent urticaria: clinical investigation of 330 patients. *Br J Dermatol*. 1981 Apr;104(4):369-81.
30. Khalaf AT, Li W, Jinqun T. Current advances in the management of urticaria. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008 Mar-Apr;56(2):103-14.
31. Zuberbier T, Chantraine-Hess S, Hartmann K, Czarnetzki BM. Pseudoallergen-free diet in the treatment of chronic urticaria. A prospective study. *Acta Derm Venereol*. 1995 Nov;75(6):484-7.
32. Zuberbier T, Henz BM, Fiebiger E, Maurer D, Stingl G. Anti-FcεpsilonRIα serum autoantibodies in different subtypes of urticaria. *Allergy*. 2000 Oct;55(10):951-4.
33. Sheikh J. Autoantibodies to the high-affinity IgE receptor in chronic urticaria: how important are they? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005 Oct;5(5):403-7.
34. Brunetti L, Francavilla R, Miniello VL, Platzer MH, Rizzi D, Lospalluti ML, et al. High prevalence of autoimmune urticaria in children with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Oct;114(4):922-7.
35. Du Toit G, Prescott R, Lawrence P, Johar A, Brown G, Weinberg EG, et al. Autoantibodies to the high-affinity IgE receptor in children with chronic urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006 Feb;96(2):341-4.
36. Greaves M. Autoimmune urticaria. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2002 Oct;23(2):171-83.
37. Irinyi B, Szeles G, Gyimesi E, Tumpek J, Heredi E, Dimitrios G, et al. Clinical and laboratory examinations in the subgroups of chronic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;144(3):217-25.



38. Sabroe RA, Seed PT, Francis DM, Barr RM, Black AK, Greaves MW. Chronic idiopathic urticaria: comparison of the clinical features of patients with and without anti-FcεRI or anti-IgE autoantibodies. *J Am Acad Dermatol.* 1999 Mar;40(3):443-50.
39. Caproni M, Giomi B, Melani L, Volpi W, Antiga E, Torchia D, et al. Cellular infiltrate and related cytokines, chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules in chronic autoimmune urticaria: comparison between spontaneous and autologous serum skin test induced wheal. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2006 Jul-Sep;19(3):507-15.
40. Caproni M, Giomi B, Volpi W, Melani L, Schincaglia E, Macchia D, et al. Chronic idiopathic urticaria: infiltrating cells and related cytokines in autologous serum-induced wheals. *Clin Immunol.* 2005 Mar;114(3):284-92.
41. Caproni M, Volpi W, Macchia D, Giomi B, Manfredi M, Campi P, et al. Infiltrating cells and related cytokines in lesional skin of patients with chronic idiopathic urticaria and positive autologous serum skin test. *Exp Dermatol.* 2003 Oct;12(5):621-8.
42. Sabroe RA, Poon E, Orchard GE, Lane D, Francis DM, Barr RM, et al. Cutaneous inflammatory cell infiltrate in chronic idiopathic urticaria: comparison of patients with and without anti-FcεRI or anti-IgE autoantibodies. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Mar;103(3 Pt 1):484-93.
43. Kern F, Lichtenstein LM. Defective histamine release in chronic urticaria. *J Clin Invest.* 1976 May;57(5):1369-77.
44. Sabroe RA, Francis DM, Barr RM, Black AK, Greaves MW. Anti-Fc(ε)RI auto antibodies and basophil histamine releasability in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 1998 Oct;102(4 Pt 1):651-8.
45. Sabroe RA, Greaves MW. Chronic idiopathic urticaria with functional autoantibodies: 12 years on. *Br J Dermatol.* 2006 May;154(5):813-9.
46. O'Donnell BF, O'Neill CM, Francis DM, Niimi N, Barr RM, Barlow RJ, et al. Human leucocyte antigen class II associations in chronic idiopathic urticaria. *Br J Dermatol.* 1999 May;140(5):853-8.
47. Fradin MS, Ellis CN, Goldfarb MT, Voorhees JJ. Oral cyclosporine for severe chronic idiopathic urticaria and angioedema. *J Am Acad Dermatol.* 1991 Dec;25(6 Pt 1):1065-7.
48. Grattan CE, O'Donnell BF, Francis DM, Niimi N, Barlow RJ, Seed PT, et al. Randomized double-blind study of cyclosporin in chronic 'idiopathic' urticaria. *Br J Dermatol.* 2000 Aug;143(2):365-72.
49. Toubi E, Blant A, Kessel A, Golan TD. Low-dose cyclosporin A in the treatment of severe chronic idiopathic urticaria. *Allergy.* 1997 Mar;52(3):312-6.
50. Vena GA, Cassano N, Colombo D, Peruzzi E, Pigatto P. Cyclosporine in chronic idiopathic urticaria: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Am Acad Dermatol.* 2006 Oct;55(4):705-9.
51. Asero R. Are IVIG for chronic unremitting urticaria effective? *Allergy.* 2000 Nov;55(11):1099-101.
52. O'Donnell BF, Barr RM, Black AK, Francis DM, Kermani F, Niimi N, et al. Intravenous immunoglobulin in autoimmune chronic urticaria. *Br J Dermatol.* 1998 Jan;138(1):101-6.
53. Godse K. Methotrexate in autoimmune urticaria. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2004 Nov-Dec;70(6):377.

54. Montero Mora P, Gonzalez Perez Mdel C, Almeida Arvizu V, Matta Campos JJ. Autoimmune urticaria. Treatment with methotrexate.. *Rev Alerg Mex.* 2004 Sep-Oct;51(5):167-72.
55. Grattan CE, Sabroe RA, Greaves MW. Chronic urticaria. *J Am Acad Dermatol.* 2002 May;46(5):645-57; quiz 57-60.
56. Kaplan AP, Joseph K, Maykut RJ, Geba GP, Zeldin RK. Treatment of chronic autoimmune urticaria with omalizumab. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Sep;122(3):569-73.
57. Sheikh J. Effect of omalizumab on patients with chronic urticaria: issues with the determination of autoimmune urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008 Jan;100(1):88; author reply -9.
58. Grattan CE, Francis DM, Slater NG, Barlow RJ, Greaves MW. Plasmapheresis for severe, unremitting, chronic urticaria. *Lancet.* 1992 May 2;339(8801):1078-80.
59. Bajaj AK, Saraswat A, Upadhyay A, Damisetty R, Dhar S. Autologous serum therapy in chronic urticaria: old wine in a new bottle. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2008 Mar-Apr;74(2):109-13.
60. Staubach P, Onnen K, Vonend A, Metz M, Siebenhaar F, Tschentscher I, et al. Autologous whole blood injections to patients with chronic urticaria and a positive autologous serum skin test: a placebo-controlled trial. *Dermatology.* 2006;212(2):150-9.
61. Zuberbier T, Bindslev-Jensen C, Canonica W, Grattan CE, Greaves MW, Henz BM, et al. EAACI/GA<sup>2</sup>LEN/EDF guideline: management of urticaria. *Allergy.* 2006 Mar;61(3):321-31.
62. T.Zuberbier CB-J, W.Canonica, C.E.H.Grattan, M.W.Greaves, B.M.Henz et al. . EAACI/ GA<sup>2</sup>LEN/EDF guideline: definition, classification and diagnosis of urticaria. . *Allergy.* 2006;61:316-20.
63. Ferrer M, Kinet JP, Kaplan AP. Comparative studies of functional and binding assays for IgG anti-Fc(epsilon)RIalpha (alpha-subunit) in chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 1998 May;101(5):672-6.
64. Sabroe RA, Fiebiger E, Francis DM, Maurer D, Seed PT, Grattan CE, et al. Classification of anti-FcepsilonRI and anti-IgE autoantibodies in chronic idiopathic urticaria and correlation with disease severity. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Sep;110(3):492-9.
65. Tong LJ, Balakrishnan G, Kochan JP, Kinet JP, Kaplan AP. Assessment of autoimmunity in patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 1997 Apr;99(4):461-5.
66. Fiebiger E, Hammerschmid F, Stingl G, Maurer D. Anti-FcepsilonRIalpha autoantibodies in autoimmune-mediated disorders. Identification of a structure-function relationship. *J Clin Invest.* 1998 Jan 1;101(1):243-51.
67. Asero R, Lorini M, Chong SU, Zuberbier T, Tedeschi A. Assessment of histamine-releasing activity of sera from patients with chronic urticaria showing positive autologous skin test on human basophils and mast cells. *Clin Exp Allergy.* 2004 Jul;34(7):1111-4.
68. Hyry H, Elg P, Ranki A. A commercial histamine release test and autologous serum skin test in the diagnosis of autoimmune urticaria. *Allergy.* 2006 Sep;61(9):1147-8.
69. Platzer MH, Grattan CE, Poulsen LK, Skov PS. Validation of basophil histamine release against the autologous serum skin test and outcome of serum-induced

- basophil histamine release studies in a large population of chronic urticaria patients. *Allergy*. 2005 Sep;60(9):1152-6.
70. De Swerd A, Van Den Keybus C, Kasran A, Cadot P, Neyens K, Coorevits L, et al. Detection of basophil-activating IgG autoantibodies in chronic idiopathic urticaria by induction of CD 63. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Sep;116(3):662-7.
  71. Frezzolini A, Provini A, Teofoli P, Pomponi D, De Pita O. Serum-induced basophil CD63 expression by means of a tricolour flow cytometric method for the in vitro diagnosis of chronic urticaria. *Allergy*. 2006 Sep;61(9):1071-7.
  72. Gyimesi E, Sipka S, Danko K, Kiss E, Hidvegi B, Gal M, et al. Basophil CD63 expression assay on highly sensitized atopic donor leucocytes-a useful method in chronic autoimmune urticaria. *Br J Dermatol*. 2004 Aug;151(2):388-96.
  73. Szegedi A, Irinyi B, Gal M, Hunyadi J, Danko K, Kiss E, et al. Significant correlation between the CD63 assay and the histamine release assay in chronic urticaria. *Br J Dermatol*. 2006 Jul;155(1):67-75.
  74. Wedi B, Novacovic V, Koerner M, Kapp A. Chronic urticaria serum induces histamine release, leukotriene production, and basophil CD63 surface expression--inhibitory effects of anti-inflammatory drugs. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Mar;105(3):552-60.
  75. Yasnowsky KM, Dreskin SC, Efaw B, Schoen D, Vedanthan PK, Alam R, et al. Chronic urticaria sera increase basophil CD203c expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Jun;117(6):1430-4.
  76. Leznoff A, Josse RG, Denburg J, Dolovich J. Association of chronic urticaria and angioedema with thyroid autoimmunity. *Arch Dermatol*. 1983 Aug;119(8):636-40.
  77. Grattan CE, Wallington TB, Warin RP, Kennedy CT, Bradfield JW. A serological mediator in chronic idiopathic urticaria--a clinical, immunological and histological evaluation. *Br J Dermatol*. 1986 May;114(5):583-90.
  78. Gruber BL, Baeza ML, Marchese MJ, Agnello V, Kaplan AP. Prevalence and functional role of anti-IgE autoantibodies in urticarial syndromes. *J Invest Dermatol*. 1988 Feb;90(2):213-7.
  79. Grattan CE, Francis DM, Hide M, Greaves MW. Detection of circulating histamine releasing autoantibodies with functional properties of anti-IgE in chronic urticaria. *Clin Exp Allergy*. 1991 Nov;21(6):695-704.
  80. Hide M, Francis DM, Grattan CE, Hakimi J, Kochan JP, Greaves MW. Autoantibodies against the high-affinity IgE receptor as a cause of histamine release in chronic urticaria. *N Engl J Med*. 1993 Jun 3;328(22):1599-604.
  81. Ferrer M, Nakazawa K, Kaplan AP. Complement dependence of histamine release in chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Jul;104(1):169-72.
  82. Kikuchi Y, Kaplan AP. Mechanisms of autoimmune activation of basophils in chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Jun;107(6):1056-62.
  83. Kikuchi Y, Kaplan AP. A role for C5a in augmenting IgG-dependent histamine release from basophils in chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Jan;109(1):114-8.
  84. Marone G, Spadaro G, Palumbo C, Condorelli G. The anti-IgE/anti-Fc epsilon RI alpha autoantibody network in allergic and autoimmune diseases. *Clin Exp Allergy*. 1999 Jan;29(1):17-27.
  85. Fiebiger E, Maurer D, Holub H, Reininger B, Hartmann G, Woisetschlager M, et al. Serum IgG autoantibodies directed against the alpha chain of Fc epsilon RI: a

- selective marker and pathogenetic factor for a distinct subset of chronic urticaria patients? *J Clin Invest*. 1995 Dec;96(6):2606-12.
86. Zweiman B, Valenzano M, Atkins PC, Tanus T, Getsy JA. Characteristics of histamine-releasing activity in the sera of patients with chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Jul;98(1):89-98.
  87. Soundararajan S, Kikuchi Y, Joseph K, Kaplan AP. Functional assessment of pathogenic IgG subclasses in chronic autoimmune urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Apr;115(4):815-21.
  88. Fureder W, Agis H, Willheim M, Bankl HC, Maier U, Kishi K, et al. Differential expression of complement receptors on human basophils and mast cells. Evidence for mast cell heterogeneity and CD88/C5aR expression on skin mast cells. *J Immunol*. 1995 Sep 15;155(6):3152-60.
  89. Greaves MW, Tan KT. Chronic urticaria: recent advances. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2007 Oct;33(1-2):134-43.
  90. Boguniewicz M. The autoimmune nature of chronic urticaria. *Allergy Asthma Proc*. 2008 Sep-Oct;29(5):433-8.
  91. Nawata Y, Koike T, Hosokawa H, Tomioka H, Yoshida S. Anti-IgE autoantibody in patients with atopic dermatitis. *J Immunol*. 1985 Jul;135(1):478-82.
  92. Quinti I, Brozek C, Wood N, Geha RS, Leung DY. Circulating IgG autoantibodies to IgE in atopic syndromes. *J Allergy Clin Immunol*. 1986 Apr;77(4):586-94.
  93. Twena DM, Marshall JS, Haeney MR, Bell EB. A survey of nonatopic and atopic children and adults for the presence of anti-IgE autoantibodies. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989 Oct;53(1):40-51.
  94. Bobrzynski T, Fux M, Vogel M, Stadler MB, Stadler BM, Miescher SM. A high-affinity natural autoantibody from human cord blood defines a physiologically relevant epitope on the FcepsilonRIalpha. *J Immunol*. 2005 Nov 15;175(10):6589-96.
  95. Horn MP, Pachlopnik JM, Vogel M, Dahinden M, Wurm F, Stadler BM, et al. Conditional autoimmunity mediated by human natural anti-Fc(epsilon)RIalpha autoantibodies? *Faseb J*. 2001 Oct;15(12):2268-74.
  96. Miescher SM, Horn MP, Pachlopnik JM, Baldi L, Vogel M, Stadler BM. Natural anti-FcepsilonRIalpha autoantibodies isolated from healthy donors and chronic idiopathic urticaria patients reveal a restricted repertoire and autoreactivity on human basophils. *Hum Antibodies*. 2001;10(3-4):119-26.
  97. Pachlopnik JM, Horn MP, Fux M, Dahinden M, Mandallaz M, Schneeberger D, et al. Natural anti-FcepsilonRIalpha autoantibodies may interfere with diagnostic tests for autoimmune urticaria. *J Autoimmun*. 2004 Feb;22(1):43-51.
  98. Horn MP, Gerster T, Ochensberger B, Derer T, Kricek F, Jouvin MH, et al. Human anti-FcepsilonRIalpha autoantibodies isolated from healthy donors cross-react with tetanus toxoid. *Eur J Immunol*. 1999 Apr;29(4):1139-48.
  99. Niimi N, Francis DM, Kermani F, O'Donnell BF, Hide M, Kobza-Black A, et al. Dermal mast cell activation by autoantibodies against the high affinity IgE receptor in chronic urticaria. *J Invest Dermatol*. 1996 May;106(5):1001-6.
  100. Asero R, Tedeschi A, Lorini M, Salimbeni R, Zanoletti T, Miadonna A. Chronic urticaria: novel clinical and serological aspects. *Clin Exp Allergy*. 2001 Jul;31(7):1105-10.

101. Grattan CE, Hamon CG, Cowan MA, Leeming RJ. Preliminary identification of a low molecular weight serological mediator in chronic idiopathic urticaria. *Br J Dermatol*. 1988 Aug;119(2):179-83.
102. Claveau J, Lavoie A, Brunet C, Bedard PM, Hebert J. Chronic idiopathic urticaria: possible contribution of histamine-releasing factor to pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. 1993 Jul;92(1 Pt 1):132-7.
103. MacDonald SM, Rafnar T, Langdon J, Lichtenstein LM. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science*. 1995 Aug 4;269(5224):688-90.
104. Vonakis BM, Sora R, Langdon JM, Casolaro V, MacDonald SM. Inhibition of cytokine gene transcription by the human recombinant histamine-releasing factor in human T lymphocytes. *J Immunol*. 2003 Oct 1;171(7):3742-50.
105. Confino-Cohen R, Aharoni D, Goldberg A, Gurevitch I, Buchs A, Weiss M, et al. Evidence for aberrant regulation of the p21Ras pathway in PBMCs of patients with chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Feb;109(2):349-56.
106. Toubi E, Adir-Shani A, Kessel A, Shmuel Z, Sabo E, Hacham H. Immune aberrations in B and T lymphocytes derived from chronic urticaria patients. *J Clin Immunol*. 2000 Sep;20(5):371-8.
107. Asero R, Tedeschi A, Riboldi P, Cugno M. Plasma of patients with chronic urticaria shows signs of thrombin generation, and its intradermal injection causes wheal-and-flare reactions much more frequently than autologous serum. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 May;117(5):1113-7.
108. Asero R, Tedeschi A, Riboldi P, Griffini S, Bonanni E, Cugno M. Severe chronic urticaria is associated with elevated plasma levels of D-dimer. *Allergy*. 2008 Feb;63(2):176-80.
109. Asero R, Riboldi P, Tedeschi A, Cugno M, Meroni P. Chronic urticaria: a disease at a crossroad between autoimmunity and coagulation. *Autoimmun Rev*. 2007 Nov;7(1):71-6.
110. Rorsman H. Basopenia in urticaria. *Acta Allergol*. 1961;16:185-215.
111. Grattan CE, Walpole D, Francis DM, Niimi N, Dootson G, Edler S, et al. Flow cytometric analysis of basophil numbers in chronic urticaria: basopenia is related to serum histamine releasing activity. *Clin Exp Allergy*. 1997 Dec;27(12):1417-24.
112. Vonakis BM, Saini SS. New concepts in chronic urticaria. *Curr Opin Immunol*. 2008 Oct 16.
113. Eckman JA, Hamilton RG, Gober LM, Sterba PM, Saini SS. Basophil phenotypes in chronic idiopathic urticaria in relation to disease activity and autoantibodies. *J Invest Dermatol*. 2008 Aug;128(8):1956-63.
114. Grattan CE, Dawn G, Gibbs S, Francis DM. Blood basophil numbers in chronic ordinary urticaria and healthy controls: diurnal variation, influence of loratadine and prednisolone and relationship to disease activity. *Clin Exp Allergy*. 2003 Mar;33(3):337-41.
115. Luquin E, Kaplan AP, Ferrer M. Increased responsiveness of basophils of patients with chronic urticaria to sera but hypo-responsiveness to other stimuli. *Clin Exp Allergy*. 2005 Apr;35(4):456-60.
116. Lourenco FD, Azor MH, Santos JC, Prearo E, Maruta CW, Rivitti EA, et al. Activated status of basophils in chronic urticaria leads to interleukin-3 hyper-

- responsiveness and enhancement of histamine release induced by anti-IgE stimulus. *Br J Dermatol.* 2008 May;158(5):979-86.
117. Vasagar K, Vonakis BM, Gober LM, Viksman A, Gibbons SP, Jr., Saini SS. Evidence of in vivo basophil activation in chronic idiopathic urticaria. *Clin Exp Allergy.* 2006 Jun;36(6):770-6.
  118. Smith CH, Kepley C, Schwartz LB, Lee TH. Mast cell number and phenotype in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 1995 Sep;96(3):360-4.
  119. Cohen RW, Rosenstreich DL. Discrimination between urticaria-prone and other allergic patients by intradermal skin testing with codeine. *J Allergy Clin Immunol.* 1986 Jun;77(6):802-7.
  120. Jacques P, Lavoie A, Bedard PM, Brunet C, Hebert J. Chronic idiopathic urticaria: profiles of skin mast cell histamine release during active disease and remission. *J Allergy Clin Immunol.* 1992 Jun;89(6):1139-43.
  121. Zuberbier T, Schwarz S, Hartmann K, Pfrommer C, Czarnetzki BM. Histamine releasability of basophils and skin mast cells in chronic urticaria. *Allergy.* 1996 Jan;51(1):24-8.
  122. Monge C, Demarco P, Burman KD, Wartofsky L. Autoimmune thyroid disease and chronic urticaria. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007 Sep;67(3):473-5.
  123. Leznoff A, Sussman GL. Syndrome of idiopathic chronic urticaria and angioedema with thyroid autoimmunity: a study of 90 patients. *J Allergy Clin Immunol.* 1989 Jul;84(1):66-71.
  124. Muhlemann MF, Macrae KD, Smith AM, Beck P, Hine I, Hegde U, et al. Hereditary angioedema and thyroid autoimmunity. *J Clin Pathol.* 1987 May;40(5):518-23.
  125. O'Donnell BF, Francis DM, Swana GT, Seed PT, Kobza Black A, Greaves MW. Thyroid autoimmunity in chronic urticaria. *Br J Dermatol.* 2005 Aug;153(2):331-5.
  126. Palma-Carlos AG, Palma-Carlos ML. Chronic urticaria and thyroid autoimmunity. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2005 Apr;37(4):143-6.
  127. Verneuil L, Leconte C, Ballet JJ, Coffin C, Laroche D, Izard JP, et al. Association between chronic urticaria and thyroid autoimmunity: a prospective study involving 99 patients. *Dermatology.* 2004;208(2):98-103.
  128. Zauli D, Deleonardi G, Foderaro S, Grassi A, Bortolotti R, Ballardini G, et al. Thyroid autoimmunity in chronic urticaria. *Allergy Asthma Proc.* 2001 Mar-Apr;22(2):93-5.
  129. Fusari A, Colangelo C, Bonifazi F, Antonicelli L. The autologous serum skin test in the follow-up of patients with chronic urticaria. *Allergy.* 2005 Feb;60(2):256-8.
  130. Dreskin SC, Andrews KY. The thyroid and urticaria. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005 Oct;5(5):408-12.
  131. Rottem M. Chronic urticaria and autoimmune thyroid disease: is there a link? *Autoimmun Rev.* 2003 Mar;2(2):69-72.
  132. Rumbyrt JS, Katz JL, Schocket AL. Resolution of chronic urticaria in patients with thyroid autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol.* 1995 Dec;96(6 Pt 1):901-5.
  133. Kaplan AP. Clinical practice. Chronic urticaria and angioedema. *N Engl J Med.* 2002 Jan 17;346(3):175-9.
  134. Aversano M, Caiazzo P, Iorio G, Ponticello L, Lagana B, Leccese F. Improvement of chronic idiopathic urticaria with L-thyroxine: a new TSH role in immune response? *Allergy.* 2005 Apr;60(4):489-93.

135. Gaig P, Garcia-Ortega P, Enrique E, Richart C. Successful treatment of chronic idiopathic urticaria associated with thyroid autoimmunity. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2000 Nov-Dec;10(6):342-5.
136. Asero R, Orsatti A, Tedeschi A, Lorini M. Autoimmune chronic urticaria associated with type 1 diabetes and Graves' disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 May;115(5):1088-9.
137. Gallo C, Vighi G, Schroeder J, Strozzi M, Scibilia J, Colafrancesco M, et al. Chronic urticaria atopic dermatitis and celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 1992 Nov;87(11):1684.
138. Hautekeete ML, DeClerck LS, Stevens WJ. Chronic urticaria associated with coeliac disease. *Lancet*. 1987 Jan 17;1(8525):157.
139. Peltz S, Barchuk W, Oppenheimer J, Druce H, Bielory L. Chronic angio-oedema of the tongue associated with pernicious anaemia and Hashimoto's thyroiditis. *Clin Exp Dermatol*. 1995 Jul;20(4):351-2.
140. Hachulla E. Systemic urticarias.. *Ann Dermatol Venereol*. 2003 May;130 Spec No 1:1S53-68.
141. O'Loughlin S, Schroeter AL, Jordon RE. Chronic urticaria-like lesions in systemic lupus erythematosus. A review of 12 cases. *Arch Dermatol*. 1978 Jun;114(6):879-83.
142. Yell JA, Mbuagbaw J, Burge SM. Cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. *Br J Dermatol*. 1996 Sep;135(3):355-62.
143. Berg RE, Kantor GR, Bergfeld WF. Urticarial vasculitis. *Int J Dermatol*. 1988 Sep;27(7):468-72.
144. Greaves MW. Chronic urticaria. *N Engl J Med*. 1995 Jun 29;332(26):1767-72.
145. Mehregan DR, Hall MJ, Gibson LE. Urticarial vasculitis: a histopathologic and clinical review of 72 cases. *J Am Acad Dermatol*. 1992 Mar;26(3 Pt 2):441-8.
146. Napoli DC, Freeman TM. Autoimmunity in chronic urticaria and urticarial vasculitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2001 Jul;1(4):329-36.
147. Bisaccia E, Adamo V, Rozan SW. Urticarial vasculitis progressing to systemic lupus erythematosus. *Arch Dermatol*. 1988 Jul;124(7):1088-90.
148. Alexander EL, Provost TT. Cutaneous manifestations of primary Sjogren's syndrome: a reflection of vasculitis and association with anti-Ro(SSA) antibodies. *J Invest Dermatol*. 1983 May;80(5):386-91.
149. Dalal I, Levine A, Somekh E, Mizrahi A, Hanukoglu A. Chronic urticaria in children: expanding the "autoimmune kaleidoscope". *Pediatrics*. 2000 Nov;106(5):1139-41.
150. Levy Y, Segal N, Weintrob N, Danon YL. Chronic urticaria: association with thyroid autoimmunity. *Arch Dis Child*. 2003 Jun;88(6):517-9.
151. Asero R, Tedeschi A, Lorini M. Autoreactivity is highly prevalent in patients with multiple intolerances to NSAIDs. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2002 May;88(5):468-72.
152. Namazy JA, Simon RA. Sensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2002 Dec;89(6):542-50; quiz 50, 605.
153. Moore-Robinson M, Warin RP. Effect of salicylates in urticaria. *Br Med J*. 1967 Nov 4;4(5574):262-4.
154. Asero R. Predictive value of autologous plasma skin test for multiple nonsteroidal anti-inflammatory drug intolerance. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;144(3):226-30.

155. Erbagci Z. Multiple NSAID intolerance in chronic idiopathic urticaria is correlated with delayed, pronounced and prolonged autoreactivity. *J Dermatol.* 2004 May;31(5):376-82.
156. Asero R. Intolerance to nonsteroidal anti-inflammatory drugs might precede by years the onset of chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 May;111(5):1095-8.
157. Sabroe RA, Grattan CE, Francis DM, Barr RM, Kobza Black A, Greaves MW. The autologous serum skin test: a screening test for autoantibodies in chronic idiopathic urticaria. *Br J Dermatol.* 1999 Mar;140(3):446-52.
158. Caproni M, Volpi W, Giomi B, Cardinali C, Antiga E, Melani L, et al. Chronic idiopathic and chronic autoimmune urticaria: clinical and immunopathological features of 68 subjects. *Acta Derm Venereol.* 2004;84(4):288-90.
159. George M, Balachandran C, Prabhu S. Chronic idiopathic urticaria: comparison of clinical features with positive autologous serum skin test. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology.* 2008 Mar-Apr;74(2):105-8.
160. Toubi E, Kessel A, Avshovich N, Bamberger E, Sabo E, Nusem D, et al. Clinical and laboratory parameters in predicting chronic urticaria duration: a prospective study of 139 patients. *Allergy.* 2004 Aug;59(8):869-73.
161. Asero R, Tedeschi A, Lorini M, Caldironi G, Barocci F. Sera from patients with multiple drug allergy syndrome contain circulating histamine-releasing factors. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003 Jul;131(3):195-200.
162. Fagiolo U, Cancian M, Bertollo L, Peserico A, Amadori A. Inhibitory effect of heparin on skin reactivity to autologous serum in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Jun;103(6):1143-7.
163. Comi AL, Tedeschi A, Lorini M, Miadonna A. Novel clinical and serological aspects in non-allergic asthma. *Respir Med.* 2007 Dec;101(12):2526-33.
164. Guttman-Yassky E, Bergman R, Maor C, Mamorsky M, Pollack S, Shahar E. The autologous serum skin test in a cohort of chronic idiopathic urticaria patients compared to respiratory allergy patients and healthy individuals. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007 Jan;21(1):35-9.
165. Jang AS, Park JS, Lee JH, Park SW, Kim DJ, Park CS. Autologous serum skin test for autoantibodies is associated with airway hyperresponsiveness in patients with asthma. *Respiration.* 2007;74(3):293-6.
166. Mari A. Allergy-like asthma and rhinitis. A cross-sectional survey of a respiratory cohort and a diagnostic approach using the autologous serum skin test. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004 Jan;133(1):29-39.
167. Tedeschi A, Comi AL, Lorini M, Tosini C, Miadonna A. Autologous serum skin test reactivity in patients with non-allergic asthma. *Clin Exp Allergy.* 2005 Jul;35(7):849-53.
168. Asero R, Tedeschi A, Riboldi P, Griffini S, Bonanni E, Cugno M. Coagulation cascade and fibrinolysis in patients with multiple-drug allergy syndrome. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008 Jan;100(1):44-8.
169. Marsland AM, Soundararajan S, Joseph K, Kaplan AP. Effects of calcineurin inhibitors on an in vitro assay for chronic urticaria. *Clin Exp Allergy.* 2005 May;35(5):554-9.
170. Ferrer M, Luquin E, Kaplan AP. IL3 effect on basophils histamine release upon stimulation with chronic urticaria sera. *Allergy.* 2003 Aug;58(8):802-7.



171. Sainte-Laudy J, Vallon C, Guerin JC. Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis.. *Allerg Immunol (Paris)*. 1994 Jun;26(6):211-4.
172. Sainte-Laudy J, Vallon C, Guerin JC. Diagnosis of latex allergy: comparison of histamine release and flow cytometric analysis of basophil activation. *Inflamm Res*. 1996 Mar;45 Suppl 1:S35-6.
173. Sabbah A, Drouet M, Sainte-Laudry J, Lauret MG, Loiry M. Contribution of flow cytometry to allergologic diagnosis.. *Allerg Immunol (Paris)*. 1997 Jan;29(1):15-21.
174. Sabbah A, Plassais R, Grenapin S, Drouet M, Lauret MG, Loiry M, et al. Testing basophil activation by flow cytometry in the diagnosis of allergy to hymenopteran venom.. *Allerg Immunol (Paris)*. 1998 Feb;30(2):44-8.
175. Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, et al. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy*. 2006 Sep;61(9):1028-39.
176. Goding JW, Grobden B, Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta*. 2003 May 20;1638(1):1-19.
177. Kepley CL, Youssef L, Andrews RP, Wilson BS, Oliver JM. Multiple defects in Fc epsilon RI signaling in Syk-deficient nonreleaser basophils and IL-3-induced recovery of Syk expression and secretion. *J Immunol*. 2000 Nov 15;165(10):5913-20.
178. de Leon MP, Drew AC, Glaspole IN, Suphioglu C, Rolland JM, O'Hehir RE. Functional analysis of cross-reactive immunoglobulin E antibodies: peanut-specific immunoglobulin E sensitizes basophils to tree nut allergens. *Clin Exp Allergy*. 2005 Aug;35(8):1056-64.
179. Moneret-Vautrin DA, Sainte-Laudy J, Kanny G, Fremont S. Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1999 Jan;82(1):33-40.
180. Triggiani M, Marone G. Basophil's secrets revealed by flow cytometry. *Allergy*. 2006 Sep;61(9):1025-7.
181. Boumiza R, Monneret G, Forissier MF, Savoye J, Gutowski MC, Powell WS, et al. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63. *Clin Exp Allergy*. 2003 Feb;33(2):259-65.
182. Eberlein-Konig B, Varga R, Mempel M, Darsow U, Behrendt H, Ring J. Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy. *Allergy*. 2006 Sep;61(9):1084-5.
183. Sudheer PS, Hall JE, Read GF, Rowbottom AW, Williams PE. Flow cytometric investigation of peri-anaesthetic anaphylaxis using CD63 and CD203c. *Anaesthesia*. 2005 Mar;60(3):251-6.
184. Maria L.Sanz PMG, A.L.De Weck. In vitro tests: basophil activation tests. Pichler WJ (ed): *drug Hypersensitivity* Bazel, Karger. 2007: 391-402.
185. Nettis E, Dambra P, D'Oronzio L, Cavallo E, Loria MP, Fanelli M, et al. Reactivity to autologous serum skin test and clinical features in chronic idiopathic urticaria. *Clin Exp Dermatol*. 2002 Jan;27(1):29-31.
186. Buss YA, Garrelfs UC, Sticherling M. Chronic urticaria--which clinical parameters are pathogenetically relevant? A retrospective investigation of 339 patients. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2007 Jan;5(1):22-9.

187. Silves MR, Coelho KI, Dalben I, Lastoria JC, Abbade LP. Sociodemographic and clinical characteristics, causal factors and evolution of a group of patients with chronic urticaria-angioedema. Sao Paulo Med J. 2007 Sep 6;125(5):281-5.
188. Šitkauskienė B, Dubakienė, R, Staikūnienė, J, Emužytė, R, Marčiukaitienė, I, Valiukevičienė S, Sakalauskas, R. Dilgėlinės diagnostika ir gydymas. Metodinės rekomendacijos. 2006.

## 14 Spausdinti darbai

1. Chomičienė A, Blažienė A, Kowalski ML. Imunologiniai lėtinės dilgėlinės mechanizmai. *Medicinos teorija ir praktika* 2007; 13 (2): 143–6.
2. Chomičienė A, Blažienė A. Lėtinė dilgėlinė ir autoimunizacijos rodikliai. *Medicinos teorija ir praktika* 2008; 14 (4): 322–7.
3. Chomičienė A, Jurgauskienė L, Blažienė A. Bazofilų CD63 ekspresijos tyrimas diagnozuojant lėtinę autoimuninę dilgėlinę. *Laboratorinė medicina* 2008; 10 (4): 212–7.
4. Chomičienė A, Jurgauskienė L, Blažienė A. Lėtinė dilgėlinė ir skydliaukės autoimuniniai žymenys. *Medicina* (priimta spaudai).