

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

PROFILUL CITOKINIC ÎN URTICARIA CRONICĂ ÎNAINTE ȘI DUPĂ TRATAMENT

Doctorand **IOANA-GABRIELA CRIȘAN**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. VICTOR CRISTEA**



Cuvinte cheie: urticaria cronică, factori etiologici, citokine, tratament, calitatea vieții

CUPRINS

INTRODUCERE	13
	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Urticaria cronică	17
1.1. Aspecte clinice	19
1.2. Clasificare	18
2. Etiologia urticariei cronice	19
2.1. Predispoziția genetică	19
2.2. Infecțiile	19
2.2.1. Virusurile	20
2.2.2. Bacteriile	20
2.2.3. Paraziții	20
2.2.4. Fungii	20
2.3. Medicamentele	21
2.4. Alimentele și aditivii alimentari	21
2.5. Terenul atopic	22
2.6. Bolile autoimune	22
2.6.1. Afecțiunile tiroidiene	22
2.7. Urticaria cronică autoimună	23
2.7.1. Evidențe care atestă existența autoanticorpilor în urticaria cronică spontană	23
2.7.2. Criterii de diagnosticarea a urticariei cronice autoimune	24
2.8. Factorii neurologici	24
2.9. Neoplaziile	24
3. Patogenia urticariei cronice	25
3.1. Rolul complementului în degranularea mastocitelor și bazofilelor	26
3.2. Aspectul histopatologic în urticaria cronică	26
4. Celule și mediatorii	27
4.1. Celulele și urticaria cronică	27
4.1.1. Structura pielii	27
4.1.2. Limfocitele	27
4.1.2.1. Limfocitele T	27
4.1.2.2. Limfocitele B	28
4.1.3. Mastocitele	28
4.1.3.1. Receptorii FcεRI	29
4.1.4. Bazofilele	30
4.1.5. Eozinofilele	30
4.1.6. Celulele endoteliale	31
4.1.7. Celulele dendritice	31
4.2. Citokinele	32
4.2.1. Citokine proinflamatorii	33

4.2.1.1. Interleukina 1 β	33
4.2.1.2. TNF- α	35
4.2.1.3. Interleukina 2	35
4.2.1.4. Interleukina 4	36
4.2.1.5. Interleukina 6	36
4.2.1.6. Interferonul γ	37
4.2.2. Citokine antiinflamatorii	37
4.2.2.1. Interleukina 10	37
4.2.3. Alte citokine recent caracterizate	38
4.2.3.1. Interleukina 17	38
4.2.3.2. Interleukina 31	38
5. Tratamentul urticariei cronice	39
5.1. Antihistaminicele H1	39
5.2. Antagoniștii de leukotriene în urticaria cronică	40
5.3. Antihistaminicele H2 în urticaria cronică	40
5.4. Imunosupresive și antiinflamatorii în urticaria cronică	40
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	41
1. Ipoteza de lucru/obiective	43
2. Metodologie generală	45
3. Studiul 1 - Caracterizarea pacienților cu urticarie cronică	51
3.1. Introducere	51
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	51
3.3. Material și metodă	51
3.4. Rezultate	52
3.4.1. Date demografice	52
3.4.2. Durata și severitatea bolii	56
3.4.3. Ponderea urticariei autoimune	58
3.4.4. Evoluția bolii	59
3.5. Discuții	60
3.6. Concluzii	64
4. Studiul 2 - Profilul citokinic în urticaria cronică	65
4.1. Introducere	65
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	65
4.3. Material și metodă	65
4.4. Rezultate	66
4.4.1. Date demografice	66
4.4.2. Prezența afecțiunilor imunologice	68
4.4.3. Prezența diverselor infecții	71
4.4.4. Nivelul diferitelor citokine serice	73
4.4.5. Identificarea variabilelor cu influență independentă asupra citokinelor	78
4.5. Discuții	81
4.6. Concluzii	84
5. Studiul 3 - Variațiile profilului citokinic în urticaria cronică sub tratament	85
5.1. Introducere	85

5.2. Ipoteza de lucru/obiective	85
5.3. Material și metodă	85
5.4. Rezultate	86
5.4.1. Variațiile citokinelor sub tratament în urticaria cronică	86
5.4.2. Date comparative între loturile de pacienți cu desloratadină, respectiv levocetirizină	90
5.5. Discuții	97
5.6. Concluzii	101
6. Studiul 4 - Corelații între nivelul calității vieții și citokine la pacienții cu urticarie cronică	103
6.1. Introducere	103
6.2. Ipoteza de lucru/obiective	103
6.3. Material și metodă	103
6.4. Rezultate	105
6.5. Discuții	113
6.6. Concluzii	116
7. Discuții generale	117
8. Concluzii generale	119
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	121
REFERINȚE	123

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Urticaria cronică (UC) este o boală frecvent întâlnită, care influențează substanțial calitatea vieții pacienților afectați, la un nivel comparabil cu cel al pacienților suferinzi de boli coronariene¹.

Sub diagnosticul de urticarie, se întâlnesc un grup heterogen de boli apărute ca rezultat al unei mari varietăți de cauze². Toate tipurile și subtipurile au în comun un pattern distinctiv al reacției cutanate manifestată prin leziunile urticariene și/sau angioedem.

Până la 20% din populație sau chiar mai mult experimentează cel puțin un episod de urticarie și/sau angioedem de-a lungul vieții^{3,4}.

Definiția tradițională a urticariei cronice este prezența leziunilor urticariene care sunt recurente, tranzitorii, pruriginoase și eritematoase, ce apar de cel puțin 6 săptămâni.

Se estimează că circa 3% din populația Europei de Vest suferă de urticarie cronică iar în Statele Unite e raportată la circa 1% din populația generală. Într-un studiu realizat în România în 1995⁴ prevalența urticariei cronice era apreciată de 1,9%. Pentru România nu există date mai recente privind prevalența UC.

În contrast cu simptomele simple și stabilirea ușoară a diagnosticului, factorii etiologici sunt deseori greu de stabilit. Deși e percepută de populație ca fiind o boală alergică, aceasta etiologie este rar întâlnită în urticaria cronică. Numărul posibililor agenți etiologici este mare, însă prezența lor la pacienții cu UC nu certifică întotdeauna etiologia acesteia, putând fi și simple coincidențe. Dintre factorii etiologici, o pondere mare o au sinteza anticorpilor anti Fc^εR1α și/sau anti IgE pe suport IgG, care generează urticaria cronică autoimună, formă ce reprezintă un procent de 35-50% din urticaria cronică la adulți.

Deși nu s-a putut confirma un mecanism patogenetic unic pentru toate formele de urticarie, se consideră că mastocitul este celula centrală în patogeniza acestei boli. Manifestările urticariei pot fi produse prin mecanisme imunologice implicând toate cele patru tipuri de reacții de hipersensibilitate sau non-imunologie. Toate aceste mecanisme de producere duc la generarea diversilor mediatori vasoactivi, dintre care cel mai cunoscut este histamina.

Implicarea diverselor citokine în producerea urticariei cronice a fost și este studiată cu interes. Dintre terapiile anti-citokinice au fost încercate cu un succes relativ terapia anti TNF-α, eficientă la 60% dintre pacienții cu UC spontană care nu au răspuns anterior la terapia anti-H1⁵ și anti IL-1 în UC asociată sindroamelor autoinflamatorii.

Tratamentul de primă intenție al UC este reprezentat de antihistaminicele H1 nesedative, care și-au dovedit eficiența în numeroase studii clinice dublu orb controlate placebo. Dacă e necesar, doza acestora poate fi crescută de patru ori. Ca și tratamente adiționale și alternative, necesare fiecărui subtip de urticarie, sunt utilizate: antihistaminice H2, modificatorii de leucotriene, corticoterapia, ciclosporina și alte medicamente imunosupresive. Dintre tratamentele biologice Omalizumabul are eficiența dovedită în UC.

Durata de evoluție a bolii este variată. UC se poate rezolva spontan în primii cinci ani, în procent de 30-55%, dar în alte cazuri poate persista și o perioadă mai îndelungată.

Influența profundă asupra calității vieții, durata relativ lungă de evoluție și răspunsul diferit la tratament, alături de lipsa datelor actuale despre urticaria cronică în România sunt motivele pentru care am ales să studiez această afecțiune.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Metodologie generală

În acest studiu au fost incluși 162 de pacienți cu urticarie cronică. Pacienții s-au prezentat inițial în ambulatoriul Spitalului Clinic Municipal în perioada octombrie 2007- septembrie 2009. Ei au fost urmăriți, în cadrul studiului, pentru o perioadă de 5 ani.

Au fost incluși în studiu pacienți cu vârsta de peste 18 ani, care au avut manifestări zilnice de urticarie cu sau fără angioedem, timp de minim 6 săptămâni. Incluziunea în studiu s-a făcut după semnarea consimțământului informat. Protocolul de studiu a fost aprobat de către Comisia de Etică a UMF "Iuliu Hațieganu", Cluj Napoca.

Pacienții au fost evaluați prin anamneză și examen obiectiv pentru a evidenția prezența și severitatea urticariei cronice. Pe baza anamnezei s-au obținut și date referitoare la durata bolii, prezența angioedemului, boli asociate, posibili triggeri și traseul pacientului cu urticarie cronică.

De asemenea pacienților li s-a aplicat chestionarul pentru determinarea activității bolii - *urticarial activity score (UAS)*, recomandat de *EAACI/GAZLEN/WAO* Guidelines. Chestionarul cuprinde câte 4 alternative de răspuns în ceea ce privește intensitatea pruritului și numărul leziunilor urticariene în 24 de ore. Scorul obținut variază între 0 și 6. Acesta a fost completat în ziua consultației dar și pentru ultimele 7 zile anterioare acesteia (*UAS7*). Acest chestionar a fost completat și la 3 luni după inițierea tratamentului pentru unii pacienți.

Tuturor pacienților cu UC le-a fost efectuată testarea cutanată la ser autolog, utilizând ca martor negativ serul fiziologic, iar ca și martor pozitiv histamina.

Pacienților fără tratament antihistaminic anterior, precum și unui lot martor, le-a fost recoltată o cantitate de 5 ml de sânge pentru determinarea citokinelor studiate: IL-1B, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 (dozate pe plăci multiplex folosind Luminex Performance Human Cytokine Panel A) și TNF- α , IFN- γ , IL-17 și IL-31 (lucrate prin metoda ELISA). De asemenea acestor pacienți li s-a aplicat o baterie de teste standard în vederea evaluării etiologiei urticariei cronice: hemoleucograma, CRP, ASLO, ANA, ac. Anti TPO, ac. Anti-tireoglobulină, TSH, FT4, ac anti *Helicobacter pilory*, ag. HBS, ac. Anti VHC, secreție faringeană, examen sumar de urină, 3 examene coproparazitologice.

Toți acești pacienți au fost urmăriți periodic sub tratament iar la 3 luni după inițierea tratamentului s-a repetat dozarea citokinelor studiate.

La momentul consultului inițial precum și la 3 luni de la inițierea tratamentului, pacienții cărora li s-a recoltat sânge pentru dozarea citokinelor au completat chestionarul pentru evaluarea calității vieții.

Pentru analiza statistică s-a utilizat programul SPSS 20. Datele cantitative au fost testate pentru normalitatea distribuției cu testul Kolmogorov-Smirnov. Variabilele continue cu distribuție normală au fost caracterizate prin medie \pm DS, iar cele cu distribuție non-normală au fost descrise prin mediană iar între paranteze percentilele 25% și 75%. Diferențele unei variabile cantitative între două grupuri au fost evaluate cu ajutorul unui test T pentru variabile independente sau Mann-Whitney. Diferențele procentuale ale unei variabile nominale între două grupuri au fost testate cu testul hi-pătrat (χ^2) sau Fisher, în funcție de situație. Corelația dintre doua variabile cantitative a fost verificată cu coeficientul Spearman's rho. Am considerat pragul de semnificație statistică la valoarea lui $p < 0,05$.

Studiu 1. Caracterizarea pacienților cu urticarie cronică

În primul studiu din această teză de doctorat am evaluat pacienții cu UC din zona noastră geografică atât în ceea ce privește datele demografice cât și severitatea și durata bolii, ponderea urticariei autoimune, factori agravanți, boli asociate și evoluția sub tratament.

Din rezultatele obținute se constată predominanța netă a urticariei la persoanele de sex feminin. Decadele de vârstă mai afectate sunt 3,4 și 5 ani, cu limite foarte largi, între 18 și 72 de ani. Studiile anterioare arată că urticaria cronică tinde să fie mai des întâlnită la indivizii de vârstă mijlocie, între decadele trei și șase de vârstă, atingând prevalența maximă în cursul decadei a patra, în special la femei, care sunt de două ori mai frecvent afectate de UC decât bărbații^{6,7,8}. Astfel putem spune că și în zona noastră geografică UC este o boală a adultului de vârstă medie, cu predominanță la femei.

Studiul nostru arată că UC predomină la pacienții din mediul urban. Datele din literatură nu relevă diferențe ale prevalenței UC în funcție de nivelul educației, venit, mediul de proveniență sau etnie⁹. Rezultatele obținute de studiul nostru pot fi afectate și de accesul mai greu la medicul specialist alergolog al pacienților din mediul rural, ținând cont de faptul că studiul a fost efectuat în municipiul Cluj-Napoca. Faptul că severitatea este mai mare la pacienții din mediul rural față de cei din mediul urban, duce la ipoteza că acești pacienți se adresează serviciilor de specialitate doar în momentul în care simptomele sunt foarte greu de suportat, fiind mult amânat consultul alergologic.

În studiul nostru angioedemul asociat, e prezent la puțin peste jumătate dintre pacienții urmăriți.

Testarea la ser autolog a fost pozitivă pentru 57,4% dintre pacienți, cu predominanța sa la femei, care știm că sunt mai predispuse spre autoimunitate. Acești pacienți au fost considerați ca având urticarie cronică autoimună (UCA), situație în care, autoanticorpii IgG joacă un rol important, interacționând în principal cu lanțul α al receptorului de mare afinitate pentru IgE (Fc ϵ RI α). Valorile sunt comparabile cu cele cunoscute în literatură, menționate anterior. Recent a fost publicat un studiu realizat în China, care arată o prevalență a testări pozitive la ser autolog de până la 66.9%¹⁰. Severitatea bolii a fost semnificativ statistic mai mare la pacienții cu testare pozitivă la ser autolog, comparativ cu ceilalți, fapt care concordă cu cercetările anterioare¹¹.

Media scorului de severitate al bolii a fost de 26,6, practic 63,33% din valoarea maximă posibilă a UAS7, care este de 42. Procentul destul de ridicat al severității se datorează în parte și faptului că serviciul de alergologie nu este primul la care se adresează majoritatea pacienților, aici fiind trimiși pentru investigații suplimentare pacienții necontrolați de către serviciile de medicină de familie și dermatologie.

În studiul nostru doar 11.7% au intrat în remisiune în primele 6 luni de la debutul simptomelor, majoritatea persistând peste această perioadă. Însă pacienții nu au mai fost urmăriți după intrarea în remisiune. Ar fi necesar și pentru zona noastră geografică un studiu pe o perioadă mai lungă de timp (10-20 ani), care să urmărească periodic pacienții intrați în remisiune pentru a putea constata apariția recidivelor.

Triggerii asociați de pacienți cu agravarea simptomelor urticariene sunt în special stresul (care predomină semnificativ statistic la femei, $p=0.002$) și alcoolul consumat ocazional (predominant semnificativ statistic la bărbați, $p=0,05$).

Dintre bolile asociate, urticaria la factori fizici, în special dermografismul (dar și urticaria colinergică, urticaria la frig), ocupă locul fruntaș, fiind urmată de bolile autoimune tiroidiene, boli psihice și alergii medicamentoase.

Majoritatea cazurilor de UC urmărite de noi (83,45%) au intrat în remisiune până la finalul celor 5 ani de urmărire. Remisiunea a fost declarată atunci când pacienții nu au mai avut simptome dar nici nevoie de medicație. Circa o zecime dintre pacienți au fost pierduți din urmărire pe parcursul studiului. Un mic procent (16,55%) mai necesită încă tratament după 5 ani de la debutul bolii. În celelalte cazuri s-a instalat remisiunea, cel mai mare procent de vindecare fiind întâlnit în perioada 1-3 ani de la debutul manifestărilor. Așa cum am

mai menționat anterior, e necesară o urmărire mai îndelungată a pacienților intrați în remisiune pentru a putea evalua gradul de recidivă al bolii.

Studiu 2. Profilul citokinic în urticaria cronică

În cel de-al II-lea studiu am comparat profilul citokinic al pacienților suferinzi de UC cu lotul martor și am stabilit corelații între citokine și posibili factori etiologici.

Patogeneza UC implică eliberarea unui număr mare de mediatori. Indiferent de etiologie, urticaria cronică spontană apare secundar modificării profilului citokinic al subiecților. Așa se poate explica faptul că nu toți pacienții răspund la medicație anti H1 dar răspund la medicamente imunosupresive.

Etiologia diferită a urticariei cronice duce la profile interleukinice diferite pentru acești pacienți. De multe ori întâlnim mai mulți cofactori implicați în producerea urticariei cronice, iar modificările citokinice produse sunt secundare cooperării acestora. Rolul diferitelor interleukine în urticaria cronică nu este încă bine lămurit. De asemenea nu este clară nici valoarea etiologică în cazul prezenței la pacienții cu urticarie cronică a diferiților factori: ac. Anti *Helicobacter pylori*, alte infecții, anticorpi anti-tiroidieni.

Datele demografice sunt similare celor din primul studiu și nu există diferențe statistice între cele două loturi comparate.

Dintre parametri anormali care pot influența profilul citokinic, debutul și evoluția bolii pe primul plan ca frecvență în lotul nostru se află testarea pozitivă la ser autolog, reacționând pozitiv la 47,4% dintre pacienți, corelându-se bine ca incidență cu datele din literatură, care arată o prevalență a acesteia la 30-50% dintre pacienții cu UC¹. Acesta e urmat îndeaproape de diverse infecții 44% (dintre care 32,2% prezentau infecție cu *Helicobacter pylori*), tiroidita autoimună 37,2%, valori crescute ale IgE totale 35,5%.

Valorile IL-6, citokină pro-inflamatorie, au fost mai mari în lotul pacienților cu urticarie comparativ cu lotul martor cu o înaltă semnificație statistică ($p=0,001$). Rezultate similare au fost întâlnite și în alte studii, care au arătat și reducerea nivelului acesteia în remisiune¹². De asemenea, în studiul nostru, nivelul IL-6 a fost mai mare la cei cu istoric de angioedem decât la pacienții ce prezentau doar urticarie, fără a se corela însă cu severitatea bolii cuantificată prin scorul UAS.

De asemenea s-au registrat diferențe semnificative statistic față de lotul martor și pentru IL-2, citokină care nu a mai fost studiată în UC.

Valorile TNF- α , mediator preformat dar care poate fi și sintetizat de „de novo” în urma stimulării mastocitare, au fost semnificativ crescute la pacienții cu urticarie față de lotul martor. Rezultate similare au mai fost întâlnite în literatură¹³, motiv pentru care terapia anti TNF- α a fost încercată cu succes la unii pacienți care nu au răspuns la tratament anti H1, însă acest beneficiu nu a fost înregistrat la toți pacienții⁹⁸. De asemenea, s-a arătat că TNF- α este exprimat la nivel epidermal în pielea pacienților suferinzi de UC, atât la nivel lezionat cât și în zonele indemne, absentă fiind din tegumentul martorilor sănătoși¹⁴. În funcție de parametri patologici prezenți, TNF- α a fost mai mare la cei cu tiroidită autoimună comparativ cu cei care nu prezentau boala, această asocieră putând reprezenta un criteriu suplimentar pentru aplicarea terapiei anti TNF- α .

E cunoscut rolul important al IL-31 în dermatita atopică și în special asupra intensității pruritului. În studiul nostru, IL-31 este semnificativ mai mare la pacienții cu UC, comparativ cu martorii, ceea ce explică implicarea acesteia în inflamația cutanată din această afecțiune. Un alt studiu recent arată și el creșterea valorilor IL-31 în urticaria cronică¹⁵. Pacienții cu urticarie și teren atopic au avut mai crescut nivelul IL-31, interleukină cu rol inflamator la nivel cutanat, ceea ce poate duce la concluzia că prezența în cantitate crescută a IL-31 la pacienții cu teren atopic, favorizează și manifestările urticariene.

Interleukina 10 a fost găsită de către unii cercetători ca fiind redusă în UC¹⁶ în timp ce alții au obținut valori crescute ale acesteia față de subiecții sănătoși¹⁷, studiul nostru, confirmând ce de-a doua variantă.

Valorile IFN- γ , citokină cu activitate în principal imunomodulatoare, prin activarea macrofagelor și rolul supresor asupra Th2 au fost mai mari la pacienții cu UC decât în lotul martor. Un alt studiu anterior arată de asemenea creșteri ale IFN- γ în urticaria cronică¹⁸. De asemenea, valorile IFN- γ au fost mai mari la cei care au prezentat reacție pozitivă la testarea la ser autolog, comparativ cu celelalte etiologii, ceea ce susține implicarea celulelor Th1 în urticaria cronică autoimună.

Valorile IFN- γ s-au corelat cu prezența factorilor infecțioși, cu excepția infecției cu *Helicobacter Pylori*, la pacienții luați în studiu, ceea ce dovedește implicarea Th1 și la acești pacienți. Este cunoscut faptul că infecția cu *Helicobacter Pylori* este caracterizată printr-un răspuns imun de tip Th1/Th17¹⁹. Putem astfel emite ipoteza conform căreia, manifestarea UC la pacienții infectați cu *Helicobacter Pylori* modifică răspunsul imun caracteristic acestei infecții.

Valorile IL-17 sunt crescute la pacienții cu urticarie cronică, față de lotul martor, fenomen întâlnit și în alt studiu²⁰. IL-17 a fost mai mare la pacienții care au prezentat și angioedem, criteriu de gravitate, indiferent de etiologia acesteia, singurul simptom al bolii care poate pune în pericol viața pacienților. Implicarea IL-17 în urticaria severă se regăsește și în corelarea pozitivă a valorilor IL-17 cu scorul UAS, întâlnită în acest studiu. Th17 e implicată în boli autoimune, însă în studiul nostru valorile IL-17 nu se corelează cu tiroidita autoimună. Posibilul rol al IL-17 în patologia bolilor inflamatorii cutanate, ca psoriazis, eczema de contact și dermatita atopică a fost descris, ceea ce indică faptul că IL-17 este un mediator important al inflamației tisulare¹⁴. Din punct de vedere etiologic IL-17 se corelează cu testarea pozitivă la ser autolog, motiv pentru care supresia Th17, poate fi studiată în urticaria cronică severă, în special la cei cu rezultat pozitiv al testării la ser autolog. Rolul său în urticarie nu este încă cunoscut.

Valorile IL-4 nu sunt semnificativ crescute în lotul pacienților cu UC și teren atopic, relevând rolul mai redus al Th2 la acești pacienți față de pacienții cu teren atopic, care au doar manifestări respiratorii. Responsabil de acest fapt, poate fi și nivelul crescut al IFN- γ la pacienții cu UC, care se știe că deține un rol inhibitor asupra Th2. Valorile IL-4 s-au corelat însă pozitiv cu severitatea bolii, la fel ca IL-17, fapt care sugerează totuși o implicare a acestei interleukine în urticaria cronică, influențând practic severitatea bolii. IL-4 și IL-31, ambele cu apartenență Th2, s-au corelat negativ cu vârsta pacienților suferinzi de urticarie.

Nu am găsit diferențe semnificative între lotul cu urticarie și lotul martor pentru interleukina 1- β și interleukina 4, deși valorile lor au fost mai mari la cei care prezentau boala comparativ cu lotul de control.

Studiul nostru arată că modificările imunoinflamatorii apărute în urticaria cronică sunt o combinație a răspunsului limfocitar mixt Th1/Th2 dar și Th 17. Nu toți pacienții cu urticarie cronică au același profil interleukinic. Înclinarea balanței către predominanța răspunsului Th1 sau Th2 e dată de prezența anumitor valori anormale ale diversilor parametri studiați, care modulează relativ specific răspunsul imun și intensitatea manifestărilor urticariene.

Studiu 3. Variațiile profilului citokinic în urticaria cronică Sub tratament

Studiul de față este de fapt o continuare a studiului anterior, astfel valorile interleukinelor obținute anterior vor fi reluate în studiul actual pentru compararea lor cu cele obținute după tratament.

Pacienții incluși în studiul anterior au fost chemați la control la fiecare 2 săptămâni pentru ajustarea terapiei până la obținerea controlului total sau aproape total al bolii. Toți pacienții au primit inițial antihistaminice H1 nesedative (desloratadină sau levocetirizină) 5-10 mg, în funcție de severitate, la care s-a asociat antibioterapia acolo unde s-au constatat infecții bacteriene. De asemenea pacienții cu disfuncții tiroidiene au fost îndrumați spre medic endocrinolog pentru indicații terapeutice. După primele 2 săptămâni

dozele de anti H1 s-au ajustat în plus sau în minus în funcție de evoluție, iar la vizitele următoare, dacă a fost cazul, s-au asociat una sau mai multe dintre următoarele medicamente: montelukast 10 mg, ranitidină 2x150 mg, doxepin 25 mg. Dacă nici cu acestea simptomele nu au fost controlate satisfăcător, am recomandat tratament imunosupresiv cu ciclosporină. Corticoterapia sistemică de durată a fost evitată, pacienții având disponibilă o cură scurtă de metilprednisolon (până la 5 zile) în caz de exacerbare severă a simptomelor.

Toți pacienții luați în studiu au reușit să fie bine controlați la vizita de 3 luni.

Dintre toți pacienții, 71,18% au răspuns bine la tratament anti-H1 de generația a II-a, doar 23.4% dintre pacienți au necesitat terapie combinată pentru a controla simptomele de boală. Astfel, putem spune că studiul de față arată un control bun al activității bolii cu antihistaminice H1, datele fiind similare cu alte studii din literatură²¹. Staevska și colaboratorii au arătat faptul că 75% dintre pacienții cu urticarie cronică au fost controlați cu antihistaminice H1 (levocetirizină sau desloratadină), după o lună de tratament. Însă doar 16.5% dintre pacienți au fost controlați cu doze standard de antihistaminic (5 mg/zi), comparative cu studiul de față unde 38% dintre pacienții tratați cu antihistaminice H1 au fost controlați cu doza standard. Însă în studiul de față creșterea dozelor s-a făcut la interval de 2 săptămâni, nu săptămânal ca și în studiul lui Staevska, iar evaluarea finală la 3 luni de tratament, nu după 4 săptămâni. Diferențele menționate se pot explica prin heterogenitatea urticariei cornice, dar și prin durata mai mare de tratament. Este posibil ca un tratament de durată să permită controlul bolii și scăderea progresivă a dozelor până la doza standard, fiind bine cunoscut faptul că efectul placebo este foarte mare la pacienții cu urticarie cronică, deci rezultatele din studiile deschise trebuie atent interpretate.

În urma prelucrării statistice am constatat o scădere semnificativă a IL-1B, IL-2, IFN- γ , TNF-alfa, IL-4, IL-17 și IL-31, citokine proinflamatorii, la toți pacienții cu UC tratați aflați sub influența tratamentului. IL-10, interleukină preponderant antiinflamatorie, nu a variat semnificativ sub tratament.

Nu există date în literatură care să investigheze efectul levocetirizinei sau desloratadinei asupra citokinelor implicate în patogeneza inflamației alergice din urticaria cronică. Eficiența antihistaminicelor H1 în urticaria cronică este în primul rând evaluată clinic, prin inhibarea apariției leziunilor urticariene și a pruritului²². Nu este absolut necesară o corelare a nivelului clinic cu parametri inflamatori. Studiul de față realizează o corelare a parametrilor clinici și a răspunsului la tratament cu nivelul unor citokine proinflamatorii sau cu rol antiinflamator în urticaria cronică. Este necesară o astfel de evaluare complexă în încercarea de a desluși mecanismele adiționale ale fiecărui antihistaminic în parte pentru a putea alege medicamentul optim la pacienții cu urticarie cronică.

Comparând variațiile citokinelor în grupul de pacienți sub tratament cu desloratadină față de pacienții cu levocetirizină, s-a constatat o scădere semnificativ mai mare a IL-1 β la pacienții care urmau tratament cu desloratadină față de cei care urmau tratament cu levocetirizină. IL-1 β e interleukina cu rol esențial în cadrul răspunsului imun stimulând diferențierea și activarea LyT. Însă reducerea valorilor celorlalte interleukine pro-inflamatorii IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-17 și IL-31 nu au fost semnificative între cele două grupuri.

În cadrul pacienților care urmau tratament cu levocetirizină, au existat diferențe semnificative în ceea ce privește valorile inițiale ale IL-4 și IL-31 între cei care au necesitat 5 mg și cei care au primit 10 mg, fiind mai mari în cel de-al doilea caz. Astfel, doza de levocetirizină necesară a fost proporțională cu valorile IL-4 și IL-31.

Aceeași legătură am întâlnit-o și în lotul pacienților cu desloratadină. S-au constatat diferențe semnificative statistic în ceea ce privește nivelul inițial al IL-4 și IL-31 între pacienții care au necesitat 5 mg, cei care au necesitat 10 mg, respectiv 20 mg de desloratadină.

Nu au existat diferențe semnificative pentru celelalte interleukine privind relația cu doza de anti H1 necesară.

Scăderea citokinelor inflamatorii studiate în cazul tuturor pacienților, validată clinic prin reducerea drastică sau dispariția simptomelor, susține efectul antiinflamator al tratamentului antiH1 de durată.

Studiu 4. Corelații între nivelul calității vieții și citokine La pacienții cu urticarie cronică

Datorită pruritului și aspectului lezional, urticaria afectează profund calitatea vieții, interferând cu activitățile zilnice și somnul. Urticaria cronică generează un impact psihosocial asupra pacienților și familiilor acestora, prin alterarea imaginii de sine și starea alarmantă continuă.

Studiul de față își propune în primul rând evaluarea nivelului calității vieții la pacienții cu UC din zona noastră geografică, a variației acestuia sub tratament precum și corelarea diversilor parametri de calitate ai vieții cu citokinele studiate.

Toți pacienții luați în cel de-al II-lea studiu au completat chestionarul de calitate al vieții special conceput pentru urticarie cronică (CU-Q2oL), de către un grup de cercetători italieni în 2005 și recomandat de EAACI²³.

Am găsit o corelație directă înalt semnificativă statistic între valorile scorului de calitate a vieții și scorul UAS 7 atât la prima vizită cât și la 3 luni după debutul tratamentului.

Așa cum era de așteptat, am observat o reducere înalt semnificativă statistic atât a scorului UAS 7 cât și a scorului de calitate a vieții la 3 luni după debutul tratamentului, comparativ cu valorile inițiale, fapt care confirmă practic eficiența terapiei. Prin acești doi parametri se poate evalua practic eficiența tratamentului. Nu au existat diferențe semnificative între diferitele tipuri de medicație aplicată, deoarece scopul tratamentului a fost același (controlul bolii), tratamentul fiind instrumentul ajustabil.

În literatură nu mai există un studiu similar, care să colereze parametri de calitate ai vieții cu citokinele în UC.

Valorile inițiale ale interleukinei 31, s-au corelat direct cu valorile totale ale scorului de calitate a vieții și în mod special cu pruritul, conferind acestei citokine un rol deosebit de important în urticaria cronică. Legătura dintre IL-31 și prurit a mai fost semnalată și de alți cercetători în dermatita atopică. De asemenea IL-31 s-a corelat bine și cu valorile obținute la întrebările referitoare la evaluarea problemelor legate de aspect. Astfel, afectarea cutanată, relaționată direct cu IL-31 reduce evident calitatea vieții atât prin prurit cât și prin aspect, pielea fiind un organ cu rol major în viața socială.

Valorile obținute la întrebările referitoare la severitatea pruritului au mai fost corelate și cu IL-4, interleukină asociată bolilor alergice și TNF- α , citokină mediatoare a efectelor inflamatorii locale și sistemice. Dar așa cum am arătat în cel de-al II-lea studiu, IL-4 nu prezintă o creștere semnificativă față de lotul martor, în timp ce TNF- α e semnificativ mai mare la pacienții cu urticarie, conferindu-i acesteia o importanță mai mare în ceea ce privește corelare cu pruritul în UC. Mai sunt și alte studii care constată corelarea TNF- α cu pruritul²⁴.

IL-6, interleukină stimulatorie a sintezei de proteine de fază acută s-a corelat cu valorile scorului privind impactul asupra activităților zilnice, parametru deosebit de important direct interconectat cu capacitatea de a duce o viață normală, productivă social și economic. Însă, paradoxal, IL-6 s-a corelat negativ cu valorile inițiale ale scorului de calitate a vieții, deși așa cum am arătat în studiul I, reprezintă ce mai semnificativă creștere față de lotul martor. Într-un studiu realizat în Turcia se constată o corelație pozitivă a acesteia cu scorul de calitate a vieții²⁵. Diferența poate fi dată de faptul că s-au utilizat chestionare diferite de evaluare a calității vieții. O altă explicație ar putea fi rolul benefic asupra organismului al IL-6 secretată muscular, ca miokină la pacienții cu activitate fizică mai intensă, permisă la cei cu manifestări mai ușoare ale bolii. În contrast cu acest efect imediat, persoanele cu activitate fizică regulată tind să aibă un nivel mai redus al IL-6 dar și a altor markeri inflamatori²⁶. Astfel, poate fi explicată corelarea directă a IL-6 cu gradul de afectare al activităților zilnice, implicit al efortului fizic regulat, întâlnită în studiul nostru. Legătura IL-6 cu

scorul de calitate al vieții mai trebuie cercetat în continuare. Nu este clar dacă creșterea IL-6 e un epifenomen sau contribuie la patogeniza UC.

Lipsa de somn este o problemă majoră a societății moderne, cu efecte nefavorabile asupra sănătății. Valorile obținute la întrebările referitoare la evaluarea problemelor legate de somn au fost corelate cu nivelurile IL-17. Într-un studiu realizat pe șoareci, care are ca și scop legătura între privarea fazei REM a somnului pentru 72 de ore și interleukinele secretate, Yehuda a arătat că IL-17 este principala citokină stimulată de aceasta.²⁷

Astfel, e posibil ca această corelație să se datoreze creșterii IL-17 secundar afectării somnului de către pruritul aferent urticariei.

Valorile obținute la întrebările referitoare la evaluarea limitărilor sociale, limitări generate de indispoziție, restricțiile alimentare și reducerea activităților sportive, au fost corelate cu nivelurile IFN- γ și a TNF- α .

Concluzii generale

Urticaria cronică este o boală a adultului de vârstă medie, predominantă la sexul feminin și în zona noastră geografică.

Din punct de vedere etiologic și studiul nostru confirmă faptul că cel mai mare procent e reprezentat de urticaria cronică autoimună.

Deși în literatură nu există diferențe în ceea ce privește mediul de proveniență, în cabinetul de alergologie predomină pacienții din mediu urban.

Cele mai frecvente comorbidități ce însoțesc urticaria cronică spontană sunt alte forme de urticarie, bolile tiroidiene și depresia.

Urticaria cronică nu este o boală pe viață, pacienții intrând în remisie după un interval variabil de timp, mai mult de jumătate în primii 3 ani.

Dintre toate citokinele studiate, IL-6 e citokina cu cea mai semnificativă creștere la pacienții cu urticarie cronică față de lotul martor.

IL-2, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-31 și IL-17 sunt semnificativ mai mari la pacienții cu urticarie față de lotul de control.

Predominanța diferitelor citokine se corelează cu posibii factori etiologici evidențiați la unii pacienți.

Angioedemul asociat urticariei e însoțit de creșteri semnificative ale IL-6, IL-10 și IL-17.

Scorul de activitate al urticariei se corelează cu IL-17 și IL-4.

Profilul citokinic în urticaria cronică este unul inflamator mixt Th1/Th2/Th17.

Valorile citokinelor proinflamatorii IL-1B, IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-17 și IL-31 s-au redus semnificativ sub tratamentul care a controlat manifestările UC.

Doza necesară de desloratadină și levocetirizină e corelată direct cu valoarea inițială a IL-31.

Citokinele corelate cu pruritul din urticaria cronică sunt IL-4, IL-31 și TNF- α .

Valorile IL-17 înainte de tratament se corelează cu tulburările de somn avute de către pacienți.

Valorile obținute la întrebările referitoare la evaluarea limitărilor sociale au fost corelate cu nivelurile IFN- γ și TNF- α .

Valorile inițiale ale IL-6 se corelează cu impactul asupra activităților zilnice.

Având în vedere rezultatele obținute, putem emite ideea conform căreia terapiile anti IL-31 și anti IL-17 pot fi studiate în urticaria cronică.

Abstract of Phd Thesis

CYTOKINE PROFILE IN CHRONIC URTICARIA BEFORE AND AFTER TREATMENT

Phd student: **IOANA-GABRIELA CRIȘAN**

Scientific supervisor: **Prof. Dr. VICTOR CRISTEA**



Key words: Chronic urticaria, etiological factors, cytokines, treatment, quality of life

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	15
1. Chronic urticaria	17
1.1. Clinical aspects	19
1.2. Classification	18
2. Etiologia urticariae cronice	19
2.1. Genetic predisposition	19
2.2. Infections	19
2.2.1. Viruses	20
2.2.2. Bacteria	20
2.2.3. Parasites	20
2.2.4. Fungi	20
2.3. Drugs	21
2.4. Foods and food additives	21
2.5. Atopy	22
2.6. Autoimmune diseases	22
2.6.1. Thyroid disease	22
2.7. Chronic autoimmune urticaria	23
2.7.1. Evidence proving the existence of autoantibodies in chronic spontaneous urticaria	23
2.7.2. Criteria for diagnosis of autoimmune chronic urticaria	24
2.8. Neurological factors	24
2.9. Neoplasms	24
3. Pathogenesis of chronic urticaria	25
3.1. The role of complement in mast cell and basophils degranulation	26
3.2. Histopathological appearance in chronic urticaria	26
4. Cells and mediators	27
4.1. Cells and chronic urticaria	27
4.1.1. Skin structure	27
4.1.2. Lymphocytes	27
4.1.2.1. Lymphocytes T	27
4.1.2.2. Lymphocytes B	28
4.1.3. Mast cells	28
4.1.3.1 FcεRI receptors	29
4.1.4. Basophils	30
4.1.5. Eosinophils	30
4.1.6. Endothelial cells	31
4.1.7. Dendritic cells	31

4.2. Cytokines	32
4.2.1. Proinflammatory cytokines	33
4.2.1.1. Interleukin 1 β	33
4.2.1.2. TNF- α	35
4.2.1.3. Interleukin 2	35
4.2.1.4. Interleukin 4	36
4.2.1.5. Interleukin 6	36
4.2.1.6. Interferon γ	37
4.2.2. Anti-inflammatory cytokines	37
4.2.2.1. Interleukin 10	37
4.2.3. Other recently characterized cytokines	38
4.2.3.1. Interleukin 17	38
4.2.3.2. Interleukin 31	38
5. Treatment of chronic urticaria	39
5.1. Antihistamines H1	39
5.2. Leukotriene receptor antagonists in chronic urticaria	40
5.3. Antihistamines H2 in chronic urticaria	40
5.4. Immunosuppressive and anti-inflammatory in chronic urticaria	40
PERSONAL CONTRIBUTION	41
1. Study hypothesis/ objectives	43
2. General methodology	45
3. Study 1 - Characterization of patients with chronic urticaria	51
3.1. Introduction	51
3.2. Working hypothesis/ objectives	51
3.3. Material and methods	51
3.4. Results	52
3.4.1 Demographics	52
3.4.2. Duration and severity of the disease	56
3.4.3. Proportions of autoimmune urticaria	58
3.4.4. Evoluția bolii	59
3.5. Argument	60
3.6. Conclusions	64
4. Study 2 -Cytokine profile in chronic urticaria	65
4.1. Introduction	65
4.2. Working hypothesis/ objectives	65
4.3. Material and methods	65
4.4. Results	66
4.4.1. Date demografice	66
4.4.2. The presence of immunological diseases	68
4.4.3. The presence of various infections	71
4.4.4. Serum levels of various cytokines	73
4.4.5. Identify independent variables influence on cytokine	78
4.5. Argument	81
4.6. Conclusions	84

5. Study 3 - Variations in cytokine profile in chronic urticaria therapy	85
5.1. Introduction	85
5.2. Working hypothesis/ objectives	85
5.3. Material and methods	85
5.4. Results	86
5.4.1. Variations of cytokines in chronic urticaria treated	86
5.4.2. Comparative data between groups of patients with desloratadine and levocetirizin	90
5.5. Argument	97
5.6. Conclusions	101
6. Study 4 - Correlations between cytokine levels and quality of life in patients with chronic urticaria	103
6.1. Introduction	103
6.2. Working hypothesis/ objectives	103
6.3. Material and methods	103
6.4. Results	105
6.5. Argument	113
6.6. Conclusions	116
7. General discussions	117
8. General conclusions	119
9. The originality and innovative contributions of the thesis	121
REFERENCES	123

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Chronic urticaria (CU) is a frequent disease that considerably affects the quality of life of patients to more or less the same extent as coronary artery disease²⁸.

The diagnosis of urticaria comprises a heterogeneous group of disorders occurring as a result of a multitude of causes²⁹. All types and subtypes share a distinctive pattern of skin reaction manifested by urticarial lesions and/or angioedema.

Up to 20% of the population or even more experience at least one episode of urticaria and/or angioedema throughout their lifetime^{30,4}.

Chronic urticaria is conventionally defined as the presence of recurrent, transient, pruritic and erythematous urticarial skin lesions occurring for at least 6 weeks.

It is estimated that about 3% of the population of Western Europe suffer from chronic urticaria, being reported in about 1% of the general population of the United States. In a study conducted in Romania in 1995³¹, there was a 1.9% estimated prevalence of chronic urticaria. There is no recent data on the prevalence of CU in Romania.

Despite the simple symptoms and the easy diagnosis, the etiologic factors are often difficult to establish. Although it is perceived as an allergic disease by the population, this etiology is rare in chronic urticaria. There are a great number of possible causative agents, but their presence in patients with CU does not always certify its etiology, sometimes being simple coincidences. Among the etiologic factors, there is a high percentage of anti-Fc ϵ R1 α antibody synthesis and/or anti-IgE antibody synthesis on an IgG background, generating chronic autoimmune urticaria, which makes up about 35-40% of chronic urticaria cases in adults.

Even if there is no confirmed pathogenetic mechanism common to all types of urticaria, mast cells are considered to play a central role in the pathogenesis of this disease. Manifestations of urticaria can be caused by immunological mechanisms involving all four types of hypersensitivity or non-immunological reactions. All these production mechanisms result in the generation of various vasoactive mediators, of which the best known is histamine.

The influence of various cytokines in the production of chronic urticaria was and is still interestedly studied. Anti-TNF- α therapy, efficient in 60% of patients with spontaneous CU who were unresponsive to prior anti-H1 therapy³², and anti-IL-1 associated auto-inflammatory syndrome therapy are some of the relatively successful anti-cytokine therapies.

First-line treatment for CU comprises non-sedating H1 antihistamines, which have proven effective in many double-blind placebo-controlled clinical trials. When necessary, their dose may be increased four times. The following are used as additional and alternative therapies, required for each subtype of urticaria: H2 antihistamines, leukotriene modifiers, corticosteroids,

cyclosporine and other immunosuppressive drugs. Omalizumab has demonstrated its efficacy in the biological treatment of chronic urticaria.

The duration of the disease varies. Spontaneous resolution of CU can occur in the first five years, in a percentage of up to 30-55%, but in some cases it can persist longer.

The great impact on quality of life, the relatively long-term evolution and the different response to treatment, as well as the current lack of data on chronic urticaria in Romania are the main reasons for this study.

PERSONAL CONTRIBUTION

General methodology

This study included 162 patients with chronic urticaria (CU). These were outpatients within the Municipal Clinical Hospital between October 2007 and September 2009. They were under observation for five years.

Patients over 18, who had daily manifestations of urticaria, with or without angioedema, for at least 6 weeks, were included in the study after signing the informed consent form. The study protocol was approved by the Ethics Committee of "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca.

Medical history and physical examination indicated the presence and severity of chronic urticaria. Medical history provided information on disease duration, presence of angioedema, associated diseases, potential triggers and the evolution of patients suffering from chronic urticaria.

The urticaria activity score (UAS) was used to determine disease activity, being recommended by EAACI/GA2LEN/WAO Guidelines. The questionnaire consists of four alternative answers regarding the intensity of pruritus and the number of urticarial lesions within 24 hours. The UAS assigns a score from 0 to 6. This questionnaire was completed on the day of the examination as well as over the following 7 days (UAS7). For some patients, this questionnaire was also completed 3 months after treatment initiation.

The autologous serum skin test was performed in all patients with CU using physiological saline as a negative control and histamine as a positive control.

Five-milliliter blood samples were collected from patients without prior antihistamine therapy, as well as from the control group, for the determination of the studied cytokines: IL-1B, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 (multiplex assay, Luminex Human Cytokine Performance Panel A) and TNF- α , IFN- γ , IL-17 and IL-31 (ELISA). These patients also underwent a series of standard tests to assess the etiology of chronic urticaria: blood count, CRP, ASO, ANA, anti-TPO and anti-TG antibody testing, TSH, and FT4, anti-Helicobacter pylori antibody testing, hepatitis B antigen,

anti-HCV antibody testing, pharyngeal secretion, urinalysis and three coproparasitological exams.

During the treatment, all these patients were regularly examined and the cytokines studied were assessed again 3 months after initiation of treatment.

Patients who underwent blood sampling for the determination of cytokine levels filled out the questionnaire for the assessment of quality of life during baseline examination and 3 months after initiation of treatment.

Statistical analysis was performed using SPSS 20 software. The Kolmogorov-Smirnov test was used to compare quantitative data to normal distribution. Normally distributed continuous variables were characterized by the mean \pm SD and those with non-normal distribution were described by the median and the 25th and 75th percentiles. The differences in quantitative variables between two groups were evaluated using the independent samples t-test or the Mann-Whitney test. The differences in the percentage of a categorical variable between two groups were assessed using the chi-squared test (χ^2) or Fisher test, depending on the situation. The correlation between two quantitative variables was tested using Spearman's rho coefficient. Statistical significance was set for a p value of <0.05 .

Study 1. Characterization of patients with chronic urticaria

The first study of this thesis focused on the evaluation of patients with CU in our geographical region in terms of both demographics and severity and duration of the disease, the share of autoimmune urticaria, aggravating factors, associated diseases and evolution under therapy.

Results indicate the clear predominance of urticaria in female patients. The condition mostly affects the third, fourth and fifth decades of life, with very wide limits, represented by patients aged between 18 and 72. Previous studies indicate that chronic urticaria tends to be more common in middle-aged subjects, between the third and the sixth decade of life, reaching the maximum prevalence in the fourth decade, particularly in women, who are affected twice as much as men^{33,34,35}. Thus, the conclusion is that, in our geographical area, CU is a disease affecting middle-aged adults, predominantly women.

Our study shows that CU is more predominant in patients living in urban areas. The literature does not reveal differences in the prevalence of CU in terms of education, income, area of origin or ethnicity³⁶. The results of our study may also be affected by the difficult access to specialized allergological services for patients living in rural areas, as the study was conducted in the city of Cluj-Napoca. The fact that the severity of CU is greater in patients from rural areas than in those in urban areas, leads to the hypothesis that these patients only address specialized health services when the symptoms are unbearable, delaying allergy consultation for too long.

In our study, angioedema is associated with CU in over half of patients.

Autologous serum skin test was positive in 57.4% of patients, more predominant in women, who are more likely to develop an autoimmune disease. These patients were considered as suffering from CAU, IgG autoantibodies playing an important role, interacting primarily with the alpha chain of the high affinity IgE receptor (FcεRI α). Values are consistent with the literature, as referred to above. A recently published study conducted in China shows an approximately 66.9% prevalence of positive autologous serum skin tests³⁷. Disease severity was significantly greater in patients with positive autologous serum skin test, as compared to others, which is consistent with previous research³⁸.

Mean disease severity score was 26.6, almost 63.33% of the maximum possible UAS7 score value, which is 42. The high percentage of disease severity is partly due to the fact that allergy healthcare services are not the first to be addressed by most patients. Only patients who were not assessed by family care and dermatology services are sent here for further investigations.

In our study, only 11.7% of patients went into remission in the first six months after the onset of symptoms, most of them persisting past this period. However, patients were not followed after their remission. There is need for a long-term study for our geographic region (10-20 years) in order to regularly follow patients in remission to assess the occurrence of relapses.

The main triggers associated by patients with worsening of symptoms are stress (statistically significantly prevailing in women, $p=0.002$) and occasional alcohol consumption (statistically significantly prevailing in men, $p=0.05$).

One of the leading associated diseases is dermatographism (as well as cholinergic urticaria, cold urticaria), followed by autoimmune diseases of the thyroid, mental illnesses and drug allergies.

Most of the patients with CU examined in our study (83.45%) went into remission by the end of the 5 year of follow-up. Remission was declared when patients had no more symptoms and no more medication was needed. Follow-up was not completed for about one-tenth of the patients in the study. A small percentage (16.55%) needed additional treatment after 5 years of disease onset. In all the other cases, patients went into remission, with the highest percentage of healing occurring in the first 1-3 years after onset. As mentioned earlier, a longer follow-up period is needed for patients gone into remission in order to assess the extent of recurrence.

Study 2. Cytokine profile in chronic urticaria

In the second study, the cytokine profile of patients suffering from CU was compared to that of controls, establishing correlations between cytokines and possible etiologic factors.

The pathogenesis of CU involves the release of a series of mediators. Regardless of etiology, spontaneous chronic urticaria occurs secondary to the change in the cytokine profile of subjects. This may explain the fact that not all patients respond to anti-H1 medication, but they respond to immunosuppressive drugs.

Different etiology of chronic urticaria leads to different interleukin profiles for these patients. There are often many cofactors involved in the emergence of chronic urticaria and cytokine changes are secondary products of their cooperation. The role of various interleukins in chronic urticaria is not well clarified. The impact of other various factors is also not very clear in the etiology of chronic urticaria: anti-*Helicobacter pylori* antibodies, other infections, anti-thyroid antibodies.

Demographics are similar to those in the first study and there are no statistical differences between the two groups compared.

Among the abnormal parameters that can influence the cytokine profile, the onset and progression of the disease as the forefront in terms of frequency in our group is the positive autologous serum test, positive in 47.4% of patients, in accordance with the literature, showing its prevalence in 30-50% of patients with CU¹. This is closely followed by various infections in 44% of patients (of which 32.2% were infected with *Helicobacter pylori*), autoimmune thyroiditis in 37.2% and elevated levels of total serum IgE in 35.5%.

IL-6 pro-inflammatory cytokine levels were higher in the group of patients with urticaria than in controls. The difference was statistically significant ($p=0.001$). Similar results were found in other studies that have shown reduced levels during remission³⁹. Moreover, IL-6 levels were also higher in our study in those with a history of angioedema than in patients with urticaria alone, without any correlation with disease severity measured using the UAS score.

There were also statistically significant differences between the control group and the study groups in IL-2 levels, cytokine that has not been studied in CU before.

TNF- α levels, both preformed and "de novo" synthesized mediator as a result of mast cell stimulation, were significantly increased in patients with urticaria compared to the control group. Similar results have been found in the literature before⁴⁰, which is why anti-TNF- α therapy has been successfully used in some patients who had not responded to anti-H1 therapy, but this was not recorded in all patients⁹⁸. It was also shown that TNF- α is expressed in the epidermis of patients suffering from CU, both in lesions and lesion-free areas, but it is absent in the healthy skin in the control group⁴¹. Depending on the existing pathological parameters, TNF- α levels were higher in patients with autoimmune thyroiditis than in those without the disease. This association may be an additional criterion for the use of anti-TNF- α therapy.

The important role of IL-31 in atopic dermatitis and especially in the intensity of itching is well known. In our study, IL-31 levels were significantly higher in patients with CU than in controls, explaining its influence in skin inflammation. Another recent study also shows the increase in IL-31 levels in chronic urticaria⁴². Patients with urticaria and atopic dermatitis had higher levels of IL-31, an inflammatory interleukin in the skin, which may lead to the conclusion that the presence of elevated IL-31 levels in patients with atopic dermatitis favors urticarial events.

Some researchers have found reduced interleukin 10 levels in patients with CU⁴³, while others have obtained more elevated levels than in healthy subjects⁴⁴. Our study confirms the second hypothesis.

The levels of IFN- γ , a predominantly immunomodulatory cytokine activating macrophages and suppressing Th2, were higher in patients with CU than in the control group. Another earlier study also shows elevated IFN- γ levels in chronic urticaria⁴⁵. Moreover, IFN- γ levels were higher in patients tested positive in the autologous serum skin test than in other etiologies, supporting the influence of Th1 cells in chronic autoimmune urticaria.

In all patients in the study, IFN- γ levels were correlated with the presence of infections, except for *Helicobacter pylori* infection, which proves the involvement of Th1 in these patients too. It is known that *Helicobacter pylori* infection is characterized by a Th1/Th17 immune response⁴⁶. We thus hypothesize that the manifestation of CU in patients infected with *Helicobacter pylori* modifies the immune response typical for this infection.

IL-17 levels are higher in patients with chronic urticaria than in the control group, which was reported in another study⁴⁷. IL-17 was higher in patients with angioedema, criterion of severity, regardless of its etiology, the only symptom of the disease that may endanger patients' lives. The involvement of IL-17 in severe urticaria is reflected in the positive correlation between IL-17 levels and UAS score values found in this study. Th17 is involved in autoimmune diseases, but IL-17 levels were not correlated with autoimmune thyroiditis in our study. The potential role of IL-17 in the pathology of inflammatory skin diseases, such as psoriasis, eczema, atopic and contact dermatitis, has been described indicating that IL-17 is an important mediator of tissue inflammation¹¹⁴. In terms of etiology, IL-17 is correlated with positive autologous serum skin test, so the suppression of Th17 can be studied in severe chronic urticaria, particularly in patients with positive results in autologous serum skin testing. Its role in urticaria is not yet known.

IL-4 levels were not significantly higher in the group of patients with CU and atopic dermatitis, highlighting the reduced impact of Th2 in these patients, compared to patients with atopic dermatitis who only have respiratory symptoms. The elevated IFN- γ levels in patients with CU might also be responsible for this, as they cause the inhibition of Th2. However, IL-4 levels were positively correlated with the severity of the disease, similar to IL-17, suggesting the impact of interleukins on chronic urticaria, basically affecting disease severity. IL-4 and IL-31, both related to Th2, were negatively correlated with the age of patients suffering from urticaria.

There were no significant differences in interleukin 1 β and interleukin 4 levels between the group with chronic urticaria and the control group, although they were higher in patients with urticaria.

Our study shows that immuno-inflammatory changes occurring in chronic urticaria are a combination of mixed Th1, Th2 and Th 17 type responses. Not all patients with chronic urticaria have the same profile of interleukins. The predominance of Th1 or Th2 responses is given by the presence of certain abnormal values of the various parameters studied, relatively modulating the immune response and the intensity of urticarial manifestations.

Study 3. Changes in cytokine profile in the treatment of chronic urticaria

This is a continuation of a previous study, therefore interleukin levels previously obtained will be resumed in the current study to compare them with those measured after treatment.

Patients included in the previous study were examined every two weeks to adjust the therapy in order to achieve total or almost total disease control. Initially, all patients received non-sedating H1 antihistamines (desloratadine or levocetirizine), 5-10 mg, depending on the severity, in combination with antibiotics in case of bacterial infections. Patients with thyroid disorders were referred to endocrinology for therapeutic indications. After the first two weeks of anti-H1 therapy, doses were adjusted depending on the evolution, and during subsequent examinations, where necessary, one or more of the following drugs were associated: 10 mg montelukast, 2x150 mg ranitidine, 25 mg doxepin. When these also failed to control symptoms satisfactorily, we recommended immunosuppressive therapy with cyclosporine. Long-lasting systemic corticosteroid therapy was avoided, patients being shortly treated with methylprednisolone (up to 5 days) in case of severe exacerbation of symptoms.

A better disease control was achieved in all patients in the study during the 3-month visit.

Of all patients, 71.18% responded positively to second-generation anti-H1 therapy, and only 23.4% required combination therapy to control the symptoms of the disease. Thus, we can say that this study shows the good disease control achieved with H1 antihistamines, data being similar to other studies in the literature⁴⁸. Staevska et al. have shown that the symptoms of chronic urticaria were controlled in 75% of patients after one month of treatment with H1 antihistamines (levocetirizine or desloratadine). But disease control using standard doses of antihistamines (5 mg/day) was only achieved in 16.5% of patients, compared to the present study where disease control was achieved in 38% of patients treated with standard H1 antihistamine doses. However, in the present study, dose escalation was done every two weeks, not weekly as in the study conducted by Staevska, and the final evaluation after 3 months of treatment, not after four weeks. Those differences can be explained by the heterogeneity of chronic urticaria and by the longer duration of treatment. Long-lasting treatment may help achieve disease control and allow tapering until reaching the standard dose, being well known that the placebo effect is very high in patients with chronic urticaria, so the results of open trials must be carefully interpreted.

Statistical processing revealed a significant decrease in IL-1B, IL-2, IFN- γ , TNF-alpha, IL-4, IL-17 and IL-31 levels, pro-inflammatory cytokines, in all patients with CU under treatment. IL-10 levels, a predominantly anti-inflammatory interleukin, did not differ significantly under therapy.

There is no data in the literature investigating the effect of levocetirizine and desloratadine on the cytokines involved in the pathogenesis of allergic inflammation in chronic urticaria. The efficiency of H1 antihistamines in chronic urticaria is first assessed from a clinical perspective, by inhibiting the occurrence of urticarial lesions and itching⁴⁹. It is not absolutely necessary to correlate clinical values with inflammatory parameters. This study accomplished a correlation between clinical parameters and treatment response, on the one hand, and the role of certain pro-inflammatory or anti-inflammatory cytokines in chronic urticaria, on the other hand. This

complex assessment is required in an attempt to unravel the additional mechanisms of each antihistamine individually, to be able to choose the best drug therapy in patients with chronic urticaria.

When comparing cytokines changes in patients treated with desloratadine and in those treated with levocetirizine, there was a significantly greater decrease in IL-1 β levels in patients treated with desloratadine than in those treated with levocetirizine. IL-1 β plays an essential role in the immune response, stimulating the differentiation and activation of LyT

. But there were no significant differences in the reduced levels of the other pro-inflammatory interleukins (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-17 and IL-31) between the two groups.

There were significant differences in baseline levels of IL-4 and IL-31 in patients treated with levocetirizine, between those who required 5 mg and the others who were administered 10 mg, being greater in the second group. The required dose of levocetirizine was proportional to the amount of IL-4 and IL-31.

The same connection was found in the group of patients treated with desloratadine. There were statistically significant differences in baseline IL-4 and IL-31 levels between patients treated with 5 mg and those treated with 10 mg and 20 mg desloratadine.

There were no significant differences in other interleukin levels related to the relationship with the required anti-H1 dose.

The decrease in inflammatory cytokine levels in all patients, clinically validated by the drastic reduction or disappearance of symptoms, supports the effect of long-lasting anti-H1 anti-inflammatory therapy.

Study 4. Correlations between cytokine levels and quality of life in patients with CU

Itching and lesions, typical manifestations of urticaria, profoundly affect quality of life, interfering with daily activities and sleep. Chronic urticaria generates a psychosocial impact on patients and their families, resulting in an altered self-image and a continuous alert.

One of the main purposes of this study is to assess quality of life in patients with CU in our geographic region, its variation during the treatment and the correlation between various quality of life parameters and the cytokines studied.

All patients in the second study completed the chronic urticaria quality of life questionnaire (CU-Q2oL) designed by a group of Italian researchers in 2005 and recommended by the EAACI⁵⁰.

There was a highly statistically significant direct correlation between quality of life score values and UAS7 score values, both during the first visit and after 3 months of treatment.

As expected, there was a highly statistically significant reduction in both UAS7 and quality of life scores after 3 months of treatment, compared to baseline values, which confirms the effectiveness of therapy. These two parameters can help assess the effectiveness of the treatment.

There were no significant differences between the different types of medication used, as the purpose of the treatment was the same (disease control), the treatment being adjustable.

There is no similar study in the literature assessing the correlation between quality of life parameters and cytokines in CU.

Baseline interleukin-31 levels were directly correlated with the overall quality of life score values and especially with pruritus, confirming the important role of this cytokine in chronic urticaria. The correlation between IL-31 and pruritus has been reported by other researchers in atopic dermatitis. Moreover, IL-31 was highly correlated with the values obtained for the questions regarding the assessment of appearance. Thus, skin damage, directly linked to IL-31, obviously reduces quality of life by both itching and appearance, the skin being an organ with a major role in social life.

The values obtained for the questions related to the severity of pruritus were also correlated with IL-4, an interleukin associated with allergic diseases, and TNF- α , a cytokine mediating local and systemic inflammatory effects. But as shown in the second study, there was no significant increase in IL-4 levels compared to the control group, while TNF- α levels were significantly higher in patients with urticaria, giving this cytokine even more importance in its relationship with itching in CU. There are other studies that confirmed the correlation between TNF- α and itching⁵¹.

IL-6, an interleukin that stimulates acute phase protein synthesis, was correlated with score values related to the impact on daily activities, a particularly important parameter directly interconnected with the ability to lead a normal life, socially and economically productive. But, paradoxically, IL-6 was negatively correlated with baseline quality of life score values, although as highlighted in study 1, it shows the most significant increase compared to the control group. In a study conducted in Turkey, there was a positive correlation between IL-6 and quality of life score⁵². The difference can result from the use of different questionnaires to assess quality of life. Another explanation could be the beneficial role of IL-6 on body muscles as a myokine¹⁰², in patients with increased physical activity, allowed in those with lighter manifestations of the disease. In contrast to this immediate effect, people with regular physical activity tend to have lower levels of IL-6 and of other inflammatory markers⁵³. Thus, the direct correlation between IL-6 and the degree of impairment of daily activities, including regular exercise, in our study can be explained. The correlation between IL-6 and quality of life needs further investigation. It is unclear whether higher IL-6 levels are an epiphenomenon or they contribute to the pathogenesis of CU.

Lack of sleep is a major problem in modern society, with adverse effects on health. The values obtained for the questions concerning sleep problems were correlated with IL-17 levels. In a study conducted on mice, meant to assess the connection between REM deprivation for 72 hours and the interleukins secreted, Yehuda showed that IL-17 is the main cytokine stimulated⁵⁴. Therefore, this correlation might be due to increased IL-17 levels secondary to sleep deprivation by itching associated with urticaria.

The values obtained for questions about social limitations and other types of impairment caused by malaise, dietary restrictions and reduced sports activities were correlated with IFN- γ and TNF- α levels.

General conclusions

Chronic urticaria is a disease of middle-aged adults, also more prevalent in women in our geographic region.

In terms of etiology, this study confirms that the highest percentage is represented by chronic autoimmune urticaria, triggered by the synthesis of anti-Rc ϵ R1 α autoantibodies.

Even if there are no differences in the literature in terms of area of origin, there are a greater number of patients from the urban area in allergological offices.

The most common comorbidities associated with chronic spontaneous urticaria are other forms of urticaria, thyroid diseases and depression.

Chronic urticaria is not a life-long disease, patients going into remission after a variable period of time, most of them in the first 3 years.

Of all the cytokines studied, IL-6 presents the most significant increase in patients with chronic urticarial, compared to the control group.

IL-2, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-31 and IL-17 levels are significantly higher in patients with urticaria than in the control group.

The predominance of different cytokines is correlated with possible etiologic factors highlighted in some patients.

Angioedema associated with urticaria is accompanied by significant increases in IL-6, IL-10 and IL-17 levels.

The urticaria activity score is correlated with IL-17 and IL-4.

The cytokine profile in chronic urticaria is a mixed Th1/Th2/Th17 inflammatory profile.

Pro-inflammatory cytokine levels (IL-1B, IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-17 and IL-31) are significantly reduced during treatment, being able to control the manifestations of CU.

The required doses of desloratadine and levocetirizine are directly correlated with the baseline level of IL-31.

IL-4, IL-31 and TNF- α are correlated with itching in chronic urticaria.

IL-17 levels before treatment are correlated with sleep disorders.

The values obtained for the questions related to social limitations are correlated with IFN- γ and TNF- α level.

Baseline IL-6 levels are correlated with the impact on daily activities.

Considering the results obtained, we can hypothesize that anti-IL-31 and anti-IL-17 therapies can be studied in chronic urticaria.

References:

- ¹ 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;136:197-201.
- ² T. Zuberbier, R. Asero, C. Bindslev Jensen, EAACI/GA2LEN/EDF/WAO guideline: management of urticarial, *Allergy* 2009; 64: 1427-1443.
- ³ Schäfer T, Ring J. Epidemiology of urticaria. *Monogr Allergy*. 1993;31:49-60.
- ⁴ Allen P, Kaplan, Malcom W. Greaves. Urticaria and Angioedema. *Informa healthcare* 2009 : 17-18.
- ⁵ Sand FL, Thomsen SF. TNF -Alpha Inhibitors for Chronic Urticaria: Experience in 20 Patients. *J Allergy (Cairo)*. 2013;2013.
- ⁶ Gaig P, Olona M, Muñoz Lejarazu D, Epidemiology of urticaria in Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2004;14(3):214-20.
- ⁷ Ring J, *Allergy in practice*. Heidelberg: Springer, 2005.
- ⁸ Cooper KD. Urticaria and angioedema: diagnosis and evaluation. *J Am Acad Dermatol*. 1991 Jul;25(1 Pt 2):166-74; discussion 174-6.
- ⁹ Cooper KD. Urticaria and angioedema: diagnosis and evaluation. *J Am Acad Dermatol*. 1991 Jul;25(1 Pt 2):166-74; discussion 174-6.
- ¹⁰ Zhong H, Song Z, Chen W, Li H. Chronic urticaria in Chinese population: a hospital-based multicenter epidemiological study. *Allergy*. 2014 Mar;69(3):359-64.
- ¹¹ Sabroe RA, Fiebiger E, Francis DM, Maurer D, Seed PT, Grattan CE, Black AK, Stingl G, Greaves MW, Barr RM. Classification of anti-IgE and anti-IgG autoantibodies in chronic idiopathic urticaria and correlation with disease severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Sep;110(3):492-9.
- ¹² Kasperska-Zajac A, Sztylec J, Machura E, Jop G. Plasma IL-6 concentration correlates with clinical disease activity and serum C-reactive protein concentration in chronic urticaria patients. *Clin Exp Allergy*. 2011;41:1386-91.
- ¹³ Piconi S, Trabattoni D, Iemoli E, Fusi ML, Villa ML, Milazzo F, Clerici M. Immune profiles of patients with chronic idiopathic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002 May; 128(1):59-66.
- ¹⁴ Hermes B, Prochazka AK, Haas N, Jurgovsky K, Sticherling M, Henz BM. Upregulation of TNF-alpha and IL-3 expression in lesional and uninvolved skin in different types of urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Feb; 103(2 Pt 1):307-14.
- ¹⁵ Raap U, Wieczorek D, Gehring M, Pauls I, Ständer S, Kapp A, Wedi B. Increased levels of serum IL-31 in chronic spontaneous urticarial. *Exp Dermatol*. 2010 May;19(5):464-6.
- ¹⁶ Tong LJ, Balakrishnan G, Kochan JP, Kinét JP, Kaplan AP. Assessment of autoimmunity in patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Apr; 99(4):461-5.
- ¹⁷ Piconi S, Trabattoni D, Iemoli E, et al. Immune profiles of patients with chronic idiopathic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;128:59-66.
- ¹⁸ Gao J, Yang A, Chen M, Li A, Yao X, Li Y, Xie S, Yang X, Zhong L, Chen Z. mRNA profiles of cytokine receptors in unstimulated peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic idiopathic urticaria. *J Biomed Res*. 2011 Mar;25(2):141-7.
- ¹⁹ Paoluzi OA, Del Vecchio Blanco G, Caruso R. *Helicobacter pylori* Infection Associates with a Mucosal Downregulation of Ghrelin, Negative Regulator of Th1-Cell Responses *Helicobacter*. *Helicobacter* Volume 18, December 2013, Issue 6, pages 406-412.
- ²⁰ Atwa MA, Emara AS, Youssef N, Bayoumy NM. Serum concentration of IL-17, IL-23 and TNF -α among patients with chronic spontaneous urticaria: association with disease activity and autologous serum skin test. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014 Apr;28(4):469-74.
- ²¹ Staevska M, Popov TA, Kralimarkova T, Lazarova C, Kraeva S, Popova D, et al. The effectiveness of levocetirizine and desloratadine in up to 4 times conventional doses in difficult to- treat urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:676-82.
- ²² Church MK1, Maurer M. H(1)-antihistamines and urticaria: how can we predict the best drug for our patient? *Clin Exp Allergy*. 2012 Oct;42(10):1423-9.
- ²³ 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;58: 621-623.
- ²⁴ Gil Yosipovitch, Malcolm W Greaves, Martin Schmelz. Itch. *The Lancet*. Volume 361, Issue 9358, 22 February 2003, Pages 690-694
- ²⁵ Ucmak D¹, Akkurt M, Toprak G, Yesilova Y, Turan E, Yıldız I. Determination of dermatology life quality index, and serum C-reactive protein and plasma interleukin-6 levels in patients with chronic urticaria. *Postepy Dermatol Alergol*. 2013 Jun;30(3):146-51.
- ²⁶ Bruun JM, Helge JW, Richelsen B, Stallknecht B. Diet and Exercise Reduce Low-grade Inflammation and Macrophage Infiltration in Adipose Tissue but not in Skeletal Muscle in Severely Obese Subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 May;290(5):E961-7
- ²⁷ Yehuda S¹, Sredni B, Carasso RL, Kenigsbuch-Sredni D. REM sleep deprivation in rats results in inflammation and interleukin-17 elevation. *J Interferon Cytokine Res*. 2009 Jul;29(7):393-8.

-
- ²⁸ 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;136:197-201.
- ²⁹ T. Zuberbier, R. Asero, C. Bindslev Jensen, EAACI/GA2LEN/EDF/WAO guideline: management of urticarial, *Allergy* 2009; 64: 1427-1443.
- ³⁰ Schäfer T, Ring J. Epidemiology of urticaria. *Monogr Allergy*. 1993;31:49-60.
- ³¹ Allen P, Kaplan, Malcom W. Greaves. Urticaria and Angioedema. *Informa healthcare* 2009 : 17-18.
- ³² Sand FL, Thomsen SF. TNF-Alpha Inhibitors for Chronic Urticaria: Experience in 20 Patients. *J Allergy (Cairo)*. 2013;2013.
- ³³ Gaig P, Olona M, Muñoz Lejarazu D, Epidemiology of urticaria in Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2004;14(3):214-20.
- ³⁴ Ring J, *Allergy in practice*. Heidelberg: Springer, 2005.
- ³⁵ Cooper KD. Urticaria and angioedema: diagnosis and evaluation. *J Am Acad Dermatol*. 1991 Jul;25(1 Pt 2):166-74; discussion 174-6.
- ³⁶ Cooper KD. Urticaria and angioedema: diagnosis and evaluation. *J Am Acad Dermatol*. 1991 Jul;25(1 Pt 2):166-74; discussion 174-6.
- ³⁷ Zhong H, Song Z, Chen W, Li H. Chronic urticaria in Chinese population: a hospital-based multicenter epidemiological study. *Allergy*. 2014 Mar;69(3):359-64.
- ³⁸ Sabroe RA, Fiebiger E, Francis DM, Maurer D, Seed PT, Grattan CE, Black AK, Stingl G, Greaves MW, Barr RM. Classification of anti-IgE autoantibodies in chronic idiopathic urticaria and correlation with disease severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Sep;110(3):492-9.
- ³⁹ Kasperska-Zajac A, Sztylec J, Machura E, Jop G. Plasma IL-6 concentration correlates with clinical disease activity and serum C-reactive protein concentration in chronic urticaria patients. *Clin Exp Allergy*. 2011;41:1386-91.
- ⁴⁰ Piconi S, Trabattoni D, Iemoli E, Fusi ML, Villa ML, Milazzo F, Clerici M. Immune profiles of patients with chronic idiopathic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002 May; 128(1):59-66.
- ⁴¹ Hermes B, Prochazka AK, Haas N, Jurgovsky K, Sticherling M, Henz BM. Upregulation of TNF-alpha and IL-3 expression in lesional and uninvolved skin in different types of urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Feb; 103(2 Pt 1):307-14.
- ⁴² Raap U, Wieczorek D, Gehring M, Pauls I, Ständer S, Kapp A, Wedi B. Increased levels of serum IL-31 in chronic spontaneous urticarial. *Exp Dermatol*. 2010 May;19(5):464-6.
- ⁴³ Tong LJ, Balakrishnan G, Kochan JP, Kinét JP, Kaplan AP. Assessment of autoimmunity in patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Apr; 99(4):461-5.
- ⁴⁴ Piconi S, Trabattoni D, Iemoli E, et al. Immune profiles of patients with chronic idiopathic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;128:59-66.
- ⁴⁵ Gao J, Yang A, Chen M, Li A, Yao X, Li Y, Xie S, Yang X, Zhong L, Chen Z. mRNA profiles of cytokine receptors in unstimulated peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic idiopathic urticaria. *J Biomed Res*. 2011 Mar;25(2):141-7.
- ⁴⁶ Paoluzi OA, Del Vecchio Blanco G, Caruso R. *Helicobacter pylori* Infection Associates with a Mucosal Downregulation of Ghrelin, Negative Regulator of Th1-Cell Responses *Helicobacter*. *Helicobacter* Volume 18, December 2013, Issue 6, pages 406-412.
- ⁴⁷ Atwa MA, Emara AS, Youssef N, Bayoumy NM. Serum concentration of IL-17, IL-23 and TNF- α among patients with chronic spontaneous urticaria: association with disease activity and autologous serum skin test. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014 Apr;28(4):469-74.
- ⁴⁸ Staevska M, Popov TA, Kralimarkova T, Lazarova C, Kraeva S, Popova D, et al. The effectiveness of levocetirizine and desloratadine in up to 4 times conventional doses in difficult to-treat urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:676-82.
- ⁴⁹ Church MK, Maurer M. H(1)-antihistamines and urticaria: how can we predict the best drug for our patient? *Clin Exp Allergy*. 2012 Oct;42(10):1423-9.
- ⁵⁰ 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;58: 621-623.
- ⁵¹ Gil Yosipovitch, Malcolm W Greaves, Martin Schmelz. Itch. *The Lancet*. Volume 361, Issue 9358, 22 February 2003, Pages 690-694

⁵² Ucmak D¹, Akkurt M, Toprak G, Yesilova Y, Turan E, Yıldız I. Determination of dermatology life quality index, and serum C-reactive protein and plasma interleukin-6 levels in patients with chronic urticaria. *Postepy Dermatol Alergol*. 2013 Jun;30(3):146-51.

⁵³ Bruun JM, Helge JW, Richelsen B, Stallknecht B. Diet and Exercise Reduce Low-grade Inflammation and Macrophage Infiltration in Adipose Tissue but not in Skeletal Muscle in Severely Obese Subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 May;290(5):E961-7

⁵⁴ Yehuda S¹, Sredni B, Carasso RL, Kenigsbuch-Sredni D. REM sleep deprivation in rats results in inflammation and interleukin-17 elevation. *J Interferon Cytokine Res*. 2009 Jul;29(7):393-8.