

Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu



Aleksandra Szczawińska-Popłonyk

**Kompleksowa ocena kliniczna i immunodiagnostyczna
dzieci z zaburzeniami biosyntezy przeciwciał**

Poznań 2012

Spis treści

Objaśnienia skrótów i wyrażeń obcojęzycznych	7
1. WSTĘP	11
1.1 Wprowadzenie	11
1.2 Pierwotne niedobory odporności z przewagą defektu wytwarzania przeciwciał.....	12
1.3 Subpopulacje limfocytów krwi obwodowej	13
1.3.1 Limfocyty B	13
1.3.2 Limfocyty T	15
1.4 Odmienności immunofenotypowe subpopulacji limfocytów krwi obwodowej u dzieci	18
1.5 Odpowiedź immunologiczna związana z przeciwciałami	20
1.5.1 Podklasy IgG	20
1.5.2 Swoiste przeciwciała poszczepienne	23
1.6 Elementy odporności wrodzonej	23
1.6.1 Komórki NK	23
1.6.2 Komórki NKT	25
1.6.3 Integryny	25
1.6.4 Dopelniacz	25
1.7 Immunoregulacyjna funkcja witaminy D3	27
2. CEL PRACY	30
2.1 Cel główny	30
2.2 Cele szczegółowe	30
3. MATERIAŁ I METODY	31
3.1 Materiał	31
3.1.1 Charakterystyka kliniczna grupy badanej	31
3.1.2 Wywiad rodzinny	32
3.1.3 Kryteria kliniczno-laboratoryjne udziału w badaniu	33
3.1.4 Schemat badania	35
3.1.4.1 Etapy badania	35
3.2 Metody	36
3.2.1 Ocena kliniczna	36
3.2.2 Pobieranie materiału biologicznego od pacjentów	37
3.2.3 Morfologia krwi obwodowej i rozmaz krwinek białych	37
3.2.4 Klasy główne immunoglobulin	37

3.2.5 Stężenie składowych dopełniacza	38
3.2.6 Przygotowanie komórek i immunofenotypowanie leukocytów krwi obwodowej	38
3.2.7 Podklasy IgG	40
3.2.8 Swoiste przeciwciała poszczepienne	41
3.2.8.1 Przeciwciała swoiste przeciwko toksoidowi tężcowemu	41
3.2.8.2 Przeciwciała swoiste przeciwko toksoidowi błoniczemu	42
3.2.8.3 Przeciwciała swoiste przeciwko polisacharydowi <i>Haemophilus influenzae</i> typu b	43
3.2.8.4 Przeciwciała swoiste przeciwko antygenowi HBs wirusa zapalenia wątroby typu B ...	44
3.2.9 Badanie stężenia 25(OH)D3 w surowicy	44
3.2.10 Badanie mikrobiologiczne płwociny lub wydzieliny z dróg oddechowych	45
3.2.11 Analiza statystyczna	46
4. WYNIKI BADAŃ	48
4.1 Subpopulacje limfocytów B	49
4.1.1 Limfocyty B	49
4.1.2 Limfocyty B niedojrzałe	51
4.1.3 Limfocyty B przejściowe	52
4.1.4 Limfocyty B naiwne	53
4.1.5 Limfocyty B pamięci	54
4.1.6 Plazmablasty	56
4.2 Odpowiedź immunologiczna związana z przeciwciałami	63
4.2.1 Podklasy IgG	63
4.2.2 Antygenowo-swoiste przeciwciała poszczepienne	66
4.2.2.1 Przeciwciała anti-HBs	66
4.2.2.2 Przeciwciała przeciwko toksoidowi tężcowemu.....	67
4.2.2.3 Przeciwciała przeciwko toksoidowi błoniczemu.....	69
4.2.2.4 Przeciwciała anti- PRP Hib	71
4.3 Subpopulacje limfocytów T	78
4.3.1 Tymocyty	78
4.3.2 Limfocyty T CD4+ i CD8+	78
4.3.3 Ekspresja izoform CD45RA/CD45RO na limfocytach T CD4+	81
4.3.4 Ekspresja późnego markera aktywacji HLA-DR na limfocytach T	82
4.4 Elementy odporności wrodzonej	87
4.4.1 Komórki NK	87
4.4.2 Komórki NKT	88

4.4.3 Ekspresja integryn	89
4.4.4 Składowe dopełniacza	90
4.5 Stężenie 25(OH)D3	95
4.6 Flora bakteryjna dróg oddechowych	97
5. DYSKUSJA	99
6. WNIOSKI	115
7. STRESZCZENIE	117
8. SUMMARY	120
9. PIŚMIENNICTWO	124

Objaśnienia skrótów i wyrażeń obcojęzycznych

AID	– Activation-induced cytidine deaminase, indukowana dezaminaza cytydyny
ALPS	– Autoimmune lymphoproliferative syndrome, autoimmunizacyjny zespół limfoproliferacyjny
APC	– Antigen presenting cells, komórki prezentujące antygen
AT	– Ataxia-telangiectasia, ataksja telangiektazja
BCR	– B-cell receptor, receptor limfocyta B
BM	– Bone marrow, szpik kostny
C	– Complement, dopełniacz
C3	– Składowa C3 dopełniacza
C4	– Składowa C4 dopełniacza
CAMP	– Cathelicidin antimicrobial peptide, peptyd przeciwdrobnoustrojowy katelicydyna
CD	– Cluster of differentiation, antygen różnicowania
CMV	– Cytomegalovirus, wirus cytomegalii
CR	– Complement receptor, receptor składowej dopełniacza
CSR	– Class switch recombination, przełączenie klas immunoglobulin
CVID	– Common variable immunodeficiency – pospolity zmienny niedobór odporności
CXCL	– CXC chemokine, chemokina CXC
DEFB	– Beta-defensin, beta-defensyna
Diphtheria	- Błonica
DN	– Tymocyty podwójnie ujemne
DP	– Tymocyty podwójnie dodatnie
EBV	– Epstein-Barr virus, wirus Epsteina-Barra
EDTA	– Ethylenediaminetetraacetate, kwas etylenodiaminotetraoctowy
ESID	– European Society for Immunodeficiencies, Europejskie Towarzystwo Niedoborów Odporności
ETP	– Early thymic progenitors, wczesne progenitory limfopoezy
EUCAST	– European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości
Fab	– Fragment antygen-binding, fragment wiążący antygen immunoglobuliny
Fc	– Fragment cristallisable, fragment krystalizujący immunoglobuliny
FcγR	– Receptor fragmentu Fc immunoglobuliny G
FGD	– Familial glucocorticoid deficiency, rodzinny niedobór glikokortykosteroidów
FITC	– Fluorescein isothiocyanate, izotiocyanian fluoresceiny

FMF	– Familial Mediterranean fever, rodzinna gorączka śródziemnomorska
GM-CSF	– Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, czynnik stymulujący kolonie granulocytów i makrofagów
GC	– Germinal center, ośrodek rozmnażania
HBsAg	– Hepatitis B virus surface antygen, antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B
hCAP	– Human cathelicidin antimicrobial peptide, ludzki peptyd przeciwdrobnoustrojowy katelicydyna
Hib	– <i>Haemophilus influenzae</i> typu B
HIGM	– Hyperimmunoglobulin M syndrome, zespół hiperimmunoglobulinemii M, hiper-IgM
HIV	– Human immunodeficiency virus, ludzki wirus niedoboru odporności
HLA-DR	– Human Leucocyte Antigen-DR, ludzki antygen leukocytarny DR
IFN	– Interferon
Ig	– Immunoglobulina
IgD	– Immunoglobulina D
IgG	– Immunoglobulina G
IgM	– Immunoglobulina M
IL	– Interleukina
Immature B cells	– Limfocyty B niedojrzałe
ISP	– Immature single positive thymocytes, niedojrzałe tymocyty pojedynczo dodatnie
IUIS	– International Union of Immunological Societies, Międzynarodowa Unia Towarzystw Immunologicznych
JMF	– the Jeffrey Modell Foundation, Fundacja Jeffrey Modell
KIR	– Killer cell inhibitory receptor, receptor hamujący zabijanie komórek
LFA	– Lymphocyte function antigen, antygen czynnościowy limfocytów
Mac	– Macrophage antigen, antygen makrofagów
MALT	– Mucosa-associated lymphatic tissue, tkanka chłonna związana z błonami śluzowymi
Map	– Mannan binding lectin (MBL)-associated protein, białko związane z MBL
MASP	– Mannan binding lectin (MBL)-associated serine protease, proteaza serynowa związana z MBL
MBL	– Mannan binding lectin, lektyna wiążąca mannozę
Memory B cells	– Limfocyty B pamięci
MHC	– Major histocompatibility complex, główny układ zgodności tkankowej
MIC	– Minimal inhibitory concentration, minimalne stężenie hamujące

MSSA	– Methicillin-sensitive <i>Staphylococcus aureus</i> , gronkowiec złocisty metycylinowrażliwy
MZL	– Marginal zone lymphocytes, limfocyty strefy brzeżnej śledziony
Naïve B cells	– Limfocyty B naiwne
NBS	– Nijmegen Breakage Syndrome, zespół Nijmegen
N-CAM	– Neural cell adhesion molecule – cząsteczka adhezyjna komórek nerwowych, siarczan heparanu
NF	– Nuclear factor, czynnik jądrowy
NK	– Natural killer, komórki naturalni zabójcy
Non-switched memory B cells	– Limfocyty B nieprzełączone
PAMP	– Pathogen-associated molecular pattern, wzorzec molekularny związany z patogenem
PB	– Peripheral blood, krew obwodowa
PBS	– Phosphate-buffered saline, sól fizjologiczna buforowana fosforanami
PE	– Phicoerythrin, fikoerytryna
PNO	– Pierwotne niedobory odporności
PRP	– fosforan polirybozylorybitolu, polisacharyd otoczkowy <i>Haemophilus influenzae</i> typu b
PRR	– Pattern recognition receptor, receptor rozpoznający wzorzec
RANTES	– Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted, CCL5 chemokine, chemokina CCL5
RBE	– Recent bone marrow emigrants, limfocyty opuszczające szpik kostny
RSV	– Wirus RS
RTE	– Recent thymic emigrants, limfocyty opuszczające grasnicę
SCID	– Severe combined immunodeficiency, ciężki złożony niedobór odporności
SHM	– Somatic hypermutation, hipermutacja somatyczna
slg	– Surface immunoglobulin, immunoglobulina powierzchniowa
Switched memory B cells	– Limfocyty B po przełączeniu klas, limfocyty B przełączone
TCR	– T lymphocyte receptor, receptor limfocyta T
TD	– Thymus-dependent, grasiczozależny
Tetanus	– Tężec
Th	– T helper lymphocyte, limfocyt T pomocniczy
THI	– Transient hypogammaglobulinemia of infancy, przejściowa hipogammaglobulinemia niemowląt
TI	– Thymus-independent, grasiczniezależny

TLR	– Toll-like receptor, receptor Toll-podobny
TMB	– Tetrametylbenzydyna
TNF	– Tumor necrosis factor, czynnik martwicy nowotworu
Transitional B cells	– Limfocyty B przejściowe
TRIS	– Trometamina
VDR	– Vitamin D receptor, receptor witaminy D
Wzwb	– Wirusowe zapalenie wątroby typu B
XLP	– X-linked lymphoproliferative syndrome, zespół limfoproliferacyjny sprzężony z chromosomem X

1. WSTĘP

1.1 Wprowadzenie

Pierwotne niedobory odporności (PNO) stanowią zróżnicowaną genetycznie i klinicznie grupę schorzeń charakteryzujących się zaburzeniami różnicowania i dojrzewania komórek, a także budowy oraz funkcji narządów układu odpornościowego. W opublikowanym w 2009 roku raporcie Komitetu Ekspertów Pierwotnych Niedoborów Odporności Międzynarodowej Unii Towarzystw Immunologicznych (International Union of Immunological Societies, IUIS) przedstawiono aktualną klasyfikację pierwotnych zaburzeń odporności w aspekcie fenotypowym, diagnostycznym oraz genetyczno-patogenetycznym [1].

Symptomatologia pierwotnych niedoborów odporności wynika najczęściej ze zwiększonej podatności na zakażenia, choć może być znacznie zróżnicowana i w niektórych przypadkach manifestacja związana z alergią, autoimmunizacją lub procesem limfoproliferacyjnym odgrywa pierwszoplanową rolę w obrazie choroby. Nieodwracalne powikłania narządowe pogarszają rokowanie w pierwotnych niedoborach odporności, a ryzyko ich wystąpienia jest zwiększone w przypadku opóźnionego rozpoznania [2]. Upośledzenie jakości życia pacjentów wraz z postępem choroby jest również istotnym, chociaż rzadziej podkreślanym w literaturze problemem.

Dane te stanowią przesłanki do podejmowania intensywnych wysiłków dla poprawy dostępności i jakości diagnostyki immunologicznej celem skutecznego, wczesnego ustalenia rozpoznania PNO, a także poprawy wielospecjalistycznej opieki nad chorymi dziećmi.

Wytyczne dotyczące oceny klinicznej i postępowania diagnostycznego w pierwotnych niedoborach odporności, adresowane zarówno do pediatrów, jak i immunologów, zawarte są w szeregu publikacji o charakterze edukacyjnym [3,4,5], jak i w sprawozdawczych dokumentach z kampanii informacyjnych i szkoleniowych [6,7] oraz raportach dotyczących strategii zdrowia publicznego [8]. Specjaliści immunologii klinicznej w Polsce mają swój czynny wkład w prace Europejskiego Towarzystwa Niedoborów Odporności (European Society for Immunodeficiencies, ESID) na polu określenia epidemiologii, kliniki i immunodiagnostyki pierwotnych niedoborów odporności w ramach tworzonej w latach 2006-2008 internetowej bazy danych [9]. Fundacja Jeffrey Modell (the Jeffrey Modell Foundation, JMF), wspierająca w Stanach Zjednoczonych wysiłki środowiska medycznego na rzecz pierwotnych niedoborów odporności na polu edukacyjnym i naukowym, rozszerzyła swoją działalność na kraje europejskie. Aktywność ta zaowocowała między innymi przeniesieniem na grunt europejski prowadzonych od 2005 roku w wybranych ośrodkach w Stanach Zjednoczonych, badań skринingowych noworodków w kierunku pierwotnych niedoborów

odporności. Otwarcie filii fundacji w ośrodkach immunologii klinicznej w Polsce stwarza dalszą perspektywę rozwoju diagnostyki i terapii tej grupy schorzeń w naszym kraju.

Niniejsza monografia stanowi podsumowanie własnych zainteresowań naukowych i doświadczeń klinicznych w dziedzinie pierwotnych niedoborów odporności. Przedstawiony indywidualny schemat oceny parametrów klinicznych i immunodiagnostycznych w wybranej grupie dzieci z podejrzeniem PNO, służący badaniu różnicowania i dojrzewania elementów odpowiedzi immunologicznej oraz ewentualnemu prognozowaniu przebiegu choroby, stanowi wkład w formułowanie zasad rozpoznawania pierwotnych niedoborów odporności.

1.2 Pierwotne niedobory odporności z przewagą defektu wytwarzania przeciwciał

Spośród pierwotnych niedoborów odporności, najliczniejszą kategorię stanowią zaburzenia związane z dominującym defektem wytwarzania przeciwciał [10]. Zgodnie z najnowszymi danymi Rejestru Europejskiego Towarzystwa Niedoborów Odporności z 2010 roku (<http://www.esid.org/statistics.php?sub=2>), odpowiedzialne są one za 56% wszystkich PNO. Reprezentują one zróżnicowane patofizjologicznie i klinicznie spektrum schorzeń, od często asymptomatycznego selektywnego niedoboru IgA i niedoboru podklas IgG, aż po wrodzone agammaglobulinemie, w których wytwarzanie wszystkich izotypów immunoglobulin jest głęboko upośledzone. W populacji pediatrycznej na około 80% pierwotnych niedoborów odporności związanych z zaburzeniami wytwarzania przeciwciał składają się: selektywny niedobór IgA, niedobór podklas IgG, przejściowa hipogammaglobulinemia niemowląt oraz niedobór przeciwciał swoistych przeciwko antygenom polisacharydowym [11,12]. U części pacjentów, nie spełniających kryteriów diagnostycznych żadnego z pierwotnych niedoborów odporności, hipogammaglobulinemia ma charakter „nieokreślony” [13].

Zasadniczą cechą tej grupy zaburzeń odporności jest defekt produkcji antygenowo-swoistych przeciwciał, będących niezbędnym elementem adaptywnej odpowiedzi immunologicznej przeciwko różnego rodzaju patogenom. Pacjenci manifestują zwiększoną predyspozycję do zakażeń, przede wszystkim o etiologii bakteryjnej, najczęściej o umiejscowieniu w obrębie górnych i dolnych dróg oddechowych. Typowymi patogenami wywołującymi nawracające i przewlekłe infekcje układu oddechowego są *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae*, ale rola wirusów pneumotropowych jako czynników odgrywających rolę w zaostrzeniu przebiegu choroby dróg oddechowych i płuc jest również istotna [14,15].

Mija właśnie 60 lat od czasu pierwszego doniesienia autorstwa Ogdena Brutona na temat agammaglobulinemii, opublikowanego w 1952 r w „Pediatrics”[16]. Od tego czasu zidentyfikowanych zostało 18 defektów genetycznych, leżących u podłoża kilku ważnych jednostek chorobowych

związanych z zaburzeniami wytwarzania przeciwciał, dotyczących zarówno wewnętrznych szlaków aktywacji limfocytów B, jak i ich receptorów lub ligandów [17]. Postęp immunogenetyki umożliwił wgląd w patomechanizm wielu z tych schorzeń, choć w części z nich, związanej z zaburzeniami na etapie różnych stadiów różnicowania i dojrzewania limfocytów B, nie został on jeszcze wyjaśniony. Ponadto, na różnorodność obrazu klinicznego wpływać mogą dodatkowe determinanty, takie jak genetyczne czynniki modyfikujące, wiek pacjenta oraz uwarunkowania środowiskowe [18,19].

Opracowany przez ekspertów Europejskiego Towarzystwa Niedoborów Odporności wieloetapowy protokół diagnostycznych badań przesiewowych w kierunku PNO z grupy defektów wytwarzania przeciwciał [4] służy przede wszystkim jako narzędzie edukacyjne, mając w pierwszym rzędzie na celu zwiększenie świadomości i poszerzenie wiedzy lekarzy na temat tych schorzeń, ale nie zawiera on informacji na temat zaburzeń różnicowania i dojrzewania subpopulacji limfocytów krwi obwodowej. Jednakże, w celu wczesnego, precyzyjnego ustalenia ostatecznego rozpoznania pierwotnego niedoboru odporności i zastosowania prawidłowego postępowania leczniczego, niezbędna jest znajomość mechanizmów immunopatologicznych.

1.3 Subpopulacje limfocytów krwi obwodowej

1.3.1 Limfocyty B

Rozwój limfocytów B zachodzi w dwóch głównych etapach o różnej lokalizacji tkankowej. Pierwsze stadium polega na różnicowaniu prekursorów limfocytów B z komórek hematopoetycznych pnia do naiwnych (naïve) limfocytów B w szpiku kostnym, zaś w stadium drugim następuje ich dojrzewanie do komórek efektorowych i komórek pamięci (memory cells) w obwodowych narządach limfatycznych – węzłach chłonnych, śledzionie i układzie chłonnym związanym z błonami śluzowymi (mucosa-associated lymphatic tissue, MALT). Dynamiczne zmiany w zakresie obwodowej puli limfocytów B w rozwoju ontogenetycznym, jak również proces krążenia tych komórek pomiędzy narządami limfatycznymi poprzez krew obwodową odzwierciedlają osobniczy status immunologiczny, a także zaburzenia biologii i homeostazy tych komórek, stwierdzone w pierwotnych niedoborach odporności.

Etapy różnicowania i dojrzewania obwodowej puli limfocytów B wyróżniane są przy pomocy immunofenotypowania metodą cytometrii przepływowej i identyfikacji specyficznych antygenów różnicowania (cluster of differentiation, CD). Opuszczające szpik kostny niedojrzałe (immature) limfocyty B, we krwi obwodowej obecne w kolejnym stadium dojrzewania i określane jako limfocyty B przejściowe (transitional) (recent bone marrow emigrants, RBE), cechują się ekspresją cząsteczek związanych z receptorem komórek B (B-cell receptor, BCR), takich jak CD19, CD20, CD22 czy CD45 i posiadają powierzchniowe immunoglobuliny IgM i IgD (sIgM i sIgD, odpowiednio). Niedojrzałe

limfocyty B zachowują także ekspresję markerów związanych z wewnątrzkomórkowym przekazywaniem sygnału i charakterystycznych dla wczesnych faz rozwoju w szpiku kostnym, które albo nie są obecne, jak CD38 i CD10 lub cechują się małą intensywnością, jak CD24, w dojrzałych limfocytach B naiwnych i limfocytach B pamięci [20,21]. Komórki te w aspekcie czynnościowym charakteryzuje odpowiedź na antygeny niezależne od limfocytów T typu 1, takie jak lipopolisacharydy, które wywołują szybkie powstawanie przeciwciał bez pomocy limfocytów T zachodzącej w kontekście antygenów MHC klasy II [22]. Niedojrzałe limfocyty B wykazują ponadto homogeną ekspresję CD5 i niższą niż dojrzałe naiwne limfocyt B ekspresję CD21; fakt ten odgrywać może rolę w zapobieganiu aktywacji tych komórek na obwodzie [21]. Naiwne limfocyty B mają niezmutowany region IgV i wykazują ko-ekspresję IgM i IgD oraz, podobnie jak na niedojrzałych limfocytach B, obecne są na ich powierzchni markery związane z BCR, takie jak CD19, CD20, CD22 i CD45, natomiast w porównaniu do tych ostatnich, intensywność ekspresji antygeny CD21 jest na limfocytach naiwnych większa.




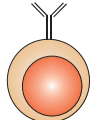
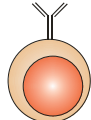
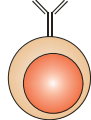
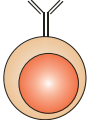
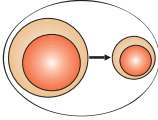
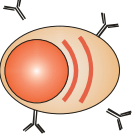
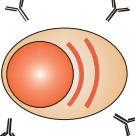
Posługując się antygenem CD27 jako markerem reakcji w ośrodkach rozmnażania (germinal center, GC), charakterystycznym dla limfocytów B pamięci wraz z oceną powierzchniowej IgD, we krwi obwodowej wyróżnić można komórki IgD+CD27- , odpowiadające limfocytom B naiwnym oraz pulę limfocytów B pamięci CD27+[23]. Równoczesna ekspresja IgD i CD27 cechuje limfocyty B pamięci nieprzełączone, w których nie doszło do przełączenia klas Ig (non-switched memory B cells), odpowiadające limfocytom B strefy brzeżnej śledziony (marginal zone-like B cells, MZL), zaś utrata ekspresji IgD na komórkach B CD27+ charakteryzuje limfocyty B po przełączeniu klas Ig (switched memory B cells). Na poziomie molekularnym limfocyty B pamięci, zarówno IgD+, jak i IgD- odznaczają hipermutacje somatyczne (somatic hypermutation, SHM) i przełączenie klas immunoglobulin (immunoglobulin class-switch recombination, CSR) [21]. Pod względem czynnościowym komórki pamięci CD27+IgD+ uważane są za wykładnik odpowiedzi humoralnej niezależnej od limfocytów T przeciwko antygenom typu 2, między innymi polisacharydom bakterii otoczkowych [24].

Podczas różnicowania limfocytów naiwnych do komórek B pamięci, następuje zwiększenie powinowactwa do antygeny oraz zmiana ekspresji szeregu receptorów powierzchniowych, które wzmacniają interakcje z limfocytami T pomocniczymi (T helper, Th) i umożliwiają powstanie z nich komórek wytwarzających przeciwciała [25,26]. Nowopowstałe populacje komórek B CD19+ we krwi obwodowej to plazmablasty o fenotypie CD20-CD24-CD38+CD138- oraz plazmocyty CD20-CD24-CD38+CD138+, recyrkulujące w stanie równowagi pomiędzy przedziałami krwi obwodowej i szpiku kostnego i będące najważniejszym źródłem przeciwciał o wysokim powinowactwie do antygenów [27]. Stadia rozwojowe limfocytów B z uwzględnieniem najważniejszych antygenów różnicowania oraz ekspresji i rearanżacji genów, wg [21], przedstawione zostały na rycinie 1.

1.3.2 Limfocyty T

Limfocyty T pochodzą z hematopoetycznych komórek pnia szpiku kostnego, które jako progenitory migrują poprzez krew obwodową do grasicy, będącej podstawowym miejscem ich dojrzewania. Rozwój limfocytów T w grasicy obejmuje stadia, które wyróżniane są na podstawie ekspresji koreceptorów CD4 i CD8. Najbardziej niedojrzałe komórki, wczesne progenitory tymopoezy (early thymic progenitors, ETP) określane są jako potrójnie negatywne, nie posiadają bowiem ani kompleksu TCR-CD3, ani antygenów CD4 i CD8. Wczesne etapy dojrzewania tymocytów są wspólne dla prekursorów limfocytów T linii $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$. Pod koniec tej fazy w niedojrzałych prekursorach wzrasta ekspresja antygeny CD3 i czynnościowego receptora TCR (T cell receptor) i komórki te przyjmują fenotyp CD3+CD4-CD8- (tymocyty podwójnie ujemne, DN). W kolejnym etapie rozwoju w niedojrzałych limfocytach CD3+CD4+CD8- lub CD3+CD4-CD8+ (ISP) zachodzi rearanżacja genu *TCRB*, przekazywanie sygnału przez pre-TCR warunkuje przeżycie komórek i dalszy rozwój [28]. Limfocyty CD3+CD4+CD8+ (tymocyty podwójnie dodatnie, DP), które stanowią około 80% wszystkich elementów komórkowych grasicy, intensywnie proliferują i zaczynają rearanżować segmenty genów kodujących podjednostki receptora TCR, będąc źródłem subpopulacji $\alpha\beta$ oraz $\gamma\delta$ limfocytów T [29].

Limfocyty T podwójnie dodatnie ulegają w grasicy selekcji pozytywnej i negatywnej, które to zjawisko odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu tolerancji wobec własnych tkanek. Podwójnie dodatnie tymocyty, w których zachodzi selekcja β polegająca na prawidłowej rearanżacji genów kodujących łańcuch β oraz, po rearanżacji genów *V* i *J* łańcucha α , powstanie TCR, poddawane są selekcji pozytywnej. Celem tego procesu jest wyłonienie tych komórek, które mają zarówno prawidłowo wytworzony TCR, jak i poprzez ten receptor w prawidłowy sposób potrafią rozpoznawać obce peptydy prezentowane przez autogeniczne cząsteczki MHC. Selekcja negatywna prowadzi natomiast do eliminacji w mechanizmie apoptozy tych tymocytów, które rozpoznają prezentowane im własne narządowo-swoiste antygeny ze zbyt dużym powinowactwem. Zjawisko selekcji pozytywnej i negatywnej prowadzi w efekcie do eliminacji klonów potencjalnie autoreaktywnych lub posiadających nieprawidłowy TCR, a za najistotniejszy czynnik warunkujący właściwy sygnał przez ten receptor jest jego optymalna awidność do prezentowanych peptydów. W przebiegu selekcji pozytywnej dochodzi jednocześnie do restrykcji MHC (major histocompatibility complex, główny układ antygenów zgodności tkankowej), prowadzącej do powstania limfocytów T zawierających antygen CD4 lub CD8 i rozpoznających antygeny w kontekście cząsteczek MHC klasy II lub klasy I, odpowiednio [30].

Lokalizacja	BM					PB	GC	PB	BM/ MALT/ Śledziona
Antygeny różnicowania									
	Pro-B CD10 CD22 CD34 CD45 ^{lo}	Pre-B-I CD10 ^{hi} CD19 CD22 CD34 CD38 CD45 ^{lo}	Pre-B-II CD10 CD19 CD20 ⁷⁺ CD22 CD38 CD45 Cy-Ig	Nieojrzały limfocyt B CD10 ^{lo} CD 19 CD 20 CD22 CD38 CD45	Naiwny limfocyt B CD19 CD20 CD22 ^{hi} CD45 ^{hi} sIgM/D	Nieojrzały limfocyt B CD10 ^{+/+} CD19 CD20 CD22 CD23 ^{+/+} CD38 ^{+/+} CD45 ^{hi} sIgM/D	 Limfocyt B GC CD10 CD19 CD20 ^{hi} CD27 ^{het} CD38 CD44 ^{lo} CD45 ^{hi}	 Plazmablast / Plazmocyt CD19 CD20 ^{+/+} CD27 ^{hi} CD38 ^{hi} CD45 CD138 ^{+/+} sIgM/G/A/D/ sIg ^{neg}	 Komórka plazmatyczna CD19 CD27 CD38 ^{hi} CD45 CD138 sIg ^{neg}
Ekspresja genów	RAG TdT Pax5	RAG TdT Pax5	RAG TdT Pax5	RAG Pax5	Pax5	Pax5	Pax5	Pax5	
Rearanżacja genów	V _H -D-J _H	V _H -D-J _H -μ V _L -J _L -κ	V _L -J _L -κ/λ	V _L -J _L -κ/λ	V(D)J-μ V(D)J-δ				

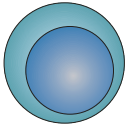
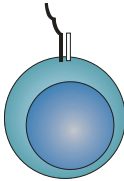
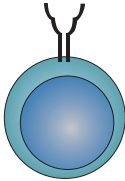
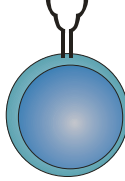
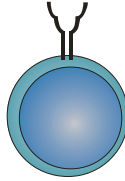
Rycina 1. Stadia rozwojowe limfocytów B z uwzględnieniem antygenów różnicowania oraz ekspresji i rearanżacji genów

Komórki, które zakończyły rozwój w grasicy i przemieszczają się do przedziału krwi obwodowej (recent thymic emigrants, RTE), tworzą pulę najbardziej niedojrzałych, różniących się od dojrzałych, choć naiwnych limfocytów T. Homeostaza obwodowej puli limfocytów T zapewniona jest dzięki wymianie i recyrkulacji pomiędzy limfocytami T na obwodzie i komórkami opuszczającymi grasicę, w którym to procesie odgrywa rolę ekspresja antygeny CD24 [31]. Na rycinie 2 przedstawiono stadia rozwojowe limfocytów T z uwzględnieniem najważniejszych antygenów różnicowania oraz ekspresji i rearanżacji genów, wg [29].

Dojrzałe limfocyty T definiowane są poprzez ekspresję markerów CD3 i CD4 na limfocytach pomocniczych lub CD3 i CD8 na limfocytach supresyjno-cytotoksycznych, zaś zróżnicowanie pomiędzy limfocytami T naiwnymi a komórkami pamięci umożliwia badanie obecności izoform CD45RA i CD45RO, odpowiednio. Szczegółowe immunofenotypowanie subpopulacji limfocytów T krwi obwodowej pozwala na wyróżnienie także pomocniczych i cytotoksycznych komórek pamięci centralnych i efektorowych, zależnie od ekspresji antygeny CD27 [32].

Jedną z najliczniej reprezentowanych molekuł na powierzchni limfocytów jest CD45, zidentyfikowana jako przezbłonowa fosfataza tyrozynowa, odgrywa kluczową rolę w efektywnym przewodzeniu sygnału przez receptor antygenowy na limfocytach T [33,34]. Ekspresja różnych izoform CD45 zależna jest od poszczególnych subpopulacji komórkowych, ich stadium różnicowania, wcześniejszej ekspozycji na antygen, a także stopnia aktywacji. Limfocyty T naiwne, na których identyfikowana jest izoforma o dużej masie cząsteczkowej, określane są jako komórki T CD45RA, zaś ekspresja izoformy o małej masie cząsteczkowej pozwala na wyróżnienie limfocytów T CD45RO [35]. Cząsteczka CD45 nie tylko odgrywa kluczową rolę w przekazywaniu sygnału aktywującego limfocyty T poprzez kompleks CD3-TCR, CD4/CD8 oraz CD2 [36], ale komórki T CD4+CD45RO spełniają także funkcję pomocniczą wobec limfocytów B i indukują sekrecję IgG [37]. Hipotetycznie zaburzenia w zakresie fenotypowej konwersji limfocytów T naiwnych do komórek T pamięci oraz związane z odchyleniami ekspresji markera CD45 nieprawidłowości w odpowiedzi immunologicznej na stymulację antygenową stwarzać mogą podłoże dla upośledzenia wytwarzania przeciwciał.

Specyficzna ekspresja powierzchniowych molekuł zaangażowanych w rozpoznawanie antygenów i aktywację limfocytów T odzwierciedla zależne od czasu inicjowanie i regulowanie odpowiedzi immunologicznej. Występowanie klasycznych antygenów głównego układu zgodności tkankowej (major histocompatibility complex, MHC) klasy II ograniczone jest przede wszystkim do limfocytów B oraz komórek prezentujących antygen (antygen presenting cells, APC), takich jak makrofagi, monocyty i komórki dendrytyczne, ale charakterystycznym zjawiskiem jest ekspresja antygeny HLA-DR także na aktywowanych limfocytach T. Ocena aktywacji limfocytów T oparta na analizie występowania markera HLA-DR może być pośrednio także odzwierciedleniem stymulacji limfocytów B i syntezy przeciwciał.

Lokalizacja	Grasica				GC/ MALT/ Śledziona
Antygeny różnicowania	 Pro-T CD25 CD44	 Pre-T CD25 CD44	 DP TCR/ CD3 ^{lo} CD4 CD8	 SP niedojrzały limfocyt T TCR/ CD3 ^{hi} CD4 lub CD8	 Naiwny dojrzały limfocyt T TCR/ CD3 ^{hi} CD4 lub CD8
Ekspresja genów	RAG TdT	RAG			
Rearanżacja genów	DNA linii zarodkowej	V(D)J-C pre TCR α TCR β	V(D)J-C TCR α TCR β	V(D)J-C TCR α TCR β	V(D)J-C TCR α TCR β

Rycina 2. Stadia rozwojowe limfocytów T z uwzględnieniem antygenów różnicowania oraz ekspresji i rearanżacji genów

1.4 Odmienności immunofenotypowe subpopulacji limfocytów krwi obwodowej u dzieci

Immunofenotypowanie limfocytów krwi obwodowej metodą cytometrii przepływowej jest szczególnie ważnym narzędziem diagnostycznym w rozpoznawaniu pierwotnych niedoborów odporności. Dynamiczny rozwój i dojrzewanie układu odpornościowego w dzieciństwie implikuje różnice dotyczące zarówno bezwzględnej wielkości puli limfocytów, jak i w zakresie względnych wartości poszczególnych subpopulacji i ich stosunku względem siebie. Pierwsze doniesienia na temat analizy immunofenotypowej limfocytów krwi obwodowej celem opracowania wartości referencyjnych dla populacji pediatrycznej, zawdzięczane są autorom polskim [38] oraz zespołowi van Dongena [39,40,41], a badania te następnie kontynuowane są przez szereg innych zespołów badawczych. Prześledzenie dynamiki zmian składu i wzajemnych proporcji składowych puli limfocytów krwi obwodowej u dzieci nie tylko wymaga zastosowania kryterium wiekowego, ale w interpretacji wyników badań cytometrycznych powinny być uwzględnione także inne istotne czynniki, jak infekcje czy stosowane leczenie immunosupresyjne.

Bezwzględna liczba limfocytów zwiększa się natychmiast po urodzeniu 1,3-krotnie, pozostaje następnie względnie stała do wieku 2 lat, odkąd stopniowo zmniejsza się trzykrotnie do wieku dorosłego. Podobną dynamiką cechują się limfocyty B CD19+, których liczba podwaja się w ciągu pierwszych 5 miesięcy życia i następnie od wieku 2 lat do wieku dorosłego zmniejsza się 6,5-krotnie.

Również limfocyty T CD3+ wykazują zwiększenie ich liczby 1,5-krotnie po urodzeniu, a u dzieci od 2 lat do wieku dorosłego ich liczba trzykrotnie zmniejsza się. Podobny wzorzec dynamiki cechuje komórki subpopulacji CD3+CD4+, z kolei liczba limfocytów T CD3+CD8+ pozostaje stabilna do wieku 2 lat i stopniowo trzykrotnie zmniejsza się do wieku dorosłego. Zwiększona po urodzeniu liczba aktywowanych limfocytów T CD3+HLA-DR+ pozostaje stała aż do 10 roku życia, a następnie zmniejsza się. Znaczenie biologiczne zjawiska dynamicznych zmian w zakresie zarówno liczby bezwzględnej, jak i względnych wartości puli limfocytów jako całości, jak i poszczególnych ich subpopulacji odzwierciedla nabywanie kompetencji immunologicznej, wynikającej z kontaktu antygenowego. W przeciwieństwie do limfocytów B i T, liczba bezwzględna komórek NK zmniejsza się w ciągu pierwszych dwóch miesięcy życia i później pozostaje stała [39]. Autorzy tej szerokiej, dokonanej w oparciu o materiał od 429 dzieci od okresu noworodkowego do wieku 16 lat, analizy podkreślają, że zmianom w zakresie bezwzględnej liczby subpopulacji limfocytów nie zawsze towarzyszą zmiany ich wartości względnych. Ilustruje to na przykład dynamika zmian liczby limfocytów T CD3+, których wartości bezwzględne, jak opisano powyżej, od wieku 2 lat do wieku dorosłego zmniejszają się, natomiast wartości względne pozostają stałe na poziomie od 64 do 72%. Podobnie, pomimo stałej w dzieciństwie liczby bezwzględnej komórek NK, stwierdza się relatywny wzrost wartości procentowych tych komórek, będący wynikiem stopniowego zmniejszania się liczby limfocytów B i T [39]. W interpretacji parametrów immunohematologicznych i wyciąganiu wniosków implikujących ustalenie rozpoznania niedoboru odporności, konieczna jest ocena przede wszystkim bezwzględnej wielkości populacji limfocytów, w odniesieniu do właściwego przedziału wiekowego.

Szczegółowa analiza stadiów dojrzewania limfocytów B także wykazuje zmiany składu subpopulacji tych komórek zależne od wieku i najbardziej intensywne w ciągu pierwszych pięciu lat życia. Odzwierciedlają one zjawisko nabywania kompetencji immunologicznej zachodzące w wyniku kontaktu z antygenami. Dawka, warunki mikrośrodowiska i czas ekspozycji na antygeny mają więc kluczowe znaczenie dla modulowania profilu adaptywnej odpowiedzi immunologicznej w pierwszych latach życia dziecka. W tym czasie istotnemu zmniejszeniu ulega zarówno liczba bezwzględna, jak i wartość procentowa niedojrzałych oraz naiwnych limfocytów B. W odniesieniu do komórek B pamięci, o fenotypie CD27+IgD+ („non-switched”), jak i po przełączeniu klas, CD27+IgD- („switched”), obserwuje bardziej złożoną dynamikę, mianowicie wartość procentowa obu subpopulacji powoli rośnie, podobnie jak liczba bezwzględna w przypadku komórek pamięci po przełączeniu klas, natomiast liczba bezwzględna limfocytów B pamięci CD27+IgD+ zmniejsza się we wczesnym dzieciństwie. Z kolei wartość procentowa komórek o fenotypie CD24-CD38+, reprezentujących plazmablasty we krwi obwodowej, nie wykazuje tendencji do zmian w różnych grupach wiekowych [20].

Stadia dojrzewania pochodzących ze szpiku kostnego prekursorów w kierunku czynnościowo sprawnych limfocytów T, odgrywające zasadnicze znaczenie dla rozwoju adapttywnej odpowiedzi immunologicznej, zachodzą w grasicy. Ten wieloetapowy proces, obejmujący powstanie szeregu puli komórek migrujących w mikrośrodowisku grasicy, nie znajduje bezpośrednio swojego odzwierciedlenia we krwi obwodowej, do której przechodzą dojrzałe limfocyty T. W puli limfocytów T CD4+ i CD8+, opierając się na analizie ekspresji izoform markera CD45, wyróżnić można limfocyty T naiwne i limfocyty T pamięci. U noworodków dominują limfocyty T naiwne; ich wartość procentowa we krwi pępowinowej wynosi średnio 85. Do 6 roku życia zwiększa się zarówno wartość procentowa, jak i liczba bezwzględna komórek T pamięci, wykazujących ekspresję antygenu CD45RO, zarówno w obrębie subpopulacji CD4+, jak i CD8+, a następnie wzajemny stosunek limfocytów T naiwnych do limfocytów T pamięci pozostaje stosunkowo stabilny [42].

Szczegółowa ocena immunofenotypowa poprzedzająca opracowanie wartości referencyjnych dla specyficznych subpopulacji limfocytów T, takich jak limfocyty niedojrzałe wywodzące się z grasicy (recent thymic emigrants), limfocyty T regulatorowe, limfocyty T pomocnicze CXCR5+ oraz różne rodzaje limfocytów T pamięci, wymaga identyfikacji charakterystycznych antygenów różnicowania, jak np. CD31, CD25, CD185, CD197, CD27 [32].

W 2010 roku opublikowane zostały wyniki pracy zespołowej [43], przeprowadzonej w Pracowni Zgodności Tkankowej oraz Klinice Immunologii Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie, na grupie 292 dzieci i młodych dorosłych w wieku 0-31 lat, która pozwoliła na opracowanie wartości referencyjnych subpopulacji limfocytów B krwi obwodowej. Wartość takiego badania w aspekcie zarówno naukowym i poznawczym, jak również z punktu widzenia praktyki klinicznej, wymaga szczególnego podkreślenia. Umożliwia bowiem prawidłową interpretację badań immunofenotypowych u dzieci w różnych przedziałach wiekowych, odzwierciedlając dynamikę zmian w obrębie subpopulacji komórek, a także służy jako narzędzie diagnostyczne w ocenie zaburzeń stwierdzanych w pierwotnych niedoborach odporności.

1.5 Odpowiedź immunologiczna związana z przeciwciałami

1.5.1 Podklasy IgG

Niedobór podklas IgG jako pierwotny defekt odporności jest trudny do zdefiniowania z powodu różnic w zakresie przyjętych jako normy wartości referencyjnych pomiędzy pracowniami laboratoryjnymi, jak również ze względu na ograniczoną korelację diagnostyczno-kliniczną. Przebieg choroby może być asymptomatyczny, ale u części dzieci w obrazie klinicznym dominują nawracające zakażenia układu oddechowego i rozwój powikłań o poważnym rokowaniu, jak rozstrzenia oskrzeli czy zarostowe zapalenie oskrzelików [44].

Warianty regionu stałego łańcucha ciężkiego γ cechują się zmiennością allotypową (polimorfizmem), co oznacza, że wykazują genetyczne różnice pomiędzy osobnikami tego samego gatunku. Z uwagi na fakt, że geny kodujące region stały łańcucha ciężkiego powiązane są z *locus* genowym łańcucha ciężkiego, dziedziczone są one razem w postaci haplotypu, charakterystycznego dla określonej populacji. Allotypowa zmienność IgG prowadząca do ekspresji zróżnicowanych epitopów łańcucha ciężkiego jest podstawą wyodrębnienia podklas IgG, charakteryzujących się odmiennościami funkcji biologicznych. W powiązaniu z determinującymi swoistość przeciwciał regionami hiperzmiennymi fragmentów wiążących antygen (Fragment antigen binding, Fab) są one źródłem różnorodności przeciwciał i optymalnej skuteczności odpowiedzi immunologicznej związanej z przeciwciałami.

Każda z czterech podklas IgG wykazuje specyficzny profil funkcji efektorowych w celu eliminacji patogenów. W odpowiedzi immunologicznej z udziałem swoistych przeciwciał dystrybucja podklas IgG jest różna zależnie od struktury antygeny, ilości i rodzaju jego epitopów, dawki, drogi wejścia do organizmu, jak i predyspozycji genetycznej gospodarza. Podczas gdy przeciwciała wytwarzane przeciwko zależnym od limfocytów T bakteryjnym i wirusowym antygenom białkowym, jak toksoid błonicy i składniki błony komórkowej wykrywane są we wszystkich czterech podklasach, IgG1 wraz z IgG3 stanowią najliczniej występujące izotypy. Antygeny polisacharydowe stymulują bardziej selektywną odpowiedź przeciwciał, niemal wyłącznie związaną z podklasą IgG2 [45]. Istotne różnice czynnościowe pomiędzy poszczególnymi podklasami, stwierdzone z punktu widzenia najważniejszych funkcji efektorowych - aktywacji dopełniacza i indukcji fagocytozy poprzez opsonizację, związane są z odmiennościami ich struktury. Zarówno długość, jak i budowa regionu zawiasowego w obrębie cząsteczki poszczególnej podklasy IgG determinuje zmienność przestrzenną i odległość pomiędzy ramionami fragmentu wiążącego antygen i ustawienie ramion Fab w stosunku do fragmentu Fc (Fragment crystallisable). Stąd też, największą aktywność w indukowaniu komórkowych funkcji efektorowych w wyniku interakcji z receptorem Fc dla IgG (Fc γ R) posiada podklasa IgG3, którą charakteryzuje też największa zdolność aktywacji klasycznej drogi dopełniacza w następstwie związania C1q z domeną C_H2 [46,47]. Najważniejsze różnice w zakresie właściwości biologicznych podklas IgG, wg [48] przedstawiono w tabeli 1.

W rozpoznawaniu niedoboru odporności należy wziąć pod uwagę istotne czynniki fizjologiczne i patologiczne, mające wpływ na stężenie podklas IgG w surowicy. Całkowite stężenie IgG może być znacznie zróżnicowane u osób zdrowych, ale proporcje pomiędzy stężeniem poszczególnych podklas zachowane są w stosunkowo wąskich granicach. Jednakże, stężenie każdej z podklas może ulegać zmianom w następstwie stymulacji antygenowej i aktywacji populacji limfocytów B. Kolejnym ważnym parametrem jest wiek dziecka, gdyż każda z podklas IgG posiada swój własny wzorzec dojrzewania, zgodnie z którym, pomimo znacznej zmienności osobniczej, IgG1 i

IgG3 osiągają stężenie charakterystyczne dla wieku dorosłego wcześniej niż podklasy IgG2 i IgG4. Istotną determinantę z zakresu immunogenetyki stanowi polimorfizm genów immunoglobulin. Alleliczne formy genów łańcuchów ciężkich i łańcuchów lekkich kappa prowadzą do powstania allotypów Gm1, Gm2 i Gm3, których rozmieszczenie jest odmienne w różnych populacjach. W rezultacie, stężenie podklas IgG i specyficzna odpowiedź związana z przeciwciałami mogą być zróżnicowane populacyjnie [49,50].

U małych dzieci często stwierdzanym defektem jest niedobór podklasy IgG3, który może być wykładnikiem przejściowego niedoboru odporności humoralnej [51,52], jak również może być następstwem zwiększonego zużycia przeciwciał w czasie infekcji i ulegać normalizacji w wyniku skutecznego leczenia zakażenia [53]. Z uwagi na fakt, że niedobór podklas IgG obserwuje się zarówno u dzieci chorujących na nawracające infekcje układu oddechowego, jak i u dzieci zdrowych, znaczenie badania stężenia podklas IgG w ocenie funkcji układu odpornościowego, poddawane jest dyskusji jako niedostateczne źródło informacji o rzeczywistej zdolności pacjenta do wytwarzania swoistych przeciwciał przeciwko antygenom białkowym i polisacharydowym drobnoustrojów [54,55]. Selektywny niedobór podklasy IgG1 stwierdzany jest najrzadziej, ale z uwagi na największe ze wszystkich podklas stężenie IgG1 składające się na całkowity poziom immunoglobuliny G w surowicy (ponad 60%), niedobór ten związany jest najczęściej z obniżeniem stężenia tego izotypu.

Tabela 1. Biologiczne właściwości podklas IgG

Izotyp	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Aktywacja C1 dopełniacza	++	+	+++	-
Transfer przezłożyskowy	+	+	+	+
Wiązanie białek bakteryjnych				
Gronkowcowe białka A	+	+	-	+
Paciorkowcowe białka G	+	+	+	+
Wiązanie fragmentu Fc				
FcγRI (monocyty)	+++	-	+++	++
FcγRII (monocyty, neutrofile, eozynofile, płytki, limfocyty B)	+	-	+	-
FcγRIII (neutrofile, eozynofile, makrofagi, limfocyty T, NK)	+	-	+	-
Specyficzna odpowiedź na antygeny				
Toksoid tężcowy	+++	+	+	++
Polisacharydy	++	+++	+	+

1.5.2 Swoiste przeciwciała poszczepienne

Ocena odpowiedzi na antygeny szczepionkowe przeprowadzana jest w celu potwierdzenia i sprecyzowania defektu wytwarzania przeciwciał. W diagnostyce immunologicznej w kierunku pierwotnych niedoborów odporności uwzględnianie przeciwciał po szczepieniu przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B (wzw B) w ocenie odpowiedzi poszczepiennej nie jest zalecane rutynowo ze względu na duży odsetek osób, sięgający 1-3% szczepionych, zwłaszcza osób dorosłych > 40 roku życia, u których wytwarzanie przeciwciał przeciwko antygenowi HBs (anty-HBs) jest upośledzone [56]. Skuteczność rekombinowanych szczepionek przeciwko wzw B, oceniana w oparciu o stężenie przeciwciał poszczepiennych anty-HBs powyżej 10 mIU/ml, jest u niemowląt, dzieci i młodzieży szacowana na 85-100% [56]. Jednakże, efekt seroprotekcyjny może wymagać większego stężenia przeciwciał antygenowo-swoistych, a u osób z upośledzoną odpornością wskazuje się na konieczność indukowania stężenia > 100 mIU/ml celem zabezpieczenia przed zakażeniem po ekspozycji [57].

Pomiar w surowicy stężenia swoistych przeciwciał, głównie należących do klasy IgG, dokonywany jest po uprzedniej immunizacji z zastosowaniem antygenów białkowych, jak toksoid błoniczy lub tężcowy oraz antygenów polisacharydowych *Streptococcus pneumoniae* lub *Haemophilus influenzae* (Hib)[58]. W przypadku toksoidów błoniczego i tężcowego minimalne ochronne stężenie przeciwciał neutralizujących określone zostało na 0,01 -0,1 IU/ml, choć dla uzyskania długotrwałego efektu seroprotekcyjnego po szczepieniu przeciwko błonicy (anty-*diphtheria toxoid*) i tężcowi (anty-*tetanus toxoid*) może być wymagane stężenie przeciwciał swoistych wynoszące 1,0 IU/ml. Wytwarzanie z kolei przeciwciał wiążących przeciwko polisacharydowi otoczkowemu Hib (anty- PRP Hib) zależne jest od rodzaju przeprowadzonej immunizacji czynnej. Po podaniu szczepionki skoniugowanej minimalne stężenie ochronne swoistych przeciwciał określone zostało na 0,15 µg/ml [59], choć długotrwały efekt protekcyjny wymaga stężenia 1,0 µg/ml. Swoiste przeciwciała przeciwko polisacharydom bakterii otoczkowym związane są z mechanizmem zabijania drobnoustrojów na drodze opsonofagocytozy [60,61].

1.6 Elementy odporności wrodzonej

1.6.1 Komórki NK

Komórki „naturalni zabójcy” (natural killer cells, NK)z powodu zdolności do spontanicznego niszczenia komórek zainfekowanych i komórek nowotworowych bez uprzedniej immunizacji, a także wykrywania braku restrykcji MHC w myśl hipotezy „missing self” zaproponowanej przez Ljunggrena i Karre [62], uważane są przede wszystkim za element odporności wrodzonej. Udział komórek NK w wielu fizjologicznych i patologicznych reakcjach immunologicznych okazuje się obecnie być złożony.

Komórki te są istotnym źródłem cytokin, o działaniu prozapalnym, jak interferon (IFN)- γ i czynnik martwicy nowotworu (TNF)- α , oraz immunosupresyjnym, jak interleukina (IL)-10, czynników wzrostu, takich jak GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, czynnik stymulujący kolonie granulocytów i makrofagów) i IL-3, a także chemokin, np. IL-8 (CXCL8) i chemokiny CCL5 (RANTES) [63]. Sekrecja chemokin przez komórki NK odgrywa rolę w ich umiejscowieniu wraz z innymi komórkami, takimi jak komórki dendrytyczne w miejscu reakcji zapalnej, natomiast produkcja IFN- γ wspomaga kształtowanie odpowiedzi limfocytów T w węzłach chłonnych poprzez interakcję z naiwnymi limfocytami T migrującymi do wtórnych narządów limfatycznych ze zmienionych zapalnie tkanek obwodowych [64]. Stąd też, zdolność komórek NK do pozytywnej i negatywnej regulacji odpowiedzi immunologicznej związanej z funkcją limfocytów B i T, zależnie od rodzaju stymulacji antygenowej [65] oznacza, że komórki NK są nie tylko efektorowymi komórkami cytolitycznymi przeciwko komórkom zainfekowanym lub transformowanym nowotworowo. Poprzez wytwarzanie cytokin i reakcje cytotoksyczne wpływają one na komórki dendrytyczne, makrofagi i neutrofile, pełniąc funkcję regulacyjną w odniesieniu do stymulowanych antygenowo limfocytów B i T [66].

W świetle nowych poglądów na funkcje komórek NK, spełniające liczne kryteria odpowiedzi adaptywnej, zaproponowano określenie miejsca komórek NK jako „pomostu” pomiędzy odpowiedzią immunologiczną wrodzoną i adaptywną [67]. Komórki NK cechują się długotrwałą pamięcią immunologiczną [68], przechodzą proces edukacji w szpiku kostnym zapewniający czynnościową sprawność receptorów hamujących, wchodzących w interakcje z cząsteczkami MHC klasy I [67], a populacja komórek NK cechująca się ekspresją receptora Ly49H rozpoznaje specyficzny ligand wirusa cytomegalii [69]. Warto nadmienić, że podobnie niektóre populacje limfocytów B i T, jak limfocyty $T\gamma\delta$, komórki NKT, limfocyty B strefy brzeżnej śledziony mają ograniczony antygenowo-specyficzny repertuar receptorów i pełnią funkcję we wczesnych etapach odpowiedzi immunologicznej. Zasadnicza różnica pomiędzy komórkami NK a limfocytami T i B polega na ograniczeniu odpowiedzi do receptorów kodowanych przez geny linii zarodkowej w przypadku tych pierwszych komórek w stosunku do niemal nieskończonego repertuaru receptorów antygenowych wynikającego z rearanżacji genów somatycznych w przypadku tych drugich komórek.

Za pierwotne miejsce rozwoju komórek NK uważany jest szpik kostny, choć różnicowanie ich prekursorów może zachodzić także w innych narządach, np. w węzłach chłonnych. Zjawisko występowania różnych stadiów rozwojowych komórek NK w różnych przedziałach tkankowych ma istotne znaczenie immunodiagnostyczne, bowiem związane jest ze zróżnicowaną ekspresją antygenową. Jak wykazano w oparciu o najnowsze badania [70], wczesne progenitory komórek NK mogą migrować ze szpiku kostnego do wtórnych narządów limfatycznych aby w węzłach chłonnych jako komórki pre-NK podlegać ukierunkowaniu rozwoju w stronę komórek NK, nabywając antygen

CD56 (siarczan heparanu, neural cell adhesion molecule, N-CAM), a dalej dojrzewają w śledzionie, skąd dojrzałe komórki NK uwalniane są do krwiobiegu.

Analiza immunofenotypowa komórek NK nabiera szczególnego znaczenia w aspekcie przedstawionych wyżej powiązań czynnościowych pomiędzy odpornością wrodzoną i adaptywną, a zwłaszcza z uwagi na rolę, jaką aktualnie przypisuje się komórkom NK w regulacji odpowiedzi na antygeny zależnej od limfocytów T i B.

1.6.2 Komórki NKT

Jest to konserwatywna linia limfocytów T o unikalnych cechach, wykazujących ekspresję niezmiennego łańcucha alfa receptora TCR (T lymphocyte receptor) i rozpoznających glikolipidy prezentowane w kontekście nieklasycznej cząsteczki MHC, CD1d [71]. W następstwie stymulacji TCR, komórki NKT zdolne są do szybkiej sekrecji cytokin, zarówno typu Th1, jak i Th2, stymulując w ten sposób zróżnicowane procesy immunologiczne i odgrywając rolę immunoregulacyjną. Komórki te odgrywają rolę w supresji autoreaktywnych limfocytów T, przede wszystkim dzięki sekrecji IL-4, polaryzując w ten sposób odpowiedź immunologiczną w kierunku limfocytów Th2 [72], a także aktywują limfocyty B i komórki NK. Te wielokierunkowe efekty działania komórek NKT mogą w rezultacie skutkować wzmocnieniem mechanizmów odporności wrodzonej i adaptywnej.

1.6.3 Integryny

Stanowią rodzinę markerów komórkowych, cechujących się specyficzną, heterodimerską strukturą molekularną. Cząsteczki integryn β_2 zawierają w swojej budowie wspólny łańcuch, oznaczony jako antygen różnicowania CD18, różnią się natomiast między sobą budową połączonego z nim łańcucha α . W ten sposób wyróżnić można antygeny powierzchniowe leukocytów: CD11a/CD18 (integryna α_1/β_2) lub LFA-1 (lymphocyte function antigen), oraz CD11b/CD18 (integryna α_M/β_2) i CD11c/CD18 (integryna α_x/β_2), stanowiące receptory dla składowej C3 dopełniacza, CR3 (Mac-1) i CR4, odpowiednio. Funkcja integryn β_2 polega przede wszystkim na wiązaniu leukocytów do komórek śródbłonna naczyniowego oraz umożliwianiu interakcji pomiędzy innymi rodzajami komórek. Na tej drodze integryny stymulują fagocytozę [73], wzmagają odpowiedź limfocytów B i wytwarzanie przeciwciał oraz odpowiedź poszczepienną [74], a także za pośrednictwem komórek dendrytycznych stymulują limfocyty T [75].

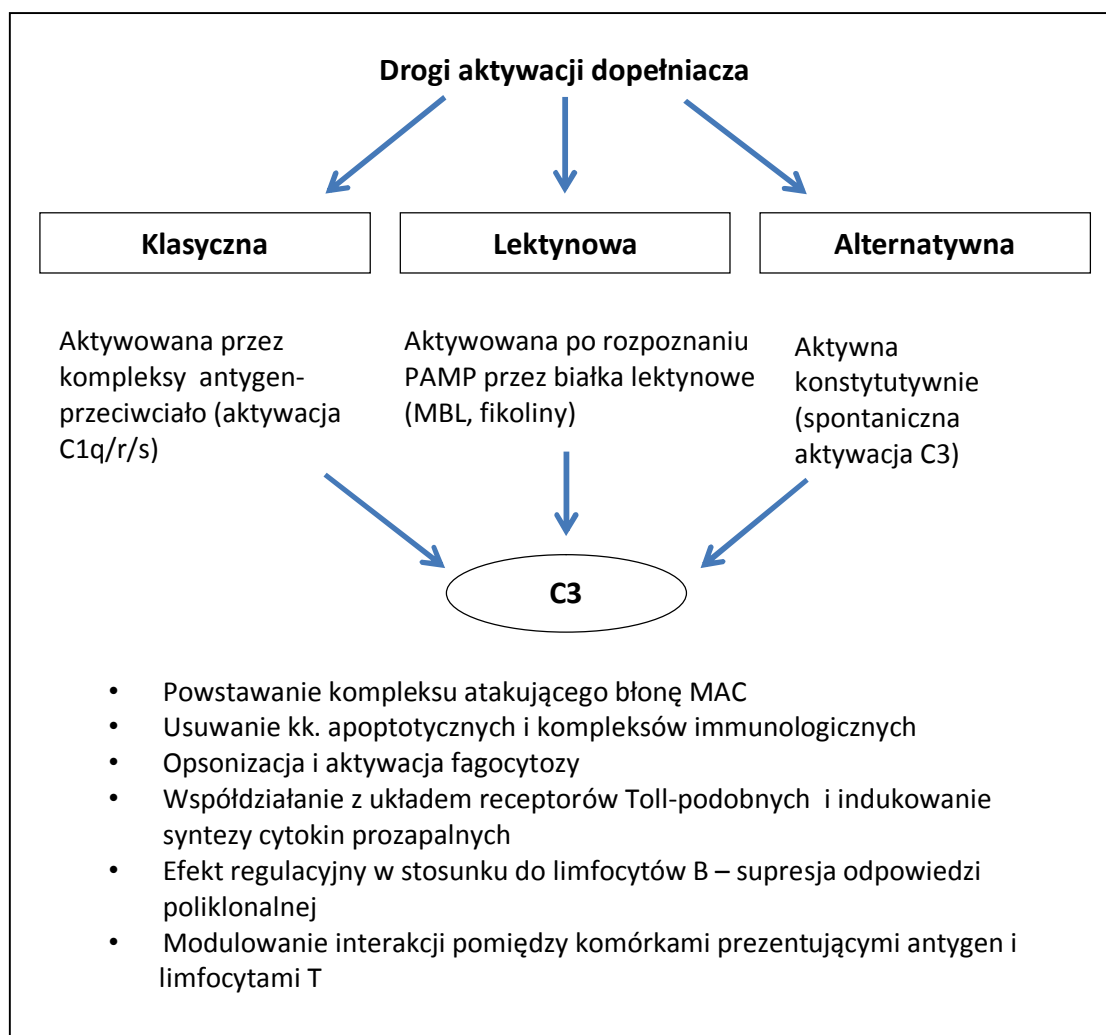
1.6.4 Dopełniacz

Układ składowych dopełniacza uznawany wprawdzie jest z punktu widzenia rozwoju ontogenetycznego przede wszystkim jako humoralny element odporności wrodzonej, jednak szeroki zakres aktywności czyni go istotnym składnikiem wiążącym odpowiedź wrodzoną z odpowiedzią

adaptywną i stawia na ważnej pozycji w utrzymaniu immunologicznej homeostazy . Zaangażowany jest on w reakcjach odpowiedzi immunologicznej przeciwko drobnoustrojom, usuwania kompleksów immunologicznych oraz procesach regeneracji tkanek na drodze trzech powiązanych ze sobą dróg aktywacji – klasycznej, alternatywnej i lektynowej [76].

Klasyczna droga aktywacji odgrywa istotną rolę w eliminacji zakażeń wywołanych przez ropotwórcze bakterie otoczkowe, takie jak *Haemophilus influenzae* i *Streptococcus pneumoniae* [77]. Jest ona inicjowana przez czynnik C1q, który ulega przyłączeniu do przeciwciał, związanych na powierzchni drobnoustrojów lub będących składnikami kompleksów immunologicznych antygen-przeciwciało. Naturalne przeciwciała klasy IgM wytwarzane przez naiwne limfocyty B oraz przeciwciała klas IgM i IgG produkowane podczas adapttywnej odpowiedzi immunologicznej wiązane są z determinantami antygenowymi otoczki bakterii, prowadząc do ich aglutynacji. Generacja kaskady aktywowanych składników prowadzi między innymi do powstania fragmentów C3a i C5a, będących mediatorami reakcji zapalnej, a także C3b i C4b, reagujących z receptorami komplementu, stymulując napływ komórek fagocytujących i aktywację limfocytów B [78]. Lektynowa droga aktywacji, związana jest z układem białek MASP (mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases) oraz Map (MBL-associated proteins), aktywowanych przez takie ligandy, jak H-, L- i M-fikoliny oraz MBL [79]. Ta droga aktywacji dopełniacza, podobnie jak klasyczna, związana jest z odpornością przeciwko zakażeniom bakteryjnym. Szczególne zainteresowanie budzi hipoteza, zgodnie z którą lektynowa droga aktywacji dopełniacza odgrywa szczególną rolę w okresie wczesnodziecięcym, pomiędzy utratą przekazanych przezłożyskowo przeciwciał matczynych a rozwojem dojrzałego układu odpornościowego [78]. Aktywacja dopełniacza na drodze alternatywnej zachodzi w następstwie aktywacji drogi klasycznej i lektynowej, jako mechanizm ich amplifikacji, a także w wyniku spontanicznej aktywności składowej C3. Ta droga aktywacji wraz z powstającym układem składowych terminalnych C5-C9, mających aktywność lityczną, odgrywa ważną rolę w odpowiedzi na zakażenia bakteryjne o etiologii *Neisseria*, szczególnie *Neisseria meningitidis* [80].

Rola efektorowa składowej C3, jako centralnego punktu wszystkich dróg aktywacji kaskady dopełniacza, którą przedstawiono na rycinie 3, jak również znaczenie kluczowe składowej C4 dla kinetyki reakcji enzymatycznej z udziałem konwertazy C3, skłania do podjęcia badania stężenia tych składowych u dzieci, chorujących na nawracające infekcje układu oddechowego. Biorąc pod uwagę wielokierunkowy efekt ich działania, nie tylko w zakresie mechanizmów odporności wrodzonej, ale i w aspekcie aktywacji adapttywnej odpowiedzi immunologicznej, zasadne jest przeprowadzenie badania w grupie dzieci z hipogammaglobulinemią.

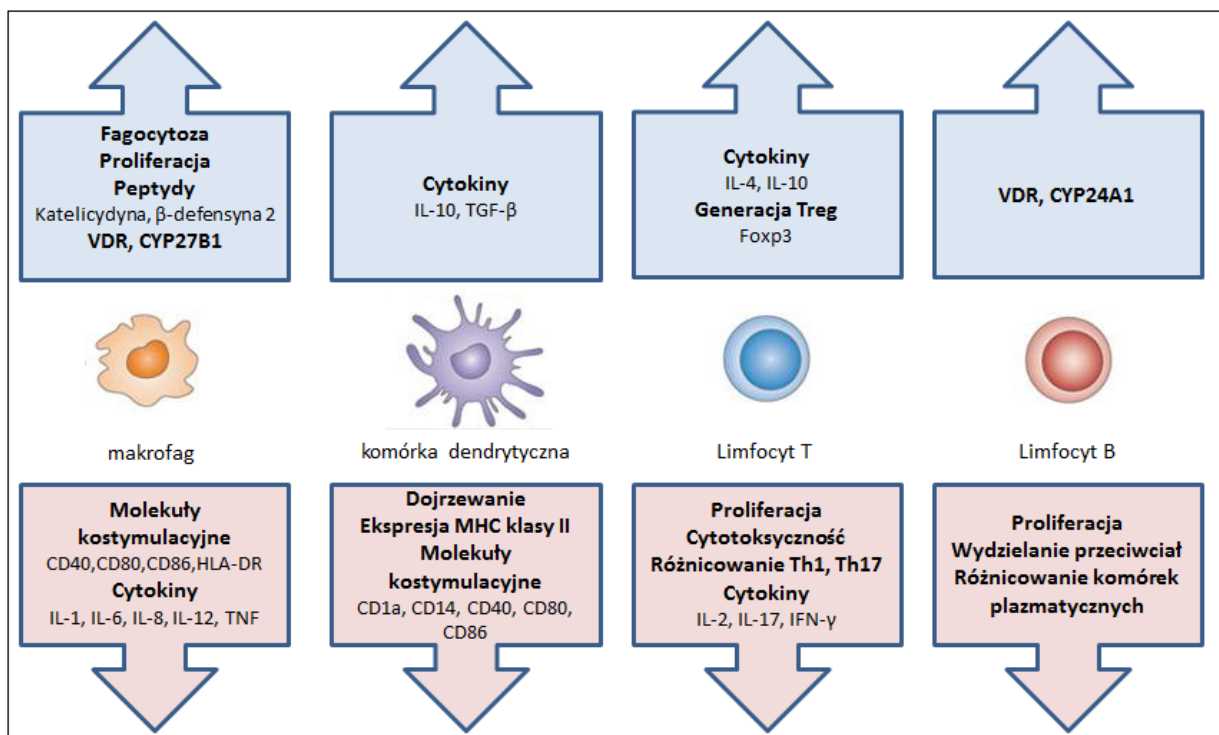


Rycina 3. Drogi aktywacji dopełniacza z uwzględnieniem centralnej roli składowej C3 w odpowiedzi immunologicznej

1.7 Immunoregulacyjna funkcja witaminy D3

Poza dobrze poznaną biologiczną rolę witaminy D w homeostazie gospodarki wapniowo-fosforanowej i metabolizmie kostnym, przedmiotem badań jest jej immunomodulujący wpływ na różne elementy układu odpornościowego. Aktywny metabolit, 1,25-dihydroksycholekalcyferol (1,25(OH)₂D₃) wiąże się z receptorem witaminy D (vitamin D receptor, VDR) i reguluje ekspresję różnych genów, wywołując tą drogą plejotropowy efekt w komórkach immunologicznie aktywnych. Ekspresja VDR ma miejsce w aktywowanych limfocytach T subpopulacji Th1, Th2 i Th17, limfocytach B, a także w komórkach prezentujących antygen – monocytach, makrofagach i komórkach dendrytycznych. 1,25(OH)₂D₃ moduluje w sposób bezpośredni proliferację i różnicowanie limfocytów T i wytwarzanie przez nie cytokin, przyczyniając się do supresji adapttywnej odpowiedzi immunologicznej i hamowania prozapalnego działania jądrowego czynnika (NF)-κB [81].

Równocześnie, witamina D wykazuje efekt stymulujący wrodzoną odpowiedź immunologiczną i pozytywnie regulujący odpowiedź przeciwko zakażeniu. Wykazano, że witamina D odgrywa zasadniczą rolę w aktywacji genów peptydów przeciwdrobnoustrojowych – katelicyny (cathelicidin antimicrobial peptide, CAMP, human cathelicidin antimicrobial peptide, hCAP) i beta-defensyn (DEFB4) w komórkach hematopoetycznych i nabłonkowych [82,83,84], będących aktywnymi czynnikami protekcyjnymi przed infekcjami. Wpływ witaminy D na komórki immunologiczne przedstawiono na rycinie 4. Interesujący i, jak dotąd, nie wyjaśniony całkowicie, jest mechanizm fizjologicznej interakcji witaminy D z elementami wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Szczególnie elementami nowości cechuje się hipoteza, zgodnie z którą synteza aktywnego metabolitu, 1,25(OH)2D3, w makrofach i innych komórkach odbierających patologiczne bodźce ze środowiska indukowana jest poprzez receptory Toll-podobne (Toll-like receptors, TLR) 2/1 [85,86]. TLR są rodziną niekatalitycznych przezbłonowych receptorów rozpoznających wzorce patogenów (pattern- recognition receptors, PRR). Rozpoznanie i odpowiedź na wzorce molekularne związane z patogenami (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), będące strukturalnymi jednostkami drobnoustrojów indukującymi wrodzoną odpowiedź immunologiczną, poprzez TLR prowadzi z kolei do zwiększenia ekspresji 1,25-hydroksylazy i receptora witaminy D, a w efekcie do autokrynowej indukcji biosyntezy katelicyny i zabijania drobnoustrojów [87].



Rycina 4. Wielokierunkowy wpływ witaminy D na komórki immunologiczne

Witamina D obejmuje zarówno witaminę D2 pochodzenia roślinnego z ergosterolu i dostarczaną w diecie, jak i witaminę D3, wytwarzaną z cholesterolu i pozyskiwaną na drodze dwóch niezależnych źródeł – w wyniku skórnej reakcji fotochemicznej i w mniejszym stopniu, z pożywienia [88]. Najważniejszym metabolitem w krążeniu jest 25-hydroksywitamina (25(OH)D3), której stężenie powyżej 30-32 ng/ml uważane jest za prawidłowe, podczas gdy jej niedobór stwierdzany jest w przypadku stężenia w surowicy poniżej 20 ng/ml. Termin „niedostatek” (insufficiency) witaminy D określa jej poziom w zakresie pomiędzy 20 ng/ml i 30-32 ng/ml [89]. Obok diety i suplementacji witaminy D3, szereg czynników determinuje jej stężenie w surowicy, mianowicie: sezonowość, ekspozycja na światło słoneczne, wiek, pigmentacja skóry, rozmiar tkanki tłuszczowej organizmu. Ponadto, uwarunkowania genetyczne, wpływające na homeostazę gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz szlaki metaboliczne witaminy D, jak polimorfizm genów reduktazy 7-dehydrocholesterolu w skórze, cytochromu P450 i 25-hydroksylazy w wątrobie i 1-hydroksylazy w nerce oraz białka wiążącego witaminę D w krążeniu, stanowią dalsze determinanty zróżnicowania statusu witaminy D [90].

Współzależności środowiskowe i wewnątrzustrojowe stężenia witaminy D mogą więc stanowić czynniki modulujące osobniczo zmienną predyspozycję do zakażeń u dzieci z pierwotnymi niedoborami wytwarzania przeciwciał.

2. CEL PRACY

2.1 Cel główny

Zasadniczym celem pracy była kompleksowa ocena elementów wrodzonej i adaptywnej odpowiedzi immunologicznej u dzieci z niedoborami wytwarzania przeciwciał, chorujących na nawracające infekcje układu oddechowego, pozwalająca na precyzyjne ustalenie mechanizmów immunopatologicznych stwierdzanych zaburzeń układu odpornościowego.

2.2 Cele szczegółowe

1. Ocena procesu różnicowania i dojrzewania subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w odniesieniu do niedoboru wytwarzania przeciwciał
2. Szczegółowa analiza charakteru i stopnia zaburzeń biosyntezy przeciwciał jako wyznaczników upośledzenia odpowiedzi na antygeny swoiste
3. Charakterystyka elementów odporności wrodzonej jako ewentualnie współistniejących zaburzeń immunologicznych pod kątem znaczenia dla przebiegu defektu wytwarzania przeciwciał
4. Określenie wpływu immunomodulujących czynników na przebieg kliniczny hipogammaglobulinemii
5. Ocena przydatności zastosowanego schematu immunodiagnostycznego w aspekcie identyfikacji specyficznych defektów dotyczących elementów odporności wrodzonej i adaptywnej, przyczyniających się do zaburzenia biosyntezy przeciwciał
6. Wielokierunkowa analiza immunodiagnostyczna zaburzeń wytwarzania przeciwciał w zakresie przewidywania przebiegu klinicznego choroby i prognozowania spontanicznej immunokorekcji

3. MATERIAŁ I METODY

3.1 Materiał

Badaniem przeprowadzonym w Klinice Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu i przedstawionym w niniejszym opracowaniu objęto grupę dzieci z hipogammaglobulinemią, wyłonionych spośród 120 pacjentów diagnozowanych w kierunku niedoboru odporności z powodu nawracających infekcji układu oddechowego, w okresie od stycznia do grudnia 2011 roku.

Projekt badawczy został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu – dokument nr 756/08 z dnia 4.09.2008. Zgodnie z Deklaracją Helsińską podpisaną w 1975 roku i ponownie opracowaną w 1983 roku, przed przystąpieniem do badania uzyskano od rodziców pisemną, świadomą zgodę na uczestnictwo.

3.1.1 Charakterystyka kliniczna grupy badanej

W badaniu uczestniczyło 22 dzieci, 17 chłopców i 5 dziewczynek, w wieku od 8 miesięcy do 5 lat (61 miesięcy); średnia wieku dzieci w grupie badanej wynosiła 26 miesięcy (mediana 23 miesiące). Immunizację czynną przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B, tężcowi, błonicy oraz zakażeniu *Haemophilus influenzae* typu b przeprowadzono u wszystkich dzieci zgodnie z obowiązującym kalendarzem szczepień, co umożliwiło ocenę odporności poszczepiennej przeciwko wymienionym schorzeniom infekcyjnym. Szczepienie przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B, z zastosowaniem antygenu powierzchniowego wirusa, przeprowadzane jest w schemacie 0-1-6 miesiąc życia. Cykl szczepienia przeciwko tężcowi, z zastosowaniem toksoidu, składa się ze szczepienia podstawowego, w skład którego wchodzi 3 dawki szczepionki, podawane od 2 miesiąca życia, w odstępach 6-tygodniowych oraz ze szczepienia uzupełniającego, polegającego na podaniu 1 dawki szczepionki w 16-18 miesiącu życia. Szczepienie przeciwko błonicy, z zastosowaniem toksoidu, przeprowadzane jest wraz ze szczepieniem przeciwko tężcowi. Przeprowadzenie szczepienia przeciwko *Haemophilus influenzae* typu b, z zastosowaniem polisacharydu otoczkowego, najlepiej wraz z podaniem toksoidów tężcowego i błoniczego, obejmuje 3 dawki szczepienia podstawowego podawane od 2 miesiąca życia w odstępach 6-tygodniowych oraz 1 dawkę szczepienia uzupełniającego w wieku 16-18 miesięcy i zapewnia ochronę przed zakażeniem Hib do piątego roku życia. U wszystkich dzieci po urodzeniu przeprowadzono szczepienie przeciwko gruźlicy.

Indywidualne różnice dotyczyły innych szczepień, zarówno obowiązkowych, jak i zalecanych. Szczepienie przeciwko odrze, śwince i różyczce nie zostało przeprowadzone u 6 dzieci; u trojga nich ze względu na wiek poniżej 13 miesiąca życia, u dwojga dzieci z uwagi na nawracające infekcje dróg

oddechowych, a u kolejnego dziecka przeciwwskazanie do szczepienia stanowiły objawy neurologiczne. Z tej samej przyczyny pacjent ten otrzymał szczepionkę acelularną przeciwko krztuścowi. Spośród 22 dzieci z grupy badanej, pięcioro otrzymało skoniugowaną szczepionkę przeciwko pneumokokom, a dwoje – przeciwko meningokokom. Niepożądany odczyn poszczepienny w postaci ropnia i nacieku zapalnego skóry i tkanki podskórnej uda stwierdzono u jednego pacjenta w 7 miesiącu życia, po podaniu szczepionki pięciowalentnej, zawierającej toksoidy tężcowy i błoniczy, szczepionkę przeciwko krztuścowi z komponentą acelularną, inaktywowaną przeciwko *poliomyelitis* i skoniugowaną przeciwko *Haemophilus influenzae* typu b (Pentaxim).

Zasadniczym problemem zdrowotnym u wszystkich dzieci były nawracające zakażenia dolnych dróg oddechowych – zapalenia oskrzeli i zapalenia płuc, których występowanie stanowiło wskazanie do diagnostyki w kierunku pierwotnego niedoboru odporności. Ponadto, dwoje dzieci przebyło ciężkie, zagrażające życiu zakażenia o lokalizacji pozapłucnej - jedno dziecko ropne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych z towarzyszącą sepsą, zaś u drugiego pacjenta punktem wyjścia do rozwoju sepsy było zakażenie układu moczowego.

Choroby alergiczne były podawane w wywiadzie u 12 dzieci; najczęściej stwierdzana była alergia pokarmowa (u wszystkich 12 dzieci, tj. u 100% badanych dzieci, u których podawano choroby alergiczne w wywiadzie), rozpoznanie astmy ustalone zostało u 9 dzieci, natomiast zarówno atopowe zapalenie skóry, jak i alergiczny nieżyt błony śluzowej nosa występowały u 2 dzieci.

Jedno dziecko leczone było z powodu schorzenia o podłożu autoimmunizacyjnym –cukrzyca insulinozależnej.

Objawy neurologiczne stwierdzano u dwojga dzieci – jedno z dzieci chorowało na padaczkę, u drugiego natomiast rozpoznano mózgowie porażenie dziecięce.

Analizę porównawczą tej grupy badanej odniesiono do populacji zdrowych dzieci, stanowiącej podmiot badania we wspomnianej wcześniej publikacji Piątosy i wsp [43].

3.1.2 Wywiad rodzinny

Wywiad rodzinny w kierunku pierwotnych niedoborów odporności był obciążony u dwojga dzieci i w obu przypadkach były to defekty wytwarzania przeciwciał. W pierwszym przypadku u siostry badanej dziewczynki rozpoznano przejściową hipogammaglobulinemię niemowląt, natomiast w drugim przypadku kuzyn badanego chłopca leczony był z powodu pospolitego zmiennego niedoboru odporności.

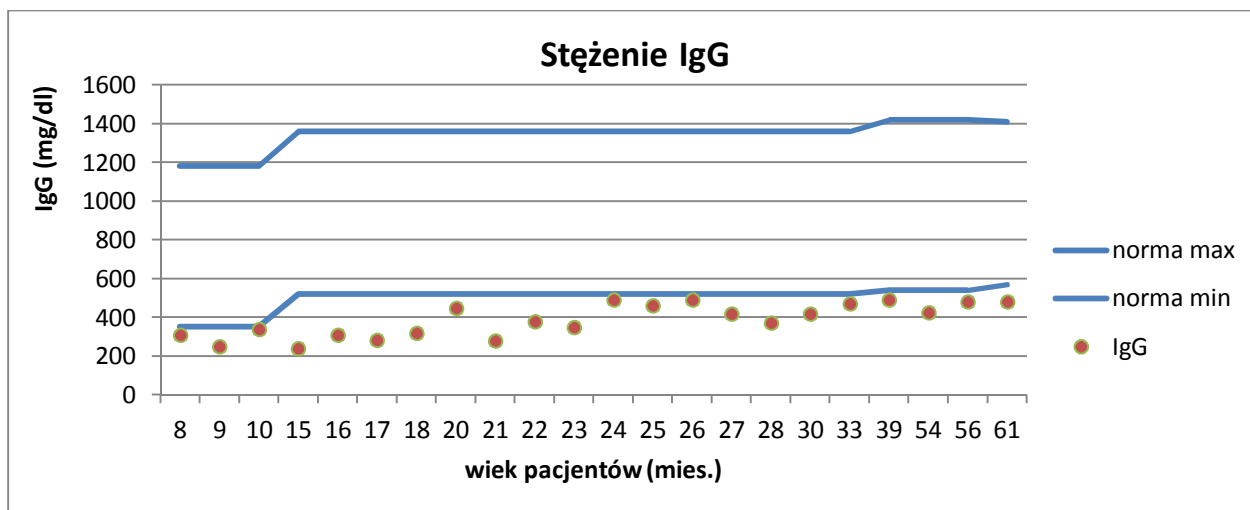
Obciążenie rodzinne alergią stwierdzono na podstawie wywiadu u 9 dzieci, natomiast w rodzinie jednego dziecka ujawniono wystąpienie choroby autoimmunizacyjnej (choroba Leśniowskiego-Crohna).

3.1.3 Kryteria kliniczno-laboratoryjne udziału w badaniu

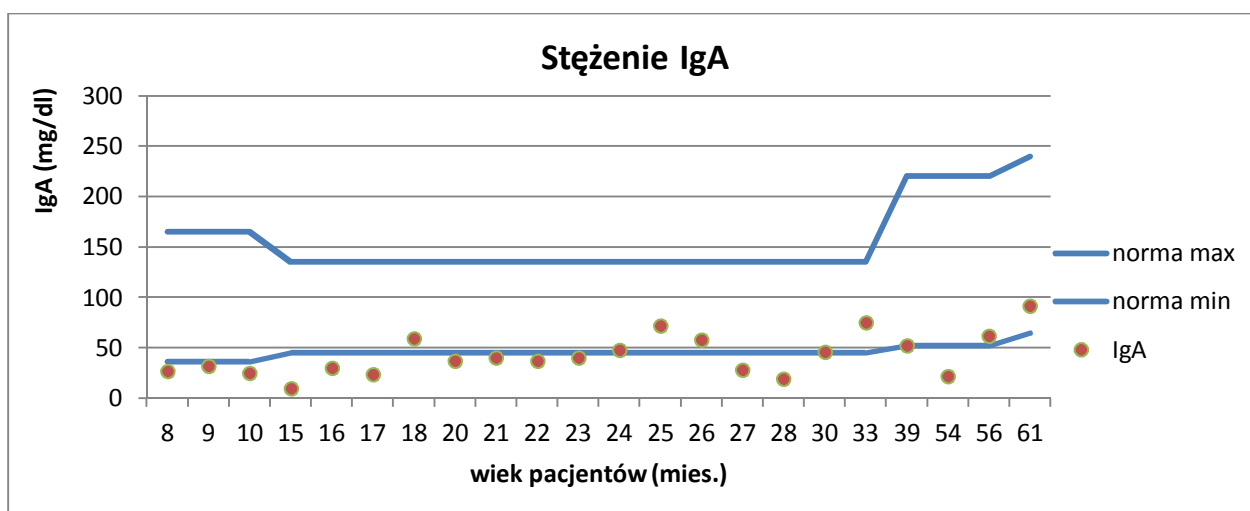
Pierwszym kryterium włączenia do badania, determinującym równocześnie wskazania do dalszej poszerzonej diagnostyki immunologicznej było obniżone w stosunku do normy wiekowej stężenie immunoglobuliny G w surowicy lub IgG oraz jednego albo dwóch izotypów (wykresy 1a, 1b, 1c). Zgodnie z tym kryterium grupa badana, licząca 22 dzieci, podzielona została na następujące 4 podgrupy (wykres 2):

- A. Dzieci, u których stwierdzono selektywny niedobór IgG (n=6)
- B. Dzieci, u których niedoborowi przeciwciał klasy IgG towarzyszył niedobór IgM (n=3)
- C. Dzieci, u których niedoborowi przeciwciał klasy IgG towarzyszył niedobór IgA (n=7)
- D. Dzieci, u których ujawniono niedobór w zakresie wszystkich trzech klas głównych - IgG, IgM oraz IgA (n=6)

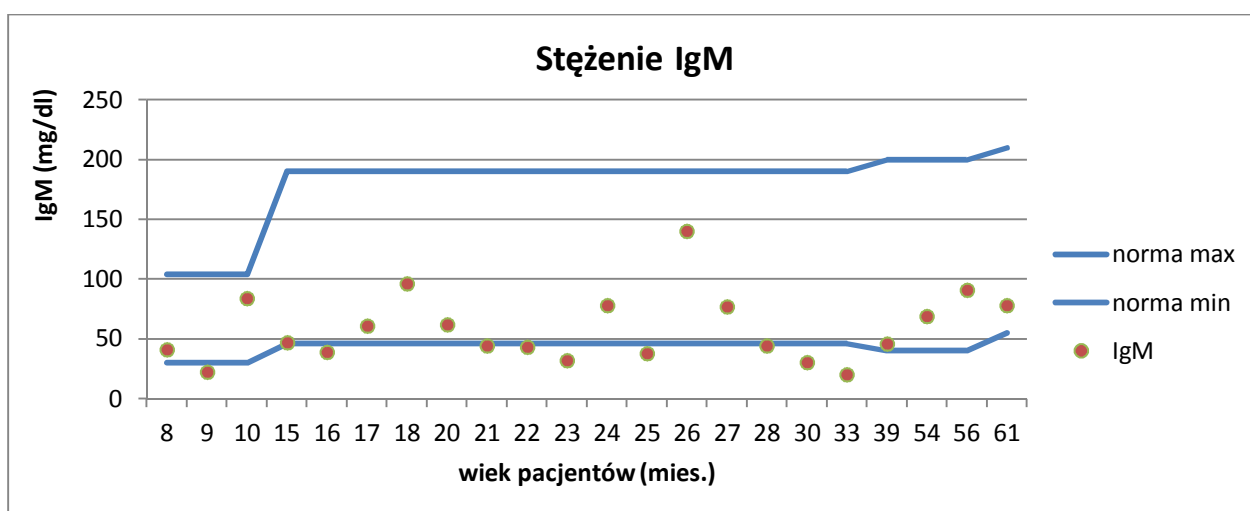
Prawidłowe stężenie wszystkich klas głównych immunoglobulin w surowicy stanowiło kryterium wyłączenia z badania. Dalszym kryterium decydującym o wykluczeniu z analizy było wcześniactwo poniżej 34 tygodnia ciąży, celem wyeliminowania wpływu niedojrzałości układu odpornościowego na wyniki przeprowadzonych badań, w szczególności zaś na stężenie immunoglobulin w surowicy. Zgodnie z tym założeniem, nie zostały włączone dzieci urodzone przed zakończeniem 34 tygodnia życia płodowego, które w dniu badania były w wieku <18 miesiąca życia. W celu eliminacji wpływu otrzymanych przezłożyskowo matczynych IgG na stężenie tego izotypu w surowicy krwi u dzieci, nie zostali włączeni do grupy badanej pacjenci w wieku do ukończenia 6 miesiąca życia. Kryteria wykluczenia z udziału w badaniu stanowiły także: anomalie anatomiczne i czynnościowe w obrębie górnych dróg oddechowych, zespoły aspiracyjne, wady wrodzone drzewa tchawiczo – oskrzelowego, wrodzona wada serca oraz mukowiscydoza, które to schorzenia związane są ze zwiększonym ryzykiem zakażenia układu oddechowego. W dniu wykonywania badań laboratoryjnych żadne z dzieci nie prezentowało objawów infekcji w obrębie górnych dróg oddechowych, a minimalny okres od zakończenia antybiotykoterapii z powodu zakażenia dróg oddechowych wynosił co najmniej dwa tygodnie. To kryterium wykluczenia zostało przyjęte celem zminimalizowania efektu zużycia przeciwciał w miejscu aktywnego procesu zapalnego w układzie oddechowym, którego odzwierciedleniem może być hipogammaglobulinemia.



Wykres 1a

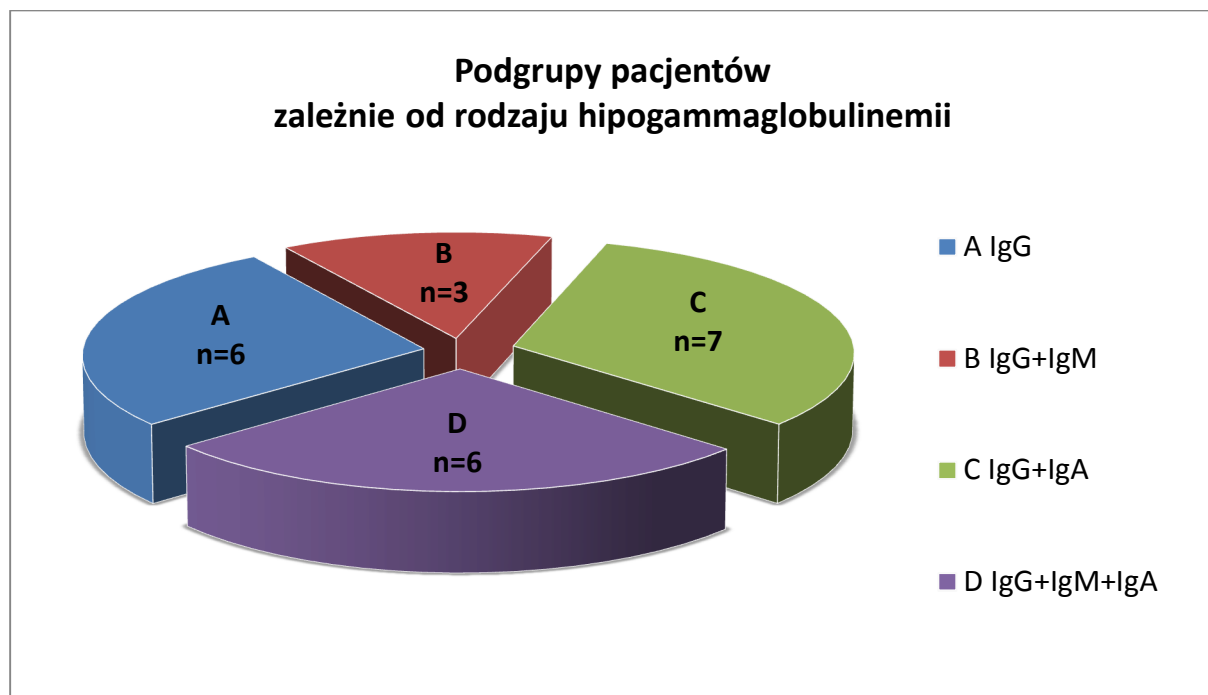


Wykres 1b



Wykres 1c

Wykresy 1a-c. Stężenie klas głównych immunoglobulin IgG, IgA i IgM w surowicy u badanych pacjentów w odniesieniu do zakresu norm (5 i 95 centyl) odpowiednich dla wieku



Wykres 2. Podgrupy badanych pacjentów w zależności od niedoboru IgG lub IgG i dodatkowo jednego (IgM albo IgA) bądź dwóch izotypów

3.1.4 Schemat badania

3.1.4.1 Etapy badania

Niniejszy projekt badawczy został zaplanowany w dwóch etapach:

- i. W etapie I przeprowadzono skrining immunodiagnostyczny czyli podstawową diagnostykę immunologiczną, która obejmowała:
 - Morfologię z rozmazem krwi obwodowej
 - Oznaczenie stężenia klas głównych IgG, IgM, IgA
 - Oznaczenie stężenia swoistych przeciwciał poszczeniennych anty-HBs
 - Oznaczenie stężenia składowych C3 i C4 dopełniacza
- ii. Obniżone stężenie immunoglobuliny G, poniżej dolnej granicy normy dla wieku, stwierdzone u 22 dzieci było niezależnym kryterium kwalifikacji do II etapu diagnostyki, na który składały się następujące elementy:
 - Badanie immunofenotypu subpopulacji limfocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem antygenów różnicowania charakterystycznych dla toru dojrzewania limfocytów B i limfocytów T
 - Oznaczenie stężenia podklas IgG
 - Oznaczenie stężenia antygenowo-swoistych przeciwciał poszczeniennych przeciwko toksoidom tężcowemu i błoniczemu oraz przeciwko polisacharydowi *Haemophilus influenzae*

- Posiew wydzieliny z dróg oddechowych / płwociny
- Oznaczenie stężenia witaminy D3 w surowicy

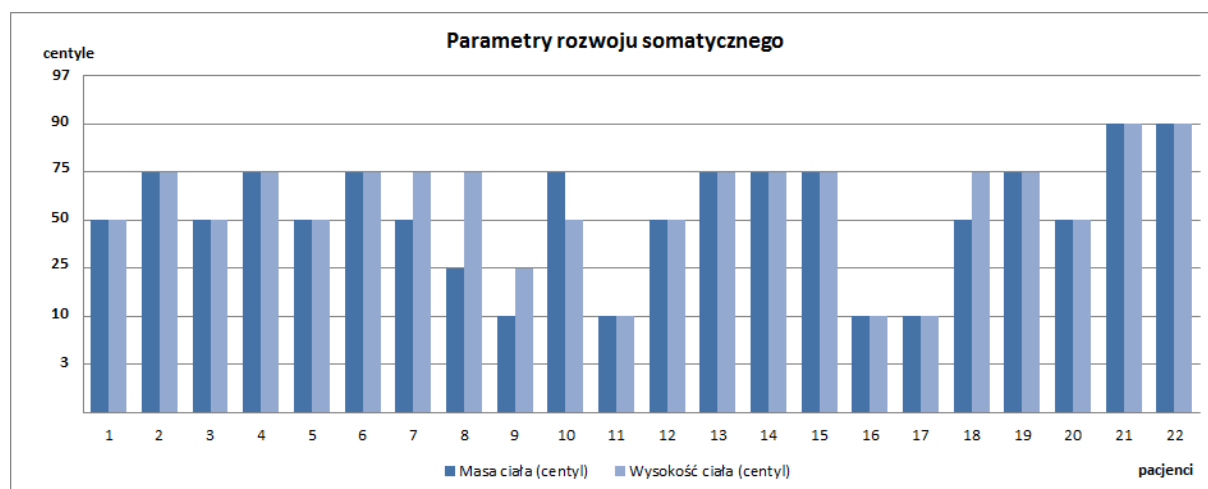
Badania laboratoryjne ujęte w I etapie diagnostyki, to jest morfologii krwi obwodowej z rozmazem, stężenia klas głównych immunoglobulin, składowych C3 i C4 dopełniacza oraz przeciwciał anti-HBs w surowicy, a także należące do II etapu badanie mikrobiologiczne i oznaczenie stężenia witaminy D3 w surowicy przeprowadzono w Centralnym Laboratorium Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Poszerzone badania immunologiczne - immunofenotypu limfocytów krwi obwodowej, stężenia podklas IgG, jak również przeciwciał przeciwko toksoidom tężcowemu i błoniczemu oraz antygenowi polisacharydowemu Hib wykonane zostały w Katedrze Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Przedstawiona w tej pracy przeprowadzona ocena immunodiagnostyczna ma godny podkreślenia nowatorski charakter, albowiem po raz pierwszy tak szeroką analizę odporności humoralnej i komórkowej przeprowadzono u dzieci z zaburzeniami wytwarzania przeciwciał, a cytowane wcześniej doniesienia innych autorów oparte były o badania u dzieci zdrowych [20,32,38,39,40,41,42,43].

3.2 Metody

3.2.1 Ocena kliniczna

Szczegółowy wywiad chorobowy oraz badanie przedmiotowe poprzedzały dalsze procedury diagnostyczne. Oceny rozwoju somatycznego dzieci dokonano w oparciu o pomiary masy ciała i wysokości ciała oraz poprzez odniesienie tych parametrów do wartości wg siatek centylowych odpowiednich dla wieku i płci (wykres 3), opracowanych przez Palczewską i Niedźwiecką z Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie [91].

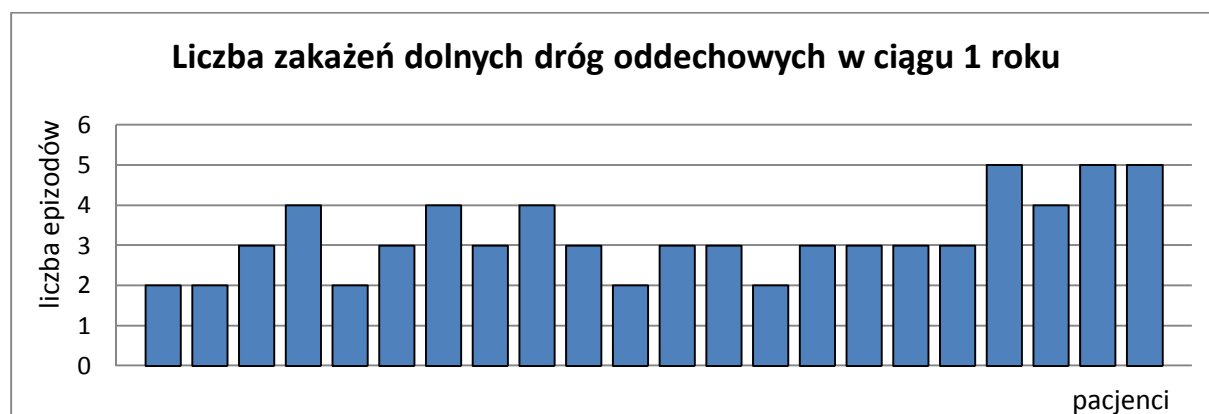


Wykres 3. Parametry rozwoju somatycznego – masa ciała i wysokość ciała badanych pacjentów wyrażone jako wartości odniesione do siatek centylowych, odpowiednich dla wieku i płci

Całkowita liczba infekcji układu oddechowego przeżyta w ciągu całego życia dziecka ustalona została na podstawie wywiadu i wahała się od 2 do 30. Jednakże, z uwagi na różny wiek dzieci w grupie badanej, i stąd różną całkowitą liczbę epizodów zapalenia płuc i / lub zapalenia oskrzeli w ciągu całego okresu życia dziecka, wyznaczono u wszystkich dzieci wskaźnik liczby zakażeń dolnych dróg oddechowych występujących średnio w ciągu 1 roku; wynosił on od 2 do 5 (wykres 4).

3.2.2 Pobieranie materiału biologicznego od pacjentów

Materiał biologiczny do badań laboratoryjnych pozyskiwano od pacjentów, pozostających na czczo, w godzinach rannych, po zebraniu szczegółowego wywiadu i przeprowadzeniu badania przedmiotowego. Krew pobierano za pomocą nakłucia żyły obwodowej. Wydzielinę z dróg oddechowych odsysano po uprzedniej rehabilitacji oddechowej.



Wykres 4. Wskaźnik liczby epizodów zakażeń dolnych dróg oddechowych występujących średnio w ciągu 1 roku u badanych pacjentów

3.2.3 Morfologia krwi obwodowej i rozmaz krwinek białych

Krew żylna pełna pobierana do próbek z antykoagulantem (kwas etylenodiaminotetraoctowy, EDTA-K₂) była badana w analizatorze SYSMEX XT 2000i, w którym krwinki białe z rozdziałem na 5 populacji (neutrofile, limfocyty, monocyty, eozynofile, bazofile) i retikulocyty oznaczane są przy pomocy detektora optycznego na zasadzie cytometrii przepływowej, z użyciem lasera półprzewodnikowego. Krwinki czerwone i płytki krwi analizowane są przy pomocy detektora RBC z użyciem metody hydroogniskowania dynamicznego. Hemoglobina oznaczana jest metodą fotometryczną z siarczanem laurylu sodu (SLS-Hb).

3.2.4 Klasy główne immunoglobulin

i. Pozyskanie i przygotowanie materiału do badania

Z krwi żyłnej otrzymanej przez nakłucie żyły obwodowej po uzyskaniu skrzepu oddzielono surowicę, w której oznaczono stężenie immunoglobulin IgG, IgA, IgM metodą immunoturbidymetryczną za pomocą analizatora Beckman Coulter AU.

ii. Zasada i wykonanie testu

Po zmieszaniu próby surowicy z buforem TRIS i roztworem antysurowicy następuje swoista reakcja immunoglobuliny pochodzenia ludzkiego z przeciwciałami kozimi anti-IgG, anti-IgA i anti-IgM, odpowiednio. W wyniku tej reakcji powstają nierozpuszczalne kompleksy, których absorbancja jest proporcjonalna do stężenia immunoglobuliny w próbce. W analizatorze Beckman Coulter stężenie immunoglobulin w próbach obliczane jest automatycznie. Najmniejsze wykrywalne stężenie IgA i IgM wynosi 0,01 g/l (1,0 mg/dl), natomiast IgG – 0,004 g/l (0,4 mg/dl).

3.2.5 Stężenie składowych dopełniacza

i. Pozyskanie i przygotowanie materiału do badania

Z krwi żyłnej otrzymanej przez nakłucie żyły obwodowej po uzyskaniu skrzepu oddzielono surowicę, w której oznaczono stężenie składowych C3 i C4 dopełniacza metodą immunoturbidymetryczną za pomocą analizatora Beckman Coulter AUii. Zasada i wykonanie testu

Po zmieszaniu próby surowicy z buforem TRIS (trometamina) i roztworem surowicy odpornościowej następuje swoista reakcja ludzkiego składnika dopełniacza C3 i C4 z przeciwciałami kozimi przeciwko białkom C3 i C4, odpowiednio. W wyniku tej reakcji powstają nierozpuszczalne agregaty, których absorbancja jest proporcjonalna do stężenia składnika dopełniacza w próbce. W analizatorze Beckman Coulter stężenie składowych C3 i C4 dopełniacza w próbach obliczane jest automatycznie. Najmniejsze wykrywalne stężenie C3 wynosi 0,011 g/l (1,1 mg/dl), natomiast C4 – 0,002 g/l (0,2 mg/dl).

3.2.6 Przygotowanie komórek i immunofenotypowanie leukocytów krwi obwodowej

i. Pozyskanie i przygotowanie materiału do badania

Krew żylna od pacjentów pobierana była w objętości 2 ml do probówek z antykoagulantem (kwas etylenodiaminotetraoctowy, EDTA-K₂) w godzinach rannych, transportowana i przechowywana w temperaturze 4-8°C i w ciągu 24 godzin od momentu pobrania podlegała procesowi dalszego przetworzenia.

ii. Immunofenotypowanie leukocytów krwi obwodowej metodą cytometrii przepływowej

Do znakowania komórek stosowano mysie przeciwciała monoklonalne związane z fluorochromami; szczegółową specyfikację przeciwciał przedstawiono w tabeli 2. Badane próbki krwi

rozdzielono na próbki w objętości 50 µl do probówek typu Falcon, zmieszano z odpowiednimi przeciwciałami w proporcjach zalecanych przez producenta i inkubowano w ciemnej komorze przez 15 minut w temperaturze pokojowej. W celu hemolizy erytrocytów i utrwalenia barwienia immunofluorescencyjnego pozostałych komórek przed przystąpieniem do analizy metodą cytometrii przepływowej próbki inkubowano z 2 ml roztworu powodującego lizę komórek (FACS Lysing Solution, Beckton-Dickinson, San Jose, CA, USA) przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie komórki dwukrotnie odwirowano i zawieszono w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS)(Roche, Mannheim, Niemcy). Próbki poddawano akwizycji przy użyciu cytometru przepływowego FACSCanto i oprogramowania FACSDiva (Beckton-Dickinson, USA).

Populacje limfocytów i subpopulacje limfocytów B i T wyodrębniono na podstawie ekspresji markerów powierzchniowych, a ich wartości względne (procentowe) otrzymano metodą sekwencyjnego bramkowania komórek na rozrzutach dwuparametrycznych. Uzyskano wartości procentowe limfocytów CD45^{hi}CD14- wśród leukocytów, podstawowych subpopulacji limfocytów - B CD19+ oraz T CD3+, wśród nich CD4+ i CD8+, jak i komórek NK CD3-CD16/CD56+. W zakresie komórek B otrzymano wartości procentowe subpopulacji limfocytów niedojrzałych CD19+CD21^{lo}, przejściowych CD19+CD38^{hi}sIgM^{hi}, naiwnych CD19+CD27-, pamięci CD19+CD27+, naiwnych nieprzełączonych (non-switched) CD19+CD27-sIgD+, pamięci nieprzełączonych (non-switched)/strefy brzeżnej CD19+CD27+sIgD+ oraz plazmablastów CD19+CD38+sIgM-. Wśród limfocytów T wyodrębniono komórki pomocnicze naiwne CD3+CD4+CD45RA+ i komórki pomocnicze pamięci CD3+CD4+CD45RO+. Przy każdej próbce wykonano kontrolę ujemną z użyciem mysich łańcuchów gamma γ1 i γ2a znakowanych odpowiednio FITC i PE.

Liczbę bezwzględną leukocytów w badanych próbkach otrzymano z analizatora SYSMEX XT 2000i. Na podstawie tej wartości obliczono liczbę bezwzględną każdej z poszczególnych wyżej wymienionych subpopulacji komórkowych, mnożąc jej wartość odsetkową przez liczbę bezwzględną dla nadrzędnej populacji.

Dane przedstawione w cytowanym powyżej doniesieniu Piątosy i wsp. [43] zostały w niniejszej pracy przyjęte jako normy w ocenie różnicowania i dojrzewania subpopulacji limfocytów B u dzieci.

Wartości limfocytów T krwi obwodowej podane w publikacji Schatorje i wsp. [32] przyjęto za referencyjne w ocenie analizowanych subpopulacji limfocytów T; w ocenie markerów różnicowania CD45RA i CD45RO, a także markerów aktywacji HLA-DR przyjęto normy podane w publikacji Huenecke i wsp. [92].

Tabela 2. Specyfika przeciwciał stosowanych do znakowania komórek w badaniu immunofenotypowym

Swoistość przeciwciała	Fluorochrom	Klon	Producent
CD45	Izotiocyanian fluoresceiny (fluoresceine isothiocyanate –FITC)	2D1	Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA (BD)
CD14	Fikoerytryna (PE)	MφP9	BD
CD19	Białko peridynowo-chlorofilowe (peridinin chlorophyll protein – PerCP), PE	4G7	BD
IgM	FITC	G20-127	BD
IgD	FITC	IA6-2	BD
CD38	Allofikocyjanina (APC)	HB7	BD
CD27	PE	L128	BD
CD21	FITC	B-Ly4	BD
CD3	FITC, PerCP	SK7	BD
CD4	FITC, APC	SK3	BD
CD8	PE	SK1	BD
CD16	PE	B73.1	BD
CD56	PE	MY31	BD
CD45RA	FITC	L48	BD
CD45RO	PE	UCHL1	BD
γ1	FITC	X39	BD
γ2a	PE	X40	BD

3.2.7 Podklasy IgG

i. Pozyskanie i przygotowanie materiału do badania

Z prób krwi otrzymanych przez nakłucie żyły obwodowej po uzyskaniu skrzepu oddzielono w krótkim czasie surowicę celem zapobiegnięcia hemolizie, a następnie próby surowicy zostały zamrożone w temperaturze -20°C. Próby zostały rozmrożone i świeżo przygotowane w dniu wykonywania oznaczenia.

ii. Zasada testu

Oznaczenie stężenia podklasy IgG1 wykonano przy pomocy zestawu MININEPH™ Human IgG1 KIT, producent The Binding Site Group Ltd, Birmingham, Wielka Brytania. Określenie stężenia

rozpuszczalnego antygenu metodą nefelometryczną obejmuje reakcję ze specyficzną surowicą w celu powstania nierozpuszczalnych kompleksów. Rozproszenie wiązki światła podczas przechodzenia przez zawiesinę ulega detekcji przez fotodiodę i jest wprost proporcjonalne do stężenia specyficznego białka w badanej próbce. Stężenie jest wyliczane automatycznie przez odniesienie do załączonej do testu krzywej kalibracyjnej. Zastosowanie zalecanego rozcieńczenia pozwala na pomiary w zakresie 1440-23000 mg/l (144,0-2300,0 mg/dl). Granica czułości testu wynosi 655 mg/l (65,5 mg/dl) podczas rozcieńczenia surowicy 1:5.

iii. Wykonanie oznaczenia

Próby surowic badanych i próby surowic kontrolnych zostały rozcieńczone przy pomocy pipety elektronicznej 1:11 w rozpuszczalniku MININEPH Sample Diluent (400 µl rozpuszczalnika i 40 µl badanej surowicy). Do rozcieńczonej próby w objętości 10 µl dodano 400 µl buforu zawierającego 0,099% azydek sodu i 40 µl MININEPH Hu IgG1 Antiserum (zawierającego 0,099% azydek sodu, 0,1% EACA i 0,01% benzydaminę) i w ten sposób przygotowaną zawiesinę poddano detekcji. Zgodnie z zasadą dobrej praktyki laboratoryjnej, po oznaczeniu każdej partii prób badanych, wykonano analizę prób kontrolnych.

Oznaczenie podklas IgG2, IgG3, IgG4 przeprowadzono stosując tę samą procedurę i reagenty tego samego producenta.

3.2.8 Swoiste przeciwciała poszczepienne

3.2.8.1 Przeciwciała swoiste przeciwko toksoidowi tężcowemu

i. Pozyskanie i przygotowanie materiału do badania

Z prób krwi otrzymanych przez nakłucie żyły obwodowej po uzyskaniu skrzepu oddzielono w krótkim czasie surowicę celem zapobiegnięcia hemolizie, a następnie próby surowicy zostały zamrożone w temperaturze -20°C. Próby zostały rozmrożone i świeżo przygotowane w dniu wykonywania oznaczenia.

ii. Zasada testu

Oznaczenie stężenia przeciwciał swoistych klasy IgG przeciwko toksoidowi tężcowemu przeprowadzono przy pomocy testu ilościowego Anti-Tetanus Toxoid ELISA IgG, producent Euroimmun, Lübeck, Niemcy. Zestaw zawiera paski mikrotestowe posiadające studzienki pokryte toksoidem tężcowym. W pierwszym etapie reakcji, próby rozcieńczonych surowic pacjentów są inkubowane w studzienkach, a specyficzne przeciwciała klasy IgG zostają związane z antygenem. W kolejnym etapie w celu detekcji związanych przeciwciał, po raz drugi przeprowadzana jest inkubacja z użyciem znakowanego enzymem przeciwciał przeciwko ludzkim IgG, katalizujących reakcję barwną. Czułość testu wynosi 0,005 IU/ml.

iii. Wykonanie oznaczenia

Próby badanych surowic rozcieńczone 1:101 w buforze (10 µl surowicy w 1,0 ml buforu) inkubowano przez 60 min w temp. 37°C, a następnie przemywano 3-krotnie buforem w objętości 300 µl. Po dodaniu do badanych surowic 100 µl koniugatu (znakowanych peroksydazą króliczych IgG przeciwko IgG ludzkim) próby ponownie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min i kolejny raz przemywano w sposób jak podano powyżej. W następnym etapie dodano do prób 100 µl chromogenu (tetrametylbenzydyna TMB/H₂O₂) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 min. Przebieg reakcji zakończono dodając 100 µl 0,5 M kwasu siarkowego. Pomiar fotometryczny intensywności zabarwienia przeprowadzono po 30 minutach, przy długości fali 450 nm i długości fali referencyjnej w zakresie pomiędzy 620 i 650 nm. Celem uzyskania krzywej standardowej, z której odczytać należało stężenie przeciwciał w badanych próbach surowic, konieczne było wykreślenie wartości ekstynkcyjnej dla 5 surowic standardowych w stężeniach IgG wynoszących 5, 2, 1, 0,1 i 0,001 IU/ml.

3.2.8.2 Przeciwciała swoiste przeciwko toksoidowi błoniczemu

i. Pozyskanie i przygotowanie materiału do badania

Z prób krwi otrzymanych przez nakłucie żyły obwodowej po uzyskaniu skrzepu oddzielono w krótkim czasie surowicę celem zapobiegnięcia hemolizie, a następnie próby surowicy zostały zamrożone w temperaturze -20°C. Próby zostały rozmrożone i świeżo przygotowane w dniu wykonywania oznaczenia.

ii. Zasada testu

Oznaczenie stężenia przeciwciał swoistych klasy IgG przeciwko toksoidowi błoniczemu przeprowadzono przy pomocy testu ilościowego EC129.00 Anti-Diphtheria ELISA IgG, producent Sekisui Virotech GmbH, Rüsselsheim, Niemcy. Zestaw zawiera płytki mikrotestowe posiadające studzienki pokryte toksoidem błoniczym. W pierwszym etapie reakcji, próby rozcieńczonych surowic pacjentów są inkubowane w studzienkach, a specyficzne przeciwciała klasy IgG zostają związane z antygenem. W kolejnym etapie w celu detekcji związanych przeciwciał, po raz drugi przeprowadzana jest inkubacja z użyciem znakowanego enzymem przeciwciał przeciwko ludzkim IgG, katalizujących reakcję barwną. Czulość testu wynosi 0,05 IU/ml.

iii. Wykonanie oznaczenia

Próby badanych surowic rozcieńczone 1:101 w buforze (10 µl surowicy w 1,0 ml buforu) inkubowano przez 30 min w temp. 37°C, a następnie przemywano 4-krotnie buforem w objętości 400 µl. Po dodaniu do badanych surowic 100 µl koniugatu (znakowanych peroksydazą króliczych IgG przeciwko IgG ludzkim) próby ponownie inkubowano, w temperaturze 37° przez 30 min, poczym kolejny raz przemywano w sposób jak podano powyżej. W następnym etapie dodano do prób 100 µl chromogenu (tetrametylbenzydyna TMB/H₂O₂) i inkubowano w temperaturze 37° przez 30 min.

Przebieg reakcji zakończono dodając 50µl roztworu cytrynianu. Pomiar fotometryczny intensywności zabarwienia przeprowadzono przy długości fali 450 nm i długości fali referencyjnej w zakresie pomiędzy 620 i 690 nm. Celem uzyskania krzywej standardowej, z której odczytać należało stężenie przeciwciał w badanych próbach surowic, konieczne było wykreślenie wartości ekstynkcji dla 6 surowic standardowych w stężeniach IgG wynoszących 5, 2, 1, 0,5, 0,2 i 0,1 IU/ml.

3.2.8.3 Przeciwciała swoiste przeciwko polisacharydowi *Haemophilus influenzae* typu b

i. Pozyskanie i przygotowanie materiału do badania

Z prób krwi otrzymanych przez nakłucie żyły obwodowej po uzyskaniu skrzepu oddzielono w krótkim czasie surowicę celem zapobiegnięcia hemolizie, a następnie próby surowicy zostały zamrożone w temperaturze -20°C. Próby zostały rozmrożone i świeżo przygotowane w dniu wykonywania oznaczenia.

ii. Zasada testu

Oznaczenie stężenia przeciwciał swoistych przeciwko fosforanowi polirybozylorybitolu (PRP) *Haemophilus influenzae* typu b (Hib) przeprowadzono przy pomocy testu ilościowego ELISA IMMUNOZYM HiB-IgG, producent PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg, Niemcy. Zestaw zawiera paski testowe posiadające studzienki pokryte PRP. W pierwszym etapie reakcji, próby rozcieńczonych surowic pacjentów są inkubowane w studzienkach, a specyficzne przeciwciała klasy IgG zostają związane z antygenem w fazie stałej. W kolejnym etapie w celu detekcji związanych przeciwciał, po raz drugi przeprowadzana jest inkubacja z użyciem znakowanego enzymem przeciwciał przeciwko ludzkim IgG, katalizujących reakcję barwną.

Czułość testu wynosi $\leq 0,1 \mu\text{g/ml}$

iii. Wykonanie oznaczenia

Próby badanych surowic rozcieńczone 1:25 w buforze (20 µl surowicy w 500 µl buforu) inkubowano przez 60 min w temperaturze pokojowej, a następnie przemywano 3-krotnie buforem w objętości 250 µl. Po dodaniu 100 µl koniugatu (znakowanych peroksydazą króliczych IgG przeciwko IgG ludzkim) do prób badanych surowic ponownie je inkubowano, w temperaturze pokojowej przez 60 min, a następnie kolejny raz przemywano w sposób jak podano powyżej. W kolejnym etapie dodano do prób 100 µl chromogenu (tetrametylbenzydyna TMB/H₂O₂) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min, poczym zakończono przebieg reakcji dodając 100 µl 0,5 M kwasu siarkowego. Pomiar fotometryczny intensywności zabarwienia przeprowadzono po 10 minutach, przy długości fali 450 nm i długości fali referencyjnej 650 nm. Celem uzyskania krzywej standardowej w skali półlogarytmicznej, z której odczytać należało stężenie przeciwciał w badanych próbach surowic, konieczne było wykreślenie wartości ekstynkcji dla 5 surowic standardowych.

3.2.8.4 Przeciwciała swoiste przeciwko antygenowi HBs wirusa zapalenia wątroby typu B

i. Pozyskanie i przygotowanie materiału do badania

Z krwi żyłnej otrzymanej przez nakłucie żyły obwodowej po uzyskaniu skrzepu oddzielono surowicę i odwirowano

ii. Zasada testu i wykonanie oznaczenia

Oznaczenie stężenia przeciwciał anti-HBs przeprowadzono za pomocą testu AxSYM AUSAB, producent Abbott Diagnostics Division, Wiesbaden, Niemcy. Test ten oparty jest o metodę immunoenzymatyczną z użyciem mikrocząsteczek (Microparticle Enzyme Immunoassay, MEIA). Granica wykrywalności wynosi 2 mIU/ml.

Próby surowicy oraz mikrocząsteczki opłaszczony rekinowanym antygenem wirusa zapalenia wątroby typu B (rHBsAg) mieszane są w naczyniu reakcyjnym. Jeśli przeciwciała anti-HBs są obecne w badanej próbce, wiążą się z antygenem opłaszczonym na mikrocząsteczkach, tworząc w mieszaninie reakcyjnej kompleks antygen-przeciwciało. Część mieszaniny reakcyjnej przenoszona jest następnie do celki matrycowej, gdzie mikrocząsteczki wiążą się na stałe z włóknem szklanym celki matrycowej. Dodanie do celki matrycowej biotynylowanego antygenu rHBs prowadzi do powstania kompleksu antygen-przeciwciało-antygen, który wiąże się z dodanym następnie koniugatem zawierającym przeciwciała przeciwko biotynie znakowane fosfatazą zasadową. Następnie dodawany jest substrat – fosforan 4-metyloumbeliferylu. Koniugat znakowany fosfatazą zasadową katalizuje odszczepienie grupy fosforanowej z substratu i powstanie produktu fluorescencji , 4-metyloumbeliferonu. Natężenie fluorescencji mierzone jest przez układ optyczny MEIA. Stężenie przeciwciał anti-HBs w badanej próbce określone jest w oparciu o uprzednio wygenerowaną krzywą kalibracyjną.

3.2.9 Badanie stężenia 25(OH)D3 w surowicy

i. Pozyskanie i przygotowanie materiału do badania

Z prób krwi otrzymanych przez nakłucie żyły obwodowej po uzyskaniu skrzepu oddzielono w krótkim czasie surowicę celem zapobiegnięcia hemolizie, a następnie próby surowicy zostały zamrożone w temperaturze -20°C. W dniu wykonywania oznaczenia próby surowicy zostały rozmrożone, wymieszane i odwirowane.

ii. Zasada testu

Oznaczenie stężenia 25(OH)D3 przeprowadzono za pomocą testu DIASource 25OH-VIT.D3-RIA-CT, producent DIASource ImmunoAssays S.A., Louvain-la-Neuve, Belgia. W pierwszym etapie próby surowicy ekstrahowane są acetonitrem. Ustalona ilość 25(OH)D3 znakowanej ¹²⁵I współzawodniczy z witaminą D3 z ekstrahowanych prób surowicy o wiązanie z ustaloną ilością swoistych przeciwciał unieruchomionych na dolnej i wewnętrznej powierzchni probówki. Po

inkubacji, w wyniku aspiracji dochodzi do zatrzymania reakcji kompetytywnej, po czym próby zliczane są w liczniku gamma. Granica detekcji wynosi 1,2 ng/ml.

iii. Wykonanie oznaczenia

Po ekstrakcji 100 µl surowicy przy pomocy 0,5 ml acetonitrilu próby były mieszane i odwirowane (800-1500g) w temperaturze pokojowej. Do probówek opłaszczonych przeciwciałami anti-25(OH)D3 dodano 100 µl powstałego w ten sposób supernatantu, a następnie 400 µl buforu inkubacyjnego z zawartością 0,1% azydku sodowego oraz 50 µl 25(OH)D3 znakowanej ¹²⁵I i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Reakcja została zatrzymana przez aspirację zawartości probówek, które następnie przepłukano roztworem TRIS HCl. Po 2 minutach zliczano próbówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

W celu obliczenia związanej radioaktywności jako odsetka wiązania w punkcie 0 kalibratora (surowica końska) konieczne było wykreślenie krzywej kalibracyjnej funkcji stężenia 25(OH)D3 dla każdego punktu kalibratora i następnie określenie stężenia 25(OH)D3 w badanych próbach przez interpolację.

3.2.10 Badanie mikrobiologiczne płwociny lub wydzieliny z dróg oddechowych

i. Przygotowanie materiału do badania

Na wstępie przeprowadzono homogenizację materiału przy pomocy środka mukolitycznego i wykonano preparat barwiony metodą Grama w celu określenia przydatności diagnostycznej materiału.

ii. Wykonanie posiewu

Posiew płwociny wykonano metodą półilościową, zaś posiew wydzieliny z dróg oddechowych metodą ilościową, na podłoże Columbia zawierające agar z 5% denaturowaną krwią baranią oraz na podłoża selekcyjne umożliwiające wykrycie istotnych patogenów:

- podłoże czekoladowe z bacytracyną w kierunku *Haemophilus influenzae*
- podłoże Streptococcus Selective Medium z kwasem nalidyksowym i kolistyną w kierunku *Streptococcus pneumoniae* i paciorkowców beta-hemolitycznych
- podłoże Chapmana z 7,5% NaCl, mannitolem i roztworem czerwieni fenolowej w kierunku *Staphylococcus aureus*
- podłoże MacConkey'a – agar z solami żółciowymi, fioletem krystalicznym i laktozą w kierunku pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz pałeczek niefermentujących
- podłoże Sabourauda z gentamycyną i chloramfenikolem w kierunku grzybów.

Inkubację posiewu w kierunku bakterii przeprowadzono w temperaturze 35-37°C w warunkach tlenowych, zaś w kierunku *Streptococcus pneumoniae*, paciorkowców beta-hemolitycznych i *Haemophilus influenzae* w atmosferze 5% CO₂. Inkubację posiewów w kierunku

grzybów przeprowadzono w temperaturze 35-37°C przez 24 godziny, a następnie w temperaturze 25°C przez kolejne 6 dni.

Identyfikacji drobnoustrojów dokonano za pomocą analizatora mikrobiologicznego PhoenixTM100 oraz dodatkowych testów biochemicznych i lateksowych.

Lekowrażliwość oznaczono przy pomocy analizatora mikrobiologicznego PhoenixTM100 oraz metodą dyfuzyjno-krażkową według zaleceń Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) oraz oznaczono wartość minimalnego stężenia hamującego (minimal inhibitory concentration, MIC) przy użyciu pasków z gradientem stężeń.

Interpretacja badania plwociny polegała na ocenie wzrostu drobnoustrojów w skali od 1+ do 4+, natomiast wydzieliny z dróg oddechowych na uzyskaniu dodatniego posiewu patogenu w ilości > 10⁵/ml w monoszczepie.

3.2.11 Analiza statystyczna

W celu zapewnienia porównywalności wartości analizowanych cech w obrębie badanej grupy dzieci, w stosunku do której odnoszą się różne przedziały normy wynikające z wieku, dla potrzeb analizy statystycznej przeprowadzona została normalizacja tych wartości. Indywidualny poziom każdego badanego czynnika odniesiony został do odpowiedniego dla danego dziecka przedziału normy według następującego wzoru:

$$Norm[X] = 1 - \frac{NorD - X}{NorG - NorD}$$

w którym:

X – oznaczony u dziecka poziom czynnika

$Norm[X]$ – znormalizowany poziom czynnika

$NorD$ – dolna granica przedziału normy wiekowej

$NorG$ – górna granica przedziału normy wiekowej

Uzyskane w ten sposób wartości znormalizowane są liczbami niemianowanymi i charakteryzują się następującymi właściwościami:

- liczby mniejsze od 1 odpowiadają oznaczeniom „poniżej normy”,
- liczby od 1 do 2 odpowiadają oznaczeniom „w granicach normy”, przy czym wielkość dystansu od 1 lub 2 to stopień oddalenia od (odpowiednio) dolnej lub górnej granicy przedziału normy,

- liczby powyżej 2 odpowiadają oznaczeniom „powyżej normy”.

W dalszym ciągu nazwy analizowanych cech poprzedzone przedrostkiem „Norm_” oznaczać będą cechy znormalizowane w opisany sposób.

Metody statystyczne zastosowane w niniejszym opracowaniu:

- Celem oceny zależności pomiędzy badanymi czynnikami zastosowano współczynnik korelacji rang Spearmana (ρ), który wykorzystywany jest do opisu korelacji dwóch cech ilościowych w przypadku niewielkiej liczby obserwacji. Współczynnik ρ przyjmuje wartości z zakresu od -1 do 1, przy czym wartości współczynnika ρ zbliżone do 0 świadczą o braku korelacji pomiędzy badanymi zmiennymi, a wartości bliskie końcom tego przedziału świadczą o silnej zależności. Dodatni znak ρ oznacza istnienie współzależności dodatniej, natomiast ujemny oznacza ujemną zależność korelacyjną. Poziom istotności p współczynnika korelacji rangowej poniżej 0,05 oznaczał zależność istotną statystycznie.

W celu wyjaśnienia, jaka część zmienności analizowanej cechy jest wyjaśniana przez drugą z cech wyznaczono współczynnik determinacji R^2 , który przyjmuje wartości z przedziału od 0 do 1. Graficznie przedstawiono model liniowy trendu wybranych zależności analizowanych danych.

Ponadto w opracowaniu użyte zostały:

- test Kruskala-Wallisa – nieparametryczny test rangowy stosowany w przypadku, gdy analizowane cechy ilościowe w rozpatrywanych podgrupach nie mają charakteru rozkładu normalnego
- test Manna-Whitneya do porównań między dwoma grupami
- dokładny test Fishera – do oceny zależności pomiędzy dwiema cechami jakościowymi

Wszystkie analizy przeprowadzone zostały przy pomocy programu STATISTICA firmy StatSoft.

4. WYNIKI BADAŃ

Parametry statystyki opisowej analizowanych zmiennych z uwzględnieniem uzyskanych wartości znormalizowanych (wg wzoru podanego powyżej w sekcji 3.2.11), mianowicie średniej arytmetycznej, mediany, maksimum, minimum oraz odchylenia standardowego (SD) przedstawia tabela 3.

Tabela 3. Parametry statystyki opisowej analizowanych zmiennych

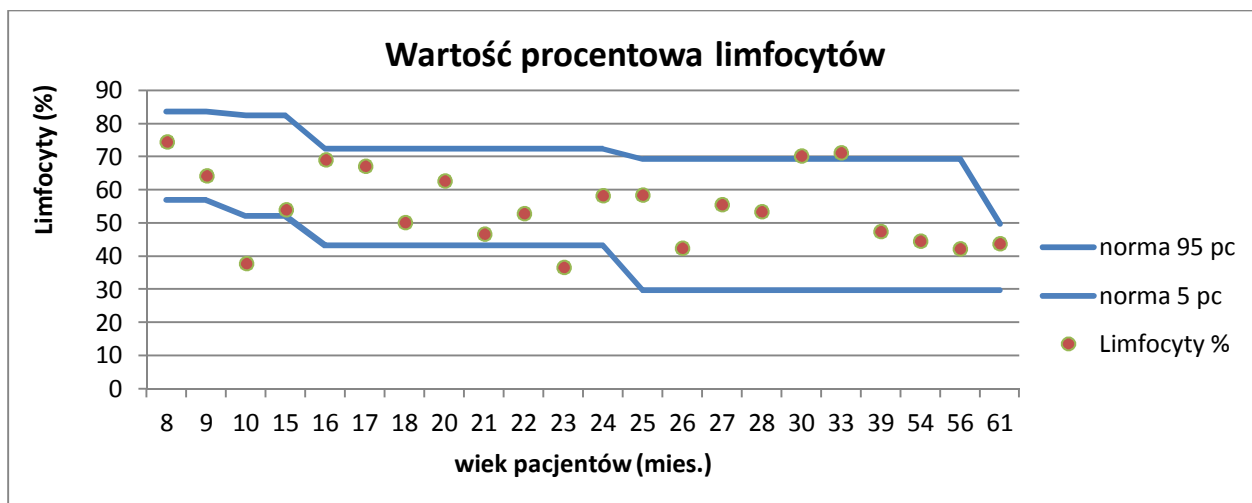
Zmienna	N	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
Wiek	22	26,5	23,5	8,0	61,0	14,6
Norm_IgG	22	0,864	0,881	0,666	0,988	0,093
Norm_IgA	22	0,967	0,944	0,611	1,333	0,179
Norm_IgM	22	1,117	1,071	0,819	1,730	0,234
Norm_IgG1	22	1,057	1,073	0,849	1,283	0,125
Norm_IgG2	22	1,252	1,241	1,122	1,570	0,090
Norm_IgG3	22	1,339	1,256	0,896	2,048	0,296
Norm_IgG4	22	1,116	1,071	1,031	1,374	0,096
Norm_C3	22	1,063	1,050	0,683	1,383	0,178
Norm_C4	22	1,292	1,300	0,933	1,867	0,216
Liczba zakażeń dróg oddech.	22	3,227	3,000	2,000	5,000	0,973
Norm_Limfocyty %	22	1,464	1,485	0,534	2,056	0,379
Norm_Limfocyty #	22	1,593	1,469	0,914	2,416	0,460
Norm_CD19%	22	1,571	1,490	0,984	2,543	0,388
Norm_CD19#	22	1,600	1,465	0,999	2,870	0,469
Norm_CD21lo%	22	1,495	1,420	0,685	3,710	0,548
Norm_CD21lo#	22	1,624	1,435	0,808	3,977	0,671
Norm_CD38hilgMhi%	22	1,934	2,111	0,663	3,792	0,850
Norm_CD38hilgMhi#	22	1,972	1,794	0,824	3,729	0,972
Norm_CD27-IgD+%	22	1,261	1,286	0,401	1,943	0,446
Norm_CD27-IgD+#	22	1,492	1,418	0,908	2,773	0,450
Norm_CD27+%	22	1,815	1,865	0,830	2,812	0,557
Norm_CD27+	22	1,855	1,675	0,960	3,687	0,641
Norm_CD27+IgD+%	22	1,298	1,165	0,765	1,959	0,387
Norm_CD27+IgD+	22	1,454	1,279	0,871	2,992	0,487
Norm_CD38+IgM-%	22	3,801	3,054	0,800	10,892	2,969
Norm_CD38+IgM-#	22	3,906	2,742	0,667	14,900	3,268
Anty-HBs	22	285,0	61,0	0,3	1000,0	398,0
Anty-Tetanus toxoid	22	0,590	0,132	0,000	2,341	0,791

Zmienna	N	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
Anty-Diphtheria toxoid	22	0,682	0,225	0,000	2,550	0,850
Anty-Hib PRP	22	2,711	0,888	0,076	9,594	3,368
CD3+CD4-CD8- %	22	4,209	3,800	1,100	9,700	2,012
CD3+CD4+CD8+ %	22	0,223	0,200	0,000	0,700	0,172
Norm_CD3 %	22	1,207	1,216	0,725	1,804	0,314
Norm_CD3#	22	1,481	1,405	0,864	2,361	0,351
Norm_CD4 %	22	1,222	1,156	0,406	2,331	0,463
Norm_CD4#	22	1,411	1,328	0,750	2,093	0,316
Norm_CD8 %	22	0,997	0,982	0,431	1,556	0,275
Norm_CD8#	22	1,260	1,183	0,841	2,264	0,364
Norm_CD4:CD8	22	1,778	1,683	0,841	4,056	0,692
Norm_CD3+HLA-DR+ %	22	2,118	1,705	0,949	5,103	1,177
CD45RA:CD45RO	22	4,150	3,850	0,300	8,200	2,227
Norm_CD3-CD16/CD56+ %	22	1,223	1,195	0,922	1,730	0,212
Norm_CD3-CD16/CD56+ #	22	1,125	1,083	0,990	1,408	0,115
Norm_CD3+CD16/CD56+ %	22	0,989	0,981	0,896	1,432	0,106
Norm_CD3+CD16/CD56+ #	22	1,028	0,987	0,936	1,583	0,137
CD11a-limf	22	91,64	93,00	64,00	99,00	7,68
CD11a-gran	22	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
CD11b-limf	22	14,32	14,50	5,00	26,00	5,52
CD11b-gran	22	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
CD11c-limf	22	14,64	14,50	5,00	32,00	6,37
CD11c-gran	22	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
CD18-limf	22	95,64	97,00	88,00	99,00	3,13
CD18-gran	22	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
25(OH)D3	22	44,06	40,15	18,20	82,40	18,63

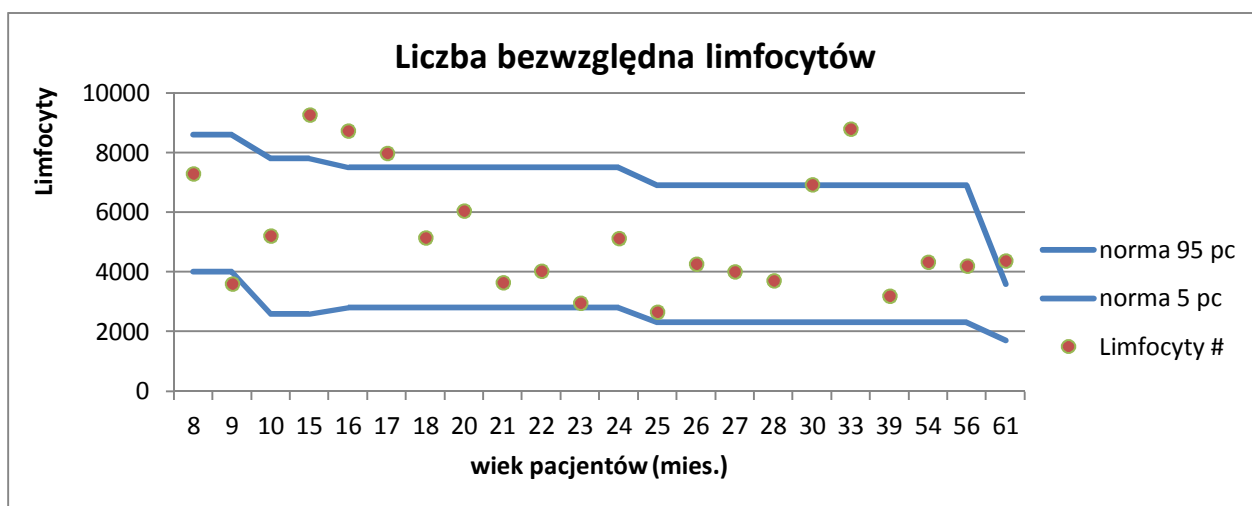
4.1 Subpopulacje limfocytów B

4.1.1 Limfocyty B

Z wartości procentowej i obliczonej bezwzględnej liczby limfocytów u pacjentów (wykresy 5a, 5b) uzyskano dane dotyczące populacji limfocytów B CD19+ (wykresy 6a, 6b)

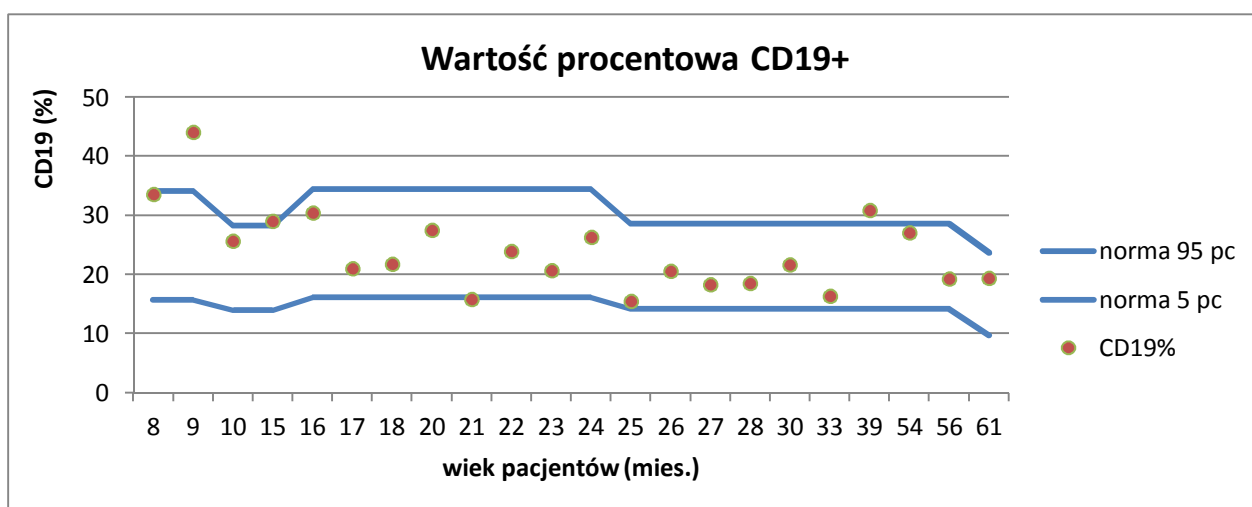


Wykres 5a

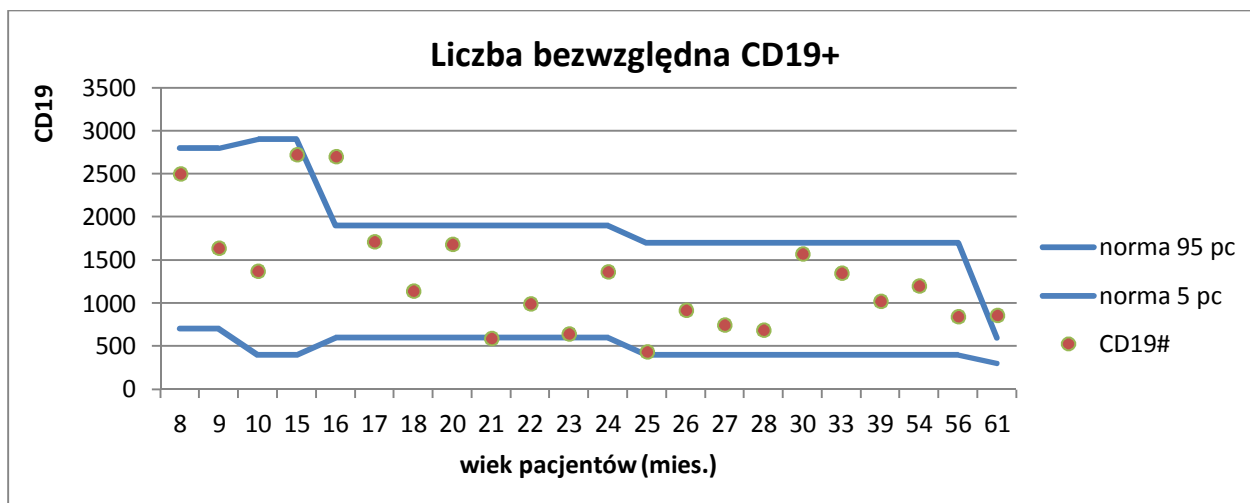


Wykres 5b

Wykresy 5a-b. Wartość procentowa i liczba bezwzględna limfocytów CD45^{hi}CD14⁻ we krwi obwodowej u badanych pacjentów



Wykres 6a

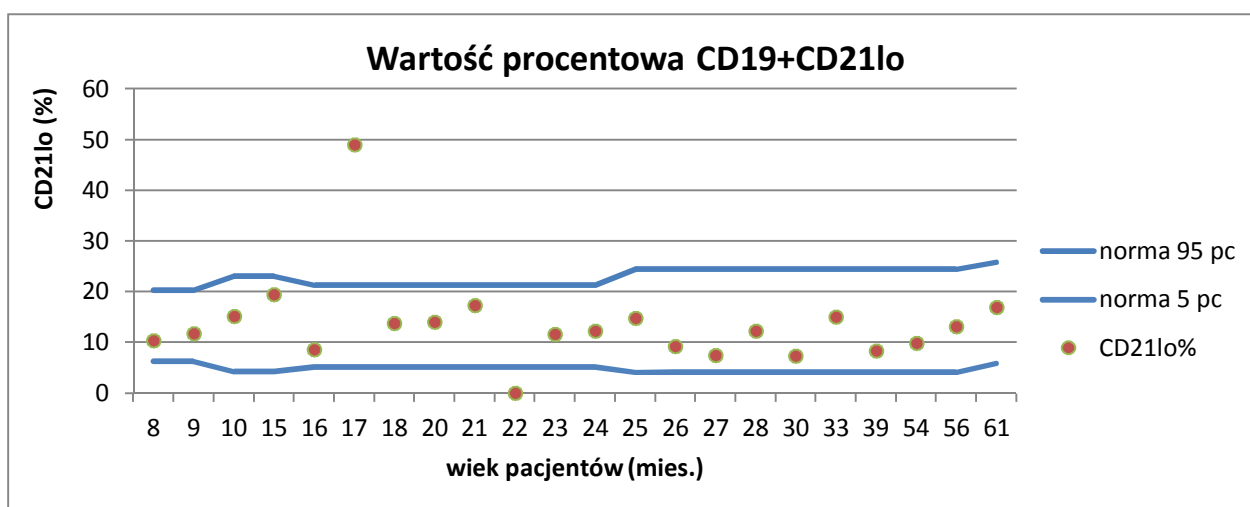


Wykres 6b

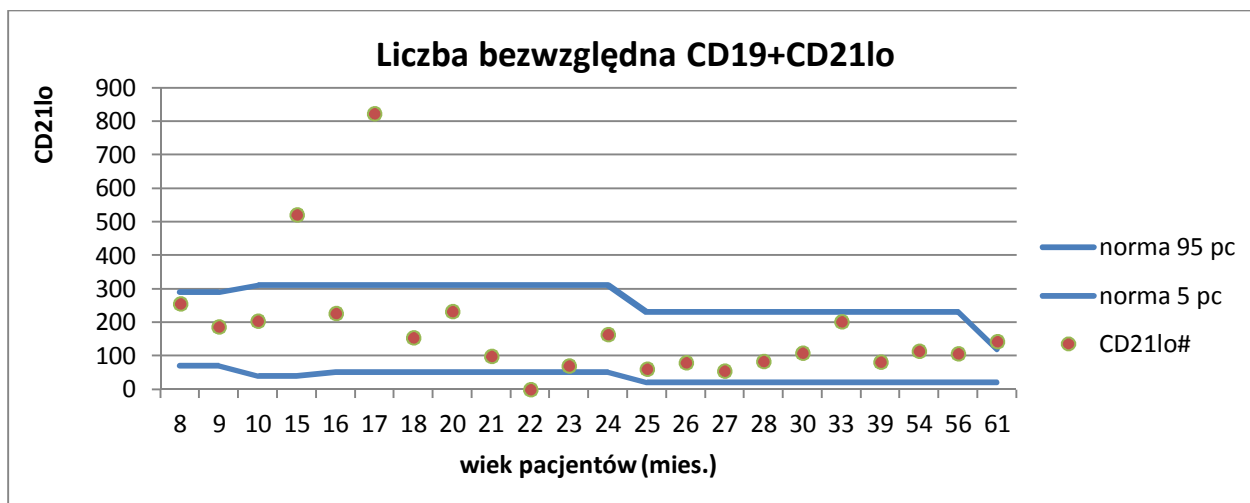
Wykresy 6a-b. Wartość procentowa i liczba bezwzględna limfocytów B CD19+ we krwi obwodowej u badanych pacjentów

4.1.2 Limfocyty B niedojrzałe

Niedojrzałe limfocyty B to komórki opuszczające szpik kostny, aby następnie poprzez stadium limfocytów B przejściowych, wejść w dalsze fazy dojrzewania, prowadzące do powstania dojrzałych limfocytów B. Populacja niedojrzałych limfocytów B charakteryzuje się ekspresją CD19, antygenu wspólnego dla linii komórek B oraz małą ekspresją antygenu CD21 (CD21^{lo}). U 18 dzieci z badanej grupy zarówno wartość procentowa, jak i liczba bezwzględna limfocytów B niedojrzałych mieściła się w zakresie normy dla wieku. U dwojga dzieci była zwiększona, a u jednego zmniejszona liczba bezwzględna tych komórek przy prawidłowej wartości procentowej, natomiast u jednego dziecka zwiększeniu ich wartości względnej nie towarzyszyło zwiększenie liczby bezwzględnej. U jednego dziecka nie zidentyfikowano limfocytów CD19+CD21^{lo} we krwi obwodowej (wykresy 7a, 7b)



Wykres 7a

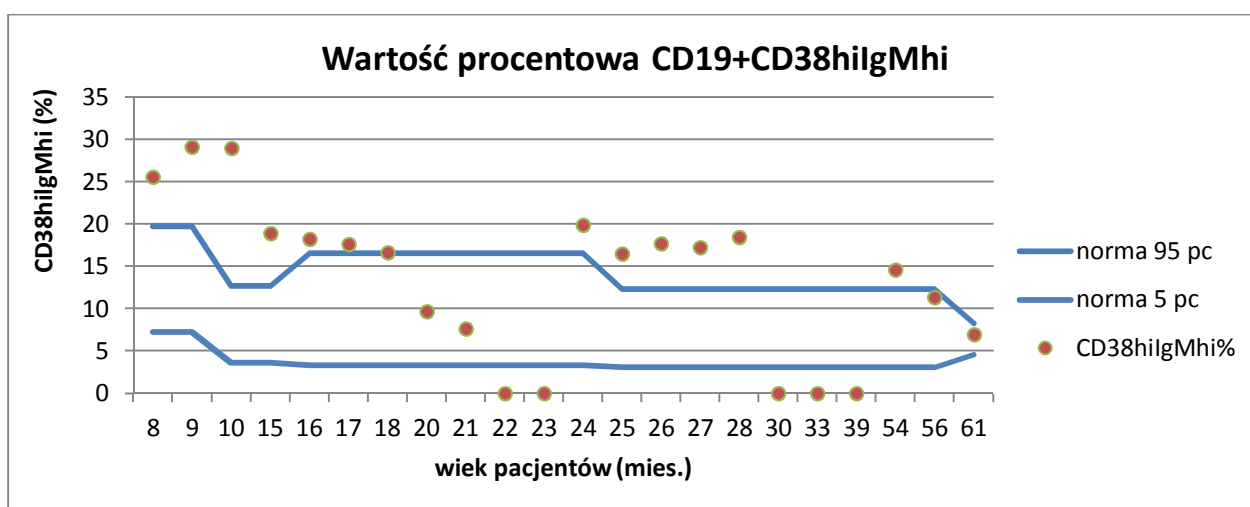


Wykres 7b

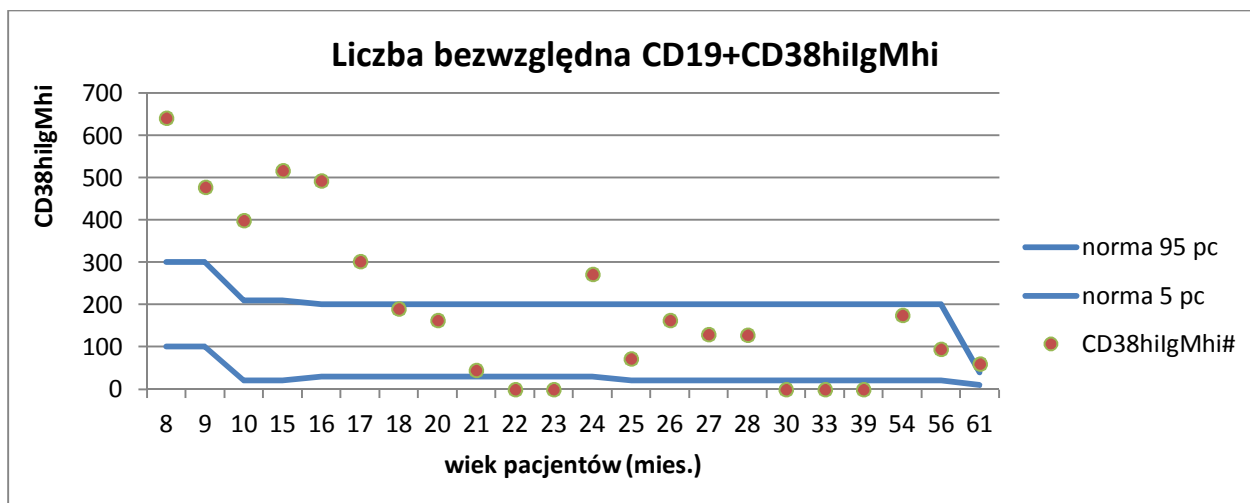
Wykresy 7a-b. Wartość procentowa i liczba bezwzględna limfocytów B niedojrzałych CD19+CD21^{lo} we krwi obwodowej u badanych pacjentów

4.1.3 Limfocyty B przejściowe

Pośrednie stadium dojrzewania pomiędzy niedojrzałymi a dojrzałymi komórkami B reprezentowane jest przez limfocyty B przejściowe. Populacja tych komórek cechuje się w badaniu immunofenotypowym dużą ekspresją markerów CD38 i IgM (CD38^{hi}IgM^{hi}). Spośród 22 dzieci w grupie badanej, u 13 z nich (59%) wartość procentowa tych komórek była zwiększona i przekraczała wartość 95 centyla normy wiekowej dla dzieci zdrowych. W sześciu przypadkach dzieci, u których odnotowano zwiększenie wartości względnej limfocytów B przejściowych, liczba bezwzględna tych komórek mieściła się w normie dla wieku. U pięciorga dzieci z badanej grupy nie stwierdzono ekspresji antygenu CD38 na limfocytach B (wykresy 8a, 8b).



Wykres 8a

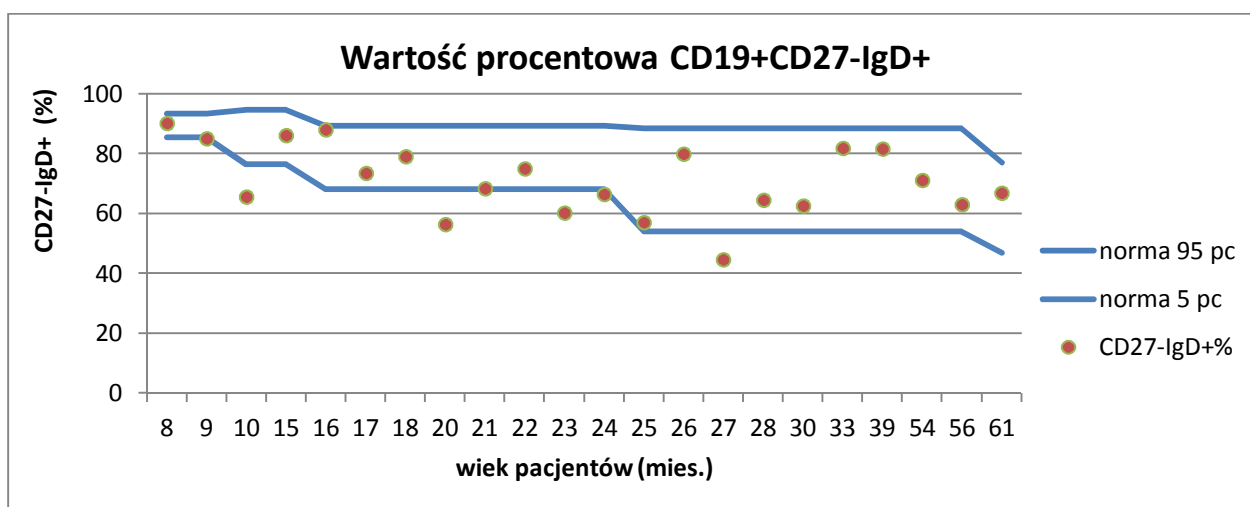


Wykres 8b

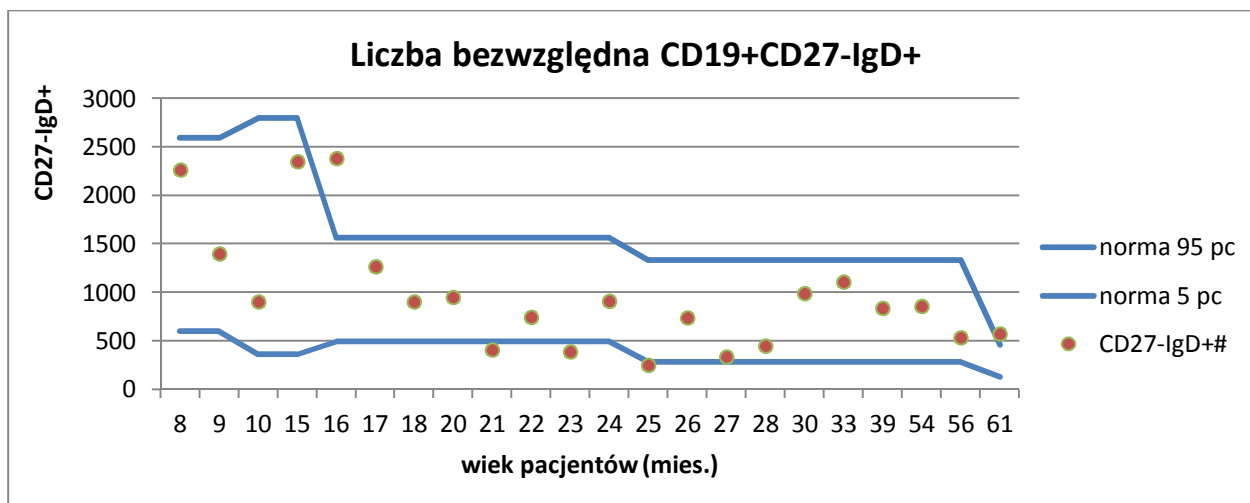
Wykresy 8a-b. Wartość procentowa i liczba bezwzględna limfocytów B przejściowych CD19+CD38^{hi}IgM^{hi} we krwi obwodowej u badanych pacjentów

4.1.4 Limfocyty B naiwne

Dojrzałe limfocyty naiwne charakteryzują się nieobecnością antygenu CD27 oraz ekspresją powierzchniowych IgD. U sześciorga dzieci z grupy badanej (27%) zmniejszona była wartość procentowa limfocytów B naiwnych, a u dwojga dzieci – zmniejszona była liczba bezwzględna tych komórek. Stopniowe zmniejszanie się populacji limfocytów B naiwnych wraz z wiekiem jest fizjologicznym procesem związanym z dojrzewaniem układu odpornościowego w odpowiedzi na antygeny, a wartości referencyjne tych komórek, opracowane dla różnych grup wiekowych odzwierciedlają to zjawisko (wykresy 9a, 9b).



Wykres 9a

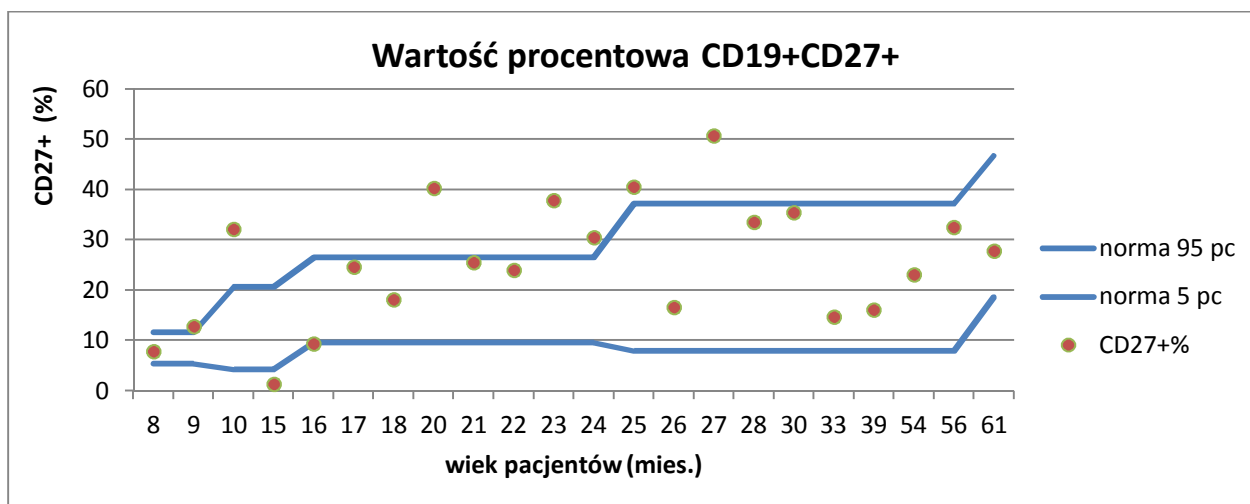


Wykres 9b

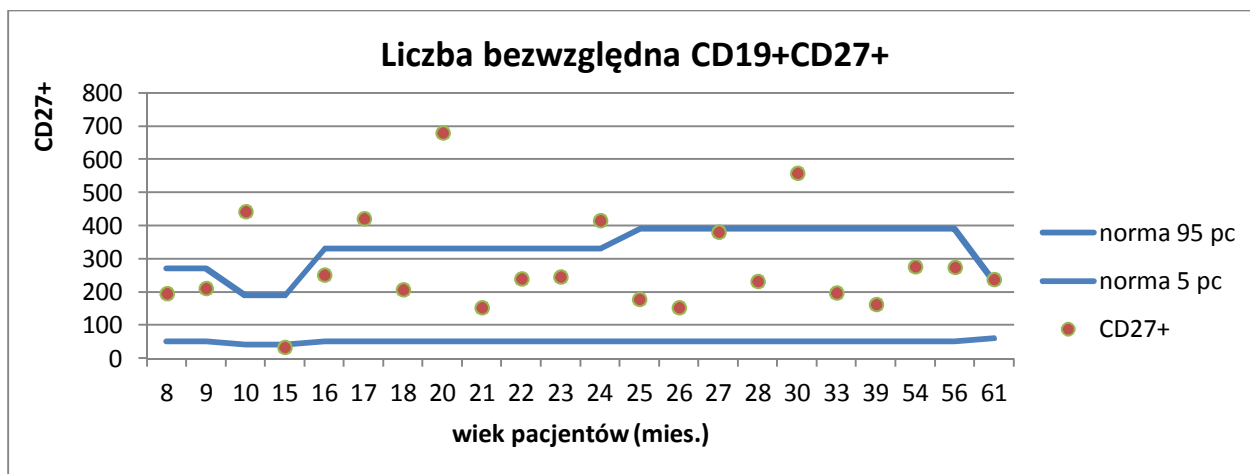
Wykresy 9a-b. Wartość procentowa i liczba bezwzględna limfocytów B naiwnych CD19+CD27-IgD+ we krwi obwodowej u badanych pacjentów

4.1.5 Limfocyty B pamięci

Markerem limfocytów B pamięci jest antygen CD27, natomiast ekspresja IgD na limfocytach B pozwala na wyróżnienie wśród nich populacji *non-switched*, odpowiadającej limfocytom strefy brzeżnej śledziony (marginal zone – like, MZL) o fenotypie CD19+CD27+IgD+ . W badanej grupie dzieci wartość procentowa całkowitej puli limfocytów B pamięci była zwiększona w stosunku do normy wiekowej u sześciorga z nich (27%), natomiast liczba bezwzględna limfocytów B pamięci była zwiększona u trojga dzieci (13,5%) (wykresy 10a, 10b). Z kolei wartość względną limfocytów B pamięci IgD+ (MZL) była zmniejszona w stosunku do wartości referencyjnych odpowiednich dla wieku u czworga dzieci z grupy badanej (18%), które nie ukończyły 2 roku życia (wykresy 11a, 11b).

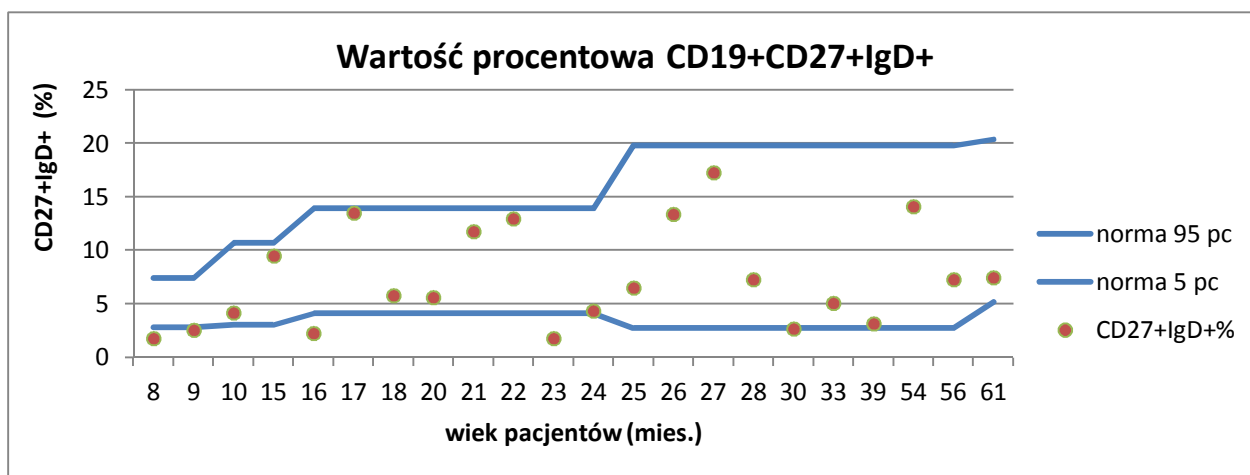


Wykres 10a

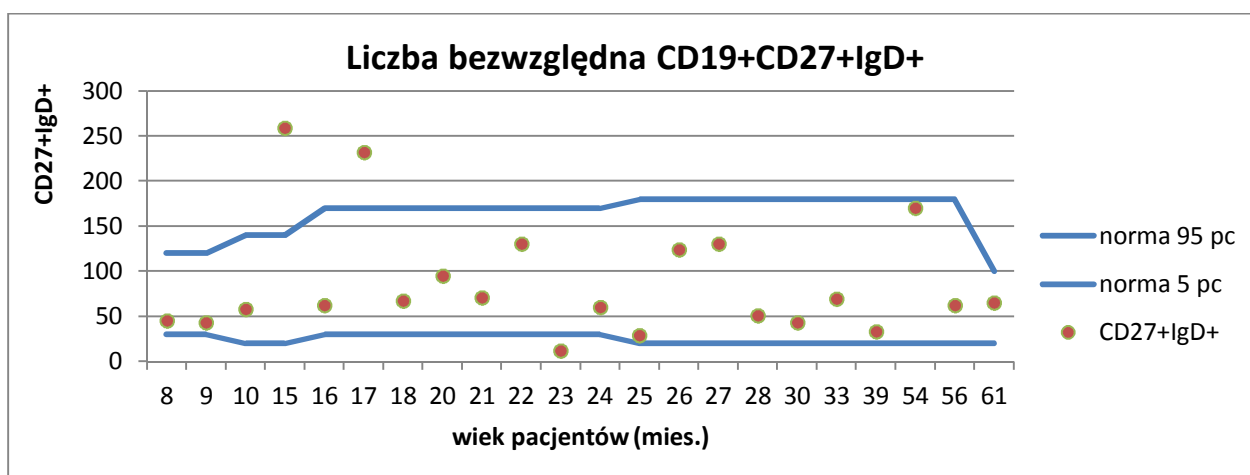


Wykres 10b

Wykresy 10a-b. Wartość procentowa i liczba bezwzględna limfocytów B pamięci CD19+CD27+ we krwi obwodowej u badanych pacjentów



Wykres 11a

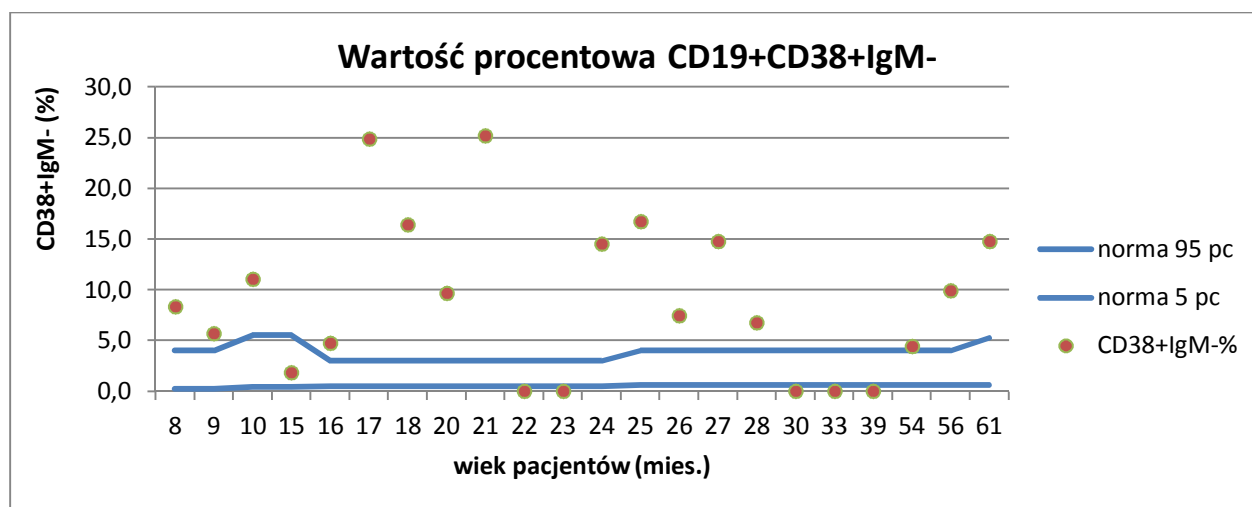


Wykres 11b

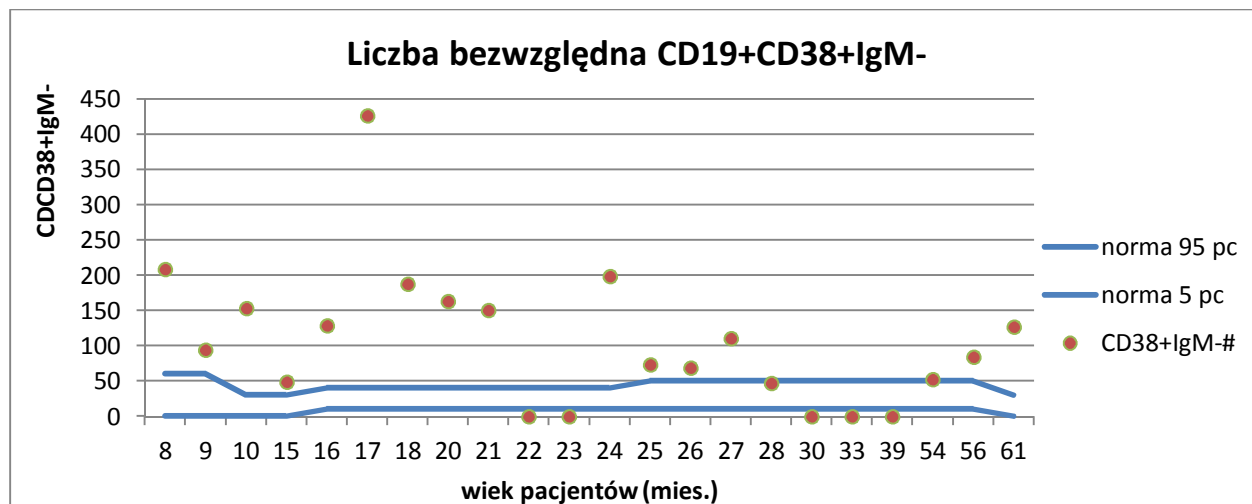
Wykresy 11a-b. Wartość procentowa i liczba bezwzględna limfocytów B pamięci nieprzełączonych / limfocytów B strefy brzeżnej CD19+CD27+IgD+ we krwi obwodowej u badanych pacjentów

4.1.6 Plazmablasty

Analiza ekspresji antygenów CD19, CD38, CD138 oraz IgM na limfocytach B pozwala na wyróżnienie populacji plazmablastów o fenotypie CD19+CD38+IgM-. Odsetek plazmablastów w populacji limfocytów B we krwi obwodowej u dzieci zdrowych nie przekracza zwykle 5 i, zgodnie z piśmiennictwem [20,43], nie wykazuje istotnych zmian w różnych grupach wiekowych. W badanej grupie dzieci z hipogammaglobulinemią aż u 16 z nich (73%) zwiększona była wartość procentowa tych komórek i ich liczba bezwzględna. U pięciorga dzieci brak ekspresji antygeny CD38 na limfocytach nie pozwolił na identyfikację plazmablastów we krwi obwodowej (wykresy 12a, 12b).



Wykres 12a



Wykres 12b

Wykresy 12a-b. Wartość procentowa i liczba bezwzględna plazmablastów CD19+CD38+IgM- we krwi obwodowej u badanych pacjentów

Zależności statystyczne pomiędzy surowiczym stężeniem immunoglobuliny G a wartościami procentowymi oraz liczbami bezwzględными poszczególnych analizowanych subpopulacji limfocytów B przedstawione zostały w tabeli 4, pozycje od 1 do 14.

Tabela 4. Współczynnik korelacji rang Spearmana (ρ) i poziom jego istotności (p) dla zależności pomiędzy znormalizowanym stężeniem IgG w surowicy a subpopulacjami limfocytów i stężeniem antygenowo-swoistych przeciwciał poszczepiennych

L.p.	Zależności	ρ	p
1	Norm_IgG a Norm_CD19%	0,219	0,328
2	Norm_IgG a Norm_CD19#	-0,007	0,974
3	Norm_IgG a Norm_CD38hIlgMhi%	0,093	0,681
4	Norm_IgG a Norm_CD38hIlgMhi#	-0,014	0,950
5	Norm_IgG a Norm_CD38+IgM-%	-0,011	0,960
6	Norm_IgG a Norm_CD38+IgM-#	-0,019	0,932
7	Norm_IgG a Norm_CD21lo%	-0,198	0,378
8	Norm_IgG a Norm_CD21lo#	0,010	0,966
9	Norm_IgG a Norm_CD27-IgD+%	-0,029	0,897
10	Norm_IgG a Norm_CD27-IgD+#	0,021	0,926
11	Norm_IgG a Norm_CD27+%	0,124	0,583
12	Norm_IgG a Norm_CD27+#	0,118	0,601
13	Norm_IgG a Norm_CD27+IgD+%	-0,312	0,157
14	Norm_IgG a Norm_CD27+IgD+#	-0,223	0,318
15	Norm_IgG a anty-HBs	-0,381	0,080
16	Norm_IgG a anty-Tetanus toxoid	-0,295	0,182
17	Norm_IgG a anty-Diphtheria toxoid	-0,145	0,519
18	Norm_IgG a anty-Hib PRP	-0,017	0,940
19	Norm_IgG a Norm_CD3 %	-0,016	0,942
20	Norm_IgG a Norm_CD3#	-0,104	0,644
21	Norm_IgG a Norm_CD4 %	-0,154	0,495
22	Norm_IgG a Norm_CD4#	-0,151	0,503
23	Norm_IgG a Norm_CD8 %	-0,099	0,662
24	Norm_IgG a Norm_CD8#	-0,230	0,303
25	Norm_IgG a Norm_CD4:CD8	-0,036	0,875
26	Norm_IgG a CD45RA:CD45RO	-0,376	0,085
27	Norm_IgG a CD3+CD4-CD8- %	-0,118	0,601
28	Norm_IgG a CD3+CD4+CD8+ %	0,123	0,585
29	Norm_IgG a Norm_CD3+HLA-DR+ %	0,036	0,875

Z tabeli tej wynika, że nie uzyskano istotności statystycznej w przypadku analizy tych korelacji ($p > 0,05$).

Podobnie, nie była istotna statystycznie analizowana zależność pomiędzy rodzajem hipogammaglobulinemii u dzieci a wartościami procentowymi i liczbami bezwzględными subpopulacji limfocytów B, którą przedstawiono kolejno w tabelach od 5.1 do 5.14.

Tabela 5.1-14. Zależność pomiędzy podgrupami hipogammaglobulinemii a znormalizowanymi wartościami procentowymi i liczbami bezwzględными analizowanych subpopulacji limfocytów B

Tabela 5.1

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_CD19+%				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,590	1,504	1,311	2,167	0,314
B	3	1,262	1,160	1,097	1,528	0,233
C	7	1,706	1,825	1,268	2,056	0,321
D	6	1,550	1,369	0,984	2,543	0,552

$p=0,245$

Tabela 5.2

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_CD19+#				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,685	1,450	1,342	2,870	0,587
B	3	1,557	1,735	1,030	1,907	0,465
C	7	1,681	1,839	1,271	1,932	0,261
D	6	1,440	1,266	0,998	2,619	0,602

$p=0,360$

Tabela 5.3

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_CD19+CD38hlgMhi%				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,843	1,954	0,663	2,591	0,663
B	3	1,261	0,663	0,663	2,458	1,036
C	7	2,473	2,469	1,486	3,792	0,702
D	6	1,731	1,732	0,750	2,755	0,914

$p=0,223$

Tabela 5.4

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_CD19+CD38hlgMhi#				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,859	1,874	0,889	2,667	0,651
B	3	1,022	0,889	0,889	1,289	0,231
C	7	2,599	2,606	1,611	3,705	0,874
D	6	1,828	1,347	0,824	3,729	1,213

$p=0,092$

Tabela 5.5

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_ CD19+CD38+IgM-%				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	4,261	3,878	0,824	7,368	2,401
B	3	2,466	0,824	0,824	5,750	2,844
C	7	4,315	3,139	1,276	10,756	3,143
D	6	3,408	2,575	0,800	10,892	3,779

p=0,400

Tabela 5.6

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_ CD19+CD38+IgM-#				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	4,257	4,042	0,750	7,300	2,639
B	3	1,358	0,750	0,750	2,575	1,054
C	7	5,688	4,483	2,075	14,900	4,353
D	6	2,749	2,246	0,667	5,700	2,145

p=0,110

Tabela 5.7

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_ CD19+CD21lo%				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,405	1,441	1,207	1,553	0,145
B	3	1,407	1,527	1,158	1,537	0,216
C	7	1,770	1,549	1,167	3,710	0,883
D	6	1,307	1,395	0,685	1,753	0,352

p=0,640

Tabela 5.8

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_ CD19+CD21lo#				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,514	1,407	1,290	2,240	0,361
B	3	1,497	1,429	1,195	1,867	0,341
C	7	2,077	1,708	1,167	3,977	0,978
D	6	1,267	1,249	0,808	1,685	0,315

p=0,163

Tabela 5.9

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_ CD19+CD27-IgD+%				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,489	1,593	0,925	1,805	0,338
B	3	1,384	1,250	1,090	1,811	0,379
C	7	1,068	1,255	0,401	1,608	0,528
D	6	1,195	1,161	0,632	1,943	0,447

p=0,460

Tabela 5.10

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_ CD19+CD27-IgD+#				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,558	1,415	1,241	2,355	0,401
B	3	1,479	1,674	0,972	1,791	0,443
C	7	1,520	1,550	1,053	1,836	0,301
D	6	1,401	1,201	0,907	2,773	0,698

p=0,521

Tabela 5.11

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_ CD19+CD27+%				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,581	1,417	1,280	2,229	0,382
B	3	1,763	1,942	1,232	2,116	0,468
C	7	1,945	1,888	0,830	2,812	0,742
D	6	1,923	1,909	0,988	2,671	0,552

p=0,588

Tabela 5.12

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_ CD19+CD27+#				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,705	1,613	1,303	2,311	0,402
B	3	1,770	1,435	1,376	2,497	0,631
C	7	2,220	1,974	0,960	3,687	0,957
D	6	1,622	1,689	1,368	1,732	0,144

p=0,569

Tabela 5.13

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_ CD19+CD27+IgD+%				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,213	1,162	1,029	1,626	0,222
B	3	1,121	1,140	1,000	1,222	0,112
C	7	1,488	1,667	0,783	1,959	0,454
D	6	1,250	1,113	0,765	1,908	0,496

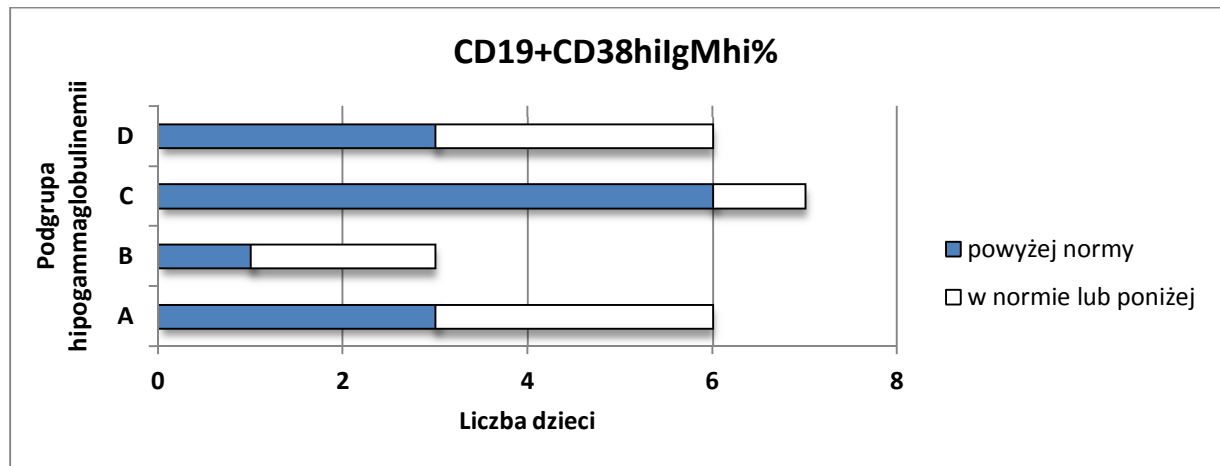
p=0,513

Tabela 5.14

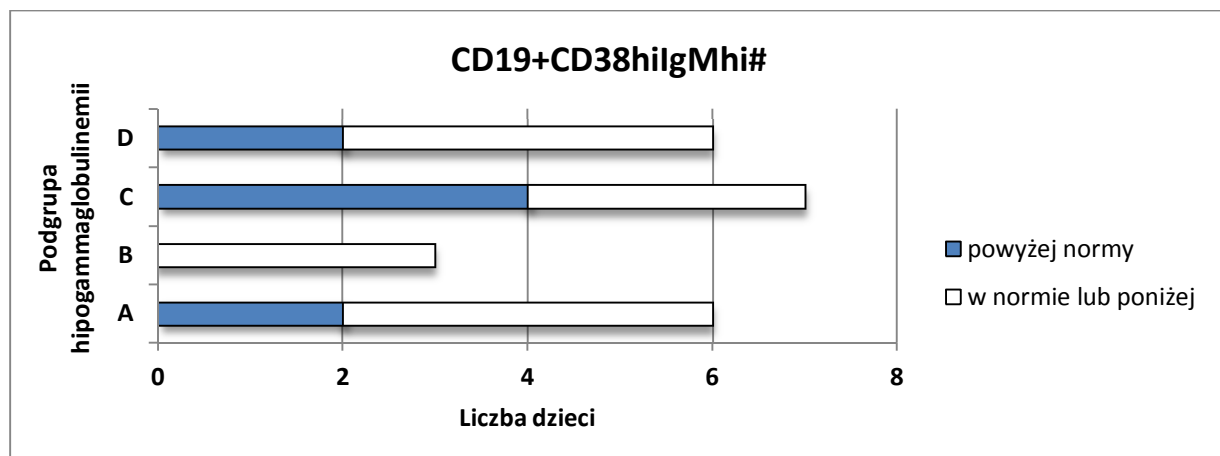
Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_ CD19+CD27+IgD+#				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,339	1,263	1,081	1,650	0,219
B	3	1,169	1,144	1,056	1,306	0,127
C	7	1,858	1,688	1,167	2,992	0,657
D	6	1,241	1,211	0,871	1,714	0,274

p=0,065

Na wykresach 13a, 13b przedstawiono występowanie zwiększonej wartości procentowej i liczby bezwzględnej limfocytów B przejściowych CD19+CD38^{hi}IgM^{hi} zależnie od przynależności badanych dzieci do poszczególnych podgrup.



Wykres 13a



Wykres 13b

Wykresy 13a-b. Występowanie zwiększonej wartości procentowej oraz liczby bezwzględnej limfocytów B przejściowych CD19+CD38^{hi}IgM^{hi} zależnie od przynależności badanych dzieci do poszczególnych podgrup hipogammaglobulinemii

Wykazano istotną statystycznie ($p=0,039$) różnicę w korelacji pomiędzy podgrupą C badanych dzieci a połączonymi grupami A, B, D pod względem uzyskanych znormalizowanych wartości bezwzględnych limfocytów B przejściowych CD19+CD38^{hi}IgM^{hi}; dane te zostały przedstawione w tabeli 6.

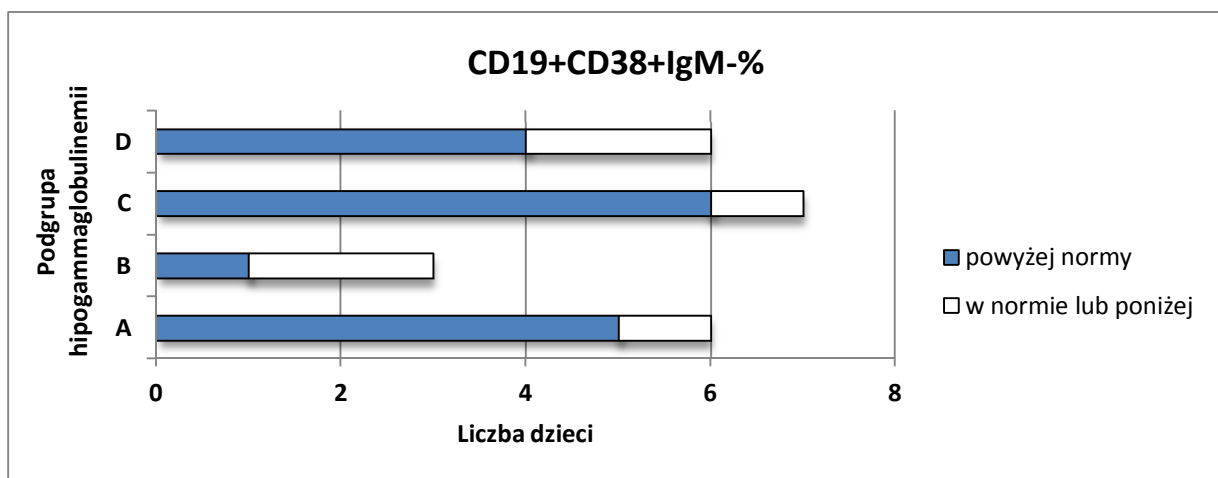
Tabela 6. Zależność pomiędzy podgrupą C hipogammaglobulinemii a połączonymi grupami A, B i D w odniesieniu do znormalizowanej liczby bezwzględnej limfocytów B przejściowych CD19+CD38^{hi}IgM^{hi}

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_CD19+CD38 ^{hi} IgM ^{hi} #				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
C	7	2,599	2,606	1,611	3,705	0,874
A lub B lub D	15	1,679	1,422	0,824	3,729	0,895

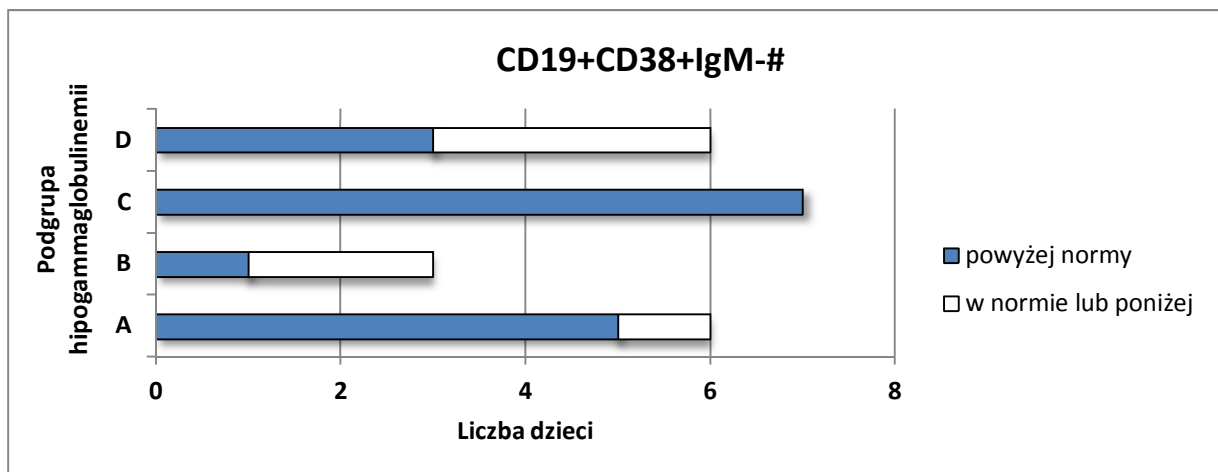
p=0,039

Na kolejnych wykresach 14a, 14b przedstawiono występowanie zwiększonej wartości procentowej i liczby bezwzględnej plazmablastów CD19+CD38+IgM- zależnie od przynależności dzieci do poszczególnych podgrup.

Wykres 14a



Wykres 14a



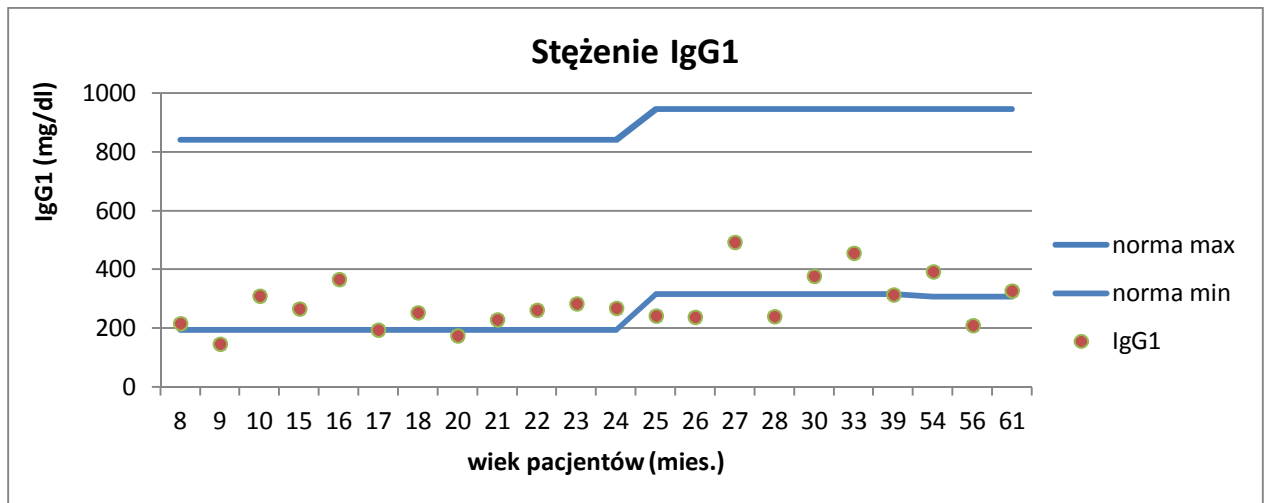
Wykres 14b

Wykresy 14a-b. Występowanie zwiększonej wartości procentowej oraz liczby bezwzględnej plazmablastów CD19+CD38+IgM- zależnie od przynależności badanych dzieci do poszczególnych podgrup hipogammaglobulinemii

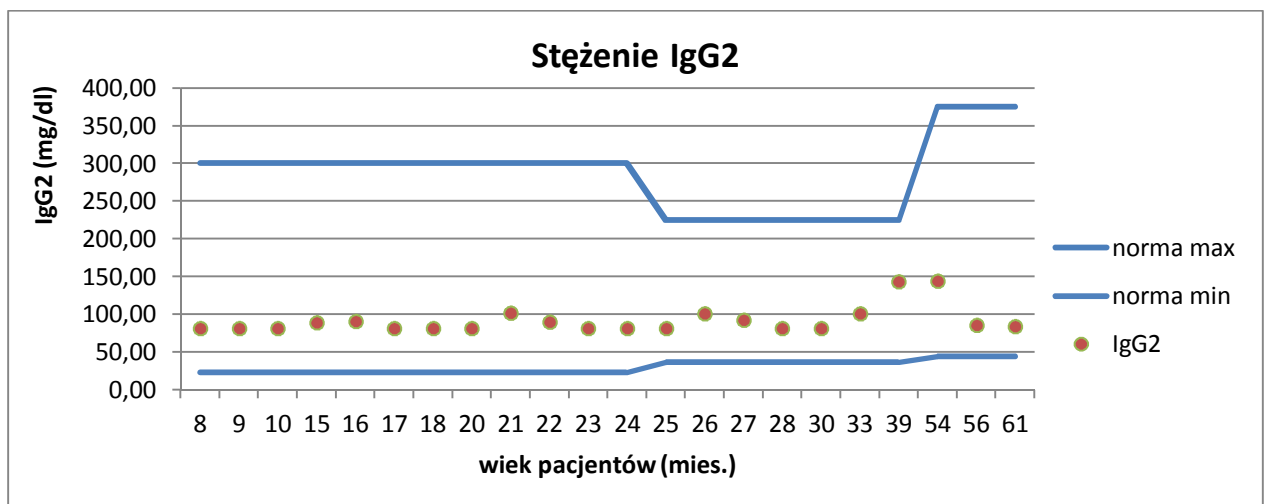
4.2 Odpowiedź immunologiczna związana z przeciwciałami

4.2.1 Podklasy IgG

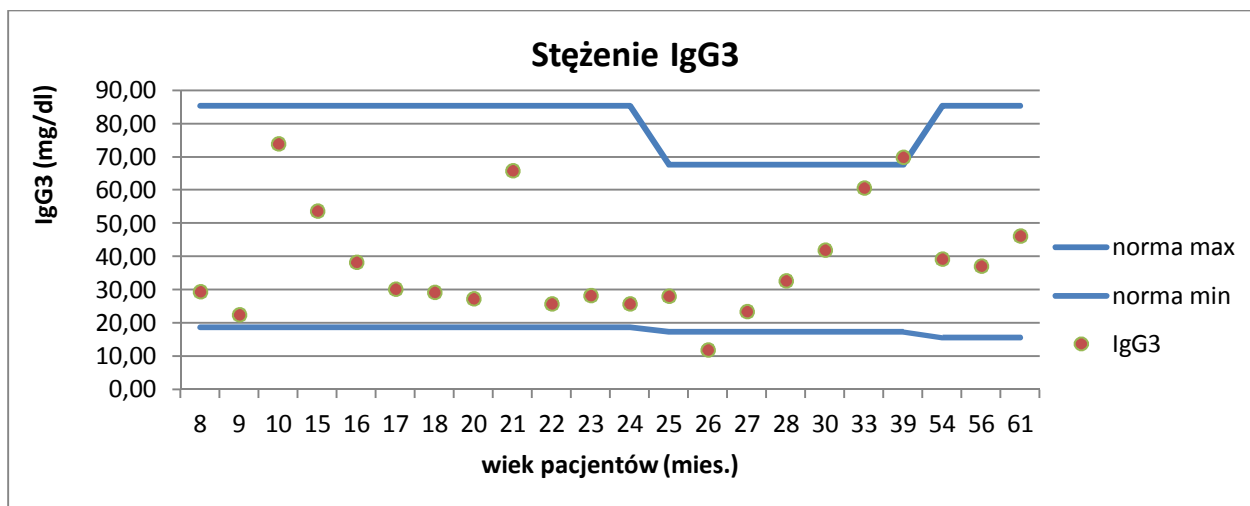
Spośród 22 dzieci z hipogammaglobulinemią w grupie badanej, obniżone stężenie podklasy IgG1 stwierdzono u 11 dzieci (50% wszystkich pacjentów). U jednego z dzieci niedobór IgG1 skojarzony był z niedoborem podklasy IgG3 (wykresy 15a, 15b, 15c, 15d).



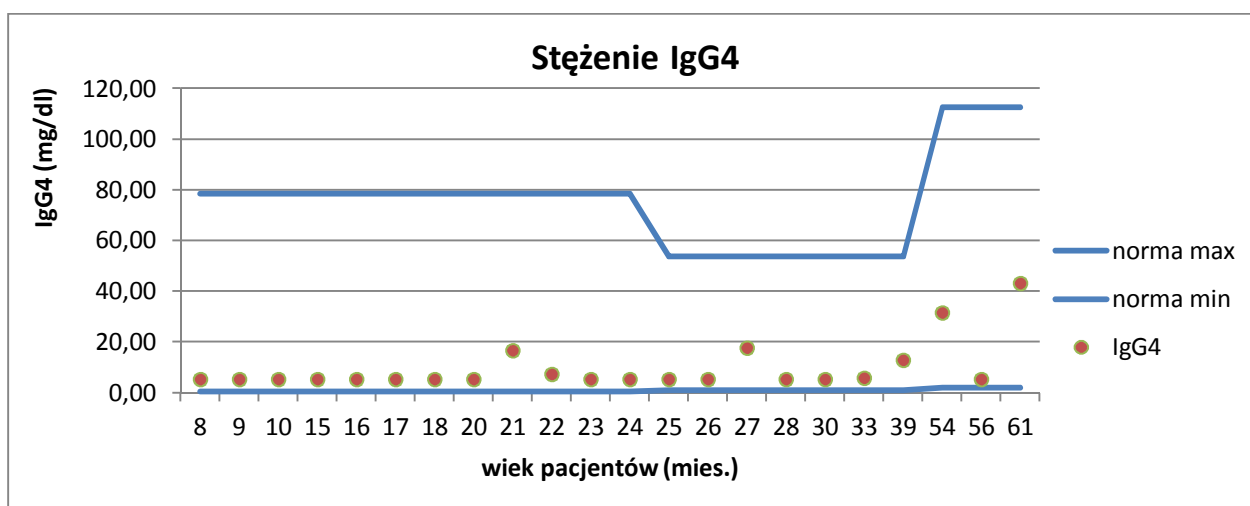
Wykres 15a



Wykres 15b



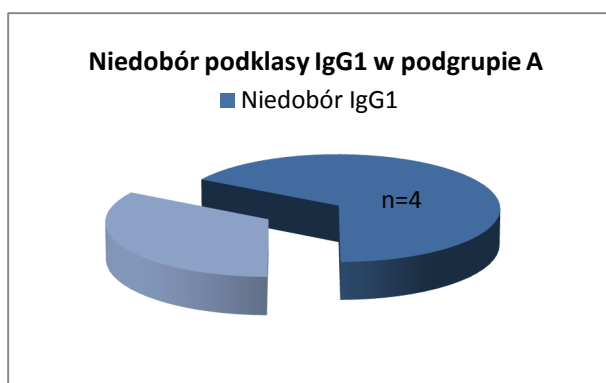
Wykres 15c



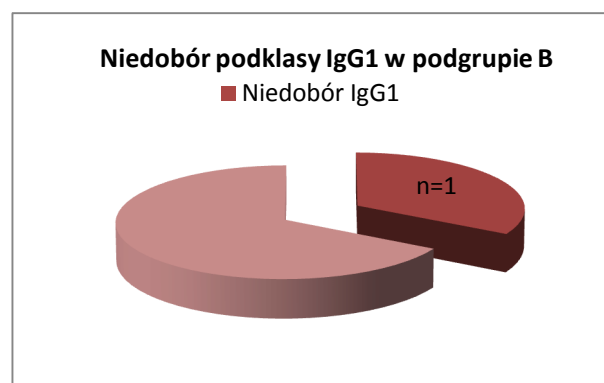
Wykres 15d

Wykresy 15a-d. Stężenie podklas IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 w surowicy u badanych pacjentów w odniesieniu do zakresu norm (5 i 95 centyl) odpowiednich dla wieku

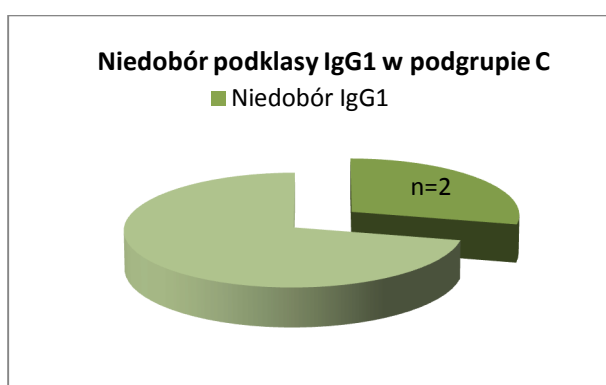
Interesujące jest, że niedobór podklasy IgG1 występował najczęściej u dzieci, u których hipogammaglobulinemia dotyczyła wyłącznie klasy głównej IgG – podgrupa A (u 4 spośród 11 dzieci), a rzadziej u dzieci kolejno w podgrupie D, z obniżonym stężeniem wszystkich izotypów (3 spośród 11 dzieci), następnie w postaci niedoboru klas głównych IgG i jednego z pozostałych izotypów – IgA (podgrupa C)(u 2 spośród 11 dzieci) i IgM (podgrupa B) (u 1 dziecka spośród wszystkich ze stwierdzonym niedoborem IgG1)(wykresy 16a, 16b, 16c, 16d).



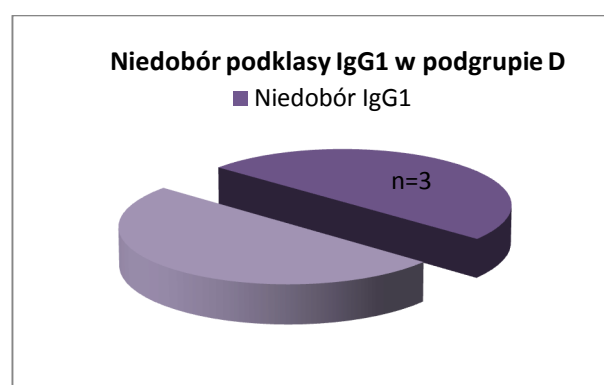
Wykres 16a



Wykres 16b



Wykres 16c



Wykres 16d

Wykresy 16a-d. Niedobór podklasy IgG1 w podgrupach badanych pacjentów w zależności od rodzaju hipogammaglobulinemii

W interpretacji wyniku badania stężenia podklas IgG należy uwzględnić fakt, że hipogammaglobulinemia IgG z zasady znajduje swoje odzwierciedlenie w obniżeniu stężenia podklasy IgG1. Współistnienie obniżonego surowiczego stężenia podklasy IgG1 z obniżonym stężeniem całkowitym IgG nie spełnia więc, zgodnie z tą definicją, kryterium niedoboru podklasy IgG, który powinien być stwierdzony u pacjenta mającego prawidłowe całkowite stężenie IgG w surowicy [5].

Analiza statystyczna zależności pomiędzy rodzajem hipogammaglobulinemii u badanych dzieci a znormalizowanym poziomem podklasy IgG1 nie wykazała istotności statystycznej; dane te przedstawia tabela 5.15

Tabela 5.15. Zależność pomiędzy podgrupami hipogammaglobulinemii a znormalizowanym stężeniem podklasy IgG1

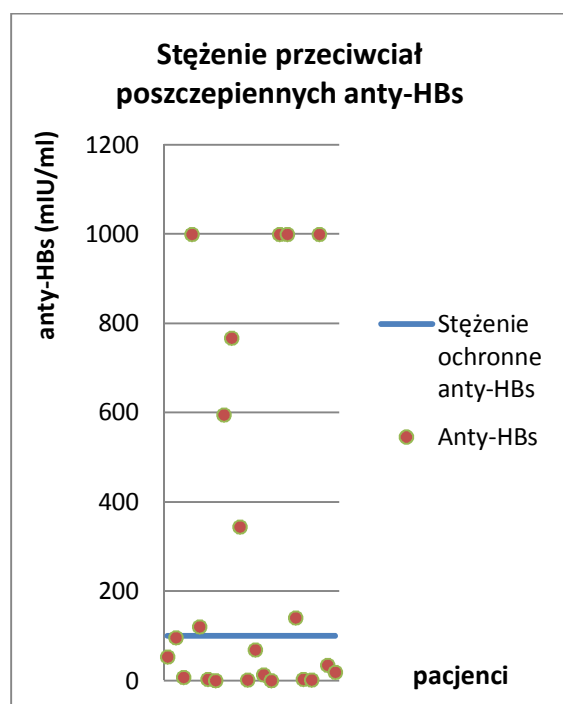
Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_IgG1				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	0,995	1,017	0,849	1,116	0,110
B	3	1,068	1,099	0,883	1,222	0,172
C	7	1,102	1,112	0,970	1,283	0,110
D	6	1,061	1,078	0,882	1,265	0,141

p=0,498

4.2.2 Antygenowo-swoiste przeciwciała poszczepienne

4.2.2.1 Przeciwciała anty-HBs

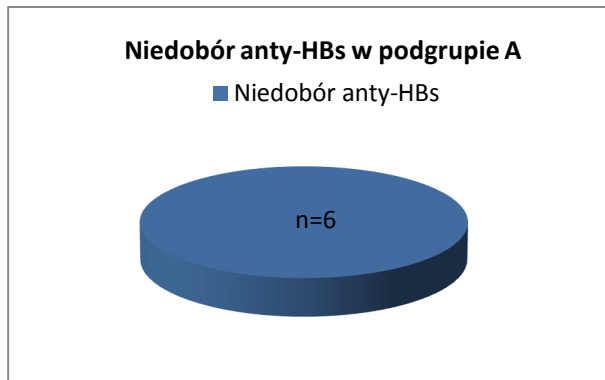
W badanej grupie dzieci stężenie przeciwciał anty-HBs poniżej 100 mIU/ml stwierdzono łącznie u 13 dzieci z grupy badanej (59%)(wykres 17), podczas gdy spośród nich u 7 dzieci (32% dzieci grupy badanej) wynosiło ono mniej niż 10 mIU/ml pomimo przeprowadzenia u wszystkich dzieci pełnego cyklu immunizacji czynnej.



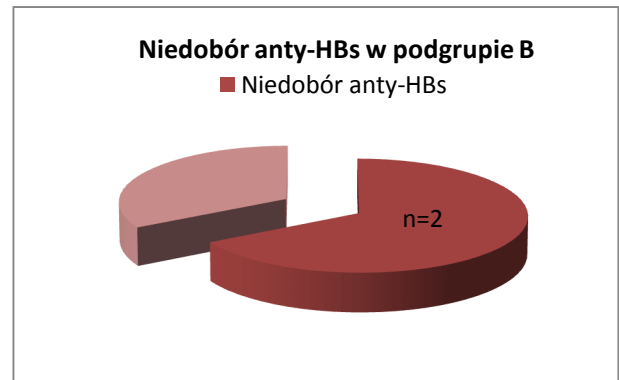
Wykres 17. Stężenie antygenowo-swoistych przeciwciał poszczepiennych przeciwko antygenowi powierzchniowemu wirusa zapalenia wątroby typu B - anty-HBs w surowicy u badanych pacjentów

Należy podkreślić, że upośledzenie odpowiedzi poszczepiennej przeciwko wzv B stwierdzono w 6 przypadkach, czyli u wszystkich dzieci należących do podgrupy A, związanej z hipogammaglobulinemią wyłącznie w zakresie klasy IgG. Niedobór przeciwciał swoistych anty-HBs występował w 3 przypadkach u dzieci w podgrupie C, dotyczącej niedoboru immunoglobulin G i A; u

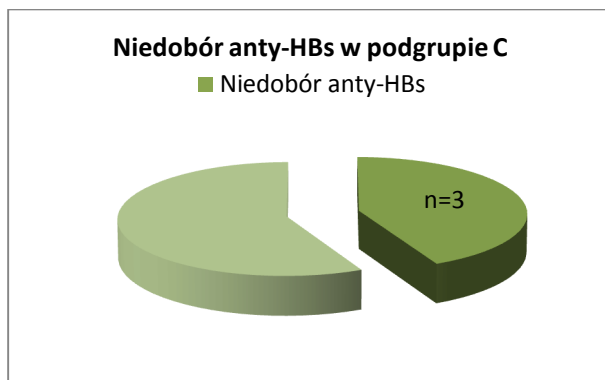
dzieci należących do podgrupy B z punktu widzenia rodzaju hipogammaglobulinemii, tj. manifestujących niedobór IgG i IgM, jak i należących do podgrupy D, z niedoborem wszystkich trzech klas głównych immunoglobulin, stężenie przeciwciał anti-HBs poniżej ochronnego stwierdzono u 2 dzieci (wykresy 18a, 18b, 18c, 18d). Istotne jest, że u wszystkich dzieci w tej ostatniej podgrupie ujawniono stężenie przeciwciał poszczepiennych anti-HBs < 10 mIU/ml.



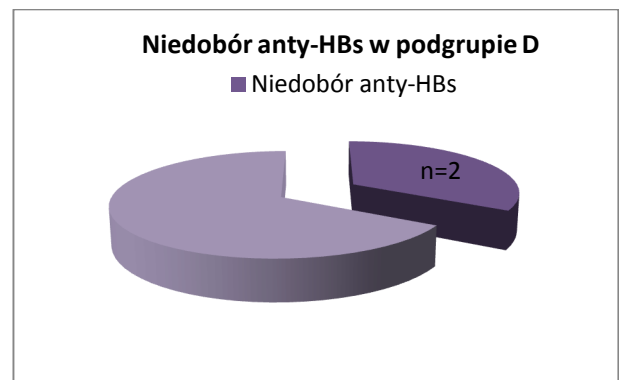
Wykres 18a



Wykres 18b



Wykres 18c



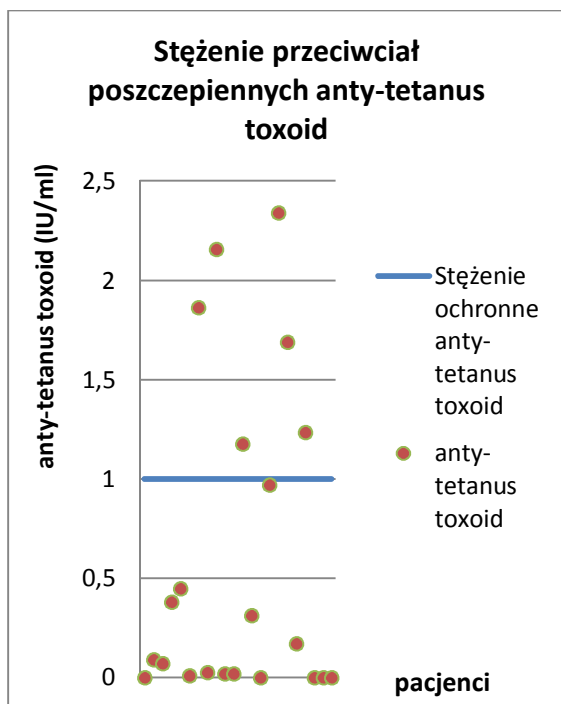
Wykres 18d

Wykresy 18a-d. Niedobór antygenowo-swoistych przeciwciał poszczepiennych anti-HBs w podgrupach badanych pacjentów w zależności od rodzaju hipogammaglobulinemii

4.2.2.2 Przeciwciała przeciwko toksoidowi tężcowemu

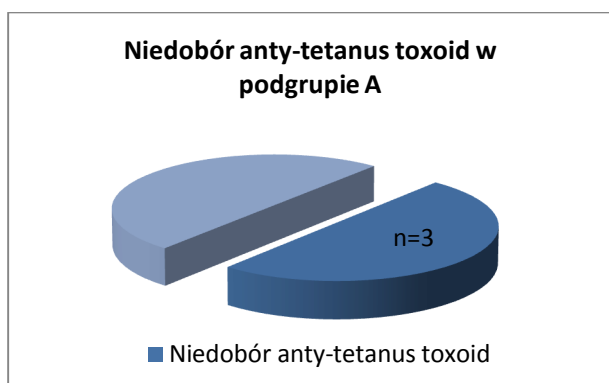
Wszystkie dzieci z grupy badanej zostały zaszczepione przeciwko tężcowi, zgodnie z obowiązującym kalendarzem szczepień.

Stężenie swoistych przeciwciał poszczepiennych przeciwko toksoidowi tężcowemu poniżej 1,0 IU/ml odnotowano u 16 dzieci z badanej grupy, tj. u 73% pacjentów (wykres 19). U 11 dzieci (50%) nie stwierdzono minimalnego stężenia ochronnego wynoszącego 0,1 IU/ml.

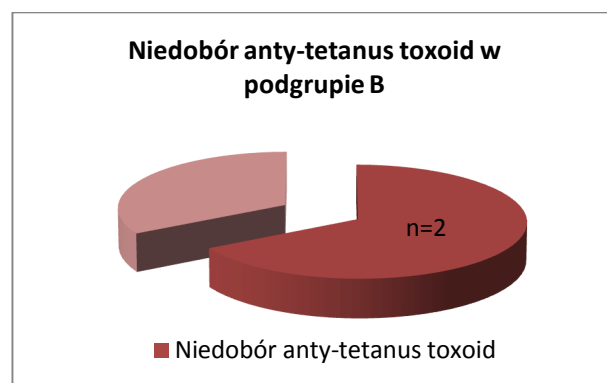


Wykres 19. Stężenie antygenowo-swoistych przeciwciał poszczepiennych przeciwko toksoidowi tężcowemu - *anti-tetanus toxoid* w surowicy u badanych pacjentów

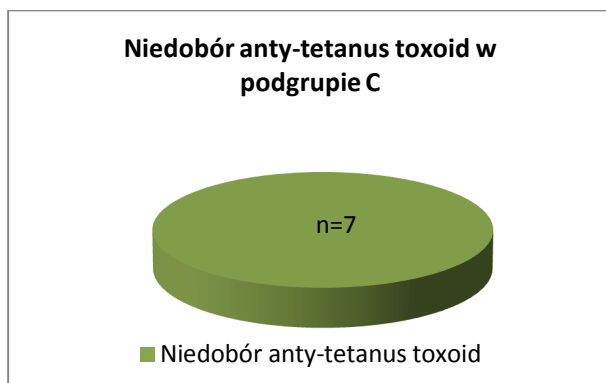
Spośród dzieci, które charakteryzowała niedostateczna odpowiedź poszczepienna na toksoid tężcowy, ich przynależność do podgrup z punktu widzenia rodzaju hipogammaglobulinemii była następująca: 3 dzieci należało do podgrupy A, którą cechowało zmniejszone stężenie IgG w surowicy, 2 dzieci należało do podgrupy B, a 4 dzieci – do podgrupy D, w której pacjenci mieli obniżone stężenie wszystkich 3 izotypów immunoglobulin. Należy zauważyć, że niedobór przeciwciał swoistych przeciwko toksoidowi tężcowemu demonstrowało 7 dzieci czyli wszyscy pacjenci należący do podgrupy C, u których zanotowano zmniejszone stężenie immunoglobulin klasy IgG i IgA (wykresy 20a, 20b, 20c, 20d).



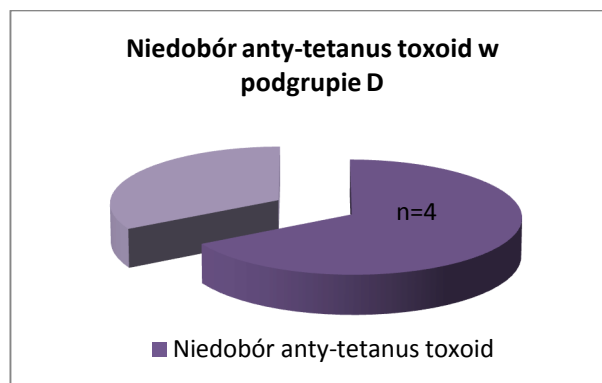
Wykres 20a



Wykres 20b



Wykres 20c



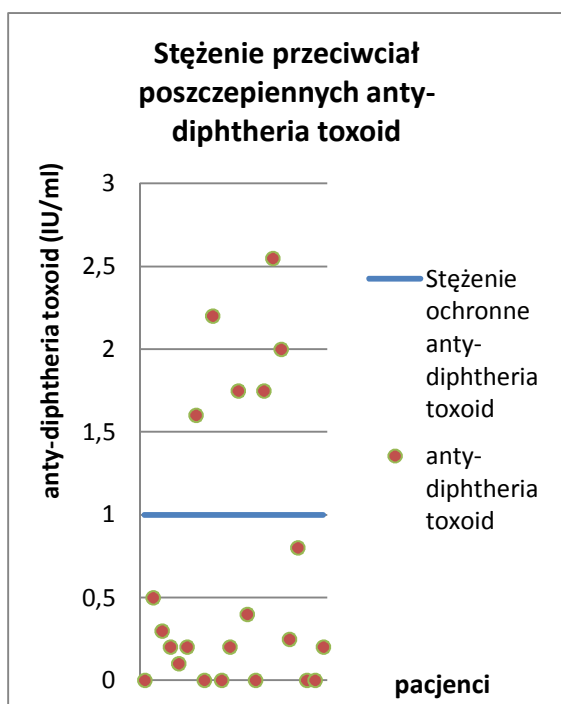
Wykres 20d

Wykresy 20a-d. Niedobór antygenowo-swoistych przeciwciał poszczepiennych anty-*tetanus toxoid* w podgrupach badanych pacjentów w zależności od hipogammaglobulinemii

4.2.2.3 Przeciwciała przeciwko toksoidowi błoniczemu

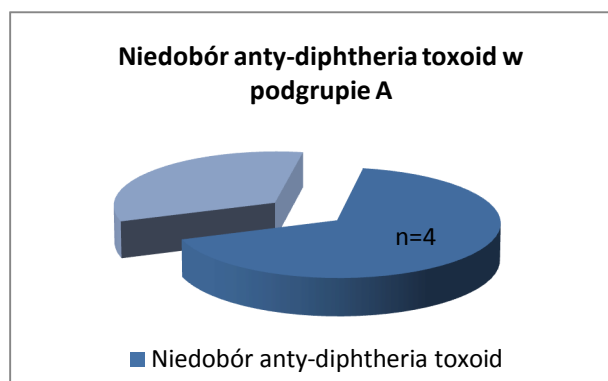
Wszystkie uczestniczące w badaniu dzieci otrzymały szczepienie przeciwko błonicy zgodnie z kalendarzem szczepień.

Stężenie przeciwciał przeciwko toksoidowi błoniczemu poniżej minimalnego stężenia ochronnego wynoszącego 0,1 IU/ml odnotowano u 6 dzieci (27% badanych), natomiast poniżej stężenia 1,0 IU/ml – u 16 dzieci (73% badanych) (wykres 21). Łącznie występujący defekt odpowiedzi na toksoidy tężcowy i błonicy stwierdzono u 16 dzieci (73% badanych dzieci).

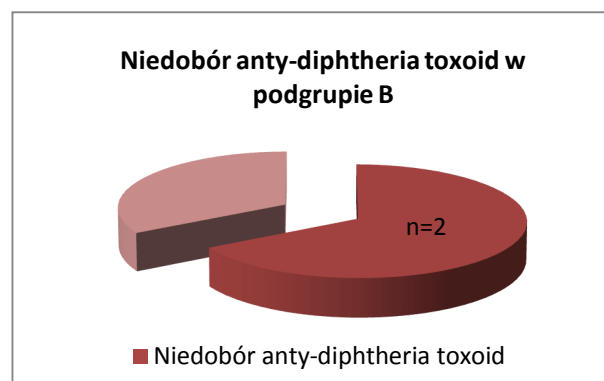


Wykres 21. Stężenie antygenowo-swoistych przeciwciał poszczepiennych przeciwko toksoidowi błoniczemu - anty-*diphtheria toxoid* w surowicy u badanych pacjentów

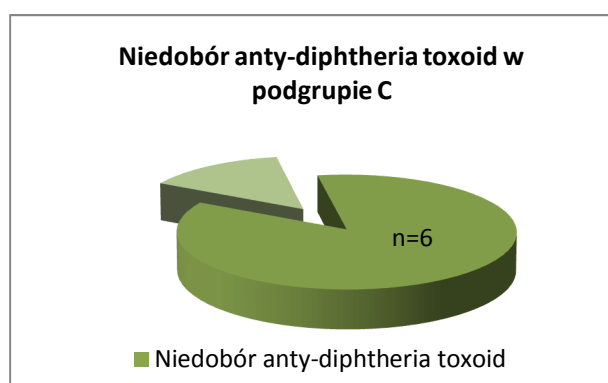
Spośród 16 dzieci, manifestujących zmniejszenie stężenia przeciwciał przeciwko toksoidowi błoniczemu, 4 należało do podgrupy A (hipogammaglobulinemia IgG) oraz 4 do podgrupy D (hipogammaglobulinemia w zakresie wszystkich trzech izotypów), 2 dzieci – do podgrupy B (niedobór IgG i IgM), zaś 6- do podgrupy C (niedobór IgG i IgA) (wykresy 22a, 22b, 22c, 22d).



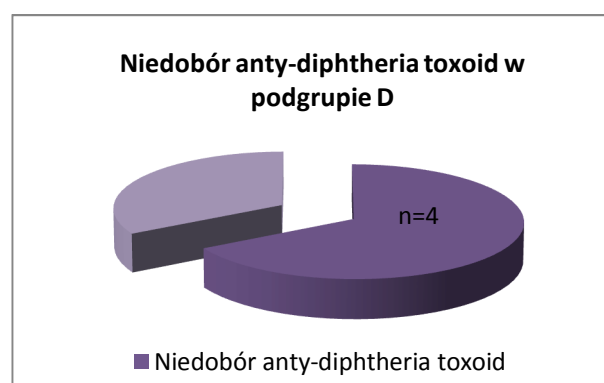
Wykres 22a



Wykres 22b



Wykres 22c

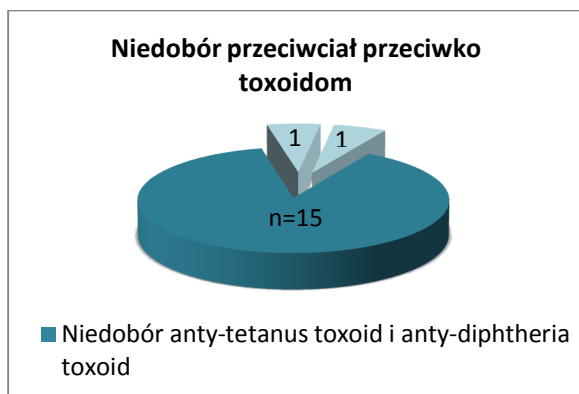


Wykres 22d

Wykresy 22a-d. Niedobór antygenowo-swoistych przeciwciał poszczepiennych *anti-diphtheria toxoid* w podgrupach badanych pacjentów w zależności od hipogammaglobulinemii

Spośród 16 dzieci, u których stwierdzono niedobór przeciwciał poszczepiennych przeciwko toksoidowi tężcowemu i podobnie, spośród 16 dzieci demonstrujących niedobór przeciwciał po szczepieniu toksoidem błoniczym, łącznie aż u 15 dzieci z każdej z tych grup odnotowano upośledzenie odpowiedzi na szczepienie toksoidami zarówno błoniczym, jak i tężcowym (wykres 23).

Należy w tym miejscu podkreślić, że niedobór przeciwciał swoistych przeciwko toksoidom najczęściej stwierdzano u pacjentów, zakwalifikowanych na wstępie badania do podgrupy C. Upośledzenie odpowiedzi poszczepiennej na toksoid tężcowy demonstrowało, jak wspomniano powyżej, 7 dzieci (100% pacjentów z podgrupy C), a na toksoid błoniczy – 6 dzieci (86% pacjentów z tej podgrupy).

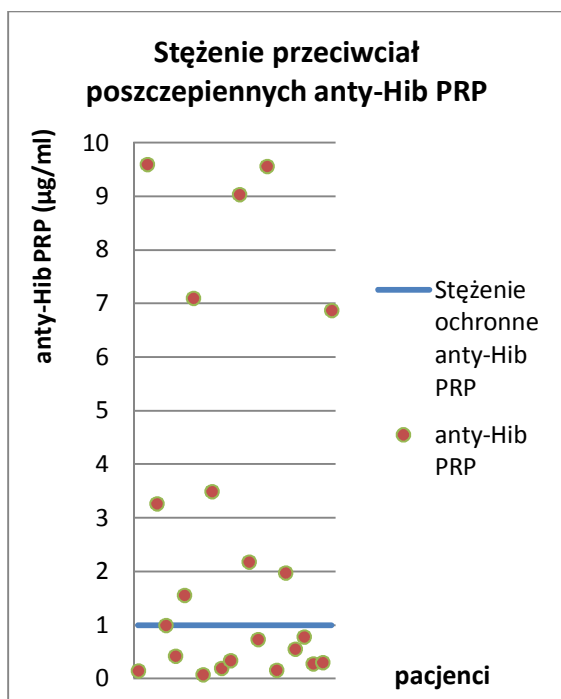


Wykres 23. Niedobór odpowiedzi poszczepiennej na toksoidy tężcowy i błonicy

4.2.2.4 Przeciwciała anty- PRP Hib

Wszystkie dzieci z badanej grupy poddane zostały, zgodnie z obowiązującym kalendarzem szczepień, czynnej immunizacji przeciwko *Haemophilus influenzae* typu b z użyciem skoniugowanej szczepionki.

Stężenie przeciwciał anty-PRP Hib poniżej 1,0 µg/ml stwierdzono u 12 spośród 22 dzieci w grupie badanej (55%) (wykres 24), natomiast stężenie przeciwciał swoistych wynoszące poniżej 0,15 µg/ml odnotowano u 2 dzieci (9%). Spośród dzieci demonstrujących niedostateczne wytwarzanie przeciwciał poszczepiennych anty-PRP Hib, u dwojga stwierdzono obecność kolonii *Haemophilus influenzae* w posiewie wydzieliny z dróg oddechowych.

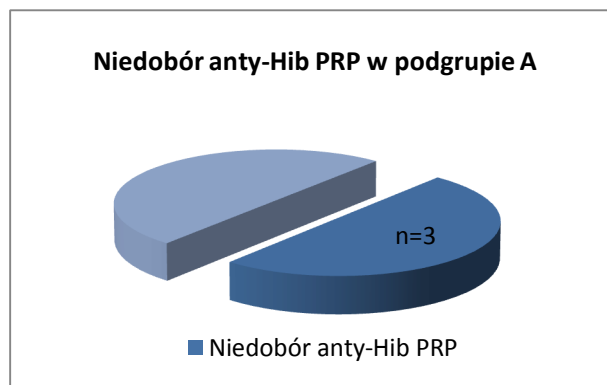


Wykres 24. Stężenie antygenowo-swoistych przeciwciał poszczepiennych przeciwko fosforanowi polirybozylorybitolu otoczki *Haemophilus influenzae* typu b - anty-PRP Hib w surowicy u badanych pacjentów

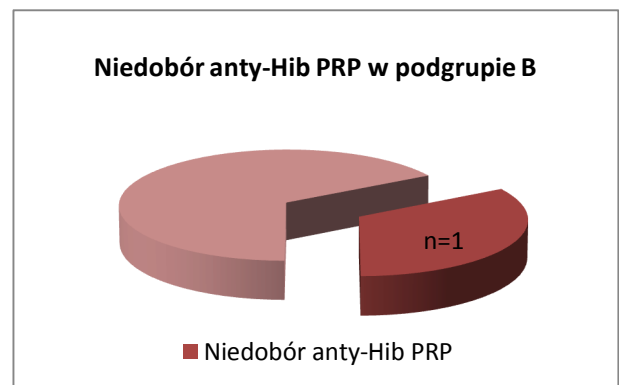
W badanej grupie w piątym roku życia było 3 dzieci i u 2 z nich stężenie przeciwciał anti-PRP Hib mieściło się w zakresie pomiędzy 0,15 µg/ml a 1,0 µg/ml.

Spośród 3 dzieci w wieku poniżej 12 miesiąca życia u 1 dziecka stwierdzono upośledzenie odpowiedzi poszczepiennej i stężenie przeciwciał anti-PRP Hib poniżej 0,15 µg/ml, natomiast u pozostałych dwojga niemowląt stężenie tych przeciwciał wynosiło 9,594 µg/ml i 3,268 µg/ml.

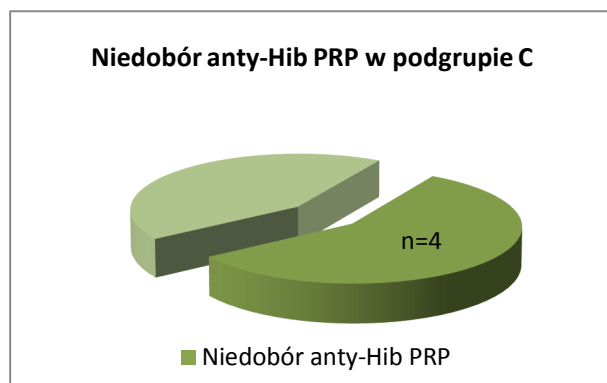
Przyjmując kryterium rodzaju hipogammaglobulinemii w podziale pacjentów na podgrupy, niedobór przeciwciał anti-PRP Hib występował z równą częstością, tj. u 4 dzieci w podgrupie C, związanej z niedoborem immunoglobulin G i A oraz w związanej z niedoborem wszystkich izotypów podgrupie D. Przynależność dzieci do pozostałych podgrup była następująca: 1 dziecko należało do podgrupy B, a 3 dzieci – do podgrupy A (wykresy 25a, 25b, 25c, 25d).



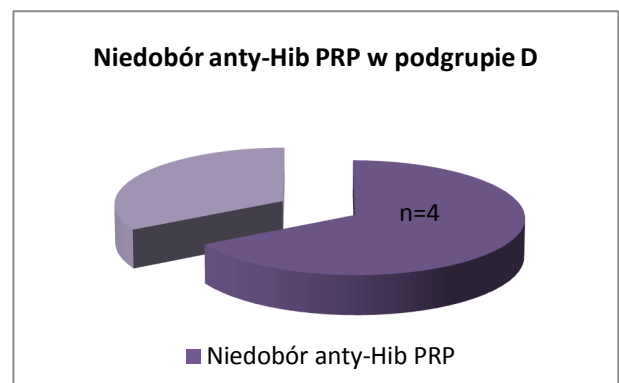
Wykres 25a



Wykres 25b



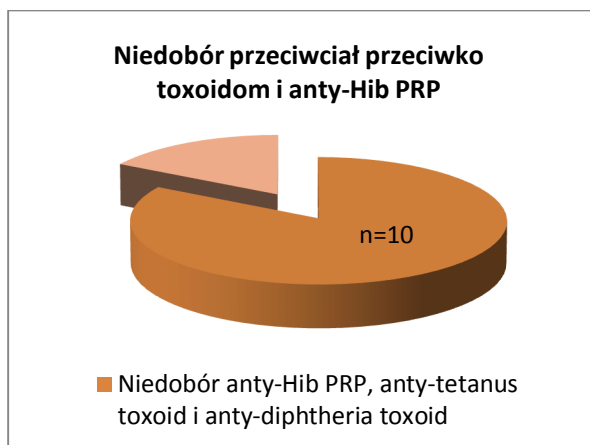
Wykres 25c



Wykres 25d

Wykres 25a-d. Niedobór antygenowo-swoistych przeciwciał poszczepiennych anti-Hib PRP w podgrupach badanych pacjentów w zależności od hipogammaglobulinemii

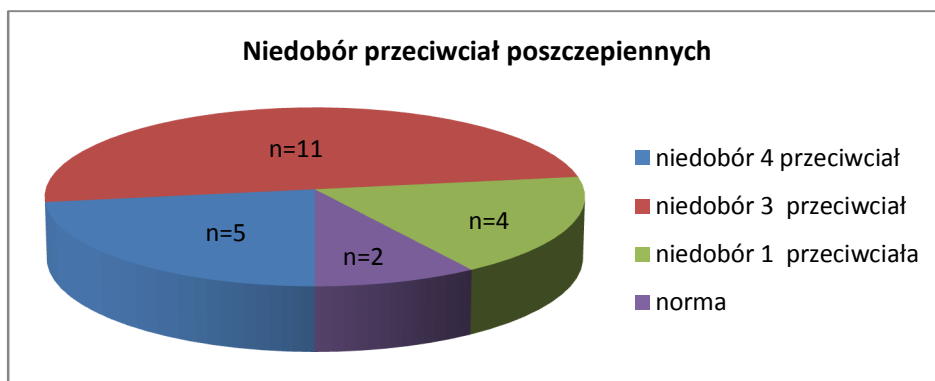
Spośród 12 dzieci, u których stwierdzono niedostateczną syntezę przeciwciał swoistych przeciwko PRP Hib, aż u 11 z nich występował defekt wytwarzania przeciwciał przeciwko toksoidowi błoniczemu, a aż 10 dzieci prezentowało równocześnie niedobór przeciwciał przeciwko toksoidom zarówno błoniczemu, jak i tężcowemu (wykres 26).



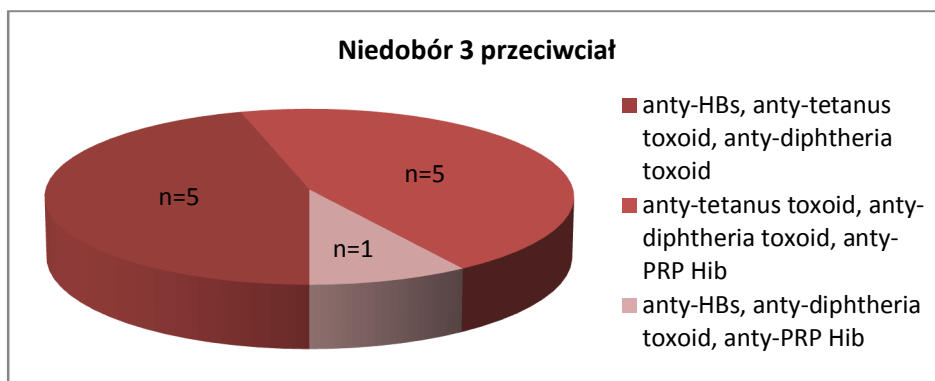
Wykres 26. Niedobór odpowiedzi poszczepiennej przeciwko toksoidom tężcowemu i błoniczemu u dzieci z niedoborem przeciwciał anti-Hib PRP

U 2 spośród łącznej liczby 12 dzieci z niedostatecznym wytwarzaniem przeciwciał anti-PRP Hib odnotowano współistnienie obniżonego stężenia składowej C3 dopełniacza, pełniącej rolę w inicjowaniu odpowiedzi immunologicznej przeciwko antygenom polisacharydowym.

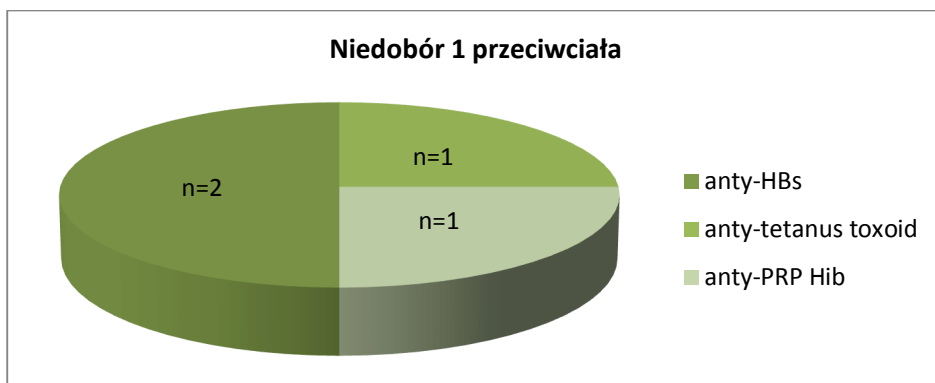
Stężenie przeciwciał poszczepiennych anti-HBs, anti-tetanus toxoid, anti-diphtheria toxoid oraz anti-PRP Hib zależnie od liczby niedostatecznie wytwarzanych przeciwciał u pacjentów przedstawiono na wykresach 27a, 27b i 27c



Wykres 27a



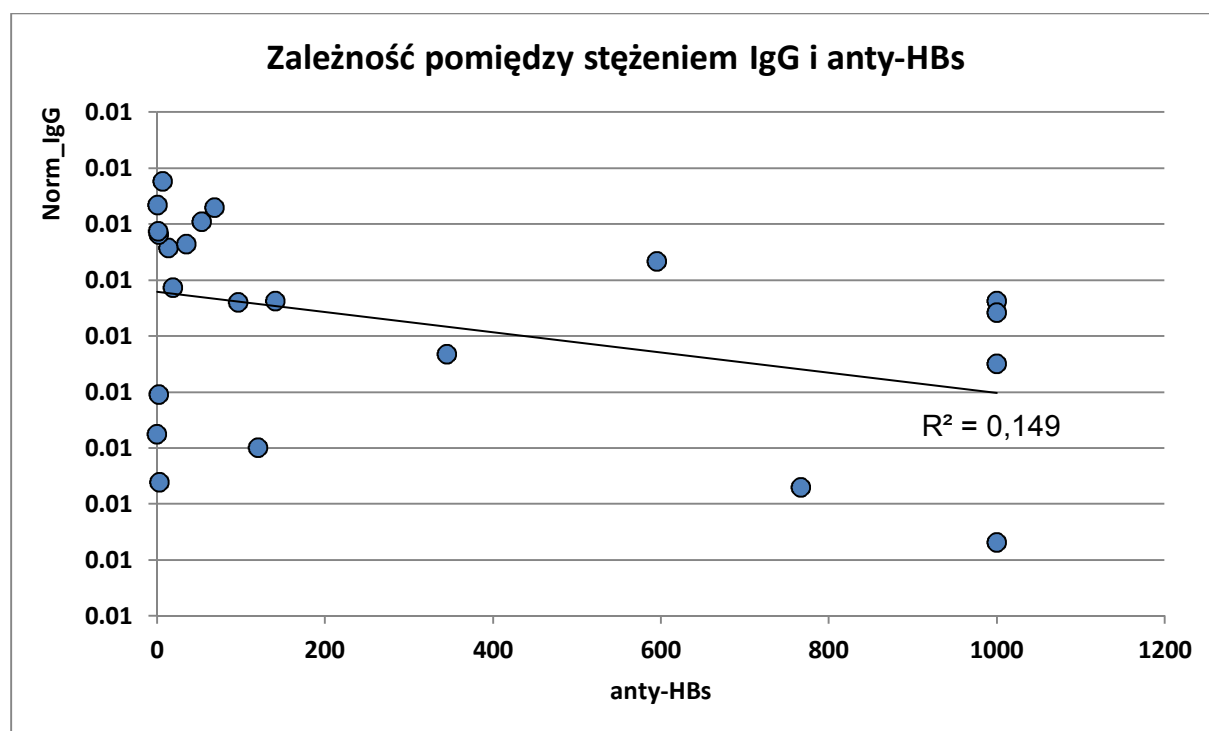
Wykres 27b



Wykres 27c

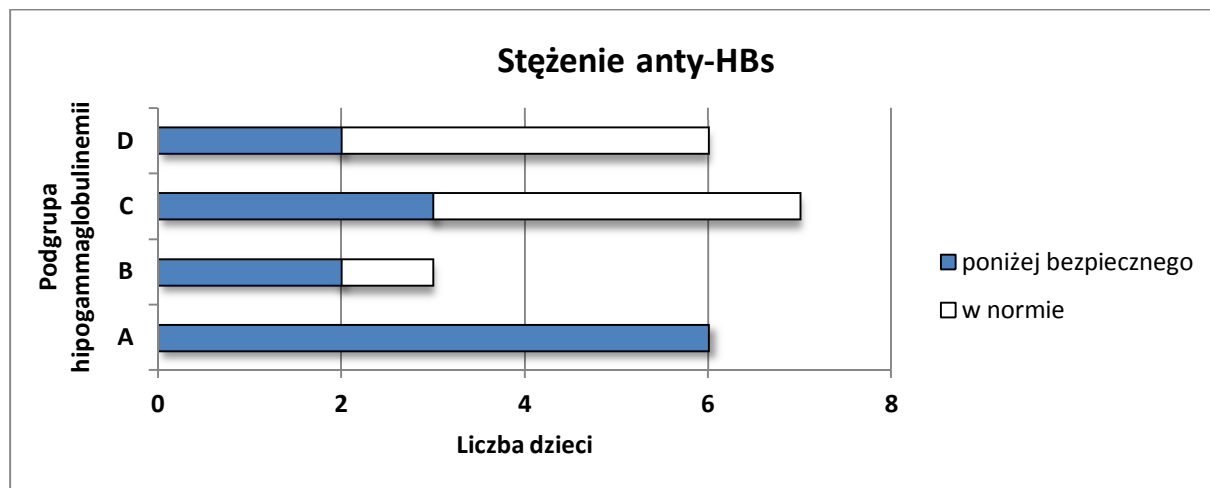
Wykresy 27a-c. Liczba niedostatecznie wytwarzanych antygenowo-swoistych przeciwciał poszczepiennych w surowicy u badanych pacjentów

Analizę zależności pomiędzy znormalizowanymi wartościami surowiczego stężenia IgG i stężenia poszczególnych antygenowo-swoistych przeciwciał poszczepiennych przedstawiono w tabeli 4, w pozycjach od 15 do 18. Z tabeli tej (pozycja 15) wynika, że umiarkowanie silna jest korelacja pomiędzy znormalizowanym poziomem IgG i anty-HBs, choć nie jest ona istotna statystycznie. Zależność tę ilustruje wykres 28, przedstawiający linię trendu tej korelacji. Współczynnik determinacji R^2 wynosi 0,149, co oznacza, że jedynie około 15% zmienności jednej z cech wyjaśniane jest przez drugą z analizowanych cech.

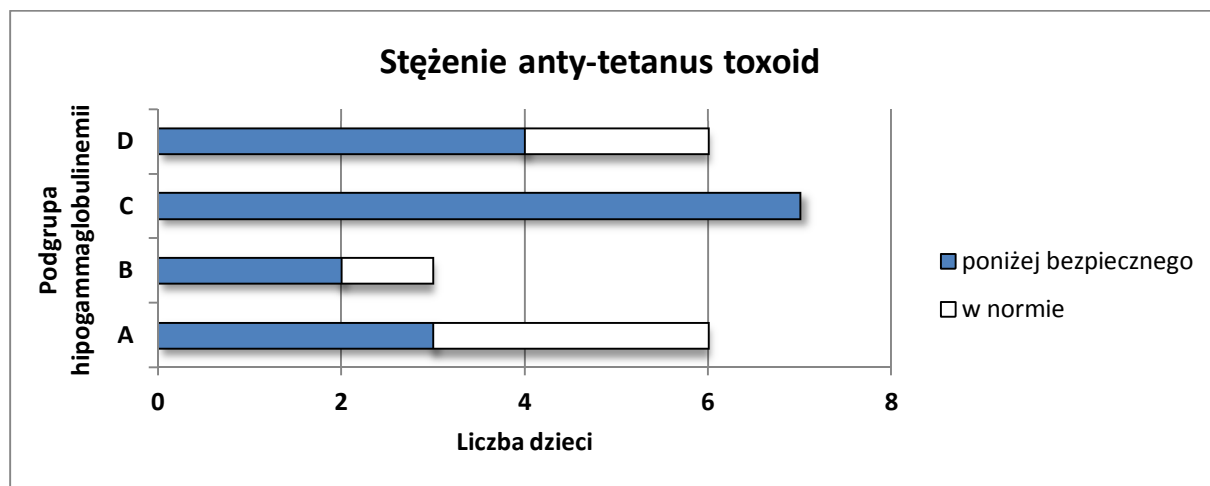


Wykres 28. Linia trendu korelacji pomiędzy znormalizowanym stężeniem IgG a stężeniem antygenowo-swoistych przeciwciał anty-HBs w surowicy u badanych pacjentów

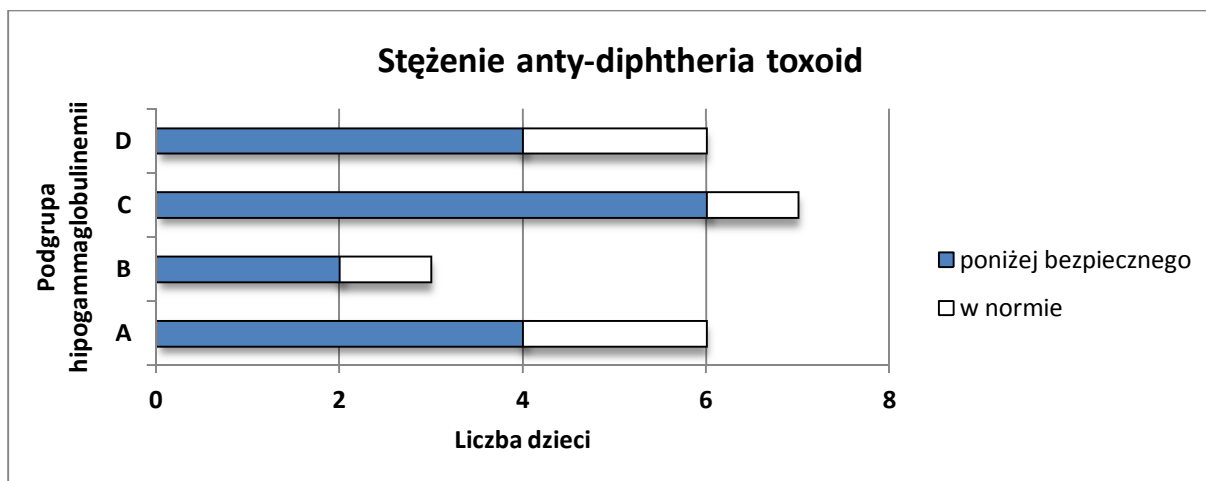
Nie uzyskano także istotności statystycznej badając zależność pomiędzy rodzajem hipogammaglobulinemii a stężeniem przeciwciał poszczepiennych, co zilustrowano na wykresach 29, 30, 31 i 32 oraz przedstawiono w tabelach od 5.16 do 5.19.



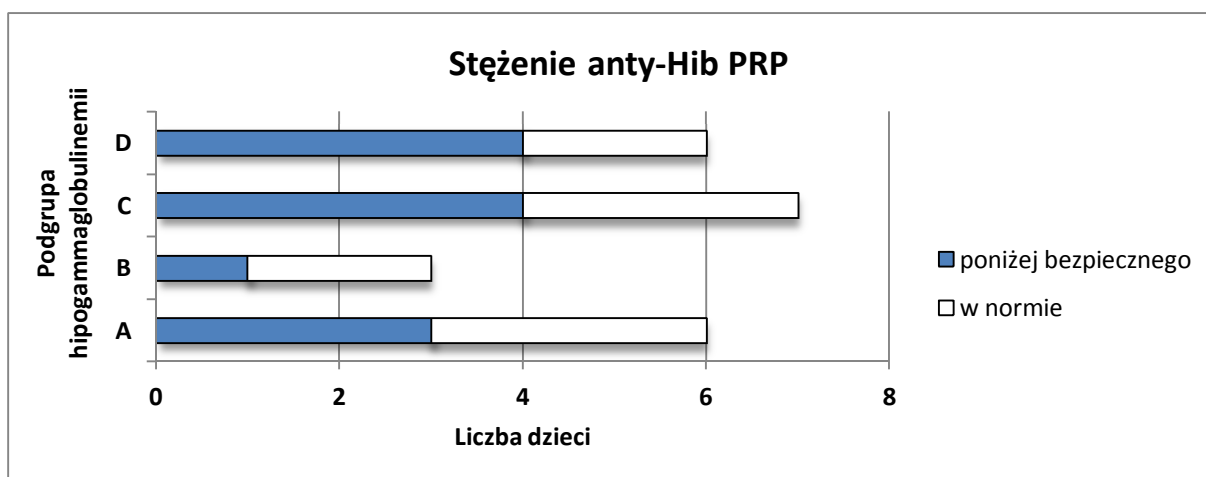
Wykres 29. Występowanie zależności pomiędzy stężeniem antygenowo-swoistych przeciwciał anti-HBs a przynależnością badanych pacjentów do poszczególnych grup hipogammaglobulinemii



Wykres 30. Występowanie zależności pomiędzy stężeniem antygenowo-swoistych przeciwciał przeciwko toksoidowi tężcowemu a przynależnością badanych pacjentów do poszczególnych grup hipogammaglobulinemii



Wykres 31. Występowanie zależności pomiędzy stężeniem antygenowo-swoistych przeciwciał przeciwko toksoidowi błoniczemu a przynależnością badanych pacjentów do poszczególnych grup hipogammaglobulinemii



Wykres 32. Występowanie zależności pomiędzy stężeniem antygenowo-swoistych przeciwciał przeciwko polisacharydowi otoczkowemu PRP *Haemophilus influenzae* a przynależnością badanych pacjentów do poszczególnych grup hipogammaglobulinemii

Tabela 5.16-19. Zależność pomiędzy podgrupami hipogammaglobulinemii a stężeniem antygenowo-swoistych przeciwciał poszczepiennych

Tabela 5.16

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	anty-HBs				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	20,717	10,100	0,300	68,700	27,245
B	3	52,533	13,800	2,500	141,300	77,082
C	7	522,600	595,200	2,700	1000,000	490,813
D	6	388,450	232,700	1,900	1000,000	406,320

p=0,068

Tabela 5.17

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	anty-Hib PRP				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	4,140	3,829	0,303	9,036	3,944
B	3	1,569	1,974	0,552	2,182	0,887
C	7	2,268	0,990	0,076	9,562	3,406
D	6	2,368	0,382	0,158	9,594	3,768

p=0,657

Tabela 5.18

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	anty-Tetanus				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	0,712	0,589	0,000	1,862	0,816
B	3	0,724	0,312	0,171	1,689	0,839
C	7	0,209	0,028	0,000	0,972	0,363
D	6	0,846	0,271	0,019	2,341	1,099

p=0,388

Tabela 5.19

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	anty-Diphtheria				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	0,725	0,500	0,000	1,750	0,794
B	3	0,883	0,400	0,250	2,000	0,970
C	7	0,350	0,200	0,000	1,750	0,629
D	6	0,925	0,350	0,000	2,550	1,141

p=0,435

W tabeli 7 zilustrowano zależność pomiędzy stężeniem podklasy IgG1 a poszczególnymi przeciwciałami poszczepiennymi. Również w tym przypadku zależność ta nie była istotna statystycznie.

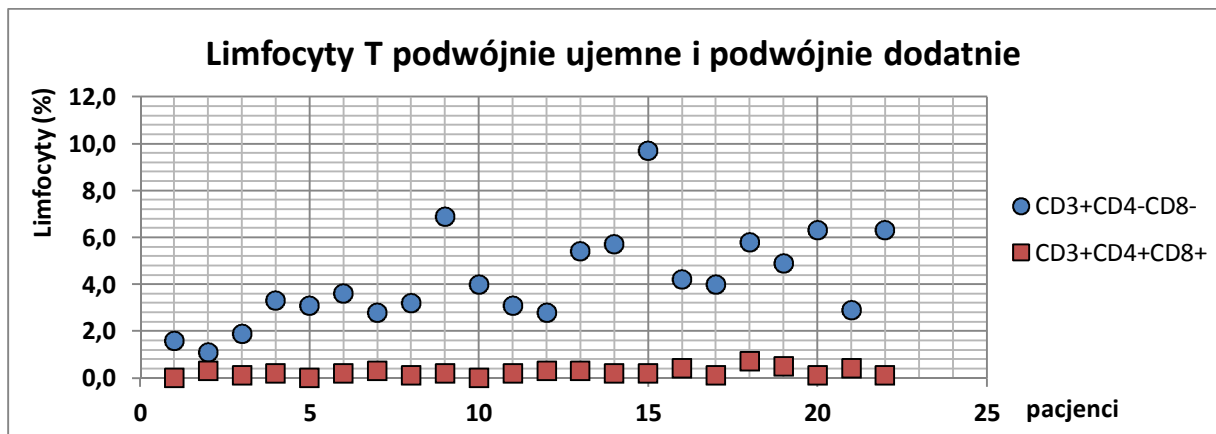
Tabela 7. Współczynnik korelacji rang Spearmana (ρ) i poziom jego istotności (p) dla zależności pomiędzy znormalizowanym stężeniem podklasy IgG1 a stężeniem antygenowo-swoistych przeciwciał poszczepiennych

Zależności	ρ	p
Norm_IgG1 a anty-HBs	0,166	0,459
Norm_IgG1a anty-Tetanus toxoid	0,177	0,432
Norm_IgG1a anty-Diphtheria toxoid	0,108	0,634
Norm_IgG1a anty-Hib PRP	0,177	0,431

4.3 Subpopulacje limfocytów T

4.3.1 Tymocyty

Najbardziej niedojrzałe postaci limfocytów T, które zidentyfikowano w analizie immunofenotypowej krwi obwodowej u dzieci z badanej grupy, stanowiły limfocyty T podwójnie ujemne (DN) o fenotypie CD3+CD4-CD8- oraz limfocyty podwójnie dodatnie (DP) o fenotypie CD3+CD4+CD8+. Najmniejsza wartość procentowa limfocytów DN wynosiła 1,1% i została stwierdzona u 9-miesięcznego niemowlęcia, zaś największa wartość procentowa, 9,7%, została odnotowana u dziecka w wieku 27 miesięcy (wykres 33).

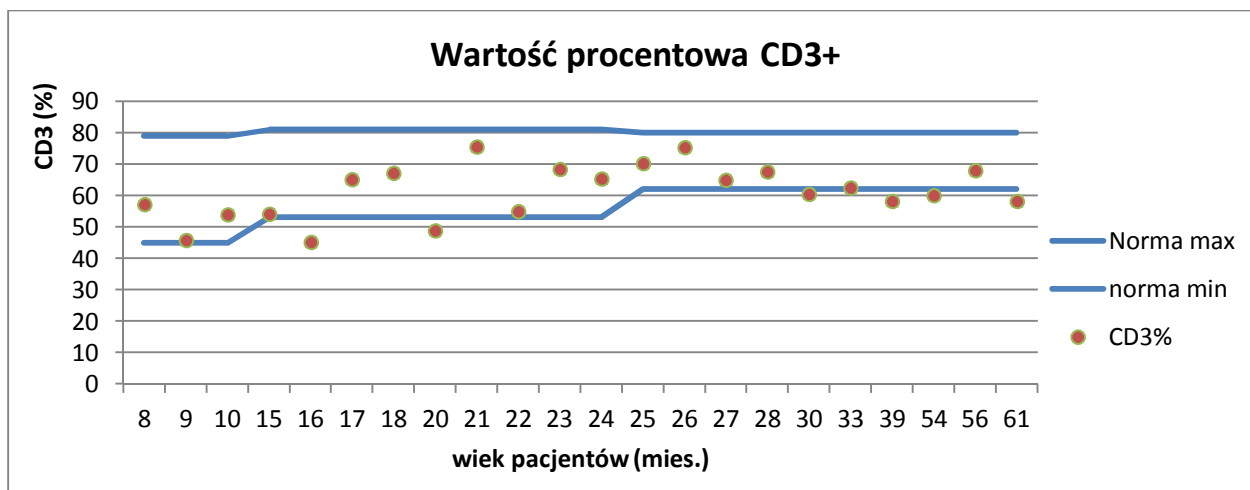


Wykres 33. Wartość procentowa limfocytów T podwójnie ujemnych CD3+CD4-CD8- i wartość procentowa limfocytów T podwójnie dodatnich CD3+CD4+CD8+ we krwi obwodowej u badanych pacjentów

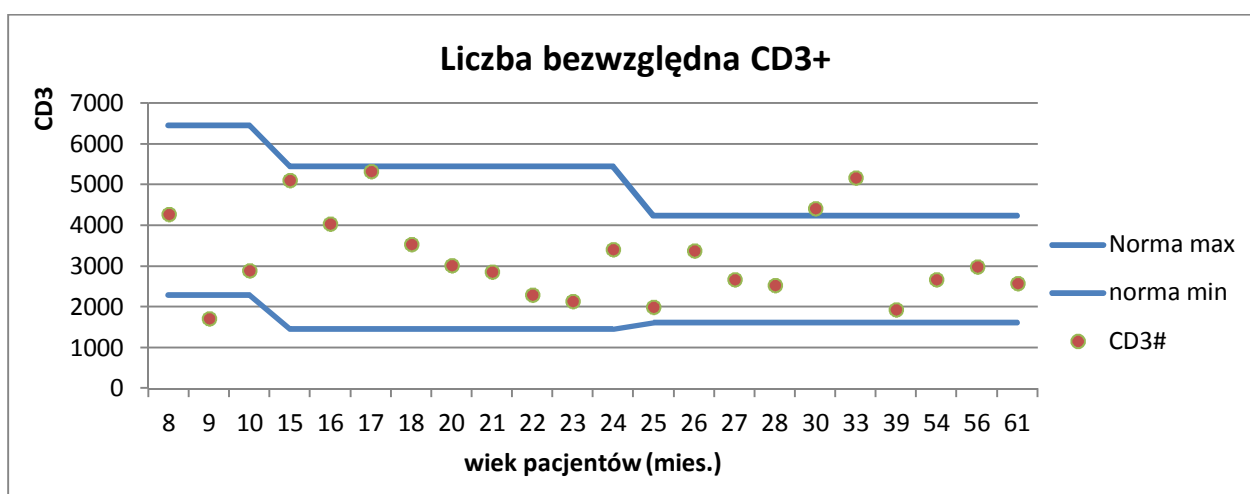
Populacja komórek DP była nielicznie reprezentowana wśród limfocytów T krwi obwodowej – jej wartość procentowa wahała się u badanych dzieci w granicach od 0,0 do 0,7% (wykres 33).

4.3.2 Limfocyty T CD4+ i CD8+

W zakresie populacji limfocytów T CD3+ stwierdzono zmniejszenie wartości procentowej tych komórek u dwojga dzieci, a liczby bezwzględnej – u jednego dziecka, w wieku 9 miesięcy (wykresy 34a, 34b).



Wykres 34a

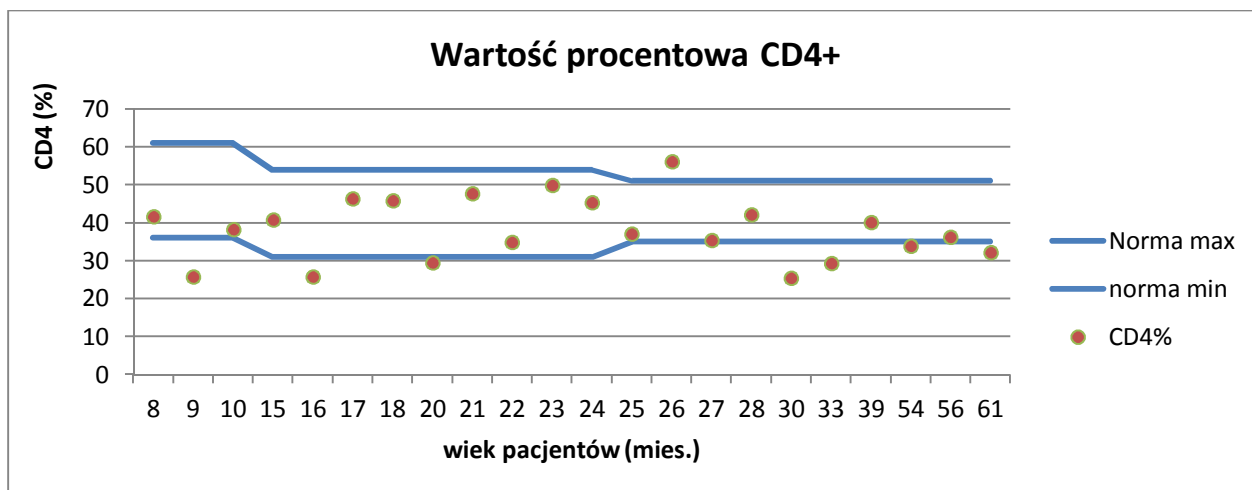


Wykres 34b

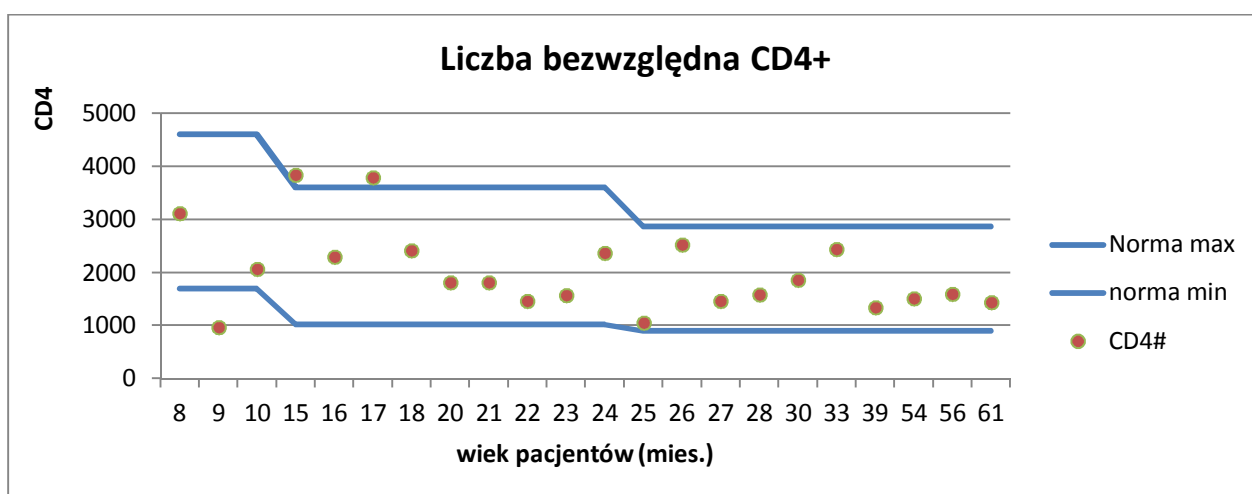
Wykres 34a-b. Wartość procentowa i liczba bezwzględna limfocytów T CD3+ we krwi obwodowej u badanych pacjentów

U tych samych pacjentów zmniejszona była także wartość względna limfocytów T subpopulacji CD4+ , u 9-miesięcznego niemowlęcia – również liczba bezwzględna tych komórek (wykresy 35a, 35b).

Wartość procentowa limfocytów T CD8+ była zmniejszona u dwojga dzieci, natomiast liczba bezwzględna komórek tej subpopulacji była zmniejszona aż u 10 dzieci z gupy badanej, z czego sześcioro dzieci było w wieku powyżej 24 miesiąca życia (wykresy 36a, 36b).

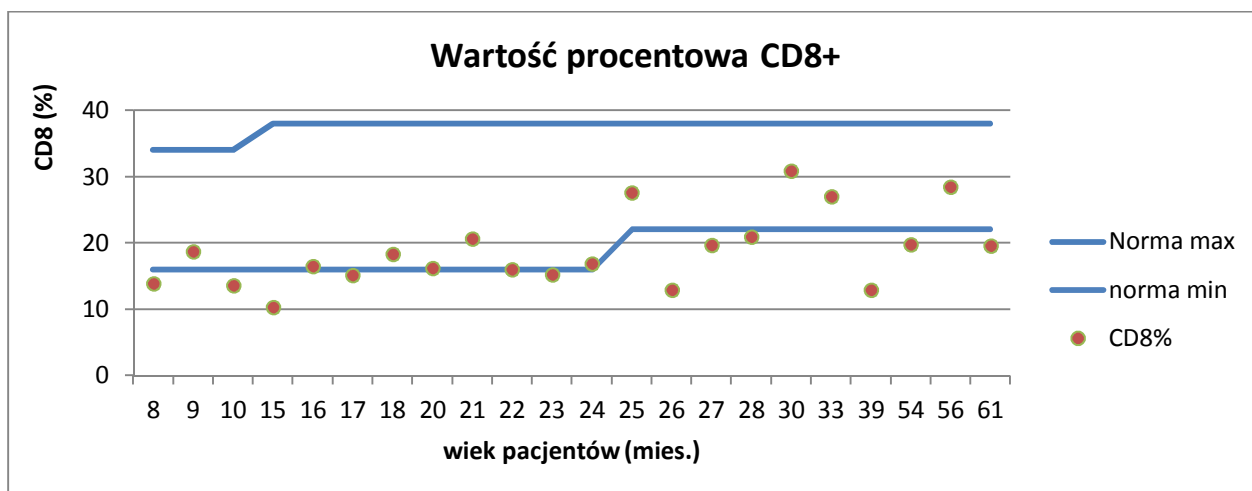


Wykres 35a

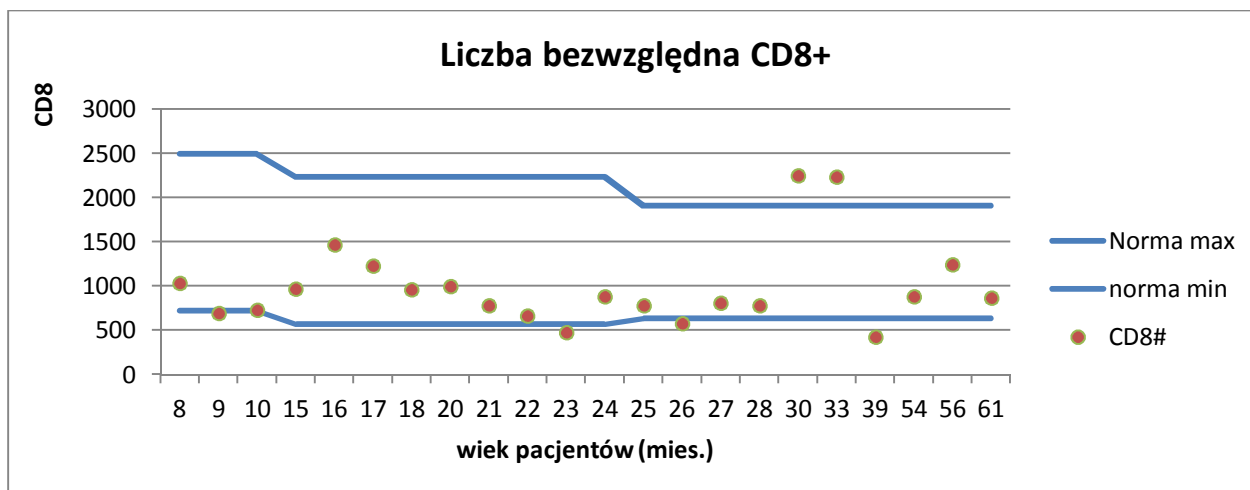


Wykres 35b

Wykresy 35a-b. Wartość procentowa i liczba bezwzględna limfocytów T pomocniczych CD3+CD4+ we krwi obwodowej u badanych pacjentów



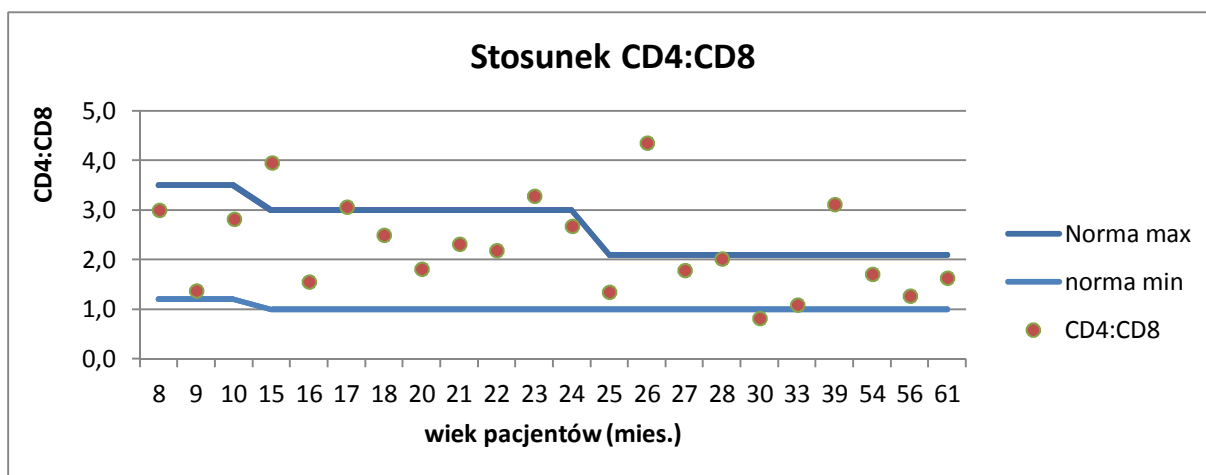
Wykres 36a



Wykres 36b

Wykresy 36a-b. Wartość procentowa i liczba bezwzględna limfocytów T cytotoksycznych / supresorowych CD3+CD8+ we krwi obwodowej u badanych pacjentów

U dwójga dzieci z badanej grupy zwiększona była liczba bezwzględna limfocytów T CD3+, która współistniała ze zwiększoną liczbą bezwzględną subpopulacji CD3+CD8+. U jednego z tych dzieci stosunek CD4:CD8 był zmniejszony, u drugiego (i zarazem jedyne dziecko z grupy badanej) – zwiększony. Łącznie zwiększenie stosunku CD4:CD8 obserwowano u czworga dzieci (wykres 37).



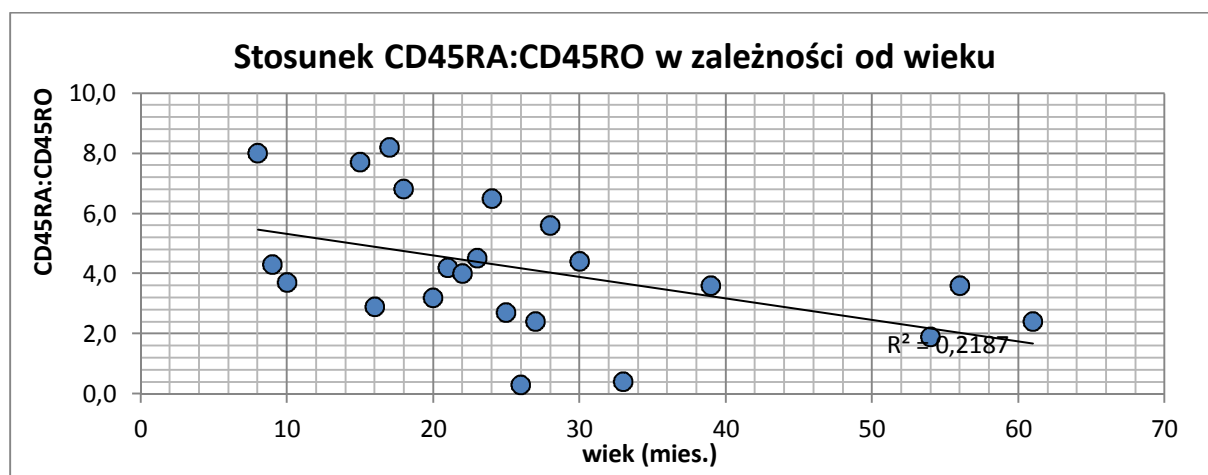
Wykres 37. Stosunek limfocytów T pomocniczych do limfocytów T cytotoksycznych /supresorowych CD4+:CD8+ u badanych pacjentów

4.3.3 Ekspresja izoform CD45RA/CD45RO na limfocytach T CD4+

Zgodnie z danymi przedstawionymi w publikacji Huenecke i wsp. [92], limfocyty T o fenotypie CD4+CD45RO stanowią we krwi obwodowej od 12% do 50% wszystkich limfocytów T pomocniczych i liczba ich istotnie zwiększa się od okresu wczesnego dzieciństwa do wieku dorosłego. W grupie badanej ekspresja izoformy 45RO, charakterystycznej dla limfocytów T pamięci wahała się w

granicach od 10,1% do 78,2% populacji limfocytów CD4+. Najwyższe wartości procentowe zanotowano u dwójki dzieci, wynosiły one 72,2% i 78,2% komórek CD4+CD45RO. Najniższą wartość procentową tych komórek stwierdzono u najmłodszego dziecka z badanej grupy, w wieku 8 miesięcy. Również ekspresja izoformy CD45RA, cechującej limfocyty T naiwne była wysoka u najmłodszych niemowląt, w wieku 8 mies. i 9 mies, u których przekraczała 80% puli limfocytów CD4+. Łącznie u 9 dzieci spośród wszystkich badanych pacjentów wartość względna limfocytów T CD4+CD45RA była większa niż 80%. Stosunek CD45RA:CD45RO, przekraczający wartość 8,0 stwierdzono u dwójki dzieci, w tym u 8-miesięcznego niemowlęcia.

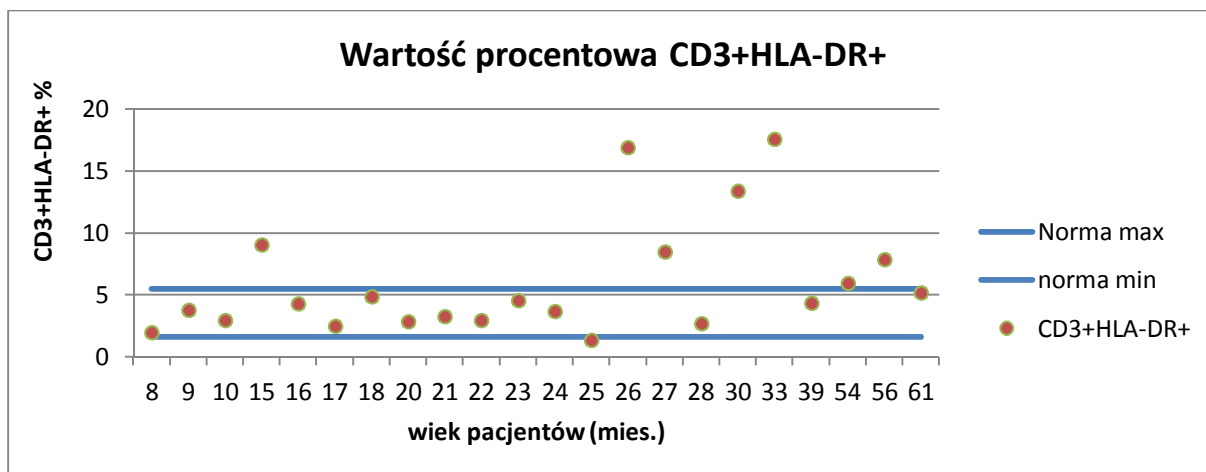
W oparciu o analizę statystyczną wykazano, że stosunek ten ulegał obniżeniu wraz z wiekiem dzieci w badanej grupie, co ilustruje wykres linii trendu tej zależności (wykres 38). Współczynnik determinacji R^2 wynosi w tym przypadku 0,2187, co oznacza, że około 22% zmienności jednej z powyższych cech jest wyjaśniane przez drugą z tych cech.



Wykres 38. Linia trendu korelacji pomiędzy stosunkiem limfocytów T pomocniczych naiwnych do limfocytów T pamięci CD4+CD45RA:CD4+CD45RO a wiekiem badanych pacjentów

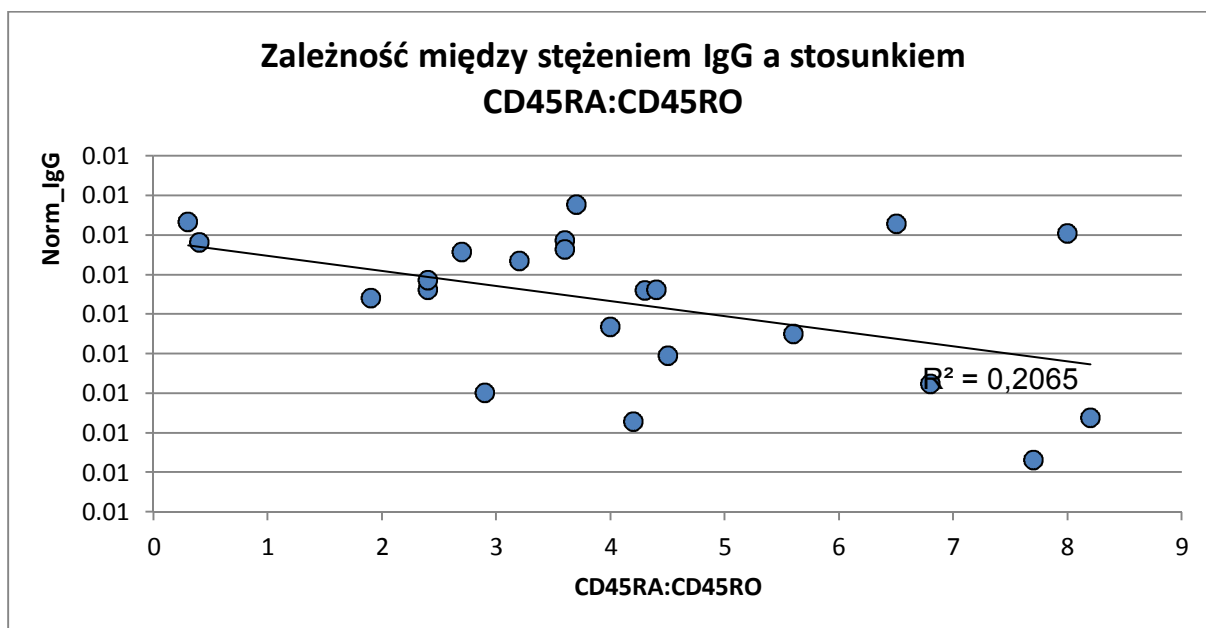
4.3.4 Ekspresja późnego markera aktywacji HLA-DR na limfocytach T

W opinii cytowanych wcześniej autorów [92], komórki o fenotypie CD3+HLA-DR+ stanowią we krwi obwodowej od 1,6% do 5,5% puli limfocytów T i wykazują z wiekiem tendencję wzrostową w zakresie wartości procentowej (wykres 39). W badanej grupie dzieci wartość procentowa tych komórek wynosiła od 1,4% do 17,6%. Największe wartości procentowe, 16,9% i 17,6% stwierdzono u dwójki dzieci, u których wykazano także dużą wartość procentową, 78,2% i 72,2%, odpowiednio, komórek wykazujących ekspresję izoformy CD45RO na limfocytach T CD4+ oraz mały stosunek CD45RA:CD45RO, wynoszący 0,4 i 0,3, odpowiednio.



Wykres 39. Wartość procentowa limfocytów T wykazujących ekspresję późnego markera aktywacji CD3+HLA-DR+ we krwi obwodowej u badanych pacjentów

W pozycjach od 19 do 29 tabeli 4 przedstawiono zależności pomiędzy znormalizowanym stężeniem IgG u dzieci i wartościami procentowymi i liczbami bezwzględными subpopulacji limfocytów T. Z tabeli tej wynika, że umiarkowanie silna jest korelacja pomiędzy znormalizowanym poziomem IgG i stosunkiem CD45RA:CD45RO, ale nie jest ona istotna statystycznie. Linia trendu dla tej korelacji przedstawiona została na wykresie 40. Współczynnik determinacji R^2 wynosi w tym przypadku 0,2065, co wskazuje, że około 20% zmienności jednej z cech wyjaśniane jest przez drugą z cech.



Wykres 40. Linia trendu korelacji pomiędzy znormalizowanym stężeniem IgG w surowicy a stosunkiem limfocytów T pomocniczych naiwnych do limfocytów T pamięci CD4+CD45RA:CD4+CD45RO

W tabelach od 5.20 do 5.30 przedstawiono zależności pomiędzy rodzajem hipogammaglobulinemii i wartościami procentowymi i liczbami bezwzględnymi subpopulacji limfocytów T. Istotną statystycznie korelację wykazano pomiędzy podgrupami hipogammaglobulinemii i znormalizowaną wartością procentową limfocytów T CD8+ (tabela 5.24). Wykres 41 ilustruje wynik porównań wielokrotnych, który wskazuje, że zasadniczą przyczynę tej istotności statystycznej stanowi istotność statystyczna różnicy pomiędzy podgrupami B i C.

Tabela 5.20-30. Zależność pomiędzy podgrupami hipogammaglobulinemii a znormalizowanymi wartościami procentowymi i liczbami bezwzględnymi analizowanych subpopulacji limfocytów T

Tabela 5.20

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_CD3 %				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,268	1,391	0,789	1,739	0,393
B	3	1,141	1,033	0,922	1,467	0,288
C	7	1,148	1,167	0,857	1,439	0,223
D	6	1,248	1,191	0,725	1,804	0,389

p=0,908

Tabela 5.21

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_CD3#				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,450	1,506	1,122	1,673	0,187
B	3	1,859	2,068	1,146	2,361	0,634
C	7	1,531	1,406	1,148	1,973	0,302
D	6	1,265	1,280	0,864	1,646	0,258

p=0,277

Tabela 5.22

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_CD4 %				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,473	1,476	0,825	2,331	0,526
B	3	0,731	0,650	0,406	1,138	0,372
C	7	1,187	1,096	0,931	1,670	0,275
D	6	1,257	1,312	0,592	1,822	0,503

p=0,243

Tabela 5.23

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_CD4#				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,455	1,437	1,220	1,827	0,224
B	3	1,449	1,487	1,078	1,781	0,353
C	7	1,526	1,309	1,127	2,093	0,395
D	6	1,213	1,258	0,750	1,495	0,254

p=0,425

Tabela 5.24

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_CD8 %				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	0,877	0,945	0,431	1,406	0,389
B	3	1,406	1,350	1,313	1,556	0,131
C	7	0,883	0,867	0,741	1,009	0,085
D	6	1,046	1,011	0,931	1,209	0,110

p=0,026

Tabela 5.25

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_CD8#				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,149	1,187	0,841	1,482	0,225
B	3	1,878	2,252	1,118	2,264	0,658
C	7	1,202	1,195	1,006	1,399	0,120
D	6	1,129	1,089	0,943	1,541	0,214

p=0,262

Tabela 5.26

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_CD4:CD8				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	2,236	1,799	1,249	4,056	1,056
B	3	1,079	1,081	0,841	1,317	0,238
C	7	1,827	1,725	1,411	2,480	0,342
D	6	1,614	1,627	1,078	2,142	0,394

p=0,085

Tabela 5.27

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	CD45RA:CD45RO				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	3,867	3,600	0,300	6,800	2,472
B	3	2,500	2,700	0,400	4,400	2,007
C	7	5,014	3,700	1,900	8,200	2,823
D	6	4,250	4,250	2,900	5,600	0,869

p=0,585

Tabela 5.28

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	CD3+CD4-CD8-				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	4,233	3,900	2,800	6,300	1,597
B	3	5,067	5,400	4,000	5,800	0,945
C	7	4,229	3,300	1,600	9,700	2,854
D	6	3,733	3,550	1,100	6,900	1,900

p=0,720

Tabela 5.29

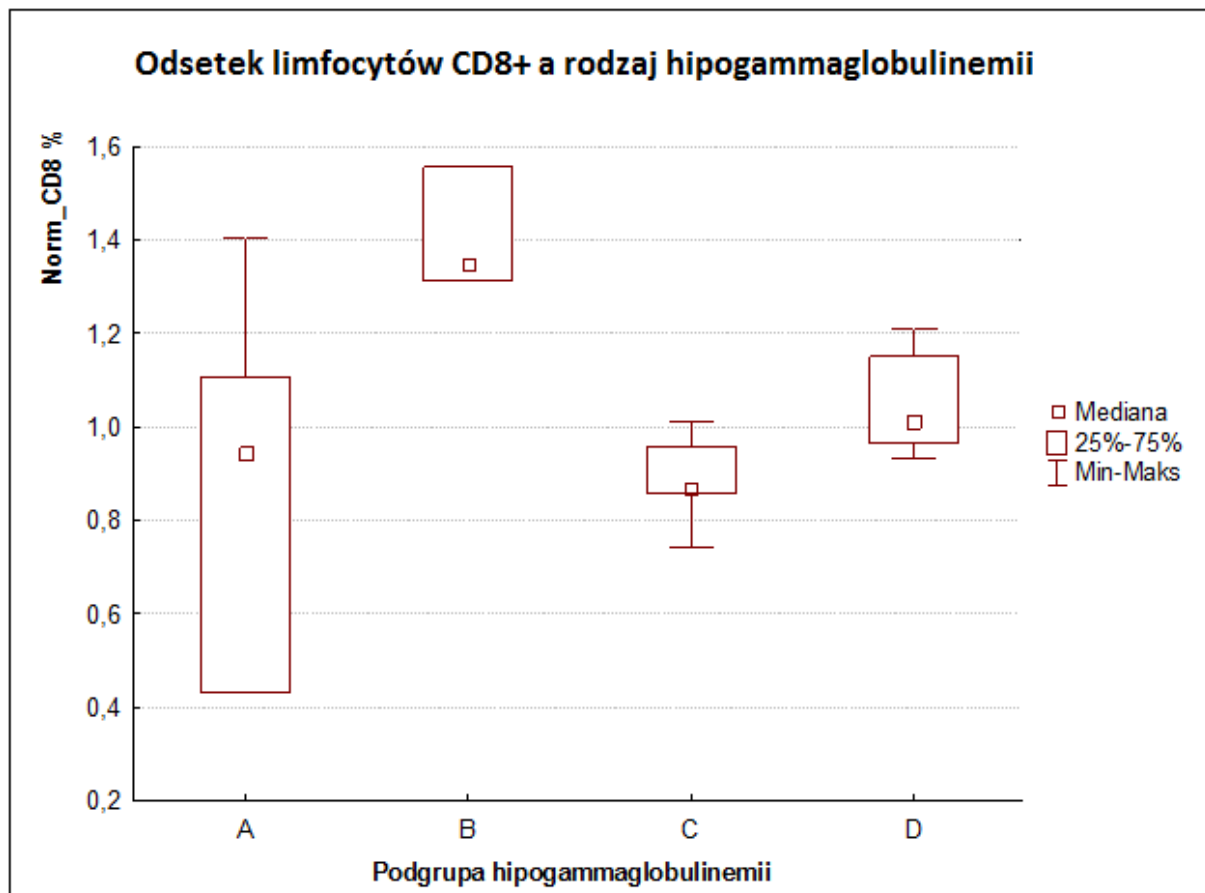
Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	CD3+CD4+CD8+				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	0,300	0,300	0,100	0,500	0,141
B	3	0,367	0,300	0,100	0,700	0,306
C	7	0,129	0,100	0,000	0,200	0,076
D	6	0,183	0,200	0,000	0,400	0,160

p=0,148

Tabela 5.30

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_CD3+HLA-DR+ %				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	2,427	1,885	1,538	4,923	1,277
B	3	3,359	4,026	0,949	5,103	2,156
C	7	1,835	1,359	1,103	2,923	0,766
D	6	1,517	1,500	1,282	1,769	0,191

p=0,323

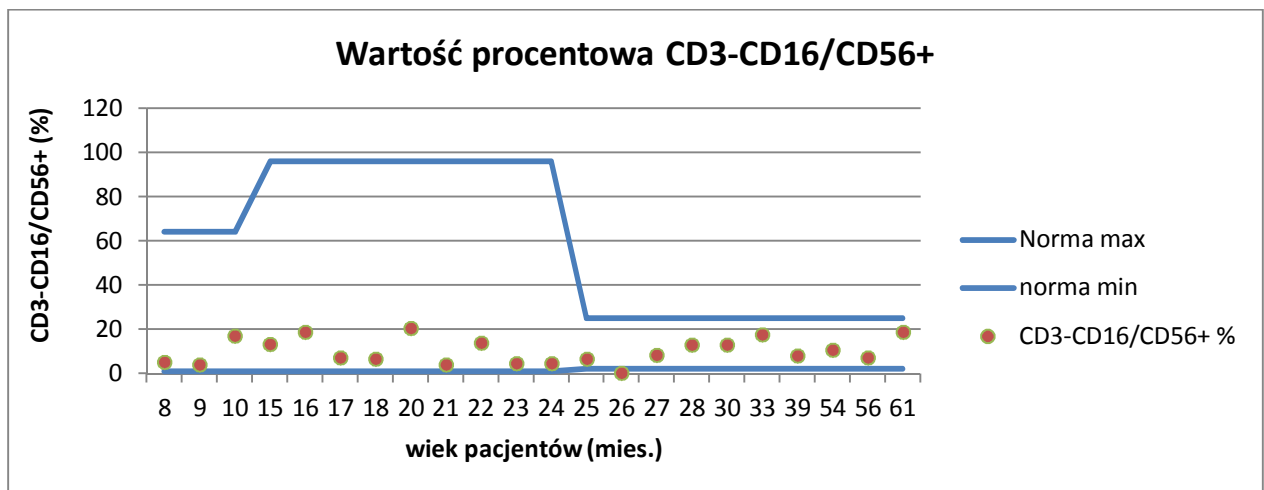


Wykres 41. Wykres zróznicowania wartości procentowych limfocytów T CD8+ pomiędzy poszczególnymi podgrupami hipogammaglobulinemii

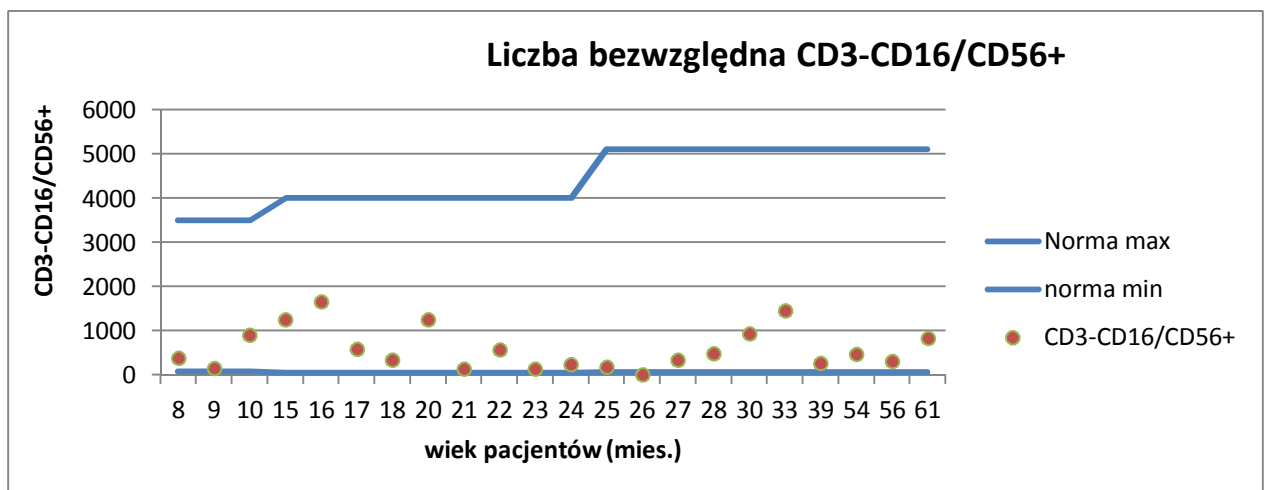
4.4 Elementy odporności wrodzonej

4.4.1 Komórki NK

W badanej grupie dzieci niedobór komórek NK, o fenotypie CD3-CD16/CD56+ stwierdzono u jednego dziecka, u którego ich wartość procentowa wynosiła 0,2%, a liczba bezwzględna 9/mm³. Spośród pozostałych 21 dzieci wartość procentowa i liczba bezwzględna mieściły się w granicach wartości referencyjnych wg Schatorje i wsp. [32] (wykresy 42a, 42b).



Wykres 42a

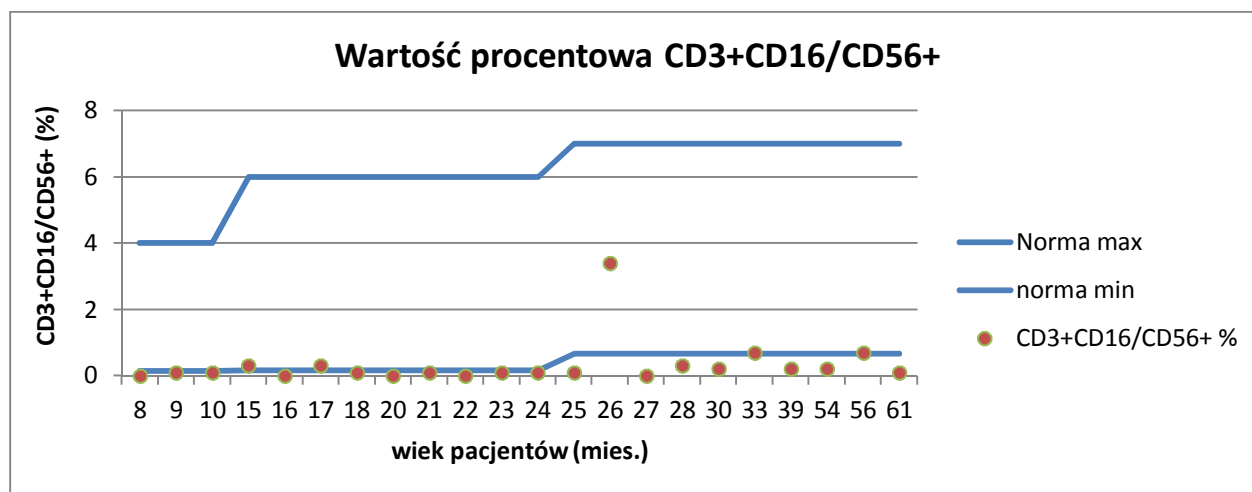


Wykres 42b

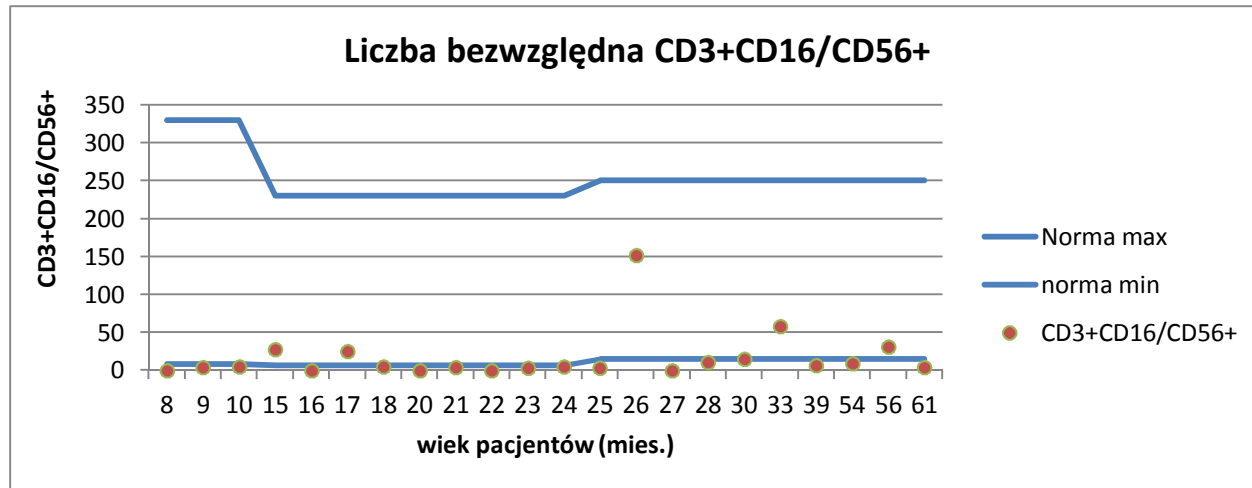
Wykresy 42a-b. Wartość procentowa i liczba bezwzględna komórek NK CD3-CD16+/CD56+ we krwi obwodowej badanych pacjentów

4.4.2 Komórki NKT

U pięciorga dzieci z badanej grupy stwierdzono całkowity brak komórek NKT (wykresy 43a, 43b), który u trojga spośród nich korelował z nieobecnością niedojrzałych limfocytów T podwójnie dodatnich o fenotypie CD3+CD4+CD8+ pochodzenia grasiczego, które stanowią prekursorów komórek NKT. Najwyższą wartość procentową wynoszącą 3,4% i liczbę bezwzględną komórek NKT stwierdzono u dziecka, u którego równocześnie wykazano niedobór komórek NK.



Wykres 43a

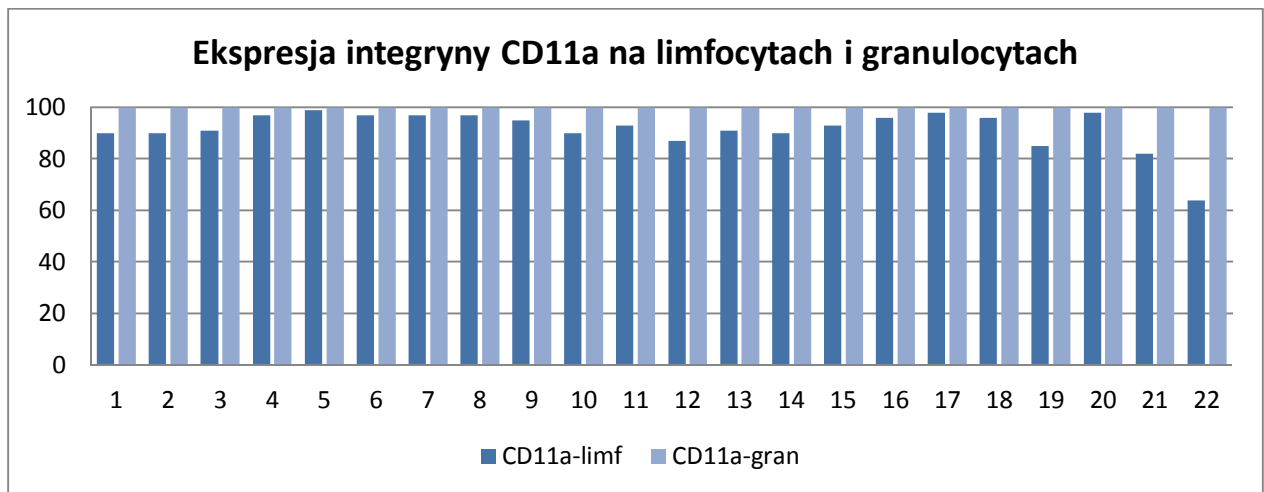


Wykres 43b

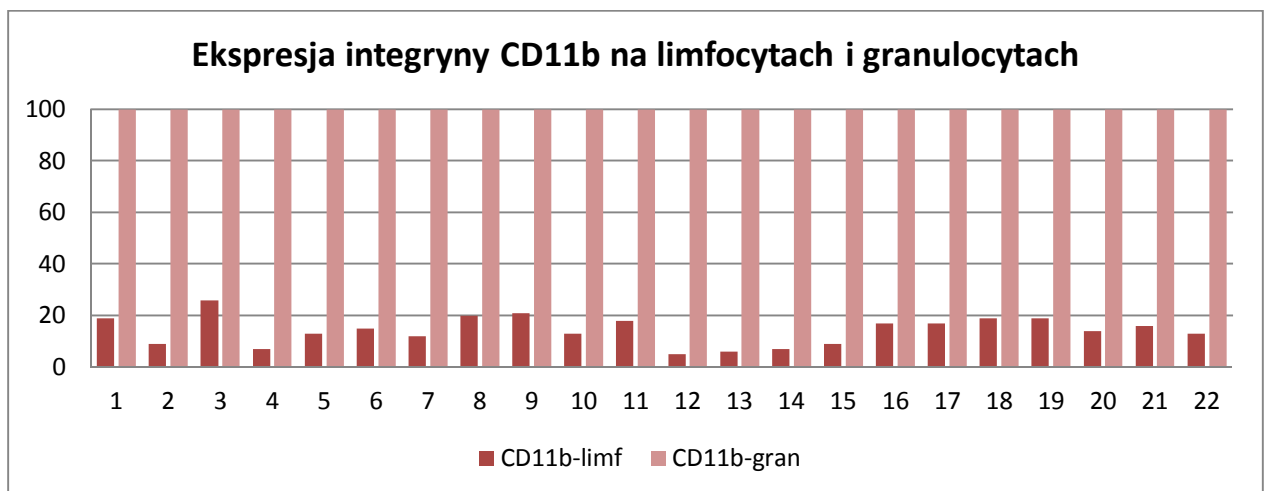
Wykresy 43a-b. Wartość procentowa i liczba bezwzględna komórek NKT CD3+CD16+/CD56+ we krwi obwodowej u badanych pacjentów

4.4.3 Ekspresja integryn

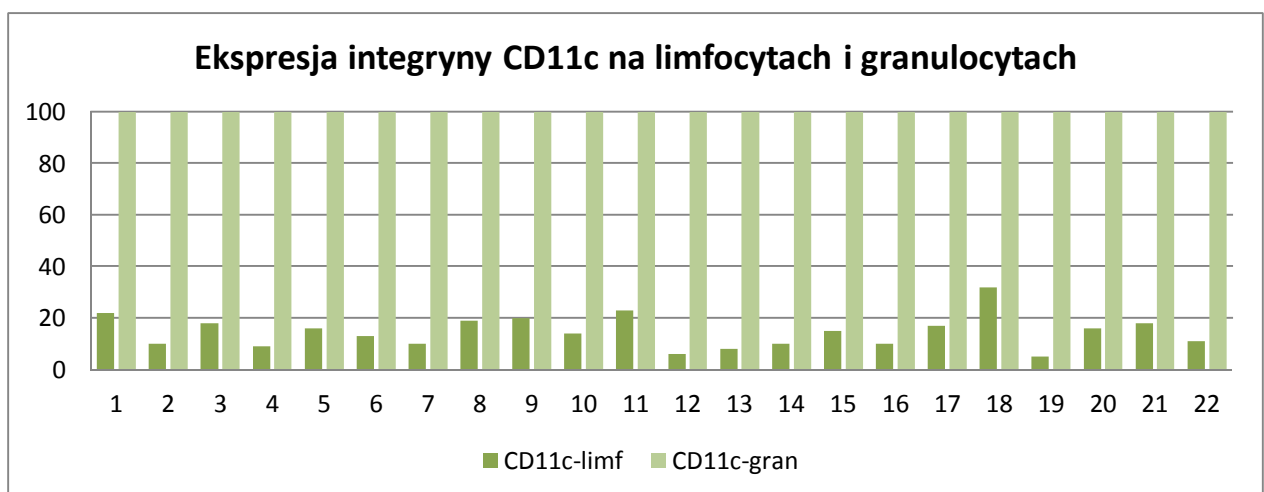
U wszystkich dzieci z grupy badanej ekspresja integryn na limfocytach oraz granulocytach obojętnochłonnych była prawidłowa (wykresy 44a, 44b, 44c, 44d).



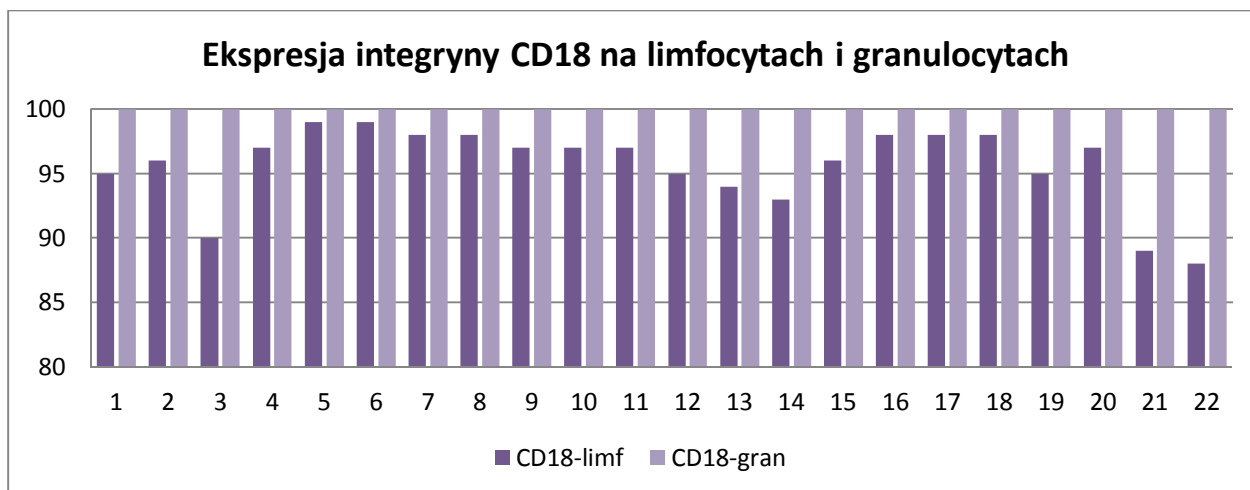
Wykres 44a



Wykres 44b



Wykres 44c



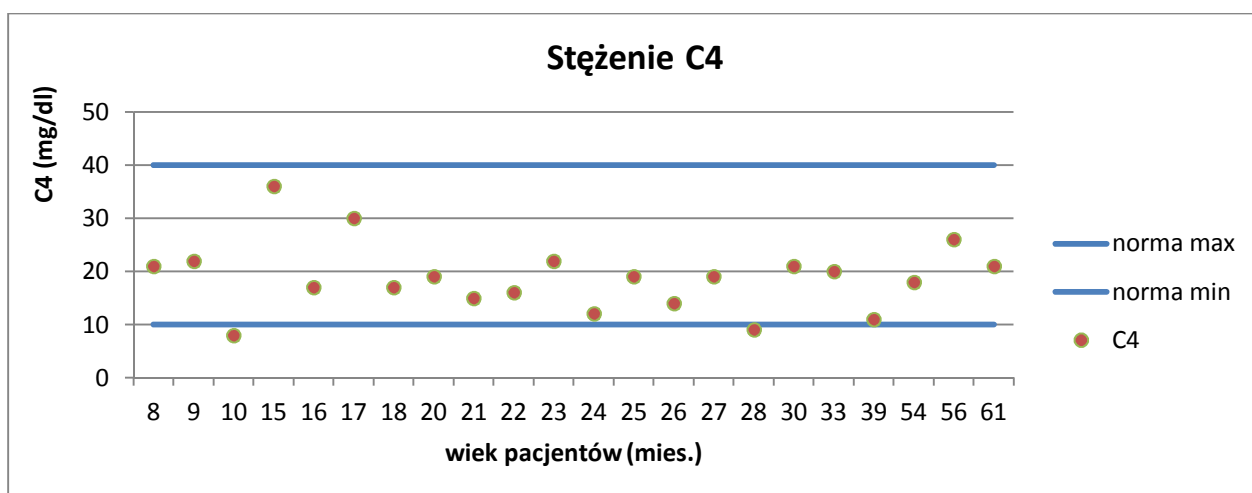
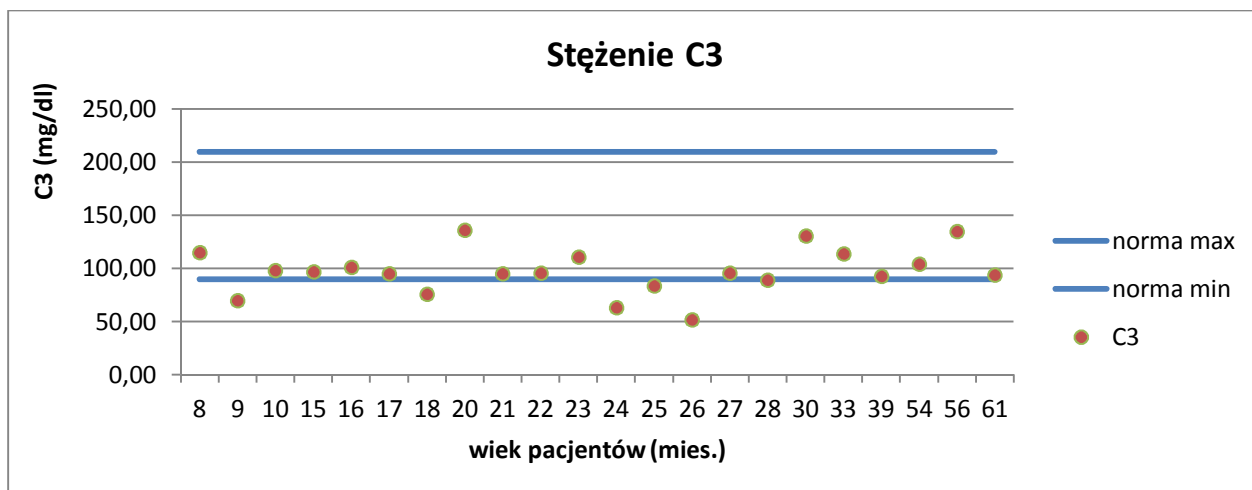
Wykres 44d

Wykresy 44a-d. Ekspresja integrynow CD11a, CD11b, CD11c i CD18 na limfocytach i granulocytach obojętnochłonnych we krwi obwodowej u badanych pacjentów

W interpretacji wyniku badania ekspresji integrynow na leukocytach należy wziąć pod uwagę różnice zależne od populacji analizowanych leukocytów. Z uwagi na fakt, że rodzina β_2 integrynow posiada jednolitą strukturę łańcucha β , ekspresja odpowiadającego mu antygeny różnicowania CD18 jest stwierdzana na wszystkich leukocytach, na których obecne są różnego rodzaju łańcuchy α . Z kolei determinowana ich obecnością ekspresja antygenów CD11a, CD11b oraz CD11c jest zróżnicowana, ponieważ tylko LFA-1 cechuje ekspresja na większości leukocytów, natomiast CR3 jest identyfikowany przede wszystkim na granulocytach obojętnochłonnych i jednojądrzastych komórkach żernych, a CR4 na makrofagach.

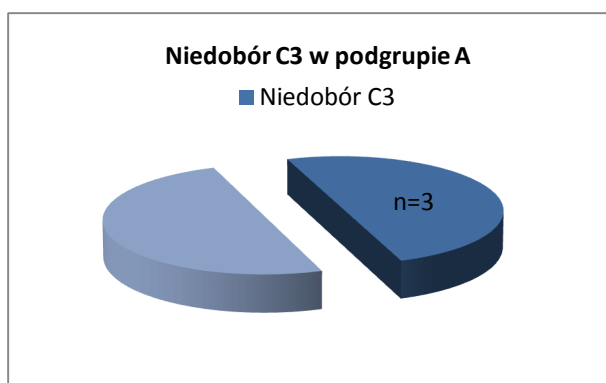
4.4.4 Składowe dopełniacza

Stężenie składowej C3 dopełniacza obniżone było w stosunku do normy u 6, natomiast składowej C4 – u 2 dzieci z grupy badanej (wykresy 45a, 45b). U jednego spośród tych dzieci stwierdzono równoczesny niedobór obu tych składowych. U 3 dzieci, u których stwierdzono niedobór C3, należało do podgrupy A pacjentów z hipogammaglobuliemią IgG, jedno dziecko należało do podgrupy B dzieci z niedoborem dwóch izotypów – IgG i IgM, natomiast 2 dzieci prezentowała niedobór wszystkich trzech klas głównych, stanowiący o przynależności do podgrupy D (wykresy 46a, 46b, 46c).

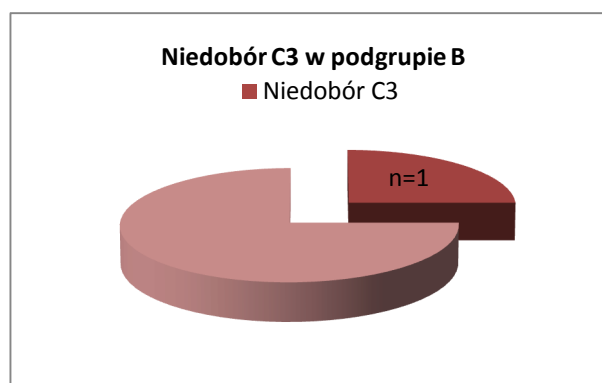


Wykres 45b

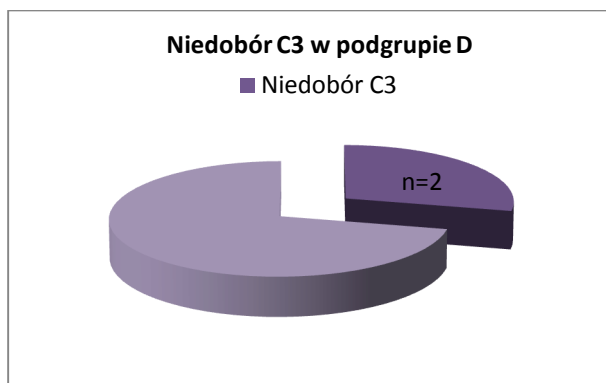
Wykresy 45a-b. Stężenie składowej C3 i składowej C4 dopełniająca w odniesieniu do zakresu norm (5 i 95 centyl) odpowiednich dla wieku



Wykres 46a



Wykres 46b

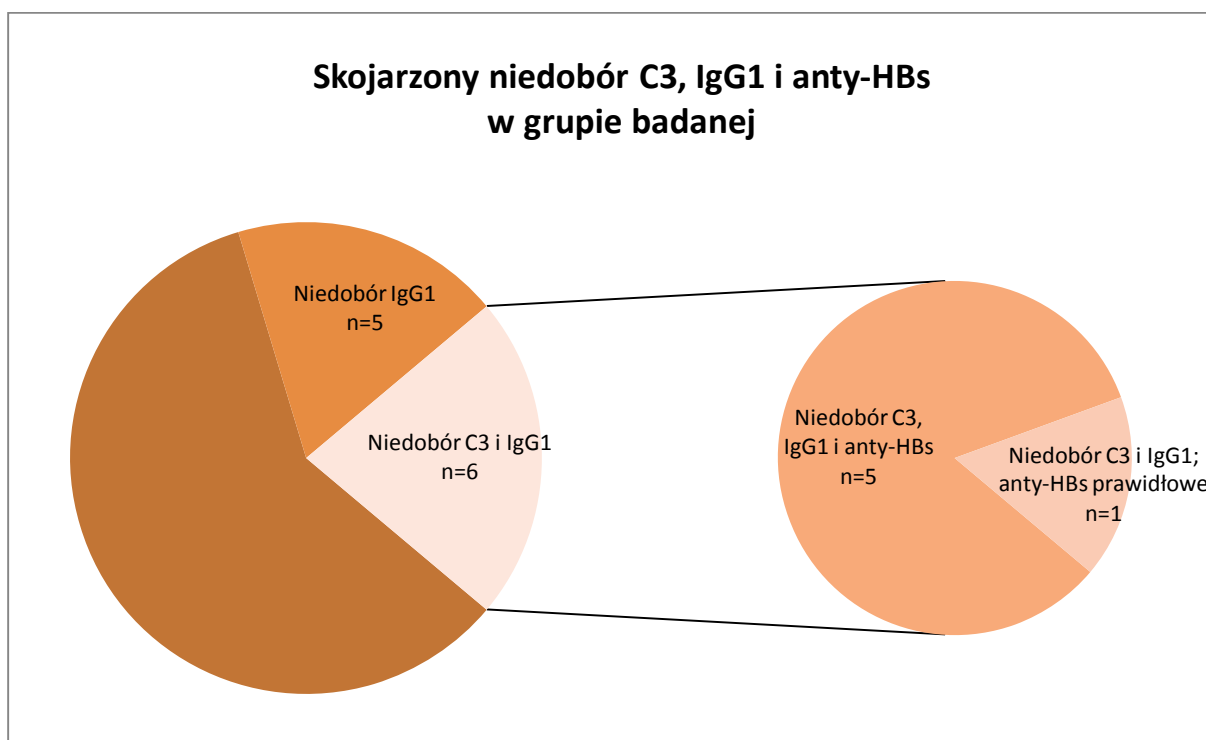


Wykres 46c

Wykresy 46a-c. Niedobór składowej C3 dopełniacza w podgrupach zależnie od rodzaju hipogammaglobulinemii u badanych pacjentów

U wszystkich sześciorga dzieci (100%), u których wykazano obniżone stężenie składowej C3 dopełniacza w surowicy, niezależnie od kwalifikacji do podgrupy z punktu widzenia hipogammaglobulinemii, stwierdzono współistniejący niedobór podklasy IgG1, a u jednego z tych dzieci – niedobór podklas IgG1 i IgG3.

Interesujące jest również, że w 5 przypadkach (83%) niedobór składowej C3 dopełniacza towarzyszył niedostatecznej odpowiedzi poszczepiennej ocenianej w oparciu o stężenie swoistych przeciwciał anti-HBs (wykres 47).



Wykres 47. Skojarzony niedobór składowej C3 dopełniacza i antygenowo-swoistych przeciwciał poszczepiennych anti-HBs

Zależności pomiędzy rodzajem hipogammaglobulinemii i elementami odporności wrodzonej przedstawione zostały w tabelach od 5.31 do 5.40. Nie były one istotne statystycznie.

Tabela 5.31-40. Zależność pomiędzy podgrupami hipogammaglobulinemii a parametrami odporności wrodzonej

Tabela 5.31

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_C3				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	0,963	0,954	0,683	1,375	0,244
B	3	1,164	1,200	0,950	1,342	0,198
C	7	1,132	1,067	1,042	1,383	0,125
D	6	1,031	1,046	0,833	1,175	0,114

p=0,140

Tabela 5.32

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_C4				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,228	1,183	1,033	1,533	0,193
B	3	1,333	1,333	1,300	1,367	0,033
C	7	1,386	1,300	0,933	1,867	0,301
D	6	1,228	1,217	0,967	1,400	0,163

p=0,577

Tabela 5.33

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_CD3-CD16/CD56+ %				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,207	1,143	0,922	1,730	0,286
B	3	1,455	1,478	1,204	1,683	0,240
C	7	1,196	1,205	1,066	1,374	0,115
D	6	1,153	1,093	1,031	1,478	0,171

p=0,241

Tabela 5.34

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_CD3-CD16/CD56+ #				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,060	1,049	0,990	1,154	0,054
B	3	1,160	1,176	1,026	1,278	0,127
C	7	1,175	1,137	1,056	1,306	0,108
D	6	1,116	1,054	1,023	1,408	0,150

p=0,170

Tabela 5.35

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_CD3+CD16/CD56+ %				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,043	0,990	0,912	1,432	0,194
B	3	0,948	0,927	0,912	1,006	0,051
C	7	0,971	0,973	0,896	1,024	0,048
D	6	0,976	0,981	0,943	0,990	0,018

p=0,797

Tabela 5.36

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	Norm_CD3+CD16/CD56+ #				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	1,093	0,993	0,953	1,583	0,243
B	3	1,044	1,000	0,949	1,183	0,123
C	7	1,004	0,977	0,936	1,096	0,061
D	6	0,981	0,984	0,971	0,989	0,008

p=0,781

Tabela 5.37

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	CD11a-limf				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	84,167	86,000	64,000	97,000	11,125
B	3	95,000	96,000	91,000	98,000	3,606
C	7	94,714	97,000	90,000	98,000	3,302
D	6	93,833	94,000	90,000	99,000	3,545

p=0,066

Tabela 5.38

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	CD11b-limf				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	12,000	12,500	5,000	19,000	5,292
B	3	14,000	17,000	6,000	19,000	7,000
C	7	15,714	15,000	7,000	26,000	6,576
D	6	15,167	15,000	9,000	21,000	4,309

p=0,612

Tabela 5.39

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	CD11c-limf				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	10,000	10,000	5,000	18,000	4,604
B	3	19,000	17,000	8,000	32,000	12,124
C	7	16,000	16,000	9,000	22,000	4,243
D	6	15,500	15,000	10,000	23,000	5,282

p=0,245

Tabela 5.40

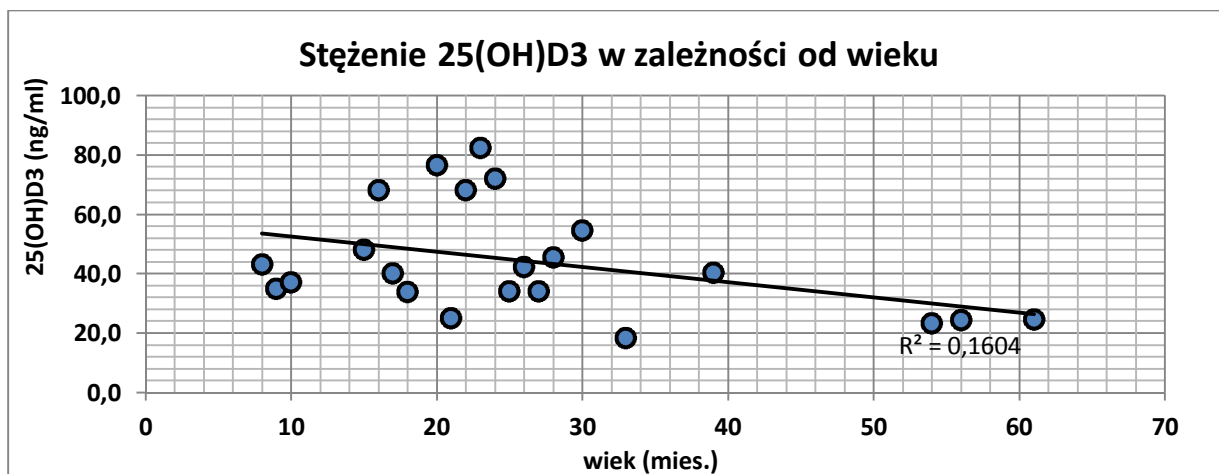
Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	CD18-limf				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	93,000	94,000	88,000	98,000	3,847
B	3	96,667	98,000	94,000	98,000	2,309
C	7	96,000	97,000	90,000	99,000	2,944
D	6	97,333	97,000	96,000	99,000	1,033

p=0,137

4.5 Stężenie 25(OH)D3

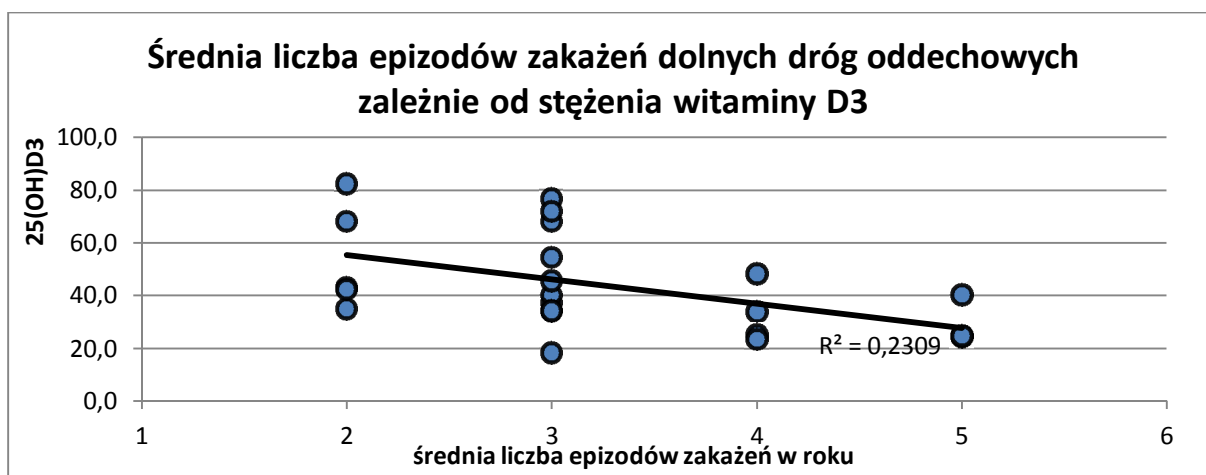
Wykazano różnice w zakresie surowiczego stężenia 25(OH)D3 pomiędzy poszczególnymi dziećmi z grupy badanej; wahało się ono w granicach od 18,2 ng/ml do 82,4 ng/ml. Biorąc pod uwagę złożone interakcje środowiskowo-osobnicze odgrywające rolę w kształtowaniu stężenia witaminy D3 w surowicy pacjenta, zostały one uwzględnione w klinicznej kwalifikacji do grupy badanej. Wszystkie dzieci z etnicznego punktu widzenia były rasy białej i pochodzenia kaukaskiego, co eliminowało wpływ hiperpigmentacji skóry na syntezę witaminy D3 w skórze. Ponadto, pod uwagę brano czynniki mogące zaburzać prawidłowe jelitowe wchłanianie witaminy D3 dostarczanej w diecie. U żadnego dziecka z grupy badanej nie ujawniono występowania objawów enteropatii, a w przypadku tych pacjentów, u których rozpoznano wcześniej alergię pokarmową, rodzice deklarowali przestrzeganie zalecanej diety eliminacyjnej. Biorąc pod uwagę fakt, że w Polsce efektywna synteza witaminy D w skórze ma miejsce w okresie od kwietnia do września, istotne znaczenie dla dzieci ma wzbogacenie w nią mieszanek oraz suplementacja w okresie niemowlęcym, która stosowana była u 3 dzieci z grupy badanej, zgodnie z obowiązującymi rekomendacjami [93].

Zgodnie z przyjętymi kryteriami interpretacji laboratoryjnego badania poziomu 25(OH)D3, przedstawionymi w sekcji 1.6 niniejszej pracy [92], niedostateczne stężenie witaminy D3, tj. mieszczące się w zakresie pomiędzy 20 ng/ml i 30 ng/ml, stwierdzono u 4 dzieci, w wieku od 23 do 61 miesięcy; stężenie 25(OH)D3 w tych przypadkach mieściło się w granicach od 23,3 ng/ml do 25,0 ng/ml. Niedobór witaminy D3, definiowany jako stężenie 25(OH)D3 poniżej 20 ng/ml, wynoszące 18,2 ng/ml stwierdzono u jednego dziecka z grupy badanej, w wieku 33 miesięcy (wykres 48).



Wykres 48. Stężenie witaminy D3 w surowicy w zależności od wieku badanych pacjentów

Stężenie witaminy D3 w surowicy skorelowano następnie zarówno z wiekiem pacjentów, jak i z liczbą infekcji dolnych dróg oddechowych średnio przebytych przez nich w ciągu 1 roku (wykres 49). Interesujące jest, że nieprawidłowe stężenie 25(OH)D3 demonstrowały dzieci, u których liczba epizodów zapalenia oskrzeli / zapalenia płuc przebytych w ciągu 1 roku była największa i wynosiła 3 (w przypadku 1 dziecka) lub 5 (u 3 dzieci).



Wykres 49. Zależność pomiędzy stężeniem witaminy D3 w surowicy a wskaźnikiem średniej liczby epizodów zakażeń dolnych dróg oddechowych w ciągu 1 roku u badanych pacjentów

Zależność pomiędzy rodzajem hipogammaglobulinemii a stężeniem witaminy D3 przedstawiona została w tabeli 5.41. Nie wykazano w tym przypadku istotności statystycznej.

Wykres 48 ilustruje zależność stężenia witaminy D3 od wieku pacjentów z badanej grupy w postaci linii trendu. Współczynnik determinacji R^2 wynosi 0,1604, co oznacza, że około 16% zmienności jednej cechy determinowane jest zmiennością drugiej z cech.

Zależność liczby epizodów zakażeń dolnych dróg oddechowych od stężenia witaminy D3 przedstawiono w postaci linii trendu na wykresie 49. W tym przypadku współczynnik determinacji wynosi 0,2309, a więc około 23% zmienności stężenia 25(OH)D3 w surowicy determinuje zmienność liczby epizodów infekcji w badanej grupie dzieci.

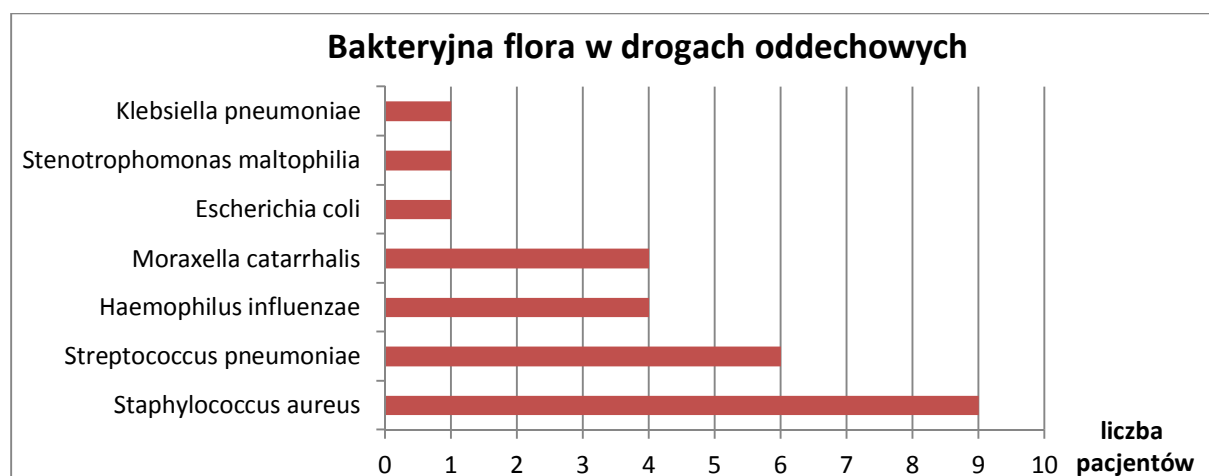
Tabela 5.41. Zależność pomiędzy podgrupami hipogammaglobulinemii a stężeniem 25(OH)D3

Rodzaj hipogammaglobulinemii	N	25(OH)D3				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
A	6	39,5	37,0	24,3	72,0	17,6
B	3	35,5	34,0	18,2	54,4	18,1
C	7	43,1	40,1	23,3	76,5	16,6
D	6	54,0	56,7	25,0	82,4	22,3

p=0,466

4.6 Flora bakteryjna dróg oddechowych

Pomimo heterogenności niedoboru wytwarzania przeciwciał u dzieci w badanej grupie, znajdującej swoje odzwierciedlenie w postaci podziału grupy badanej na podgrupy zależnie od rodzaju hipogammaglobulinemii dotyczącej różnych izotypów, profil zakażeń o etiologii bakteryjnej był stosunkowo uniwersalny. Nie stwierdzono predyspozycji do wybranego zakażenia bakteryjnego w żadnej z wymienionych podgrup. Pozytywne wyniki posiewów wydzieliny z dróg oddechowych uzyskano u 20 spośród 22 dzieci z grupy badanej (91%)(wykres 50).



Wykres 50. Flora bakteryjna w drogach oddechowych u badanych pacjentów

Najczęściej stwierdzanymi patogenami były: *Staphylococcus aureus* (metycylinowrażliwy, MSSA), obecny u 9 dzieci (41%) i *Streptococcus pneumoniae*, ujawniony u 6 dzieci (27%); inne

bakterie, takie jak *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis*, obecne były w drogach oddechowych u 4 (18%) pacjentów, odpowiednio. Należy podkreślić, że spośród 4 dzieci, u których w posiewie wydzieliny z dróg oddechowych obecne były kolonie *Haemophilus influenzae*, u dwojga z nich odnotowano niedostateczne wytwarzanie swoistych przeciwciał poszczepiennych przeciwko antygenowi otoczkowemu PRP Hib. Gram ujemna flora jelitowa – *Klebsiella pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia* oraz *Escherichia coli* zidentyfikowana została u dwójki dzieci (9%), które w czasie przeprowadzenia badania były w wieku < 12 miesięcy życia. Podobnie, u kolejnych dwojga dzieci (9%) wyhodowano kolonie *Candida* sp., które obecne były wyłącznie jako domieszka flory bakteryjnej.

W tabeli 8 przedstawiono zależność pomiędzy stężeniem 25(OH)D3 w surowicy badanych dzieci i średnią liczbą epizodów zakażeń dolnych dróg oddechowych w ciągu roku. Korelacja ta była umiarkowanie silna i ujemna (współczynnik korelacji rho Spearmana wynosił -0,513) oraz istotna statystycznie (poziom istotności p=0,015).

Tabela 8. Współczynnik korelacji rang Spearmana (rho) i poziom jego istotności (p) dla zależności pomiędzy stężeniem 25(OH)D3 a liczbą epizodów zakażeń dolnych dróg oddechowych w ciągu roku

Zależność	rho	p
Liczba epizodów zakażeń dróg oddechowych a 25(OH)D3	-0,513	0,015

5. DYSKUSJA

Limfocyty B pamięci

U dzieci dominująca jest populacja naiwnych limfocytów B, które nie zetknęły się z antygenami i nie wykazują ekspresji molekuł nabywanych podczas procesu dojrzewania, takich jak antygen CD27 i immunoglobuliny inne niż IgM i IgD, wytwarzane w rezultacie rearanżacji genów immunoglobulin. Stopniowe zastępowanie CD27- limfocytów naiwnych przez posiadające antygen różnicowania CD27 limfocyty B pamięci, odzwierciedlający molekularne procesy przełączenia klas (CSR) i hipermutacji somatycznych (SHM) zachodzi u dzieci zdrowych aż do 10-16 roku życia [43]. W pierwszych latach życia zwiększenie populacji limfocytów B pamięci ma charakter względny, jest bowiem przede wszystkim następstwem redukcji liczby limfocytów B naiwnych i przejściowych, a w jej wyniku – zmniejszenia liczby całkowitej limfocytów B. Ta charakterystyczna dynamika zmian dotycząca puli limfocytów B zachodzi najbardziej intensywnie do 5 roku życia, po czym całkowita liczba limfocytów B pozostaje stała, a przemiany w kierunku powstawania komórek B pamięci są dalej kontynuowane [20]. Szlaki molekularne limfocytów B pamięci typu *non-switched* czyli CD27+IgD+ różnią się od limfocytów B pamięci po przełączeniu klas, typu *switched* czyli CD27+IgD-, których rozwój, w przeciwieństwie do tej pierwszej populacji, zachodzi w ośrodkach rozmnażania i odzwierciedla odporność humoralną zależną od limfocytów T. Limfocyty B pamięci CD27+IgD+ z kolei, których powstawanie jest niezależne od reakcji w ośrodkach rozmnażania, reprezentują pod względem rozwojowym i funkcjonalnym element odporności humoralnej niezależnej od limfocytów T [94,95].

Istota antygeny CD27 jako ważnego biologicznie markera populacji limfocytów B pamięci ma znaczenie rokownicze w hipogammaglobulinemii. Zmniejszona liczba lub całkowity brak tych komórek we krwi obwodowej stwierdza się u pacjentów w niedoborach odporności z grupy zespołów hiperimmunoglobulinemii M (HIGM), cechujących się defektami przełączania klas immunoglobulin (CSR) i w różnym stopniu także związanego z nim procesu hipermutacji somatycznych (SHM). Zaburzenia te występują łącznie w HIGM typu 1, związanym z niedoborem CD40L (antygen różnicowania CD154 na limfocytach T), który dziedziczony jest w sprzężeniu z chromosomem X, w defekcie CD40 określanym jako HIGM typu 3 i dziedziczonym autosomalnie recesywnie, a także w zespole HIGM typu 6, charakteryzującym się zaburzeniem sygnału NFκB oraz HIGM typu 2, w którym występuje defekt indukowanej dezaminazy cytydyny (activation induce cytidine deaminase, AID) [96,97]. Poza klasycznymi postaciami HIGM, złożone defekty reparacji DNA, takie jak syndromowe niedobory odporności, ataksja-telangiektazja (AT) [98] i zespół Nijmegen (Nijmegen Breakage Syndrome, NBS)[99] charakteryzują się zaburzeniami CSR (ale nie SHM) i zbliżonym do HIGM fenotypem [100].

Stwierdzenie przez Agematsu i wsp. [101] oraz Bruet i wsp. [102] zmniejszenia liczby komórek B CD27+IgD- oraz upośledzenia SHM w limfocytach CD27+IgD+ w pospolitym zmiennym niedoborze odporności (common variable immunodeficiency, CVID) zapoczątkowało prowadzenie szeregu badań klinicznych, które zaowocowały opracowaniem klasyfikacji CVID w aspekcie immunofenotypu limfocytów B oraz jego implikacji klinicznych i prognostycznych. Kryteria kliniczno-diagnostyczne wyróżnienia postaci CVID dokonane przez różnych autorów [103,104,105] podsumowano w tabeli 9 wg [106]. Istotne jest uwzględnienie nie tylko nieprawidłowości w zakresie subpopulacji limfocytów B pamięci, ale także korelujących z nimi powikłań, wpływających niekorzystnie na rokowanie u pacjentów z CVID, takich jak autoimmunizacja, splenomegalia, tworzenie ziarniniaków oraz limfadenopatia [107], a jak wynika z badań klinicznych w grupach pacjentów, w których tychże klasyfikacji dokonano, także większa częstość zakażeń układu oddechowego i rozwój rozstrzeni oskrzeli [108] i upośledzenie odpowiedzi poszczepiennej na antygeny polisacharydowe pneumokoków [109].

Tabela 9. Kryteria kliniczno-diagnostyczne klasyfikacji pospolitego zmiennego niedoboru odporności

Klasyfikacja	Autor	Postać CVID	Limfocyty B pamięci switched CD27+IgD-	Limfocyty B niedojrzałe CD27-
Freiburska	Warnatz i wsp.	Ia Ib II	<0,4% PBMC <0,4% PBMC ≥0,4% PBMC	↑ Norma Norma
Paryska	Piqueras i wsp.	MB0 MB1 MB2	Nieobecne ↓ Norma	- - Norma
EUROclass	Wehr i wsp.	>1% limf B	≤2,0% >2,0%	↑ Norma ↑ norma

U zdrowych osób dorosłych komórki pamięci CD27+ stanowią nawet około 40% wszystkich limfocytów B krwi obwodowej [101], a przedstawione w najnowszej klasyfikacji EUROclass kryteria podziału pacjentów z CVID na grupy kliniczne w oparciu o wartość procentową limfocytów B CD27+IgD- <2% (jak również proponowaną wartość limfocytów B przejściowych >9%) można odnieść do osób > 18 roku życia. W interpretacji analizy immunofenotypowej subpopulacji komórkowych u dzieci należy brać pod uwagę normy określone dla pacjentów w różnym wieku [20,43,110] i stąd ocena znaczenia limfocytów B pamięci w przewidywaniu przebiegu pospolitego zmiennego niedoboru odporności i prognozowaniu poważnych powikłań nie może być w prosty sposób przeniesiona na grunt populacji pediatrycznej. W tej sytuacji podjęte zostały również próby zdefiniowania zaburzeń immunofenotypowych, zarówno jakościowych, jak i ilościowych,

charakterystycznych dla CVID u dzieci [111,112,113]. Wykazano, że zmniejszenie liczby bezwzględnej limfocytów B pamięci koreluje w tym schorzeniu lepiej z przebiegiem klinicznym i powikłaniami niż surowicze stężenie immunoglobulin [114]. W badaniu Aydogan i wsp. [115] zmniejszona wartość względna limfocytów B u dzieci z hipogammaglobulinemią była wyznacznikiem grupy pacjentów, u których ustalono rozpoznanie CVID, a przebieg kliniczny tego niedoboru odporności był powikłany wczesnym rozwojem rozstrzeni oskrzeli i odzwierciedlał stąd niekorzystne rokowanie dla chorych dzieci. Należy jednakże w tym miejscu podkreślić, że zmniejszony odsetek limfocytów B nie może być uznawany za jedyny czynnik prognostyczny, gdyż powikłania CVID u dzieci nie są ograniczone tylko do grupy pacjentów zdefiniowanych w oparciu o wspomniany defekt immunologiczny [116]. Pomimo tych wątpliwości podjęte zostały także próby określenia liczby limfocytów CD27+IgD- w CVID u dzieci, które pozwoliłyby na wyróżnienie grupy pacjentów, u których zwiększone jest ryzyko autoimmunizacji i ciężkich zakażeń. W publikacji Yong i wsp. [117] uznano liczbę bezwzględną limfocytów B pamięci po przełączeniu klas $<5/\mu\text{l}$ za graniczną dla wspomnianej postaci CVID u dzieci jako różnicującą prawidłowe od zaburzonego dojrzewania limfocytów B, gdyż u dzieci zdrowych > 1 roku życia liczba limfocytów B CD27+IgD- zwykle przekracza tę wartość [20,43,110].

W badanej grupie 22 dzieci z hipogammaglobulinemią wartość procentowa limfocytów B pamięci CD19+CD27+była zmniejszona u dwojga dzieci w wieku 15 i 16 miesięcy, przy czym u żadnego z dzieci nie wykazano zmniejszenia liczby bezwzględnej tych komórek w stosunku do wartości referencyjnych odpowiednich dla wieku. Zwiększenie wartości względnej limfocytów B pamięci odnotowano u 6, a liczby bezwzględnej u 3 dzieci z grupy badanej, jednak zależność pomiędzy tym zjawiskiem a hipogammaglobulinemią IgG nie była statystycznie istotna. Chociaż, jak zaznaczono powyżej, w grupie wiekowej reprezentowanej przez pacjentów uczestniczących w niniejszym badaniu, limfocyty B pamięci nie mogą stanowić definitywnego kryterium prognostycznego, pozwalającego na wykluczenie CVID, jednak można przyjąć, że u żadnego z dzieci z grupy badanej nie stwierdzono w analizie immunofenotypowej niedoboru tych komórek, nakazującego wysunąć podejrzenie tego schorzenia w oparciu o kryteria immunodiagnostyczne.

Najbardziej dojrzałą pulę limfocytów B pamięci po przełączeniu klas stanowią plazmablasty, cechujące się ekspresją CD19, CD38 i nieobecnością IgM. W przeciwieństwie do dzieci zdrowych, u których stwierdza się obecność nielicznych plazmablastów we krwi obwodowej [20,43], w niniejszym badaniu spośród 22 dzieci z hipogammaglobulinemią, aż w 16 przypadkach wykazano zwiększenie wartości procentowej tych komórek, chociaż nie uzyskano istotności statystycznej w odniesieniu do tej zależności. Równocześnie u 5 dzieci nie stwierdzono obecności plazmablastów we krwi obwodowej, czego przyczyną był brak ekspresji antygenu CD38, gdyż u tych samych dzieci nie zidentyfikowano również limfocytów B przejściowych. Plazmablasty stanowią populację krótko żyjących, intensywnie dzielących się komórek, które są prekursorami plazmocytów [118], będących

źródłem przeciwciał o wysokim powinowactwie do antygenów. Powiązanie hipogammaglobulinemii ze zwiększonym odsetkiem plazmablastów we krwi obwodowej, które po raz pierwszy stwierdzone zostało u dzieci z badanej grupy pozwala na wysunięcie własnej hipotezy bloku na etapie terminalnego dojrzewania limfocytów B, skutkującego defektem wytwarzania przeciwciał. U tych dzieci analiza puli plazmablastów nie uzasadnia podejrzenia CVID, gdyż ten niedobór odporności charakteryzuje się brakiem zdolności do zwiększenia liczby plazmablastów w odpowiedzi na stymulację antygenową przez szczepienie [119]. Fakt ten jednak nie umożliwia także prognozowania dobrego rokowania dotyczącego przemijającego charakteru tego zaburzenia i nie pozwala na określenie ewentualnego czasu spontanicznej immunokorekcji u dzieci z badanej grupy.

Towarzyszące stwierdzonym po raz pierwszy w niniejszym badaniu powyższym zaburzeniom w obrębie populacji limfocytów B zakażenia układu oddechowego oraz upośledzenie odpowiedzi poszczepiennej u dzieci z badanej grupy, które przedstawiono w dalszej części dyskusji, może stwarzać mechanizm tzw. błędnego koła. Blok czynnościowy na etapie komórek plazmatycznych, wydzielających przeciwciała o wysokim powinowactwie do antygenów, pomimo akumulacji plazmablastów we krwi obwodowej prowadzi do hipogammaglobulinemii i zaburzenia odpowiedzi antygenowo-swoistej oraz predysponuje do zakażeń. Stymulacja antygenowa prowadzi do wzrostu odsetka dysfunkcyjnych plazmablastów, ale nie powoduje zwiększenia stężenia przeciwciał swoistych, będąc przyczyną hipogammaglobulinemii oraz źródłem konsekwencji klinicznych w postaci upośledzenia odpowiedzi na zakażenia. Należy podkreślić, że w niniejszej pracy po raz pierwszy przedstawiona została analiza immunofenotypowa tej populacji komórek w aspekcie zaburzeń biosyntezy przeciwciał, stwarzając podstawy dla wyjaśnienia patomechanizmu hipogammaglobulinemii.

W przedstawionej analizie immunofenotypowej uwzględnione zostały także limfocyty B o fenotypie CD19+CD27+IgD+, odpowiadające limfocytom B strefy brzeżnej śledziony (MZL). Biorą one udział w odpowiedzi immunologicznej niezależnej od limfocytów T i określane są jako naturalne efektorowe limfocyty B [120].

W grupie badanej 12 dzieci było w wieku ≤ 24 miesiąca życia, który charakteryzuje się fizjologicznie niedojrzałością strefy brzeżnej śledziony i upośledzeniem odpowiedzi na antygeny grasiczniezależne typu 2, do których należą polisacharydy ściany bakterii otoczkowych. Spośród wspomnianych 12 dzieci w niniejszym badaniu wykazano zmniejszenie odsetka limfocytów B MZL u czworga dzieci, przy czym liczba bezwzględna tych komórek mieściła się w normie wiekowej. Należy w tym miejscu podkreślić, że opisane w dalszej części dyskusji stwierdzane u części dzieci z badanej grupy upośledzenie odpowiedzi poszczepiennej na antygen PRP *Haemophilus influenzae* nie jest bezpośrednio związane z dysfunkcją limfocytów B strefy brzeżnej śledziony. U wszystkich dzieci, u których poddano analizie stężenie przeciwciał swoistych anty-PRP Hib, została bowiem uprzednio

zastosowana szczepionka skoniugowana, dzięki której stymulowana jest T-zależna odpowiedź limfocytów B.

Limfocyty B niedojrzałe/przejęciowe

Populacja niedojrzałych limfocytów B (recent bone marrow emigrants, RBE) we krwi obwodowej charakteryzuje się ekspresją antygenów CD10, CD21, CD24, CD38 oraz powierzchniowych IgM, a także brakiem ekspresji antygeny CD27. W ciągu pierwszych lat życia u zdrowych dzieci pula tych komórek podlega fizjologicznym, intensywnym zmianom ilościowym. Mianowicie, od okresu niemowlęcego, kiedy limfocyty niedojrzałe dominują we krwi obwodowej, stopniowo obserwowana jest redukcja ich liczby związana przede wszystkim początkowo ze zmniejszeniem całkowitej liczby limfocytów B uwalnianej ze szpiku kostnego, a następnie w głównej mierze spowodowana zwiększeniem liczby komórek B pamięci [20]. Wspomniane zależne od wieku, dynamiczne przemiany w obrębie puli limfocytów B muszą być uwzględniane w ocenie immunofenotypu i wynikających z niego implikacji diagnostycznych u dzieci. U zdrowych osób dorosłych limfocyty B przejęciowe CD38^{hi}IgM^{hi} stanowią około 3% wszystkich limfocytów B [121].

Odniesienie do najnowszej klasyfikacji EUROclass pacjentów z COVID-19, w której wartość procentową komórek B przejęciowych >9% całkowitej puli limfocytów B (towarzyszącą redukcji limfocytów B pamięci typu *switched* ≤2%) przyjęto za graniczną, może być dokonane dopiero u pacjentów powyżej 18 roku życia. Spośród innych stanów upośledzonej odporności, wzrost liczby limfocytów B przejęciowych opisany został przez Malaspina i wsp. w limfopenii CD4 [122] oraz zaawansowanej infekcji HIV [123] oraz przez Cuss i wsp. [124] w zespole limfoproliferacyjnym związanym z chromosomem X (X-linked lymphoproliferative syndrome, XLP). Ci sami autorzy wykazali, że w porównaniu z dojrzałymi limfocytami B, limfocyty przejęciowe cechują się krótszym czasem przeżycia, nieefektywną odpowiedzią na stymulację CD40L, zmniejszoną proliferacją oraz małą zdolnością do sekrecji immunoglobulin i przełączenia klas. Dominacja tej czynnościowo niedojrzałej populacji komórkowej w puli limfocytów B krwi obwodowej prowadzi do upośledzenia odporności humoralnej.

Wyniki przeprowadzonego badania wskazują na zwiększenie populacji limfocytów B przejęciowych u dzieci z defektami biosyntezy przeciwciał. W niniejszej analizie immunofenotypowej grupy dzieci z hipogammaglobulinemią, u 59% pacjentów odnotowano zwiększenie odsetka limfocytów B przejęciowych, które to zaburzenie nie było dotychczas obserwowane przez innych autorów. Nie stwierdzono wprawdzie istotności statystycznej pomiędzy hipogammaglobulinemią IgG i zwiększeniem odsetka ani liczby bezwzględnej limfocytów B przejęciowych, ale taka istotność wykazano w odniesieniu do rodzaju hipogammaglobulinemii. Mianowicie, dotyczyła ona różnicy pomiędzy podgrupą C, a więc dzieci, u których upośledzona była synteza immunoglobulin klasy G i A

a pozostałymi podgrupami pacjentów. Można podejrzewać, że ekspansja populacji limfocytów B przejściowych (recent bone marrow emigrants) we krwi obwodowej odzwierciedlać może efektywną limfopoezę w szpiku kostnym, będącym centralnym narządem limfatycznym i zwiększony ich wyrzut ze szpiku kostnego. Komórki te miałyby na obwodzie wypełnić „niszę” związaną z małą liczbą dojrzałych limfocytów B na drodze mechanizmu kompensacyjnego. Zjawisko to mogłoby stanowić odzwierciedlenie immunologicznej niedojrzałości wieku dziecięcego, prowadząc w efekcie do zaburzenia wytwarzania przeciwciał, aczkolwiek ostateczne przewidywanie ewentualnego jego przemijającego charakteru nie może być dokonane na przedstawionym etapie analizy i wymaga dalszej obserwacji prospektywnej. Należy podkreślić, że przedstawiona w niniejszej pracy szczegółowa analiza immunofenotypowa subpopulacji limfocytów krwi obwodowej przeprowadzona została po raz pierwszy u dzieci z hipogammaglobulinemią. Pomimo wspomnianych powyżej ograniczeń z punktu widzenia klinicznego, uzyskane wyniki pozwalają na lepsze zrozumienie patomechanizmu zaburzeń wytwarzania przeciwciał u dzieci i wynikającej stąd predyspozycji do zakażeń.

Swoiste przeciwciała poszczepienne

Badanie swoistych przeciwciał poszczepiennych służy ocenie specyficznej odpowiedzi immunologicznej przeciwko antygenom drobnoustrojów. Szczepionki przeciwko tężcowi i błonicy z zastosowaniem toksoidów, białkowych antygenów wyizolowanych z komórek bakteryjnych, które są antygenami tzw. grasiczozależnymi, indukują aktywację limfocytów T pomocniczych i wytwarzanie przeciwciał klasy IgG (podklasy IgG1 i IgG3) przez limfocyty B. Odpowiedź na antygeny grasiczozależne, choć w mniejszym stopniu niż u człowieka dorosłego, rozwinięta jest już we wczesnym okresie niemowlęcym. Przeprowadzenie w pierwszym półroczu życia cyklu szczepienia podstawowego, a następnie podanie 1 dawki uzupełniającej w 18 miesiącu życia, w formie szczepionek skojarzonych, ma na celu wytworzenie długotrwałej seroprotekcji przeciwko zakażeniom. Dane przedstawione w piśmiennictwie dotyczące immunogenności szczepionek zawierających toksoidy nie są całkowicie zgodne. Stężenie swoistych przeciwciał poszczepiennych, oceniane u niemowląt w okresie 2-4 tygodni po podaniu trzeciej dawki szczepienia podstawowego przekraczające 1,0 IU/ml Zarei i wsp. [125] stwierdzili u 98% dzieci po szczepieniu przeciwko błonicy i aż u 100% po szczepieniu przeciwko tężcowi. Podobnie, Paulke-Korinek i wsp. [126] odnotowali wysoki wskaźnik seroprotekcji u dzieci austriackich w wieku 4-8 lat, u których cykl szczepienia skojarzonego przeciwko tężcowi i błonicy przeprowadzono w schemacie 2 – 4 – 6 – 18 miesięcy życia. Utrzymywanie się odpowiedzi poszczepiennej przeciwko tężcowi stwierdzono u 96%, a przeciwko błonicy u 81% badanych. Stężenie swoistych przeciwciał przeciwko toksoidom zależne było u badanych dzieci od czasu, jaki upłynął od ostatniego szczepienia. Analiza przeprowadzona przez

Posfay-Barbe i wsp. [127] u dzieci w wieku 10-11 lat, które otrzymały przynajmniej 3 dawki szczepionki DTP w okresie niemowlęcym wykazała osiągnięcie minimalnego stężenia przeciwciał, wynoszącego 0,1 IU/ml, po podaniu dawki przypominającej toksoidu tężcowego tylko u 55% dzieci. Zjawisko to, zdaniem autorów, może być odzwierciedlać niedojrzałość układu odpornościowego oraz ograniczenie pamięci immunologicznej w okresie niemowlęcym.

Badanie odporności poszczepiennej przeciwko tężcowi i błonicy jest uznawane za istotny element diagnostyki w kierunku pierwotnego niedoboru odporności z grupy defektów wytwarzania przeciwciał. Niedobór przeciwciał swoistych jest zarówno częścią manifestacji klinicznej i laboratoryjnej głębokich defektów odporności, takich jak agammaglobulinemia i pospolity zmienny niedobór odporności, jak i stwierdzany jest w zespołach niedoborów odporności, takich jak zespół DiGeorge'a, może być także związany z niedoborem podklas IgG1 i IgG3, a nawet być izolowanym zaburzeniem, któremu nie towarzyszą inne odchylenia w układzie odpornościowym. Należy w tym miejscu nadmienić, że predysponujący do zaburzenia odpowiedzi poszczepiennej na toksoidy niedobór podklasy IgG1 stwierdzono w niniejszym badaniu u 11 (50%) dzieci, a u 1 dziecka niedobór IgG1 skojarzony był z niedoborem podklasy IgG3. Defekt wytwarzania tej ostatniej podklasy może być zarówno niedoborem izolowanym, jak i towarzyszyć zaburzeniom wytwarzania innych podklas immunoglobuliny G, a w obrazie klinicznym najczęściej manifestuje się on u dzieci jako nawracające zakażenia układu oddechowego [128]. Dorsey i Orange [129], którzy stwierdzili stężenie przeciwciał poszczepiennych przeciwko tężcowi u 30% dzieci z przejściową hipogammaglobulinemią niemowląt, uznali upośledzenie odporności poszczepiennej współistniejące ze zwiększoną liczbą limfocytów B za główne elementy patomechanizmu THI.

Przeprowadzone badanie przeciwciał swoistych przeciwko antygenom białkowym pozwala na ocenę wytwarzania przeciwciał przez limfocyty B w mechanizmie zależnym od aktywacji limfocytów T. Biorąc pod uwagę, że odpowiedź poszczepienna przeciwko toksoidom tężcowemu i błoniczemu związana jest z przeciwciałami klasy IgG, u dzieci z hipogammaglobulinemią w zakresie tego izotypu, która była wspólną cechą wszystkich pacjentów z badanej grupy, oczekiwać można niedoboru przeciwciał swoistych. Spośród pacjentów w grupie badanej aż 50% z nich nie prezentowało minimalnego stężenia ochronnego przeciwciał IgG przeciwko toksoidowi tężcowemu wynoszącego 0,1 IU/ml. Stężenie poniżej 1,0 IU/ml, zapewniającego długotrwałą seroprotekcję odnotowano aż u 73% dzieci w grupie badanej. Upośledzenie odpowiedzi na szczepienie toksoidem błoniczym związane ze stężeniem przeciwciał swoistych poniżej 0,1 IU/ml wykazano u 27%, natomiast stężenie poniżej 1,0 mIU/ml – u 68% dzieci.

Szczepionka przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B zawiera antygen HBs, będący produktem rekombinowanego DNA, a jej podanie indukuje efekt ochronny przed zakażeniem, związany z wytwarzaniem surowicznych IgG. Oznaczanie przeciwciał anti-HBs nie jest zalecane

rutynowo w diagnostyce laboratoryjnej pierwotnego niedoboru odporności celem potwierdzenia defektu wytwarzania przeciwciał w odpowiedzi na antygeny [130], ponieważ upośledzenie wytwarzania przeciwciał swoistych po szczepieniu przeciwko wzwb może być jedynie izolowanym defektem, któremu nie towarzyszą żadne inne wykładniki niedoboru odporności. Jednakże, podkreślić należy praktyczny aspekt tego badania z uwagi na zdefiniowane stężenie przeciwciał anti-HBs, które u osób z obniżoną odpornością ma charakter ochronny przed zakażeniem, a także określone stężenie, poniżej którego należy rozważyć podanie pacjentowi dodatkowej dawki szczepionki.

W badanej grupie wykazano poziom swoistych przeciwciał poniżej minimalnego stężenia ochronnego wynoszącego 10 mIU/ml u 7 dzieci (32%), a u 13 dzieci (59%) poniżej stężenia 100 mIU/ml, które jest związane z długotrwałym efektem protekcyjnym. We wcześniej wspomnianej publikacji Paulke-Korinek i wsp. [126] przeciwciała anti-HBs w stężeniu ≥ 10 mIU/ml obecne były jedynie u 52% dzieci w wieku 4-8 lat, u których zastosowano 4 dawki szczepionki heksawalentnej w 1 i 2 roku życia. Z kolei wyniki badania przeprowadzonego przez autorów niemieckich [131] u dzieci w wieku 4-5 lat, również po immunizacji szczepionką heksawalentną wykazały, że aż 85% pacjentów posiadało stężenie przeciwciał anti-HBs ≥ 10 mIU/ml. Podanie 1 dodatkowej dawki szczepionki stymulowało zwiększenie stężenia przeciwciał swoistych > 100 mIU/ml u 95% badanych, co świadczy o długotrwałym efekcie ochronnym i indukowaniu przez szczepienie pamięci immunologicznej związanej z limfocytami B pamięci [132].

Polisacharydy bakterii otoczkowych należące do tzw. antygenów grasiczniezależnych typu 2 (thymus-independent, TI-2) cechują się brakiem zdolności do aktywacji limfocytów T pomocniczych, słabą indukcją odpowiedzi immunologicznej w okresie noworodkowym, upośledzeniem stymulacji przełączenia klas i wytwarzania przeciwciał u dzieci w wieku < 2 lat. Odpowiedź na antygeny polisacharydowe związana jest z limfocytami B strefy brzeżnej (marginal zone, MZ) śledziony, których liczba w okresie noworodkowym i niemowlęcym jest mała. Najskuteczniejszym przeciwciałem przeciwko antygenom polisacharydowym jest IgG2, którego wytwarzanie, wraz z IgG4, cechuje się w tym czasie ilościowym defektem [133]. Ponadto, limfocyty B u niemowląt posiadają małą ekspresję receptora CD21, zaangażowanego w wiązanie kompleksu składowej C3d dopełniacza i polisacharydu, które indukuje wytwarzanie przeciwciał [134]. Efektywna odpowiedź na polisacharydy obecna jest u dzieci powyżej 2 roku życia.

Szczepionki zawierające koniugaty polisacharydowo-proteinowe stymulują limfocyty B, które migrują do centrów rozrodczych, gdzie proliferują, przechodzą hipermutacje somatyczne, przełączenie klas i różnicują się w plazmocyty, produkujące przeciwciała o wysokim powinowactwie lub w komórki B pamięci. W przeciwieństwie do natywnego polisacharydu PRP Hib, szczepionka skoniugowana wywołuje fizjologicznie odpowiedź jak na antygeny białkowe, zapewnia więc

efektywną odporność poszczepienną u niemowląt i dzieci poniżej 2 lat. Oznaczanie stężenia swoistych przeciwciał przeciwko polisacharydowi PRP *Haemophilus influenzae* po podaniu szczepionki skoniugowanej jest wykładnikiem uzyskanego efektu seroprotekcyjnego i odzwierciedla odpowiedź na antygeny grasiczozależne (thymus-dependent, TD), chociaż nie pozwala bezpośrednio na ocenę pamięci immunologicznej ani awidności przeciwciał [135].

W badanej grupie wartość przeciwciał anti-PRP Hib poniżej minimalnego stężenia ochronnego, wynoszącego 0,15 µg/ml, stwierdzono u 2 dzieci (9%), natomiast stężenie poniżej 1,0 µg/ml, związanego z długotrwałym efektem protekcyjnym (lub osiąganego w wyniku naturalnego zakażenia) odnotowano u 12 dzieci (55%). Spośród wszystkich rodzajów przeciwciał poszczepiennych, niedobór przeciwciał anti-PRP Hib występował więc w najmniej licznej grupie dzieci. U żadnego dziecka nie ujawniono współistnienia niedoboru podklasy IgG2, natomiast u pięciorga spośród 12 dzieci (42%), manifestujących niedobór przeciwciał anti-PRP Hib, stwierdzono niedobór podklasy IgG1. Związek pomiędzy niedoborem podklasy IgG1 i niedostateczną odpowiedzią na szczepienie przeciwko *Haemophilus influenzae* uzasadniają wyniki badania przedstawionego przez Schauer i wsp. [136], którzy stwierdzili obecność 80% antygenowo-swoistych przeciwciał poszczepiennych anti-PRP Hib w zakresie izotypu IgG1, niezależnie od wieku dzieci. Podobnie, dominującą odpowiedzią w obrębie podklasy IgG1 wykazali także autorzy holenderscy w grupie dzieci, które przebyły inwazyjne zakażenie *Haemophilus influenzae* w wyniku niepowodzenia przeprowadzonego wcześniej szczepienia [137].

U dwojga dzieci, u których stężenie przeciwciał przeciwko polisacharydowi Hib mieściło się w zakresie pomiędzy 0,15 µg/ml a 1,0 µg/ml, odnotowano współistniejący niedobór składowej C3 dopełniacza, który może przyczyniać się do upośledzenia odpowiedzi na szczepienie. Poza bowiem stężeniem przeciwciał, dystrybucją w zakresie poszczególnych izotypów i awidnością, także zdolność bakteriobójcza mediowana przez dopełniacz, odgrywa rolę w skutecznej odporności poszczepiennej. W niniejszym badaniu obecność kolonii *Haemophilus influenzae* w drogach oddechowych wykazano u dwojga dzieci, u których stężenie przeciwciał anti-PRP Hib mieściło się w zakresie pomiędzy 0,15 µg/ml a 1,0 µg/ml.

U 5 dzieci z badanej grupy (23%) stwierdzono niedobór wszystkich czterech badanych rodzajów przeciwciał swoistych: anti-HBs, anti-*tetanus toxoid*, anti-*diphtheria toxoid*, anti-PRP Hib. Zmniejszone stężenie trzech rodzajów przeciwciał swoistych odnotowano u 11 dzieci (50%). Stężenie jednego rodzaju przeciwciał swoistych było zmniejszone u kolejnych 4 pacjentów (18%). Oznacza to, że łącznie niedobór odporności poszczepiennej demonstrowało aż 20 dzieci, tj. 91% pacjentów z badanej grupy dzieci z hipogammaglobulinemią, przy czym u 16 dzieci (73%) był to defekt wytwarzania trzech lub czterech rodzajów antygenowo-swoistych przeciwciał (wykres 25). Wyniki tego badania wskazują na związek pomiędzy hipogammaglobulinemią u dzieci i upośledzeniem odpowiedzi poszczepiennej, na co wcześniej wskazali w swojej publikacji Dorsey i Orange [129],

jednak, odnotowany w tej pracy odsetek dzieci manifestujących to zaburzenie odporności jest większy niż podawany przez cytowanych powyżej autorów.

W analizie patomechanizmu tego zjawiska wymaga szczególnego podkreślenia rozpoczęcie immunizacji czynnej przez szczepienia już w okresie noworodkowym i wczesnym okresie niemowlęcym. Niedojrzałość zjawisk adapttywnej odpowiedzi immunologicznej prowadzących do rozwoju długotrwałej pamięci immunologicznej może w tym wieku być uważana za zasadniczą przyczynę upośledzenia wytwarzania przeciwciał poszczepiennych u dzieci. Niedojrzałość mechanizmów efektorowych w pierwszych miesiącach życia i upośledzenie odpowiedzi humoralnej nasila ponadto supresyjna aktywność przezłożyskowo otrzymanych matczyńskich przeciwciał IgG [138].

Należy również w tym miejscu podkreślić, że szczepienia stanowią ekspozycję organizmu dziecka, charakteryzującego się swoistą dynamiką rozwoju układu odpornościowego, na antygeny modulujące profil tej dojrzewającej odpowiedzi immunologicznej. Dominująca w życiu płodowym i zaznaczona w okresie noworodkowym i niemowlęcym aktywność Th2-zależnej odpowiedzi immunologicznej [139] może być między innymi wynikiem zwiększonej aktywności limfocytów T regulatorowych, prowadzącej do supresji odpowiedzi mediowanej przez limfocyty Th1. Ponadto, mechanizmy odporności wrodzonej [140] odgrywające rolę w kształtowaniu rozwoju odpowiedzi adapttywnej mogą przyczyniać się do zaburzenia jej homeostazy. Hipotetycznie konsekwencją wczesnej ingerencji poprzez immunizację czynną w dynamicznie rozwijające się zjawiska immunologiczne może być zwiększona predyspozycja do rozwoju chorób alergicznych [141], których częstość wzrasta obecnie w warunkach zmieniającego się trybu życia, warunków środowiska i zmniejszonej ekspozycji na antygeny drobnoustrojów w myśl „teorii higienicznej” [142,143,144].

Limfocyty T

Heterogeny pod względem patogenez, manifestacji klinicznej oraz rokowania obraz hipogammaglobulinemii w okresie wczesnego dzieciństwa może być sygnałem zarówno genetycznie uwarunkowanego niedoboru odporności, związanego z upośledzeniem wytwarzania przeciwciał, jak i wykładnikiem przemijającego opóźnienia syntezy immunoglobulin. W szczególności patogenez przejściowej hipogammaglobulinemii niemowląt i ewentualna rola wewnętrznego defektu limfocytów T w tym schorzeniu nie została dotąd szczegółowo wyjaśniona. Wyniki opublikowanych badań sugerują zróżnicowane odchylenia w zakresie subpopulacji limfocytów T, mogące stanowić elementy patomechanizmu przejściowej hipogammaglobulinemii we wczesnym okresie życia, takie jak nadmierna odpowiedź limfocytów Th1 i sekrecja IL-12 [145], zwiększona liczba limfocytów T CD8+ [146], jak również zwiększona liczba limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+Foxp3+[147].

Podjęte badania celem scharakteryzowania subpopulacji limfocytów T wykazały występowanie zwiększonego odsetka limfocytów T podwójnie ujemnych wprawdzie w pojedynczych

przypadkach pacjentów z hipogammaglobulinemią, jednak z uwagi na przypisywaną komórkom o fenotypie CD3+CD4-CD8- funkcję immunoregulacyjną, zjawisko to może być jednym z elementów składających się na patomechanizm zmniejszonej biosyntezy przeciwciał. Wspomniana populacja komórek T, podobnie jak limfocyty T CD4+CD25+Foxp3+, limfocyty T gamma/delta czy CD8+CD28- czy komórki NK, wchodzi w interakcje z efektorowymi limfocytami T i moduluje ich działanie [148,149]. Podobnie, hamowaniu podlegać może także odpowiedź limfocytów B na alloantygeny i ich funkcja syntezy immunoglobulin [150].

Analiza immunofenotypowa wykazała ponadto zmniejszenie wartości procentowych zarówno limfocytów CD3+, jak i subpopulacji CD4+ oraz CD8+ u pojedynczych pacjentów. Z kolei zmniejszenie liczby bezwzględnej limfocytów T CD8+ stwierdzono u 10, tj. 45% dzieci z badanej grupy. Sześcioro dzieci prezentujących zmniejszoną liczbę limfocytów T CD8+ stanowili pacjenci powyżej 24 miesiąca życia, a wśród nich u czworga wykazano współistniejący niedobór witaminy D3, który z kolei korelował ze średnią liczbą epizodów zakażeń układu oddechowego. Interesującą hipotezę, która sugeruje związek pomiędzy niedoborem limfocytów T CD8+ i niedostatecznym stężeniem witaminy D3 przedstawił Peneder [151]. Defekt limfocytów T CD8+ skutkuje zaburzeniem kontroli infekcji wirusem Epsteina-Barra (EBV), akumulacją zakażonych, autoreaktywnych limfocytów B, które produkują autoprzeciwciała i dostarczają sygnał kostymulujący oraz naciekaniem narządów docelowych przez autoreaktywne limfocyty T. Zgodnie z tą teorią, niedobór witaminy D zwiększa ryzyko autoimmunizacji, na drodze pogłębienia defektu limfocytów T CD8 i upośledzenia kontroli zakażenia EBV.

W niniejszej pracy uwzględniono także markery różnicowania limfocytów T naiwnych i limfocytów T pamięci, tj. izoformy CD45RA i CD45RO, które nie były dotychczas przedmiotem badań u dzieci z defektami biosyntezy przeciwciał. CD45, będąca jedną z najliczniej obecnych cząsteczek na powierzchni limfocytów, zidentyfikowana została jako przezbłonowa fosfataza tyrozynowa, o kluczowym znaczeniu dla efektywnego przewodzenia sygnału przez receptor antygenowy limfocytów T [152,153]. Ekspresja różnych izoform CD45 zależna jest od poszczególnych subpopulacji komórkowych, stadium ich różnicowania, uprzedniej ekspozycji na antygeny i stanu aktywacji. Limfocyty T naiwne definiowane są jako CD45RA, natomiast limfocyty T, cechujące się ekspresją CD45RO posiadają aktywność limfocytów T pomocniczych i zdolność indukowania sekrecji IgG przez limfocyty B [154]. Obserwowana w badanej grupie dzieci u dziewięciorga spośród nich, a dotychczas nie stwierdzana w literaturze dotyczącej zagadnienia hipogammaglobulinemii, ekspresja izoformy CD45RA na ponad 80% limfocytów T CD4+może być zjawiskiem czynnościowym odgrywającym rolę w patogenezie upośledzonej syntezy przeciwciał. Dominacja izoformy CD45RA w populacji limfocytów T pomocniczych fizjologicznie jest zależna od wieku i kontaktu dojrzewającego układu odpornościowego małego dziecka z antygenami, co wykazano również w analizie ekspresji CD45RA w

badanej grupie dzieci zależnie od ich wieku. W szczególności fakt, że największą wartość procentową w populacji limfocytów T CD4+ stanowiły komórki CD45RA u niemowląt, a równocześnie najmniejszą ekspresję izoformy CD45RO, charakterystycznej dla limfocytów T pamięci stwierdzono u najmłodszego niemowlęcia spośród wszystkich badanych dzieci, odzwierciedlać może właśnie zależność wiekową ekspresji tego antygeny. Równocześnie, zmniejszenie przewodzenia sygnału przez receptor TCR i indukowania sekrecji immunoglobulin przez limfocyty B może nie być tylko wykładnikiem fizjologicznej niewielkiej ekspozycji na antygeny we wczesnym dzieciństwie, ale objawem zaburzenia dojrzewania adapttywnej odpowiedzi immunologicznej, które jest jednak w oparciu o uzyskane wyniki trudne do przewidzenia.

Podobnie, u niemowląt poniżej średniej wartości procentowej wyliczonej dla dzieci z grupy badanej, kształtowała się ekspresja późnego markera aktywacji HLA-DR na komórkach CD3+. Jakkolwiek opierając się na publikacji Huenecke i wsp. [92], którzy obserwowali stopniowe zwiększenie wartości procentowej komórek CD3+HLA-DR+ wraz z wiekiem dzieci, można uznać to zjawisko za odzwierciedlenie procesu dojrzewania układu odpornościowego. Podkreślić jednak należy, że doniesienia w piśmiennictwie wskazują także na zwiększenie odsetka komórek CD3+HLA-DR+ w szeregu schorzeniach z komponentą zapalną, np. w rodzinnej gorączce śródziemnomorskiej (familial Mediterranean fever, FMF) [155], autoimmunizacyjnym zespole limfoproliferacyjnym (autoimmune lymphoproliferative syndrome, ALPS) [156] i w zakażeniach, np. gruźlicy płuc [157]. Interesujące jest, że u dwojga dzieci, u których stwierdzono największą wartość względną limfocytów CD3+, charakteryzujących się ekspresją molekuly HLA-DR, wykazano również największą procentową wartość komórek CD4+CD45RO. Współistnienie dużej ekspresji dwóch różnych markerów aktywacji u tych dzieci odzwierciedla raczej aktywność adaptywnej odpowiedzi immunologicznej, a nie związek z ich wiekiem. Interpretacja stopnia ekspresji markerów aktywacji na limfocytach T, poddana wpływowi szeregu czynników w okresie wczesnodziecięcym, jest w aspekcie możliwego związku przyczynowo – skutkowego z zaburzeniami syntezy przeciwciał trudna.

Elementy odporności wrodzonej

Komórki NK uważane są przede wszystkim za element odporności wrodzonej ze względu na konstytutywną funkcję cytotoksyczną związaną z wydzielaniem m.in. perforyn i granzymów, prowadzących do lizy komórek docelowych. Jednocześnie ekspresja szeregu aktywujących (NKG2D, KIR2DS1) i hamujących (KIR) receptorów warunkujących równowagę pomiędzy efektem cytotoksycznym a tolerancją w stosunku do własnych antygenów oraz zdolność generowania pewnego rodzaju antygenowo-specyficznej pamięci immunologicznej, stanowią cechy wysublimowanych funkcji biologicznych i zacierają granicę pomiędzy odpornością wrodzoną i adaptywną. Indukowanie odpowiedzi zapalnej przez komórki NK, związane z aktywacją limfocytów T i

B, wykazane zostało w doświadczalnej pracy Krebs i wsp. [65], którzy stwierdzili zarówno zwiększenie aktywności limfocytów T CD8+, jak i wytwarzania immunoglobuliny G, a zwłaszcza podklasy IgG1. Autorzy ci wskazali także na możliwą w związku z tymi mechanizmami optymalizację odpowiedzi poszczepiennej. W świetle tych danych w diagnostyce hipogammaglobulinemii oraz ocenie odpowiedzi poszczepiennej uzasadnione jest uwzględnienie roli komórek NK. W analizie wyników cytometrycznej identyfikacji komórek NK we krwi obwodowej w populacji pediatrycznej istotne znaczenie ma wiek pacjenta, na co zwrócili uwagę Gasparoni i wsp. [140], którzy wykazali zmniejszenie aktywności komórek NK u niemowląt, będący odzwierciedleniem stopniowego rozwoju układu odpornościowego w okresie postnatalnym.

Defekty komórek NK spowodowane zaburzeniami ich rozwoju i aktywności mogą manifestować się zróżnicowanym obrazem klinicznym i predyspozycją do nowotworów, autoimmunizacji, reakcji nadwrażliwości oraz zakażeń patogenami wewnątrzkomórkowymi [158], spośród których największe znaczenie kliniczne i prognostyczne ma zakażenie wirusami grupy Herpes [159]. Selektywny niedobór komórek NK (Online Mendelian Inheritance in Man database, OMIM 609981) jest schorzeniem rzadkim i, jak dotąd, opisanym w pojedynczych przypadkach u pacjentów z Irlandii, prezentujących zakażenia układu oddechowego o ciężkim przebiegu klinicznym, związane z etiologią wirusową i u jednego dziecka, u którego nastąpił rozwój zespołu limfoproliferacyjnego w wyniku zakażenia wirusem Epsteina-Barra [160]. W lutym 2012 na łamach czasopisma „The Journal of Clinical Investigation” opublikowane zostały wyniki badań genetycznych przeprowadzonych przez dwa zespoły badawcze u 8 pacjentów irlandzkiego pochodzenia z izolowanej genetycznie populacji, cierpiących na rodzinny niedobór glikokortykosteroidów (familial glucocorticoid deficiency, FGD) współistniejący z niedoborem wzrostu, u których stwierdzono także zwiększoną łamliwość chromosomów i niedobór komórek NK [161,162]. Zidentyfikowano mutację genu *MCM4* (minichromosome maintenance-deficient 4), kodującego część kompleksu MCM2-7, niezbędnego dla prawidłowej replikacji DNA i stabilności genomu.

Niedobór komórek NK jest także typowym wykładnikiem ciężkiego złożonego niedoboru odporności dziedzicznego w sprzężeniu z chromosomem X (SCID-X1) wynikającego z mutacji genu receptora IL-2, kodującego wspólny łańcuch gamma receptorów dla interleukin 2, 4, 7, 9, 15 i 21. Stąd też, brak sygnału z receptora IL-7 (IL-7R) i IL-15R jest przyczyną niedoboru zarówno limfocytów T, jak i komórek NK, odpowiednio, choć defekt ontogenezy tych komórek może być zróżnicowany [163].

W badanej grupie dzieci niedobór komórek NK stwierdzono u jednego pacjenta z hipogammaglobulinemią IgG i współistniejącą astmą, chorującego na nawracające infekcje układu oddechowego. Obecność zarówno limfocytów B, jak i T w badaniu immunofenotypowym pozwoliła u tego chłopca na wykluczenie związanego z chromosomem X ciężkiego złożonego niedoboru

odporności jako przyczyny niedoboru komórek NK. Z kolei prawidłową wartość względną i liczbę bezwzględną komórek NK wykazano u jednego z dzieci, u którego w obrazie klinicznym od wczesnego okresu niemowlęcego dominowały zapalenia płuc i zapalenia oskrzelików wywołane zakażeniem wirusem RS oraz zakażenia przewodu pokarmowego o potwierdzonej etiologii rotawirusowej; ponadto, chłopiec przebył ospę wietrzną w 6 miesiącu życia. Brak korelacji przedstawionych danych klinicznych z wynikami badania immunofenotypowego wydaje się być tylko pozorny. Dane z piśmiennictwa wskazują bowiem z jednej strony na rolę obecnych u pacjenta komórek NK i ich interakcji z komórkami dendrytycznymi w odpowiedzi przeciwwirusowej [164], ale także na znaczenie aktywacji tych komórek we wczesnej fazie zakażenia i wytwarzanego przez nie IFN- γ w indukowaniu immunopatologii narządowej, związanej z zakażeniem wirusowym [165,166]. Zmniejszenie liczby komórek NK w następstwie zakażenia wirusowego może być zjawiskiem wtórnym do aktywacji mechanizmów odpowiedzi adaptywnej zależnej od naturalnych limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+Foxp3+, które przyczyniają się do zahamowania reakcji odporności wrodzonej i związanego z nimi nadmiernego wydzielania IFN- γ i prozapalnych cytokin [167].

Komórki NKT

Rozpoznanie antygenów glikolipidowych prezentowanych przez cząsteczki CD1d komórek APC prowadzi do wydzielania przez komórki NKT cytokin, stymulujących różne rodzaje komórek, jak również aktywacja samych komórek NKT przyczyniać się może do odpowiedzi przeciwko niektórym zakażeniom, jak np. *Borrelia burgdorferi* czy wirusem LCMV [168,169], ale z uwagi na ograniczenie repertuaru TCR, wykorzystując w znacznym stopniu mechanizmy odporności wrodzonej, zależne od rozpoznania własnych antygenów czy aktywacji receptorów TLR.

Wielokierunkowa immunoregulacyjna rola komórek NKT sugeruje również znaczenie tych komórek dla adaptywnej odpowiedzi immunologicznej, a ich interakcje z limfocytami B i wpływ na fenotyp limfocytów T poprzez komórki dendrytyczne, pozwalają na wysunięcie hipotezy o wspomaganie przez komórki NKT odporności humoralnej zależnej od limfocytów T [170,171]. Obniżenie liczby bezwzględnej komórek NKT stwierdzono u pacjentów z pospolitym zmiennym niedoborem odporności, sugerując zarówno związek pomiędzy niedoborem komórek NKT i upośledzeniem wytwarzania przeciwciał, jak i powiązanie pomiędzy zaburzeniem odporności wrodzonej i stąd wynikającą predyspozycją do zakażeń [172]. W badanej grupie dzieci u pięciorga z nich stwierdzono całkowity brak komórek NKT, współistniejący u trojga z nieobecnością we krwi obwodowej niedojrzałych tymocytów o fenotypie CD3+CD4+CD8+, które są prekursorami dla procesu selekcji w grasicy i powstania komórek NKT [173,174].

U czworga spośród badanych dzieci niedobór komórek NKT związany był z hipogammaglobulinemią w zakresie dwóch lub trzech izotypów. Interpretacja tych danych nie może

być jednak jednoznaczna, gdyż współistniejące zaburzenia obserwowane u tych dzieci mogą być niezależnymi wykładnikami wczesnodziecięcej niedojrzałości układu odpornościowego w zakresie odporności wrodzonej i adaptywnej i mieć charakter przemijający.

Warto także w tym miejscu podkreślić, że u dziecka, u którego stwierdzano całkowity brak komórek NK w badaniu immunofenotypowym, równocześnie wykazano najwyższą liczbę i wartość procentową komórek NKT. W interpretacji współistniejących zaburzeń uwzględnić można mechanizm kompensacyjny celem zapewnienia czynnościowej sprawności mechanizmów odporności wrodzonej.

Integryny

Biodystrybucja receptora CR4 dla składowej C3 dopełniacza (CD11c/CD18) na komórkach dendrytycznych w powiązaniu z jego wyjątkową zdolnością do wychwytywania antygenów w tkance chłonnej, wyjaśnia w znacznym stopniu jego zdolność do pobudzania odpowiedzi zależnej od limfocytów T, co zostało wykazane w badaniu Castro i wsp. na modelu zwierzęcym [175]. Autorzy ci sugerują wykorzystanie tej unikalnej właściwości CD11c wzmacniania odpowiedzi w zakresie zarówno komórek T CD4, jak i CD8, w strategii opracowywania efektywnych szczepień. Ponadto, wyniki prac tego samego zespołu badawczego wskazują na efekt adiuwantowy pobudzenia receptora CR4 na komórkach dendrytycznych w stosunku do limfocytów B, aktywowanych poprzez molekuly CD21 lub CD19, który prowadzi do wzmocnienia reakcji w centrach rozrodczych i wytwarzania komórek plazmatycznych [176]. Z kolei receptor CR3 dopełniacza (CD11b/CD18, Mac-1) stymuluje fagocytozę cząstek opłaszczonych przez składową C3b, a proces ten może być modulowany przez drugi mechanizm fagocytozy, jakim jest wiązanie IgG powodujących opsonizację cząstek przez receptory dla fragmentu Fc immunoglobuliny G (FcγR) [177]. Wyniki powyższych badań nie tylko potwierdzają rolę inicjującą odporności wrodzonej w stosunku do mechanizmów odpowiedzi adaptywnej, ale podkreślają rolę receptorów dla dopełniacza w tych wzajemnych wielokierunkowych powiązaniach, a implikując dalej, także przynajmniej pośrednio jako liganda dla CR3 i CR4, także składowej C3.

Zakażenia

Liczba epizodów zakażeń dolnych dróg oddechowych, będących przyczyną przeprowadzenia u dzieci z grupy badanej skriningu immunodiagnostycznego, przebytych w ciągu całego życia wynosiła od 2 do 30 i zależna była od wieku poszczególnych pacjentów. Wprowadzenie wskaźnika średniej liczby infekcji w ciągu 1 roku pozwoliło na ocenę wrażliwości dzieci na zakażenia minimalizując znaczenie wieku. Podobne własne kryteria analizy objawów klinicznych u pacjentów z hipogammaglobulinemią wprowadzili też inni autorzy. Aghamohammadi i wsp. [178] opracowali system punktowy (scoring) uwzględniający nie tylko ilość, ale i ciężkość przebiegu klinicznego zakażeń, na podstawie którego ustalili wskazania do diagnostyki w kierunku pierwotnego niedoboru odporności.

Istotna statystycznie korelacja pomiędzy średnią liczbą epizodów zakażeń układu oddechowego a niedoborem lub niedostatecznym stężeniem 25(OH)D3 w surowicy stwierdzonym u pięciorga pacjentów przemawia za rolą witaminy D3 w indukowaniu mechanizmów przeciwniekcyjnych, które wiązane są przede wszystkim z efektem aktywacji odporności wrodzonej [179,180]. U dzieci z badanej grupy zaburzenie oddziaływania biologicznego witaminy D3 współlistnieje z upośledzeniem odpowiedzi adaptatywnej w postaci hipogammaglobulinemii. Wykazano ponadto, że spośród pięciorga dzieci, u których stężenie 25(OH)D3 było zmniejszone, u trojga z nich zmniejszona była także liczba bezwzględna limfocytów T CD8+ . Należy w tym miejscu podkreślić, że uwzględnienie w kompleksowej ocenie układu odpornościowego u dzieci z defektami biosyntezy przeciwciał badania stężenia 25(OH)D3 ma nowatorski charakter i nie było dotychczas przedmiotem doniesień w literaturze. Stąd też, w niniejszym opracowaniu po raz pierwszy wykazano zależność pomiędzy stężeniem surowiczym 25(OH)D3 a liczbą epizodów infekcji układu oddechowego u pacjentów z hipogammaglobulinemią.

Powołać się w tym miejscu można ponownie na hipotezę wysuniętą przez Pendera [151], w której autor przedstawił powiązania pomiędzy niedoborem witaminy D3, defektem limfocytów T CD8+ i zaburzeniem odpowiedzi immunologicznej na zakażenie EBV, prowadzące do zwiększenia ryzyka schorzeń autoimmunizacyjnych. W patomechanizmie procesu autoimmunizacji uwzględnić należy także rolę antygenów bakterii, takich jak paciorkowce, *Klebsiella* czy *Escherichia coli*, zakażenia którymi mogą nie być skutecznie kontrolowane u dzieci mających w surowicy niedostateczne stężenie 25(OH)D3.

6. WNIOSKI

1. W badanej grupie dzieci z defektami biosyntezy przeciwciał nie stwierdza się nieprawidłowości w zakresie limfopojezy szpikowej ani tymopojezy, natomiast dominują zaburzenia dojrzewania subpopulacji limfocytów B i T krwi obwodowej, zarówno na wczesnych, jak i na terminalnych etapach tego procesu. Ekspansja czynnościowo niedojrzałych populacji komórkowych, stanowiąc zasadniczy element patomechanizmu hipogammaglobulinemii, implikuje pierwszorzędowną pozycję analizy immunofenotypowej w diagnostyce zaburzeń wytwarzania przeciwciał u dzieci
2. Dominującym zaburzeniem odpowiedzi immunologicznej związanej z przeciwciałami w badanej grupie dzieci jest upośledzenie wytwarzania antygenowo-swoistych przeciwciał poszczepiennych przeciwko antygenom białkowym i polisacharydowym. Defekt ten charakteryzuje wszystkie rodzaje hipogammaglobulinemii, dlatego też ocena odporności poszczepiennej stanowi uniwersalny wykładnik adaptywnej odpowiedzi immunologicznej
3. Spośród zaburzeń wrodzonej odpowiedzi immunologicznej w badanej grupie dzieci najczęściej stwierdza się niedobór składowej C3 dopełniacza, współistniejący ze złożonym defektem odporności humoralnej. Ocena składowej C3 dopełniacza powinna stanowić niezbędny element skriningu immunodiagnostycznego u dzieci z hipogammaglobulinemią
4. Niedostateczne stężenie witaminy D3 wpływa na przebieg kliniczny hipogammaglobulinemii u dzieci i związane jest z większą liczbą epizodów infekcji układu oddechowego. Efekt ten jest niezależny od rodzaju defektu wytwarzania przeciwciał i nie jest związany z zaburzeniami w zakresie subpopulacji limfocytów krwi obwodowej
5. Defekty biosyntezy przeciwciał u dzieci nie są ograniczone wyłącznie do hipogammaglobulinemii, ale obejmują spektrum zaburzeń humoralnych i komórkowych. Wykorzystany zestaw badań diagnostycznych pozwala na specyficzną i szczegółową ocenę elementów odporności wrodzonej i adaptywnej, dzięki czemu może zostać zaproponowany jako schemat immunodiagnostyczny u dzieci z hipogammaglobulinemią
6. Kompleksowa analiza kliniczna i immunodiagnostyczna pozwala na wnikliwą ocenę układu odpornościowego w aspekcie odpowiedzi na antygeny drobnoustrojów i predyspozycji do zakażeń, umożliwia wykluczenie / podejrzenie głębokich zaburzeń na drodze różnicowania

limfocytów. Znaczenie prognostyczne analizy jest ograniczone i nie pozwala na definitywne różnicowanie pomiędzy przejściowym i trwałym defektem wytwarzania przeciwciał ani na określenie czasu ewentualnej spontanicznej immunokorekcji

7. STRESZCZENIE

Defekty biosyntezy przeciwciał są najliczniej reprezentowaną kategorią pierwotnych niedoborów odporności o zróżnicowanej immunopatologii, manifestacji klinicznej i podłożu genetycznym. Stąd też hipogammaglobulinemia może być wykładnikiem nieokreślonego zaburzenia wytwarzania immunoglobulin, nie spełniającego kryteriów diagnostycznych żadnego z pierwotnych niedoborów odporności, może cechować łagodnie przebiegający lub nawet asymptomatyczny niedobór IgA lub podklas IgG, ale także stanowić sygnał ciężkiego upośledzenia odporności humoralnej w postaci agammaglobulinemii lub pospolitego zmiennego niedoboru odporności. Defekt produkcji antygenowo-swoistych przeciwciał, niezbędnych dla prawidłowej adaptywnej odpowiedzi immunologicznej na zakażenia jest zasadniczym patomechanizmem odpowiedzialnym za manifestację kliniczną. Wiek pacjenta, genetyczne czynniki modyfikujące oraz uwarunkowania środowiskowe mogą dodatkowo determinować przebieg choroby u dzieci dotkniętych tymi zaburzeniami odporności. Postęp immunogenetyki umożliwił identyfikację szeregu defektów genetycznych i wgląd w patomechanizm wielu zaburzeń syntezy przeciwciał, ale w części z nich nie został on dotychczas wyjaśniony. W celu wczesnego, precyzyjnego ustalenia ostatecznego rozpoznania pierwotnego niedoboru odporności związanego z defektem biosyntezy przeciwciał niezbędna jest znajomość mechanizmów immunopatologicznych zachodzących podczas różnicowania i dojrzewania limfocytów oraz oddziaływania na te procesy czynników immunomodulujących. Immunofenotypowanie metodą cytometrii przepływowej umożliwia ocenę różnicowania i dojrzewania limfocytów oraz identyfikację zaburzeń biologii i homeostazy tych komórek w pierwotnych niedoborach odporności. Rozwój limfocytów B, od stadium migrujących ze szpiku limfocytów B niedojrzałych, cechujących się obecnością związanego z receptorem komórek B antygenem CD19 oraz niską ekspresją antygenem CD21, poprzez limfocyty B przejściowe o fenotypie CD38^{hi}IgM^{hi} prowadzi do powstania dojrzałych limfocytów B naiwnych. Dalszy rozwój tych komórek jest źródłem limfocytów B pamięci, których markerem jest antygen CD27, a ekspresja immunoglobulin powierzchniowych pozwala na wyróżnienie limfocytów B pamięci typu non-switched oraz typu switched, wiodących do powstania plazmablastów CD38+IgM- wydzielających przeciwciała o największym powinowactwie do antygeny. W rozwoju limfocytów T wyróżnić można wczesny okres limfopoezy szpikowej i powstania progenitorów migrujących do grasicy. Ekspresja antygenów CD3, CD4 i CD8 pozwala na wyróżnienie kolejno etapów rozwoju tymocytów potrójnie ujemnych, podwójnie ujemnych CD3+CD4-CD8-, podwójnie dodatnich CD3+CD4+CD8+ do stadium niedojrzałych limfocytów T CD3+CD4+ i CD3+CD8+, przemieszczających się do przedziału krwi obwodowej. Ekspresja izoform fosfatazy tyrozynowej CD45RA i CD45RO pozwala na wyróżnienie wśród dojrzałych limfocytów T komórek naiwnych i pamięci. W analizie odpowiedzi immunologicznej związanej z

wytwarzaniem przeciwciał należy wziąć pod uwagę także stężenie podklas IgG oraz przeciwciał poszczepiennych przeciwko toksoidom i antygenom polisacharydowym, jako najbardziej swoistego wykładnika odpowiedzi immunologicznej na antygeny. W aspekcie powiązań czynnościowych pomiędzy odpornością wrodzoną i adaptywną znaczenia nabiera także ocena immunofenotypowa komórek NK i NKT, a spośród czynników humoralnych – składowych układu dopełniacza. Immunomodulacyjna rola witaminy D3, związana z aktywacją białek przeciwbakteryjnych – katelicydyny i defensyn oraz wpływ na adaptywną odpowiedź immunologiczną stanowią o znaczeniu badania stężenia 25(OH)D3 u dzieci chorujących na nawracające infekcje układu oddechowego.

Celem pracy była kompleksowa ocena elementów wrodzonej i adaptywnej odpowiedzi immunologicznej u dzieci z niedoborami wytwarzania przeciwciał, chorujących na nawracające infekcje układu oddechowego, pozwalająca na precyzyjne ustalenie mechanizmów immunopatologicznych stwierdzanych zaburzeń układu odpornościowego. Założenie to uwzględniało zarówno ocenę procesu różnicowania i dojrzewania subpopulacji limfocytów krwi obwodowej, jak i analizę charakteru i stopnia zaburzeń biosyntezy przeciwciał, a także wpływ elementów odporności wrodzonej i czynników immunomodulujących na przebieg kliniczny hipogammaglobulinemii. Celem tej wielokierunkowej analizy immunodiagnostycznej było także prognozowanie dotyczące spontanicznej immunokorekcji defektów wytwarzania przeciwciał.

Badaniem objęto 22 dzieci w wieku od 8 do 61 miesięcy, chorujących na nawracające infekcje układu oddechowego, u których na podstawie skriningu immunodiagnostycznego ujawniono niedobór jednego lub więcej izotypów immunoglobulin, oznaczanych metodą immunoturbidymetryczną. Szczegółowy wywiad chorobowy z uwzględnieniem liczby epizodów zakażeń układu oddechowego, jak i pozapłucnej manifestacji choroby oraz badanie kliniczne i ocena rozwoju somatycznego w odniesieniu do norm dla płci i wieku poprzedzały badania laboratoryjne. Analizę defektów biosyntezy przeciwciał przeprowadzono w oparciu o badanie stężenia podklas IgG metodą nefelometryczną i antygenowo-swoistych przeciwciał poszczepiennych przeciwko toksoidom błoniczemu i tężcowemu oraz antygenowi powierzchniowemu wirusa zapalenia wątroby typu B, jak i przeciwko polisacharydowi otoczkowemu *Haemophilus influenzae*, do oznaczenia których zastosowano metody immunoenzymatyczne. Immunofenotypowej oceny procesu dojrzewania populacji limfocytów krwi obwodowej dokonano za pomocą cytometrii przepływowej z zastosowaniem specyficznych antygenów różnicowania. W zakresie odpowiedzi wrodzonej badano stężenie składowych C3 i C4 dopełniacza metodą immunoturbidymetryczną oraz uwzględniono w immunofenotypowaniu metodą cytometrii przepływowej populację komórek NK i NKT. Spośród czynników immunomodulujących metodą radioimmunologiczną oznaczono stężenie 25(OH)-witaminy D3 w surowicy. Badanie mikrobiologiczne wydzielin z dróg oddechowych lub płwociny i

identyfikacja bakteryjnych patogenów w układzie oddechowym było kolejnym elementem tej kompleksowej oceny pacjentów z hipogammaglobulinemią.

Analiza wywiadu chorobowego ujawniła, że najczęstszym problemem zdrowotnym dzieci z hipogammaglobulinemią były infekcje układu oddechowego, a wskaźnik średniej liczby epizodów zakażeń dolnych dróg oddechowych w ciągu 1 roku, minimalizujący wpływ wieku badanych dzieci, wynosił od 2 do 5. Spośród czynników infekcyjnych w posiewach wydzieliny z dróg oddechowych stwierdzano patogeny bakteryjne charakterystyczne dla niedoborów odporności z grupy defektów wytwarzania przeciwciał, jak *Staphylococcus aureus* i bakterie otoczkowe - *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae*. Najczęściej współistniały z hipogammaglobulinemią choroby alergiczne, szczególnie alergія pokarmowa. Powikłania poszczepienne nie należały do obrazu klinicznego choroby w badanej grupie dzieci. Rozwój somatyczny dzieci z badanej grupy mieścił się w granicach normy określonej dla wieku i płci w populacji polskiej. W szczegółowej ocenie odpowiedzi immunologicznej związanej z przeciwciałami wykazano niedobór podklasy IgG1 występujący u 50% dzieci z hipogammaglobulinemią. Dominującym zaburzeniem odporności humoralnej było upośledzenie odpowiedzi poszczepiennej zarówno na antygeny białkowe, jak i polisacharydowe. Niedobór antygenowo-swoistych przeciwciał przeciwko toksoidowi tężcowemu stwierdzono u 73%, a błoniczemu u 68% dzieci, zaś przeciwko antygenowi powierzchniowemu wirusa wzwb u 59% pacjentów z badanej grupy. Niedostateczne wytwarzanie przeciwciał przeciwko polisacharydowemu antygenowi otoczkowemu *Haemophilus influenzae* prezentowało 55% dzieci z hipogammaglobulinemią. Skojarzony defekt wytwarzania podklasy IgG1, odpowiedzi poszczepiennej na antygeny białkowe ze współistniejącym niedoborem składowej C3 dopełniacza występował najczęściej w grupie dzieci z niedoborem wyłącznie klasy głównej IgG. Charakterystyczny immunofenotyp obejmował zwiększony odsetek populacji komórkowych o cechach czynnościowej niedojrzałości - limfocytów B przejściowych CD38^{hi}IgM^{hi} oraz limfocytów T podwójnie ujemnych CD3+CD4-CD8-, świadcząc równocześnie o efektywnej limfopoezie szpikowej i tymopoezie. Współistniejące z hipogammaglobulinemią akumulacja plazmablastów we krwi obwodowej i zwiększona ekspresja markerów aktywacji limfocytów T, HLA-DR i CD45RO, wynikać mogą ze stanu dysfunkcji komórkowych elementów układu odpornościowego u dzieci z badanej grupy. Immunomodulujący wpływ witaminy D3 odzwierciedla większa liczba epizodów zakażeń dolnych dróg oddechowych wśród dzieci, u których stwierdzono niedostateczne stężenie 25(OH)D3 w surowicy, niezależnie od defektu wytwarzania przeciwciał i zaburzeń subpopulacji limfocytów. Przeprowadzona wielokierunkowa analiza kliniczna i immunodiagnostyczna pozwala na podejrzenie lub wykluczenie pierwotnych niedoborów odporności związanych z głębokimi zaburzeniami wytwarzania przeciwciał, ale nie pozwala na definitywne prognozowanie w zakresie spontanicznej immunokorekcji.

8. SUMMARY

Complex clinical and immunodiagnostic evaluation of children with antibody biosynthesis defects

Antibody biosynthesis defects are the most prevalent category of primary immune deficiencies in diverse immunopathology, clinical manifestation and genetic background. Hence, hypogammaglobulinemia may be a hallmark of an undefined disorder of antibody production, failing to fulfill the diagnostic criteria of all primary immune deficiencies, and may characterize mild or even asymptomatic IgA or IgG subclass deficiencies, as well as signalling a severe impairment in humoral immunity occurring in agammaglobulinemia or in common variable immune deficiency. The defective synthesis of antigen-specific antibodies, which is indispensable for an effective adaptive immune response to infections, is a fundamental pathomechanism which leads to clinical manifestation. The age of the patient, modifying genetic factors as well as environmental conditions may constitute further determinants of the clinical course of the disease in children affected with antibody production defects. Advances in molecular techniques have enabled the identification of several genetic defects and an insight into the pathomechanism of numerous disorders of antibody synthesis, even though in a number of them it has not been totally explained. For the purposes of an early and precise establishing of a definitive diagnosis of the primary immune deficiency associated with antibody biosynthesis defect, knowledge about the immunopathological mechanisms taking place in the differentiation and maturation of lymphocytes and in the immunomodulatory factors influencing these processes is necessary. Flow cytometric immunophenotyping allows for the evaluation of lymph cell subsets differentiation and maturation as well as for the identification of impairment of biology and homeostasis of these cells in primary immune deficiencies. The development of B lymphocytes arises out of the migration stage of immature B lymph cells from the bone marrow and is characterized by the presence of the CD19 antigen associated with the B cell receptor as well as by a low expression of the CD21 antigen, through the transitional B cells which show the CD38^{hi}IgM^{hi} phenotype, up to the formation of the mature naïve B lymphocytes. Further development of these cells gives rise to the memory B cell subset, of which the CD27 antigen is a surrogate marker, and the surface immunoglobulin expression allows for the distinguishing between non-switched and switched B cell pools, leading to the formation of CD38+IgM- plasmablasts which secrete antibodies with the highest affinity to antigens. The development of T lymphocytes comprises the early stage of bone marrow lymphopoiesis and the formation of progenitors migrating to the thymus. The expression of CD3, CD4 and CD8 antigens outlines the consecutive

developmental stages of triple negative CD3-CD4-CD8-, double negative CD3+CD4-CD8- and double positive CD3+CD4+CD8+ thymocytes by the stage of immature CD3+CD4+ or CD3+CD8+ T cells, translocating to the peripheral blood compartment. The expression of CD45RA and CD45RO isoforms of the tyrosine phosphatase allows for further differentiation between mature naïve and memory T cell subsets.

In the evaluation of the immune response associated with antibody production, similar concentrations of IgG subclasses and of postvaccination antibodies against toxoids and polysaccharide antigens should be taken into consideration as the most specific expression of the immune response to antigens. In terms of functional relationships between innate and the adaptive immune responses, the immunophenotyping of NK and NKT cells similarly complement components among the humoral factors are of relevance. The immunomodulatory role of vitamin D3, associated with the activation of antibacterial proteins, cathelicidin and defensins as well as the effect on the adaptive immune response makes the examination of 25(OH)D3 concentration in children suffering from recurrent respiratory tract infections reasonable.

The purpose of this study was to conduct a complex evaluation of the elements of innate and the adaptive immune responses in children with antibody production deficiencies and who suffered from recurrent respiratory tract infection, allowing the precise establishing of the immunopathological mechanisms governing the observed disorders of the immune system. The objective here included both the evaluation of the processes of differentiation and maturation of the lymph cell subpopulations and the analysis of the character and the degree of antibody biosynthesis impairment, as well as the influence of the elements of innate immunity and immunomodulatory factors on the clinical course of hypogammaglobulinemia. The additional purpose of these multidirectional immunodiagnostic procedures was also the anticipation of the spontaneous immunocorrection of the antibody production defects.

Twenty-two children, aged from 8 to 61 months, suffering from recurring infections of the airway, and in whom immunodiagnostic screening with the use of the immunoturbidimetric method revealed deficiency of one or more immunoglobulin isotypes, were included in the study. A detailed anamnesis which took into account the number of respiratory tract infection episodes, as well as the extrapulmonary manifestation of the disease and clinical examination and evaluation of the somatic development in relation to age- and gender- matched limits preceded the laboratory testing. The analysis of the antibody biosynthesis defects was carried out based on the examination of the IgG subclass concentrations, making use of nephelometric assay and of the antigen-specific postvaccination antibodies against tetanus and diphtheria toxoids and against the surface antigen of the hepatitis B virus, as well as against the capsular polysaccharide *Haemophilus influenzae* antigen, which were assessed using immunoenzymatic methods. Immunofenotypic evaluation of the

peripheral blood lymphocytes maturation process was conducted by flow cytometry with the use of antibodies against specific antigens. In terms of innate immunity, the concentration of complement C3 and C4 components were examined, employing the immunoturbidimetric method; furthermore NK and NKT cell populations were investigated during flow cytometric immunophenotyping. Among the immunomodulatory factors the concentration of 25(OH)-vitamin D3 in serum was studied with the use of radioimmunoassay. The microbiological examination of sputum or discharge from the lower airways for the identification of bacterial pathogens in the respiratory tract was the additional element of this complex evaluation of patients with hypogammaglobulinemia.

Analysis of the personal histories of the patients revealed that the respiratory tract infections were the most common health problem of the children with hypogammaglobulinemia involved in this study, and the index of the median number of the lower airways infections episodes in one year, minimizing the effect of the children's age, ranged from 2 to 5. As far as the infectious factors were concerned, the cultures of the material from the airways showed bacterial pathogens characteristic of immune deficiencies with antibody production defects, such as *Staphylococcus aureus* and encapsulated bacteria – *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. Allergic diseases, particularly the alimentary allergy were the predominating comorbidities. The postvaccination adverse reactions were not a part of the clinical manifestation of hypogammaglobulinemia in the group of children studied. The somatic development of children from the study group was within the age- and gender-matched normal limits for the Polish population. A detailed evaluation of the immune response associated with the antibodies of the IgG1 subclass deficiency was revealed in 50% of the children with hypogammaglobulinemia. The predominating disorder of the humoral immunity was a defective response to vaccine protein and polysaccharide antigens. A deficiency of antigen-specific antibodies against the tetanus toxoid was assessed in 73% of the children and against the diphtheria toxoid in 68% of the children studied, whereas assessment of antigen-specific antibodies against the surface antigen of the hepatitis B virus revealed deficiency in 59% of patients. Defective production of antibodies against the polysaccharide capsular *Haemophilus influenzae* antigen was presented by 55% of the hypogammaglobulinemic children. A combined deficiency of IgG1 subclass production, a postvaccination response to protein antigens, coexisting with impaired C3 component of complement synthesis occurred predominantly in the group of children with an exclusive defect of IgG isotype production. Characteristic immunophenotype included the increased proportion of functionally immature lymphocyte populations – CD38^{hi}IgM^{hi} transitional B cells and double negative CD3+CD4-CD8- T cells, which was also evidence of effective bone marrow lymphopoiesis and thymopoiesis, respectively. Accumulation of plasmablasts in the peripheral blood as well as an increased expression of T lymph cell activation markers, HLA-DR and CD45RO accompanying hypogammaglobulinemia, possibly result from a dysfunctional state of cellular elements of the

immune system in the children studied. The immunomodulatory effect of vitamin D3 reflects the increased number of the respiratory tract infection episodes among children, in whom insufficient 25(OH)D3 serum concentration was revealed, independently either of the antibody production defect or lymph cell subsets abnormalities. This multidirectional clinical and immunodiagnostic analysis allows for the suspicion or exclusion of primary immune deficiencies associated with profound antibody biosynthesis defects. However, it does not enable a definitive prognosis in terms of spontaneous immunocorrection.

9. PIŚMIENICTWO

1. International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies, Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Hammartröm L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck J, Roifman C, Seger R, Wedgwood J. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(6):1161-1178
2. Urschel S, Kayikci L, Wintergerst U, Notheis G, Jansson A, Belohradsky BH. Common variable immunodeficiency disorders in children: delayed diagnosis despite typical clinical presentation. *J Pediatr* 2009;154(6):888-894
3. de Vries E. Immunological investigations in children with recurrent respiratory infections. *Paediatr Respir Rev* 2001;2(1):32-36
4. de Vries E; Clinical Working Party of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Patient-centred screening for primary immunodeficiency: a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists. *Clin Exp Immunol* 2006;145(2):204-214
5. Driessen G, van der Burg M. Educational paper: primary antibody deficiencies. *Eur J Pediatr* 2011;170(6):693-702
6. Modell F, Puente D, Modell V. From genotype to phenotype. Further studies measuring the impact of a Physician Education and Public Awareness Campaign on early diagnosis and management of primary immunodeficiencies. *Immunol Res* 2009;44(1-3):132-149
7. Modell V, Gee B, Lewis DB, Orange JS, Roifman CM, Routes JM, Sorensen RU, Notarangelo LD, Modell F. Global study of primary immunodeficiency diseases (PI)-diagnosis, treatment, and economic impact: an updated report from the Jeffrey Modell Foundation. *Immunol Res* 2011;51(1):61-70
8. Lindegren ML, Kobrynski L, Rasmussen SA, Moore CA, Grosse SD, Vanderford ML, Spira TJ, McDougal JS, Vogt RF Jr, Hannon WH, Kalman LV, Chen B, Mattson M, Baker TG, Khoury M. Applying public health strategies to primary immunodeficiency diseases: a potential approach to genetic disorders. *MMWR Recomm Rep* 2004;53(RR-1):1-29
9. Gathmann B, Grimbacher B, Beauté J, Dudoit Y, Mahlaoui N, Fischer A, Knerr V, Kindle G; ESID Registry Working Party. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: results 2006-2008. *Clin Exp Immunol* 2009;157(Suppl 1):3-11
10. De Vries E, Driessen G. Primary immunodeficiencies in children: a diagnostics challenge. *Eur J Pediatr* 2011; 170(2):169-177
11. Stiehm RE. The four most common pediatric immunodeficiencies. *Adv Exp Med Biol* 2007;601:15-26

12. Stiehm ER. The four most common pediatric immunodeficiencies. *J Immunotoxicol* 2008;5(2):227-234
13. Fried AJ, Bonilla FA. Pathogenesis, diagnosis, and management of primary antibody deficiencies and infections. *Clin Microbiol Rev* 2009;22(3):396-414
14. Kainulainen L, Nikoskelainen J, Vuorinen T, Tevola K, Liippo K, Ruuskanen O. Viruses and bacteria in bronchial samples from patients with primary hypogammaglobulinemia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(4 Pt 1):1199-1204
15. Kainulainen L, Vuorinen T, Rantakokko-Jalava K, Osterback R, Ruuskanen O. Recurrent and persistent respiratory tract viral infections in patients with primary hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126(1):120-126
16. Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952;9:722-728
17. van der Burg M, van Zelm MC, Driessen GJA, van Dongen JJM. New frontiers of primary antibody deficiencies. *Cell Mol Life Sci* 2012;69(1):59-73
18. Conley ME, Dobbs AK, Farmer DM, Kilic S, Paris K, Grigoriadou S, Coustan-Smith E, Howard V, Campana D. Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annu Rev Immunol* 2009;27:199-227
19. Sriram G, Martinez JA, McCabe ER, Liao JC, Dipple KM. Single-gene disorders: what role could moonlighting enzymes play? *Am J Hum Genet* 2005;76(6):911-924
20. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol* 2010; 162(2):271-279
21. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, Vogt RF Jr, Marti GE, Rawstron AC, Van Zelm MC, Van Dongen JJ, Johnsen HE, Klein B, Orfao A; Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78(Suppl 1):47-60
22. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008;112(5):1570-1580
23. Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998;188(9):1679-1689
24. Zandvoort A, Timens W. The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clin Exp Immunol* 2002;130(1):4-11
25. Fecteau JF, Néron S. CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J Immunol* 2003;171(9):4621-4629

26. Good KL, Avery DT, Tangye SG. Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J Immunol* 2009;182(2):890-901
27. Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, Berek C, Hiepe F, Manz R, Radbruch A, Dörner T. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* 2005;105(4):1614-1621
28. Gameiro J, Nagib P, Verinaud L. The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. *Cell Adh Migr* 2010;4(3):382-390
29. Yang Q, Bell JJ, Bhandoola A. T-cell lineage determination. *Immunol Rev* 2010;238(1):12-22
30. Saito T, Watanabe N. Positive and negative thymocyte selection. *Crit Rev Immunol* 1998;18(4):359-370
31. Fink PJ, Hendricks DW. Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality. *Nat Rev Immunol* 2011;11(8):544-549
32. Schatorjé EJ, Gemen EF, Driessen GJ, Leuvenink J, van Hout RW, de Vries E. Pediatric reference values for the peripheral T-cell compartment. *Scand J Immunol* 2012;75(4):436-444
33. Hermiston ML, Xu Z, Majeti R, Weiss A. reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases. *J Clin Invest* 2002; 109(9):9-14
34. Hermiston ML, Zheng X, Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling threshold in immune cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:107-137
35. Tchilian EZ, Gil J, Navarro ML, Fernandez-Cruz E, Chapel H, Misbach S, Ferry B, Renz H, Schwinzer R, Beverly PCL. Unusual case presentations associated with the CD45 C77G polymorphism. *Clin Exp Immunol* 2006; 146(3):448-454
36. Altin JG, Sloan EK. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol* 1997; 75(5):430-445
37. Early E, Reen DJ. Rapid conversion of naïve to effector T cell function counteracts diminished primary human newborn T cell responses. *Clin Exp Immunol* 1999; 116(3): 527-533
38. Kawiak J, Rokicka-Milewska R, Zeman K, Hoser G, Derulska G, Fornalczyk-Wachowska E, Gosk B, Kantorski J, Pacholska J, Tchórzewski H, et al. Peripheral blood leukocytes and lymphocyte subpopulations as determined by flow cytometric measurements in healthy children. *Folia Histochem Cytobiol* 1995;33(1):33-38
39. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WC, Groeneveld K, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1997;130(3):388-393

40. de Vries E, de Bruin-Versteeg S, Comans-Bitter WM, van Dongen JJ, de Groot R, Boerma GJ, Lotgering FK. Longitudinal follow-up of blood lymphocyte subpopulations from birth to 1 year of age. *J Pediatr* 1998;133(4):586-588
41. de Vries E, de Bruin-Versteeg S, Comans-Bitter WM, de Groot R, Hop WC, Boerma GJ, Lotgering FK, van Dongen JJ. Longitudinal survey of lymphocyte subpopulations in the first year of life. *Pediatr Res* 2000;47(4 Pt 1):528-537
42. van Gent R, van Tilburg CM, Nibbelke EE, Otto SA, Gaiser JF, Janssens-Korpela PL, Sanders EA, Borghans JA, Wulffraat NM, Bierings MB, Bloem AC, Tesselaar K. Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments. *Clin Immunol* 2009;133(1):95-107
43. Piątoś B, Wolska-Kuśnierz B, Pac M, Siewiera K, Gałkowska E, Bernatowska E. B cell subsets in healthy children: reference values for evaluation of B cell maturation process in peripheral blood. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78(6):372-381
44. Ozkan H, Atlihan F, Genel F, Targan S, Gunvar T. IgA and/or IgG subclass deficiency in children with recurrent respiratory infections and its relationship with chronic pulmonary damage. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2005;15(1):69-74
45. Falconer AE, Carson R, Johnstone R, Bird P, Kehoe M, Calvert JE. Distinct IgG1 and IgG3 subclass responses to two streptococcal protein antigens in man: analysis of antibodies to streptolysin O and M protein using standardized subclass-specific enzyme-linked immunosorbent assays. *Immunology* 1993;79(1):89-94
46. Michaelsen TE, Sandlie I, Bratlie DB, Sandin RH, Ihle O. Structural difference in the complement activation site of human IgG1 and IgG3. *Scand J Immunol* 2009;70(6):553-564
47. Thommesen JE, Michaelsen TE, Løset GA, Sandlie I, Brekke OH. Lysine 322 in the human IgG3 C(H)2 domain is crucial for antibody dependent complement activation. *Mol Immunol* 2000;37(16):995-1004
48. Jefferis R, Kumararatne DS. Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clin Exp Immunol* 1990;81(3):357-367
49. Jefferis R, Lefranc MP. Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity. *MAbs* 2009;1(4):332-338
50. Dard P, Lefranc MP, Osipova L, Sanchez-Mazas A. DNA sequence variability of IGHG3 alleles associated to the main G3m haplotypes in human populations. *Eur J Hum Genet* 2001;9(10):765-772
51. Karaca NE, Karadeniz C, Aksu G, Kutukculer N. Clinical and laboratory evaluation of periodically monitored Turkish children with IgG subclass deficiencies. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2009;27(1):43-48

52. Kutukculer N, Karaca NE, Demircioglu O, Aksu G. Increases in serum immunoglobulins to age-related normal levels in children with IgA and/or IgG subclass deficiency. *Pediatr Allergy Immunol* 2007;18(2):167-173
53. Armenaka M, Grizzanti J, Rosenstreich DL. Serum immunoglobulins and IgG subclass levels in adults with chronic sinusitis: evidence for decreased IgG3 levels. *Ann Allergy* 1994;72(6):507-514
54. Maguire GA, Kumararatne DS, Joyce HJ. Are there any clinical indications for measuring IgG subclasses? *Ann Clin Biochem* 2002;39(Pt 4):374-377
55. Buckley RH. Immunoglobulin G subclass deficiency: fact or fancy? *Curr Allergy Asthma Rep* 2002;2(5):356-360
56. Madaliński K. Przetrawanie odporności po szczepieniach przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B. *Przegl Epidemiol* 2002;56:605-613
57. Keating GM, Noble S. Recombinant hepatitis B vaccine (Engerix-B): a review of its immunogenicity and protective efficacy against hepatitis B. *Drugs* 2003;63(10):1021-1051
58. Oliveira JB, Fleisher TA. Laboratory evaluation of primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(2 Suppl 2):S297-305
59. Plotkin SA. Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity. *Clin Infect Dis* 2008;47(3):401-409
60. Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17(7):1055-1065
61. Adderson EE. Antibody repertoires in infants and adults: effects of T-independent and T-dependent immunizations. *Springer Semin Immunopathol* 2001;23(4):387-403
62. Ljunggren HG, Karre K. In search of the „missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990;11:237-244
63. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011;331(6013):44-49
64. Martín-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 2004;5(12):1260-1265
65. Krebs P, Barnes MJ, Lampe K, Whitley K, Bahjat KS, Beutler B, Janssen E, Hoebe K. NK-cell-mediated killing of target cells triggers robust antigen-specific T-cell-mediated and humoral responses. *Blood* 2009;113(26):6593-6602

66. Moretta A, Marcenaro E, Sivori S, Della Chiesa M, Vitale M, Moretta L. Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. *Trends Immunol* 2005;26(12):668-6675
67. Sun JC, Lanier LL. Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? *Eur J Immunol* 2009;39(8):2059-2064
68. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 2009;457(7229):557-561
69. Kuijpers TW, Baars PA, Dantin C, van den Burg M, van Lier RA, Roosnek E. Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood* 2008;112(3):914-915
70. Eissens DN, Spanholtz J, van der Meer A, van Cranenbroek B, Dolstra H, Kwekkeboom J, Preijers FW, Joosten I. Defining early human NK cell developmental stages in primary and secondary lymphoid tissues. *PLoS One* 2012;7(2):e30930
71. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol* 2005;23:877-900
72. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, Bendelac A. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol* 1999;163(9):4647-4650
73. Huang ZY, Hunter S, Chien P, Kim MK, Han-Kim TH, Indik ZK, Schreiber AD. Interaction of two phagocytic host defense systems: Fcγ receptors and complement receptor 3. *J Biol Chem* 2011;286(1):160-168
74. White AL, Tutt AL, James S, Wilkinson KA, Castro FV, Dixon SV, Hitchcock J, Khan M, Al-Shamkhani A, Cunningham AF, Glennie MJ. Ligation of CD11c during vaccination promotes germinal centre induction and robust humoral responses without adjuvant. *Immunology* 2010;131(1):141-151
75. Castro FV, Tutt AL, White AL, Teeling JL, James S, French RR, Glennie MJ. CD11c provides an effective immunotarget for the generation of both CD4 and CD8 T cell responses. *Eur J Immunol* 2008;38(8):2263-2273
76. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010;11(9):785-797
77. Degn SE, Jensenius JC, Thiel S. Disease-causing mutations in genes of the complement system. *Am J Hum Genet* 2011;88(6):689-705
78. Ram S, Lewis LA, Rice PA. Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. *Clin Microbiol Rev* 2010;23(4):740-780

79. Wallis R, Dodds AW, Mitchell DA, Sim RB, Reid KB, Schwaebler WJ. Molecular interactions between MASP-2, C4, and C2 and their activation fragments leading to complement activation via the lectin pathway. *J Biol Chem* 2007;282(11):7844-7851
80. Agarwal S, Ferreira VP, Cortes C, Pangburn MK, Rice PA, Ram S. An evaluation of the role of properdin in alternative pathway activation on *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Immunol* 2010;185(1):507-516
81. Gombart AF. The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. *Future Microbiol* 2009;4(9):1151-1165
82. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, Tavera-Mendoza L, Lin R, Hanrahan JW, Mader S, White JH. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* 2004;173(5):2909-2912
83. White JH. Vitamin D as an inducer of cathelicidin antimicrobial peptide expression: past, present and future. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121(1-2):234-238
84. Hewison M. Antibacterial effects of vitamin D. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7(6):337-345
85. Adams JS, Hewison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4(2):80-90
86. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defense. *Nat Rev Immunol* 2007;7(3):179-190
87. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zügel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL. Toll-like receptor triggering a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;311(5768):1770-1773
88. Wagner CL, Taylor SN, Hollis BW. Does vitamin D make the world go 'round'? *Breastfeed Med* 2008;3(4):239-250
89. Walker VP, Modlin RL. The vitamin D connection to pediatric infections and immune function. *Pediatr Res* 2009;65(5 Pt 2):106R-113R
90. Thacher TD, Clarke BL. Vitamin D insufficiency. *Mayo Clin Proc* 2011;86(1):50-60
91. Palczewska I, Niedźwiecka Z. Wskaźniki rozwoju somatycznego dzieci i młodzieży warszawskiej. *Med Wieku Rozwoj* 2002;2(supl 1)
92. Huenecke S, Behl M, Fadler C, Zimmermann SY, Bochennek K, Tramsen L, Esser R, Klarmann D, Kamper M, Sattler A, von Laer D, Klingebiel T, Lehrnbecher T, Koehl U. Age-matched lymphocyte subpopulation reference values in childhood and adolescence: application of exponential regression analysis. *Eur J Haematol* 2008;80(6):532-539
93. Charzewska J, Chlebna-Sokół D, Chybicka A, Czech-Kowalska J, Dobrzańska A, Helwich E, Imiela JR, Karczarewicz E, Książek JB, Lewiński A, Lorenc RS, Lukas W, Łukaszewicz J,

- Marcinowska-Suchowierska E, Milanowski A, Milewicz A, Płodowski P, Pronicka E, Radowski S, Ryzko J, Socha J, Szczapa J, Weker H. Recommendations of prophylaxis of vitamin D deficiency in Poland (2009). *Med Wieku Rozwoj* 2010;14(2):218-223
94. Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, Plebani A, Kumararatne DS, Bonnet D, Tournilhac O, Tchernia G, Steiniger B, Staudt LM, Casanova JL, Reynaud CA, Weill JC. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 2004;104(12):3647-3654
95. Weller S, Mamani-Matsuda M, Picard C, Cordier C, Lecoeuche D, Gauthier F, Weill JC, Reynaud CA. Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM+ IgD+ CD27+ B cell repertoire in infants. *J Exp Med* 2008;205(6):1331-1342
96. Davies EG, Thrasher AJ. Update on the hyper immunoglobulin M syndromes. *Br J Haematol*. 2010;149(2):167-180
97. Durandy A, Taubenheim N, Peron S, Fischer A. Pathophysiology of B-cell intrinsic immunoglobulin class switch recombination deficiencies. *Adv Immunol* 2007;94:275-306
98. Noordzij JG, Wulffraat NM, Haraldsson A, Meyts I, van't Veer LJ, Hogervorst FB, Warris A, Weemaes CM. Ataxia-telangiectasia patients presenting with hyper-IgM syndrome. *Arch Dis Child* 2009;94(6):448-449
99. Chrzanowska KH, Gregorek H, Dembowska-Bagińska B, Kalina MA, Digweed M. Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Orphanet J Rare Dis* 2012;7:13
100. Gennery AR, Cant AJ, Jeggo PA. Immunodeficiency associated with DNA repair defects. *Clin Exp Immunol* 2000;121(1):1-7
101. Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Komiyama A. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol Today* 2000;21(5):204-206
102. Brouet JC, Chedeville A, Fermanand JP, Royer B. Study of the B cell memory compartment in common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol* 2000;30(9):2516-2520
103. Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, Eibel H, Schlesier M, Peter HH. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 2002;99(5):1544-1551
104. Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, Debré P, Schmitt C, Oksenhendler E. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol* 2003;23(5):385-400

105. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, Vlkova M, Hernandez M, Detkova D, Bos PR, Poerksen G, von Bernuth H, Baumann U, Goldacker S, Gutenberger S, Schlesier M, Bergeron-van der Cruyssen F, Le Garff M, Debré P, Jacobs R, Jones J, Bateman E, Litzman J, van Hagen PM, Plebani A, Schmidt RE, Thon V, Quinti I, Espanol T, Webster AD, Chapel H, Vihinen M, Oksenhendler E, Peter HH, Warnatz K. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008;111(1):77-85
106. Ahn S, Cunningham-Rundles C. Role of B cells in common variable immune deficiency. *Expert Rev Clin Immunol* 2009;5(5):557-564
107. Al Kindi M, Mundy J, Sullivan T, Smith W, Kette F, Smith A, Heddle R, Hissaria P. Utility of peripheral blood B cell subsets analysis in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 2012;167(2):275-281
108. Vodjgani M, Aghamohammadi A, Samadi M, Moin M, Hadjati J, Mirahmadian M, Parvaneh N, Salavati A, Abdollahzade S, Rezaei N, Srrafnejad A. Analysis of class-switched memory B cells in patients with common variable immunodeficiency and its clinical implications. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007;17(5):321-328
109. Ko J, Radigan L, Cunningham-Rundles C. Immune competence and switched memory B cells in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2005;116(1):37-41
110. Schatorjé EJ, Gemen EF, Driessen GJ, Leuvenink J, van Hout RW, van der Burg M, de Vries E. Age-matched reference values for B-lymphocyte subpopulations and CVID classifications in children. *Scand J Immunol* 2011;74(5):502-510
111. Huck K, Feyen O, Ghosh S, Beltz K, Bellert S, Niehues T. Memory B-cells in healthy and antibody-deficient children. *Clin Immunol* 2009;131(1):50-59
112. van de Ven AA, van de Corput L, van Tilburg CM, Tesselaar K, van Gent R, Sanders EA, Boes M, Bloem AC, van Montfrans JM. Lymphocyte characteristics in children with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2010;135(1):63-71
113. Smet J, Mascart F, Schandené L. Are the reference values of B cell subpopulations used in adults for classification of common variable immunodeficiencies appropriate for children? *Clin Immunol* 2011;138(3):266-273
114. Alachkar H, Taubenheim N, Haeney MR, Durandy A, Arkwright PD. Memory switched B cell percentage and not serum immunoglobulin concentration is associated with clinical complications in children and adults with specific antibody deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2006;120(3):310-318
115. Aydogan M, Eifan AO, Gocmen I, Ozdemir C, Bahceciler NN, Barlan IB. Clinical and immunologic features of pediatric patients with common variable immunodeficiency and respiratory complications. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008;18(4):260-265

116. van de Ven AA, van Montfrans JM. Clinical complications in pediatric CVID are not restricted to patients with severely reduced class-switched memory B cells. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22(3):347-348
117. Yong PL, Orange JS, Sullivan KE. Pediatric common variable immunodeficiency: immunologic and phenotypic associations with switched memory B cells. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21(5):852-858
118. Tarte K, Zhan F, De Vos J, Klein B, Shaughnessy J Jr. Gene expression profiling of plasma cells and plasmablasts: toward a better understanding of the late stages of B-cell differentiation. *Blood* 2003;102(2):592-600
119. Chovancova Z, Vlkova M, Litzman J, Lokaj J, Thon V. Antibody forming cells and plasmablasts in peripheral blood in CVID patients after vaccination. *Vaccine* 2011;29(24):4142-4150
120. van der Burg M, van Zelm MC, Driessen GJ, van Dongen JJ. Dissection of B-cell development to unravel defects in patients with a primary antibody deficiency. *Adv Exp Med Biol* 2011;697:183-196
121. Vlková M, Fronková E, Kanderová V, Janda A, Ruzicková S, Litzman J, Sedivá A, Kalina T. Characterization of lymphocyte subsets in patients with common variable immunodeficiency reveals subsets of naive human B cells marked by CD24 expression. *J Immunol* 2010;185(11):6431-6438
122. Malaspina A, Moir S, Chaitt DG, Rehm CA, Kottlilil S, Falloon J, Fauci AS. Idiopathic CD4+ T lymphocytopenia is associated with increases in immature/transitional B cells and serum levels of IL-7. *Blood* 2007;109(5):2086-2088
123. Malaspina A, Moir S, Ho J, Wang W, Howell ML, O'Shea MA, Roby GA, Rehm CA, Mican JM, Chun TW, Fauci AS. Appearance of immature/transitional B cells in HIV-infected individuals with advanced disease: correlation with increased IL-7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(7):2262-2267
124. Cuss AK, Avery DT, Cannons JL, Yu LJ, Nichols KE, Shaw PJ, Tangye SG. Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity. *J Immunol* 2006;176(3):1506-1516
125. Zarei S, Jeddi-Tehrani M, Akhondi MM, Zeraati H, Pourheidari F, Ostadkarampour M, Tavangar B, Shokri F. Primary immunization with a triple diphtheria-tetanus-whole cell pertussis vaccine in Iranian infants: an analysis of antibody response. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2009;8(2):85-93
126. Paulke-Korinek M, Fischmeister G, Grac A, Rendi-Wagner P, Kundi M, Mohsenzadeh-Rabbani A, Moritz K, Fenninger B, Jarisch R, Jasinska J, Holzmann H, Wiedermann U, Kollaritsch H.

- Persistence of antibodies in 4-8 year old Austrian children after vaccination with hexavalent DTaP-HBV-IPV/Hib and MMR vaccines. *Vaccine* 2011;29(32):5130-5136
127. Posfay-Barbe KM, Kobela M, Sottas C, Grillet S, Taguebue J, Ekoe T, Lambert PH, Lecoultre C, Siegrist CA. Frequent failure of adolescent booster responses to tetanus toxoid despite infant immunization: waning of infancy-induced immune memory? *Vaccine* 2010;28(27):4356-4361
128. Szczawińska-Popłonyk A, Bręborowicz A, Ossowska L. Impact of IgG3 subclass deficiency on chronic lung disease in children. *Centr Eur J Immunol* 2012;37(1):30-35
129. Dorsey MJ, Orange JS. Impaired specific antibody response and increased B-cell population in transient hypogammaglobulinemia of infancy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;97(5):590-595
130. Abraham RS. Relevance of laboratory testing for the diagnosis of primary immunodeficiencies: a review of case-based examples of selected immunodeficiencies. *Clin Mol Allergy* 2011;9:6
131. Steiner M, Ramakrishnan G, Gartner B, Van Der Meeren O, Jacquet JM, Schuster V. Lasting immune memory against hepatitis B in children after primary immunization with 4 doses of DTPa-HBV-IPV/Hib in the first and 2nd year of life. *BMC Infect Dis* 2010;10:9
132. Rosado MM, Scarsella M, Pandolfi E, Cascioli S, Giorda E, Chionne P, Madonna E, Gesualdo F, Romano M, Ausiello CM, Rapicetta M, Zanetti AR, Tozzi A, Carsetti R. Switched memory B cells maintain specific memory independently of serum antibodies: the hepatitis B example. *Eur J Immunol* 2011;41(6):1800-1808
133. Atkinson AR, Roifman CM. Low serum immunoglobulin G2 levels in infancy can be transient. *Pediatrics* 2007;120(3):e543-547
134. Klein Klouwenberg P, Bont L. Neonatal and infantile immune responses to encapsulated bacteria and conjugate vaccines. *Clin Dev Immunol* 2008;2008:628963
135. Kelly DF, Moxon ER, Pollard AJ. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. *Immunology* 2004;113(2):163-174
136. Schauer U, Stemberg F, Rieger CH, Büttner W, Borte M, Schubert S, Möllers H, Riedel F, Herz U, Renz H, Herzog W. Levels of antibodies specific to tetanus toxoid, Haemophilus influenzae type b, and pneumococcal capsular polysaccharide in healthy children and adults. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10(2):202-207
137. Breukels MA, Spanjaard L, Sanders LA, Rijkers GT. Immunological characterization of conjugated Haemophilus influenzae type b vaccine failure in infants. *Clin Infect Dis* 2001;32(12):1700-1705
138. Siegrist CA. The challenges of vaccine responses in early life: selected examples. *J Comp Pathol* 2007;137(1):4-9

139. Morein B, Blomqvist G, Hu K. Immune responsiveness in the neonatal period. *J Comp Pathol* 2007;137(1):27-31
140. Gasparoni A, Ciardelli L, Avanzini A, Castellazzi AM, Carini R, Rondini G, Chirico G. Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults. *Biol Neonate* 2003;84(4):297-303
141. Sanchez-Solis M, Garcia-Marcos L. Do vaccines modify the prevalence of asthma and allergies? *Expert Rev vaccines* 2006;5(5):631-640
142. Romagnani S. The increased prevalence of allergy and hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression or both? *Immunology* 2004;112(3):352-363
143. Liu AH. Hygiene theory and allergy and asthma prevention. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2007; 21(3):2-7
144. Garn H, Renz H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. *Immunobiology* 2007;212(6):441-452
145. Kowalczyk D, Baran J, Webster AD, Zembala M. Intracellular cytokine production by Th1/Th2 lymphocytes and monocytes of children with symptomatic transient hypogammaglobulinaemia of infancy (THI) and selective IgA deficiency (SIgAD). *Clin Exp Immunol* 2002;127(3):507-512
146. Karaca NE, Aksu G, Gulez N, Yildiz B, Azarsiz E, Kutukculer N. New laboratory findings in Turkish patients with transient hypogammaglobulinemia of infancy. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2010;9(4):237-243
147. Rutkowska M, Lenart M, Bukowska-Strakovà K, Szaflarska A, Pituch-Noworolska A, Kobylarz K, Błaut-Szlósarczyk A, Zwonarz K, Zembala M, Siedlar M. The number of circulating CD4+ CD25high Foxp3+ T lymphocytes is transiently elevated in the early childhood of transient hypogammaglobulinemia of infancy patients. *Clin Immunol* 2011;140(3):307-310
148. Chen W, Ford MS, Young KJ, Zhang L. The role and mechanisms of double negative regulatory T cells in the suppression of immune responses. *Cell Mol Immunol* 2004;1(5):328-335
149. Ford McIntyre MS, Young KJ, Gao J, Joe B, Zhang L. Cutting edge: in vivo trogocytosis as a mechanism of double negative regulatory T cell-mediated antigen-specific suppression. *J Immunol* 2008;181(4):2271-2275
150. Leguern C. Regulatory T cells for tolerance therapy: revisiting the concept. *Crit Rev Immunol* 2011;31(3):189-207
151. Pender MP. CD8+ T-Cell Deficiency, Epstein-Barr Virus Infection, Vitamin D Deficiency, and Steps to Autoimmunity: A Unifying Hypothesis. *Autoimmune Dis* 2012;2012:189096

152. Hermiston ML, Xu Z, Majeti R, Weiss A. Reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases. *J Clin Invest* 2002;109(1):9-14
153. Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:107-137
154. Early E, Reen DJ. Rapid conversion of naive to effector T cell function counteracts diminished primary human newborn T cell responses. *Clin Exp Immunol* 1999;116(3):527-533
155. Musabak U, Sengul A, Oktenli C, Pay S, Yesilova Z, Kenar L, Sanisoglu SY, Inal A, Tuzun A, Erdil A, Bagci S. Does immune activation continue during an attack-free period in familial Mediterranean fever? *Clin Exp Immunol* 2004;138(3):526-533
156. Bleesing JJ, Brown MR, Straus SE, Dale JK, Siegel RM, Johnson M, Lenardo MJ, Puck JM, Fleisher TA. Immunophenotypic profiles in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* 2001;98(8):2466-2473
157. Aktas E, Ciftci F, Bilgic S, Sezer O, Bozkanat E, Deniz O, Citici U, Deniz G. *Scand J Immunol*. Peripheral immune response in pulmonary tuberculosis. 2009;70(3):300-308
158. Wood SM, Ljunggren HG, Bryceson YT. Insights into NK cell biology from human genetics and disease associations. *Cell Mol Life Sci* 2011;68(21):3479-3793
159. Orange JS. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect* 2002;4(15):1545-1558
160. Eidenschenk C, Dunne J, Jouanguy E, Fourlinnie C, Gineau L, Bacq D, McMahon C, Smith O, Casanova JL, Abel L, Feighery C. A novel primary immunodeficiency with specific natural-killer cell deficiency maps to the centromeric region of chromosome 8. *Am J Hum Genet* 2006;78(4):721-727
161. Hughes CR, Guasti L, Meimaridou E, Chuang CH, Schimenti JC, King PJ, Costigan C, Clark AJ, Metherell LA. MCM4 mutation causes adrenal failure, short stature, and natural killer cell deficiency in humans. *J Clin Invest* 2012,pii: 60224,doi: 10.1172/JCI60224
162. Gineau L, Cognet C, Kara N, Lach FP, Dunne J, Veturi U, Picard C, Trouillet C, Eidenschenk C, Aoufouchi S, Alcaïs A, Smith O, Geissmann F, Feighery C, Abel L, Smogorzewska A, Stillman B, Vivier E, Casanova JL, Jouanguy E. Partial MCM4 deficiency in patients with growth retardation, adrenal insufficiency, and natural killer cell deficiency. *J Clin Invest* 2012,pii: 61014,doi: 10.1172/JCI61014
163. Smyth CM, Ginn SL, Deakin CT, Logan GJ, Alexander IE. Limiting γ c expression differentially affects signaling via the interleukin (IL)-7 and IL-15 receptors. *Blood* 2007;110(1):91-98
164. Andoniou CE, van Dommelen SL, Voigt V, Andrews DM, Brizard G, Asselin-Paturel C, Delale T, Stacey KJ, Trinchieri G, Degli-Esposti MA. Interaction between conventional dendritic cells

- and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. *Nat Immunol* 2005;6(10):1011-1019
165. Li F, Zhu H, Sun R, Wei H, Tian Z. Natural killer cells are involved in acute lung immune injury caused by respiratory syncytial virus infection. *J Virol* 2012;86(4):2251-2258
166. Hussell T, Openshaw PJ. Intracellular IFN-gamma expression in natural killer cells precedes lung CD8+ T cell recruitment during respiratory syncytial virus infection. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 11):2593-2601
167. Kim KD, Zhao J, Auh S, Yang X, Du P, Tang H, Fu YX. Adaptive immune cells temper initial innate responses. *Nat Med* 2007;13(10):1248-1252
168. Kinjo Y, Ueno K. iNKT cells in microbial immunity: recognition of microbial glycolipids. *Microbiol Immunol* 2011;55(7):472-482
169. Kronenberg M, Kinjo Y. Innate-like recognition of microbes by invariant natural killer T cells. *Curr Opin Immunol* 2009;21(4):391-396
170. Hermans IF, Silk JD, Gileadi U, Salio M, Mathew B, Ritter G, Schmidt R, Harris AL, Old L, Cerundolo V. NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells. *J Immunol* 2003;171(10):5140-5147
171. Wu L, Gabriel CL, Parekh VV, Van Kaer L. Invariant natural killer T cells: innate-like T cells with potent immunomodulatory activities. *Tissue Antigens* 2009;73(6):535-545
172. Carvalho KI, Melo KM, Bruno FR, Snyder-Cappione JE, Nixon DF, Costa-Carvalho BT, Kallas EG. Skewed distribution of circulating activated natural killer T (NKT) cells in patients with common variable immunodeficiency disorders (CVID). *PLoS One* 2010;5(9),pii: e12652
173. Hu T, Gimferrer I, Alberola-Ila J. Control of early stages in invariant natural killer T-cell development. *Immunology* 2011;134(1):1-7
174. Hu T, Simmons A, Yuan J, Bender TP, Alberola-Ila J. The transcription factor c-Myb primes CD4+CD8+ immature thymocytes for selection into the iNKT lineage. *Nat Immunol* 2010;11(5):435-441
175. Castro FV, Tutt AL, White AL, Teeling JL, James S, French RR, Glennie MJ. CD11c provides an effective immunotarget for the generation of both CD4 and CD8 T cell responses. *Eur J Immunol* 2008;38(8):2263-2273
176. White AL, Tutt AL, James S, Wilkinson KA, Castro FV, Dixon SV, Hitchcock J, Khan M, Al-Shamkhani A, Cunningham AF, Glennie MJ. Ligation of CD11c during vaccination promotes germinal centre induction and robust humoral responses without adjuvant. *Immunology* 2010;131(1):141-151

177. Huang ZY, Hunter S, Chien P, Kim MK, Han-Kim TH, Indik ZK, Schreiber AD. Interaction of two phagocytic host defense systems: Fc γ receptors and complement receptor 3. *J Biol Chem* 2011;286(1):160-168
178. Aghamohammadi A, Bahrami A, Mamishi S, Mohammadi B, Abolhassani H, Parvaneh N, Rezaei N. Impact of delayed diagnosis in children with primary antibody deficiencies. *J Microbiol Immunol Infect* 2011;44(3):229-234
179. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;39(2):365-379
180. Herr C, Greulich T, Koczulla RA, Meyer S, Zakharkina T, Branscheidt M, Eschmann R, Bals R. The role of vitamin D in pulmonary disease: COPD, asthma, infection, and cancer. *Respir Res* 2011;12:31