

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Magdalena Rutkowska

ROLA LIMFOCYTÓW T REGULATOROWYCH O FENOTYPIE
CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ W PATOMECHANIZMIE PRZEJŚCIOWEJ
HIPOGAMMAGLOBULINEMII WIEKU DZIECIĘCEGO

Praca doktorska

Promotor: Dr hab. med. Maciej Siedlar, prof. UJ

Pracę wykonano w Zakładzie Immunologii Klinicznej, Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum

Kierownik jednostki: Dr hab. med. Maciej Siedlar, prof. UJ

Kraków 2013

Badania wykonano w ramach realizacji projektu badawczego promotorskiego pt. „Poszukiwanie zaburzeń genetycznych związanych z receptorami dla TGF- β u dzieci z przejściową hipogammaglobulinemią wieku dziecięcego” (nr. N N407 541439) oraz projektu badawczego pt. „Rola limfocytów regulatorowych T (CD4⁺CD25⁺/Foxp3⁺T_{reg}) oraz subpopulacji monocytów prozapalnych (CD14⁺CD16⁺⁺) w hipogammaglobulinemiach wieku dziecięcego oraz u osób dorosłych – implikacje patogenetyczne i diagnostyczne” (nr. N407 082 32/3220).

*Szczególne podziękowania pragnę złożyć
mojemu Opiekunowi, prof. Maciejowi Siedlarowi
za nieocenioną pomoc, czas mi poświęcony oraz
rady i wskazówki, które kształtowały moje
zainteresowania naukowe.*

*Pragnę również podziękować wszystkim
pracownikom Katedry Immunologii Klinicznej
i Transplantologii za życzliwość oraz miłą
atmosferę w trakcie prowadzenia badań.*

*Dziękuję moim Rodzicom oraz Marcinowi
za miłość i wsparcie.*

SPIS TREŚCI

1 WPROWADZENIE	10
1.1 Limfocyty T regulatorowe	10
1.1.1 Charakterystyka limfocytów T _{reg}	10
1.1.1.1 Naturalne limfocyty T _{reg}	11
1.1.1.1.1 Rola TGF- β i IL-2 w powstawaniu limfocytów T _{reg}	12
1.1.1.2 Indukowane limfocyty T _{reg}	14
1.1.2 Funkcje limfocytów T _{reg}	16
1.1.3 Aktywność supresorowa limfocytów T _{reg}	16
1.1.3.1 Mechanizmy supresji bezpośredniej	17
1.1.3.2 Mechanizmy supresji pośredniej	18
1.1.4 Czynniki transkrypcyjne Foxp3 - marker limfocytów T _{reg}	19
1.1.4.1 Budowa genu FOXP3	20
1.1.5 Rola limfocytów T _{reg} w patomechanizmie wybranych chorób człowieka	21
1.1.5.1 Zaburzenia limfocytów T _{reg} w pierwotnych niedoborach odporności	23
1.1.5.1.1 Zespół IPEX	23
1.1.5.1.2 Niedobór CD25	23
1.1.5.1.3 Inne pierwotne niedobory odporności	24
1.1.6 Perspektywy wykorzystania terapeutycznego limfocytów T _{reg}	25
1.2 Pierwotne niedobory odporności	26
1.2.1 Niedobory odporności z przewagą zaburzeń produkcji przeciwciał	26
1.2.2 Przejściowa hipogammaglobulinemia wieku dziecięcego (THI)	27
1.2.2.1 Częstość występowania THI	28
1.2.2.2 Patomechanizmy THI	28
1.2.2.2.1 Teoria matczyno-płodowej niezgodności antygenowej	29
1.2.2.2.2 THI jako heterozygotyczna postać hipogammaglobulinemii	29
1.2.2.2.3 Rola limfocytów T helper w etiopatogenezie THI	30
1.2.2.2.4 THI jako wynik zaburzonej produkcji cytokin	30
1.2.2.2.5 THI a zaburzona ekspresja cząsteczki CD40 na monocytach	31
1.2.2.3 Obraz kliniczny i etiologia zakażeń w THI	31
1.2.2.4 THI w ocenie laboratoryjnej	32
1.2.2.5 Leczenie	33
1.2.2.6 Podsumowanie	33
1.2.3 Inne często występujące pierwotne niedobory odporności humoralnej	34
1.2.3.1 Pospolity zmienny niedobór odporności (CVID)	34
1.2.3.2 Izolowany niedobór IgA (SIgAD)	36
1.2.4 Diagnostyka różnicowa THI z innymi dziecięcymi postaciami hipogammaglobulinemii	37
2 CELE PRACY	39
2.1 Cel ogólny	39
2.2 Cele szczegółowe	39

3	PACJENCI I METODYKA.....	41
3.1	Osoby badane	41
3.2	Izolacja komórek jednojądrzastych.....	42
3.3	Ocena ilościowa limfocytów T _{reg} i limfocytów B.....	42
3.3.1	Określenie liczby bezwzględnej limfocytów T CD4 ⁺	42
3.3.2	Oznaczanie bezwzględnej liczby limfocytów T _{reg}	43
3.3.3	Ocena liczebności limfocytów B	43
3.4	Ocena poziomu immunoglobulin.....	43
3.5	Ocena ekspresji genu <i>FOXP3</i> na poziomie mRNA.....	44
3.5.1	Izolacja całkowitego RNA	44
3.5.2	Odwrotna transkrypcja	44
3.5.3	PCR w czasie rzeczywistym	46
3.5.4	Analiza profilu ekspresji genu <i>FOXP3</i>	48
3.6	Oznaczanie poziomu wybranych cytokin	48
3.6.1	Stymulacja PBMC.....	48
3.6.2	Ocena stężenia czynnika TGF-β	49
3.6.3	Ocena stężenia cytokiny IL-10.....	49
3.7	Analiza sekwencji genów <i>TGFBR1</i> oraz <i>TGFBR2</i>	49
3.7.1	Izolacja DNA	50
3.7.2	Metoda przesiewowa analizy heterodupleksów	50
3.7.2.1	Amplifikacja egzonów genów <i>TGFBR1</i> i <i>TGFBR2</i> metodą PCR.....	50
3.7.2.2	Elektroforeza produktów reakcji PCR.....	54
3.7.2.3	Reakcja tworzenia heterodupleksów	54
3.7.2.4	Rozdział heterodupleksów metodą elektroforezy kapilarnej.....	55
3.7.3	Sekwencjonowanie genów <i>TGFBR1</i> oraz <i>TGFBR2</i>	56
3.7.3.1	Oczyszczanie produktów PCR	56
3.7.3.2	Sekwencyjny PCR	57
3.7.3.3	Precypitacja produktów sekwencyjnego PCR.....	58
3.7.3.4	Reakcja sekwencjonowania	58
3.8	Ocena funkcjonalna limfocytów T _{reg}	59
3.8.1	Izolacja limfocytów T _{reg} oraz wybranych subpopulacji limfocytów	59
3.8.2	Zakładanie hodowli PBMC z określonymi wysortowanymi subpopulacjami komórkowymi.....	60
3.8.3	Ocena zmian produkcji immunoglobulin klasy IgG	61
3.8.4	Ocena zmian proliferacji PBMC pod wpływem limfocytów T _{reg}	61
3.9	Analiza statystyczna wyników	62
4	WYNIKI.....	63
4.1	Analiza liczebności limfocytów T _{reg} w odniesieniu do wybranych parametrów immunologicznych	63
4.1.1	Ocena liczebności limfocytów T _{reg} u pacjentów z wybranymi pierwotnymi niedoborami odporności humoralnej	63
4.1.2	Ocena zależności pomiędzy poziomami IgG, wiekiem, liczebnością limfocytów B oraz limfocytów T _{reg}	69

4.1.3 Ocena liczebności limfocytów T _{reg} w diagnostyce różnicowej THI z innymi formami hipogammaglobulinemii	74
4.1.3 Analiza zmian poziomu ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w PBMC	76
4.2 Analiza wybranych parametrów związanych z powstawaniem i funkcją limfocytów T _{reg}	79
4.2.1 Ocena poziomu surowiczego oraz produkcji wybranych cytokin	79
4.2.1.1 Poziom IL-10 i TGF-β w surowicy krwi	79
4.2.1.2 Produkcja cytokin po stymulacji PBMC <i>in vitro</i>	80
4.2.1.2.1 Ocena produkcji IL-10.....	80
4.2.1.2.2 Ocena produkcji TGF-β.....	80
4.2.2 Analiza sekwencji genów <i>TGFBR1</i> i <i>TGFBR2</i>	83
4.2.2.1 Wykryte polimorfizmy genów <i>TGFBR1</i> i <i>TGFBR2</i>	85
4.2.2.1.1 Polimorfizm <i>T375T</i>	85
4.2.2.1.2 Polimorfizm <i>N478S</i>	86
4.3 Ocena funkcjonalna limfocytów T _{reg}	87
4.3.1 Wpływ limfocytów T _{reg} na produkcję IgG.....	87
4.3.2 Wpływ limfocytów CD4 ⁺ CD25 ^{high} na proliferację komórek	89
5 DYSKUSJA.....	91
6 WNIOSKI	105
7 STRESZCZENIE.....	108
8 ABSTRACT	109
9 PIŚMIENNICTWO.....	110

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

APC	(<i>antigen presenting cells</i>) – komórki prezentujące antygen
-APC	(<i>allophycocyanin</i>) – alofikocyjanina, fluorofor
CD	(<i>cluster of differentiation</i>) – antygen różnicowania
cTEC	(<i>cortical thymic epithelial cells</i>) – komórki nabłonkowe kory grasicy
CTLA-4	(<i>cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4</i>) – antygen 4 związany z limfocytom T cytotoksycznym
CVID	(<i>common variable immunodeficiency</i>) – pospolity zmienny niedobór odporności
dNTP	mieszanina trifosforanów deoksyrybonukleotydów (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
EDTA	(<i>ethylenediaminetetraacetate</i>) – kwas etylenodiaminotetraoctowy
EBV	(<i>Epstein-Barr virus</i>) – wirus Epsteina-Barr
FGL-2	(<i>fibrynogen-like protein 2</i>) – białko podobne do fibrynogenu 2
-FITC	(<i>fluorescein isothiocyanate</i>) – izotiocyanian fluoresceiny, fluorofor
Foxp3	(<i>forkhead box P3</i>) – czynnik transkrypcyjny Foxp3
FSC	(<i>forward scatter</i>) – przedni detektor światła rozproszonego, umożliwiający analizę komórek pod względem ich wielkości
GITR	(<i>glucocorticoid induced TNF-family receptor</i>) – receptor z rodziny TNF indukowany przez glikokortykosteroidy
HET	(<i>heteroduplex</i>) – heterodupleks
ICER	(<i>Inducible cAMP Early Repressor</i>) – wczesny represor indukowany cAMP
IDO	(<i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>) – 2,3-dioksygenaza indoloaminy
IFN- γ	interferon γ
IL	interleukina
IPEX	(<i>immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome</i>) – sprzężony z chromosomem X zespół dysregulacji immunologicznej, poliendokrynopatii i enteropatii
IUIS	(<i>International Union of Immunological Societies</i>) – Międzynarodowa Unia Towarzystw Immunologicznych
IVIG	(<i>intravenous immunoglobulin</i>) – dożylny wlew immunoglobulin
LAG-3	(<i>lymphocyte-activation gene 3</i>) – gen 3 aktywacji limfocytów
LPS	(<i>lipopolysaccharide</i>) – lipopolisacharyd

MHC	(<i>major histocompatibility complex</i>) – główny układ zgodności tkankowej
MS	(<i>multiple sclerosis</i>) – stwardnienie rozsiane
mTEC	(<i>medullary thymic epithelial cells</i>) – komórki nabłonkowe rdzenia grasicy
NK	(<i>natural killer</i>) – komórka NK, naturalna komórka cytotoksyczna
NRP-1	(<i>neurophilin 1</i>) – neurofilina
PBMCs	(<i>peripheral blood mononuclear cells</i>) – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej
PBS	(<i>phosphate buffer saline</i>) – bufor fosforanowy
PCR	(<i>polimerase chain reaction</i>) – łańcuchowa reakcja polimerazy
-PE	(<i>phycoerythrin</i>) – fikoerytryna, fluorofor
PHA	(<i>phytohaemagglutinin</i>) – fitohemaglutynina
PIDs	(<i>primary immunodeficiency diseases</i>) – pierwotne niedobory odporności
PWM	(<i>pokweed mitogen</i>) – mitogen szkarłatki
RA	(<i>rheumatoid arthritis</i>) – reumatoidalne zapalenie stawów
SCID	(<i>severe combined immunodeficiency</i>) – ciężki złożony niedobór odporności
SIG	(<i>subcutaneous immunoglobulin</i>) – podskórne preparaty immunoglobulin
SIgAD	(<i>Selective IgA Deficiency</i>) – izolowany niedobór IgA
SLE	(<i>systemic lupus erythematosus</i>) – toczeń rumieniowaty układowy
SMAD	rodzina białek Smad
SSC	(<i>side scatter</i>) – boczny detektor światła rozproszonego, umożliwiający analizę komórek pod względem ich ziarnistości
T1D	(<i>type 1 diabetes</i>) – cukrzyca typu I
TAE	(<i>tris-acetate-EDTA</i>) – bufor octanowy
T β R	(<i>transforming growth factor β receptor</i>) – receptor dla TGF- β
T _{con}	(<i>conventional T cell</i>) – limfocyty T konwencjonalne
TCR	(<i>T cell lymphocyte receptor</i>) – receptor limfocyta T
TGF- β	(<i>transforming growth factor β</i>) – transformujący czynnik wzrostu β
Th	(<i>T helper cells</i>) – limfocyty T pomocnicze
THI	(<i>transient hypogammaglobulinemia of infancy</i>) – przejściowa hipogammaglobulinemia wieku dziecięcego
TNF	(<i>tumor necrosis factor</i>) – czynnik martwicy nowotworów
T _{reg}	(<i>regulatory T cells</i>) – limfocyty T regulatorowe
XLP	(<i>X-linked lymphoproliferative syndrome</i>) – zespół limfoproliferacyjny sprzężony z chromosomem X

1 WPROWADZENIE

1.1 *Limfocyty T regulatorowe*

Limfocyty T regulatorowe są obecnie uznaną składową układu odpornościowego, stanowiąc pulę komórek odpowiedzialnych w głównej mierze za utrzymanie stanu tolerancji na własne antygeny. Po raz pierwszy subpopulację limfocytów mającą zdolność hamowania funkcji innych komórek immunokompetentnych, opisano na początku lat 70 ubiegłego wieku [1]. Przeprowadzone przez Gershona i Kondo eksperymenty doprowadziły do opisanie zjawiska określanego mianem „tolerancji infekcyjnej”, a tymocyty ją wywołujące nazwano limfocytami T supresorowymi [2]. Przez kolejne dekady lat 70 i 80 próby bliższego scharakteryzowania tych komórek, zarówno pod względem fenotypowym jak i funkcjonalnym, napotykały duże trudności wynikające z nieznaności charakterystycznych dla nich markerów powierzchniowych i/lub molekularnych. Przełomem okazały się prace *Sakaguchiego i wsp.* opublikowane w roku 1995, w których udowodniono, iż komórkami odpowiedzialnymi za hamowanie rozwoju autoimmunizacji u myszy są limfocyty T pomocnicze wykazujące na swej powierzchni konstytutywną ekspresję łańcucha α receptora dla IL-2 (CD25) [3]. Komórki te nazwano limfocytami T regulatorowymi (T_{reg}). Ich obecność wykazano również u ludzi, znajdując je m.in. w krwi obwodowej, grasicy, śledzionie, migdałkach i krwi pępowinowej [4-9]. Ostatecznie stwierdzono, iż funkcję limfocytów T_{reg} w organizmie człowieka spełniają komórki wykazujące najwyższą powierzchniową ekspresję cząsteczki CD25, tworzące subpopulację limfocytów T o fenotypie $CD4^+CD25^{++}$ (lub $CD4^+CD25^{high}$).

1.1.1 Charakterystyka limfocytów T_{reg}

Limfocyty T regulatorowe są heterogenną grupą komórek. Na podstawie różnic w ontogenezie, wyróżnia się pośród nich dwie główne subpopulacje: powstające w grasicy, tzw. naturalne, wykazujące ekspresję czynnika transkrypcyjnego Foxp3 (ang. *forkhead box P3*) - o fenotypie $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (ang. *natural regulatory T cells*, nT_{reg}), oraz generowane na obwodzie w określonych warunkach „tolerogennych”, tzw.

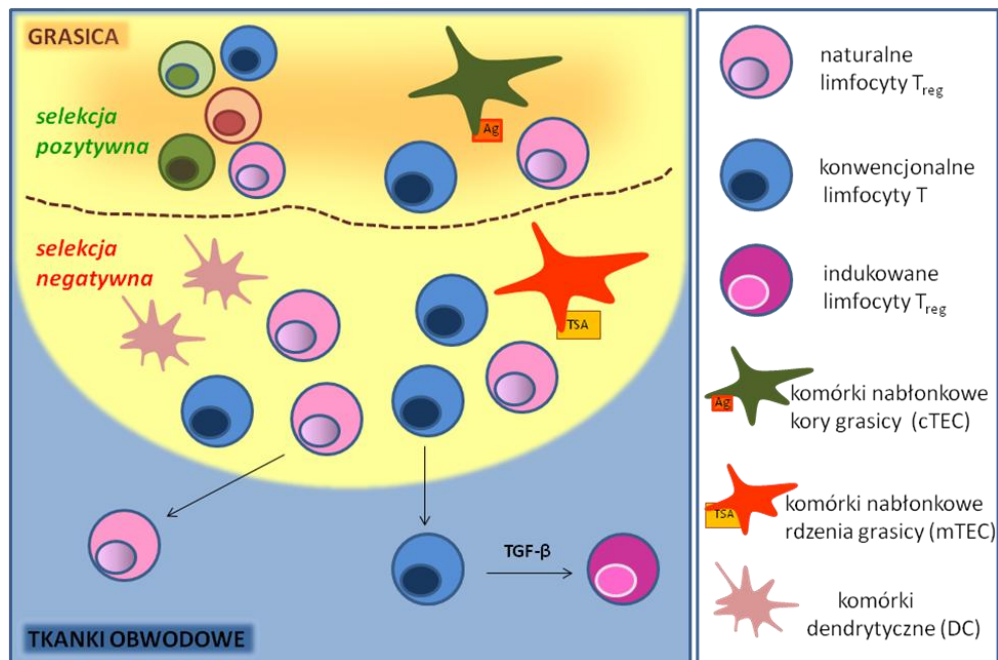
adaptacyjne/indukowane limfocyty T regulatorowe (*ang. inducible regulatory T cells, iT_{reg}*) [10-13].

1.1.1.1 Naturalne limfocyty T_{reg}

Naturalne limfocyty T_{reg} stanowią od 5 do 10% wszystkich krążących limfocytów CD4⁺ [14]. Charakteryzują się wysoką i stałą ekspresją podjednostki α receptora dla IL-2 (CD25), co odróżnia je od aktywowanych limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ wykazujących niższą i jedynie przejściową ekspresję tej cząsteczki. Jako markery limfocytów T_{reg} wymienia się również antygen 4 związany z limfocytom T cytotoksycznym (*ang. cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4*), receptor z rodziny TNF indukowany przez glikokortykosteroidy (*ang. glucocorticoid induced TNF-family receptor, GITR*), oraz gen 3 aktywacji limfocytów (*ang. lymphocyte-activation gene 3, LAG-3*) [15-19]. Antygeny te, pełniąc rolę negatywnych regulatorów procesu aktywacji komórek efektorowych, nie są jednak charakterystyczne wyłącznie dla populacji limfocytów T_{reg}. Innymi oznaczanymi na powierzchni tych komórek antygenami są: HLA-DR, CD45RO, CD28, CD27, CD5, CD122, OX-40 (CD134), CD62L, TLR5, TLR7, TLR8 [20,21].

Proces powstawania nT_{reg} zachodzi w grasicy (Rys. 1) [22-25]. Podobnie, jak wszystkie limfocyty T posiadające receptor TCR (*ang. T cell lymphocyte receptor*) typu α/β , limfocyty nT_{reg} podlegają procesom pozytywnej i negatywnej selekcji [10,26]. Wykazano, iż awidność TCR występujących na prekursorach limfocytów nT_{reg} do peptydów prezentowanych przez komórki nabłonkowe grasicy jest dużo wyższa, w porównaniu do „siły” tego oddziaływania w przypadku konwencjonalnych limfocytów T. Rozpoznawanie z dużym powinowactwem własnych antygenów nie oznacza jednak dla prekursorów limfocytów nT_{reg} selekcji negatywnej. Przeciwnie, sprzyja tworzeniu repertuaru autoreaktywnych limfocytów nT_{reg}, które z jednej strony zapobiegają autoimmunizacji, a z drugiej mogą warunkować rozwój tolerancji na obce antygeny. Opuszczające grasicę dojrzałe limfocyty nT_{reg} są komórkami anergicznymi, niezdolnymi do proliferacji i produkcji IL-2 po stymulacji TCR [27].

Rysunek 1. Powstawanie limfocytów T_{reg} . Komórki będące prekursorami limfocytów T_{reg} podlegają w grasicy selekcji pozytywnej, jednak w odróżnieniu od konwencjonalnych limfocytów T, powinowactwo receptorów TCR tych tymocytów do antygenów prezentowanych przez komórki nabłonkowe kory grasicy (ang. *cortical thymic epithelial cells*, cTEC) jest znacznie wyższe. Selekcja negatywna eliminuje z repertuaru powstających limfocytów T_{reg} , jak i konwencjonalnych limfocytów T, komórki swoiste dla prezentowanych przez komórki dendrytyczne (ang. *dendritic cell*, DC) antygenów ubikwitynowanych, jak również neutralizuje te z prekursorów konwencjonalnych limfocytów T, które rozpoznają prezentowane przez komórki nabłonkowe rdzenia grasicy (ang. *medullary thymic epithelial cells*, mTEC) antygeny tkankowo-specyficzne (ang. *tissue-specific antigen*, TSA). Z kolei, autoreaktywne limfocyty T_{reg} (rozpoznające z wysokim powinowactwem antygeny TSA prezentowane przez komórki mTEC) nie podlegają delecji. Interakcja komórek T_{reg} z komórkami mTEC, jak i DC w grasicy, zapewnia ponadto kostymulację niezbędną dla podtrzymania ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxp3 będącego markerem limfocytów T_{reg} . Powstające w grasicy komórki T_{reg} tworzą pule tzw. naturalnych limfocytów T_{reg} (nT_{reg}). Z kolei, generowane w tkankach obwodowych, tzw. indukowane limfocyty T_{reg} (iT_{reg}), powstają - w obecności czynnika TGF- β - z konwencjonalnych limfocytów T.

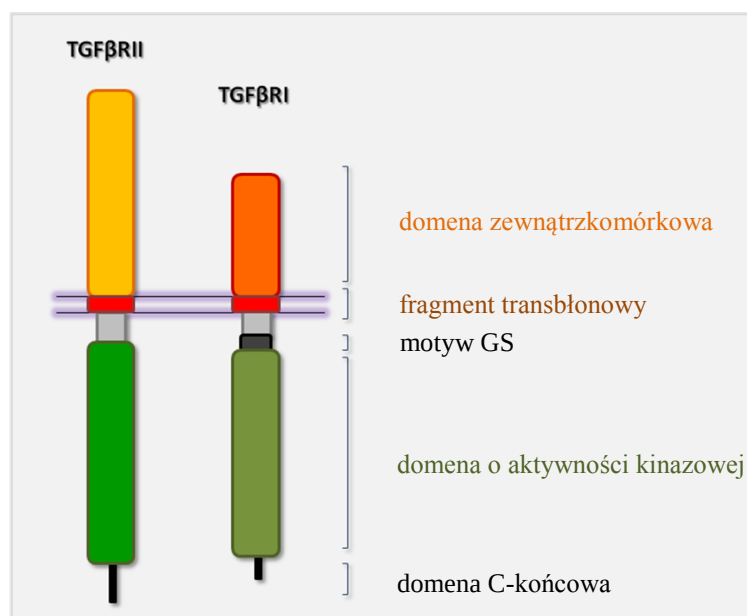


1.1.1.1.1 Rola TGF- β i IL-2 w powstawaniu limfocytów T_{reg}

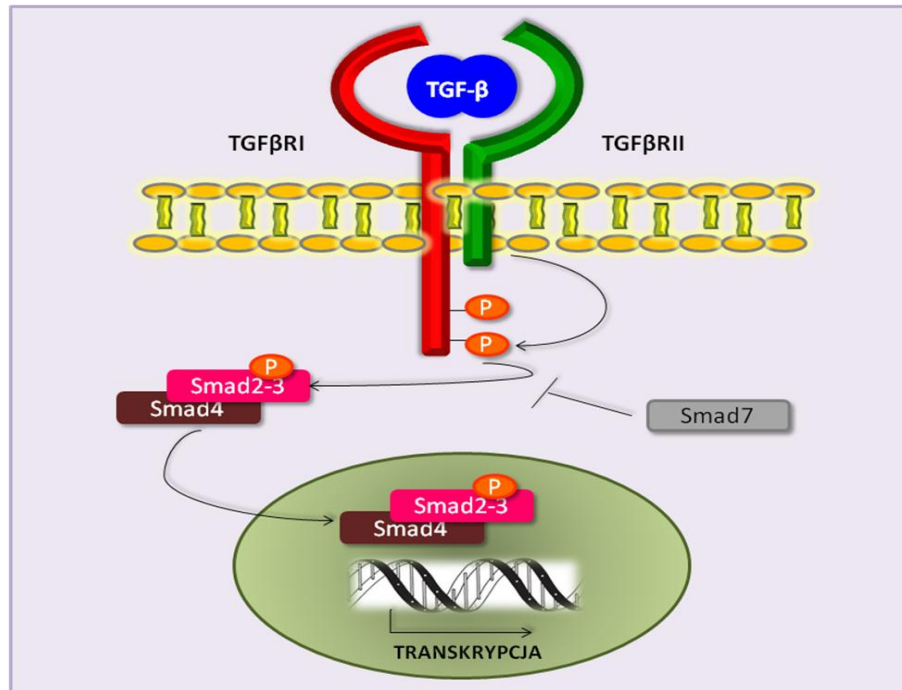
Dotychczasowe badania wykazały, iż czynnikiem krytycznym, koniecznym do rozwoju nT_{reg} w grasicy, jest obecność transformującego czynnika wzrostu β (ang. *transforming growth factor β* , TGF- β), który stymuluje ekspresję czynnika transkrypcyjnego Foxp3 [12,28-31]. W przekazywaniu sygnału udział biorą dwa typy receptorów błonowych dla TGF- β : typu I (T β RI, o masie cząsteczkowej 65 kDa), oraz typu II (T β RII, o m. cz. od 85 do 110 kDa). Oba typy receptorów zbudowane są z około 500 reszt aminokwasowych,

posiadają N-terminalną domenę wiążącą ligand, region transbłonowy oraz domenę C-kończową o aktywności kinazy serynowo-treoninowej (Rys. 2) [32]. Trzeci typ receptora – T β RIII o m. cz. ok. 600 kDa, nie bierze bezpośredniego udziału w szlaku sygnałowania, a jedynie ułatwia dostęp TGF- β do dwóch pozostałych receptorów [33]. Przyłączenie dimeru czynnika TGF- β do T β RII a następnie do T β RI, wykazującego dużo mniejsze powinowactwo do TGF- β , aktywuje wewnątrzkomórkowy szlak sygnałowania. W obrębie wewnątrzkomórkowej domeny GS receptora T β RI dochodzi do fosforylacji reszt seryny i treoniny. Aktywowany w ten sposób receptor przekazuje sygnał do jądra komórkowego przy udziale białek z rodziny SMAD. W pierwszej kolejności, fosforylacji ulega obecny w cytoplazmie czynnik Smad-2/3, oddziałujący bezpośrednio z cytoplazmatycznym fragmentem receptora T β RI. Następnie, po połączeniu z białkiem Smad-4, podlega translokacji do wnętrza jądra komórkowego, gdzie wiążąc się z odpowiednią sekwencją DNA, regulując ekspresję określonych genów, m. in. kodujących Foxp3 (Rys. 3). Negatywnymi regulatorami sygnału indukowanego przez TGF- β po związaniu z receptorem są białka Smad-7 i Smad-9, których poziom ekspresji wzrasta pod wpływem obecnych w środowisku cytokin prozapalnych (np. TNF, IFN- γ , IL-6) [29,34].

Rysunek 2. Schemat budowy receptorów wiążących czynnik TGF- β (T β RI oraz T β RII), z uwzględnieniem podziału na poszczególne domeny.



Rysunek 3. Szlak sygnałowania TGF- β indukujący ekspresję czynnika Foxp3 w limfocytach T_{reg}. Połączenie czynnika TGF- β z receptorem typu II (T β RII) inicjuje morfostrukturalne zmiany tego kompleksu, umożliwiające przyłączenie do niego receptora typu I (T β RI). Zachodząca w dalszej kolejności aktywacja domeny kinazowej doprowadza do fosforylacji białek Smad2-3, które w kompleksie z białkiem Smad4 podlegają translokacji do jądra komórkowego indukując zależną od TGF- β ekspresję genów.



Jak wykazano na modelu zwierzęcym, w przypadku zaburzeń spowodowanych brakiem funkcjonalnie czynnego receptora dla TGF- β , czynnikiem wystarczającym do pobudzenia proliferacji i dojrzewania limfocytów T_{reg} była IL-2, która powodowała przejściowy, paradoksalnie nadmierny wzrost liczności tych komórek w krwi obwodowej młodych osobników [35]. Pomimo istotnej roli, jaką IL-2 odgrywa w proliferacji i funkcjonowaniu limfocytów nT_{reg}, jej obecność nie jest jednak konieczna do wzbudzenia ekspresji czynnika Foxp3 w tymocytach i tym samym, do powstawania tych komórek w grasicy [36,37].

1.1.1.2 Indukowane limfocyty T_{reg}

Komórki o potencjale regulatorowym mogą powstawać również poza grasicą [38-42]. Generowane z dziewiczych limfocytów T CD4⁺CD25⁻, komórki iT_{reg} wykazują zmienną ekspresję cząsteczek powierzchniowych jak np. CD25, GITR czy CTLA-4, a ich powstawanie

wymaga obecności w środowisku określonych cytokin, a zwłaszcza TGF- β [43]. Spotykany najczęściej podział limfocytów iT_{reg} dokonywany jest w oparciu o ekspresję czynnika Foxp3 i obejmuje komórki iT_{reg} Foxp3⁺ oraz komórki iT_{reg}Foxp3⁻. Do komórek nie wykazujących ekspresji Foxp3 należą limfocyty regulatorowe typu 1 (ang. *type 1 regulatory T cells*, Tr1) oraz limfocyty T pomocniczymi typu Th3 (ang. *T helper-3 cells*, Th3). Mechanizm supresji wywieranej przez komórki Tr1, związany jest w głównej mierze z uwalnianiem cytokin o właściwościach immunosupresyjnych, takich jak IL-10 oraz, w mniejszym stopniu, TGF- β . W szczególnych przypadkach komórki te mogą dodatkowo produkować IL-5 oraz IFN- γ . Z kolei, limfocyty Th3 wytwarzają związany z błoną TGF- β , który odgrywa istotną rolę w wywieranej przez te komórki supresji na drodze kontaktowej [44-46]. Populacja limfocytów iT_{reg} odpowiada za zjawisko tolerancji potransplantacyjnej, a w miejscu toczącego się procesu zapalnego hamuje nadmierną, uszkadzającą tkanki, odpowiedź immunologiczną [47]. Komórki iT_{reg} umiejscawiają się głównie w tkance limfatycznej związanej z błonami śluzowymi jelit oraz dróg oddechowych, gdzie ma miejsce stała ekspozycja na obce antygeny, głównie bakteryjne oraz wirusowe [48].

Wydaje się, iż rozróżnienia subpopulacji limfocytów nT_{reg} i iT_{reg} można dokonać w oparciu o ekspresję czynnika transkrypcyjnego Helios, charakteryzującego pierwszy z wymienionych typów komórek, jak również w oparciu o powierzchniową ekspresję białka neurofiliny (ang. *neurophilin 1*, NRP-1) biorącej udział w wywieranym przez limfocyty nT_{reg} efekcie supresorowym [48-51]. Porównanie cech naturalnych i indukowanych limfocytów T_{reg}, przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Porównanie naturalnych (nT_{reg}) i indukowanych (iT_{reg}) limfocytów T_{reg}.

Cecha	Naturalne limfocyty T _{reg} (nT _{reg})	Indukowane limfocyty T _{reg} (iT _{reg})
MIEJSCE POWSTAWANIA	Grasica	Obwodowe narządy limfatyczne, MALT, GALT, tkanki objęte stanem zapalnym, przeszczepione narządy
FENOTYP: - CD25 - FOXP3 - GITR - CTLA-4	+++ ++ ++ +++	+/- +/- -/? +/?
MECHANIZM SUPRESJI	m. in. kontakt komórka-komórka, TGF- β , IL-35, grazymy, CTLA-4	TGF- β , IL-10
SWOISTOŚĆ	Antygeny własne	Antygeny własne, alergen, bakterie komensalne, neoantygeny nowotworowe, alloantygeny
EKSPANSJA W WARUNKACH IN VITRO	Stymulacja TCR/CD28, IL-2	CD3, IL-10, TGF- β , kwas retinowy

W organizmie człowieka wyróżnia się także inne komórki o właściwościach regulatorowych: limfocyty $CD8^+CD25^+$ wykazujące ekspresję błonową TGF- β i CTLA-4, limfocyty T $CD8^+CD25^+Foxp3^+$ produkujące cytokiny przeciwzapalne TGF- β i IL-4 oraz limfocyty T $CD8^+CD28^+$ wydzielające cytokiny charakterystyczne dla limfocytów Th2 [52]. Do tej grupy komórek zaliczą się także niektóre limfocyty T o fenotypie $TCR\alpha\beta^+CD4^-CD8^-NK1.1^-$, $CD8\alpha\alpha^+TCR\alpha\beta^+$, niektóre limfocyty $TCR\gamma\delta^+$ oraz komórki NKT [53-55].

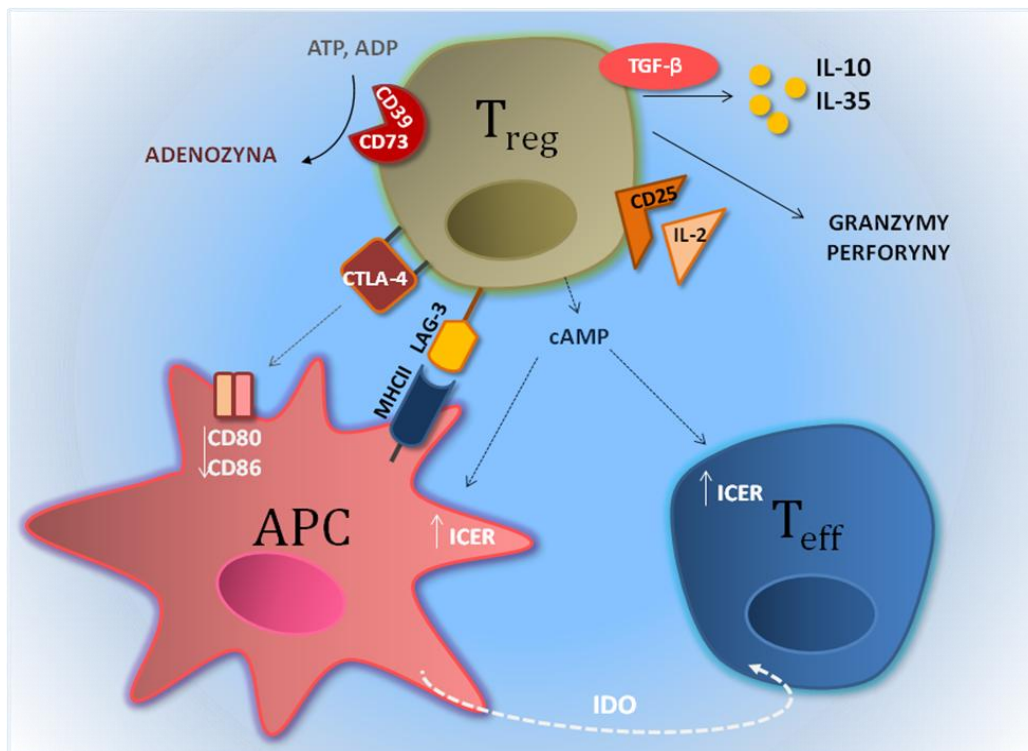
1.1.2 Funkcje limfocytów T_{reg}

Limfocyty T_{reg} wykazują działanie supresorowe w stosunku do innych komórek immunokompetentnych. Hamują aktywację, proliferację i różnicowanie, m.in. limfocytów $CD4^+$ i $CD8^+$, limfocytów B, monocytów, komórek NK, NKT oraz komórek dendrytycznych. Uczestniczą w zapobieganiu reakcjom autoimmunizacji i nadwrażliwości, w utrzymaniu tolerancji na antygeny podane doustnie, w zapobieganiu eliminacji bakterii komensalnych przez układ odpornościowy, w ochronie płodu przed odrzuceniem przez układ odpornościowy matki, jak również w rozwoju tolerancji potransplantacyjnej. W chorobie nowotworowej i w przewlekłych infekcjach limfocyty T_{reg} odgrywają jednakże niekorzystną rolę, przyczyniając się do rozwoju tolerancji na antygeny drobnoustrojów lub antygeny nowotworowe [6,56,57,58].

1.1.3 Aktywność supresorowa limfocytów T_{reg}

Wyróżnia się dwie formy oddziaływania limfocytów T_{reg} na limfocyty efektorowe. Zachodząca bez udziału komórek prezentujących antygen (ang. *antigen presenting cell*, APC) supresja bezpośrednia, obejmuje w głównej mierze działanie cytokin o właściwościach immunosupresyjnych. Z kolei, pośrednią formą oddziaływania limfocytów T_{reg} na komórki efektorowe, jest hamowanie aktywności komórek APC, czego wynikiem jest zahamowanie indukcji swoistej odpowiedzi immunologicznej. Niektóre z mechanizmów obu typów supresji, przedstawiono na rysunku 4.

Rysunek 4. Wybrane mechanizmy supresji wywieranej przez limfocyty T_{reg} .



1.1.3.1 Mechanizmy supresji bezpośredniej

Główną rolę w supresji wywieranej przez komórki T_{reg} na limfocyty efektorowe, odgrywają cytokiny o właściwościach immunosupresyjnych, takich jak TGF- β , IL-10 i IL-35 [59-62]. Związany na powierzchni limfocytów T_{reg} TGF- β , jak również wydzielana do środowiska IL-10, hamują odpowiedź zapalną, a także promują powstawanie indukowanych limfocytów T_{reg} w tkankach obwodowych. Z kolei, wzrost produkcji IL-35 obserwuje się dopiero po dłuższym (powyżej 3 dni) okresie aktywacji tych komórek. Kolejny, wydajny mechanizm supresji bezpośredniej, związany jest z wysoką ekspresją cząsteczki CD25 na powierzchni limfocytów T_{reg} , wchodzącej w skład receptora o wysokim powinowactwie do IL-2 [4,63]. Umożliwia to limfocytom T_{reg} „konsumpcję” zapasu tej cytokiny w miejscu swojego działania, ograniczając jej dostępność dla limfocytów efektorowych. Spadek poziomu IL-2 skutkuje zahamowaniem proliferacji limfocytów efektorowych, prawdopodobnie w wyniku swoistej formy apoptozy zależnej od proapoptotycznego czynnika Bim (ang. *Bcl-2 interacting mediator of cell death*). Zahamowanie cyklu komórkowego komórek efektorowych może przebiegać również z udziałem białka galektyny 1, która

występując na powierzchni limfocytów T_{reg} posiada zdolność wiązania takich cząsteczek, jak CD45, CD43 i CD7 [64]. Bezpośrednia supresja komórek efektorowych może zachodzić w warunkach *in vitro* także na drodze cytolizy, po aktywacji limfocytów T_{reg} przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD46. Wydzielane wówczas proteazy serynowe, głównie granzymy A i B, uszkadzają komórki docelowe w mechanizmie zależnym od perforyn [65]. Limfocyty T_{reg} mają także zdolność wygaszania aktywności komórek efektorowych poprzez blokowanie transkrypcji kluczowych dla ich funkcjonowania genów. Wykazano, iż rolę tzw. wczesnego represora pełni w komórkach docelowych białko ICER (ang. *Inducible cAMP Early Repressor*), którego ekspresję reguluje wytwarzany przez limfocyty T_{reg} cykliczny AMP. Samodzielnie lub w połączeniu z takimi represorami jak NFAT, PPRG, p21SNFT, ICER, hamuje w komórkach efektorowych produkcję licznych cytokin, a w szczególności IL-2 i IL-4 [66,67].

1.1.3.2 Mechanizmy supresji pośredniej

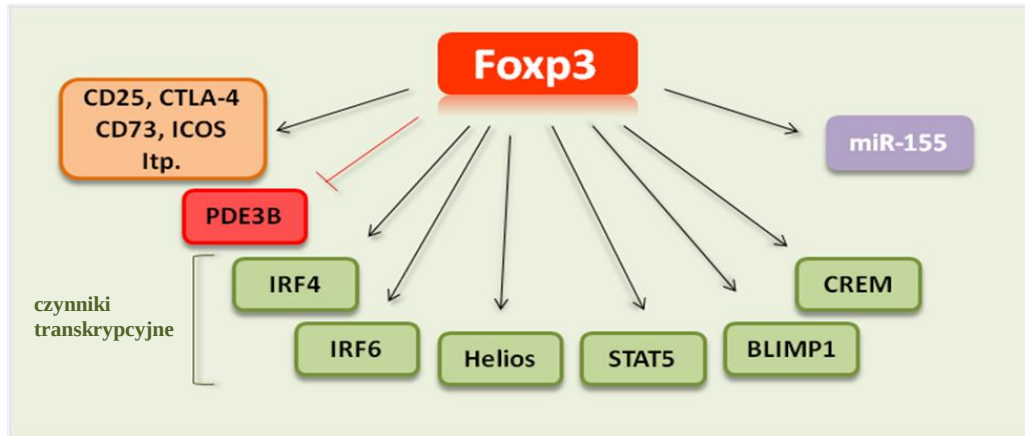
Molekularny mechanizm supresji przy udziale cząsteczki CTLA-4 jest najlepiej poznaną formą oddziaływania limfocytów T_{reg} na komórki APC. Interakcja tego białka z jego ligandami, tj. CD80 i CD86, występującymi na komórkach dendrytycznych, hamuje następujący w warunkach fizjologicznych, po kontakcie z komórkami efektorowymi, wzrost ekspresji tychże molekuł [68,69]. W efekcie, zdolność komórek dendrytycznych do stymulacji dziewiczych limfocytów T w trakcie interakcji CD80/86-CD28 ulega znacznemu ograniczeniu, co prowadzi do rozwoju tolerancji immunologicznej. Oddziaływanie limfocytów T_{reg} z komórkami APC może ponadto wzmagać w tych ostatnich produkcję białka o aktywności oksygenazy (ang. *indoleamine 2,3-dioxygenase*, IDO). Enzym ten katalizuje degradację tryptofanu do kynureniny - proapoptotycznego metabolitu, który wykazuje działanie supresorowe wobec komórek efektorowych, poprzez zatrzymanie ich cyklu komórkowego [70]. Limfocyty T_{reg} „osłabiają” również funkcje immunostymulujące komórek dendrytycznych, za pośrednictwem cząsteczki LAG-3. Białko to, będąc homologiem glikoproteiny CD4, wiąże się z wysokim powinowactwem z występującymi na komórkach APC cząsteczkami MHC klasy II, co indukuje sygnał hamujący dojrzewanie tych ostatnich [71]. Do obniżenia poziomu ekspresji cząsteczek CD80 i CD86 na powierzchni komórek dendrytycznych dochodzi również w wyniku oddziaływania białka FGL-2 (ang. *fibrynogen-like protein 2*) produkowanego przez limfocyty T_{reg} , z receptorem hamującym FcγRIIB (ang. *Fc gamma receptor IIb*) obecnym na komórkach APC [72]. Hamowanie funkcji komórek

APC wykazuje ponadto obecny na powierzchni ok. 50% ludzkich limfocytów T_{reg} ektoenzym – CD39, hydrolizujący zewnątrzkomórkowy ATP do ADP i AMP [73]. Skutkuje to usunięciem ATP z przestrzeni pozakomórkowej, co zapobiega indukcji ekspresji cząsteczki CD86 na komórkach APC i wygasa proces zapalny. Immunomodulujący efekt usuwania ATP przez CD39 może ulec wzmocnieniu poprzez generowanie adenozyiny. Proces ten zachodzi przy udziale 5'-ekto-nukleotydu (CD73), która defosforyluje AMP uzyskiwany w reakcji katalizowanej przez CD39. Powstająca w ten sposób adenozyina, wiążąc się ze swoim receptorem - A2A (ang. *adenosine A2A receptor*) na komórkach dendrytycznych, wpływa hamująco na ich funkcję poprzez indukowanie wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP [74]. Mechanizm supresji pośredniej limfocytów T_{reg} wobec niedojrzałych komórek APC wykazuje również białko neurofilina [75]. Wiąże się ona z komórkami APC, przez co wydłuża znacznie czas ich oddziaływania z komórkami T_{reg} , zmniejszając tym samym zdolność do prezentacji konwencjonalnych antygenów limfocytom efektorowym.

1.1.4 Czynniki transkrypcyjne Foxp3 - marker limfocytów T_{reg}

Czynnik transkrypcyjny Foxp3, uznawany za najbardziej specyficzny marker limfocytów T_{reg} , jest odpowiedzialny za powstawanie i prawidłowe funkcjonowanie tychże komórek. Aktywuje, bądź też hamuje, ekspresję ponad 700 różnych genów człowieka [76-78]. Wykazuje zdolność wiązania m. in. do promotorów genów kodujących białka biorące udział w przekazywaniu sygnału (np. ZAP-70, PTPN22), czynniki transkrypcyjne (np. CREM, Helios, BLIMP1), cytokiny, cząsteczki występujące na powierzchni komórek, enzymy biorące udział w metabolizmie (głównie PDE3B) oraz cząsteczki microRNA (zwłaszcza miR-155), które wydają się odgrywać istotną rolę w powstawaniu limfocytów T_{reg} (Rys. 5).

Rysunek 5. Regulacja transkrypcji przez czynnik Foxp3. Czynnik Foxp3 reguluje, w sposób bezpośredni, transkrypcję takich genów, jak CD25, CTLA4, CD73 (charakterystyczne dla limfocytów T_{reg}), PDE3b, miR-155, oraz szereg czynników transkrypcyjnych (IRF4, IRF6, Helios, STAT5, BLIMP1, CREM), które w dalszej kolejności regulują ekspresję innych genów [78].



Wykazano, iż wzrost poziomu ekspresji Foxp3 powoduje wzrost transkrypcji takich cząsteczek, jak: CD25, CTLA-4 i GITR, jak również CD134, CD103, CD39, CD73, odpowiadając tym samym za rozwój prawidłowego fenotypu limfocytów T_{reg} [30,79,80]. Natomiast negatywnej regulacji podlega produkcja niektórych cytokin, takich jak np.: IL-2, IL-4 i IFN- γ oraz ekspresja łańcucha α receptora dla IL-7 [77,78].

1.1.4.1 Budowa genu *FOXP3*

Gen *FOXP3* zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu X, w regionie 11.23-13.3 [81,82]. Składa się z 11 egzonów i koduje białko o masie 48 kDa, złożone z 421 aminokwasów. Gen ten koduje cztery funkcjonalnie czynne domeny białkowe, tj. domenę FKH (*forkhead/winged helix domain*), uczestniczącą w wiązaniu z DNA, bogatą w prolinę domenę represorową, motyw palca cynkowego oraz motyw zamka leucynowego. Dwie ostatnie biorą prawdopodobnie udział w dimeryzacji czynnika Foxp3, która odgrywa kluczową rolę w zachowaniu regulatorowego charakteru białka. Z kolei, domena represorowa znajdująca się na N-końcowym, aminowym odcinku Foxp3, reguluje transkrypcję kontrolowanych przez Foxp3 genów.

1.1.5 Rola limfocytów T_{reg} w patomechanizmie wybranych chorób człowieka

Aktywność limfocytów T_{reg} tworzy istotny mechanizm regulacyjny, przy pomocy którego układ odpornościowy w precyzyjny sposób przyczynia się do zachowania szeroko pojętej homeostazy. Dotychczasowe badania potwierdzają, iż zaburzenia dotyczące liczebności i/lub funkcji komórek o fenotypie CD4⁺CD25⁺⁺ mogą odgrywać kluczową rolę w patomechanizmie chorób zapalnych/autoimmunizacyjnych, alergicznych, infekcyjnych, nowotworowych, oraz w zjawiskach immunoregulacyjnych związanych z odrzucaniem/utrzymaniem funkcji przeszczepionych tkanek i/lub narządów.

Obniżony odsetek krążących limfocytów T_{reg} obserwowano u pacjentów cierpiących z powodu toczenia rumieniowatego układowego (ang. *systemic lupus erythematosus*, SLE), w aktywnej fazie choroby [83]. Upośledzone w SLE funkcje supresorowe tychże komórek prowadziły do utraty tolerancji na własne antygeny, co skutkowało poliklonalną aktywacją limfocytów B i wytwarzaniem autoprzeciwciał [84]. Nieprawidłowości dotyczące liczebności, jak i funkcji limfocytów T_{reg}, opisano również w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów (ang. *rheumatoid arthritis*, RA) [85]. Podczas, gdy poziom tych komórek był istotnie obniżony w krwi obwodowej, w stawach objętych procesem zapalnym stwierdzano podwyższoną ich liczbę, co sugerowało zdolność tych komórek do migracji, celem ewentualnej kontroli nadmiernie intensywnego procesu zapalnego. W badaniach *in vitro*, limfocyty T_{reg} uzyskane od pacjentów z RA wykazywały zdolność hamowania proliferacji autologicznych komórek efektorowych, jednakże wywierały słaby efekt supresorowy na wytwarzanie prozapalnych cytokin (głównie TNF α), zarówno przez limfocyty efektorowe, jak i monocyty [86]. Podobny, funkcjonalny defekt komórek regulatorowych, opisano u chorych z sarkoidozą [87]. Obserwowano gromadzenie się limfocytów T_{reg} w objętych procesem chorobowym narządach ale, w przeciwieństwie do pacjentów z RA, także wzrost ich liczebności w krwi obwodowej pacjentów. Osłabioną aktywność supresorową limfocytów T_{reg} obserwowano ponadto w stwardnieniu rozsianym (ang. *multiple sclerosis*, MS) oraz w łuszczycy [88,89]. W obu przypadkach, izolowane od pacjentów komórki CD4⁺CD25⁺⁺ wykazywały obniżoną zdolność hamowania proliferacji i wydzielania cytokin przez limfocyty efektorowe, w porównaniu z osobami zdrowymi. Coraz częściej podkreśla się także udział limfocytów T_{reg} w patomechanizmie insulinozależnej cukrzycy typu I (ang. *type 1 diabetes*, T1D) [90]. Jak wykazano na modelu mysim, podanie izolowanych komórek CD4⁺CD25⁺⁺

chroni zwierzęta przed rozwojem tej choroby na wczesnych etapach jej trwania, na co może wpływać produkowany przez limfocyty T_{reg} TGF- β . Podejmuje się również pierwsze próby kliniczne terapii T1D u dzieci, przy udziale autologicznych, namnożonych i aktywowanych *ex vivo* limfocytów T_{reg} .

Uważa się, iż zaburzona równowaga pomiędzy limfocytami T_{reg} aktywowanymi alergenem, a komórkami efektorowymi Th2, może być przyczyną występowania chorób alergicznych. Wykorzystując mysz model astmy wykazano, iż obniżona liczba krążących limfocytów T_{reg} wiązała się z nadreaktywnością oskrzeli, a poziom ekspresji mRNA dla Foxp3 w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych był wyższy, w porównaniu do grupy kontrolnej [91,92].

Nieprawidłowości związane z limfocytami T_{reg} opisywano także w różnego rodzaju infekcjach wirusowych. Zwiększoną liczbę jak i aktywność tych komórek obserwowano m.in. w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu B i C, gdzie limfocyty T_{reg} hamowały odpowiedź przeciwwirusową zależną od limfocytów T $CD4^+$ i $CD8^+$, sprzyjając tym samym podtrzymywaniu długotrwałej wirerii [93,94]. Podobne wyniki uzyskano w przypadku infekcji wirusem opryszczki pospolitej typu 1 i 2, wirusem Epsteina-Barr (ang. *Epstein-Barr virus*, EBV) oraz wirusem cytomegalii, w przebiegu których populacja komórek T_{reg} hamowała odpowiedź immunologiczną mediowaną przez limfocyty T [95,96]. Z kolei, obniżony poziom prawidłowo funkcjonujących limfocytów T_{reg} u pacjentów zakażonych wirusem ludzkiej białaczki z komórek T (ang. *human T-lymphotropic virus 1*, HTLV-1), może przyczyniać się do występowania wielonarządowych nacieków limfocytowych [97]. Nie ma bezpośrednich dowodów na to, że mediowana przez T_{reg} immunosupresja odpowiada za nieudaną eliminację wirusa ludzkiego niedoboru odporności z organizmu gospodarza. Wykazano jednak w warunkach *in vitro* potencjalną zdolność tych komórek do wygaszania mediowanej przez limfocyty T $CD4^+$ i $CD8^+$ odpowiedzi przeciwwirusowej, co ostatecznie może sprzyjać rozwojowi pełnoobjawowej postaci AIDS [98].

Na podstawie badań *in vitro* można wnioskować, iż limfocyty T_{reg} hamują *in vivo* aktywność immunologiczną skierowaną przeciw komórkom nowotworowym. Podwyższony poziom krążących komórek T_{reg} opisano w szeregu nowotworów występujących u ludzi, m.in. w raku jajnika i sutka, raku płuca, żołądka, trzustki, w czerniaku i w chłoniakach nieziarniczych [99-106]. We wspomnianych schorzeniach odsetek limfocytów T_{reg} krążących w krwi obwodowej był z reguły skorelowany odwrotnie proporcjonalnie ze wskaźnikami przeżywalności pacjentów.

1.1.5.1 Zaburzenia limfocytów T_{reg} w pierwotnych niedoborach odporności

Zaburzenia dotyczące subpopulacji limfocytów T_{reg} , skutkują nieprawidłową regulacją odpowiedzi immunologicznej. Mogą wiązać się z całkowitym lub częściowym brakiem tych komórek, lub z defektami dotyczącymi ich funkcji. Zaburzenia te mogą występować pod postacią odrębnych zespołów pierwotnych niedoborów odporności, lub też jako jeden z defektów im towarzyszących.

1.1.5.1.1 Zespół IPEX

Zespół immunodysregulacyjny sprzężony z chromosomem X, z poliendokrynopatią i enteropatią (ang. *Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked syndrome*, IPEX), opisany został po raz pierwszy w 1982 roku przez Powella [107,108]. Jego bezpośrednią przyczyną jest mutacja genu *FOXP3*. Objawy kliniczne tego niedoboru występują już we wczesnym dzieciństwie i wynikają z braku funkcjonalnie czynnych limfocytów T_{reg} . Najczęściej występują objawy ze strony przewodu pokarmowego, obejmujące m.in. ciężkie wodniste biegunki i alergie pokarmowe, zwykle współwystępujące z atopowym zapaleniem skóry, a także endokrynopatie autoimmunologiczne dotyczące najczęściej trzustki i tarczycy. Insulinozależną cukrzycę typu I wykrywa się już często w ciągu pierwszego roku życia. Do pozostałych objawów należą: autoimmunizacyjne choroby hematologiczne (niedokrwistość hemolityczna z pozytywnym odczynem Coombsa, małopłytkowość lub neutropenia), choroby nerek (śródmiąższowe zapalenie nerek, błoniaste kłębuszkowe zapalenie nerek), autoimmunizacyjne zapalenie wątroby oraz zaburzenia neurologiczne. W celu uniknięcia nieodwracalnych zmian wielonarządowych, we wczesnej fazie choroby zalecany jest allogeniczny przeszczep komórek macierzystych szpiku kostnego.

1.1.5.1.2 Niedobór CD25

Opisany w 1997 roku niedobór CD25 – łańcucha α współtworzącego receptor o wysokim powinowactwie do IL-2 - wywołuje zbliżony do zespołu IPEX (ang. *IPEX-like syndrome*) niedobór odporności [109]. Głównymi objawami tego schorzenia są: masywne powiększenie obwodowych narządów limfatycznych, hepatosplenomegalia, limfadenopatia, oraz choroby zapalne jelit. Pacjenci prezentują ponadto szereg objawów które nie występują

w zespole IPEX, przede wszystkim zwiększoną podatność na infekcje – głównie wirusami z rodziny *Herpesviridae*. Pomimo, iż IL-2 odgrywa kluczową rolę w powstawaniu limfocytów T_{reg} , we krwi obwodowej pacjentów stwierdza się zazwyczaj prawidłowy ich odsetek. Występuje jednak znaczne upośledzenie funkcji tych komórek, które przejawia się m.in. zahamowaniem produkcji IL-10.

1.1.5.1.3 Inne pierwotne niedobory odporności

Pierwotnym niedoborom odporności relatywnie często współtowarzyszą schorzenia autoimmunizacyjne. Uwzględniając kluczową rolę limfocytów T_{reg} w utrzymaniu stanu tolerancji na własne antygeny, w grupie pacjentów ze schorzeniami układu odpornościowego opisano różnego rodzaju zaburzenia dotyczące zarówno liczby, jak i funkcji tych komórek. Niski odsetek limfocytów T_{reg} opisywano u pacjentów z zespołem limfoproliferacyjnym związanym z chromosomem X (ang. *X-linked lymphoproliferative syndrome*, XLP), któremu towarzyszyły przypadki nieswoistego zapalenia jelit [110,111]. Wyraźnie zmniejszoną liczbę komórek o fenotypie $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ obserwowano również we krwi obwodowej pacjentów z CVID, u których stwierdzano współwystępowanie różnego typu schorzeń autoimmunizacyjnych [112-116]. U pacjentów z zespołem Wiskotta-Aldricha, oprócz obniżonej liczby limfocytów o fenotypie $CD4^+CD25^+$, odnotowano również osłabioną aktywność supresorową tych komórek [117,118]. Zaburzenia dotyczące generowania nT_{reg} opisano w zespole Omenna, natomiast dotyczące iT_{reg} stwierdzono w zespole hiper-IgE [119,120].

1.1.6 Perspektywy wykorzystania terapeutycznego limfocytów T_{reg}

Immunoterapia z użyciem limfocytów T_{reg} stwarza potencjalnie duże możliwości leczenia różnego typu schorzeń o podłożu immunologicznym. W zależności od potrzeb, opiera się ona na wytworzeniu u pacjentów stanu wzmożonej supresji, bądź też aktywacji układu odpornościowego. W pierwszym przypadku, wzrost liczebności i/lub aktywności limfocytów T_{reg}, uzyskuje się m.in. poprzez kontrolowaną w warunkach *in vitro* ekspansję tych komórek po stymulacji przeciwciałami anty-CD3 i anty-CD28, w obecności IL-2 [121,122]. Indukowane w ten sposób komórki zachowują swoistość antygenową i posiadają zdolność hamowania odpowiedzi immunologicznej. Eksperymentalna terapia adoptywna z użyciem transferu limfocytów T_{reg} znajduje potencjalne zastosowanie w zapobieganiu rozwojowi chorób autoimmunizacyjnych, zapalnych, jak również alergicznych. Obecnie trwają zaawansowane próby wykorzystania komórek supresorowych w leczeniu eksperymentalnego autoimmunizacyjnego zapalenia mózgu, zapalenia śluzówki żołądka, zapalenia tarczycy, jajników, SLE i chorób zapalnych jelit, a także wcześniej wykrytej cukrzycy typu I u dzieci [123-133]. Planuje się także zastosowanie tych komórek w zapobieganiu wystąpienia choroby „przeszczep przeciwko gospodarzowi” [134]. Opracowywane są również strategie terapeutyczne mające na celu zmniejszanie liczebności i/lub osłabienie aktywności supresorowej limfocytów T_{reg}. Tego typu rozwiązanie może być wykorzystane w leczeniu przewlekłych infekcji wirusowych i bakteryjnych, jak również w terapii przeciwnowotworowej. W tym celu próbuje się hamować ekspresję białka Foxp3, jego wiązanie z DNA, neutralizuje się cytokiny niezbędne do prawidłowego funkcjonowania limfocytów T_{reg} oraz blokuje cząsteczki CD25, CTLA-4 i GITR na ich powierzchni przy użyciu odpowiednich przeciwciał monoklonalnych [135-139].

Pomimo ogromnego postępu, jakiego dokonano w poznawaniu mechanizmów tolerancji obwodowej mediowanej przez limfocyty T_{reg}, pewne kwestie, dotyczące głównie ich aktywności supresorowej wobec pozostałych komórek immunokompetentnych, wciąż pozostają niejasne. Ingerencje terapeutyczne skutkujące zmianami liczebności limfocytów T_{reg} i/lub modyfikacją ich aktywności, stwarzają zatem potencjalne zagrożenie niezamierzonej dysregulacji funkcjonalnej układu odpornościowego.

1.2 Pierwotne niedobory odporności

Pierwotne niedobory odporności (ang. *primary immunodeficiencies*, PIDs) to grupa genetycznie uwarunkowanych schorzeń układu odpornościowego, które predysponują cierpiących z ich powodu chorych do częstych i/lub ciężkich infekcji oraz - w wyniku szeroko pojętej dysfunkcji mechanizmów immunoregulacyjnych – do występowania schorzeń autoimmunizacyjnych, alergicznych oraz nowotworowych.

Średnia częstotliwość wystąpienia PIDs w populacji ogólnej wynosi (w przybliżeniu) 1:2,500 żywo urodzonych niemowląt, ale różni się dość znacznie w zależności od rodzaju niedoboru i badanej populacji [140-143].

Zaawansowanie nowoczesnych metod badawczych, zwłaszcza technik molekularnych, umożliwiło identyfikację blisko 200 różnych fenotypowo rodzajów PIDs [144]. Większość z nich, to dość dobrze scharakteryzowane choroby monogenowe, w około 170 przypadkach o ustalonym *locus* genowym. Odkrycia te wyjaśniły przy okazji szereg molekularnych i komórkowych mechanizmów immunoregulacyjnych. Oszacowano m. in., iż może istnieć ponad 1,000 genów biorących udział w prawidłowym rozwoju, różnicowaniu, funkcjonowaniu i kooperacji różnych subpopulacji leukocytów. Na tej podstawie zakłada się, iż wiele potencjalnie istniejących PIDs nie zostało do tej pory zidentyfikowanych, co sugeruje pilną potrzebę badań nad zrozumieniem patomechanizmów tych chorób.

1.2.1 Niedobory odporności z przewagą zaburzeń produkcji przeciwciał

Ponad połowę diagnozowanych PIDs stanowią zaburzenia dotyczące produkcji przeciwciał, występujące najczęściej w wieku rozwojowym, ale diagnozowane również i u osób dorosłych. Pomimo różnorodnych defektów genetycznych leżących u ich podłoża, wszystkie niedobory odporności humoralnej łączy podobny obraz kliniczny, wynikający z upośledzonej syntezy przeciwciał. Ponad 90% pacjentów prezentuje, zazwyczaj w drugiej połowie pierwszego roku życia, nawracające zakażenia układu oddechowego, głównie o etiologii bakteryjnej. Dość powszechne są również infekcje przewodu pokarmowego, zakażenia dróg moczowych, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, przewlekłe stany

zapalne kości, stawów i skóry [145,146]. Obserwuje się ponadto nawracające zakażenia wirusowe oraz wzmożone występowanie chorób o podłożu autoimmunizacyjnym [147,148]. Niedobór przeciwciał może być wynikiem szeregu defektów zakłócających powstawanie i/lub dojrzewanie limfocytów B, bądź też prawidłowe ich funkcjonowanie [146].

Z powodu wysokich wskaźników zachorowalności i śmiertelności, kluczową rolę w przypadku niedoborów odporności humoralnej odgrywa wdrożona odpowiednio wcześniej specjalistyczna diagnostyka oraz następową specyficzną terapią [145].

Do najczęstszych niedoborów odporności humoralnej, które charakteryzuje upośledzona produkcja immunoglobulin przez zwykle obecne limfocyty B, należą: przejściowa hypogammaglobulinemia wieku dziecięcego (ang. *transient hypogammaglobulinemia of infancy*, THI), pospolity zmienny niedobór odporności (ang. *common variable immunodeficiency*, CVID) oraz wybiórczy (izolowany) niedobór IgA (ang. *selective IgA deficiency*, SIgAD) [149].

1.2.2 Przejściowa hipogammaglobulinemia wieku dziecięcego (THI)

Pierwotny niedobór odporności humoralnej, znany pod nazwą przejściowej hipogammaglobulinemii wieku dziecięcego (THI), opisany został po raz pierwszy w 1956 roku przez dwóch amerykańskich immunologów - Davida Gitlina i Charlesa A. Janeway'a [150]. W swoim artykule zatytułowanym „Agammaglobulinemia, congenital, acquired and transient forms”, autorzy uznali ten rodzaj niedoboru za wydłużenie okresu fizjologicznej hipogammaglobulinemii niemowląt, który występuje z reguły pomiędzy 3 a 6 miesiącem życia i jest wypadkową katabolizmu/zużycia matczynej immunoglobulin (okres ich półtrwania wynosi w przybliżeniu 21 dni), oraz opóźnionej w czasie syntezy własnych. Jako kryterium diagnostyczne tej choroby przyjmuje się obecnie obniżenie surowiczego poziomu IgG poniżej dwóch odchyłeń standardowych (SD) dla badanego przedziału wiekowego, któremu może towarzyszyć jednocześnie upośledzone wytwarzanie immunoglobulin klasy IgA, rzadziej IgM [151-153]. Brak ściśle określonych kryteriów definiujących to schorzenie powoduje, iż wstępne rozpoznanie ustalane jest dopiero po wykluczeniu innych przyczyn hipogammaglobulinemii, a definitywna diagnoza stawiana jest z reguły retrospektywnie.

Przyczyny obniżonej produkcji immunoglobulin u pacjentów z THI oraz mechanizmy ich późniejszej normalizacji, pozostają w dużej mierze nieznane.

1.2.2.1 Częstość występowania THI

THI jest jednym z czterech najczęściej występujących pierwotnych niedoborów odporności humoralnej u dzieci. Dotyczy w jednakowym stopniu niemowląt płci męskiej, jak i żeńskiej, bez względu na rasę. Rzeczywiste rozpowszechnienie tej formy hipogammaglobulinemii pozostaje ciągle kwestią sporną, ze względu na rozbieżne dane pochodzące z ośrodków diagnozujących PIDs na całym świecie [154]. Ponadto, wiele przypadków tego niedoboru nie zostaje odnotowanych, ze względu na swój przejściowy charakter lub bezobjawowy przebieg u niektórych chorych oraz brak jednoznacznych kryteriów diagnostycznych [155]. W USA częstość występowania THI szacowana jest na około 0,061-1,1 przypadków na 1000 żywych urodzeń. Z kolei, na podstawie badań przeprowadzonych w Japonii wynika, iż stanowi ona 18,5 % PIDs [156]. Jednakże od dawna sugeruje się, że statystyki te są zaniżone, i częstość THI może być zbliżona do obserwowanej w przypadku najbardziej powszechnie występującego niedoboru odporności humoralnej, jakim jest SIgAD [156,157]. W oparciu o dane udostępnione przez organizacje grupujące badaczy zajmujących się pierwotnymi niedoborami odporności wynika, iż z roku na rok rośnie liczba pacjentów objętych diagnostyką i specjalistyczną opieką immunologów klinicznych. Wzrasta tym samym liczba osób, u których poprawnie rozpoznaje się pierwotne niedobory odporności, w tym THI. Liczba rozpoznawanych przypadków tego niedoboru różni się jednak znacznie, w zależności od kraju.

1.2.2.2 Patomechanizmy THI

Dotychczasowe badania wskazują na szeroką skalę zaburzeń związanych z funkcjonowaniem układu odporności u pacjentów z THI. Należą do nich m.in.: opóźnione dojrzewanie limfocytów B, niedobory limfocytów T pomocniczych (Th), jak również zaburzenia dojrzewania limfocytów T, co w konsekwencji nieprawidłowej kooperacji międzykomórkowej może skutkować również upośledzeniem funkcji limfocytów B [154]. Pomimo wielu zaproponowanych rozwiązań, patomechanizmy rozwoju THI nie są do chwili obecnej w pełni poznane.

1.2.2.2.1 Teoria matczyno-płodowej niezgodności antygenowej

Pierwszą próbę wyjaśnienia przyczyn przejściowo obniżonego poziomu gammaglobulin u dzieci podjął Fudenberg opisując tzw. matczyno-płodową niezgodność antygenową w obrębie allotypów immunoglobulin [158]. Opierał się on na założeniu, iż antygenowe różnice ludzkich 7S γ -globulin (IgG) warunkowane są przez kodominujące allele dwóch niezależnych loci: Gm i Inv, podlegających dziedziczeniu według praw Mendla. Przeciwciała anty-globulinowe, specyficzne dla różnych allotypów, wykrywano m.in. w surowicy biorców krwi oraz u dzieci, którym z powodu choroby hemolitycznej przetaczano krew. Czynniki Gm(a) i Gm(b) były obecne w cząsteczkach 7S γ -globulin (IgG) i były podstawą wyróżniania tzw. genetycznych allotypów γ -globulin (typu Gm). Ich powstawanie warunkowane było występowaniem mutacji w obrębie genów kodujących podklasy IgG, które powodują niewielkie zmiany ich sekwencji aminokwasowych, dzięki czemu u różnych osobników ulegały ekspresji różne formy allotypowe. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że już niewielka ilość produkowanych przez płód gammaglobulin była wystarczająca do immunizacji matki niezgodnym allotypem Gm, i mogła następować już w 7 miesiącu ciąży. Produkowane w odpowiedzi na alloimmunizację przez organizm matki przeciwciała anty-Gm (klasy IgG) mogły być transportowane do organizmu płodu i hamować u niego produkcję immunoglobulin. Tego typu przeciwciała wykryto w surowicy dwóch z czterech badanych matek, których dzieci kilka miesięcy po porodzie rozwinęły stan przemijającej hipogammaglobulinemii. Przeprowadzone kilka lat później przez Nathensona badania, na dużo większej grupie pacjentów, nie potwierdziły w pełni tej hipotezy [159].

1.2.2.2.2 THI jako heterozygotyczna postać hipogammaglobulinemii

W oparciu o badania nad rodzinnym występowaniem PIDs, prowadzone m.in. przez Soothilla, pojawiły się przypuszczenia, iż THI prezentuje heterozygotyczną postać innej formy hipogammaglobulinemii - dziedziczonej autosomalnie recesywnie [159,160]. Sugerowano, iż THI może być łagodną manifestacją efektu ekspresji pojedynczego, bliżej nieznanego genu, objawiającego się w fenotypie heterozygoty. Obecnie wiadomo, iż rodzinne występowania THI stwierdza się u 20-25% pacjentów, co potwierdzałoby niniejszą teorię.

1.2.2.2.3 Rola limfocytów T helper w etiopatogenezie THI

Przeprowadzone w 1981 roku przez Siegela badania wskazały kolejny możliwy patomechanizm rozwoju przejściowej hipogammaglobulinemii [161]. W grupie 17 pacjentów z THI oznaczona liczebność krążących limfocytów B, jak i ich zdolność do syntezy immunoglobulin (po stymulacji wirusem EBV), nie odbiegały od normy. Stwierdzono natomiast wyraźnie obniżoną zdolność limfocytów B do syntezy IgG w odpowiedzi na ich nieswoistą stymulację mitogenem szkarłatki (ang. *pokweed mitogen*, PWM), który również aktywuje te komórki do produkcji immunoglobulin na drodze niezależnej od limfocytów T. Jednocześnie, w testach funkcjonalnych, nie wykazano u wspomnianych chorych zwiększonej aktywności komórek supresorowych. U wszystkich pacjentów z objawową THI obserwowano natomiast zmniejszoną liczebność limfocytów T pomocniczych CD4⁺ (Th), przy czym poziom tych komórek wzrastał do obserwowanego u zdrowych osób, w miarę normalizacji stężeń immunoglobulin oraz stanu klinicznego chorych. Uzyskane wyniki wskazywały, iż przyczyną obniżonej produkcji IgG w THI mogą więc być zaburzenia związane zarówno z liczebnością, jak i funkcją limfocytów Th wspomagających swoistą odpowiedź typu humoralnego.

1.2.2.2.4 THI jako wynik zaburzonej produkcji cytokin

Oceniając poziom cytokin w nadsączach hodowlanych z komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) izolowanych od pacjentów z THI wykazano w nich zwiększony, w odniesieniu do zdrowych dzieci, poziom TNF- α , TNF- β , jak również IL-10 [162]. Obserwacje prospektywne pozwoliły stwierdzić, iż normalizacji poziomu IgG (bez stosowania terapii substytucyjnej immunoglobulinami) towarzyszył spadek produkcji obu typów TNF, natomiast produkcja IL-10 pozostawała niezmienną. Hamujący wpływ egzogenego TNF- α oraz TNF- β na produkcję IgG i IgA przez prawidłowe limfocyty B potwierdzono w badaniach *in vitro* [163]. W świetle powyższych obserwacji postuluje się, iż podwyższony w surowicy poziom niektórych cytokin, w szczególności TNF- α i TNF- β , może odpowiadać za polaryzację równowagi układu odpornościowego w kierunku przewagi aktywności funkcjonalnej limfocytów pomocniczych Th1, kosztem limfocytów Th2. Zjawisko to wydają się potwierdzać wyniki przeprowadzonych u dzieci z THI długoterminowych obserwacji prospektywnych. Niskiemu poziomowi immunoglobulin w surowicy pacjentów towarzyszył początkowo wysoki poziom

IL-12 i IL-18, które odgrywają istotną rolę w różnicowaniu limfocytów Th1. Z kolei, po normalizacji poziomu IgG, poziom tych cytokin ulegał obniżeniu [162]. Na obserwowaną u pacjentów z THI przewagę odpowiedzi typu Th1 może mieć również wpływ podwyższona liczebność monocytów wykazujących wewnątrzkomórkową ekspresję IL-12. Nadmierna produkcja tej cytokiny (z nieznanych przyczyn) może więc być istotnym czynnikiem patogenetycznym przejściowej hipogammaglobulinemii u dzieci.

1.2.2.2.5 THI a zaburzona ekspresja cząsteczki CD40 na monocytach

Jednym z mechanizmów regulujących produkcję przeciwciał jest oddziaływanie pomiędzy receptorem błonowym CD40, wykazującym ekspresję na limfocytach B, monocytach i komórkach dendrytycznych, a jego ligandem – CD40L (CD154), obecnym na aktywowanych limfocytach T. Ich wzajemne interakcje odpowiadają m.in. za zjawisko przełączania izotypu przeciwciał produkowanych przez limfocyty B. U dzieci z THI zaobserwowano spadek poziomu ekspresji cząsteczek CD40 na monocytach, podczas gdy ekspresja CD40L na limfocytach T była porównywalna z grupą kontrolną. Wyniki przeprowadzonych badań sugerowały, iż znaczne obniżenie poziomu ekspresji CD40 na monocytach u dzieci z THI (37% komórek pozytywnych) w porównaniu z grupą kontrolną (81% komórek pozytywnych), może być jednym z czynników odpowiedzialnych za nieprawidłowe interakcje pomiędzy komórkami prezentującymi antygen i limfocytami T, co w konsekwencji może prowadzić do spadku produkcji immunoglobulin [164].

1.2.2.3 Obraz kliniczny i etiologia zakażeń w THI

U pacjentów cierpiących z powodu PIDs, niezależnie od rodzaju tego niedoboru, zakażenia mają charakter przewlekły, nawracający, często z tendencją do uogólniania się. Wywoływane są nie tylko przez patogenne, ale również i oportunistyczne drobnoustroje, a większość infekcji ma bardziej burzliwy przebieg, niż u osób z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym. W przypadku THI, wyodrębnić można dwie grupy pacjentów. Pierwszą z nich tworzą dzieci, u których przebieg choroby jest bezobjawowy, a obniżony poziom immunoglobulin wykrywany jest zazwyczaj przypadkowo w trakcie badania członków rodzin obciążonych występowaniem niedoboru odporności. W drugiej grupie dzieci, dominującym objawem klinicznym, będącym najczęściej powodem skierowania celem przeprowadzenia pełnej diagnostyki immunologicznej, są ciężkie zakażenia występujące już

w pierwszych miesiącach życia [165,166]. Zwykle dotyczą one układu oddechowego. Stanom zapalnym oskrzeli i - nieco rzadziej – płuc, towarzyszą nawracające, bakteryjne zapalenia ucha środkowego, zatok obocznych i błony śluzowej nosa oraz jamy ustnej [152]. Rzadziej rozpoznawane są infekcje kości lub stawów. Zakażenia przewodu pokarmowego, drugie pod względem częstości występowania u pacjentów z niedoborem przeciwciał, w THI dotyczą około 8% pacjentów [166,167]. Z kolei, u ponad połowy stwierdza się w badaniu histopatologicznym nacieki zapalne w obrębie śluzówki jelita cienkiego [165]. W obrazie klinicznym THI dość powszechne są również schorzenia atopowe, alergie i nietolerancje pokarmowe, które dotyczą, według niektórych źródeł, nawet 80% chorych [152,168]. Opisywane jest relatywnie częste występowanie astmy oraz atopowego zapalenia skóry [154,168,169]. Znacznie rzadziej okresowi przejściowej hipogammaglobulinemii towarzyszą zakażenia wirusowe i grzybicze, choć opisywano przypadki ciężkich infekcji wirusem ospy wietrznej i półpaśca, jak i przewlekłe kandydozy jamy ustnej [166]. Ponadto, donoszono o zakażeniach enterowirusami, głównie ECHO lub polio, i to zarówno szczepem dzikim, jak też szczepionkowym [166]. Niewielki odsetek dzieci prezentuje tzw. ciężką objawową postać THI, związaną z zapaleniem, najczęściej meningokokowym, opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu, oraz sepsą bakteryjną, która może doprowadzić do niewydolności wielonarządowej, a nawet być przyczyną zgonu [165,170,171].

1.2.2.4 THI w ocenie laboratoryjnej

Zdecydowana większość pacjentów z THI w badaniach laboratoryjnych prezentuje obniżone stężenie IgG w surowicy, poniżej dwóch odchyłeń standardowych dla wieku ($<2SD$), któremu mogą towarzyszyć niskie stężenie IgA (80% przypadków), rzadziej IgM (30-50% chorych) [149]. Oznaczane u ponad połowy pacjentów całkowite stężenie immunoglobulin wskazujące na niedobór przeciwciał, wykazuje poziom niższy niż 4 g/l, a stężenie IgG niższy niż 2 g/l [152,171]. Poziom IgG poniżej 1 g/l sugeruje już zazwyczaj trwały niedobór odporności. Podwyższone poziomy IgE są zazwyczaj skutkiem współistniejących niekiedy u dzieci z THI schorzeń o atopowym podłożu alergicznym. Badanie morfologiczne krwi może ujawniać łagodną neutropenię, niekiedy również trombocytopenię [149,157]. Badania immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej (przeprowadzone przy użyciu metod cytometrii przepływowej), obejmujące pomiar liczby bezwzględnej i odsetka subpopulacji limfocytów T, B oraz komórek NK, nie wykazują zazwyczaj nieprawidłowości. U niektórych pacjentów obserwuje się niekiedy niewielkie

zaburzenia ich liczebności, najczęściej limfocytów T CD8⁺, w dalszej kolejności – CD4⁺ i limfocytów B [165]. Reaktywność limfocytów oceniana w testach proliferacyjnych po stymulacji antygenami i/lub mitogenami (fitohemaglutynina, konkanawalina-A, mitogen szkarłatki, antygeny *Candida*) jest zazwyczaj prawidłowa.

Pomocniczym badaniem odporności humoralnej jest ocena stężenia swoistych przeciwciał poszczepiennych. U większości dzieci z THI stwierdza się prawidłową odpowiedź na antygeny białkowe (anatoksyna błonicy, antygeny tężca, krztuśca) oraz – u dzieci powyżej 2 roku życia – na antygeny polisacharydowe (wysokie miano przeciwciał przeciwko pneumokokom). U niewielkiej liczby chorych obserwowano przejściowo osłabioną odpowiedź na szczepionki wirusowe.

1.2.2.5 Leczenie

Pacjenci z THI wymagają bardzo zróżnicowanego podejścia klinicznego. Dzieci z pierwszej, asymptomatycznej grupy, nie wymagają intensywnego/specjalistycznego leczenia. Pacjenci rozwijający objawową postać tego niedoboru podlegają stałej obserwacji przez immunologa klinicznego. Niekiedy wskazana jest u nich tzw. profilaktyka antybiotykowa, zwłaszcza w okresach zwiększonego ryzyka rozwoju infekcji w miesiącach jesienno-zimowych oraz wiosennych. W przypadku występujących u części pacjentów powikłań autoimmunizacyjnych, konieczne jest zastosowanie leczenia immunosupresyjnego, które niestety może dodatkowo pogłębić istniejący defekt odporności i zwiększać ryzyko potencjalnych zakażeń [166]. W skrajnych przypadkach, kiedy chorzy prezentują ciężkie infekcje i stwierdza się bardzo słabą odpowiedź poszczepienną, stosowane jest okresowo leczenie substytucyjne preparatami immunoglobulin, w postaci wlewów dożylnych (ang. *intravenous immunoglobulin*, IVIG), rzadziej podskórnych (ang. *subcutaneous immunoglobulin*, SIG) [149,164,165].

1.2.2.6 Podsumowanie

Okolo 25% pacjentów z THI diagnozowanych jest przed ukończeniem 6-go m-ca życia, kolejne 50% pomiędzy 6 a 12 miesiącem życia [149,166]. Pomimo początkowo przyjętych twierdzeń odnośnie równomiernego występowania THI u obu płci, wyniki badań dowodzą, iż nieco ponad 60% przypadków przejściowej hipogammaglobulinemii dotyczy pacjentów płci męskiej. U większości chorych normalizacja poziomu immunoglobulin

następuje pod koniec 2-go roku życia, ale poziom ten może pozostawać poniżej dolnego zakresu normy dla wieku nawet do 5-go – 6-go roku życia. [149]. Jak wynika z dostępnych statystyk, w grupie pacjentów dłużej manifestujących hipogammaglobulinemię, przeważają dzieci płci żeńskiej. U około 20-25% dzieci z rozpoznaniem THI, stwierdza się jej rodzinne występowanie, a niekiedy również i innych pierwotnych niedoborów odporności, zwłaszcza izolowanego niedoboru IgA, CVID, a nawet ciężkiego złożonego niedoboru odporności (ang. *severe combined immunodeficiency*, SCID).

1.2.3 Inne często występujące pierwotne niedobory odporności humoralnej

1.2.3.1 Pospolity zmienny niedobór odporności (CVID)

CVID stanowi heterogenną pod względem genetycznym, patogenetycznym i klinicznym grupę niedoborów, z przewagą zaburzeń produkcji przeciwciał [165]. Częstość występowania tego schorzenia uzależniona jest od regionu i badanej populacji, waha się w szerokich granicach, od 1:10.000 do 1:50.000 żywo urodzonych niemowląt, choć jak sugerują ostatnie badania, wskaźnik ten może wynosić nawet 1:1.200 [172]. W przypadku rasy kaukaskiej, niedobór ten występuje u około 1 na 25 tys. żywo urodzonych niemowląt, równomiernie u obu płci [173-175]. CVID diagnozuje się najczęściej pomiędzy 5-8 rokiem życia lub w 2 – 3 dekadzie życia, ale jego występowanie należy również rozważać w przypadku dzieci około 2-go roku życia, różnicując z THI. Spektrum objawów klinicznych jest zróżnicowane, ale dominują w nim nawracające infekcje górnych i dolnych dróg oddechowych, których przyczyną są w głównej mierze bakterie otoczkowe i drobnoustroje atypowe. W grupie osób z CVID obserwuje się ponadto zwiększoną częstość występowania schorzeń autoimmunizacyjnych, które dotyczą ok. 20% pacjentów. Do najczęstszych należą: pierwotna małopłytkowość immunologiczna, autoimmunizacyjna anemia hemolityczna, neutropenia, reumatoidalne zapalenie stawów i zapalenia naczyń o podłożu autoimmunizacyjnym. Aż jedna trzecia chorych z CVID rozwija choroby limfoproliferacyjne, które manifestują się najczęściej splenomegalią, uogólnioną limfadenopatią, a także zajęciem skóry. W zespole CVID wyższe jest ponadto ryzyko wystąpienia raka żołądka oraz jelita grubego [176,177].

Głównym kryterium diagnostycznym tego niedoboru odporności jest obniżone – poniżej 2 SDs względem normy dla wieku - stężenie immunoglobulin IgG, niekiedy także IgA oraz IgM [177-179]. U większości chorych stwierdza się prawidłowy lub nieznacznie obniżony poziom limfocytów B w krwi obwodowej [176,180,181]. W większości przypadków obserwuje się także obniżoną produkcję swoistych przeciwciał poszczepiennych oraz brak izohemaglutynin. W trakcie długoletnich obserwacji chorych z CVID, opisano liczne przykłady zaburzeń dotyczących liczby i funkcji limfocytów T [182], m. in. zmiany liczebności poszczególnych subpopulacji limfocytów T, np. redukcję antygenowo swoistych komórek T pamięci, zmniejszenie odsetka populacji komórek CD4⁺ i wzrost odsetka limfocytów CD8⁺ [183].

Zaburzenia genetyczne, o charakterze jedno- lub wielogenowym, wykazano do chwili obecnej u ok. 10 - 15% pacjentów z CVID [180]. Opisano nieprawidłowości dotyczące genów kodujących cząsteczki uczestniczące w przekazywaniu sygnałów w limfocycie B, biorące udział w dojrzewaniu limfocytów B lub w przekazywaniu sygnału do syntezy przeciwciał [157]. Stwierdzono m.in. mutacje genu *TNFRSF13B* kodującego receptor TACI (ang. *transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin-ligand (CAML) interactor*), genu *TNFRSF13C* kodującego BAFF-R (ang. *B cell activating factor receptor*) [172], homozygotyczną mutację genu CD19, defekt czynnika kostymulującego limfocytów T – ICOS (ang. *inducible costimulatory molecule*) [184], jak również mutacje genów *CD81*, oraz *MSH5* [185]. Do najczęstszych należy mutacja genu *TNFRSF13B* [165], przy czym reszta zaburzeń nie jest częstsza niż 1% [172,186]. Ponadto stwierdzono, iż opisane w CVID zaburzenia genetyczne nie wywołują hipogammaglobulinemii w sposób bezpośredni, a jedynie zwiększają ryzyko jej wystąpienia [174].

Dokładny patomechanizm tego schorzenia nadal pozostaje niejasny. Najbardziej prawdopodobną wydaje się koncepcja, iż zaburzenie wielu różnych mechanizmów immunoregulacyjnych znajduje swój wspólny obraz kliniczny, określane jako CVID. Ze względu na swój przebieg, często naśladujący w początkowej fazie inne niedobory odporności humoralnej, rozpoznanie CVID może być opóźnione nawet o kilka lat [172]. Trudności diagnostyczne wynikają z faktu, iż w niektórych przypadkach CVID początkowo może występować pod maskami izolowanego lub częściowego niedoboru IgA, niedoboru podklas IgG lub niedoboru swoistych przeciwciał przeciw antygenom polisacharydowym [174]. Duże trudności może stwarzać w pierwszych latach życia chorego diagnostyka różnicowa CVID i THI.

1.2.3.2 Izolowany niedobór IgA (SIgAD)

Izolowany niedobór IgA (SIgAD) jest najczęstszym pierwotnym niedoborem odporności humoralnej. Jego występowanie jest zróżnicowane, w zależności od regionu waha się od 1:300 w krajach Europy i Ameryki, do 1:21000 w populacji japońskiej [187]. W przypadku rasy kaukaskiej, SIgAD rozpoznawany jest w przybliżeniu u 1:500 – 1:600 żywo urodzonych niemowląt. Podstawą definitywnej diagnozy SIgAD jest stwierdzenie śladowego stężenia IgA w surowicy (i wydzielinach) ($<0,05\text{g/l}$), przy prawidłowym poziomie pozostałych immunoglobulin, oraz wykluczenie innych przyczyn niedoboru przeciwciał [57,179,188,189]. Definitywną diagnozę można postawić dopiero po ukończeniu przez dziecko 4 – 5-go roku życia, po wykluczeniu THI [190]. We krwi obwodowej stwierdza się prawidłowy poziom limfocytów B i T. Z reguły zachowana jest również prawidłowa produkcja przeciwciał poszczepiennych.

Szacuje się, iż u większości pacjentów choroba ma przebieg bezobjawowy lub skąpoobjawowy, a samo schorzenie często wykrywane jest przypadkowo [149]. U około jednej trzeciej chorych obserwuje się jednakże nawracające zakażenia bakteryjne i wirusowe, dotyczące głównie dróg oddechowych, ale także nawracające zapalenie ucha środkowego, opon mózgowych oraz infekcje dróg moczowych i przewodu pokarmowego [145]. Chorzy cierpiący na ten niedobór narażeni są na zwiększone ryzyko rozwoju schorzeń autoimmunizacyjnych (w tym cytopenii immunologicznych) alergicznych oraz chorób przewodu pokarmowego (głównie celiakii). Odnotowuje się także większą zapadalność na nowotwory przewodu pokarmowego i schorzenia limfoproliferacyjne (choć mniej niż u chorych z CVID) [149,145].

Patomechanizm leżący u podstaw upośledzonej produkcji IgA pozostaje wciąż niejasny. Główną przyczyną SIgAD wydają się być defekty dojrzewania i końcowego różnicowania limfocytów B do komórek syntetyzujących oraz wydzielających IgA, wynikające z wadliwego współdziałania limfocytów T i B [174]. Uważa się, iż dysfunkcja limfocytów T pomocniczych oraz T supresorowych może także odgrywać rolę w patomechanizmie SIgAD [6,11].

Podłoże genetyczne SIgAD nadal pozostaje przedmiotem intensywnych badań. Jak dotąd, u niektórych pacjentów opisano, podobnie jak w przypadku CVID, mutacje w obrębie genu *TNFRSF13B* [152]. Opisane nieprawidłowości tego receptora u pacjentów z CVID dodatkowo potwierdzają zbliżoną etiopatogenezę tych dwóch niedoborów [174,191].

Na podstawie długoletnich obserwacji potwierdzono rodzinne występowanie SIgAD u ok. 20-25% chorych [149,173,192,193]. Ponadto, wyniki badań sugerują, iż CVID może rozwinąć się w późniejszym wieku u osób z SIgAD, co potwierdzają przypadki progresji SIgAD do pełnoobjawowego CVID, choć opisywano również, nieco rzadziej, sytuację odwrotną [173,194].

1.2.4 Diagnostyka różnicowa THI z innymi dziecięcymi postaciami hipogammaglobulinemii

Hipogammaglobulinemia w okresie niemowlęcym i wczesnodziecięcym stanowi istotny problem z punktu widzenia praktyki klinicznej, immunodiagnostyki, terapii i prognozowania.

Obniżone stężenie jednego lub więcej izotopów immunoglobulin w surowicy, w powiązaniu z prawidłowym immunofenotypem lub nieznacznymi jedynie odchyleniami liczbowymi dotyczącymi subpopulacji limfocytów, nie pozwala na jednoznaczne ustalenie rozpoznania niedoboru odporności, oraz na prognozowanie przebiegu klinicznego. W ten sposób bowiem mogą manifestować się wszystkie opisane powyżej trzy najczęściej występujące u dzieci postacie hipogammaglobulinemii [165]. Pomimo ogromnego postępu w zakresie molekularnych, genetycznych oraz biochemicznych metod diagnostycznych, szybkie rozpoznawanie i celna diagnoza, będące podstawą skutecznego leczenia zaburzeń odporności, nadal pozostają wyzwaniem dla współczesnych immunologów. Średnie opóźnienie w diagnozie wszystkich pierwotnych niedoborów odporności wynosi obecnie (w przedziale wiekowym od 2-go miesiąca do 54 roku życia) 21,2 miesiąca, a wskaźnik śmiertelności sięga 25% [144]. Również badania prowadzone nad CVID w Wielkiej Brytanii dowiodły, iż opóźnienie w rozpoznaniu tego konkretnego niedoboru wynosi ponad 3 lata u dzieci i około 6 lat w przypadku dorosłych [175,195]. Brak jest natomiast danych dotyczących THI.

Trudności w diagnostyce różnicowej hipogammaglobulinemii u dzieci związane są z paradoksalną sytuacją dotyczącą: i) różnego przebiegu klinicznego u chorych z tym samym defektem odporności, ii) podobnego przebiegu klinicznego u chorych z różnymi defektami odporności [165,171]. Rozpoznanie THI jest diagnozą z wykluczenia, stawianą zwykle retrospektywnie, po osiągnięciu normalizacji stężeń wszystkich izotypów immunoglobulin. Większość chorych z THI osiąga prawidłowe poziomy immunoglobulin około 2-go roku

życia. W oparciu o doniesienia literaturowe oraz wyniki obserwacji długoterminowych można stwierdzić, iż poziom immunoglobulin w surowicy u części pacjentów osiąga odpowiedni dla wieku zakres normy również pomiędzy 24-ym a 36-ym miesiącem życia. W pojedynczych przypadkach ma to miejsce nawet około 78-go miesiąca życia [149,171]. Zwykle chorzy z THI, którzy około 5-go roku życia w dalszym ciągu manifestują hipogammaglobulinemię, zaczynają być traktowani i leczeni jako osoby z CVID. Pomimo istniejących ogólnych kryteriów klinicznych i laboratoryjnych różnicujących oba niedobory, w chwili obecnej brak jest swoistego parametru pozwalającego we wczesnym dzieciństwie na odróżnienie THI od CVID. Przykładem może być ocena produkcji specyficznych przeciwciał poszczepiennych, którą część autorów kwestionuje, jako parametr odróżniający CVID od THI. Okazało się bowiem, iż prawidłowa humoralna odpowiedź poszczepienna nie wyklucza rozpoznania CVID i odwrotnie, zaburzona produkcja przeciwciał poszczepiennych nie wyklucza rozpoznania THI [154,196-198]. Również w przypadku diagnostyki różnicowej THI i SIgAD problemem jest właściwa interpretacja wyników badań. Zaobserwowano, że u pacjentów z THI normalizacja poziomu IgG następuje zwykle wcześniej niż IgA, tym samym u części dzieci z przejściową hipogammaglobulinemią przez pewien okres można obserwować utrzymujący się obniżony poziom IgA, przy prawidłowych poziomach pozostałych izotypów immunoglobulin [93]. Może to być błędnie rozpoznane jako izolowany lub częściowy niedobór IgA. Dodatkowym problemem jest brak jasnych kryteriów, które umożliwiłyby wskazanie tych pacjentów z SIgAD, u których ryzyko przejścia niedoboru IgA w CVID jest zwiększone.

Problemy wynikające z niewłaściwej lub opóźnionej diagnozy mają u dzieci poważne implikacje terapeutyczne. Wczesna, prawidłowa diagnoza ma istotne znaczenie dla wyboru leczenia – CVID wymaga terapii substytucyjnej dożylnymi lub podskórnymi preparatami immunoglobulin, podczas gdy pacjenci z THI i SIgAD leczeni są najczęściej objawowo. Niepodjęcie odpowiednio wcześnie celowanego leczenia u pacjentów z CVID może być w przyszłości przyczyną ciężkich, zagrażających życiu zakażeń oraz nieodwracalnych zmian narządowych prowadzących do trwałego inwalidztwa lub w skrajnych przypadkach do śmierci.

W świetle przytoczonych powyżej faktów, niezbędnym wydaje się ustalenie nowych kryteriów/parametrów immunologicznych, które byłyby pomocne w diagnostyce różnicowej hipogammaglobulinemii, zwłaszcza THI i CVID o wczesnym początku (poniżej 5-go – 6-go roku życia), a także poszukiwanie nowych mechanizmów immunologicznych odgrywających rolę w etiopatogenezie tychże hipogammaglobulinemii.

2 CELE PRACY

Przesłanką do podjęcia niniejszych badań były obserwacje dotyczące dzieci z podejrzeniem THI, u których stwierdzono podwyższony, w odniesieniu do zdrowych rówieśników, poziom krążących limfocytów T regulatorowych.

2.1 Cel ogólny

Celem ogólnym badań była próba określenia ewentualnej roli, jaką odgrywają limfocyty T regulatorowe w etiopatogenezie przejściowej hipogammaglobulinemii wieku dziecięcego.

2.2 Cele szczegółowe

W szczególności skupiono się na:

- I. Ocenie liczebności limfocytów T regulatorowych w grupie dzieci z ustalonym retrospektywnie - na podstawie obserwacji długoterminowej - rozpoznaniem THI, w aspekcie:
 1. monitorowania liczebności krążących limfocytów T_{reg}, od momentu wystąpienia pierwszych objawów klinicznych, do czasu ustalenia ostatecznej diagnozy;
 2. próby oceny zależności zmian poziomów krążących limfocytów T_{reg} od wieku, stężenia immunoglobulin oraz liczebności limfocytów B pacjentów grupy badanej, w odniesieniu do dobranej pod względem wieku grupy kontrolnej;
 3. analizy zachodzących w czasie zmian poziomu ekspresji mRNA dla czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) pacjentów oraz oceny tych zmian w zależności od liczby krążących limfocytów T_{reg}.

- II. Ocenie wybranych parametrów związanych z powstawaniem i dojrzewaniem limfocytów T_{reg} , uwzględniając:
1. obserwację zmian poziomów oraz produkcji wybranych cytokin (IL-10 oraz TGF- β), odpowiednio: w surowicy oraz w nadsączach pochodzących ze stymulowanych fitohemaglutyniną lub lipopolisacharydem hodowli PBMC, izolowanych z krwi obwodowej w trakcie kolejnych wizyt pacjentów;
 2. analizę sekwencji genów *TGFBR1* i *TGFBR2* kodujących receptory dla TGF- β , celem poszukiwania ewentualnych mutacji i/lub polimorfizmów.
- III. Ocenie funkcjonalnej limfocytów T_{reg} (izolowanych od zdrowych dawców) z wykorzystaniem w badaniach modelowych testów czynnościowych *in vitro* po wysortowaniu odpowiednich populacji komórek, polegającej na:
1. określeniu efektu supresorowego limfocytów T_{reg} na produkcję IgG przez limfocyty B wchodzące w skład autologicznych PBMC;
 2. określeniu zmian proliferacji PBMC pod wpływem wzrastającej liczby autologicznych limfocytów T_{reg} .
- IV. Ocenie znaczenia badanych parametrów immunologicznych w diagnostyce różnicowej THI z innymi niedoborami odporności humoralnej (CVID i SIgAD) u dzieci do 5 roku życia.

3 PACJENCI I METODYKA

3.1 Osoby badane

Badaniami objęte zostały dzieci z pierwotnymi niedoborami odporności humoralnej, diagnozowane i leczone w Poradni i Oddziale Immunologicznym Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie, w latach 2008-2012. Poszczególne formy hipogammaglobulinemii diagnozowano zgodnie z wytycznymi “International Union of Immunological Society” (IUIS) [199]. Grupy pacjentów, wyłonione retrospektywnie na podstawie długoterminowej obserwacji poziomu immunoglobulin w surowicy oraz stanu klinicznego, prezentowały następujące rodzaje niedoborów:

- pacjenci z retrospektywnie ustalonym rozpoznaniem przejściowej hipogammaglobulinemii wieku dziecięcego (THI), u których poziom immunoglobulin w trakcie trwania projektu uległ normalizacji;
- pacjenci, u których uprzednio definitywnie zdiagnozowano pospolity zmienny niedobór odporności (CVID), z utrzymującym się obniżonym poziomem IgG, IgA oraz ewentualnie IgM;
- pacjenci z izolowanym niedoborem IgA (SIgAD), u których poziom IgA pozostawał obniżony poniżej 0,05g/L w trakcie obserwacji trwającej powyżej trzech lat.

Dobraną pod względem wieku grupę kontrolną utworzyły dzieci, u których badania laboratoryjne i planowa diagnostyka kliniczna układu immunologicznego, wykluczyły zaburzenia odporności. Badania objęły również grupę dobrowolnych dorosłych dawców, których krew posłużyła do wykonania testów czynnościowych *in vitro*, z wykorzystaniem PBMC oraz izolowanych limfocytów T. Szczegółową charakterystykę grup badanych i kontrolnej, przedstawia tabela 2.

Na przeprowadzenie opisanych powyżej badań wydane zostały zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego: nr KBET/107/B/2006 oraz KBET/6/B/2012. Badaniami objęto jedynie tych pacjentów, których Rodzice bądź Prawni Opiekunowie, poinformowani o celu i rodzaju badań, wyrazili pisemną zgodę na udział w projekcie.

Tabela 2. Charakterystyka badanych grup pacjentów.

	Rozpoznanie	Liczebność	Wiek (średnia $\pm$ SD)	Płeć [K/M]
Dzieci	THI	68	3 $\pm$ 2	18/50
	CVID	32	10 $\pm$ 3	11/21
	SIgAD	40	7 $\pm$ 4	18/22
	Grupa kontrolna	87	4 $\pm$ 3	38/49
Dorośli	Zdrowi	7	36 $\pm$ 11	3/4

3.2 Izolacja komórek jednojądrzastych

PBMC izolowano z pełnej krwi żyłnej pobranej na antykoagulant EDTA, metodą wirowania na gradiencie gęstości Ficoll/Isopaque (Pharmacia, Uppsala, Szwecja), przy prędkości wirowania 400 g przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Uzyskane w ten sposób komórki wykorzystywano do barwień cytometrycznych (od 200 do 500 tys. komórek) lub stymulowano odpowiednimi mitogenami w trakcie prowadzenia hodowli (około 600 tys. komórek). Około 500 tys. PBMC mrożono w temp. -80 °C i przechowywano do czasu wykonania odwrotnej transkrypcji.

3.3 Ocena ilościowa limfocytów T_{reg} i limfocytów B

3.3.1 Określenie liczby bezwzględnej limfocytów T CD4⁺

Do próbek typu TruCount (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) zawierających mikrokuleczki (ang. *beads*) dodawano 100 μ l krwi pełnej pobranej na EDTA oraz zestaw dwóch przeciwciał monoklonalnych: anty-CD3-FITC i anty-CD4-PE (BD Biosciences). Próbkę inkubowano przez 30 minut w temperaturze 4 °C, a następnie, w celu lizy erytrocytów, dodawano 400 μ l buforu lizującego (BD FACS Lysing Solution, BD Biosciences). Tak przygotowane próbki analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCanto przy użyciu oprogramowania FACSDiva Software (Becton Dickinson, CA,

USA). Na podstawie zebranej liczby mikrokuleczek, określano liczbę limfocytów $CD3^+CD4^+$ w 1 μ l krwi pełnej.

3.3.2 Oznaczanie bezwzględnej liczby limfocytów T_{reg}

Oznaczanie liczby komórek $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ przeprowadzano przy użyciu odczynników i przeciwciał wchodzących w skład zestawu Human Regulatory T Cell Staining Kit (eBioscience, San Diego, CA, USA), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Do otrzymanej zawiesiny PBMC dodawano mieszaninę przeciwciał anty- $CD4$ -FITC i anty- $CD25$ -PE, po czym komórki poddawano utrwalaniu i permeabilizacji. Następnie, dodawano przeciwciało anty- $Foxp3$ -APC, wiążące cytoplazmatyczny marker limfocytów T_{reg} . Równolegle, komórki znakowano odpowiednio dobraną kontrolą izotypową. Próbkę analizowano w cytometrze przepływowym FACSCanto. Liczbę bezwzględną limfocytów T regulatorowych o fenotypie $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ określano na podstawie liczby bezwzględnej limfocytów T $CD3^+CD4^+$.

3.3.3 Ocena liczebności limfocytów B

Ocena liczebności limfocytów B, definiowanych jako komórki o fenotypie $CD19^+$, prowadzona była w trakcie rutynowych badań diagnostycznych oceniających subpopulacje limfocytów krwi obwodowej. Próbkę inkubowano z przeciwciałami monoklonalnymi wchodzącymi w skład zestawu BD Multitest (BD Bioscience), a następnie analizowano przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur i oprogramowania CellQuest Software v 3.3 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA). Bezwzględną liczbę limfocytów B $CD19^+$ określano na podstawie całkowitej liczby limfocytów oznaczanej na analizatorze hematologicznym ABX Micros 60 (ABX Diagnostics, Francja).

3.4 Ocena poziomu immunoglobulin

Stężenie immunoglobuliny IgG oznaczano w surowicy krwi metodą nefelometryczną, przy użyciu aparatu BNII nephelometer (Dade-Behring, Deerfield, IL, USA). Ocena poziomu

immunoglobulin u dzieci z grup badanych prowadzona była w ramach rutynowych oznaczeń diagnostycznych z wykorzystaniem odczynników firmy Siemens Healthcare (Marburg, Niemcy).

3.5 Ocena ekspresji genu *FOXP3* na poziomie mRNA

Analiza ekspresji genu dla czynnika transkrypcyjnego Foxp3 przeprowadzana była na poziomie transkryptów (mRNA) metodą PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*). Procedura ta obejmowała następujące etapy: izolację komórek jednojądrzastych krwi obwodowej, izolację RNA, reakcję odwrotnej transkrypcji oraz amplifikację cDNA w czasie rzeczywistym.

3.5.1 Izolacja całkowitego RNA

Izolację całkowitego RNA z PBMC przeprowadzano przy użyciu gotowego zestawu kolumnkowego RNeasy Micro Kit (Qiagen, Holandia), według procedury zalecanej przez producenta. W pierwszej kolejności, komórki poddawano działaniu buforu lizującego, a następnie homogenizowano. Po dodaniu etanolu, próbki przenoszono na kolumny specyficznie wiążące RNA. Kolumny przemywano dwukrotnie buforem czyszczącym, po czym w ostatnim etapie eluowano związane na nich RNA wodą wolną od RNaz. Stężenie otrzymanych preparatów RNA oceniano spektrofotometrycznie (DU 640B Spectrophotometer UV/VIS, Beckman Coulter, CA, USA). Stopień czystości preparatu określano na podstawie stosunku wartości absorbancji przy długości fal 260/280 nm.

3.5.2 Odwrotna transkrypcja

W celu syntezy komplementarnego DNA (cDNA) na matrycy RNA, przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji (ang. *reverse transcription*, RT), z użyciem odwrotnej transkryptazy eAMV-RT (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Do probówek typu Eppendorf dodawano wyizolowane uprzednio RNA, deoksynukleotydy: dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Invitrogen, Carlsbad, USA) oraz startery oligo(dT)₂₃ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA),

komplementarne do fragmentu poli-A, które umożliwiały syntezę cDNA od 3' końca mRNA. Skład mieszaniny, o łącznej objętości 10 µl, przedstawiono w tabeli 3. Tak przygotowane próbki inkubowano w temperaturze 70°C przez 10 minut w termocyklerze GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) w celu zdenaturowania struktur drugorzędowych RNA.

Tabela 3. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji odwrotnej transkrypcji (etap 1).

Składnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe	Objętość na próbkę
RNA	10-25 µg/µl	1,0 µg/µl	8 µl
Nukleotydy:			
- dATP	10 mM	0,5 mM	0,25µl
- dTTP	10 mM	0,5 mM	0,25 µl
- dGTP	10 mM	0,5 mM	0,25 µl
- dCTP	10 mM	0,5 mM	0,25 µl
oligo(dT) ₂₃	70 µM	7 µM	1 µl

Następnie, próbki przenoszono na лёd i dodawano 10 µl uprzednio sporządzonej mieszaniny reakcyjnej, której skład przedstawia tabela 4. Dalszą inkubację prowadzono przez 60 minut, w temperaturze 45°C. Po jej zakończeniu, uzyskane cDNA wykorzystywano jako matrycę w reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji odwrotnej transkrypcji (etap 2).

Składnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe	Objętość na próbkę
Bufor	10x	1x	2 µl
Inhibitor RNaz	40 U/µl	2 U/µl	0,5 µl
Odwrotna transkryptaza	20 U/µl	1 U/µl	1 µl
Woda wolna od nukleaz	-	-	6,5 µl

3.5.3 PCR w czasie rzeczywistym

W celu oceny ilościowej zawartości transkryptów genu *FOXP3*, na matrycy uzyskanego po reakcji RT cDNA, prowadzono reakcję PCR w czasie rzeczywistym. W skład mieszaniny reakcyjnej, o końcowej objętości 10 μ l, wchodziły ponadto: pary specyficznych starterów (Genomed, Polska), roztwór $MgCl_2$, woda (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) oraz barwnik fluorescencyjny SYBR I Green, będący składnikiem odczynnika FastStart DNA SYBR Green Master I Reaction Mix (Roche Biochemicals, Niemcy) (tabela 5). Przygotowane próbki przenoszono do szklanych kapilar typu LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Niemcy), wirowano przez 1 minutę przy prędkości 1600 obr./minutę, a następnie umieszczano w termocyklerze do PCR w czasie rzeczywistym – LightCycler II (Roche Diagnostics GmbH, Niemcy). Kompleks SYBR Green I – DNA, absorbujący światło o długości fali 480, emitował fluorescencję przy długości fali 530 nm, rejestrowaną przez odpowiednie detektory, a intensywność tego sygnału zwiększała się proporcjonalnie do wzrostu produktu PCR w kolejnych cyklach amplifikacji. W celu weryfikacji każdego zamplifikowanego produktu, zastosowano analizę tzw. krzywej stapiania. Uzyskane ostatecznie dane opracowywano przy użyciu oprogramowania LightCycler Software v. 3.5 (Roche Diagnostics).

Sekwencje starterów specyficznych dla transkryptów genów *FOXP3* i β -aktyny, oraz warunki cieplne reakcji PCR w czasie rzeczywistym, przedstawiono, odpowiednio, w tabeli 6 i na rysunku 7.

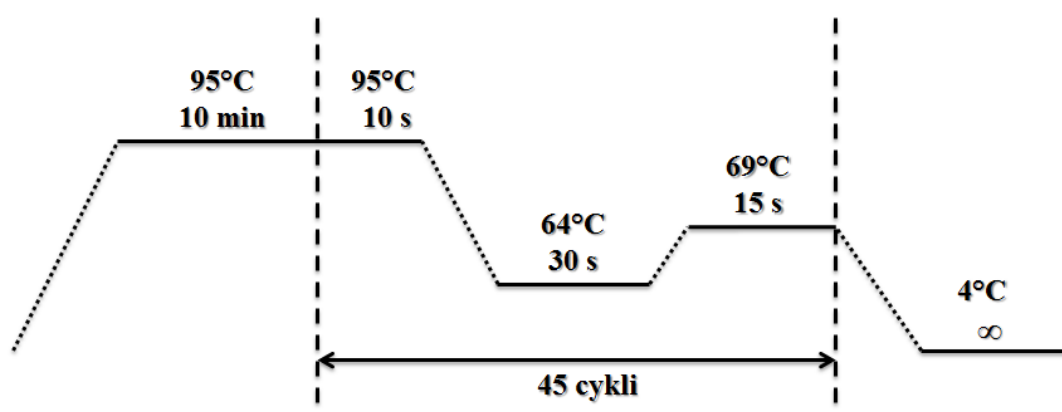
Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR w czasie rzeczywistym.

Składnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe	Objętość na próbkę
cDNA	-	-	5 µl
SYBR Green I	10x	1x	1 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	0,6 µl
Primer Forward	10 µM	0,5 µM	0,5 µl
Primer Reverse	10 µM	0,5 µM	0,5 µl
Woda do PCR	-	-	2,4 µl

Tabela 6. Sekwencje starterów użytych do PCR w czasie rzeczywistym [200].

Gen	Starter	Sekwencja startera
<i>FOXP3</i>	-sensowny	5' - GAGAAGCTGAGTGCCATGCA -3'
	-antysensowny	5' - AGGAGCCCTTGTCGGATGAT -3'
<i>B-aktyna</i>	-sensowny	5' - TCTGGCACCACACCTTCTAC -3'
	-antysensowny	5' - GATAGCACAGCCTGGATAGC -3'

Rysunek 7. Warunki cieplne reakcji PCR w czasie rzeczywistym



3.5.4 Analiza profilu ekspresji genu *FOXP3*

Wyniki względnej ekspresji genu *FOXP3* otrzymywano w postaci wartości Ct (ang. *threshold cycle*), czyli cyklu reakcji PCR, w którym nastąpił maksymalny wzrost fluorescencji wyznaczony w punkcie przecięcia z linią graniczną. Analiza poziomu ekspresji badanego genu, wykonana poprzez obliczenie wartości $2^{-\Delta\Delta Ct}$, umożliwiała porównanie zawartości mRNA w próbkach pochodzących od różnych pacjentów. Względną ilość transkryptów genu *FOXP3* przeliczano używając wzoru:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(\text{próbka badana } Ct \text{ dla } FOXP3 - Ct \text{ dla } \beta\text{-aktyny}) - (\text{kontrola } Ct \text{ dla } FOXP3 - Ct \text{ dla } \beta\text{-aktyny})]}$$

Uzyskane wyniki względnej ekspresji badanego genu były normalizowane, zarówno względem genu referencyjnego (β -aktyna), jak i względem tzw. kalibratora wewnętrznego, którym była wartość $2^{-\Delta\Delta Ct}$ otrzymana w przypadku zdrowej osoby z grupy kontrolnej.

3.6 Oznaczanie poziomu wybranych cytokin

3.6.1 Stymulacja PBMC

W celu oceny produkcji wybranych cytokin, wyizolowane z krwi pełnej PBMC hodowano w obecności fitohemaglutyniny w stężeniu 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (PHA, Remel Europe, Dartford, UK) lub lipopolisacharydu w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ (LPS, Alexis Biochemicals, Lausen, Szwajcaria). Hodowle prowadzono w medium hodowlanym RPMI-1640 zawierającym stabilną glutaminę (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), z dodatkiem antybiotyku gentamycyny w stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$ (Gibco, Paisley, Wielka Brytania) oraz 10% płodowej surowicy cielęcej wolnej od endotoksyny (FCS, Biochrom), w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂, przez 18 godzin, w płaskodennych 96-dołkowych płytkach (Nunc, Roskilde, Dania). Uzyskane z hodowli komórkowych nadsącze przechowywano w temperaturze -20 °C do czasu oznaczenia w nich stężeń wybranych cytokin.

3.6.2 Ocena stężenia czynnika TGF- β

Stężenie czynnika TGF- β w surowicy oraz nadsączach hodowlanych oznaczano metodą immunoenzymatyczną z użyciem zestawu Quantikine ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA), zgodnie ze wskazaniem producenta. Odczytu dokonywano na aparacie ELx800_{NB} Universal Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, VT, USA), przy długości fali 450 nm. Zakres pomiaru stężeń TGF- β wynosił od 31,2 do 2000 pg/ml.

3.6.3 Ocena stężenia cytokiny IL-10

Stężenie cytokiny IL-10 oznaczano w surowicy i w nadsączach hodowlanych metodą *cytometric bead array* (CBA), wykorzystującą znakowane fluorescencyjnie mikrokuleczki, opłaszczone przeciwciałami specyficznymi dla oznaczanej cytokiny (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Analizę przygotowanych zgodnie z instrukcją producenta próbek wykonywano na cytometrze przepływowym FACSCanto, a uzyskane dane opracowywano przy użyciu oprogramowania FCAP Array Software (BD Bioscience, CA, USA). Dolna granica wykrywalności IL-10 wynosiła 0,13 pg/ml.

3.7 Analiza sekwencji genów *TGFBR1* oraz *TGFBR2*

Ocenę występowania ewentualnych nieprawidłowości w sekwencjach genów *TGFBR1* i *TGFBR2* przeprowadzano metodą sekwencjonowania bezpośredniego. Do wstępnego wykrywania zaburzeń w produktach amplifikacji, wykorzystywano przesiewową metodę analizy heterodupleksów (ang. *heteroduplex analysis*, HET). Kolejne jej etapy obejmowały: amplifikację wszystkich badanych egzonów z użyciem startera znakowanego fluorescencyjnie, reakcję tworzenia heterodupleksów oraz ich rozdział metodą elektroforezy kapilarnej.

3.7.1 Izolacja DNA

W celu stwierdzenia ewentualnych zmian genetycznych w obrębie genów *TGFBR1* oraz *TGFBR2* u pacjentów, w porównaniu do osób zdrowych, w pierwszej kolejności izolowano genomowe DNA. Izolację prowadzono z użyciem zestawu firmy Qiagen (QIAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Niemcy), zgodnie ze wskazaniem producenta. Krew pełną o objętości 200 µl pobraną na antykoagulant (EDTA) odbiałczano przy pomocy proteinazy K, lizowano buforem lizującym, a następnie tak przygotowaną mieszaninę, inkubowano w 56 °C przez 10 minut. Do próbek dodawano etanol (POCH, Gliwice, Polska), po czym całość przenoszono na kolumny wiążące DNA. Kolumny przemywano dwukrotnie buforami myjącymi, a w ostatnim etapie, wymywano związane na nich DNA za pomocą buforu eluującego. Stężenie wyizolowanego DNA określano metodą spektrofotometryczną na aparacie DU 640B Spectrophotometer UV/VIS (Beckman Coulter, CA) dokonując pomiaru absorbancji przy długości fali 260 nm. Czystość DNA określano na podstawie ilorazu absorbancji przy długości fali 260 i 280 nm.

3.7.2 Metoda przesiewowa analizy heterodupleksów

3.7.2.1 Amplifikacja egzonów genów *TGFBR1* i *TGFBR2* metodą PCR

Łańcuchową reakcję polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) prowadzono w celu namnożenia każdego z dziewięciu egzonów genu *TGFBR1* oraz siedmiu egzonów genu *TGFBR2*, z użyciem nieznakowanego startera sensownego oraz znakowanego fluorescencyjnie (barwnikiem FAM-6, HEX lub NED) startera antysensownego. Sekwencje starterów zamieszczono poniżej (Tabela 7). Matrycą dla tej reakcji było wyizolowane uprzednio genomowe DNA. Dla każdego z egzonów reakcję prowadzono w osobnych probówkach. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 µl, a w jej skład wchodziło: DNA, deoksynukleotydy dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, USA), polimeraza DNA AmpliTaq Gold, odpowiedni bufor, roztwór MgCl₂ (Applied Biosystems, CA, USA) oraz para specyficznych starterów (Applied Biosystems) (Tabela 8). Reakcje PCR prowadzono w probówkach typu Eppendorf w termocyklerze GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), według dobranych dla poszczególnych par starterów warunków cieplnych (Rys. 8). Temperatura przyłączania starterów (T_{ann}) była różna dla poszczególnych egzonów

i wynosiła odpowiednio: 56 °C dla egzonu 1, 3, 4 i 9 genu *TGFBR1* i egzonu 2, 3, 4, 5 i 6 genu *TGFBR2*; 60 °C dla egzonu 5, 6, 7 i 8 genu *TGFBR1* i egzonu 7 genu *TGFBR2*, 62 °C dla egzonu 2 genu *TGFBR1* oraz 65 °C dla egzonu 1 genu *TGFBR2*.

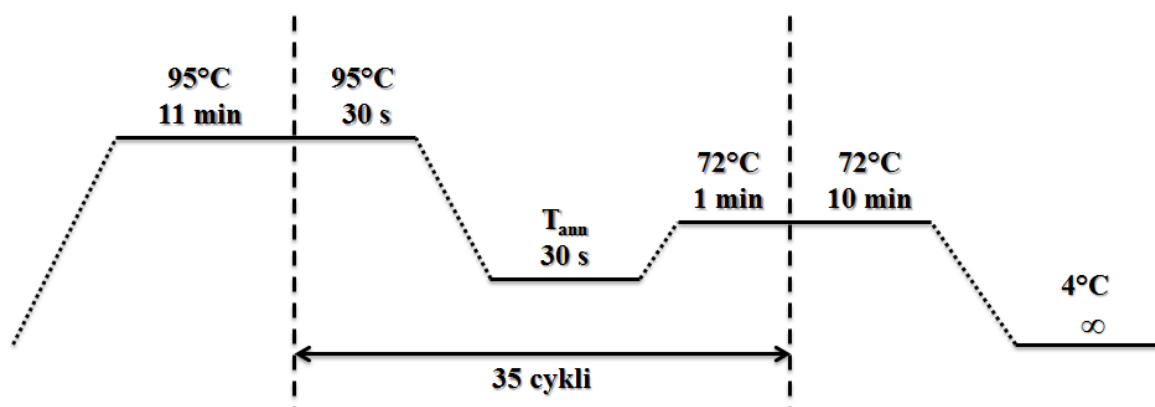
Tabela 7. Startery stosowane w reakcji PCR (egzon 4 genu *TGFBR2* z uwagi na swoją wielkość był amplifikowany przy użyciu dwóch par starterów – a i b) [201, 202, 203].

Gen	Egzon	Starter	Sekwencja startera	Długość produktu
<i>TGFBR1</i>	1	-sensowny -antysensowny	5'- CCTCCGAGCAGTTACAAAGG -3' 5'- GCGCCATGTTTGAGAAAGAG -3'	319 pz
	2	-sensowny -antysensowny	5'- TGCTACATTTCTTGGGCTT -3' 5'- AACACATACCCAGGAGGCAG -3'	646 pz
	3	-sensowny -antysensowny	5'- CTGACAGAGCTGGTGTGCAT -3' 5'- GGAGCTGACTTATTGATTCTGC -3'	675 pz
	4	-sensowny -antysensowny	5'- CCCTCTAGCAGGAGTTTCTGG -3' 5'- AGGAATGCTATCAAGAGTCAAGA -3'	656 pz
	5	-sensowny -antysensowny	5'- TTGAGTGTGTGACTCAGGA -3' 5'- GATGCGTTTTGTTCATGTTG -3'	458 pz
	6	-sensowny -antysensowny	5'- GTGGGCTGAAATGCTTTGAT -3' 5'- ATTTTCTGGAAGGGCAACCT -3'	485 pz
	7	-sensowny -antysensowny	5'- AGATCATGAGGCAGATAGTGTG -3' 5'- GCCTTTGTTTTCTCTGGCAC -3'	495 pz
	8	-sensowny -antysensowny	5'- GGAAGTGGCTTGTGGATACAG -3' 5'- AAAGGCCACTGCAAATGTTC -3'	509 pz
	9	-sensowny -antysensowny	5'- TCTTTGTCCACCTGCTTTCC -3' 5'- AGTGCACAGAAAGGACCCAC -3'	531 pz
<i>TGFBR2</i>	1	-sensowny -antysensowny	5'- TCGGTCTATGACGAGCAG -3' 5'- GGGACCCCAGGAAGACCC -3'	178 pz
	2	-sensowny -antysensowny	5'- CTCATGACATCAAGTTCATTTG -3' 5'- GGAGACAGAGATACTGACTGTG -3'	365 pz
	3	-sensowny -antysensowny	5'- TCCAATGAATCTCTTCACTC -3' 5'- CCCACACCCTTAAGAGAAGA -3'	242 pz
	4a	-sensowny -antysensowny	5'- CCAACTCCTTCTCTCCTTGTGTTTG -3' 5'- TCCAAGAGGCATACTCCTCATAGG -3'	444 pz
	4b	-sensowny -antysensowny	5'- GTCGCTTTGCTGAGGTCTATAAGG -3' 5'-CCAGGCTCAAGGTAAAGGGATCTAGCA-3'	540 pz
	5	-sensowny -antysensowny	5'- GGCAGCTGGAATTAAATGATGGGC -3' 5'- TGCTCGAAGCAACACATG -3'	261 pz
	6	-sensowny -antysensowny	5'- TTTCTTTGGCTGCACATG -3' 5'- CCTAAGAGGCAACTTGGTTGAATC -3'	242 pz
	7	-sensowny -antysensowny	5'- CCAACTCATGGTGCCCTTTG -3' 5'- TCTTTGGACATGGCCCAGCCTG -3'	252 pz

Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji PCR.

Składnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe	Objętość na próbkę
DNA	0,5-1,5 ng/μl	0,1 ng/μl	3 μl
Startery: - sensowny - antysensowny	10 μM 10 μM	0,5 μM 0,5 μM	1 μl 1 μl
Polimeraza AmpliTaq Gold	2 U/μl	0,015 U/μl	0,15 μl
Bufor dla polimerazy	10x	1x	2 μl
Nukleotydy: - dATP - dTTP - dGTP - dCTP	10 mM 10 mM 10 mM 10 mM	0,5 mM 0,5 mM 0,5 mM 0,5 mM	0,1 μl 0,1 μl 0,1 μl 0,1 μl
MgCl ₂	-	-	1,2 μl
H ₂ O	-	-	10,8 μl

Rysunek 8. Warunki cieplne reakcji PCR.



3.7.2.2 Elektroforeza produktów reakcji PCR

W celu sprawdzenia poprawności reakcji PCR, produkty tej reakcji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym. W celu przygotowania 50 ml żelu, rozpuszczano 0,75 g agarozy (Sigma) w buforze 1xTAE o pH 8,5, którego skład przedstawiał się następująco: 2 M Tris (Trizma Base, Sigma), 1 M kwas octowy (Sigma), 5 M EDTA (Sigma). Mieszaninę podgrzewano do całkowitego rozpuszczenia agarozy, po czym dodawano 20 µl roztworu bromku etydyny o stężeniu 1mg/ml (Sigma, St. Louis, MO). Całość wylewano na saneczki z grzebieniami i pozostawiano do zastygnięcia. Saneczki z żelem umieszczano w aparacie do elektroforezy (Biotec-Fischer, GmbH, Reiskirchen, Niemcy) i zalewano buforem 1xTAE.

Próbki do rozdziału przygotowywano poprzez zmieszanie 3 µl produktu PCR, 2 µl buforu obciążającego (Sigma) oraz 10 µl wody. Próbki nakładano do poszczególnych studzienek w żelu, do osobnej studzienki nakładano 3 µl markera masowego (Gen Ladder 100, Inno-train Diagnostik GmbH). Elektroforezę prowadzono przez około 30 minut, przy napięciu 90 V. Po zakończeniu rozdziału żel umieszczano na transiluminatorze w celu uwidocznienia w świetle UV rozdzielonych w postaci prążków produktów PCR, związanych z bromkiem etydyny.

3.7.2.3 Reakcja tworzenia heterodupleksów

Dla każdego z otrzymanych metodą PCR dziewięciu egzonów genu *TGFBR1* oraz siedmiu egzonów *TGFBR2*, przeprowadzono reakcję tworzenia heterodupleksów. Oparta była na dodaniu, w równych stężeniach, produktów PCR uzyskanych od osób z grupy badanej oraz od zdrowego dawcy, u którego wcześniejsze sekwencjonowanie wykluczyło obecność mutacji (tzw. DNA kontrolne). Reakcję powstawania heterodupleksów prowadzono w termocyklerze GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), w dobranych eksperymentalnie warunkach cieplnych (tabela 9).

Tabela 9. Warunki tworzenia heterodupleksów.

Etap	Temperatura	Czas trwania cyklu
Denaturacja	96 °C	10 min
Tworzenie heterodupleksów	96 °C, spadek temperatury o 0,5 °C w kolejnych cyklach	20 s x 72 cykle
Zakończenie procesu	60 °C	30 min

3.7.2.4 Rozdział heterodupleksów metodą elektroforezy kapilarnej

Próbki uzyskane w reakcji tworzenia dupleksów poddawano rozdziałowi metodą elektroforezy kapilarnej na sekwenatorze ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Powstałe homo/heterodupleksy identyfikowano pod względem różnic w ich ruchliwości w żelu niedenaturującym (5% GeneScan Polymer z dodatkiem glicerolu), którego skład podano w tabeli 10. Na wstępie, każdą z próbek DNA rozcieńczano dejonizowaną wodą. Następnie do próbek (o objętości 1µl) dodawano 1µl rozcieńczonego standardu wielkości ROX-1000 (Applied Biosystems, Warrington, Wielka Brytania) oraz 10 µl dejonizowanej wody. Rozdział próbek prowadzono w kwarcowej kapilarze o długości 47 cm i średnicy 50µm (PE Applied Biosystems, Rotkreuz, Szwajcaria) w warunkach częściowo denaturujących, w temperaturze 30 °C i przy napięciu 13 kV. Fluorescencja emitowana przez sprzężone ze starterami barwniki była rejestrowana przez odpowiednie detektory z zastosowaniem wirtualnego filtra D. Rezultat rozdziału przedstawiano w postaci chromatogramu z pikami fluorescencji odpowiadającymi poszczególnym fragmentom standardu wielkości i uzyskanym dupleksom. Eksperymentalnie dobrane warunki elektroforezy umożliwiały odróżnienie heterodupleksów od homodupleksów. Uzyskane wyniki analizowano przy użyciu oprogramowania 310 Gene Scan 3.1.2 (Applied Biosystems). W celu oceny charakteru wykrytej zmiany, wytypowane metodą HET egzony poddano reakcji sekwencjonowania metodą Sangera.

Tabela 10. Schemat przygotowania 25 ml 5% polimeru z 10% glicerolem.

Składnik	Objętość
7% GeneScan Polymer	3,57 ml
10% glicerol	0,5 ml
10xTBE	0,5 ml
H ₂ O	0,43 ml

3.7.3 Sekwencjonowanie genów *TGFBR1* oraz *TGFBR2*

Sekwencjonowanie wytypowanych metodą HET egzonów genów *TGFBR1* i *TGFBR2* przeprowadzano zautomatyzowaną metodą terminacji łańcucha (tzw. metoda „dideoksynukleotydów” Sanger). Procedura oceny sekwencji genów kodujących receptory dla TGF- β obejmowała następujące etapy: amplifikację wybranych egzonów, oczyszczanie DNA po reakcji PCR, reakcję sekwencyjnego PCR i ostatecznie, rozdział oczyszczonego metodą precypitacji DNA na aparacie ABI PRISM 310.

Proces amplifikacji, jak i elektroforezy produktów reakcji PCR, przebiegały według tych samych zasad, co w opisanej powyżej metodzie przesiewowej.

3.7.3.1 Oczyszczanie produktów PCR

Uzyskane w poprzednich etapach produkty reakcji PCR poddawane były następnie procesowi oczyszczania, który polegał na usunięciu pozostałości składników użytych do sporządzenia mieszaniny reakcyjnej. Próbkę oczyszczano za pomocą zestawu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) metodą kolumnkową, według wytycznych dostarczonych przez producenta. Związane na kolumnach DNA przemywano odpowiednimi buforami, co miało na celu usunięcie zanieczyszczeń, w ostatnim zaś etapie, wymywano je buforem Tris o odpowiednio dobranym pH.

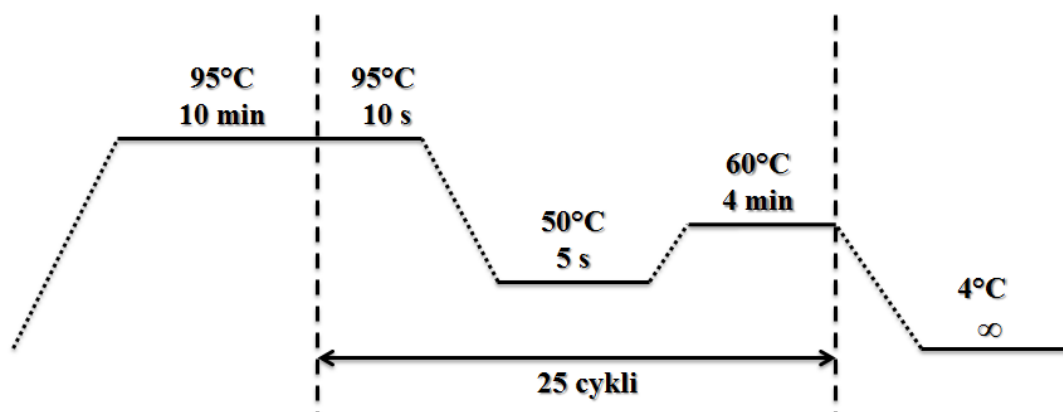
3.7.3.2 Sekwencyjny PCR

Do przeprowadzenia reakcji sekwencyjnego PCR wykorzystano metodę Sangera z użyciem dNTPs, przy czym matrycą dla tej reakcji były oczyszczone uprzednio produkty PCR. Mieszaninę reakcyjną, której skład przedstawiono w tabeli 11, przygotowywano w objętości końcowej 20 μl , dodając oczyszczone DNA, Terminator Ready Reaction Mix (Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, California, USA) oraz jeden ze starterów użytych wcześniej do reakcji PCR. Proces sekwencjonowania każdego z fragmentów DNA prowadzono dwukierunkowo, przygotowując po dwie mieszaniny reakcyjne dla tego samego produktu PCR. Reakcje prowadzono w termocyklerze GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) według programu cieplnego BigDye dostarczonego przez producenta (Rys. 9).

Tabela 11. Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR sekwencyjnego.

Składnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe	Objętość na próbkę
DNA	-	-	10 μl
Startery (sensowny lub antysensowny)	1 μM	0,32 μM	1 μl
Ready Reaction Premix	2,5x	1x	1,2 μl
Bufor Big Dye Sequencing Buffer	5x	1x	2 μl
H ₂ O	-	-	0,8 μl

Rysunek 9. Warunki cieplne reakcji PCR sekwencyjnego



3.7.3.3 Precypitacja produktów sekwencyjnego PCR

Precypitację produktów sekwencyjnego PCR prowadzono przy użyciu roztworu EDTA i etanolu. Proces ten miał na celu oddzielenie powstałych fragmentów jednoniciowego DNA od pozostałych składników mieszaniny użytej do przeprowadzenia reakcji PCR. W pierwszej kolejności, do próbek dodawano 5 μ l roztworu 125 mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i 60 μ l etanolu bezwodnego (POCH), po czym próbki energicznie mieszano i inkubowano przez 15 minut chroniąc je przed światłem. Następnie próbki wirowano przez 30 min przy 3000 g w temperaturze 4 °C, usuwano nadsącz i dodawano 60 μ l roztworu 70% etanolu. Próbki ponownie wirowano przez 15 min przy 1650 g w temperaturze 4 °C, a następnie dokładnie usuwano nadsącz. Powstałą peletkę rozpuszczano w 25 μ l dejonizowanego formamidu (Applied Biosystems). Tak uzyskane próbki denaturowano w temperaturze 95 °C przez 3 min, po czym przenoszono na лёd na około 10 minut.

3.7.3.4 Reakcja sekwencjonowania

Rozdział elektroforetyczny produktów sekwencyjnego PCR prowadzono na sekwenatorze kapilarnym ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) w temperaturze 60 °C, z użyciem polimeru POP-7 (Performance Optimilazed Polimer 7, Applied Biosystems) oraz kapilary o długości 47 cm i średnicy 50 μ m (Applied Biosystems). W odpowiednio dobranych warunkach elektroforezy, fragmenty DNA zakończone znakowanymi dideoksyrybonukleotydami (ddNTP), rozdzielane były pod względem wielkości. Uzyskane dane przetwarzano przy użyciu programu Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems). Otrzymane wyniki analizowano za pomocą takich programów, jak: Ridom TraceEdit (Ridom Bioinformatics) oraz Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd). Poprawność uzyskanych sekwencji kodujących wybrane egzony oceniano porównując je z dostępną w internetowej bazie Entrez Gene sekwencją referencyjną (ID genu *TGFBR1* – 7046, ID genu *TGFBR2* - 7048).

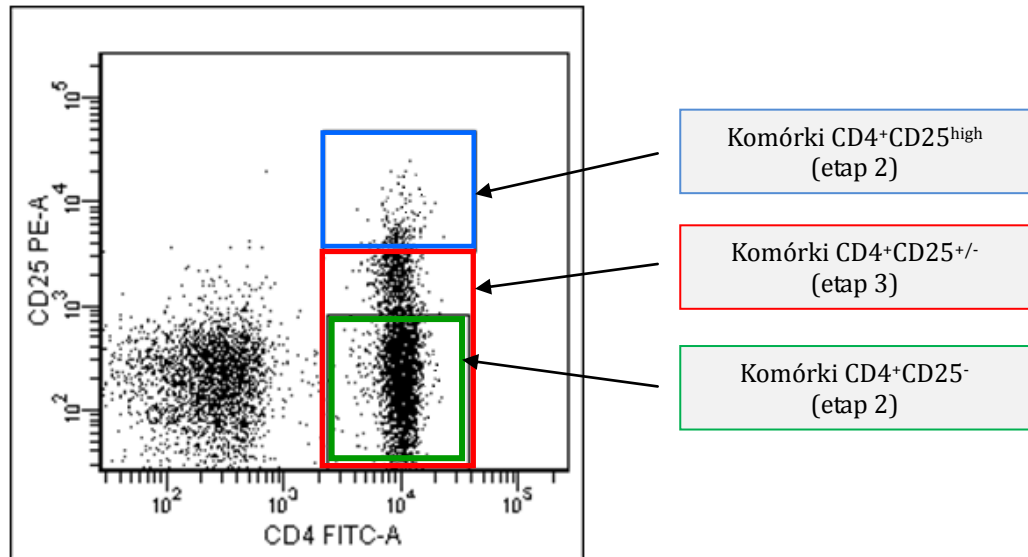
3.8 Ocena funkcjonalna limfocytów T_{reg}

Ocenę funkcjonalną limfocytów T_{reg} , w oparciu o pomiar produkcji IgG oraz proliferacji PBMC, przeprowadzono przy użyciu wysortowanych limfocytów T_{reg} , hodowanych w różnej liczbie z autologicznymi PBMC oraz z innymi sortowanymi populacjami limfocytów różniących się poziomem ekspresji cząsteczek CD4 i CD25. Eksperymenty prowadzono z użyciem komórek uzyskanych z krwi pełnej pobranej od zdrowych dawców ($n=7$) na antykoagulant EDTA w objętości około 300 ml.

3.8.1 Izolacja limfocytów T_{reg} oraz wybranych subpopulacji limfocytów

Na wstępie, z krwi pełnej izolowano PBMC, zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Uzyskane komórki inkubowano z mieszaniną przeciwciał monoklonalnych anty-CD4-FITC oraz anty-CD25-PE (BD Bioscience) przez 20 minut w temperaturze 4 °C. Po upływie tego czasu, komórki zawieszano w 2 ml buforu fosforanowego (ang. *phosphate-buffered saline*, PBS), a następnie umieszczano w cytofluorymetrze przepływowym FACS Aria II (Becton Dickinson, CA, USA). Proces izolacji poszczególnych populacji komórek przebiegał kilkietapowo. Jako że komórkami użytymi w eksperymencie były m. in. pełna populacja PBMC, w pierwszym etapie odpowiednią liczbę PBMC przepuszczano przez sorter w celu ujednolicenia wpływu procedury sortowania na stopień aktywacji komórek (tzw. „*dummy sorting*”). Po uzyskaniu odpowiedniej liczby komórek sort taki przerywano, po czym rozpoczynano – w oparciu tym razem o intensywność fluorescencji pochodzącej od FITC i PE – proces izolacji pozostałych subpopulacji. I tak, w drugim etapie, z reszty PBMC, bramkowano a następnie sortowano jednocześnie dwie populacje komórek: komórki CD4-pozytywne wykazujące najwyższą ekspresję cząsteczki CD25 (limfocyty T_{reg} , $CD4^+CD25^{high}$) oraz komórki CD4-pozytywne nie wykazujące ekspresji cząsteczki CD25 (komórki $CD4^+CD25^-$). Po uzyskaniu odpowiedniej liczby komórek sort ponownie przerywano, zmieniano schemat bramkowania komórek (etap 3) i sortowano komórki $CD4^+CD25^{+/-}$, pozbawione populacji komórek o najwyższej ekspresji CD25 ($CD4^+CD25^{high}$). Strategię bramkowania i izolacji wymienionych subpopulacji komórek, z uwzględnieniem poszczególnych etapów, przedstawiono na rysunku 10.

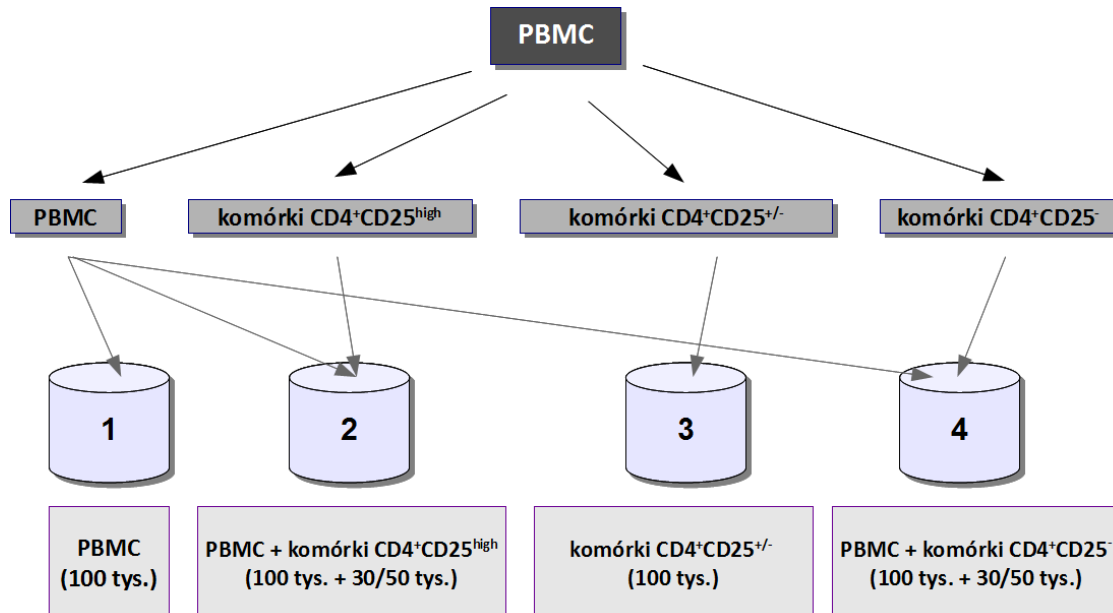
Rys. 10. Schemat analizy cytofluorymetrycznej, prowadzonej w celu izolacji następujących subpopulacji komórek: populacji komórek o fenotypie $CD4^+$ wykazujących zarazem wysoką ekspresję cząsteczki CD25 (komórki $CD4^+CD25^{high}$), populacji komórek $CD4^+$ pozbawionych komórek o najwyższej ekspresji CD25 (komórki $CD4^+CD25^{+/-}$) oraz populacji komórek $CD4^+$ nie wykazujących ekspresji CD25 (komórki $CD4^+CD25^-$).



3.8.2 Zakładanie hodowli PBMC z określonymi wysortowanymi subpopulacjami komórkowymi

W celu oceny funkcjonalnej limfocytów T_{reg} (ocena produkcji IgG oraz ocena proliferacji PBMC), z wysortowanych subpopulacji limfocytów oraz z przepuszczonych przez sorter PBMC, zgodnie ze schematem zamieszczonym na rysunku 11, zakładano odpowiednie hodowle komórkowe. Hodowle prowadzono w podłożu RPMI-1640 z dodatkiem 10% surowicy cielęcej (FCS, Biochrom) i gentamycyny w stężeniu $25\mu\text{g/ml}$ (Gibco), w temperaturze 37°C , w atmosferze 5% CO_2 , przez 5 dni, w płaskodennych 96-dółkowych płytkach (Nunc). Komórki stymulowano dodawaniem do hodowli PWM (Biochrom, Berlin, Niemcy) o stężeniu końcowym 4 ng/ml . W celu zapewnienia przeżycia limfocytów, do hodowli dodawano również rekombinowaną ludzką IL-2 w stężeniu 300 IU/ml (PeproTech, NJ, USA). Po zakończeniu hodowli, oceniano proliferację komórek, z kolei w nadsącach hodowlanych oceniano stężenie IgG.

Rysunek 11. Schemat obrazujący zakładanie hodowli z wyizolowanych uprzednio od zdrowych dawców populacji komórek, w celu oceny funkcjonalnej limfocytów T_{reg} w warunkach *in vitro*. Prowadzono następujące typy hodowli: PBMC przepuszczone przez sorter w liczbie 100 tys. komórek na dołek (pozycja nr 1), PBMC (100 tys.) z komórkami T_{reg} o fenotypie $CD4^+CD25^{high}$ (pozycja nr 2) dodawanymi do PBMC w dwóch różnych stężeniach, tj. 30 tys. i 50. tys., populację komórek pozbawionych limfocytów T_{reg} (pozycja nr 3) oraz PBMC z komórkami $CD4^+CD25^-$ (pozycja nr 4), dodawanymi do hodowli w dwóch różnych stężeniach, tj. 30 tys. i 50. tys.



3.8.3 Ocena zmian produkcji immunoglobulin klasy IgG

Poziom IgG oznaczany był w nadsączach hodowlanych przy użyciu metody cytometrycznej CBA, którą opisano powyżej. Dolna granica wykrywalności IgG wynosiła 0,34 ng/ml.

3.8.4 Ocena zmian proliferacji PBMC pod wpływem limfocytów T_{reg}

Odpowiedź proliferacyjną PBMC na stymulację PWM oceniano stosując metodę opartą o inkorporację tymidyny znakowanej trytem przez proliferujące komórki. Na sześć godzin przed zakończeniem 5-dniowej hodowli (prowadzonej zgodnie ze schematem zamieszczonym powyżej), do zawiesiny komórek dodawano roztwór tymidyny znakowanej trytem o aktywności 1μCi (Hartmann Analytic, Sterilin, UK) i inkubowano w temperaturze

37 °C. Po upływie tego czasu, komórki przenoszono na specjalne filtry (FilterMAT, Skatron Instruments, Sterling, VA, USA), które umieszczano następnie w odpowiednich naczyniach i zalewano mieszaniną scyntylacyjną. Ilość wbudowanej tymidyny korelowała z aktywnością radiacyjną próbki, którą mierzono przy użyciu licznika scyntylacyjnego LS 1801 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). Uzyskane wyniki podawano w jednostkach zliczeń na minutę (ang. *count per minute*, cpm).

3.9 Analiza statystyczna wyników

W celu opracowania uzyskanych danych, posłużono się oprogramowaniem PRISM GraphPad 4 statistical package (GraphPad Prism, USA). Wyniki badań prezentujące cechy ilościowe, charakteryzowano poprzez podanie wartości średniej, mediany, wartości minimalnej i maksymalnej oraz odchyłeń standardowych. W przypadku, gdy nie została potwierdzona zgodność z rozkładem normalnym, stosowano odpowiednie testy nieparametryczne. Dla porównywania rozkładu pomiędzy dwoma grupami, użyty został test Manna-Whitney'a. Natomiast, w przypadku porównywania większej liczby grup, zastosowano test Kruskala-Wallisa z testem wielokrotnych porównań Dunna. Zależności pomiędzy dwoma cechami ilościowymi oceniano przy użyciu współczynnika korelacji rang Spearmana, jak również stosując regresję liniową. Część wyników przeprowadzonych badań przedstawiono w postaci cech jakościowych. Zależności między tymi cechami analizowano dokładnym testem Fishera i uznawano za istotne statystycznie, gdy ich poziom istotności (p) był równy lub mniejszy od 0,05.

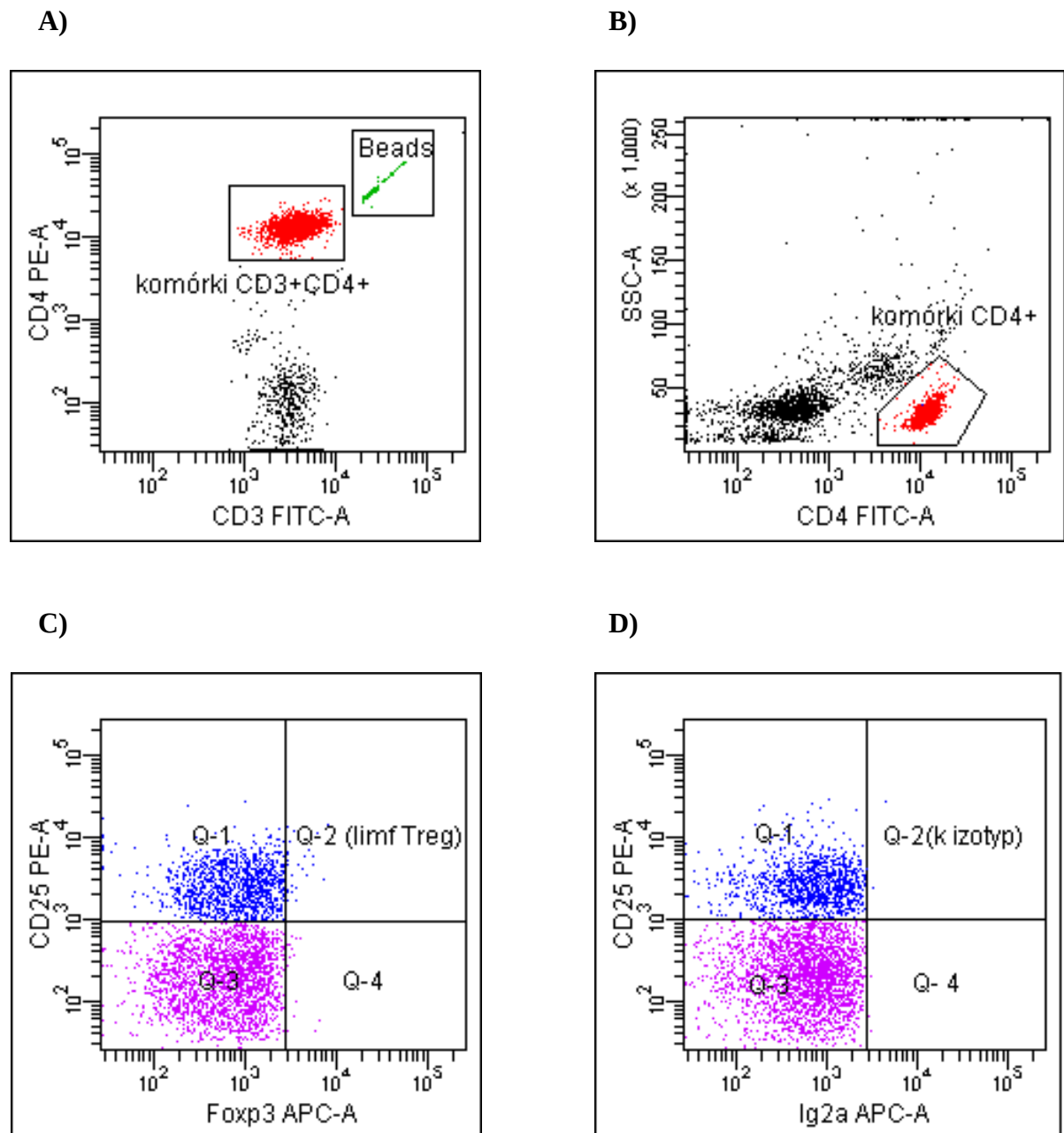
4 WYNIKI

4.1 Analiza liczebności limfocytów T_{reg} w odniesieniu do wybranych parametrów immunologicznych

Liczbę limfocytów T_{reg} oznaczano w grupie dzieci z THI, CVID oraz SIgAD. Chorych, u których postawiono wstępne rozpoznanie THI lub CVID, objęto długoterminowymi badaniami kontrolnymi (badania typu *follow-up*) celem ostatecznego ustalenia diagnozy. Podczas kolejnych wizyt, oprócz oznaczania liczebności krążących limfocytów T_{reg} , monitorowano ponadto surowicze stężenie immunoglobulin IgG oraz bezwzględną liczbę limfocytów B. Jednocześnie, w PBMC izolowanych od pacjentów, przeprowadzano analizę zmian poziomu ekspresji mRNA dla Foxp3.

4.1.1 Ocena liczebności limfocytów T_{reg} u pacjentów z wybranymi pierwotnymi niedoborami odporności humoralnej

Bezwzględną liczbę krążących limfocytów T_{reg} oznaczono łącznie u 140 dzieci z niedoborami odporności humoralnej, tj.: 68 z THI, 32 z CVID, 40 z SIgAD oraz w dobranej wiekowo grupie kontrolnej liczącej 87 dzieci. Przykład analizy cytometrycznej, umożliwiającej określenie liczby krążących limfocytów T_{reg} , przedstawiono na rysunku 12.

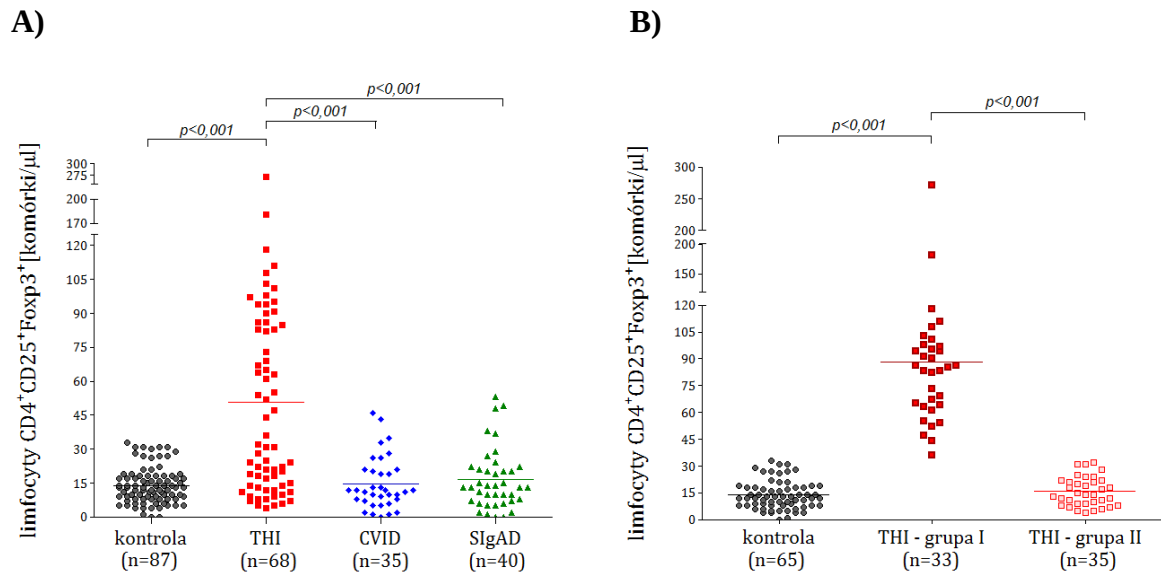


Rysunek 12. Przykład analizy liczebności limfocytów T_{reg} u zdrowego dziecka. Ocena bezwzględnej liczby krążących limfocytów T_{reg} przebiegała dwuetapowo. Na wstępie, w probówkach typu TruCount oznaczano bezwzględną liczbę limfocytów T o fenotypie $CD3^+CD4^+$ w krwi pełnej, na podstawie liczebności zawartych w próbce tzw. mikrokuleczek (beads) (A); W następnym etapie, wyizolowane z krwi pełnej PBMC inkubowano z mieszaniną przeciwciał wchodzących w skład zestawu do oznaczania limfocytów T_{reg} . Na podstawie powierzchniowej ekspresji białka CD4 i parametru ziarnistości (SSC) identyfikowano populację limfocytów $CD4^+$ (B); następnie, biorąc pod uwagę jedynie komórki $CD4$ -pozytywne, oceniano na nich powierzchniową ekspresję cząsteczki CD25 i jednocześnie cytoplazmatyczną ekspresję białka Foxp3 (C). Komórki o fenotypie $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ uznawano za limfocyty T_{reg} (bramka Q2 na rys. C). Przeprowadzenie poprawnej analizy zapewniało barwienie dodatkowej próbki PBMC z zastosowaniem przeciwciała IgG2a-APC (kontrola izotopowa dla Foxp3) (D).

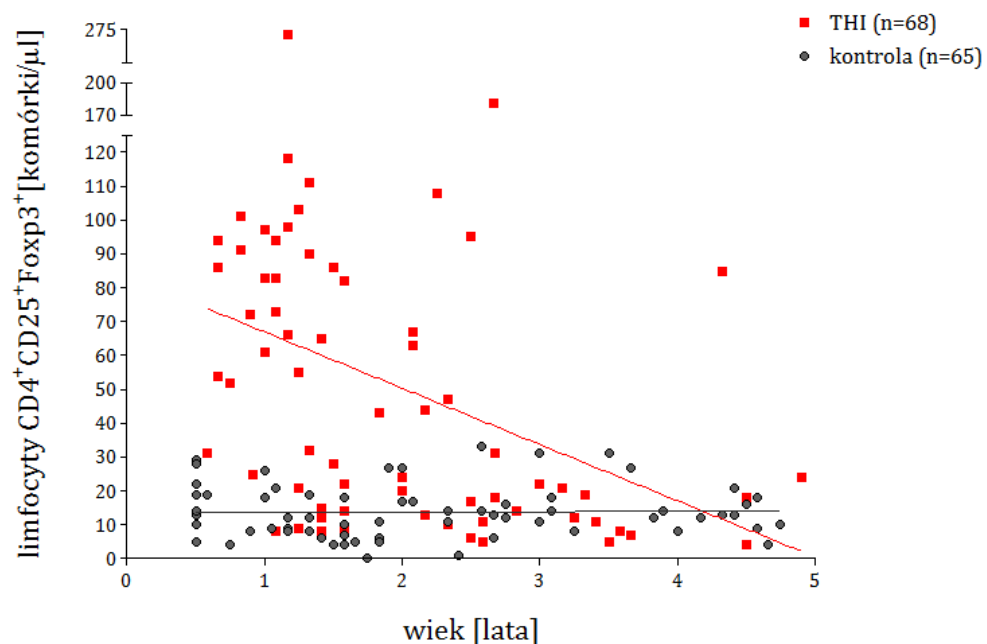
Spośród badanych grup, jedynie u dzieci z THI obserwowano istotnie podwyższony (względem kontroli oraz CVID/SlgAD) poziom limfocytów T_{reg} ($p < 0,001$). W przypadku pacjentów z CVID oraz SlgAD, średnia liczebność krążących limfocytów T_{reg} była porównywalna z obserwowaną u osób zdrowych (Rys. 13A). Grupę pacjentów z THI tworzyły dzieci w różnym wieku: i) u których nastąpiła normalizacja poziomu IgG w surowicy i ogólnego stanu klinicznego, i u których można było postawić retrospektywną, pewną diagnozę THI oraz te, ii) u których na podstawie objawów klinicznych i wyników badań laboratoryjnych sugerowano rozpoznanie przejściowej hipogammaglobulinemii. Stąd też, otrzymane dla 68 pacjentów z tej grupy liczebności limfocytów T_{reg} pochodzą od dzieci będących w różnych stadiach choroby: nadal z hipogammaglobulinemią, lub już po normalizacji poziomu IgG.

Obserwując wyraźne różnice w poziomie krążących limfocytów T_{reg} w niejednorodnej pod względem objawów klinicznych grupie THI, dokonano arbitralnego jej podziału na dwie podgrupy (Rys. 13B). Pierwszą z nich, nazwaną „THI – grupa I”, utworzyły dzieci, u których obserwowany poziom limfocytów T_{reg} był wyższy od najwyższej wartości obserwowanej w grupie kontrolnej, tj. 43 komórek/ μ l. Średni poziom limfocytów T_{reg} w tej grupie wynosił 88 komórek/ μ l. W drugiej – nazwanej „THI – grupa II”, średnia liczebność limfocytów T_{reg} wynosiła 15 komórek/ μ l i odpowiadała obserwowanej u zdrowych dzieci. Pomiędzy obiema grupami zaobserwowano istotne statystycznie różnice w odniesieniu do wieku badanych chorych: dzieci z grupy I były wyraźnie młodsze (średnia wieku: $1,47 \pm 0,79$ lat), w odniesieniu do grupy II (średnia wieku: $2,45 \pm 1,06$ lat; $p < 0,0001$). W związku z tym, podjęto próbę analizy zmian liczebności limfocytów T_{reg} w zależności od wieku pacjentów. W całej grupie THI (biorąc pod uwagę wyjściowe poziomy T_{reg} , przy pierwszym oznaczeniu u każdego z pacjentów) stwierdzono istnienie ujemnej korelacji pomiędzy analizowanymi parametrami (współczynnik korelacji Spearmana $r = -0,5132$, $p < 0,001$) oraz obserwowano spadek bezwzględnej liczby limfocytów T_{reg} wraz z wiekiem (Rys. 14). U starszych dzieci (w wieku około 4-5 lat) poziom limfocytów T_{reg} osiągał wartości obserwowane u zdrowych osób. Odpowiednio, liczebność limfocytów T_{reg} w grupie kontrolnej pozostawała na stałym poziomie, niezależnie od wieku dziecka badanego (korelacja nieznamienne statystycznie). W analizie regresji linowej, wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy nachyleniami linii regresji dla grupy kontrolnej i dla grupy THI ($p = 0,007$).

Rysunek 13. Bezwzględna liczba limfocytów T_{reg} u dzieci z wybranymi niedoborami odporności humoralnej (THI, CVID, SIgAD), w odniesieniu do grupy kontrolnej (A); oraz po podziale uwzględniającym liczebność tych komórek w grupie THI (B). Niższa, w porównaniu z rys. A, liczebność osób w grupie kontrolnej na rys. B wynika z faktu, iż została ona dobrana pod względem wieku do prezentowanej równolegle grupy dzieci z THI (zakres wieku w przypadku osób zdrowych i pacjentów THI mieścił się w przedziale od 6 do 52 miesiąca życia).



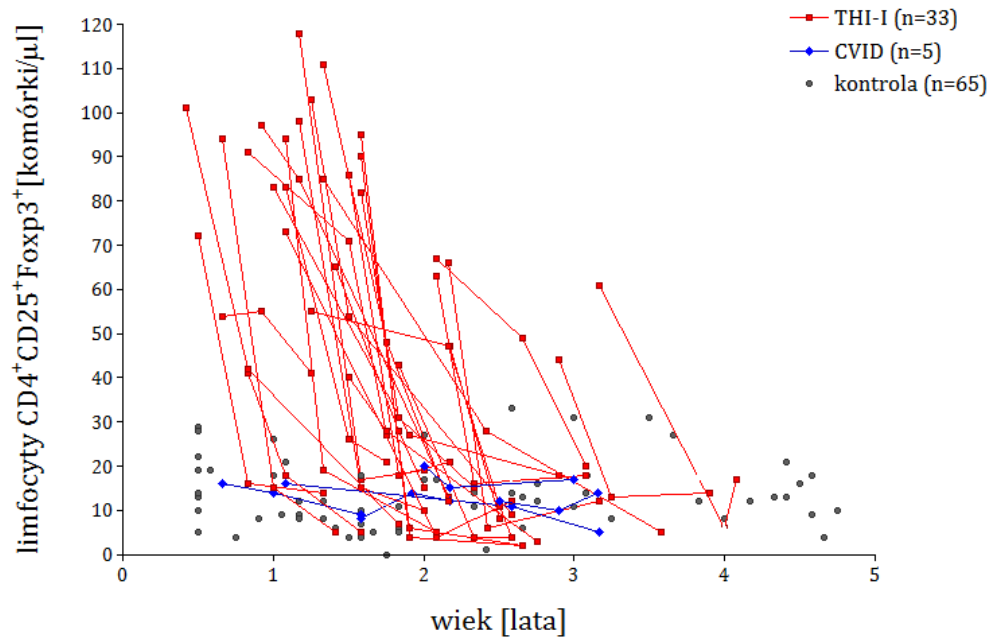
Rysunek 14. Liczebności limfocytów T_{reg} , w odniesieniu do wieku, u wszystkich pacjentów THI oraz u osób zdrowych z dobranej wiekowo grupy kontrolnej. Wykres przedstawia uzyskane dane wraz z wyznaczonymi liniami regresji.



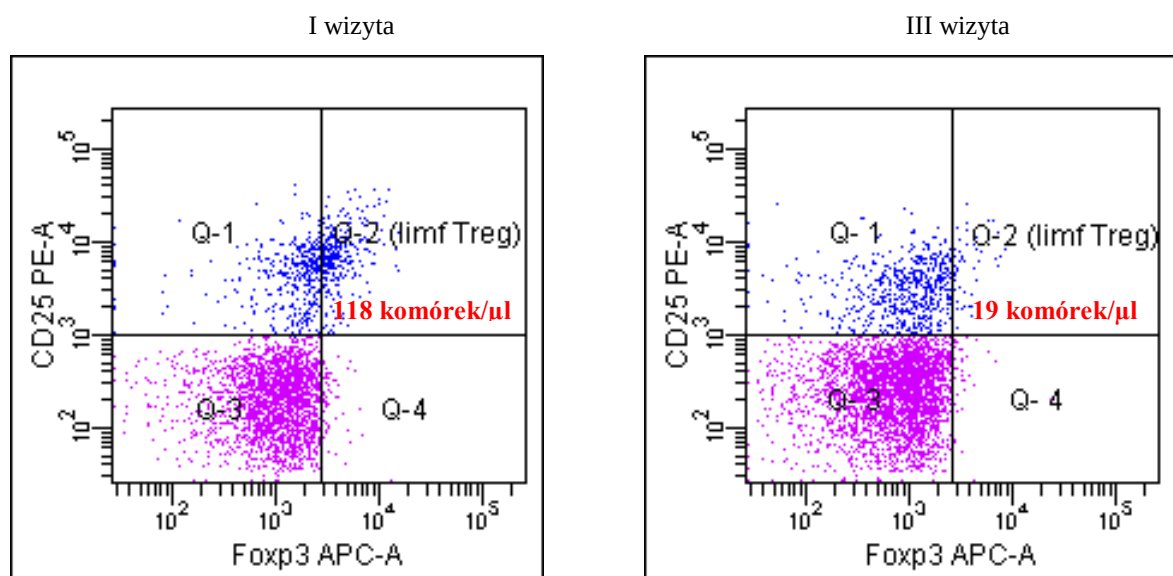
W celu oceny dynamiki zmian poziomu limfocytów T_{reg} , pacjentów należących do grupy THI-I, w liczbie 33 osób prezentujących najwyższy ich poziom, objęto obserwacją długoterminową. U dzieci tych, będących (w momencie rozpoczęcia obserwacji) w wieku od 6 miesięcy do 3 roku życia, w trakcie kolejnych 3 wizyt monitorujących stan kliniczny i parametry immunologiczne, oznaczano m. in. liczebność badanej subpopulacji limfocytów T_{reg} . Obserwacje prowadzono do momentu normalizacji poziomu IgG w surowicy krwi, co miało miejsce u poszczególnych pacjentów badanej grupy pomiędzy 1,5 a 4 rokiem życia. Podobne obserwacje przeprowadzono u 5 pacjentów z rozpoznaniem CVID. U wszystkich dzieci z grupy THI-I bezwzględna liczba limfocytów T_{reg} ulegała obniżeniu pomiędzy kolejnymi wizytami osiągając, przy ostatnim pomiarze, wartości obserwowane w grupie kontrolnej (Rys. 15). W przypadku pacjentów z CVID, nie odnotowano wyraźnych zmian liczebności limfocytów T_{reg} w trakcie kolejnych wizyt. Przykład analizy cytometrycznej zmian liczebności limfocytów T_{reg} u losowo wybranego chorego z THI, pomiędzy pierwszą i ostatnią (trzecią) wizytą, przedstawiono na rysunku 16.

Ostatecznie stwierdzono iż: i) średnia liczebność krążących limfocytów T_{reg} była znamienne podwyższona (względem kontroli) jedynie u chorych z grupy THI, ii) u pacjentów z THI obserwowano zależne od wieku różnice w poziomie krążących limfocytów T_{reg} : młodsze dzieci (średnia wieku $1,47 \pm 0,79$ lat) wykazywały istotnie wyższą ($p < 0,05$) liczebność limfocytów T_{reg} (średnia: 88 ± 38 komórek/ μ l), niż starsze (odpowiednio: $2,45 \pm 1,06$ lat, 15 ± 8 komórek/ μ l), iii) prospektywne obserwacje kliniczne wybranych chorych z THI pozwoliły stwierdzić, iż podwyższona liczba limfocytów T_{reg} u młodszych dzieci obniżała się wraz z wiekiem, aż do poziomu wartości obserwowanych w grupie kontrolnej.

Rysunek 15. Poziom limfocytów T_{reg} u 33 pacjentów z THI (grupa THI-I) i 5 chorych z CVID podczas trzech kolejnych wizyt, w odniesieniu do pojedynczych pomiarów wykonanych u zdrowych dzieci z grupy kontrolnej.



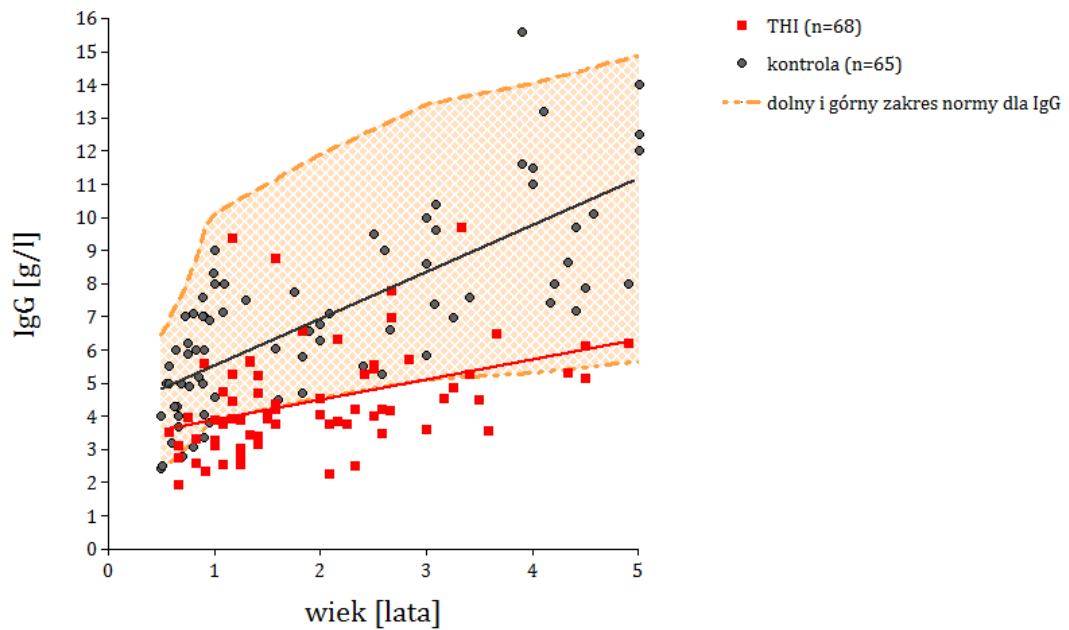
Rysunek 16. Przykład analizy cytofluorymetrycznej, obrazujący spadek bezwzględnej liczby krążących limfocytów T_{reg} u jednego z pacjentów THI poddanych obserwacji długoterminowej. Liczebność limfocytów T_{reg} (odczytywana z bramki Q-2) w trakcie pierwszej wizyty wynosiła 118 komórek na 1 μ l krwi, natomiast w trakcie trzeciej, mającej miejsce 6 miesięcy później wizyty – 19 komórek na 1 μ l (wiek dziecka w trakcie pierwszej wizyty wynosił 16 miesięcy).



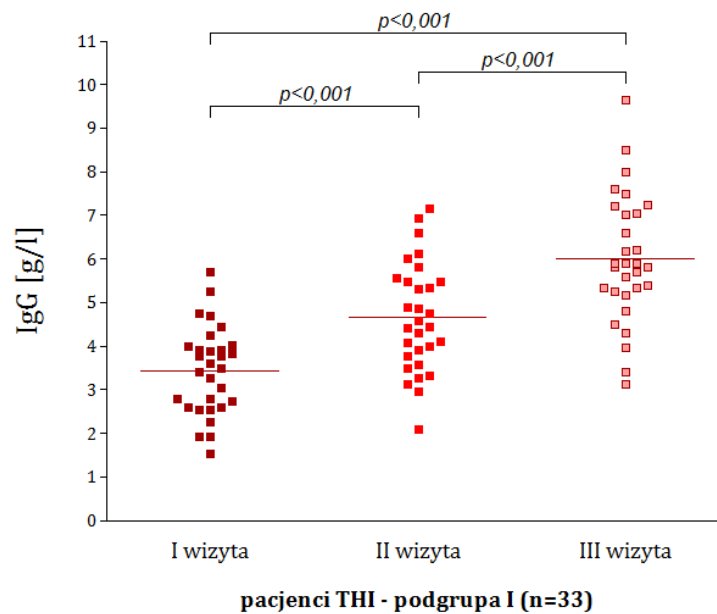
4.1.2 Ocena zależności pomiędzy poziomami IgG, wiekiem, liczebnością limfocytów B oraz limfocytów T_{reg}

Równolegle z oceną liczby krążących limfocytów T_{reg}, u każdego pacjenta z grupy THI określano podczas pierwszego oznaczenia poziom IgG w surowicy krwi oraz bezwzględną liczbę krążących limfocytów B (CD19⁺). Poziom IgG w grupie THI wzrastał wraz z wiekiem (współczynnik korelacji Spearmana $r = 0,5005$, $p < 0,0001$), ale wzrost ten, w porównaniu do obserwowanego u zdrowych osób z grupy kontrolnej, był wyraźnie spowolniony (Rys. 17). Różnice pomiędzy nachyleniem linii regresji liniowej dla THI i grupy kontrolnej były statystycznie istotne ($p = 0,01$). Oceniany pomiędzy wizytami poziom IgG u pacjentów z grupy THI-I wskazywał na systematyczny wzrost surowiczego stężenia IgG w trakcie kolejnych badań (Rys. 18). Oznaczana u wszystkich pacjentów z grupy THI bezwzględna liczba krążących limfocytów B (CD19⁺) mieściła się w zakresach normy dla danego wieku i była porównywalna z poziomami obserwowanymi u dzieci zdrowych tworzących grupę kontrolną. W grupie chorych z THI, zmiany liczebności limfocytów B w zależności od wieku, pokrywały się z analogicznymi zmianami obserwowanymi u dzieci zdrowych (Rys. 19).

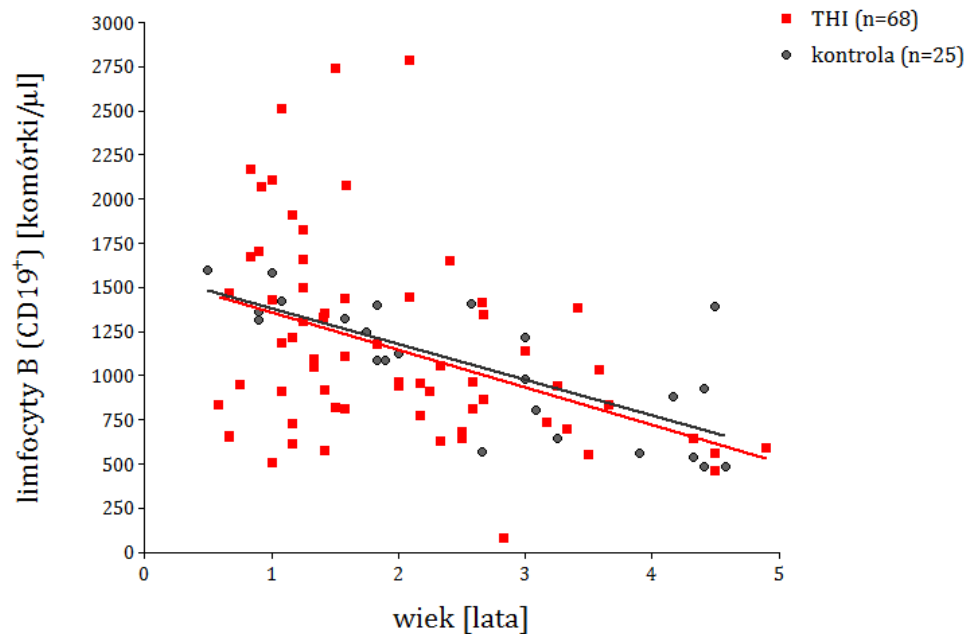
Rysunek 17. Wykres zmian poziomów IgG w zależności od wieku, u wszystkich pacjentów z THI i w grupie kontrolnej, z uwzględnieniem dolnego i górnego zakresu norm IgG. Wykres przedstawia uzyskane dane wraz z wyznaczonymi liniami regresji.



Rysunek 18. Zmieniający się w czasie surowiczy poziom IgG u pacjentów z grupy THI-I, obserwowany w trakcie kolejnych wizyt (odstępów pomiędzy kolejnymi pomiarami były różne dla poszczególnych pacjentów i wynosiły od 3 do 12 miesięcy).



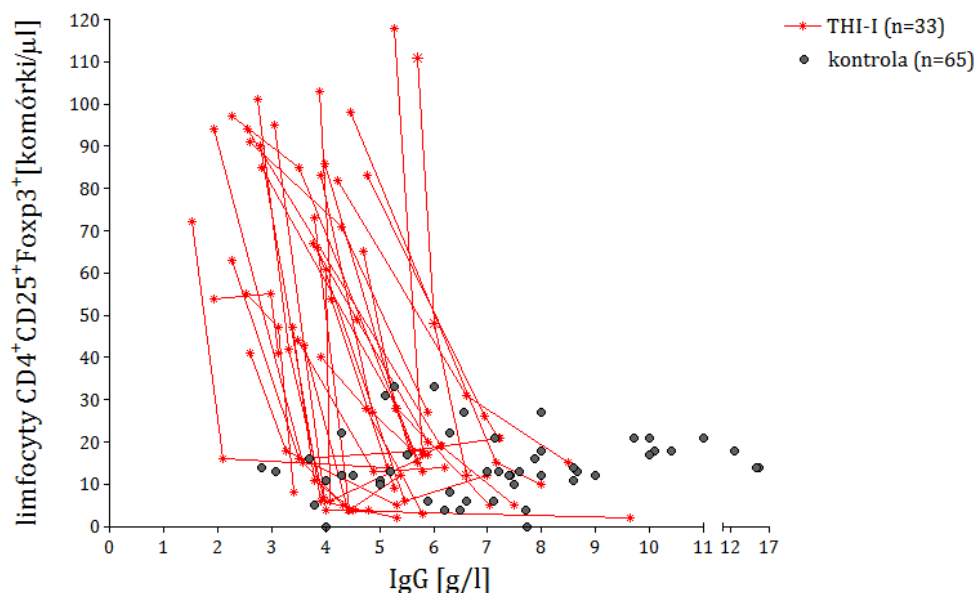
Rysunek 19. Poziomy krążących limfocytów B ($CD19^+$) w odniesieniu do wieku, obserwowane u wszystkich pacjentów z grupy THI i osób z grupy kontrolnej (przedstawione na wykresie liczebności limfocytów B oznaczane były u chorych z THI jednorazowo, podczas pierwszej wizyty). W obrębie grupy kontrolnej liczebność limfocytów B oznaczono u 25 zdrowych osób. Wykres przedstawia uzyskane dane wraz z wyznaczonymi liniami regresji.



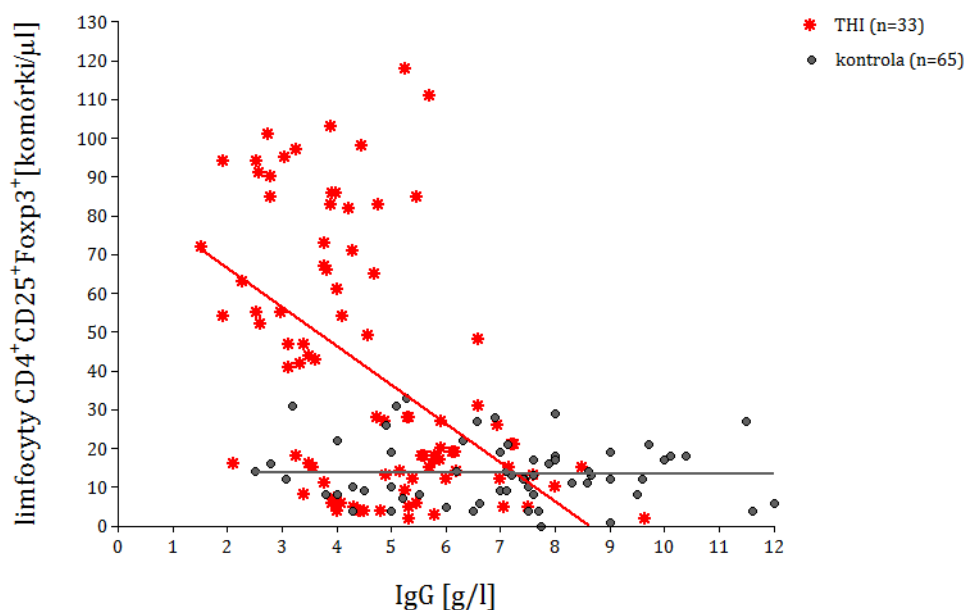
W badaniach prospektywnych, którymi objęta została grupa THI-I, wraz ze spadkiem liczebności krążących limfocytów T_{reg} obserwowano, w trakcie kolejnych wizyt, wzrastający poziom surowiczego IgG (rys. 20).

Badając zależność pomiędzy liczebnością krążących limfocytów T_{reg} a poziomem IgG u 33 dzieci z THI (grupa THI-I), uzyskano istotną statystycznie korelację pomiędzy badanymi parametrami (współczynnik Spearmana $r = -0,4888$, $p < 0,0001$). Różnice pomiędzy nachyleniem linii regresji liniowej dla grupy THI-I, ale nie dla grupy kontrolnej, były statystycznie istotne (rys. 21).

Rysunek 20. Liczebności limfocytów T_{reg} w odniesieniu do poziomów IgG, u pacjentów THI-I podczas trzech kolejnych wizyt (w przypadku osób zdrowych z grupy kontrolnej, analizowane parametry oznaczane były jednorazowo).



Rysunek 21. Liczebności krążących limfocytów T_{reg} w odniesieniu do poziomów IgG u dzieci z grupy THI-I oraz w grupie kontrolnej, wraz z wyznaczonymi liniami regresji (w przypadku pacjentów THI na wykresie przedstawiono dane pochodzące jednocześnie z wszystkich trzech kolejnych wizyt).



Podsumowując, jedynie u dzieci z THI obserwowano znacznie podwyższoną liczbę krążących limfocytów T_{reg} (komórki o fenotypie $CD4^+CD25^+Foxp3^+$), w przeciwieństwie do chorych z CVID i SIgAD, gdzie ich liczebność była porównywalna z grupą kontrolną. Ponadto, u pacjentów z THI obserwowano zależne od wieku różnice w poziomie tych komórek. Prowadzone prospektywne obserwacje kliniczne 33 chorych z THI (grupa THI-I) pozwoliły stwierdzić, iż podwyższona liczba limfocytów T_{reg} u młodszych dzieci malała wraz z wiekiem, aż do wartości obserwowanych w grupie kontrolnej. Ponadto, spadkowi liczby krążących komórek T_{reg} towarzyszyła normalizacja poziomu immunoglobulin w surowicy krwi tych pacjentów.

4.1.3 Ocena liczebności limfocytów T_{reg} w diagnostyce różnicowej THI z innymi formami hipogammaglobulinemii

Biorąc pod uwagę dane uzyskane dla pacjentów poniżej 5 roku życia, podjęto próbę określenia podstawowych cech testu diagnostycznego, jakim mogłaby się stać ocena liczebności krążących limfocytów T_{reg}. Na podstawie zamieszczonej poniżej tabeli obliczono takie wartości testu, jak: czułość, swoistość, dodatnie i ujemne wartości predykcyjne.

Tabela 12. Tabela kontyngencji obrazująca zależność pomiędzy wynikiem testu diagnostycznego jakim jest ocena liczebności krążących limfocytów T_{reg} u dzieci poniżej 5 roku życia, a faktycznym występowaniem, lub też nie występowaniem, choroby (THI). „Wynik negatywny” testu stwierdzano wówczas, gdy liczebność komórek T_{reg} mieściła się w przedziale obserwowanym w grupie kontrolnej (tj. od 0 do 31 komórek/ μ l), natomiast za „wynik pozytywny” testu uznawano liczebności limfocytów T_{reg} wyższą niż 31 komórek/ μ l (tj. wyższą, niż największa wartość obserwowana w grupie osób zdrowych). Za osoby chore (choroba(+)) uznano wszystkich pacjentów z grupy THI. Chorzy z pozostałych grup badanych (tj. z grupy CVID i SIgAD) utworzyli grupę osób, u których choroby (czyli THI) nie stwierdzono.

		Rzeczywistość (gold standard)		
		Choroba (+)	Brak choroby (-)	Suma
Test diagnostyczny	Wynik pozytywny	33	9	42
	Wynik negatywny	35	43	78
	Suma	68	52	120

Czułość testu interpretowano jako stosunek wyników prawdziwie dodatnich do sumy prawdziwie dodatnich i fałszywie ujemnych. Swoistość testu wyliczano jako stosunek wyników prawdziwie ujemnych do sumy prawdziwie ujemnych i fałszywie dodatnich. Wartość predykcyjna dodatnia stanowiła stosunek wyników prawdziwie dodatnich do sumy prawdziwie dodatnich i fałszywie dodatnich. Wartość predykcyjna ujemna obliczana była jako stosunek wyników prawdziwie ujemnych do sumy prawdziwie ujemnych i fałszywie ujemnych.

Przy uwzględnieniu wieku pacjentów mieszczącego się w przedziale od 0,5 do 5 roku życia, czułość testu diagnostycznego była równa 48,5%, swoistość testu wynosiła 83%, dodatnia wartość predykcyjna 79%, ujemna wartość predykcyjna 55%. Wynika z tego, iż: i) u blisko połowy chorych z THI (48,5%) stwierdzono pozytywny wynik testu (tj. podwyższoną liczbę krążących limfocytów T_{reg}); ii) większość, tj. 83% chorych z CVID lub SIgAD, miała negatywny wynik testu. Na podstawie powyższych obliczeń można ponadto wykazać, iż jeżeli liczba oznaczanych w krwi komórek T_{reg} u dziecka w wieku od 6 miesięcy do 5 roku życia przyjmowała wartości powyżej 31 komórek/ μ l, to z prawdopodobieństwem sięgającym 79% można było zakładać rozpoznanie THI. Z kolei, u dziecka, u którego poziom tych komórek był niższy niż 31 komórek/ μ l, z prawdopodobieństwem wynoszącym 55% można było stwierdzać występowanie innych form hipogammaglobulinemii, takich jak CVID lub SIgAD.

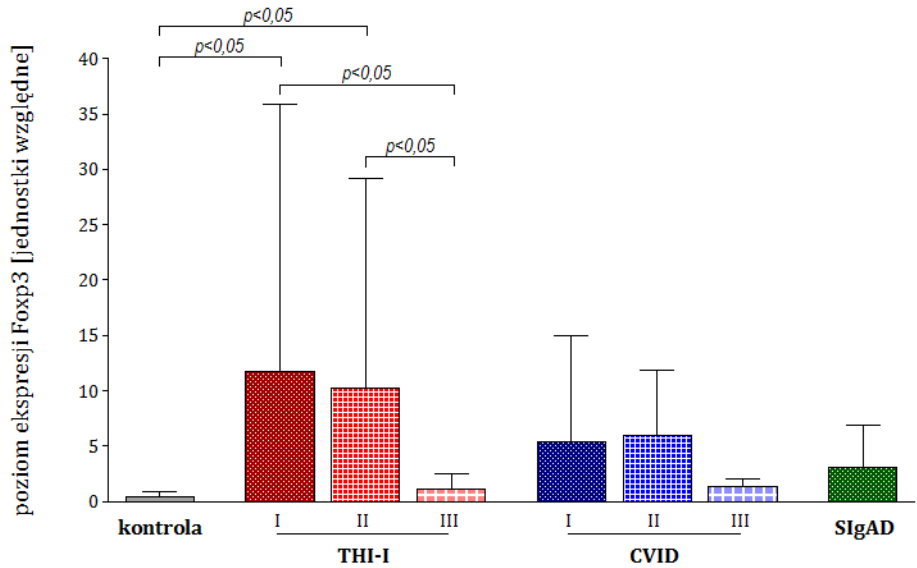
Uwzględniając fakt, iż większość chorych z THI (jak wynika z danych literaturowych) osiąga prawidłowe poziomy immunoglobulin około 2-go roku życia, ocenę testu diagnostycznego przeprowadzono dodatkowo u dzieci z grup badanych (THI, CVID, SIgAD) będących poniżej 2 roku życia. Uzyskane w tym przypadku wartości przedstawiały się następująco: i) pozytywny wynik testu stwierdzano u ponad połowy chorych z THI (72%); ii) 73% pacjentów z CVID lub SIgAD miało negatywny wynik testu; iii) w przypadku uzyskania pozytywnego wyniku testu, z prawdopodobieństwem równym 90% możliwe było postawienie rozpoznania THI; iv) w przypadku negatywnego wyniku testu, rozpoznanie CVID lub SIgAD można było stwierdzać z prawdopodobieństwem sięgającym zaledwie 42%.

4.1.3 Analiza zmian poziomu ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w PBMC

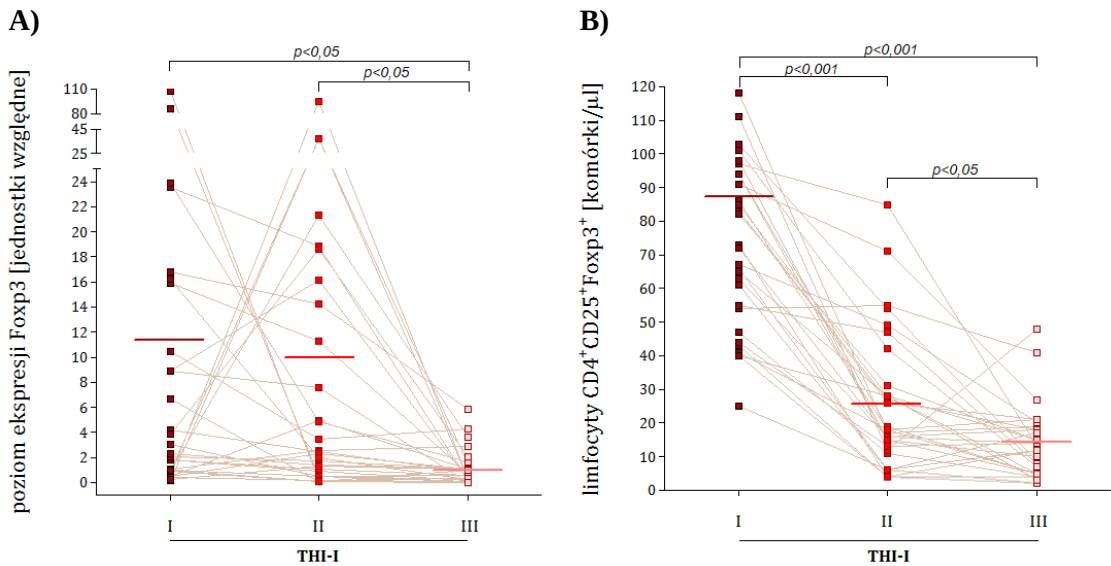
Ocenę ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxp3 na poziomie mRNA przeprowadzono u 33 dzieci z grupy THI-I objętych obserwacją długoterminową. W przypadku każdego z pacjentów, oznaczenia wykonywano trzykrotnie, z PBMC izolowanych podczas każdej wizyty. Względny poziom ekspresji mRNA dla Foxp3 oznaczano według tego samego schematu również u 5 chorych z potwierdzonym CVID oraz, jednorazowo, u 5 chorych z SIgAD i 25 zdrowych osób z grupy kontrolnej.

W grupie pacjentów z THI odnotowano pomiędzy kolejnymi wizytami wyraźny spadek poziomu ekspresji badanego genu. Średnie wartości względnego poziomu ekspresji mRNA dla Foxp3 w tej grupie chorych przedstawiały się następująco: I wizyta $11,7 \pm 24,18$, II wizyta $10,22 \pm 18,91$ oraz III wizyta $1,1 \pm 1,39$ jednostek względnych. W trakcie III wizyty (normalizacja poziomu IgG, liczebności limfocytów T_{reg} oraz stanu klinicznego wszystkich pacjentów), średni poziom ekspresji mRNA dla Foxp3 był porównywalny z obserwowanym u zdrowych osób. W grupie chorych z CVID, średnie poziomy ekspresji mRNA dla Foxp3 podczas trzech kolejnych wizyt nie różniły się istotnie zarówno pomiędzy sobą, jak i w odniesieniu do grupy kontrolnej. W grupie SIgAD, poziom względnej ekspresji badanego genu nie wykazywał istotnych różnic w porównaniu z grupą kontrolną. Średnie, względne poziomy ekspresji mRNA dla Foxp3 ($\pm$ SD) obserwowane w poszczególnych grupach badanych oraz w grupie osób zdrowych, przedstawiono na rysunku 22.

Rysunek 22. Wartości średnich poziomów ekspresji mRNA dla Foxp3 u pacjentów z pierwotnymi niedoborami odporności (THI, CVID, SIgAD) oraz u osób zdrowych (kontrola) (w przypadku grupy THI-I i CVID, cyfry: I, II, III oznaczają numery trzech kolejnych wizyt).



Rysunek 23. Względny poziom ekspresji mRNA dla Foxp3 (wyrażony w jednostkach względnych) przedstawiony dla każdego pacjenta z grupy THI-I (n=33) podczas trzech kolejnych wizyt (A), w odniesieniu do monitorowanej równolegle bezwzględnej liczby krążących limfocytów T_{reg} (B) (cyfry: I, II, III oznaczają numery kolejnych wizyt). W zamieszczonej poniżej wykresu tabeli, przedstawiono średnie wartości $\pm$ SD dla: wieku, względnej ekspresji mRNA dla Foxp3 oraz liczebności krążących limfocytów T_{reg} w grupie dzieci THI-I podczas trzech kolejnych wizyt.



Analizowany parametr	Wizyta I	Wizyta II	Wizyta III
wiek [lata $\pm$ SD]	1,47 $\pm$ 0,79	1,89 $\pm$ 0,74	2,42 $\pm$ 0,72
względna ekspresja mRNA dla Foxp3 [jed. względne $\pm$ SD]	11,7 $\pm$ 24,18	10,22 $\pm$ 18,91	1,1 $\pm$ 1,39
liczebność limf. CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ [kom./μl $\pm$ SD]	88 $\pm$ 38	26 $\pm$ 19	14 $\pm$ 10

W dalszej kolejności, indywidualnie dla każdego z 33 pacjentów z grupy THI-I, analizowano dynamikę zmian poziomu ekspresji genu *FOXP3*, w odniesieniu do monitorowanej równolegle, w trakcie kolejnych wizyt, liczby krążących limfocytów T_{reg} (Rys. 23). Analizując liczebność komórek T_{reg} zaobserwowano, iż u 31 z 33 dzieci ulegała ona obniżeniu podczas kolejnych wizyt, u pozostałych dwóch pacjentów była najwyższa podczas drugiej lub trzeciej wizyty (rys. 23 B). Z kolei, najwyższe względne poziomy ekspresji mRNA dla *Foxp3* odnotowano podczas pierwszego oraz drugiego pomiaru. Najwyższe wartości poziomu ekspresji mRNA dla *Foxp3* podczas pierwszej wizyty zaobserwowano u 10 z 33 pacjentów w grupie THI-I, natomiast podczas drugiej wizyty obserwowano je u innych 11 chorych (za punkt odcięcia przyjęto najwyższy poziom względnej ekspresji w grupie THI-I podczas ostatniej wizyty). Spadek ekspresji mRNA dla *FOXP3* u 32 z 33 pacjentów następował podczas ostatniej wizyty (rys. 23 A). Analizując surowicze poziomy IgG u pacjentów z THI podczas drugiej wizyty, nie obserwowano jednak istotnych różnic pomiędzy grupą chorych wykazujących wysoki i niski względny poziom ekspresji mRNA dla *Foxp3* (dane nie prezentowane).

Badając zależność poziomu względnej ekspresji genu *FOXP3* od wieku, nie stwierdzono w grupie THI-I znamiennej statystycznie korelacji pomiędzy badanymi parametrami ($r = -0,1974$, $p = 0,0623$). Analiza regresji liniowej nie wykazała statystycznie znamiennych różnic pomiędzy nachyleniem linii regresji uzyskanych dla grup pacjentów i grupy kontrolnej. Podobnie, oceniając korelację pomiędzy poziomem ekspresji genu *FOXP3* a bezwzględną liczbą krążących limfocytów T_{reg} , nie obserwowano istotnej statystycznie zależności pomiędzy analizowanymi cechami w grupie dzieci z THI-I ($r = 0,1887$, $p = 0,0749$). Różnice pomiędzy nachyleniem linii regresji liniowej dla grup badanych i grupy kontrolnej nie wykazywały istotnej statystycznie znamienności.

Podsumowując, analiza ekspresji genu *FOXP3* przeprowadzona u pacjentów z pierwotnymi niedoborami odporności humoralnej (THI, CVID, SIgAD) wykazała istotnie podwyższony jego poziom jedynie w grupie chorych z THI, w trakcie pierwszych dwóch wizyt. Nie stwierdzono zależności pomiędzy poziomem ekspresji genu *FOXP3* w PBMC izolowanych od tych pacjentów, a monitorowaną równolegle bezwzględną liczbą krążących limfocytów T_{reg} o fenotypie $CD4^+CD25^+Foxp3^+$.

4.2 Analiza wybranych parametrów związanych z powstawaniem i funkcją limfocytów T_{reg}

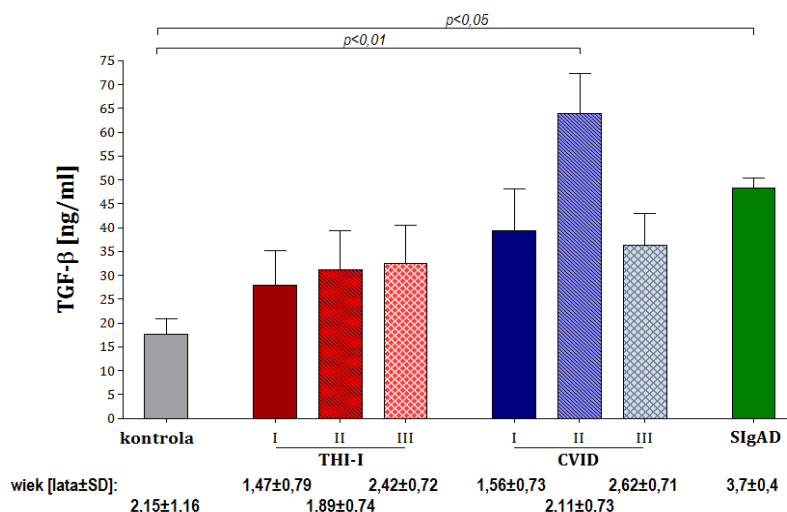
4.2.1 Ocena poziomu surowiczego oraz produkcji wybranych cytokin

Stężenie cytokin IL-10 i TGF- β oceniano w surowicy krwi oraz w nadsączach pochodzących z hodowli PBMC stymulowanych LPS lub PHA. Analizę wykonano u 33 pacjentów z grupy THI-I oraz u 5 chorych z CVID, poddanych obserwacji długoterminowej. Poziom cytokin oznaczono ponadto u 5 pacjentów z rozpoznaniem SIgAD oraz u 25 zdrowych dzieci tworzących grupę kontrolną.

4.2.1.1 Poziom IL-10 i TGF- β w surowicy krwi

U pacjentów z grup badanych, jak i u zdrowych osób, IL-10 nie był wykrywany w surowicy. W przypadku TGF- β , najniższy jego poziom wykazano w grupie kontrolnej (Rys. 24). Najwyższe wartości obserwowano u pacjentów z CVID (II wizyta) i SIgAD. W grupie dzieci z THI, poziom TGF- β wzrastał nieznacznie w trakcie kolejnych wizyt, lecz nie obserwowano istotnych statystycznie różnic, zarówno pomiędzy wizytami, jak i w odniesieniu do grupy kontrolnej.

Rys. 24. Poziom TGF- β w surowicy krwi pacjentów z pierwotnymi niedoborami odporności humoralnej (THI, CVID, SIgAD) oraz w grupie kontrolnej (cyfry: I, II i III oznaczają numery kolejnych wizyt). Poniżej wykresu zamieszczono średnie wartości wieku $\pm$ SD odnoszące się do poszczególnych grup pacjentów, z uwzględnieniem (w przypadku THI i CVID) kolejnych wizyt. Wartości te odnoszą się również do rys. 25 i 26.



4.2.1.2 Produkcja cytokin po stymulacji PBMC *in vitro*

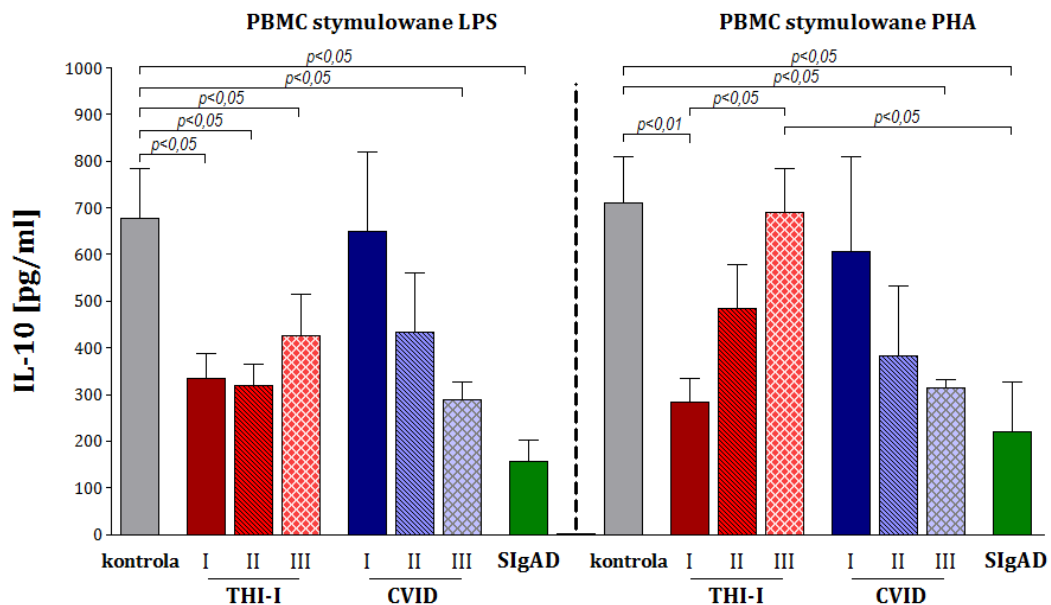
4.2.1.2.1 Ocena produkcji IL-10

Po stymulacji LPS średnie poziomy IL-10: i) w grupie THI-I, w odniesieniu do grupy kontrolnej, były istotnie niższe podczas wszystkich trzech wizyt, natomiast nie różniły się pomiędzy sobą, ii) w grupie CVID podczas dwóch pierwszych pomiarów, nie różniły się znamienne od poziomu obserwowanego w grupie kontrolnej, z kolei podczas trzeciej wizyty były istotnie niższe, iii) u chorych z SIgAD poziom IL-10 był znamienne niższy w odniesieniu do grupy kontrolnej. Po stymulacji PHA średni poziom IL-10: i) u pacjentów z grupy THI-I był, w odniesieniu do osób zdrowych, istotnie niższy jedynie podczas pierwszej wizyty, przy czym wzrastał w trakcie trwania obserwacji (podczas trzeciej wizyty średnie stężenie IL-10 było znamienne wyższe, w porównaniu do obserwowanego podczas pierwszej wizyty), ii) u chorych z CVID w trakcie trzech kolejnych wizyt ulegał obniżeniu, przy czym był istotnie niższy - w odniesieniu do grupy kontrolnej - dopiero w trakcie trzeciej wizyty, iii) w grupie SIgAD był znamienne niższy w porównaniu do grupy kontrolnej. Średnie poziomy IL-10 w grupach badanych oraz u zdrowych osób, uzyskane ze stymulowanych LPS i PHA hodowli PBMC, przedstawiono na rysunku 25.

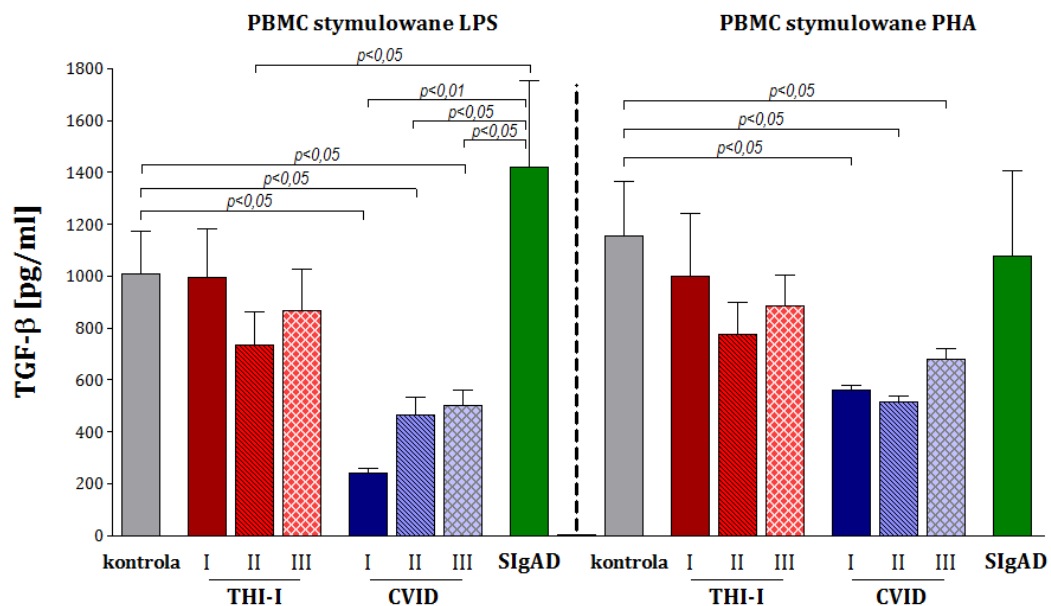
4.2.1.2.2 Ocena produkcji TGF- β

Po stymulacji LPS poziomy TGF- β : i) w grupie THI-I, podczas każdej z trzech wizyt, nie różniły się istotnie w odniesieniu do grupy kontrolnej, jak i pomiędzy sobą, ii) u pacjentów z CVID były – w porównaniu do osób zdrowych – istotnie niższe podczas każdej z trzech wizyt, przy czym nie różniły się pomiędzy wizytami, iii) w grupie SIgAD nie wykazywały znamienych różnic w odniesieniu do grupy kontrolnej, jednak były istotnie wyższe w porównaniu do każdej z trzech wizyt w grupie CVID oraz drugiej wizyty w grupie THI. Po stymulacji PHA poziomy tej cytokiny: i) w grupie THI-I nie wykazywały istotnych różnic w odniesieniu do grupy kontrolnej, jak również nie różniły się pomiędzy sobą ii) w grupie CVID były, w porównaniu z grupą kontrolną, istotnie niższe podczas każdej z trzech wizyt, natomiast – biorąc pod uwagę wszystkie trzy pomiary – nie różniły się pomiędzy sobą, iii) u chorych z SIgAD nie różniły się istotnie w odniesieniu do oznaczanych u osób z grupy kontrolnej. Średnie poziomy TGF- β w grupach badanych oraz u zdrowych osób, uzyskane ze stymulowanych LPS i PHA hodowli PBMC, przedstawiono na rysunku 26.

Rysunek 25. Średnie stężenia IL-10 u pacjentów z pierwotnymi niedoborami odporności (THI, CVID, SIgAD) oraz u osób zdrowych (kontrola), uzyskane po 18-godzinnej hodowli PBMC w obecności LPS lub PHA (cyfry: I, II i III odnoszą się do pacjentów z grupy THI i CVID i oznaczają numery kolejnych wizyt). W przypadku niestymulowanych hodowli PBMC, poziomy produkcji IL-10 były bliskie lub równe 0 (dane nie prezentowane).



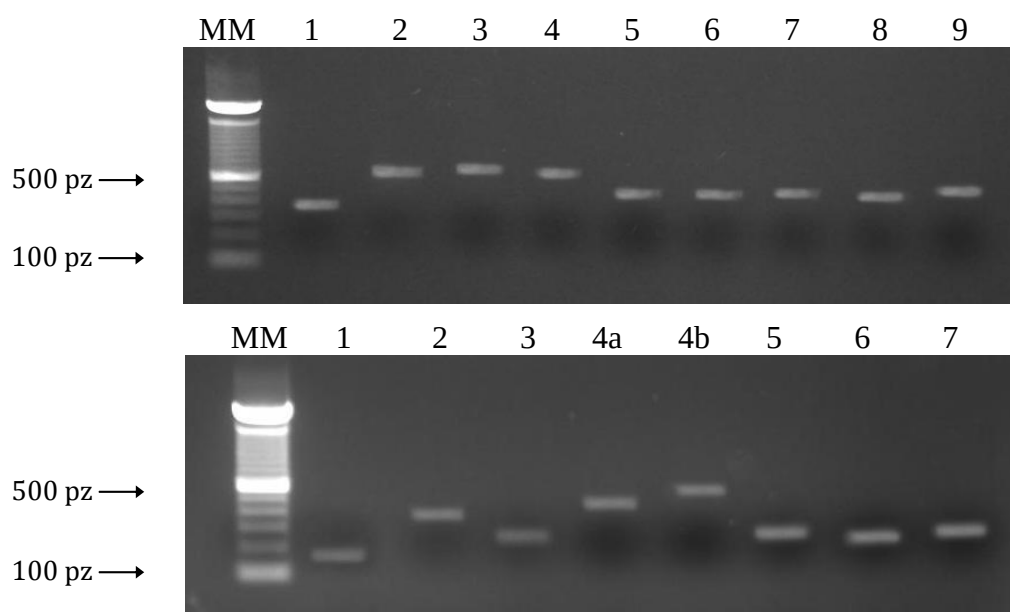
Rysunek 26. Średnie stężenia TGF- β u pacjentów z pierwotnymi niedoborami odporności (THI, CVID, SIgAD) oraz u osób zdrowych (kontrola), uzyskane po 18-godzinnej hodowli PBMC w obecności LPS i PHA (cyfry: I, II i III odnoszą się do pacjentów z grupy THI i CVID i oznaczają numery kolejnych wizyt). W przypadku niestymulowanych hodowli PBMC, poziom produkcji TGF- β był bliski lub równy 0 (dane nie prezentowane).



LPS nie indukował w PBMC u dzieci z THI (w trakcie trwania obserwacji długoterminowej) porównywalnego z osobami zdrowymi poziomu produkcji IL-10, natomiast produkcja TGF- β pozostawała (w tych samych warunkach) niezaburzona. Z kolei, produkcja IL-10 po stymulacji PHA w tej grupie dzieci, początkowo niższa, wzrastała wraz z wiekiem do poziomów porównywalnych z grupą kontrolną, natomiast produkcja TGF- β , podobnie jak po stymulacji LPS, nie była upośledzona. U pacjentów z CVID produkcja IL-10 po stymulacji zarówno LPS, jak i PHA obniżała się wraz z wiekiem, podczas gdy produkcja TGF- β pozostawała obniżona przez cały czas trwania obserwacji. W grupie SIgAD produkcja IL-2 po stymulacji PHA oraz produkcja IL-10 po stymulacji LPS jak i PHA była – w odniesieniu do grupy kontrolnej – istotnie obniżona, natomiast produkcja TGF- β nie była upośledzona.

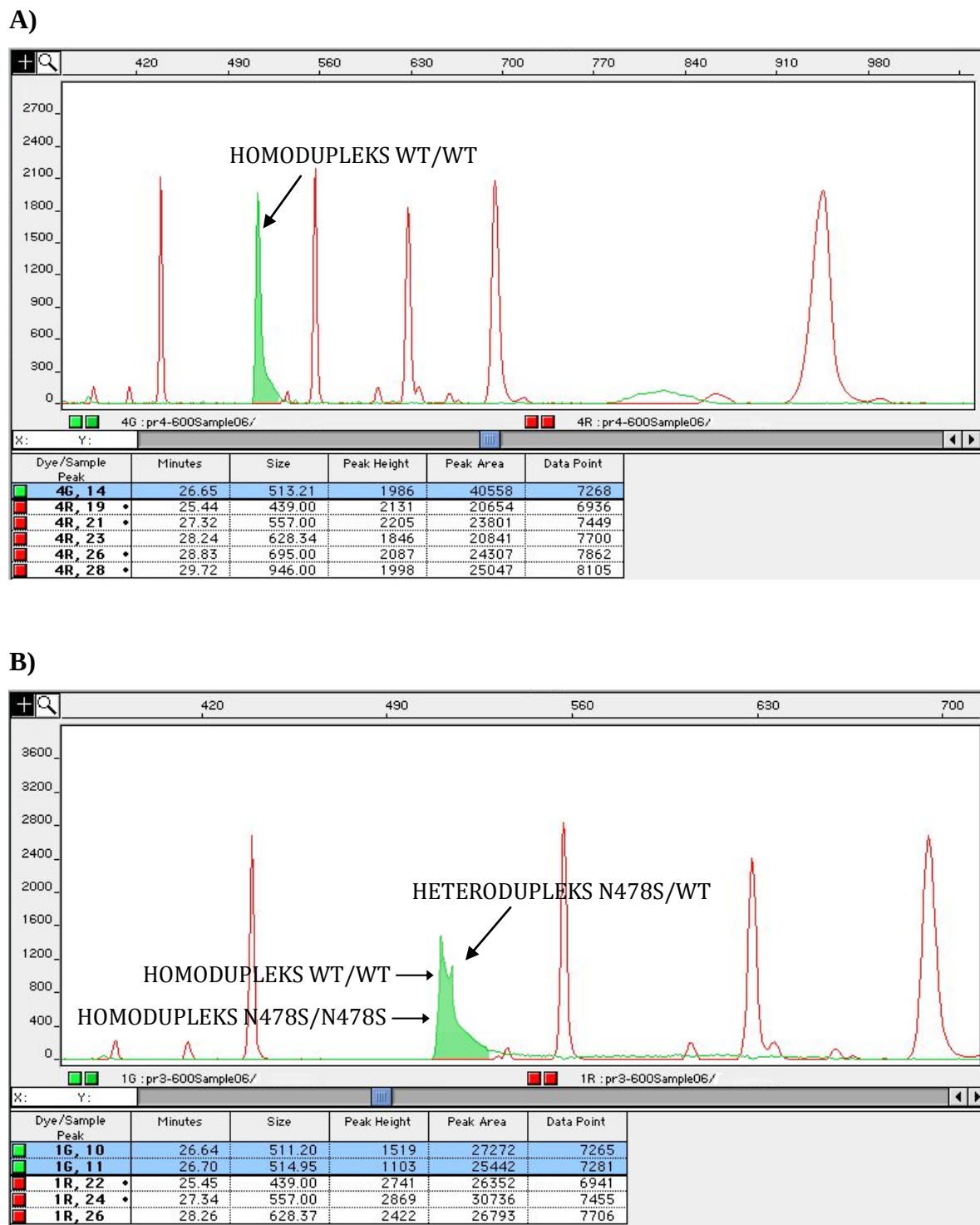
4.2.2 Analiza sekwencji genów *TGFBR1* i *TGFBR2*

Analizę sekwencji genów kodujących receptory dla TGF- β przeprowadzono łącznie u 33 pacjentów z THI objętych obserwacją długoterminową (THI - grupa I), jak również u 20 chorych z CVID, 10 chorych z SIgAD i u 25 zdrowych osób tworzących grupę kontrolną. Użyta na wstępie metoda przesiewowa w postaci analizy heterodupleksów, pozwoliła na wytypowanie tych regionów kodujących, których sekwencja różniła się od sekwencji referencyjnej (*wild-type*). W tym celu, każdy z egzonów genu *TGFBR1* i *TGFBR2* amplifikowano metodą PCR. Poprawność przebiegu reakcji PCR sprawdzano wykonując elektroforezę produktów reakcji w żelu agarozowym oraz porównując położenie prążków odnoszących się do produktów PCR, w odniesieniu do prążków markera masowego (Rys. 27). Następnie przygotowywano odpowiednie mieszaniny produktów reakcji PCR i na uzyskanych elektroferogramach analizowano charakterystyczny układ pików (przykład analizy elektroferogramów dla egzonu dziewiątego genu *TGFBR1* przedstawiono na rysunku 28). W celu identyfikacji wykrytych nieprawidłowości, sekwencjonowano wytypowane metodą HET egzony badanych genów. Produkty sekwencyjnego PCR poddawano elektroforezie kapilarnej, a uzyskane wyniki przedstawiano w postaci elektroferogramów, z których odczytywano następnie sekwencje analizowanego fragmentu DNA.



Rysunek 27. Przykład elektroforezy produktów PCR dziewięciu egzonów genu *TGFBR1* (A) oraz siedmiu egzonów genu *TGFBR2* (B); MM – marker masowy, 1-9 oraz 1-7 – numery kolejnych egzonów, pz – par zasad.

Rysunek 28. Przykładowy elektroferogram egzonu dziewiątego genu *TGFBR1* u pacjenta z SigAD, przedstawiający sekwencję referencyjną (próbka kontrolna „wild type”) (A) oraz obarczoną polimorfizmem N478S w postaci heterozygotycznej (B). Pojedynczy pik na pierwszym elektroferogramie pochodzi od homodupleksu WT/WT dla kontroli „wild type”. Na drugim elektroferogramie widoczne są dwa piki, z których jeden powstał na skutek obecności w mieszaninie homodupleksów N478S/ N478S i WT/WT, drugi zaś na skutek obecności heterodupleksów N478S/WT.

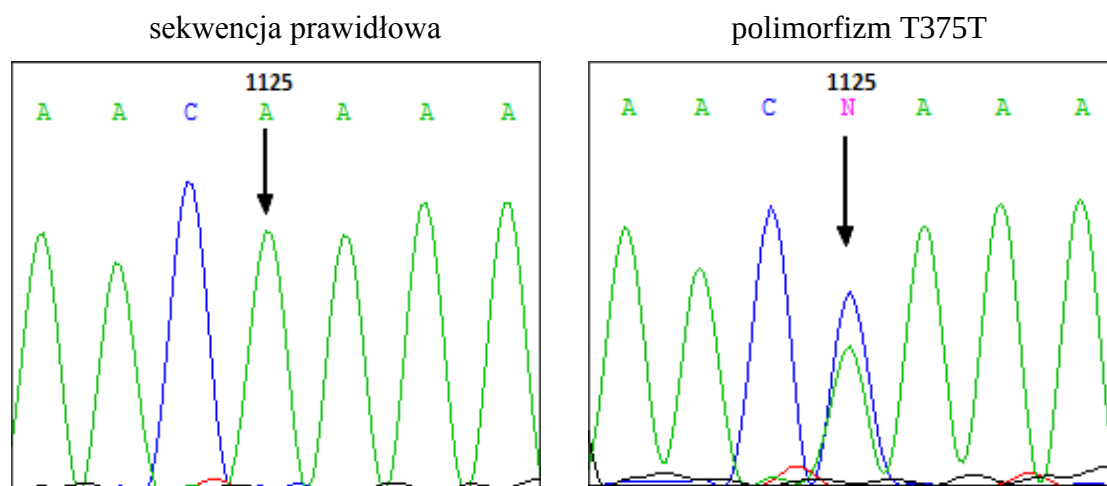


4.2.2.1 Wykryte polimorfizmy genów *TGFBR1* i *TGFBR2*

U dzieci z THI nie stwierdzono żadnych nieprawidłowości w sekwencji genów kodujących receptory dla TGF- β – T β R1 i T β R2. W obrębie genu *TGFBR1* wykryto dwa rodzaje polimorfizmów, których występowanie ograniczało się jedynie do grupy pacjentów z CVID (polimorfizm T375T) i SIgAD (polimorfizm N478S). Analiza całego regionu kodującego genu *TGFBR2* nie ujawniła żadnych opisanych dotychczas w literaturze zmian nukleotydowych.

4.2.2.1.1 Polimorfizm T375T

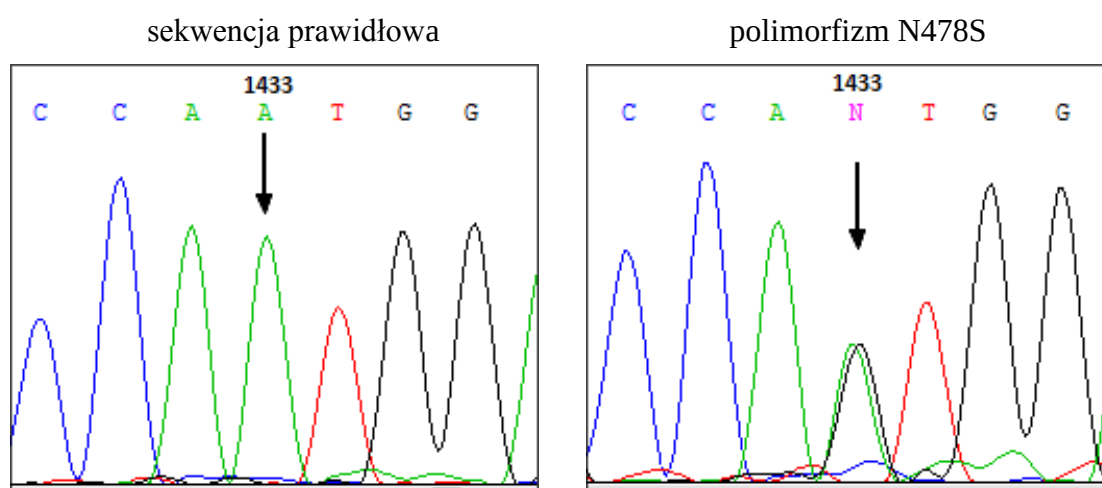
Polimorfizm T375T polega na substytucji A w miejscu 1125, w kodonie ACA, przez C tworząc kodon ACC. Zamiana ta nie powoduje zmiany aminokwasu 375, gdyż oba wspomniane kodony kodują treoninę. Polimorfizm T375T w postaci heterozygotycznej 1125A/C, wykryto u 6 pacjentów z CVID (30%). Nie stwierdzono jego występowania w żadnej z pozostałych grup badanych, jak również u osób z grupy kontrolnej. Na rysunku 29 przedstawiono fragment prawidłowej sekwencji egzonu szóstego genu *TGFBR1* oraz fragment tej sekwencji zawierający wspomniany polimorfizm.



Rysunek 29. Wykryte u badanych osób (CVID) warianty polimorfizmu T375T: wariant prawidłowy 1125A/A oraz heterozygotyczny 1125A/C, oba kodujące fenotyp 375T/T.

4.2.2.1.2 Polimorfizm N478S

Polimorfizm N478S, wykryty w egzonie dziewiątym genu *TGFBR1*, wynika z zamiany nukleotydu 47 z A w kodonie AAT kodującym asparaginę, na G tworząc kodon AGT kodujący serynę. Obecność tego polimorfizmu wykryto w postaci heterozygotycznej 1433A/G (fenotypowo 478N/S) u 2 na 10 osób z grupy SIgAD (20%). U pozostałych pacjentów oraz u osób kontrolnych nie wykryto tego polimorfizmu, oznaczając jedynie formę homozygotyczną 1433A/A (fenotypowo 478N/N). Rysunek 30 przedstawia fragment sekwencji bez polimorfizmu oraz fragment z polimorfizmem N478S.



Rysunek 30. Wykryte u badanych osób (SIgAD) warianty polimorfizmu N478S: wariant prawidłowy 478N/N (1433A/A) oraz heterozygotyczny 478N/S (1433A/G).

Otrzymane wyniki wskazują zatem, iż w THI nie obserwuje się jakichkolwiek zmian w obrębie genów kodujących receptory dla TGF- β , referując do grupy przebadanych w niniejszej pracy pacjentów.

4.3 Ocena funkcjonalna limfocytów T_{reg}

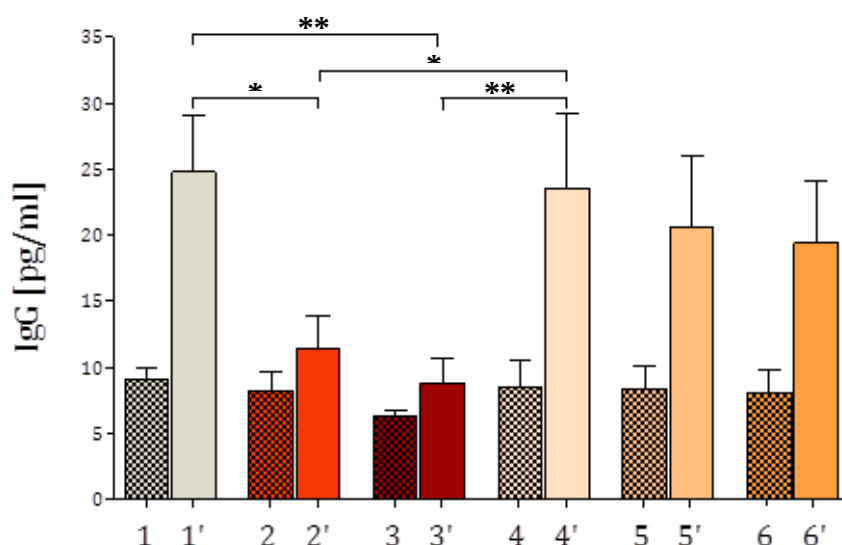
Ocenę czynnościową *in vitro* limfocytów T_{reg} przeprowadzano używając do badań krew pobraną od zdrowych dawców ($n=7$). Z krwi żyłnej izolowano PBMC, które następnie poddawano procesowi sortowania w celu uzyskania następujących subpopulacji komórek: limfocytów T_{reg} (komórki o fenotypie $CD4^+CD25^{high}$), populacji komórek $CD4^+$ pozbawionych komórek o najwyższej ekspresji CD25 (komórki $CD4^+CD25^{+/-}$), jak również populacji komórek $CD4^+$ nie wykazujących ekspresji cząsteczki CD25 (komórki $CD4^+CD25^-$). W nadsączach pochodzących z hodowli niestymulowanych i stymulowanych PWM, oznaczano – metodą CBA – stężenie IgG. Ponadto, w teście transformacji blastycznej, oceniano aktywność proliferacyjną hodowanych komórek.

4.3.1 Wpływ limfocytów T_{reg} na produkcję IgG

Najwyższą, średnią produkcję IgG po stymulacji PWM obserwowano w nadsączach pochodzących z hodowli PBMC bez dodatku innych subpopulacji komórek (pozycja 1' na rys. 31). Statystycznie znaczne obniżenie produkcji IgG, w odniesieniu do stymulowanych PBMC z pozycji 1', stwierdzono w przypadku hodowli PBMC z komórkami o fenotypie $CD4^+CD25^{high}$, dodawanymi do PBMC w dwóch różnych „dawkach” (odpowiednio 30 i 50 tys. komórek) (pozycja 2' i 3'). Z kolei, w przypadku stymulowanych PWM hodowli komórek $CD4^+CD25^{+/-}$ (pozycja 4'), poziom wydzielanej IgG był porównywalny do tego, obserwowanego w przypadku stymulowanych hodowli PBMC kontrolnych (pozycja 1'), i zarazem istotnie statystycznie wyższy, w odniesieniu do hodowli PBMC z dodatkiem populacji komórek regulatorowych $CD4^+CD25^{high}$ (pozycje 2' i 3'). W hodowlach PBMC z komórkami $CD4^+CD25^-$ (pozycje 5' i 6'), oznaczane poziomy IgG były porównywalne z wynikami uzyskanymi w przypadku stymulowanych hodowli kontrolnych PBMC w pozycji 1', a także wyraźnie wyższe od obserwowanych w hodowlach z dodatkiem komórek $CD4^+CD25^{high}$ (pozycja 2' i 3'), jednak, w przypadku tych ostatnich, obserwowane różnice nie były istotne statystycznie.

Rysunek 31. Stężenie IgG w nadsącach pochodzących z hodowli wysortowanych uprzednio komórek, niestymulowanych (zakreskowane kolumny o numerze od 1 do 6) i stymulowanych PWM (kolumny o numerze od 1' do 6'), których skład przedstawiał się następująco: PBMC w liczbie 100 tys. (pozycja nr 1 i 1'), PBMC hodowane w obecności odpowiednio, 30 i 50 tys. komórek o fenotypie $CD4^+CD25^{high}$ (pozycja 2, 2' oraz 3, 3'), PBMC pozbawione komórek $CD4^+CD25^{high}$ (komórki $CD4^+CD25^{+/-}$) (pozycja 4 i 4') oraz PBMC hodowane w obecności odpowiednio, 30 i 50 tys. komórek $CD4^+CD25^-$ (pozycje 5, 5' oraz 6 i 6'). Wykres przedstawia wartości średnie $\pm$ SD uzyskane z siedmiu niezależnych eksperymentów (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

W rubrykach zamieszczonej poniżej wykresu tabeli, podano wartości p wynikające z wzajemnego porównania poszczególnych typów hodowli komórkowych stymulowanych PWM. W przypadku hodowli niestymulowanych, nie obserwowano znamienych różnic w produkcji IgG.



	pozycja	1'	2'	3'	4'	5'	6'
PBMC (100 tys.)	1'	-					
PBMC + $CD4^+CD25^{high}$ (100 tys. + 30 tys.)	2'	<0,05	-				
PBMC + $CD4^+CD25^{high}$ (100 tys. + 50 tys.)	3'	<0,01	>0,05	-			
komórki $CD4^+CD25^{+/-}$ (100 tys.)	4'	>0,05	<0,05	<0,01	-		
PBMC + $CD4^+CD25^-$ (100 tys. + 30 tys.)	5'	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	-	
PBMC + $CD4^+CD25^-$ (100 tys. + 50 tys.)	6'	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	-

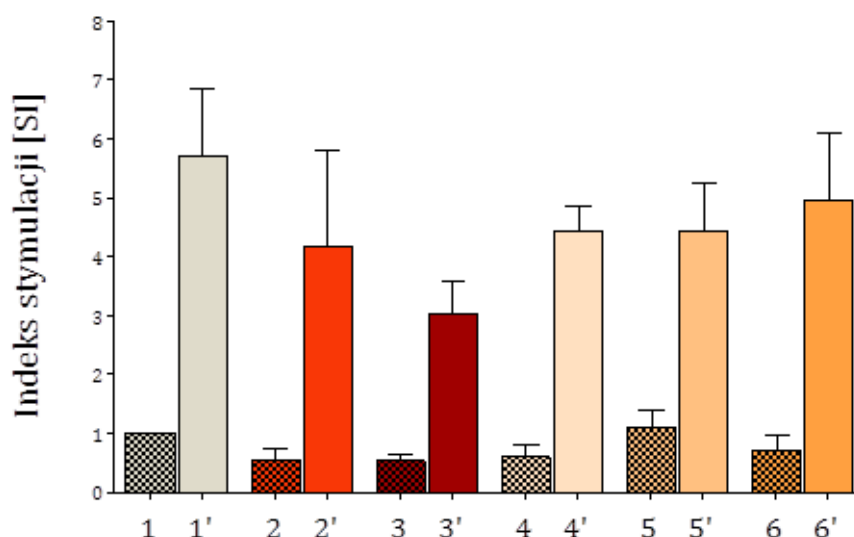
4.3.2 Wpływ limfocytów CD4⁺CD25^{high} na proliferację komórek

We wszystkich typach prowadzonych hodowli komórkowych stwierdzono, względem komórek niestymulowanych, kilkukrotny wzrost aktywności proliferacyjnej po stymulacji PWM, (Rys. 32). Chociaż różnice pomiędzy grupami nie osiągnęły znamienności statystycznej, to jednak w obecności limfocytów T_{reg} (CD4⁺CD25^{high}) obserwowano niewielkie, zależne od dawki, zahamowanie stymulowanej PWM proliferacji PBMC (pozycja 2' i 3'). Z kolei, PBMC hodowane z limfocytami T pozbawionymi subpopulacji komórek T_{reg} (pozycja 4') oraz hodowane z dodatkiem populacji komórek CD4⁺CD25⁻ (pozycja 5' i 6') – nie wpływały na proliferację komórek.

Podsumowując, uzyskane w układzie modelowym *in vitro* wyniki potwierdzają, iż limfocyty T_{reg} mogą wywierać hamujący wpływ na produkcję IgG. Ponadto, limfocyty T_{reg} wydają się nie mieć istotnego wpływu na odpowiedź proliferacyjną PBMC.

Rysunek 32. Aktywność proliferacyjna w hodowlach komórkowych, niestymulowanych (zakreskowane kolumny o numerze od 1 do 6) i stymulowanych PWM (kolumny o numerze od 1' do 6'), których skład przedstawiał się następująco: PBMC w liczbie 100 tys. (pozycja nr 1 i 1'), PBMC hodowane w obecności odpowiednio, 30 i 50 tys. komórek o fenotypie $CD4^+CD25^{high}$ (pozycje 2, 2' oraz 3, 3'), PBMC pozbawione komórek $CD4^+CD25^{high}$ (komórki $CD4^+CD25^{+/-}$) (pozycja 4 i 4') oraz PBMC hodowane w obecności odpowiednio, 30 i 50 tys. komórek $CD4^+CD25^-$ (pozycja 5, 5' oraz 6 i 6'). Wykres przedstawia wartości średnie $\pm$ SD uzyskane z siedmiu niezależnych eksperymentów.

Aktywność proliferacyjną wyrażono w postaci indeksów stymulacji (za indeks stymulacji o wartości „1” przyjęto wartość obserwowaną dla PBMC niestymulowanych). W zamieszczonej poniżej wykresu tabeli, podano wartości *p* wynikające z wzajemnego porównania poszczególnych typów hodowli komórkowych stymulowanych PWM. W przypadku hodowli niestymulowanych, nie obserwowano znamienych różnic w aktywność proliferacyjnej.



	pozycja	1'	2'	3'	4'	5'	6'
PBMC (100 tys.)	1'	-					
PBMC + $CD4^+CD25^{high}$ (100 tys. + 30 tys.)	2'	>0,05	-				
PBMC + $CD4^+CD25^{high}$ (100 tys. + 50 tys.)	3'	>0,05	>0,05	-			
komórki $CD4^+CD25^{+/-}$ (100 tys.)	4'	>0,05	>0,05	>0,05	-		
PBMC + $CD4^+CD25^-$ (100 tys. + 30 tys.)	5'	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	-	
PBMC + $CD4^+CD25^-$ (100 tys. + 50 tys.)	6'	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	-

5 DYSKUSJA

Problem pierwotnych niedoborów odporności dotyczy co najmniej 10 milionów ludzi na świecie [204]. Szacuje się, iż łączna częstość występowania około 250 – 300 zdefiniowanych w chwili obecnej (zależnie od klasyfikacji) postaci PIDs, przewyższa liczbę przypadków białaczek i chłoniaków u dzieci i jest czterokrotnie wyższa w porównaniu do takich schorzeń u dzieci, jak mukowiscydoza lub cukrzyca typu I [205,206]. Rozpoznawalność PIDs jest ciągle niska. Ponad połowę diagnozowanych niedoborów odporności stanowią zaburzenia dotyczące produkcji przeciwciał. Do najczęstszych form hipogammaglobulinemii wieku rozwojowego, w których wykrywa się krążące limfocyty B, należą: THI, SIgAD oraz CVID. Głównymi ich objawami są przewlekłe, nawracające zakażenia bakteryjne i wirusowe, zagrażające niejednokrotnie życiu chorych. Zbliżony obraz kliniczny oraz nieznajomość (w większości przypadków) podłoża genetycznego tych chorób powoduje, iż diagnostyka różnicowa w obrębie grupy niedoborów odporności humoralnej u dzieci jest trudna, a ostateczne rozpoznanie stawiane jest zazwyczaj z kilkuletnim opóźnieniem. W odróżnieniu od SIgAD i CVID, które są schorzeniami stygmatyzującymi chorego na całe życie, THI – jak obecnie się uważa – ma charakter przemijający. Przyczyny obserwowanej w tym niedoborze w pierwszych 2-5 latach życia zaburzonej produkcji immunoglobulin oraz mechanizmy związane z ich późniejszą, samoistną normalizacją, pozostają nadal niewyjaśnione. Definitywna diagnoza stawiana jest zazwyczaj retrospektywnie, co ma istotne implikacje kliniczne, nie tylko dla pacjentów z THI, ale przede wszystkim dla dzieci z CVID oraz SIgAD. Największe trudności diagnostyczne sprawia rozróżnienie THI od CVID manifestujących się przed 5 rokiem życia, które to jednostki chorobowe wymagają odmiennych strategii terapeutycznych. Dostępne w chwili obecnej testy diagnostyczne nie pozwalają na jednoznaczne wyodrębnienie dzieci, które, jak w przypadku THI, spontanicznie wyrównają poziom immunoglobulin, i u których stan kliniczny ulegnie normalizacji, od tych, które posiadają trwałe niedobór produkcji immunoglobulin wraz ze wszystkimi jego konsekwencjami. Poznanie patomechanizmu THI i ewentualne ustalenie podłoża genetycznego tego niedoboru umożliwiłoby wcześniejsze rozpoznanie różnicowe, a w przyszłości, być może, stało by się podstawą do opracowania nowych strategii terapeutycznych.

Celem niniejszego projektu badawczego było poszukiwanie nowych patomechanizmów leżących u podłoża THI, w trakcie kilkuletniej obserwacji dzieci z podejrzeniem tego niedoboru. Podjęto próbę ustalenia związku pomiędzy obserwowanym u wspomnianych pacjentów okresem przejściowej hipogammaglobulinemii, a zmieniającą się w czasie liczbą krążących limfocytów T_{reg} . Dodatkowo, próbowano odnieść wyniki powyższych obserwacji do grupy kontrolnej równoletnich dzieci zdrowych oraz tych, u których postawiono diagnozę CVID lub SIgAD.

Spośród badanych grup pacjentów, jedynie u dzieci z THI obserwowano podwyższoną liczbę krążących limfocytów T_{reg} . Poziom tych komórek u dzieci z CVID oraz SIgAD nie różnił się w istotny sposób od oznaczanego u osób zdrowych z grupy kontrolnej. Limfocyty T_{reg} definiowano na podstawie poziomu ekspresji cząsteczek CD25 na powierzchni komórek oraz obecności cytoplazmatycznego czynnika Foxp3, które to białka uznaje się powszechnie za markery swoiste dla subpopulacji limfocytów regulatorowych [6,7,21,77]. Wyniki przedstawiano w jednostkach bezwzględnych, tj. jako liczbę komórek na 1 μ l pełnej krwi. Ten sposób analizy był niezależny od zmian proporcji subpopulacji leukocytów, na które przejściowy wpływ mogą mieć zakażenia lub schorzenia autoimmunizacyjne i/lub alergiczne, charakterystyczne dla wspomnianych grup pacjentów. Do chwili obecnej nie prowadzono podobnych badań u chorych z przemijającą postacią hipogammaglobulinemii.

Analiza liczebności limfocytów T_{reg} w odniesieniu do wieku, dotycząca całej grupy THI wykazała, iż podwyższona liczebność tych komórek była obserwowana u młodszych dzieci (średnia wieku: $1,47 \pm 0,79$ lat), natomiast u starszych (średnia wieku: $2,45 \pm 1,06$ lat) wykazywała poziomy porównywalne z grupą kontrolną. Obserwacja długoterminowa 33 pacjentów z THI (grupa THI-I – od postawienia wstępnego rozpoznania do ostatecznej diagnozy) wykazała, że wyjściowo podwyższona u tych dzieci liczba krążących limfocytów T_{reg} obniżała się wraz z wiekiem, aż do osiągnięcia wartości obserwowanych w grupie kontrolnej. Spadkowi liczebności tych komórek towarzyszyła normalizacja surowiczego poziomu IgG oraz normalizacja stanu klinicznego chorych. Podobnych zmian nie obserwowano w dobranej pod względem wieku grupie pacjentów z CVID. Uzyskane wyniki sugerują zatem, iż okresowi hipogammaglobulinemii u większości chorych z THI towarzyszy przejściowo podwyższony poziom krążących limfocytów T_{reg} , które mogą mieć związek z supresją produkcji immunoglobulin przez limfocyty B. Komórki T_{reg} wydają się odgrywać

istotną rolę w regulacji odpowiedzi humoralnej. Zaburzenia dotyczące odsetka limfocytów T_{reg} obserwowano w szeregu chorób autoimmunizacyjnych przebiegających z zaburzoną produkcją przeciwciał. Spadek liczebności tych komórek opisywano m. in. u pacjentów cierpiących na krieglobulinemię mieszaną w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C [207] oraz u osób z indukowanym kolagenem zapaleniem stawów [208]. Z kolei, obniżoną aktywność limfocytów T_{reg} stwierdzano u chorych na miastenię [209] oraz u osób z anemią hemolityczną [210]. Posługując się modelem zwierzęcym wykazano, iż zmniejszanie liczby komórek $CD4^+CD25^{high}$ (przy zastosowaniu m. in. przeciwciał monoklonalnych anty-CD25) prowadziło do rozwoju schorzeń autoimmunizacyjnych i nieprawidłowej produkcji przeciwciał [208,211]. Z kolei, podawanie limfocytów T_{reg} myszom z rozwiniętymi schorzeniami autoimmunizacyjnymi, skutkowało zmniejszeniem syntezy autoprzeciwciał [212]. Populacja komórek T_{reg} posiada zdolność migracji do ośrodków różnicowania limfocytów B, gdzie komórki te hamują zależną od limfocytów T indukcję produkcji immunoglobulin [213]. Do chwili obecnej nie podnoszono jednak roli, jaką mogłyby odgrywać limfocyty T_{reg} w przebiegu pierwotnych niedoborów odporności przebiegających z zaburzoną produkcją przeciwciał.

W grupie THI, u dwanaścioro dzieci poniżej 2-go roku życia (tj. około 30% chorych, w wieku od 7 do 19 miesiąca życia) oznaczona liczebność komórek T_{reg} (od 8 do 31 komórek/ μ l) mieściła się w zakresie typowym dla osób zdrowych tworzących grupę kontrolną. Można zatem przypuszczać, iż w obrębie grupy chorych z THI mogą operować również i inne, bliżej nieokreślone w obecnej chwili, patomechanizmy sprzyjające rozwojowi tego samego rodzaju niedoboru, niezależne od limfocytów T_{reg} .

Wyniki uzyskane z analizy liczebności krążących limfocytów T_{reg} w grupie pacjentów z CVID i SIgAD pozostają w pewnej opozycji do dostępnych obecnie danych literaturowych. W przypadku CVID, opisywano niższy (odsetkowo) – w odniesieniu do osób zdrowych – poziom komórek T_{reg} w krwi obwodowej [112-116]. Obserwacje te dotyczyły pacjentów z CVID, u których odnotowywano współistniejące choroby o podłożu autoimmunizacyjnym lub zapalnym (m. in.: anemię hemolityczną, gorączkę reumatyczną, zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka, celiakię, zespół Sjögrena, autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy lub wątroby oraz choroby zapalne jelit). Jak sugerują autorzy powyższych prac, ich obserwacje wydają się potwierdzać związek pomiędzy zaburzoną liczebnością i/lub funkcją komórek T_{reg} , a rozwojem schorzeń autoimmunizacyjnych [10,84,115,214]. Tymczasem, spośród 35 przebadanych osób z CVID, zaledwie około 20% prezentowało objawy autoimmunizacji (np. postępujące włóknienie płuc, splenomegalię, małopłytkowość, celiakię, nieswoiste zapalenie

jelit), bez obserwowanych istotnych zaburzeń dotyczących liczebności limfocytów T_{reg} (m. in. znacznego obniżenia ich liczby). Średni wiek dzieci z CVID wynosił $3 \pm 1,8$ lat, podczas gdy w cytowanych pracach oznaczenia wykonywano u osób dorosłych, których wiek mieścił się w przedziale od 16 do 75 roku życia. Być może, wspomniane zaburzenia związane z komórkami regulatorowymi rozwijają się dopiero z czasem trwania choroby i są raczej jej skutkiem, niż przyczyną. Z kolei, wcześniejsze doniesienia wskazują również, iż odsetek limfocytów T_{reg} u chorych z SIgAD jest znacząco niższy w odniesieniu do dobranej pod względem wieku grupy kontrolnej. Dotyczyło to zazwyczaj tych pacjentów, którzy manifestowali objawy przewlekłego stanu zapalnego [215]. W prezentowanych badaniach, nie więcej niż 10% dzieci z grupy SIgAD wykazywało przewlekłe stany zapalne i/lub choroby autoimmunizacyjne. Ich występowanie nie korelowało również z poziomem limfocytów T_{reg} . Tak więc, sposób analizy oparty na obserwacji liczebności subpopulacji limfocytów T_{reg} , a nie wyłącznie ich obrazu odsetkowego (jak w cytowanych obserwacjach klinicznych), wydaje się korygować wcześniejsze wnioski oparte na nie w pełni miarodajnych przesłankach związanych z wadliwym sposobem ich pomiaru.

Wyniki przedstawionych badań sugerują po raz pierwszy, iż THI jest szczególnym rodzajem hipogammaglobulinemii, u której podłoża (przynajmniej u części chorych) mogą leżeć zaburzenia immunoregulacyjne związane m. in. ze zwiększoną liczebnością subpopulacji limfocytów T_{reg} . Niemniej jednak, rola tych komórek w rozwoju i przebiegu klinicznym THI wymaga szerszych badań.

Analiza względnej ekspresji genu *FOXP3*, przeprowadzona u pacjentów z THI i CVID (objętych obserwacją długoterminową) oraz u chorych z SIgAD, wykazała jej istotnie podwyższony poziom jedynie w grupie dzieci z THI, różniący się dodatkowo pomiędzy kolejnymi wizytami. Odnosząc uzyskane wyniki do bezwzględnej liczby krążących limfocytów T_{reg} , nie wykazano istotnej zależności pomiędzy badanymi parametrami. Białko Foxp3 uznaje się za najbardziej swoisty marker limfocytów T_{reg} [77,76]. Można by więc przypuszczać, iż podwyższona ekspresja mRNA dla tego czynnika będzie korelować ze zwiększonym poziomem limfocytów T_{reg} . Niemniej jednak, uzyskane wyniki nie potwierdziły w pełni tej zależności. O ile bezwzględna liczba krążących komórek T_{reg} w grupie THI-I malała wraz z wiekiem, to średni względny poziom ekspresji mRNA dla Foxp3 był relatywnie wysoki (ok. 10-krotnie wyższy w odniesieniu do osób zdrowych)

podczas pierwszej i drugiej wizyty, dopiero podczas ostatniego pomiaru osiągając wartości obserwowane w grupie kontrolnej.

Analizując zmiany poziomu ekspresji tego genu indywidualnie dla każdego z 33 pacjentów w grupie THI-I podczas trzech kolejnych wizyt, obserwowano trzy modele zmian tej ekspresji. U blisko połowy pacjentów (14 dzieci, 43% chorych) względna ekspresja genu dla Foxp3 była najwyższa podczas pierwszej wizyty, malała w przybliżeniu o połowę w trakcie drugiego pomiaru, osiągając w trakcie trzeciej wizyty poziom porównywalny do wyników w grupie kontrolnej. U 8 pacjentów (24% chorych), najwyższy względny poziom ekspresji mRNA dla Foxp3 odnotowano podczas drugiej wizyty, przy czym podczas pierwszego i trzeciego pomiaru, poziom ten był porównywalny do oznaczanego u osób zdrowych. W trzecim z kolei modelu zmian, dotyczącym 11 chorych (33% badanych), nie obserwowano istotnych różnic w poziomie ekspresji badanego genu pomiędzy wszystkimi trzema pomiarami. Podsumowując, jedynie u 14 dzieci z grupy THI-I (tj. u około 42% wspomnianych pacjentów), poziom ekspresji korelował z liczbą krążących limfocytów T_{reg} . Nie można zatem potwierdzić prostej zależności, iż liczebność limfocytów T_{reg} u chorych z THI koreluje z poziomem ekspresji czynnika Foxp3, którego analizę przeprowadzono wykorzystując materiał genetyczny izolowany z całej populacji PBMC, a nie jedynie z izolowanych limfocytów T_{reg} . Również przejściowa ekspresja Foxp3 w indukowanych komórkach T_{reg} mogła mieć wpływ na otrzymane wyniki analiz. Różniące się znacznie poziomy ekspresji genu dla Foxp3 w całej badanej grupie pacjentów można tłumaczyć faktem, iż mRNA posiada wysoką zmienność na poziomie transkrypcji genów [216,217]. Korelację między poziomem białka i mRNA można zaobserwować tylko w przypadku ściśle kontrolowanych przez komórkę warunków transkrypcji i translacji. Nawet minimalne zmiany w poziomie ekspresji mRNA mogą skutkować brakiem proporcjonalnej zależności pomiędzy mRNA, a poziomem białka [218,219,220]. Odwrotną zależność pomiędzy liczbą limfocytów T_{reg} , a poziomem ekspresji czynnika Foxp3, kiedy niskiej liczebności komórek T_{reg} towarzyszył wysoki poziom względnej ekspresji czynnika, można tłumaczyć możliwością występowania w obrębie PBMC innych komórek wykazujących ekspresję czynnika Foxp3 (także przejściową), do których należą m. in. limfocyty $CD8^+CD25^+$ [53-55]. Jako że w niniejszej pracy nie analizowano innych, oprócz limfocytów $CD4^+ T_{reg}$, komórek regulatorowych, rozwiązanie tej kwestii wymaga dalszych badań.

Ocenę stężenia IL-10 oraz TGF- β w surowicy krwi pacjentów przeprowadzono ze względu na ich udokumentowane znaczenie w procesie indukcji limfocytów T_{reg} oraz ich prawidłowego funkcjonowania [221]. W przypadku indukowalnych komórek T_{reg} odgrywają one zasadniczą rolę w mechanizmach immunosupresji, na drodze których limfocyty te regulują odpowiedź immunologiczną. Indukowane w obecności TGF- β limfocyty T_{reg} (iT_{reg}) wydają się posiadać wszystkie właściwości generowanych w grasicy komórek nT_{reg}, znajdując zastosowanie m. in. w terapii chorób autoimmunizacyjnych [222]. Biorąc pod uwagę powyższe dane wydawać by się mogło, iż odpowiednio wyższe stężenie obu cytokin w krwi obwodowej może wpływać stymulująco na powstawanie indukowalnych komórek T_{reg}.

Analiza stężenia TGF- β w surowicy wykazała, iż poziom tej cytokiny u chorych z THI nie różnił się jednak istotnie od wyników uzyskanych w grupie kontrolnej. Z kolei, znamienne wyższy (w odniesieniu do kontroli) poziom tego czynnika występował u chorych z SIgAD oraz przejściowo (tj. tylko podczas II wizyty) u pacjentów z CVID. Biorąc pod uwagę oznaczone uprzednio liczebności krążących limfocytów T_{reg} w badanych grupach, wydaje się, iż brak jest związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy poziomem TGF- β a liczebnością limfocytów T_{reg} w krwi obwodowej. Należy jednak zaznaczyć, iż poza badanymi limfocytami T_{reg}, istnieją także inne typy komórek regulatorowych indukowanych przez TGF- β , tj. limfocyty Tr1 oraz Th3, nie wykazujące ekspresji czynnika Foxp3 oraz charakteryzujące się zmiennym poziomem ekspresji cząsteczki CD25 na swojej powierzchni [39,41]. Jako, że w niniejszej pracy oceniano jedynie liczebność limfocytów T_{reg} o fenotypie CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, nie można jednoznacznie określić wpływu TGF- β na generowanie wspomnianych populacji komórek regulatorowych.

Obserwowane w prezentowanych badaniach wartości surowiczego stężenia IL-10 u wszystkich badanych osób były poniżej progu czułości testu. Wcześniejsze obserwacje wskazywały na pozytywną korelację pomiędzy odsetkiem limfocytów T_{reg} w krwi obwodowej, a poziomem IL-10 w surowicy [223,224]. Jednakże, badania te prowadzono u pacjentów z chorobami nowotworowymi, których przebieg może być związany z zaburzoną produkcją zarówno IL-10, jak i limfocytów T_{reg} [225,226,227].

Produkcję obu badanych cytokin oceniano także po stymulacji PBMC, wyizolowanych od pacjentów i grupy kontrolnej, przy użyciu LPS lub PHA.

U pacjentów z THI stwierdzono, iż produkcja TGF- β po stymulacji zarówno LPS jak i PHA, nie różniła się istotnie od wartości uzyskanych w grupie kontrolnej. U pacjentów

z CVID produkcja TGF- β (zarówno po stymulacji LPS jak i PHA) pozostawała obniżona przez cały okres trwania obserwacji, natomiast u pacjentów z SIgAD była porównywalna z grupą kontrolną. Obserwacja ta jest zgodna z wcześniejszymi doniesieniami, wskazującymi na obniżoną produkcję TGF- β przez PBMC izolowane od pacjentów z CVID [228]. Ponadto, uzyskane wyniki wskazują na odmienny profil produkcji cytokin w przypadku pacjentów z THI i CVID, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami [162]. TGF- β wzmacnia wytwarzanie IgA, umożliwiając przełączanie klas i hamując jednocześnie wydzielanie IgM i IgG [229-232]. Niemniej jednak, porównywalna z grupą kontrolną produkcja TGF- β u chorych z SIgAD może wskazywać, iż zaburzona produkcja IgA u tych chorych nie wynika bezpośrednio z zaburzonej produkcji TGF- β .

Spośród komórek regulatorowych, czynnik TGF- β wydzielany jest głównie przez limfocyty Th3 oraz, w mniejszym stopniu, Tr1 [41]. Nie można zatem wyznaczyć prostej zależności pomiędzy liczbą komórek T_{reg}, a poziomem produkcji TGF- β , tym bardziej, że nie oceniano liczebności innych subpopulacji limfocytów regulatorowych, za wyjątkiem komórek CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

Analiza produkcji IL-10 w grupie chorych z THI po stymulacji LPS wykazała istotnie niższy jej poziom (w odniesieniu do osób zdrowych). Sekrecja tej cytokiny pozostawała obniżona przez cały czas trwania obserwacji, z kolei po stymulacji PHA - wzrastała w miarę normalizacji surowiczego poziomu IgG, do wartości oznaczanych w grupie kontrolnej. W grupie chorych z CVID obserwowano spadek produkcji IL-10 wraz z wiekiem, zarówno po stymulacji LPS, jak i PHA. Niższą - w odniesieniu do kontroli – produkcję IL-10, obserwowano także w grupie chorych z SIgAD, po stymulacji LPS i PHA.

IL-10 wydzielana jest głównie przez aktywowane komórki układu odpornościowego, a w szczególności przez monocyty/makrofagi oraz subpopulacje regulatorowe i przeciwzapalne limfocytów T, takie jak komórki Tr1, T_{reg} i Th2 [233]. Wydawać by się zatem mogło, iż produkcja IL-10 przez stymulowane PBMC u osób z wyższą liczebnością limfocytów T_{reg} (szczególnie w przypadku pacjentów z THI) będzie wyższa. Jednakże, dynamika zmian poziomu sekrecji tej cytokiny wydaje się nie korelować z liczbą krążących limfocytów T_{reg} w badanych grupach pacjentów.

Poza istotną rolę w mechanizmach immunosupresji zależnych od limfocytów T_{reg}, IL-10 pełni również rolę czynnika stymulującego wzrost limfocytów B. Jest odpowiedzialna za ich różnicowanie, a także zapobiega apoptozie tych komórek [234]. Ponadto, stymuluje limfocyty B do sekrecji immunoglobulin (głównie przeciwciał klasy IgG, IgA i IgM)

[229,235]. Zaburzone uwalnianie IL-10 po stymulacji nieswoistej (PHA) mogłoby zatem jedynie częściowo tłumaczyć obserwowany u pacjentów z THI i CVID obniżony surowiczy poziom immunoglobulin. Natomiast, powracająca do normy w trakcie kolejnych wizyt produkcja IL-10 u pacjentów z THI, korelowała ze wzrastającym poziomem IgG. Z kolei, zaburzona odpowiedź na LPS świadczyć może o trwałym, swoistym defekcie limfocytów/monocytów wyrażającym się nieadekwatną do sytuacji klinicznej produkcją IL-10 (kontrolującej w dużej mierze dynamikę reakcji prozapalnej) w odpowiedzi na kontakt z produktami bakteryjnymi, takimi np. jak syntetyzowany przez bakterie Gram-ujemne lipopolisacharydy.

Obserwowany u chorych z THI profil zmian produkcji IL-10 pozostaje w pewnej opozycji do jednego z proponowanych mechanizmów rozwoju THI, związanego z zaburzeniem produkcji cytokin [162,163,195]. Opisano, iż PBMC izolowane od dzieci z THI w okresie hipogammaglobulinemii, jak i po osiągnięciu prawidłowego poziomu IgG i po stymulacji PHA, produkowały istotnie więcej IL-10 w odniesieniu do dobranej wiekowo grupy kontrolnej. Niemniej jednak, sami autorzy wskazywali, iż obserwacja ta była dość zaskakująca, spodziewając się raczej niedoboru IL-10 u tych pacjentów, niż jej zwiększonej produkcji. Taką hipotezę potwierdzają uzyskane w niniejszej pracy wyniki. Sugerowano także, iż przyczyną zwiększonej produkcji IL-10 była zwiększona sekrecja TNF- α , gdyż TNF zwiększa syntezę i uwalnianie IL-10, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* [236,237]. Jednakże, produkcja TNF- α u badanych w niniejszej pracy pacjentów z THI była obniżona względem grupy kontrolnej (wyniki nie prezentowane), co pozostaje w zgodzie ze wspomnianą hipotezą. Rozbieżności dotyczące prezentowanych wyników mogą także wiązać się z różną liczbą badanych pacjentów z THI (w niniejszej pracy grupa ta była blisko dwukrotnie większa oraz precyzyjnie zdefiniowana w analizie retrospektywnej).

W przypadku chorych z CVID, obniżająca się produkcja IL-10 z wiekiem może skutkować (podobnie jak u chorych z THI) nieprawidłową syntezą przeciwciał przez limfocyty B, co z kolei może prowadzić do spadku surowiczego poziomu immunoglobulin. Ponadto, cytokina ta bierze udział w ograniczaniu odpowiedzi zapalnej oraz autoimmunizacyjnej [238]. Niewykluczone zatem, iż utrzymujący się w grupie CVID stale obniżony poziom produkcji IL-10 w odpowiedzi na bodźce stymulujące jej syntezę, sprzyja nasilonej odpowiedzi prozapalnej, a co za tym idzie, występowaniu różnego rodzaju schorzeń autoimmunizacyjnych, obserwowanych u ok. 20% chorych z tym niedoborem [149]. Podobnie, obniżona produkcja IL-10 w grupie chorych z SIgAD może wskazywać na

zaburzoną odpowiedź prozapalną, która także sprzyja występowaniu u tych chorych schorzeniom autoimmunizacyjnym i/lub alergicznym [149].

Schemat dynamiki zmian produkcji IL-10 oraz TGF- β przez stymulowane PBMC pacjentów objętych obserwacją długoterminową z grupy THI-I i CVID, zobrazowano na rysunku 33.

Rysunek 33. Schemat ilustrujący dynamikę zmian produkcji cytokin po stymulacji LPS (A) i PHA (B) w przypadku pacjentów poddanych obserwacji długoterminowej (THI-I, CVID). Strzałka pozioma koloru niebieskiego oznacza produkcję cytokiny na stałym, porównywalnym z grupą kontrolną poziomie; strzałka pozioma koloru czerwonego oznacza produkcję na stałym, ale istotnie niższym - w odniesieniu do grupy kontrolnej - poziomie; strzałka skierowana w dół koloru czerwonego obrazuje spadek produkcji pomiędzy kolejnymi wizytami, z zaznaczeniem, iż w trakcie ostatniego pomiaru jej poziom był istotnie niższy, w porównaniu do kontroli; strzałka skierowana do góry koloru niebieskiego obrazuje wzrost produkcji, z uwzględnieniem faktu, iż w trakcie ostatniego pomiaru poziom cytokiny był porównywalny z oznaczanym u osób zdrowych.

A)

LPS	THI	CVID
IL-10		
TGF- β		

B)

PHA	THI	CVID
IL-10		
TGF- β		

Podsumowując, monitorowanie poziomu TGF- β oraz IL-10 w surowicy wydaje się nie mieć istotnego znaczenia dla wnioskowania odnośnie patogenezy THI i/lub implikacji diagnostycznych dla pacjentów z hipogammaglobulinemiami wieku wczesnodziecięcego. Ponadto, obserwowana u dzieci z THI podwyższona liczebność krążących limfocytów T_{reg} wydaje się nie mieć związku ze zmianami stężeń surowiczych TGF- β oraz IL-10, jak również poziomu produkcji obu tych cytokin przez PBMC pacjentów. Natomiast, wzrost produkcji IL-10 po stymulacji nieswoistej do poziomów obserwowanych w grupie kontrolnej może

odzwierciedlać normalizację odpowiedzi immunologicznej towarzyszącą normalizacji stanu klinicznego chorych z THI.

Analizę zmian sekwencji genów kodujących receptory dla TGF- β przeprowadzono z uwagi na potwierdzone znaczenie szlaku sygnałowania związanego z tym czynnikiem w rozwoju naturalnych oraz w generowaniu indukowalnych form limfocytów T_{reg} . Dotychczasowe badania na modelu zwierzęcym wykazały, że delecja genu $T\beta RI$ skutkuje brakiem limfocytów o fenotypie $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ w 3-5 dniu po urodzeniu. Poczynając jednak od około pierwszego tygodnia po urodzeniu, u tych samych mutantów mysich obserwowano wzmożony rozwój populacji limfocytów T_{reg} w grasicy oraz znaczący wzrost odsetka tychże komórek w krwi obwodowej [28]. Jak wykazano, wzmożona generacja limfocytów T_{reg} wynikała głównie z nadprodukcji i zwiększonej wrażliwości na IL-2. Udowodniono, iż w przypadku braku receptora dla TGF- β , IL-2 była głównym czynnikiem pobudzającym proliferację i dojrzewanie tych komórek. Delecja genu dla IL-2 u myszy z wrodzoną nieprawidłowością $T\beta R$ wiązała się z całkowitym zahamowaniem powstawania komórek $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. Nadmiernie zwiększona liczebność komórek T_{reg} ulegała wraz z wiekiem stopniowej normalizacji [28]. Uwzględniając fakt, iż cytowane powyżej obserwacje pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych wyłącznie na modelu zwierzęcym, istotne wydawało się przeprowadzenie badań mających na celu sprawdzenie, czy zaburzenia immunoregulacji u dzieci z THI prowadzące do przejściowej hipogammaglobulinemii z towarzyszącym jej znacznym przejściowym wzrostem liczebności subpopulacji limfocytów T_{reg} , są również związane z defektem genu kodującego receptor $T\beta R$ oraz wahaniami poziomu IL-2.

Przeprowadzona w grupie THI-I analiza genów kodujących receptory $T\beta RI$ oraz $T\beta RII$ nie wykazała jakichkolwiek zmian w ich sekwencji (zarówno w postaci mutacji jak i polimorfizmów). Zatem, przejściowy wzrost liczebności limfocytów T_{reg} u tych osób wydaje się nie mieć związku z zaburzeniami strukturalnymi dotyczącymi genów kodujących receptory dla TGF- β . Wydaje się ponadto, iż także nie ma związku z poziomem IL-2. Stężenie tej cytokiny w surowicy badanych osób było poniżej granicy czułości testu. Z kolei, produkcja IL-2 przez PBMC pacjentów z THI po stymulacji PHA wzrastała pomiędzy kolejnymi wizytami jedynie do poziomów obserwowanych w grupie kontrolnej (dane nie prezentowane). Nie wyklucza to jednak istnienia zaburzeń w obrębie genów kodujących inne

białka biorące udział w przekazie sygnału po związaniu TGF- β z receptorem. Dla przykładu, mutacje białek z rodziny SMAD biorących udział w tym szlaku sygnałowania wewnątrzkomórkowego opisano w wielu chorobach nowotworowych, m. in. u pacjentów z rakiem brodawkowatym tarczycy, jelita grubego, rakiem jajnika oraz gruczolakorakiem trzustki [239-243]. Obecność tychże mutacji wiązała się z utratą prawidłowej odpowiedzi na TGF- β , szybszym rozwojem nowotworu, częstszym przerzutowaniem do węzłów chłonnych oraz wzmożoną angiogenezą.

W badanej grupie pacjentów z CVID, u 6 na 20 chorych stwierdzono obecność polimorfizmu T375T w postaci heterozygotycznej, zaś u 2 na 10 pacjentów z SIgAD wykazano obecność polimorfizmu N478S. Wykryty u 30% chorych z CVID polimorfizm T375T opisano jak dotąd jedynie u pacjentki z umiarkowanie zróżnicowanym rakiem płaskonabłonkowym szyjki macicy [244]. Pomimo, iż mutacja ta nie zmienia sekwencji aminokwasowej białka, to jej umiejscowienie w pozycji 6-tego nukleotydu od granicy egzonu z intronem może mieć wpływ, jak sugerują autorzy, na proces składania RNA. Polimorfizm T375T, jak i obserwowany polimorfizm N478S dotyczący 20% pacjentów z grupy SIgAD, wykrywane były uprzednio u chorych z zespołem Marfana typu I i II. Ich występowanie korelowano z rozwojem u wspomnianych chorych tzw. fenotypu sercowo-szkieletowego, bez towarzyszących tzw. objawów ocznych [245]. Jednakże, analiza sekwencji badanych genów nie była jak dotąd prowadzona u pacjentów z pierwotnymi niedoborami odporności humoralnej, stąd efekt obserwowanych polimorfizmów jest nieznany.

Podsumowując, przeprowadzone badania nie wykazały charakterystycznych mutacji i/lub polimorfizmów w obrębie genów kodujących receptory T β RI i T β RII, które z jednej strony uzasadniałyby zaburzoną odpowiedź limfocytów T_{reg} na TGF- β (a tym samym ewentualne nieprawidłowości dotyczących nabywania funkcji supresorowych), a z drugiej umożliwiły rozróżnienie na poziomie molekularnym THI od innych form hipogammaglobulinemii wieku wczesnodziecięcego (CVID, SIgAD).

Limfocyty T_{reg} regulują proliferację i różnicowanie limfocytów B [59]. Hamują również produkcję autoprzeciwciał, jednak mechanizmy, na drodze których do tego dochodzi, pozostają niejasne [207-211]. Obserwując u większości dzieci z THI podwyższoną liczbę komórek T_{reg} w krwi obwodowej podejrzewano, iż może mieć ona związek z obniżoną produkcją przeciwciał. W celu zbadania możliwego wpływu podwyższonej liczby limfocytów

T_{reg} na syntezę immunoglobulin, przeprowadzono modelowe badania z użyciem wysortowanej od zdrowych dawców subpopulacji komórek T_{reg} CD4⁺CD25^{high} oraz autologicznych PBMC. Hodując PBMC w obecności tychże komórek zaobserwowano obniżoną produkcję IgG. Równolegle, nie stwierdzono istotnego wpływu obecności komórek regulatorowych na odpowiedź proliferacyjną PBMC.

Do chwili obecnej nie badano zależności pomiędzy liczbą limfocytów T_{reg} a sekrecją immunoglobulin. Opisano natomiast hamujący wpływ tych komórek na funkcję limfocytów B, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* [246,247]. Limfocyty B izolowane od chorych z SLE, hodowane w obecności limfocytów T_{reg}, produkowały istotnie mniejszą ilość IgG [246]. Ponadto, badania *in vitro* z udziałem izolowanych limfocytów T_{reg} i limfocytów B z migdałków osób zdrowych, potwierdziły supresorowy charakter komórek T_{reg} względem limfocytów B, wskazując jednocześnie, iż działają one hamująco na limfocyty B na drodze kontaktu bezpośredniego, bez udziału limfocytów Th [247]. Otrzymane w niniejszej pracy wyniki wydają się potwierdzać wnioski płynące ze wspomnianych powyżej badań. Obserwowana jako efekt końcowy obniżona produkcja IgG przez PBMC po kohodowli z limfocytami T_{reg}, może wynikać z bezpośredniej supresji limfocytów B przez dodane komórki regulatorowe. Ponadto, niezaburzona odpowiedź proliferacyjna PBMC wskazuje raczej na supresję funkcji, niż na hamowanie proliferacji limfocytów B przez komórki T_{reg}. Hipotezę o wpływie limfocytów T_{reg} na funkcje, lecz nie liczebność limfocytów B, wydają się potwierdzać obserwowane w grupie THI prawidłowe poziomy krążących limfocytów B.

Podsumowując, obniżony u dzieci z THI poziom IgG może być wynikiem przejściowej supresji funkcji limfocytów B przez limfocyty T_{reg}, przy czym supresja ta nie wydaje się wiązać z wpływem na liczebność limfocytów B.

W celu oceny przydatności pomiaru liczebności krążących limfocytów T_{reg} w diagnostyce różnicowej THI z innymi formami hipogammaglobulinemii, analizowano średnie wartości liczebności tych komórek w grupach badanych, uwzględniając w analizie różne zakresy wiekowe dzieci z niedoborami odporności humoralnej. Wykazano, iż u chorych z THI średnia liczebność komórek T_{reg} była istotnie wyższa, zarówno w odniesieniu do grupy osób zdrowych, jak i chorych z CVID i SIgAD, niezależnie od badanego przedziału wiekowego, tj. poniżej 5, 4, 3 i 2 roku życia (dane nie prezentowane). W każdym z analizowanych zakresów wieku można było wyodrębnić, oprócz dzieci prezentujących

podwyższoną liczbę krążących limfocytów T_{reg} , również tych pacjentów, u których oznaczana liczebność mieściła się w przedziale typowym dla osób zdrowych. Przyczyną, dla której pewien odsetek dzieci z THI poniżej 5, 4, 3, czy 2 roku życia (odpowiednio: 51,5%, 50%, 44% i 28% chorych) prezentował prawidłowy (tj. porównywalny z grupą kontrolną) poziom krążących limfocytów T_{reg} , może być fakt, iż u dzieci tych wyrównanie poziomu immunoglobulin nastąpiło relatywnie szybko, przed pierwszym oznaczeniem liczebności limfocytów T_{reg} . Diagnozę THI u tych osób stawiano na podstawie wcześniejszych pomiarów poziomu IgG, zanim rozpoczęto monitorowanie chorych pod względem liczebności limfocytów T_{reg} . Długoterminowe obserwacje 33 dzieci z grupy THI-I wykazały, że dynamika spadku poziomu limfocytów T_{reg} jest bardzo różna u poszczególnych chorych. Tak więc w trakcie pierwszego pomiaru poziom limfocytów T_{reg} mógł mieścić się już w granicach normy. Należy zaznaczyć, iż nie u wszystkich dzieci z THI mechanizm hipogammaglobulinemii może być związany z przejściowo podwyższonym poziomem limfocytów T_{reg} . Podsumowując, u części pacjentów z THI poniżej 2-go roku życia (średnio ok. 1/3 chorych) diagnostyka różnicowa, w oparciu o pomiar liczebności krążących limfocytów T_{reg} , może być utrudniona.

Diagnostyka różnicowa THI z innymi formami hipogammaglobulinemii, zwłaszcza z większością przypadków klinicznych dziecięcej postaci CVID, jest praktycznie niemożliwa i do chwili obecnej pozostaje istotnym problemem dla klinicystów. „Złotym standardem” w rozpoznaniu THI jest normalizacja obniżonego w momencie postawienia wstępnej diagnozy, poziomu immunoglobulin w surowicy krwi. Zbliżony obraz kliniczny THI i CVID w pierwszych latach życia stwarza również problemy odnośnie wdrożenia odpowiedniej strategii terapeutycznej, gdyż CVID wymaga terapii substytucyjnej preparatami immunoglobulin, podczas gdy w THI jest ona zasadniczo przeciwwskazana [171]. Niepodjęcie odpowiednio wcześnie leczenia u pacjentów z CVID może być niestety przyczyną ciężkich, zagrażających życiu zakażeń, prowadzących w dłuższej perspektywie czasowej do nieodwracalnych zmian narządowych, a nawet inwalidztwa. W przeszłości podejmowano już próby zmierzające do określenia parametrów laboratoryjnych, które byłyby pomocne w diagnostyce różnicowej hipogammaglobulinemii, m. in. THI i CVID o wczesnym początku. W prospektywnych obserwacjach klinicznych oceniano m. in. rodzaj oraz przebieg infekcji, częstość współwystępujących schorzeń alergicznych i autoimmunizacyjnych, zdolność do produkcji IgG w warunkach *in vitro*, odsetek limfocytów B pamięci po przełączeniu klas [248-251]. Niemniej jednak, do chwili obecnej nie istnieje parametr

diagnostyczny, który pozwalałby jednoznacznie rozróżniać te dwa typy niedoborów odporności.

W ostatnich latach wykazano, iż preparaty IVIG mogą przyczyniać się do wzrostu aktywności supresorowej limfocytów T_{reg} . Opisywano m. in. nasilenie proliferacji limfocytów nT_{reg} w grasicy [252], zwiększenie liczebności lub odsetka tychże komórek w krwi obwodowej [253-255], zwiększenie poziomu wewnątrzkomórkowej ekspresji czynnika Foxp3 [256,257], TGF- β , IL-10 [256], a także wzrost ekspresji cząsteczek CD38 i CD69 na powierzchni - traktowanych IVIG - komórek T_{reg} [258,259]. Zakładając, że podwyższona liczba krążących limfocytów T_{reg} może mieć związek z rozwojem THI, substytucja preparatami immunoglobulinowymi u tych dzieci wydaje się tym bardziej niewskazana.

Podsumowując, w świetle uzyskanych wyników zasadnym wydaje się stwierdzenie, iż ocena liczebności krążących limfocytów T_{reg} może mieć pomocnicze znaczenie diagnostyczne we wczesnym różnicowaniu THI z innymi formami hipogammaglobulinemii wieku wczesnodziecięcego (CVID, SIgAD). Niemniej jednak, mechanizmy prowadzące do wzrostu liczebności komórek T_{reg} w krwi obwodowej oraz mogące odgrywać rolę w supresji produkcji immunoglobulin *in vivo* wymagają dalszych badań.

6 WNIOSKI

1. Średnia liczebność krążących limfocytów T_{reg} była znamienne wyższa u pacjentów z THI, w porównaniu do dzieci zdrowych tworzących grupę kontrolną, jak również chorych z CVID i SIgAD. Ponadto, podwyższona liczba tych komórek była charakterystyczna dla dzieci młodszych (poniżej 2 roku życia) z podejrzeniem THI (ok. 72% chorych), natomiast u starszych (od 3 do 5 roku życia) nie różniła się istotnie od dobranej wiekowo grupy kontrolnej. Wyniki te sugerują, iż podwyższona bezwzględna liczba krążących w krwi obwodowej limfocytów T_{reg} (wartość odcięcia – powyżej 31 komórek/ μ l) u dzieci z podejrzeniem THI może faktycznie wskazywać na występowanie tego konkretnego niedoboru odporności humoralnej.
2. Prospektywne obserwacje kliniczne 33 dzieci z THI (obejmujące okres od momentu wystąpienia pierwszych objawów do czasu ustalenia ostatecznej diagnozy) pozwoliły stwierdzić, iż wyjściowo podwyższona liczba limfocytów T_{reg} malała z wiekiem osiągając pod koniec obserwacji poziomy porównywalne z obserwowanymi u osób zdrowych. Wraz ze spadkiem liczby tych komórek w krwi obwodowej, stwierdzano normalizację poziomu immunoglobulin klasy IgG w surowicy krwi oraz normalizację stanu klinicznego pacjentów. Zmiany te nie były związane z zaburzeniami poziomu krążących limfocytów B. Uzyskane wyniki sugerują zatem nowy patomechanizm THI, zależny od przejściowej supresji produkcji immunoglobulin przez podwyższoną liczbę krążących limfocytów T_{reg} .
3. Prospektywne obserwacje kliniczne 5 pacjentów z CVID (obejmujące okres od chwili wystąpienia pierwszych symptomów schorzenia do momentu ustalenia ostatecznego rozpoznania) wykazały, iż liczebność krążących limfocytów T_{reg} , oznaczana podczas każdej z kolejnych wizyt, nie różniła się w sposób istotny od obserwowanej u równoletnich dzieci zdrowych. Uzyskane wyniki sugerują, iż subpopulacja krążących limfocytów T_{reg} wydaje się nie mieć bezpośredniego związku z patomechanizmami leżącymi u podłoża CVID.
4. Ocena względnego poziomu ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w PBMC, przeprowadzona u pacjentów z THI objętych obserwacją długoterminową, nie

wykazała korelacji pomiędzy poziomem mRNA dla Foxp3 a oznaczaną równolegle u tych dzieci liczbą krążących limfocytów T_{reg}. Stąd też, analiza ekspresji powyższego genu na poziomie transkryptu wydaje się nie mieć związku z liczebnością krążących limfocytów T_{reg}.

5. Poziom IL-10 w surowicy krwi, nie był wykrywalny zarówno u pacjentów z grup badanych, jak i osób zdrowych.
6. Poziomy TGF- β w surowicy krwi, oceniany u pacjentów z THI objętych badaniem długoterminowym, nie różniły się istotnie zarówno od wartości obserwowanych w grupie kontrolnej, jak i pomiędzy kolejnymi wizytami. Monitorowanie poziomu tej cytokiny nie wydaje się mieć zatem istotnego znaczenia w patogenezie THI i/lub implikacji diagnostycznych dla pacjentów podejrzanych o THI.
7. W grupie dzieci z THI produkcja IL-10 przez PBMC w odpowiedzi na stymulację LPS, była znamienne obniżona (w odniesieniu do grupy kontrolnej) i nie ulegała istotnym wahaniom pomiędzy kolejnymi wizytami. Oceniana równolegle w tych samych warunkach produkcja TGF- β nie była istotnie zaburzona. Indukowana PHA produkcja IL-10, początkowo istotnie niższa (w odniesieniu do grupy kontrolnej), wzrastała pomiędzy kolejnymi wizytami, osiągając ostatecznie wartości obserwowane u równoletnich osób zdrowych. Z kolei, produkcja TGF- β również nie była istotnie zaburzona. Wydaje się zatem, iż obserwowana u dzieci z THI podwyższona liczebność krążących limfocytów T_{reg} nie ma związku ze zmianami dotyczącymi poziomu produkcji TGF- β przez PBMC, jako czynnika niezbędnego dla rozwoju tychże komórek. Natomiast, obniżony poziom stymulowanej LPS (przez cały okres obserwacji) lub PHA (we wczesnym dzieciństwie) produkcji IL-10 przez PBMC tych chorych, może wskazywać na tendencję do nadmiernie nasilonej odpowiedzi prozapalnej u pacjentów z THI. Obserwowany w trakcie kolejnych wizyt wzrost produkcji IL-10 po stymulacji nieswoistej (PHA) do poziomów obserwowanych w grupie kontrolnej, może odzwierciedlać normalizację odpowiedzi immunologicznej towarzyszącą normalizacji poziomu immunoglobulin i stanu klinicznego tych chorych.
8. Obserwowana w grupie pacjentów z CVID (objętych obserwacją długoterminową) produkcja IL-10 po stymulacji LPS lub PHA, obniżała się wraz z wiekiem, natomiast produkcja TGF- β pozostawała cały czas na obniżonym (względem zdrowych dzieci)

poziomie. Wyniki te wskazują na trwałą tendencję do nadmiernie wyrażonej odpowiedzi prozapalnej u tych chorych. Może to również częściowo tłumaczyć zwiększoną podatność osób z CVID na rozwój schorzeń o podłożu autoimmunizacyjnym.

9. W grupie SIgAD produkcja IL-10 po stymulacji zarówno LPS jak i PHA była istotnie obniżona w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast produkcja TGF- β nie była zaburzona. Wyniki te wskazują na - podobnie jak u pacjentów z CVID - zaburzoną odpowiedź prozapalną, która także może sprzyjać występującym u tych chorych schorzeniom autoimmunizacyjnym i/lub alergicznym.
10. Analiza sekwencji genów *TGFBR1* i *TGFBR2* kodujących receptory dla TGF- β , przeprowadzona w grupie dzieci z THI objętych obserwacją długoterminową oraz w grupie kontrolnej, nie wykazała żadnych nieprawidłowości dotyczących ich sekwencji. U 30% pacjentów z CVID w obrębie genu *TGFBR1* wykryto polimorfizm T375T, z kolei u 20% dzieci z grupy SIgAD stwierdzono obecność polimorfizmu N478S. Analiza całego regionu kodującego genu *TGFBR2* nie ujawniła żadnych zmian nukleotydowych. Podsumowując, w THI nie zaobserwowano zaburzeń strukturalnych dotyczących genów kodujących receptory dla TGF- β . Stąd też, analiza sekwencji tych genów wydaje się nie mieć implikacji zarówno diagnostycznych, jak i patogenetycznych.
11. Ocena funkcjonalna limfocytów T_{reg} przeprowadzona w modelowych warunkach *in vitro* potwierdziła ich hamujący wpływ na produkcję IgG przez limfocyty B wchodzące w skład PBMC zdrowych dawców krwi. Limfocyty T_{reg} wydają się zarazem nie mieć istotnego wpływu na stopień proliferacji komórek wchodzących w skład PBMC. Obserwacje te sugerują, iż wysoka liczebność krążących limfocytów T_{reg} może rzeczywiście przekładać się na obserwowany u dzieci z THI obniżony (przejściowo) poziom produkcji immunoglobulin *in vivo*.

Podsumowując, uzyskane wyniki badań wskazują na możliwą istotną rolę limfocytów T_{reg} w patomechanizmie rozwoju THI (lecz nie CVID oraz SIgAD), a ocena ich liczebności może pomóc w diagnostyce różnicowej THI i innych częstych form hipogammaglobulinemii (np. CVID i/lub SIgAD) występujących poniżej 2 roku życia.

7 STRESZCZENIE

Przejęciowa hipogammaglobulinemia wieku dziecięcego należy do jednego z najczęściej występujących pierwotnych niedoborów odporności humoralnej u dzieci, którego ostateczne rozpoznanie stawiane jest zwykle retrospektywnie. Przyczyny obniżonej produkcji immunoglobulin u pacjentów z THI oraz mechanizmy ich późniejszej normalizacji, pozostają ciągle nieznane. Zasadniczym celem niniejszej pracy było poszukiwanie nowych patomechanizmów leżących u podłoża tego niedoboru, jak również ustalenie nowych kryteriów/parametrów immunologicznych, które byłyby pomocne w diagnostyce różnicowej THI z CVID o wczesnym początku. W prezentowanych badaniach oznaczano liczebność krążących limfocytów T_{reg} o fenotypie $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ oraz analizowano wybrane parametry związane z ich powstawaniem i funkcjonowaniem. Prospektywne obserwacje kliniczne dzieci z THI pozwoliły stwierdzić, iż wyjściowo podwyższona liczba limfocytów T_{reg} malała wraz z wiekiem osiągając pod koniec obserwacji poziomy porównywalne z oznaczanymi u osób zdrowych. Wraz ze spadkiem liczby tych komórek w krwi obwodowej, stwierdzano normalizację poziomu immunoglobulin klasy IgG w surowicy krwi oraz normalizację stanu klinicznego pacjentów. Analizowana równolegle u dzieci z THI dynamika zmian poziomów produkcji TGF- β jako czynnika niezbędnego dla rozwoju limfocytów T_{reg} , nie wykazała istotnych różnic w odniesieniu do osób z grupy kontrolnej. Natomiast, obniżony poziom stymulowanej LPS lub PHA produkcji IL-10 przez PBMC tych chorych może wskazywać na występującą u pacjentów z THI tendencję do nadmiernie nasilonej odpowiedzi prozapalnej. Ocena funkcjonalna limfocytów T_{reg} przeprowadzona w warunkach *in vitro* potwierdziła ich hamujący wpływ na produkcję IgG przez limfocyty B. Natomiast, analiza sekwencji genów *TGFBR1* i *TGFBR2* kodujących receptory dla TGF- β nie wykazała żadnych mutacji/polimorfizmów, które mogłyby mieć związek z badanym niedoborem. Uzyskane wyniki badań wskazują na istotną rolę limfocytów T_{reg} w patomechanizmie rozwoju THI (lecz nie CVID oraz SIgAD), który wiąże się prawdopodobnie z przejęciową supresją produkcji immunoglobulin. Ocena liczebności limfocytów T_{reg} może być przydatna w diagnostyce różnicowej THI z innymi częstymi formami hipogammaglobulinemii wieku wczesnodziecięcego.

8 ABSTRACT

Transient hypogammaglobulinemia of infancy is one of the most common primary humoral immunodeficiencies in children, while definitive diagnosis of THI is usually made retrospectively. The underlying basis of reduced serum immunoglobulins level and their subsequent mechanisms of normalization are still unknown. The main goal of this study was to determine new pathomechanisms underlying this immunodeficiency, as well as to establish new criteria/immunological parameters that would be useful in the differential diagnosis of THI and early-onset CVID. In this study the number of circulating $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ T_{reg} cells and several parameters related to the generation and function of these cells were determined. Prospective clinical observations of children with THI revealed that initially increased T_{reg} numbers decreased with age and reached the values observed in healthy subjects. The normalization of IgG levels in serum and withdrawal of clinical symptoms occurring with the decrease of the T_{reg} number in the peripheral blood was observed. TGF- β production, which is a crucial factor for the development of T_{reg} cells, was analyzed in children with THI and has not revealed any significant differences in comparison to healthy control subjects. However, low levels of PHA- or LPS- stimulated IL-10 production by PBMC of these patients, may indicate that they may tend to excessively severe proinflammatory response. Functional evaluation of T_{reg} cells performed *in vitro* has demonstrated their inhibitory effect on the production of IgG by B lymphocytes. However, the analysis of sequences of *TGFBR1* and *TGFBR2* encoding genes has not shown any mutations/polymorphisms that could be responsible for studied deficiency. The obtained data indicate the important role of T_{reg} cells in the pathogenesis of THI (yet not CVID or SIgAD), which is probably associated with transient suppression of immunoglobulin production. Evaluation of T_{reg} cell number may be helpful in the differential diagnosis of THI with other forms of frequently occurring hypogammaglobulinemias in early childhood.

9 PIŚMIENNICTWO

- [1] Gershon RK., Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970; 18(5):723-37.
- [2] Gershon RK., Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 1971; 21(6):903-14.
- [3] Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995; 155(3):1151-64.
- [4] Baecher-Allan C., Brown JA., Freeman GJ., Hafler DA. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2001; 167(3):1245-53.
- [5] Dieckmann D., Plottner H., Berchtold S., Berger T., Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med.* 2001; 193(11):1303-10.
- [6] Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M., Tuettenberg A., Knop J., Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med.* 2001; 193(11):1285-94.
- [7] Ng WF., Duggan PJ., Ponchel F., Matarese G., Lombardi G., Edwards AD., Isaacs JD., Lechler RI. Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 2001; 98(9):2736-44.
- [8] Taams LS , Smith J , Rustin MH , Salmon M , Poulter LW , Akbar AN. Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol.* 2001; 31(4):1122-31.
- [9] Stephens LA., Mottet C., Mason D., Powrie F. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31:1247-1254.
- [10] Itoh M., Takahashi T., Sakaguchi N., Kuniyasu Y., Shimizu J., Otsuka F., Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol.* 1999; 162(9):5317-26.
- [11] Liston A., Rudensky AY. Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19(2):176-85.
- [12] Kretschmer K., Apostolou I., Hawiger D., Khazaie K., Nussenzweig MC., von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol.* 2005; 6(12):1219-27.
- [13] Maggi E., Cosmi L., Liotta F., Romagnani P., Romagnani S., Annunziato F. Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev.* 2005; 4(8):579-86.
- [14] Sakaguchi S., Wing K., Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol.* 2007; 37(1):S116-23.

- [15] Read S., Malmström V., Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med.* 2000; 192(2):295-302.
- [16] Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S., Uede T., Shimizu J., Sakaguchi N., Mak TW., Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 2000; 192(2):303-10.
- [17] Shimizu J., Yamazaki S., Takahashi T., Ishida Y., Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* 2002; 3(2):135-42.
- [18] McHugh RS., Whitters MJ., Piccirillo CA., Young DA., Shevach EM., Collins M., Byrne MC. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; 16(2):311-23.
- [19] Huang CT., Workman CJ., Flies D., Pan X., Marson AL., Zhou G., Hipkiss EL., Ravi S., Kowalski J., Levitsky HL., Powell JD., Pardoll DM., Drake CG., Vignali DA. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004; 21(4):503-13.
- [20] Baecher-Allan C., Wolf E., Hafler DA. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *Clin Immunol.* 2005; 115(1):10-8.
- [21] Yi H., Zhen Y., Jiang L., Zheng J., Zhao Y. The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *Cell Mol Immunol.* 2006; 3(3):189-95.
- [22] Pacholczyk R., Ignatowicz H., Kraj P., Ignatowicz L. Origin and T cell receptor diversity of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells. *Immunity* 2006; 25(2):249-59.
- [23] Sakaguchi S. The origin of FOXP3-expressing CD4⁺ regulatory T cells: thymus or periphery. *J Clin Invest.* 2003; 112(9):1310-2.
- [24] Lohr J., Knoechel B., Abbas AK. Regulatory T cells in the periphery. *Immunol Rev.* 2006; 212:149-62.
- [25] Akbar AN., Vukmanovic-Stejić M., Taams LS., Macallan DC. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4⁺ T cells in the periphery. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(3):231-7.
- [26] Cosgrove D., Chan SH., Waltzinger C., Benoist C., Mathis D. The thymic compartment responsible for positive selection of CD4⁺ T cells. *Int Immunol.* 1992; 4(6):707-10.
- [27] Annunziato F., Cosmi L., Liotta F., Lazzeri E., Manetti R., Vanini V., Romagnani P., Maggi E., Romagnani S. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med.* 2002; 196(3):379-87.
- [28] Liu Y., Zhang P., Li J., Kulkarni A.B., Perruche S., Chen W. A critical function for TGF-β signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2008; 9 (6):632-640.
- [29] Fantini MC., Becker C., Monteleone G., Pallone F., Galle PR., Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol.* 2004; 172(9):5149-53.

- [30] Maruyama T., Konkel JE., Zamarron BF., Chen W. The molecular mechanisms of Foxp3 gene regulation. *Semin Immunol.* 2011; 23(6):418-23.
- [31] Xu L., Kitani A., Strober W. Molecular mechanisms regulating TGF-beta-induced Foxp3 expression. *Mucosal Immunol.* 2010; 3(3):230-8.
- [32] Li MO., Wan YY., Sanjabi S., Robertson A-KL., Flavell RA. Transforming growth factor – β regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24:99-146.
- [33] Shi Y., Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113(6):685-700.
- [34] Mehra A, Wrana JL. TGF-beta and the Smad signal transduction pathway. *Biochem Cell Biol.* 2002; 80(5):605-22.
- [35] Liu Y., Zhang P., Li J., Kulkarni AB., Perruche S., Chen W. A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2008; 9(6):632-40.
- [36] Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2005; 6(11):1142-51.
- [37] Shevach EM., Tran DQ., Davidson TS., Andersson J. The critical contribution of TGF-b to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 2008; 38:915-917.
- [38] Peterson RA. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol.* 2012; 40(2):186-204.
- [39] Roncarolo MG., Gregori S., Battaglia M., Bacchetta R., Fleischhauer K., Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev.* 2006; 212:28-50.
- [40] Mills KH., McGuirk P. Antigen-specific regulatory T cells--their induction and role in infection. *Semin Immunol.* 2004; 16(2):107-17.
- [41] Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect.* 2001; 3(11):947-54.
- [42] Taams LS., Vukmanovic-Stejc M., Smith J., Dunne PJ., Fletcher JM., Plunkett FJ., Ebeling SB., Lombardi G., Rustin MH., Bijlsma JW., Lafeber FP., Salmon M., Akbar AN. Antigen-specific T cell suppression by human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2002; 32(6):1621-30.
- [43] Josefowicz SZ., Lu LF., Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol.* 2012; 30:531-64.
- [44] Hall BM., Verma ND., Tran GT., Hodgkinson SJ. Distinct regulatory CD4⁺T cell subsets; differences between naïve and antigen specific T regulatory cells. *Curr Opin Immunol.* 2011; 23(5):641-7.
- [45] Thompson C., Powrie F. Regulatory T cells. *Curr Opin Pharmacol.* 2004; 4(4):408-14.
- [46] Beissert S., Schwarz A., Schwarz T. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol.* 2006; 126(1):15-24.
- [47] Long E., Wood KJ. Understanding FOXP3: progress towards achieving transplantation tolerance. *Transplantation* 2007; 84(4):459-61.
- [48] Bilate AM., Lafaille JJ. Induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol.* 2012; 30:733-58.

- [49] Sugimoto N., Oida T., Hirota K., Nakamura K., Nomura T., Uchiyama T., Sakaguchi S. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol.* 2006; 18(8):1197-209.
- [50] Hill JA., Feuerer M., Tash K., Haxhinasto S., Perez J., Melamed R., Mathis D., Benoist C. Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* 2007; 27(5):786-800.
- [51] Haribhai D., Lin W., Edwards B., Ziegelbauer J., Salzman NH., Carlson MR., Li SH., Simpson PM., Chatila TA., Williams CB. A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. *J Immunol.* 2009; 182(6):3461-8.
- [52] Ozdemir C., Akdis M., Akdis CA. T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation. *Clin Exp Allergy.* 2009; 39(5):626-39.
- [53] Born WK., Reardon CL., O'Brien RL. The function of gammadelta T cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18(1):31-8.
- [54] Tang XL., Smith TR., Kumar V. Specific control of immunity by regulatory CD8 T cells. *Cell Mol Immunol.* 2005; 2(1):11-9.
- [55] Tang X., Maricic I., Purohit N., Bakamjian B., Reed-Loisel LM., Beeston T., Jensen P., Kumar V. Regulation of immunity by a novel population of Qa-1-restricted CD8alpha⁺TCRalpha⁺ T cells. *J Immunol.* 2006; 177(11):7645-55.
- [56] Schmidt A., Oberle N., Krammer PH. Molecular mechanisms of T_{reg}-mediated T cell suppression. *Front Immunol.* 2012; 3(51):1-20.
- [57] Stokłosa T.: Niedobory odporności [w:] Gołab J., Jakóbisiak M., Lasek W., Stokłosa T. *Immunologia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008;
- [58] Leber A., Teles A., Zenclussen AC. Regulatory T cells and their role in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2010; 63(6):445-59.
- [59] Shevach EM. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009; 30(5):636-45.
- [60] Collison LW., Workman CJ., Kuo TT., Boyd K., Wang Y., Vignali KM., Cross R., Sehy D., Blumberg RS., Vignali DA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007; 450(7169):566-9.
- [61] Asseman C., Mauze S., Leach MW., Coffman RL., Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med.* 1999; 190(7):995-1004.
- [62] Nakamura K., Kitani A., Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 2001; 194(5):629-44.
- [63] de la Rosa M., Rutz S., Dorninger H., Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 2004; 34(9):2480-8.
- [64] Garín MI., Chu CC., Golshayan D., Cernuda-Morollón E., Wait R., Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4⁺CD25⁺ T cells. *Blood* 2007; 109(5):2058-65.
- [65] Grossman WJ., Verbsky JW., Tollefsen BL., Kemper C., Atkinson JP., Ley TJ. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 2004; 104(9):2840-8.

- [66] Bodor J., Bodorova J., Gress RE. Suppression of T cell function: a potential role for transcriptional repressor ICER. *J Leukoc Biol.* 2000; 67(6):774-9.
- [67] Bopp T., Becker C., Klein M., Klein-Hessling S., Palmetshofer A., Serfling E., Heib V., Becker M., Kubach J., Schmitt S., Stoll S., Schild H., Staeger MS., Stassen M., Jonuleit H., Schmitt E. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med.* 2007; 204(6):1303-10.
- [68] Cederbom L., Hall H., Ivars F. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol.* 2000; 30(6):1538-43.
- [69] Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P., Yamaguchi T., Miyara M., Fehervari Z., Nomura T., Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* 2008; 322(5899):271-5.
- [70] Grohmann U., Orabona C., Fallarino F., Vacca C., Calcinaro F., Falorni A., Candeloro P., Belladonna ML., Bianchi R., Fioretti MC., Puccetti P. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol.* 2002; 3(11):1097-101.
- [71] Liang B., Workman C., Lee J., Chew C., Dale BM., Colonna L., Flores M., Li N., Schweighoffer E., Greenberg S., Tybulewicz V., Vignali D., Clynes R. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol.* 2008; 180(9):5916-26.
- [72] Shalev I., Liu H., Kosciuk C., Bartczak A., Javadi M., Wong KM., Maknojia A., He W., Liu MF., Diao J., Winter E., Manuel J., McCarthy D., Catral M., Gommerman J., Clark DA., Phillips MJ., Gorczynski RR., Zhang L., Downey G., Grant D., Cybulsky MI., Levy G. Targeted deletion of fgl2 leads to impaired regulatory T cell activity and development of autoimmune glomerulonephritis. *J Immunol.* 2008; 180(1):249-60.
- [73] Borsellino G., Kleinewietfeld M., Di Mitri D., Sternjak A., Diamantini A., Giometto R., Höpner S., Centonze D., Bernardi G., Dell'Acqua ML., Rossini PM., Battistini L., Röttschke O., Falk K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ T_{reg} cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 2007; 110(4):1225-32.
- [74] Deaglio S., Dwyer KM., Gao W., Friedman D., Usheva A., Erat A., Chen JF., Enjyoji K., Linden J., Oukka M., Kuchroo VK., Strom TB., Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007; 204(6):1257-65.
- [75] Sarris M., Andersen KG., Randow F., Mayr L., Betz AG. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity.* 2008; 28(3):402-13.
- [76] Fontenot JD., Gavin MA., Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4(4):330-6.
- [77] Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299(5609):1057-61.
- [78] Lu LF., Rudensky A. Molecular orchestration of differentiation and function of regulatory T cells. *Genes Dev.* 2009; 23(11):1270-82.
- [79] Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev.* 2011; 241(1):260-8.
- [80] Li B., Greene MI. FOXP3 actively represses transcription by recruiting the HAT/HDAC complex. *Cell Cycle* 2007; 6(12):1432-6.
- [81] Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:209-26.

- [82] van der Vliet HJJ., Nieuwenhuis EE. IPEX as a Result of Mutations in FOXP3. *Clin Dev Immunol.* 2007; 2007:89017.
- [83] Crispin JC., Martínez A., Alcocer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 2003; 21(3):273-6.
- [84] Ni Choileain N., Redmond HP. Regulatory T-cells and autoimmunity. *J Surg Res.* 2006; 130:124-135.
- [85] Cao D., Malmström V., Baecher-Allan C., Hafler D., Klareskog L., Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* 2003; 33(1):215-23.
- [86] Nadkarni S., Mauri C., Ehrenstein MR. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J Exp Med.* 2007; 204(1):33-9.
- [87] Belkaid Y., Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol.* 2005; 6(4):353-60.
- [88] Viglietta V., Baecher-Allan C., Weiner HL., Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2004; 199(7):971-9.
- [89] Soler DC., McCormick TS. The dark side of regulatory T cells in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2011; 131(9):1785-6.
- [90] Chen Z., Herman AE., Matos M., Mathis D., Benoist C. Where CD4⁺CD25⁺ T_{reg} cells impinge on autoimmune diabetes. *J Exp Med.* 2005; 202(10):1387-97.
- [91] Wing K., Sakaguchi S. Regulatory T cells as potential immunotherapy in allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2006; 6(6):482-8.
- [92] Doganci A., Eigenbrod T., Krug N., De Sanctis GT., Hausding M., Erpenbeck VJ., Haddad el-B., Lehr HA., Schmitt E., Bopp T., Kallen KJ., Herz U., Schmitt S., Luft C., Hecht O., Hohlfeld JM., Ito H., Nishimoto N., Yoshizaki K., Kishimoto T., Rose-John S., Renz H., Neurath MF., Galle PR., Finotto S. The IL-6R alpha chain controls lung CD4⁺CD25⁺ T_{reg} development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J Clin Invest.* 2005; 115(2):313-25.
- [93] Xu D., Fu J., Jin L., Zhang H., Zhou C., Zou Z., Zhao JM., Zhang B., Shi M., Ding X., Tang Z., Fu YX., Wang FS. Circulating and liver resident CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol.* 2006; 177(1):739-47.
- [94] Franzese O., Kennedy PT., Gehring AJ., Gotto J., Williams R., Maini MK., Bertoletti A. Modulation of the CD8⁺-T-cell response by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol.* 2005; 79(6):3322-8.
- [95] Wingate PJ., McAulay KA., Anthony IC., Crawford DH. Regulatory T cell activity in primary and persistent Epstein-Barr virus infection. *J Med Virol.* 2009; 81(5):870-7.
- [96] Aandahl EM., Michaëlsson J., Moretto WJ., Hecht FM., Nixon DF. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol.* 2004; 78(5):2454-9.
- [97] Yamano Y., Cohen CJ., Takenouchi N., Yao K., Tomaru U., Li HC., Reiter Y., Jacobson S. Increased expression of human T lymphocyte virus type I (HTLV-I) Tax11-19 peptide-human histocompatibility leukocyte antigen A*201 complexes on CD4⁺CD25⁺

- T Cells detected by peptide-specific, major histocompatibility complex-restricted antibodies in patients with HTLV-I-associated neurologic disease. *J Exp Med.* 2004; 199(10):1367-77.
- [98] Eggena MP., Barugahare B., Jones N., Okello M., Mutalya S., Kityo C., Mugenyi P., Cao H. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol.* 2005; 174(7):4407-14.
- [99] Curiel TJ., Coukos G., Zou L., Alvarez X., Cheng P., Mottram P., Evdemon-Hogan M., Conejo-Garcia JR., Zhang L., Burow M., Zhu Y., Wei S., Kryczek I., Daniel B., Gordon A., Myers L., Lackner A., Disis ML., Knutson KL., Chen L., Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004; 10(9):942-9.
- [100] Woo EY., Chu CS., Goletz TJ., Schlienger K., Yeh H., Coukos G., Rubin SC., Kaiser LR., June CH. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001; 61(12):4766-72.
- [101] Ishibashi Y., Tanaka S., Tajima K., Yoshida T., Kuwano H. Expression of Foxp3 in non-small cell lung cancer patients is significantly higher in tumor tissues than in normal tissues, especially in tumors smaller than 30 mm. *Oncol Rep.* 2006; 15(5):1315-9.
- [102] Sasada T., Kimura M., Yoshida Y., Kanai M., Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 2003; 98(5):1089-99.
- [103] Liyanage UK., Moore TT., Joo HG., Tanaka Y., Herrmann V., Doherty G., Drebin JA., Strasberg SM., Eberlein TJ., Goedegebuure PS., Linehan DC. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol.* 2002; 169(5):2756-61.
- [104] Appay V., Jandus C., Voelter V., Reynard S., Coupland SE., Rimoldi D., Lienard D., Guillaume P., Krieg AM., Cerottini JC., Romero P., Leyvraz S., Rufer N., Speiser DE. New generation vaccine induces effective melanoma-specific CD8⁺ T cells in the circulation but not in the tumor site. *J Immunol.* 2006; 177(3):1670-8.
- [105] Ishida T., Ishii T., Inagaki A., Yano H., Komatsu H., Iida S., Inagaki H., Ueda R. Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. *Cancer Res.* 2006; 66(11):5716-22.
- [106] Yang ZZ., Novak AJ., Stenson MJ., Witzig TE., Ansell SM. Intratumoral CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4⁺ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006; 107(9):3639-46.
- [107] Powell BR., Buist NR., Stenzel P. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr.* 1982; 100(5):731-7.
- [108] Barzaghi F., Passerini L., Bacchetta R. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome: a paradigm of immunodeficiency with autoimmunity. *Front Immunol.* 2012; 3:211.
- [109] Caudy AA., Reddy ST., Chatila T., Atkinson JP., Verbsky JW. CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 119(2):482-7.

- [110] Verbsky JW., Chatila TA. T-regulatory cells in primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2011; 11(6):539-44.
- [111] Rigaud S., Fondanèche MC., Lambert N., Pasquier B., Mateo V., Soulas P., Galicier L., Le Deist F., Rieux-Laucat F., Revy P., Fischer A., de Saint Basile G., Latour S. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* 2006; 444(7115):110-4.
- [112] Fevang B., Yndestad A., Sandberg WJ., Holm AM., Müller F., Aukrust P., Frøland SS. Low numbers of regulatory T cells in common variable immunodeficiency: association with chronic inflammation in vivo. *Clin Exp Immunol.* 2007; 147(3):521-5.
- [113] Melo KM., Carvalho KI., Bruno FR., Ndhlovu LC., Ballan WM., Nixon DF., Kallas EG., Costa-Carvalho BT. A decreased frequency of regulatory T cells in patients with common variable immunodeficiency. *PLoS One* 2009; 4(7):e6269.
- [114] Horn J., Manguiat A., Berglund LJ., Knerr V., Tahami F., Grimbacher B., Fulcher DA. Decrease in phenotypic regulatory T cells in subsets of patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol.* 2009; 156(3):446-54.
- [115] Genre J., Errante PR., Kokron CM., Toledo-Barros M., Câmara NO., Rizzo LV. Reduced frequency of CD4(+)CD25(HIGH)FOXP3(+) cells and diminished FOXP3 expression in patients with Common Variable Immunodeficiency: a link to autoimmunity? *Clin Immunol.* 2009; 132(2):215-21.
- [116] Yu GP., Chiang D., Song SJ., Hoyte EG., Huang J., Vanishsarn C., Nadeau KC. Regulatory T cell dysfunction in subjects with common variable immunodeficiency complicated by autoimmune disease. *Clin Immunol.* 2009; 131(2):240-53.
- [117] Maillard MH., Cotta-de-Almeida V., Takeshima F., Nguyen DD., Michetti P., Nagler C., Bhan AK., Snapper SB. The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for the function of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *J Exp Med.* 2007; 204(2):381-91.
- [118] Marangoni F., Trifari S., Scaramuzza S., Panaroni C., Martino S., Notarangelo LD., Baz Z., Metin A., Cattaneo F., Villa A., Aiuti A., Battaglia M., Roncarolo MG., Dupré L. WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) natural regulatory T cells. *J Exp Med.* 2007; 204(2):369-80.
- [119] Cassani B., Poliani PL., Moratto D., Sobacchi C., Marrella V., Imperatori L., Vairo D., Plebani A., Giliani S., Vezzoni P., Facchetti F., Porta F., Notarangelo LD., Villa A., Badolato R. Defect of regulatory T cells in patients with Omenn syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(1):209-16.
- [120] Saito M., Nagasawa M., Takada H., Hara T., Tsuchiya S., Agematsu K., Yamada M., Kawamura N., Ariga T., Tsuge I., Nonoyama S., Karasuyama H., Minegishi Y. Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. *J Exp Med.* 2011; 208(2):235-49.
- [121] Jiang S., Tsang J., Lechler RI. Adoptive cell therapy using in vitro generated human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells with indirect allospecificity to promote donor-specific transplantation tolerance. *Transplant Proc.* 2006; 38(10):3199-201.
- [122] Golshayan D., Jiang S., Tsang J., Garin MI., Mottet C., Lechler RI. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood* 2007; 109(2):827-35.

- [123] Mason D., Powrie F. Control of immune pathology by regulatory T cells. *Curr Opin Immunol.* 1998; 10(6):649-55.
- [124] Salomon B., Lenschow DJ., Rhee L., Ashourian N., Singh B., Sharpe A., Bluestone JA. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000; 12(4):431-40.
- [125] Sakaguchi S., Takahashi T., Nishizuka Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J Exp Med.* 1982; 156(6):1577-86.
- [126] Bach JF., Boitard C., Yasunami R., Dardenne M. Control of diabetes in NOD mice by suppressor cells. *J Autoimmun.* 1990; 3 Suppl 1:97-100.
- [127] Tang Q., Henriksen KJ., Bi M., Finger EB., Szot G., Ye J., Masteller EL., McDevitt H., Bonyhadi M., Bluestone JA. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med.* 2004; 199(11):1455-65.
- [128] Kohm AP., Carpentier PA., Anger HA., Miller SD. Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2002; 169(9):4712-6.
- [129] Edinger M., Hoffmann P., Ermann J., Drago K., Fathman CG., Strober S., Negrin RS. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med.* 2003; 9(9):1144-50.
- [130] Taylor PA., Lees CJ., Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002; 99(10):3493-9.
- [131] Frey O., Petrow PK., Gajda M., Siegmund K., Huehn J., Scheffold A., Hamann A., Radbruch A., Bräuer R. The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4⁺CD25⁺ T cells. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7(2):R291-301.
- [132] DiPaolo RJ., Glass DD., Bijwaard KE., Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ T cells prevent the development of organ-specific autoimmune disease by inhibiting the differentiation of autoreactive effector T cells. *J Immunol.* 2005; 175(11):7135-42.
- [133] Scalapino KJ., Tang Q., Bluestone JA., Bonyhadi ML., Daikh DI. Suppression of disease in New Zealand Black/New Zealand White lupus-prone mice by adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells. *J Immunol.* 2006; 177(3):1451-9.
- [134] Hippen KL., Riley JL., June CH., Blazar BR. Clinical perspectives for regulatory T cells in transplantation tolerance. *Semin Immunol.* 2011; 23(6):462-8.
- [135] Shimizu J., Yamazaki S., Takahashi T., Ishida Y., Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* 2002; 3(2):135-42.
- [136] Beyer M., Kochanek M., Darabi K., Popov A., Jensen M., Endl E., Knolle PA., Thomas RK., von Bergwelt-Baildon M., Debey S., Hallek M., Schultze JL. Reduced frequencies and suppressive function of CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood* 2005; 106(6):2018-25.

- [137] Read S., Greenwald R., Izcue A., Robinson N., Mandelbrot D., Francisco L., Sharpe AH., Powrie F. Blockade of CTLA-4 on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol.* 2006; 177(7):4376-83.
- [138] Kryczek I., Wei S., Zou L., Zhu G., Mottram P., Xu H., Chen L., Zou W. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol.* 2006; 177(1):40-4.
- [139] Callahan MK., Wolchok JD., Allison JP. Anti-CTLA-4 antibody therapy: immune monitoring during clinical development of a novel immunotherapy. *Semin Oncol.* 2010; 37(5):473-84.
- [140] Errante PR., Franco JL., Espinosa-Rosales FJ., Sorensen R., Condino-Neto A. Advances in primary immunodeficiency diseases in Latin America: epidemiology, research and perspectives. *Ann N Y Acad Sci.* 2012; 1250:62-72.
- [141] Kutukculer N., Gulez N. The outcome of patients with unclassified hypogammaglobulinemia in early childhood. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009; 20:693-698.
- [142] Eades-Perner AM., Gathmann B., Knerr V., Guzman D., Veit D., Kindle G., Grimbacher B.; ESID Registry Working Party. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: results 2004-06. *Clin Exp Immunol.* 2007; 147(2):306-12.
- [143] 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):204-14.
- [144] Al-Muhsen S., Alsum Z. Primary immunodeficiency diseases in the Middle East. *Ann N Y Acad Sci.* 2012; 1250:56-61.
- [145] Seymour B., Miles J., Haeney M. Primary antibody deficiency and diagnostic delay. *J Clin Pathol.* 2005; 58(5):546-7.
- [146] Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(2):S182-194.
- [147] Moise A., Nedelcu FD., Toader MA., Sora SM., Tica A., Ferastraoaru DE., Constantinescu I. Primary immunodeficiencies of the B lymphocyte. *J Med Life.* 2010; 3(1):60-3.
- [148] Driessen G., van der Burg M. Educational paper: primary antibody deficiencies. *Eur J Pediatr.* 2011; 170(6):693-702.
- [149] Bonilla FA., Bernstein IL., Khan DA., Ballas ZK., Chinen J., Frank MM., Kobrynski LJ., Levinson AI., Mazer B., Nelson RP Jr., Orange JS., Routes JM., Shearer WT., Sorensen RU. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005; 94(5 Suppl 1):1-63.
- [150] Gitlin D., Janeway CA. Agammaglobulinemia, congenital, acquired and transient forms. *Prog Hematol.* 1956; 1:318-29.
- [151] Doğu F., İkinçioğulları A., Babacan E. Transient hypogammaglobulinemia of infancy and early childhood: outcome of 30 cases. *Turk J Pediatr.* 2004; 46:120-124.
- [152] Stiehm ER. The Four Most Common Pediatric Immunodeficiencies. *J Immunotoxicol.* 2008; 5:227-234.
- [153] Kowalczyk D., Zembala M. Zespoły niedoborów odporności, [w:] Zembala M, Górski A.:Zarys immunologii klinicznej, Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa 2001.

- [154] 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):590-5.
- [155] Meazza C., Cerutti P., Pagani S., Boncimino A., Marconi M., Avanzini A., Bozzola M. Clinical management of short children with low serum immunoglobulin but no immunodeficiency features. *Pediatr Int.* 2010; 52(4):626-30.
- [156] Walker AM., Kemp AS., Hill DJ., Shelton MJ. Features of transient hypogammaglobulinaemia in infants screened for immunological abnormalities. *Arch Dis Child.* 1994; 70 (3):183-6.
- [157] Szczawińska-Popłonyk A., Zelent A., Dachtera A., Bręborowicz A. Hipogammaglobulinemia u niemowląt i małych dzieci – charakterystyka kliniczna i immunodiagnostyczna. *Alerg Astma Immun.* 2009, 15(2):121-132.
- [158] Fudenberg HH., Fudenberg BR. Antibody to hereditary human gamma-globulin (GM) factor resulting from maternal-fetal incompatibility. *Science* 1964; 145(3628):170-1.
- [159] Nathenson G., Schorr JB., Litwin SD. Gm Factor Fetomaternal Gamma Globulin Incompatibility. *Pediatr Res.* 1971; 5:2-9.
- [160] Soothill JF. Immunoglobulins in first-degree relatives of patients with hypogammaglobulinaemia. Transient hypogammaglobulinaemia: a possible manifestation of heterozygosity. *Lancet* 1968; 1(7550):1001-3.
- [161] Siegel RL., Issekutz T., Schwaber J., Rosen FS., Geha RS. Deficiency of T helper cells in transient hypogammaglobulinemia of infancy. *N Engl J Med.* 1981; 305:1307-1313.
- [162] Kowalczyk D., Mytar B., Zembala M. Cytokine production in transient hypogammaglobulinemia and isolated IgA deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 1997; 100(4):556-62.
- [163] Kowalczyk D., Baran J., Webster ADB., 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.* 2001; 127:507-512.
- [164] Kowalczyk D., Macura-Biegun A., Zembala M. The expression of CD40 on monocytes of children with primary humoral immunodeficiencies. *Pediatr Res.* 2006; 59(6):816-9.
- [165] Szaflarska A., Kowalczyk D. Zakażenia przewodu pokarmowego w pierwotnych niedoborach odporności. *Alergologia . Immunologia* 2007; 4(1-2).
- [166] Wolska-Kuśnierz B., Kurenko-Deptuch M., Bernatowska E. Trudności w rozpoznawaniu i leczeniu powikłań infekcyjnych u chorych z pierwotnymi niedoborami odporności. *Przegl Epidemiol.* 2008; 62:123-131.
- [167] Dalal I., Reid B., Nisbet-Brown E., Roifman CM. The outcome of patients with hypogammaglobulinemia in infancy and early childhood. *J Pediatr.* 1998; 133(1):144-6.
- [168] Wang AS., Liang MG., Schneider LC. Severe Atopic Dermatitis and Transient Hypogammaglobulinemia in Children. *Pediatr Dermatol.* 2012; 29(1):73-78.
- [169] Kiliç SS., Tezcan İ., Sanal Ö., Metin A., Ersoy F. Transient hypogammaglobulinemia of infancy: Clinical and immunologic features of 40 new cases. *Pediatr Int.* 2000; 42:647-650.

- [170] McGeady SJ. Transient hypogammaglobulinemia of infancy: need to reconsider name and definition. *J Pediatr.* 1987; 110(1):47-50.
- [171] Whelan MA., Hwan WH., Beausoleil J., Hauck WW., McGeady SJ. Infants presenting with recurrent infections and low immunoglobulins: characteristics and analysis of normalization. *J Clin Immunol* 2006; 26(1):7-11.
- [172] Bergbreiter A., Salzer U. Common variable immunodeficiency: a multifaceted and puzzling disorder. *Expert Rev Clin. Immunol.* 2009; 5(2):167-180.
- [173] Hammarström L., Vorechovsky I., Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol.* 2000; 120(2):225-31.
- [174] Castigli E., Geha RS. TACI, isotype switching, CVID and IgAD. *Immunol Res.* 2007; 38(1-3):102-11.
- [175] Geha RS., Notarangelo LD., Casanova JL., Chapel H., Conley ME., Fischer A., Hammarstrom L., Nonoyama S., Ochs HD., Puck JM., Roifman C., Seger R., Wedgwood J. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 120(4):776-794.
- [176] Cunningham-Rundles C., Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol.* 1999; 92(1):34-48.
- [177] Quinti I., Soresina A., Spadaro G., Martino S., Donnanno S., Agostini C., Claudio P., Franco D., Pesce MA., Borghese F., Guerra A., Rondelli R., Plebani A. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2007; 27(3):308-316.
- [178] Hermaszewski RA., Webster AD. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Q J Med.* 1993; 86(1):31-42.
- [179] Conley ME., Notarangelo LD., Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. *Clin Immunol.* 1999;93(3):190-197.
- [180] Salzer U., Grimbacher B. Common variable immunodeficiency: The power of costimulation. *Semin Immunol.* 2006; 18:337-346.
- [181] Cunningham-Rundles C. Clinical and immunologic analyses of 103 patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 1989; 9(1):22-33.
- [182] Fried AJ., Bonilla FA. Pathogenesis, diagnosis, and management of primary antibody deficiencies and infections. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(3):396-414.
- [183] Vlková M., Thon V., Sárkyová M., Bláha L., Svobodník A., Lokaj J., Litzman J. Age dependency and mutual relations in T and B lymphocyte abnormalities in common variable immunodeficiency patients. *Clin Exp Immunol.* 2006; 143(2):373-9.
- [184] Salzer U., Maul-Pavicic A., Cunningham-Rundles C., Urschel S., Belohradsky BH., Litzman J., Holm A., Franco JL., Plebani A., Hammarstrom L., Skrabl A., Schwinger W., Grimbacher B. ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol.* 2004; 113(3):234-40.
- [185] Sekine H., Ferreira RC., Pan-Hammarström Q., Graham RR., Ziemba B., de Vries SS., Liu J., Hippen K., Koeuth T., Ortmann W., Iwahori A., Elliott MK., Offer S., Skon C., Du L., Novitzke J., Lee AT., Zhao N., Tompkins JD., Altshuler D., Gregersen PK., Cunningham-Rundles C., Harris RS., Her C., Nelson DL., Hammarström L., Gilkeson

- GS., Behrens TW. Role for Msh5 in the regulation of Ig class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(17):7193-8.
- [186] Arason GJ., Jorgensen GH., Ludviksson BR. Primary Immunodeficiency and Autoimmunity: Lessons From Human Diseases. *Scand J Immunol*. 2010; 71:317-328.
- [187] Wang N., Shen N., Vyse TJ., Anand V., Gunnarson I., Sturfelt G., Rantapää-Dahlqvist S., Elvin K., Truedsson L., Andersson BA., Dahle C., Ortqvist E., Gregersen PK., Behrens TW., Hammarström L. Selective IgA deficiency in autoimmune diseases. *Mol Med*. 2011; 17(11-12):1383-96.
- [188] Gathmann B., Binder N., Ehl S., Kindle G. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: update 2011. *Clin Exp Immunol*. 2012; 167(3):479-91.
- [189] Johnson ML., Keeton LG., Zhu ZB., Volanakis JE., Cooper MD., Schroeder HW Jr. Age-related changes in serum immunoglobulins in patients with familial IgA deficiency and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol*. 1997;108(3):477-483.
- [190] Yel L. Selective IgA Deficiency. *J Clin Immunol*. 2010; 30:10-16.
- [191] Waldrep ML., Zhuang Y., Schroeder Jr HW. Analysis of TACI mutations in CVID & RESPI patients who have inherited HLA B*44 or HLA*B8. *BMC Medical Genetics*. 2009; 10(100):1-5.
- [192] Vorechovsky I., Cullen M., Carrington M., Hammarström L., Webster AD. Fine mapping of IGAD1 in IgA deficiency and common variable immunodeficiency: identification and characterization of haplotypes shared by affected members of 101 multiple-case families. *J Immunol*. 2000; 164:4408-4416.
- [193] Lilic D., Sewell WA. IgA deficiency: what we should-or should not-be doing. *J Clin Pathol*. 2001; 54:337-338.
- [194] Espanol T., Catala M., Hernandez M., Caragol I., Bertran JM. Development of a common variable immunodeficiency in IgA deficient patients. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996; 80:333-335.
- [195] Kowalczyk D. Cytokines in children with immunodeficiencies. *Folia Med Cracov*. 1999; 40(1-2):5-97.
- [196] S´anchez-Ramón S., Radigan L., Yu JE., Bard S., Cunningham-Rundles C. Memory B cells in common variable immunodeficiency: clinical associations and sex differences. *Clin Immunol*. 2008; 128:314-21.
- [197] Wolpert J., Knutsen AP. Natural history of selective antibody deficiency to bacterial polysaccharide antigens in children. *Pediatr Asthma, Allergy, Immunol*. 1998; 12:183-191.
- [198] Goldacker S., Draeger R., Warnatz K., Huzly D., Salzer U., Thiel J., Eibel H., Schlesier M., Peter HH. Active vaccination in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Immunol*. 2007; 124:294-303.
- [199] Chapel H. Classification of primary immunodeficiency diseases by the International Union of Immunological Societies (IUIS) Expert Committee on Primary Immunodeficiency 2011. *Clin Exp Immunol*. 2012; 168(1):58-9.

- [200] Pan XD., Mao YQ., Zhu LJ., Li J, Xie Y., Wang L., Zhang GB. Changes of regulatory T cells and FoxP3 gene expression in the aging process and its relationship with lung tumors in humans and mice. *Chin Med J (Engl)*. 2012; 125(11):2004-11.
- [201] Lu SL., Zhang WC., Akiyama Y., Nomizu T., Yuasa Y. Genomic structure of the transforming growth factor beta type II receptor gene and its mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Cancer Res*. 1996; 56(20):4595-8.
- [202] Santiago-Sim T., Mathew-Joseph S., Pannu H., Milewicz DM., Seidman CE., Seidman JG., Kim DH. Sequencing of TGF-beta pathway genes in familial cases of intracranial aneurysm. *Stroke* 2009; 40(5):1604-11.
- [203] McKnight AJ., Savage DA., Patterson CC., Sadlier D., Maxwell AP. Resequencing of genes for transforming growth factor beta1 (*TGFB1*) type 1 and 2 receptors (*TGFB1*, *TGFB2*), and association analysis of variants with diabetic nephropathy. *BMC Med Genet*. 2007; 8:5.
- [204] 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; 51:61-70.
- [205] Ozen A., Baris S., Karakoc-Aydiner E., Ozdemir C., Bahceciler NN., Barlan IB. Outcome of hypogammaglobulinemia in children: Immunoglobulin levels as predictors. *Clin Immunol*. 2010; 137:374-383.
- [206] Keles S., Artac H., Kara R., Gokturk B., Ozen A., Reisli I. Transient hypogammaglobulinemia and unclassified hypogammaglobulinemia: “Similarities and differences”. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010; 21:843-851.
- [207] Boyer O., Saadoun D., Abriol J., Dodille M., Piette J.C., Cacoub P., Klatzmann D. CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood* 2004; 103:3428-3430.
- [208] Morgan ME., Suttmuller RP., Witteveen HJ., van Duivenvoorde LM., Zanelli E., Melief CJ., Snijders A., Offringa R., de Vries RR., Toes RE. CD25⁺ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003; 48:1452-60.
- [209] Balandina A., Lecart S., Darteville P., Saoudi A., Berrih-Aknin S. Functional defect of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood* 2005; 105:735-41.
- [210] Mqadmi A., Zheng X., Yazdanbakhsh K. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control induction of autoimmune hemolytic anemia. *Blood* 2005; 105:3746-48.
- [211] Bystry RS., Aluvihare V., Welch KA., Kallikourdis M., Betz AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol*. 2001; 2(12):1126-32.
- [212] Seo SJ., Fields ML., Buckler JL., Reed AJ., Mandik-Nayak L., Nish SA., Noelle RJ., Turka LA., Finkelman FD., Caton AJ., Erikson J. The impact of T helper and T regulatory cells on the regulation of anti-double-stranded DNA B cells. *Immunity* 2002; 16(4):535-46.
- [213] Lim HW., Hillsamer P., Kim CH. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. *J Clin Invest*. 2004; 114(11):1640-9.

- [214] Curotto de Lafaille MA., Lafaille JJ. CD4⁺ regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol.* 2002; 14:771-778.
- [215] Soheili H., Abolhassani H., Arandi N., Khazaei HA., Shahinpour S., Hirbod-Mobarakeh A., Rezaei N., Aghamohammadi A. Evaluation of natural regulatory T cells in subjects with selective IgA deficiency: from senior idea to novel opportunities. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013; 160(2):208-14.
- [216] Wiedro K., Stachowska E., Chlubek D. Łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (RT-PCR). *Ann Acad Med Stetin.* 2007; 53(3):5-9.
- [217] Studzińska A., Tyburski J., Dąca P., Tretyn A. PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategie monitorowania przebiegu reakcji. *Biotechnologia* 2008; 1(80):71-85.
- [218] Livak KJ., Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25:402-408.
- [219] Romanowski T., Markiewicz A., Bednarz N., Bielawski KP. Geny metabolizmu podstawowego jako geny referencyjne w ilościowym oznaczaniu ekspresji genów metodą real-time PCR. *Postepy Hig Med Dosw.* 2007; 28(61):500-510.
- [220] Wyczałkowska-Tomasik A., Zegarska J. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym - zastosowanie w badaniach naukowych i diagnostyce medycznej. *Przegl Lek.* 2009; 66(4):209-212.
- [221] Duan W., So T., Mehta AK., Choi H., Croft M. Inducible CD4⁺LAP⁺Foxp3⁺ regulatory T cells suppress allergic inflammation. *J Immunol.* 2011; 187(12):6499-507.
- [222] Huter EN., Punkosdy GA., Glass DD., Cheng LI., Ward JM., Shevach EM. TGF-beta-induced Foxp3⁺ regulatory T cells rescue scurfy mice. *Eur J Immunol.* 2008; 38(7):1814-21.
- [223] Chen ZF., Xu Q., Ding JB., Zhang Y., Du R., Ding Y. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T_{reg} and TGF-beta play important roles in pathogenesis of Uyghur cervical carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2012; 33(5):502-7.
- [224] George J., Schwartzberg S., Medvedovsky D., Jonas M., Charach G., Afek A., Shamiss A. Regulatory T cells and IL-10 levels are reduced in patients with vulnerable coronary plaques. *Atherosclerosis* 2012; 222(2):519-23.
- [225] Liu CZ., Zhang L., Chang XH., Cheng YX., Cheng HY., Ye X., Fu TY., Chen J., Cui H. Overexpression and immunosuppressive functions of transforming growth factor 1, vascular endothelial growth factor and interleukin-10 in epithelial ovarian cancer. *Chin J Cancer Res.* 2012; 24(2):130-7.
- [226] Wu H., Li P., Shao N., Ma J., Ji M., Sun X., Ma D., Ji C. Aberrant expression of T_{reg}-associated cytokine IL-35 along with IL-10 and TGF-β in acute myeloid leukemia. *Oncol Lett.* 2012; 3(5):1119-1123.
- [227] Geng L., Deng J., Jiang G., Song P., Wang Z., Jiang Z., Zhang M., Zheng S. B7-H1 up-regulated expression in human hepatocellular carcinoma tissue: correlation with tumor interleukin-10 levels. *Hepatogastroenterology* 2011; 58(107-108):960-4.
- [228] Holm AM., Aukrust P., Damås JK., Müller F., Halvorsen B., Frøland SS. Abnormal interleukin-7 function in common variable immunodeficiency. *Blood* 2005; 105(7):2887-90.
- [229] Defrance T., Vanbervliet B., Brière F., Durand I., Rousset F., Banchereau J. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-

- activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med.* 1992; 175(3):671-82.
- [230] Rousset F., Garcia E., Banchereau J. Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen. *J Exp Med.* 1991; 173(3):705-10.
- [231] Kitani A., Strober W. Differential regulation of C alpha 1 and C alpha 2 germ-line and mature mRNA transcripts in human peripheral blood B cells. *J Immunol.* 1994; 153(4):1466-77.
- [232] McIntyre TM., Kehry MR., Snapper CM. Novel in vitro model for high-rate IgA class switching. *J Immunol.* 1995; 154(7):3156-61.
- [233] Sabat R., Grütz G., Warszawska K., Kirsch S., Witte E., Wolk K., Geginat J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010; 21(5):331-44.
- [234] Rousset F., Garcia E., Defrance T., Péronne C., Vezzio N., Hsu DH., Kastelein R., Moore KW., Banchereau J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(5):1890-3.
- [235] Itoh K., Hirohata S. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Immunol.* 1995; 154(9):4341-50.
- [236] Wanidworanun C., Strober W. Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *J Immunol.* 1993; 151(12):6853-61.
- [237] van der Poll T., Jansen J., Levi M., ten Cate H., ten Cate JW., van Deventer SJ. Regulation of interleukin 10 release by tumor necrosis factor in humans and chimpanzees. *J Exp Med.* 1994; 180(5):1985-8.
- [238] Iwasaki Y., Fujio K., Okamura T., Yanai A., Yamamoto K. Toward therapeutic application of IL-10-producing regulatory T cells. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 2013; 36(1):40-6.
- [239] Mohri D., Asaoka Y., Ijichi H., Miyabayashi K., Kudo Y., Seto M., Ohta M., Tada M., Tanaka Y., Ikenoue T., Tateishi K., Isayama H., Kanai F., Fukushima N., Tada M., Kawabe T., Omata M., Koike K. Different subtypes of intraductal papillary mucinous neoplasm in the pancreas have distinct pathways to pancreatic cancer progression. *J Gastroenterol.* 2012; 47(2):203-13.
- [240] D'Inzeo S., Nicolussi A., Donini CF., Zani M., Mancini P., Nardi F., Coppa A. A novel human Smad4 mutation is involved in papillary thyroid carcinoma progression. *Endocr Relat Cancer.* 2012; 19(1):39-55.
- [241] Lampropoulos P., Zizi-Sermpetzoglou A., Rizos S., Kostakis A., Nikiteas N., Papavassiliou AG. TGF-beta signalling in colon carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2012; 314(1):1-7.
- [242] Antony ML., Nair R., Sebastian P., Karunakaran D. Changes in expression, and/or mutations in TGF-beta receptors (TGF-beta RI and TGF-beta RII) and Smad 4 in human ovarian tumors. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010; 136(3):351-61.
- [243] Eloy C., Santos J., Cameselle-Teijeiro J., Soares P., Sobrinho-Simões M. TGF-beta/Smad pathway and BRAF mutation play different roles in circumscribed and infiltrative papillary thyroid carcinoma. *Virchows Arch.* 2012; 460(6):587-600.

- [244] Chen T., de Vries EGE., Hollema H., Yegen HA., Vellucci VF., Strickler HD., Hildesheim A., Reiss M. Structural alterations of Transforming Growth Factor- β Receptor genes in human cervical carcinoma. *Int J Cancer* 1999; 82:43-51.
- [245] Disabella E., Grasso M., Marziliano N., Ansaldi S., Lucchelli C., Porcu E., Tagliani M., Pilotto A., Diegoli M., Lanzarini L., Malattia C., Pelliccia A., Ficcadenti A., Gabrielli O., Arbustini E. Two novel and one known mutation of the *TGFBR2* gene in Marfan syndrome not associated with *FBN1* gene defects. *Eur J Hum Genet*. 2006; 14(1):34-8.
- [246] Iikuni N., Lourenço EV., Hahn BH., La Cava A. Cutting edge: Regulatory T cells directly suppress B cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2009; 183(3):1518-22.
- [247] Lim HW., Hillsamer P., Banham AH., Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol*. 2005; 175(7):4180-3.
- [248] Moschese V., Graziani S., Avanzini MA., Carsetti R., Marconi M., La Rocca M., Chini L., Pignata C., Soresina AR., Consolini R., Bossi G., Trizzino A., Martino S., Cardinale F., Bertolini P., Marseglia GL., Zecca M., Di Cesare S., Quinti I., Rondelli R., Pietrogrande MC., Rossi P., Plebani A. A prospective study on children with initial diagnosis of transient hypogammaglobulinemia of infancy: results from the Italian Primary Immunodeficiency Network. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008; 21(2):343-52.
- [249] Artac H., Kara R., Gokturk B., Reisli I. Reduced CD19 expression and decreased memory B cell numbers in transient hypogammaglobulinemia of infancy. *Clin Exp Med*. 2012.
- [250] 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):237-43.
- [251] Qian JH., Zhu JX., Zhu XD., Chen TX. Clinical features and follow-up of Chinese patients with symptomatic hypogammaglobulinemia in infancy. *Chin Med J (Engl)*. 2009; 122(16):1877-83.
- [252] Ephrem A., Chamat S., Miquel C., Fisson S., Mouthon L., Caligiuri G., Delignat S., Elluru S., Bayry J., Lacroix-Desmazes S., Cohen JL., Salomon BL., Kazatchkine MD., Kaveri SV., Misra N. Expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* 2008; 111(2):715-22.
- [253] Tsurikisawa N., Saito H., Oshikata C., Tsuburai T., Akiyama K. High-dose intravenous immunoglobulin treatment increases regulatory T cells in patients with eosinophilic granulomatosis with polyangiitis. *J Rheumatol*. 2012; 39(5):1019-25.
- [254] Bayry J., Mouthon L., Kaveri SV. Intravenous immunoglobulin expands regulatory T cells in autoimmune rheumatic disease. *J Rheumatol*. 2012; 39(2):450-1.
- [255] Massoud AH., Guay J., Shalaby KH., Bjur E., Ablona A., Chan D., Nouhi Y., McCusker CT., Mourad MW., Piccirillo CA., Mazer BD. Intravenous immunoglobulin attenuates airway inflammation through induction of forkhead box protein 3-positive regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 129(6):1656-65.
- [256] Kessel A., Ammuri H., Peri R., Pavlotzky ER, Blank M, Shoenfeld Y, Toubi E. Intravenous immunoglobulin therapy affects T regulatory cells by increasing their suppressive function. *J Immunol*. 2007; 179(8):5571-5.

- [257] Olivito B., Taddio A., Simonini G., Massai C., Ciullini S., Gambineri E., de Martino M., Azzari C., Cimaz R. Defective FOXP3 expression in patients with acute Kawasaki disease and restoration by intravenous immunoglobulin therapy. *Clin Exp Rheumatol.* 2010; 28(1 Suppl 57):93-7.
- [258] Tha-In T., Metselaar HJ., Bushell AR., Kwekkeboom J., Wood KJ. Intravenous immunoglobulins promote skin allograft acceptance by triggering functional activation of CD4+Foxp3+ T cells. *Transplantation* 2010; 89(12):1446-55.
- [259] Maddur M.S, Othy S., Hegde P., Vani J., Lacroix-Desmazes S., Bayry J., Kaveri SV. Immunomodulation by intravenous immunoglobulin: role of regulatory T cells. *J Clin Immunol.* 2010; 30(Suppl 1):S4-8.