

Joanna Prusinowska

**Charakterystyka immunofenotypu oraz funkcji komórek
jednojądrzastych odporności wrodzonej u dzieci z przewlekłym
wirusowym zapaleniem wątroby typu C**

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Praca realizowana w Klinice Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik Kliniki: Prof. zw. dr hab. n. med. Wojciech Służewski

Pod kierunkiem promotora: Prof. dr hab. n. med. Iwony Mozer-Lisewskiej

Z Kliniki Chorób Zakaźnych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w
Poznaniu

Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. n. med. Iwona Mozer-Lisewska

Poznań 2013

Pragnę serdecznie podziękować promotorowi pracy

Pani Prof. dr hab. n. med. Iwonie Mozer-Lisewskiej

za okazaną pomoc i cenne uwagi, bez których praca ta nie powstałaby

Panu Prof. zw. dr hab. n. med. Wojciechowi Służewskiemu

*oraz wszystkim **Współpracownikom***

z Kliniki Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Uniwersytetu

Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

za wsparcie i życzliwość w trakcie realizacji pracy

*Pracę dedykuję mojej **Rodzinie***

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów stosowanych w pracy.....	5
1. WSTĘP.....	8
1.1 Epidemiologia zakażenia wirusowym zapaleniem wątroby typu C.....	8
1.2 Biologia HCV.....	9
1.3 Drogi przenoszenia oraz naturalny przebieg zakażenia HCV.....	11
1.4 Odrębności zakażenia HCV.....	14
1.5 Możliwości terapii PWZW C u dzieci.....	15
1.6 Cechy układu odpornościowego u człowieka.....	16
1.7 Wpływ HCV na układ odpornościowy.....	17
1.8 Odpowiedź układu odpornościowego na obecność HCV.....	18
1.9 Rola odporności wrodzonej w zakażeniu HCV.....	20
1.10 Limfocyty krwi obwodowej i jej subpopulacje.....	22
2. CEL PRACY.....	26
3. PACJENCI, MATERIAŁ I METODY.....	27
3.1 Zastosowane metody oceny parametrów klinicznych.....	28
3.2 Zastosowane metody oceny parametrów laboratoryjnych.....	29
3.3 Badanie histopatologiczne bioptatu wątroby.....	31
3.4 Badania immunologiczne.....	31
3.5 Zastosowane metody statystyczne.....	33
4.WYNIKI.....	35
4.1 Wiek i płeć pacjentów.....	35
4.2 Dane epidemiologiczne.....	35
4.3 Badania laboratoryjne.....	36
4.4 Analiza wybranych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej	40
4.4.1 Analiza immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem płci	
pacjentów w obu grupach.....	43

4.4.2 Analiza immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV w grupie badanej.....	52
4.4.3 Analiza immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem wysokości wirerii HCV u pacjentów z grupy badanej.....	56
4.4.4 Analiza immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem wartości aminotransferaz u pacjentów z grupy badanej.....	61
4.4.5 Analiza immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem przebytego leczenia przeciwwirusowego pacjentów z grupy badanej.....	65
4.4.6 Analiza immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem efektów leczenia przeciwwirusowego pacjentów z grupy badanej.....	70
4.4.7 Analiza immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności innych chorób dodatkowych.....	74
4.4.8 Analiza immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autoprzeciwciał.....	79
 5. DYSKUSJA.....	 84
 6. WNIOSKI.....	 90
 7. PIŚMIENNICTWO.....	 91
 8. SPIS RYCIN.....	 104
 9. SPIS TABEL.....	 110
 10. STRESZCZENIE.....	 112
 11. SUMMARY.....	 115

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

AIDS - ang. *Acquired Immunodeficiency Syndrome* – zespół nabytego niedoboru odporności

ALB - albuminy

ALT - ang. *alanine aminotransferase* – aminotransferaza alaninowa

ALP – fosfataza zasadowa

AMA - ang. *antimitochondrial antibodies* – przeciwciała przeciwmitochondrialne

ANA - ang. *anti-nuclear antibodies* – przeciwciała przeciwjądrowe

Anty-LKM 1 - ang. *anti-liver-kidney microsomal antibodies* – przeciwciała przeciw mikrosomom wątroby i nerek typu 1

ASMA - ang. *anti-smooth muscle antibodies* – przeciwciała przeciw mięśniom gładkim

AST- ang. *asparagine aminotransferase*- aminotransferaza asparaginowa

APC – ang. *antigen presenting cell* – komórka prezentująca antygen

BOC - boceprewir

CD – ang. *clusters of differentiation* – kompleks różnicowania

CMV – ang. *cytomegalovirus* - cytomegalowirus

CTL – ang. *cytotoxic T lymphocyte* – limfocyt T cytotoksyczny

CTLA-4 – ang. *cytotoxic T lymphocyte antigen 4* – antygen 4 limfocytów T cytotoksycznych

EBV – ang.- *Epstein-Barr virus* – wirus Epsteina-Barr

ELISA – ang. *enzyme-linked immunosorbent assay* - reakcja immunoenzymatyczna

Fe – żelazo

FoxP3 – ang.- *forkhead box protein P3*- białko

GGB – gammaglobuliny

GGTP – gammaglutamylotranspeptydaza

GM – CSF – ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*- czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów I makrofagów

gpE1/E2 – ang. *envelope protein E1/E2* – glikoproteina otoczkowa E1/E2

HAV – ang. *hepatitis A virus* – wirus zapalenia wątroby typu A

HBV – ang. *hepatitis B virus* – wirus zapalenia wątroby typu B

HCV – ang. *hepatitis C virus* – wirus zapalenia wątroby typu C

HCV-RNA – kwas rybonukleinowy HCV

HGB – hemoglobina

HIV – ang. *human immunodeficiency virus* – ludzki wirus upośledzenia odporności

HSC – ang. *hepatic stellate cells* – komórki gwiaździste

HVR-1- ang. *hypervariable region 1* – region hiperzmienny 1

IFN – interferon

IL – interleukina

LPR –ang. *leucine-rich repeats* – fragmenty bogate w powtórzenia

M – mediana

MHC – ang. *major histocompatibility complex* – kompleks zgodności tkankowej

NK – ang. *natural killers* – komórki „naturalni zabójcy”

NKT – ang. *natural killer T – cells* – limfocyty T „naturalni zabójcy”

NLR – ang. *Nod-like receptors* – receptory Nod-podobne

NS – ang. *nonstructural protein* – białko niestrukturalne

ORF – ang. *open reading frame* – otwarta ramka odczytu

PAMP's – ang. *patogen associated molecular patterns*- struktury związane z patogenami

PCR – ang. *polymerase chain reaction*- polimerazowa reakcja łańcuchowa

PegIFN – interferon pegylowany

PLT – płytki krwi

PT – wskaźnik protrombinowy

PRR – ang. *pattern recognition receptor* – receptor rozpoznający wzorce molekularne

PWZW C – przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C

RBV- rybawiryna

RBC – ang. *red blood cells* - erytrocyty

RIG – ang. *Rig-like receptors* – receptory Rig-podobne

SD – ang. *standard deviation* – odchylenie standardowe

SVR – ang. *sustained virological response*- trwała odpowiedź wirusologiczna

TBIL – bilirubina całkowita

TCR – ang. *T-cell receptor*- receptor limfocytów T

TGF-beta 1- ang. *transforming growth factor-beta 1*- transformujący czynnik wzrostu beta 1

Th – ang. *T helpers* – limfocyty T pomocnicze

TLR – ang. *Toll-like receptor* – receptor Toll-podobny

TNF alfa – ang. *tumor necrosis factor alfa* – czynnik martwicy guza alfa

TReg – ang. *T regulatory* – limfocyty T regulatorowe

TVR - telaprewir

UTR – ang. *untranslated region*- sekwencja niekodująca

WBC – ang. *white blood cells*- leukocyty

WZW C – wirusowe zapalenie wątroby typu C

1. WSTĘP

1.1 Epidemiologia zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C

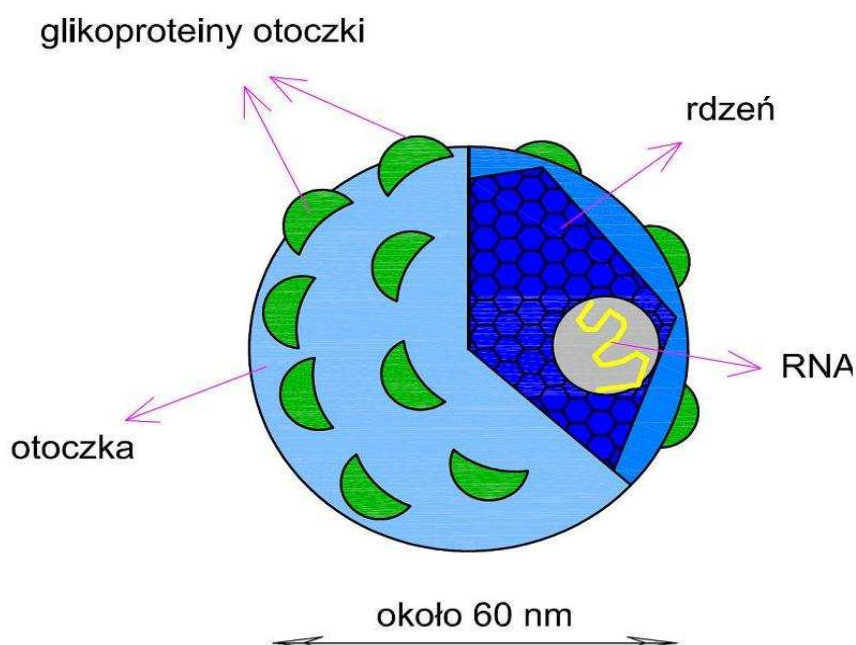
Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C (PWZW C) jest ważnym problemem zdrowotnym o stale rosnącym znaczeniu na świecie nie tylko u dorosłych, ale również u dzieci. Wirus zapalenia wątroby typu C - HCV (ang. *Hepatitis C Virus*) został zidentyfikowany dopiero w 1989 roku, choć znacznie wcześniej podejrzewano istnienie innego czynnika niż znane dotąd wirusy: zapalenia wątroby typu A – HAV (ang. *Hepatitis A Virus*) i zapalenia wątroby typu B - HBV (ang. *Hepatitis B Virus*). Na jego obecność wskazywały obserwacje kliniczne jak i doświadczenia na zwierzętach [1]. Stosowano wówczas powszechnie określenie zapalenie wątroby nie-A-nie-B (ang. *non A non B hepatitis*). HCV ewoluował w ciągu kilku tysięcy lat w ścisłym związku z gatunkiem ludzkim. Obecnie stwierdza się stały wzrost częstości występowania PWZW C oraz marskości i pierwotnego raka wątroby jako odległych następstw zakażeń HCV. Dane epidemiologiczne wskazują, że liczba ludzi zakażonych HCV na świecie wynosi ok. 170 mln (3% populacji). Co roku infekcji tej ulega kolejnych 3-4 mln ludzi. Najwięcej osób zakażonych - powyżej 10% stwierdza się w niektórych regionach Afryki, Azji i Ameryki Południowej, w Egipcie stanowią nawet 14,5% populacji kraju [2]. W Stanach Zjednoczonych liczbę zakażonych HCV określa się na 1,3% populacji, co odpowiada około 3,2 mln ludzi. Dane dotyczące populacji dziecięcej wskazują na występowanie HCV u 0,2% w grupie 6 do 12 lat i 0,4% w grupie od 12 do 19 lat [3]. W Polsce liczba nosicieli HCV szacowana jest na około 700 tysięcy. W 2010 zarejestrowano 2021 przypadków zachorowań na wirusowe zapalenie wątroby typu C – WZW C, w tym 38 (1,9% w skali kraju) było wywołanych przez zakażenia mieszane HCV i HBV, zapadalność wynosiła 5,29 i pozostała na poziomie podobnym jak w 2009 r. (5,08) z niewielką tendencją wzrostową (o 4%). Nowo wykrytych zachorowań w 2010 roku stwierdzono o 17% więcej niż w roku poprzednim [4]. W 2009 zapadalność była o 17,6% niższa od notowanej w 2008 roku i o prawie 30% niższa od średniej za lata 2003-2007. Odsetek wykrywanych zakażeń mieszanych wykazuje tendencję spadkową, od 1999 do 2010 roku odnotowano ponad 4-krotny spadek tego wskaźnika (z 7,6% w 1999 r. do 1,9% w 2006 r.). Potwierdza to odmienną ewolucję sytuacji epidemiologicznej wirusowego zapalenia wątroby typu B - WZW B i WZW C [5]. W poszczególnych regionach Polski zapadalność na WZW C kształtuje się różnie. Najwięcej

zachorowań w poprzednich latach zanotowano w województwach świętokrzyskim, łódzkim, wielkopolskim i dolnośląskim. W ciągu ostatnich lat w województwach lubuskim, opolskim i warmińsko-mazurskim zanotowano tendencję wzrostową. Podobnie jak w latach ubiegłych zapadalność na WZW C w Polsce była ponad dwukrotnie wyższa w miastach niż na wsi (odpowiednio 6,61 i 3,23) a także była wyższa wśród mężczyzn niż kobiet (6,09 i 4,55). Zarówno wśród mężczyzn, jak i kobiet największa zapadalność oraz najwięcej zachorowań odnotowano w grupie wiekowej 50-54 lata. W porównaniu do 2009r. zapadalność wśród dorosłych w wieku 35-54 lata wzrosła 19%, przy czym w większym stopniu dotyczyła mężczyzn niż kobiet (o odpowiednio 28% i 9%) oraz mieszkańców wsi niż miast (o odpowiednio 44% i 12%). Ze względu na początkowo bezobjawowy przebieg infekcji większość zakażonych nie jest świadoma swojej choroby. Podawane dane epidemiologiczne mają więc wyłącznie charakter szacunkowy.

1.2 Biologia HCV

HCV jest małym wirusem otoczkowym, zaliczanym na podstawie molekularnej organizacji genomu, uporządkowania genów oraz homologii RNA do rodziny *Flaviviridae*. Cząstka wirusa jest okrągłą strukturą o gęstości 1,14-1,16 g/ml. Kapsyd ma budowę ikosaedralną o średnicy około 30-35 nm, zbudowany z licznych kopii tego samego białka p21. Otoczka wirusa składa się z krótkich wyrostków złożonych z dwóch glikoprotein (E1 lub gp31 i E2 lub gp68-72), a także lipidów pochodzących z komórki gospodarza. Genom wirusa jednoniciowy, dodatnio-spolaryzowany, niepodzielony na segmenty RNA, zbudowany z około 9500 nukleotydów. HCV łączy również z rodziną *Flaviviridae* uderzające podobieństwo profili hydrofobowych [6]. Większą jego część stanowi pojedyncza długa ramka odczytu - ORF (ang. *open reading frame*) kodująca prekursorową poliproteinę złożoną z 3010-3011 aminokwasów, składających się na około 10 białek. Po obu końcach genomu w końcach 5' i 3', podobnie jak u innych wirusów RNA występują sekwencje niekodujące - UTR (ang. *untranslated region*), nie podlegające procesowi translacji. Są one niezbędne do prawidłowej replikacji i translacji białek wirusa [7,8]. Proces replikacji zachodzi całkowicie w błonowych strukturach komórki i wszystkie białka wirusowe powstające z prekursorowej poliproteiny są zasocjowane bezpośrednio lub pośrednio z błoną retikulum endoplazmatycznego [9]. Prekursorowa poliproteina ulega pofragmentowaniu dzięki proteazom kodowanym przez wirusa i komórkę gospodarza, tworząc białka strukturalne i niestrukturalne. Do białek strukturalnych należą: białko rdzenia (ang. *protein core*)

stanowiący główny składnik nukleokapsydu, glikoproteiny otoczki E1/E2 (ang. *envelope protein*) oraz białko p7 o dotąd niepoznanej funkcji. Białka niestrukturalne (ang. *nonstructural protein*) to: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B [10]. Białko rdzenia jest fosfoproteina wiążącą RNA, wpływa na procesy metaboliczne zakażonej komórki, wykazano też jego właściwości onkogenne. Białka otoczki E1 i E2, które są glikoproteinami tworzą stabilny heterodimer. Przy N końcu białka E2 znajduje się wysoce zróżnicowana struktura – region HVR1, który może odgrywać rolę w przewlekaniu się procesu zakażenia HCV. Białko NS2 ma właściwości metaloproteazy i proteazy cysteinowej, wpływa na kształtowanie się miejsca wiązania białek NS2/NS3. Białko NS3 ma zróżnicowaną aktywność enzymatyczną: od N końca wykazuje aktywność proteazy serynowej, przy C-końcu NPT-azy/helikazy niezbędnej do tworzenia w trakcie replikacji struktury drugorzędowej HCV. Białko NS4A uczestniczy w procesie fosforylacji białka NS5A. Białko NS4B uczestniczy w procesie replikacji HCV. NS5A jest wysoce ufosforylowaną proteiną, która pełni funkcję inhibitora komórkowej kinazy białkowej, zależnej od RNA i stymulowanej przez interferon. W ten sposób może hamować mechanizmy obrony przeciwwirusowej, jest więc formą obrony HCV przeciwko mechanizmom immunologicznym gospodarza [11]. NS5B jest RNA – zależną polimerazą RNA. Jego obecność zaobserwowano w cytoplazmie otaczającej jądro komórkowe (Rycina 1)[12,13].



Rycina 1. Model budowy ludzkiego wirusa zapalenia wątroby typu C (wg Clarke B. Molecular virology of hepatitis C virus. J Gen Virol 1997; 78:2397-2410)

Obecnie znanych jest 6 podstawowych genotypów HCV (oznaczonych cyframi arabskimi od 1 do 6). Każdy z nich można podzielić na wiele podtypów, których w sumie jest już około 80. Genotyp jest cechą wirusa nie ulegającą zmianie w trakcie trwania infekcji. Nie wiadomo jednak w jakim stopniu różne genotypy (lub różne warianty tego samego genotypu) mogą ze sobą rekombinować w zakażonym organizmie [14]. W Polsce dominuje genotyp 1b, choć obserwuje się również występowanie genotypu 3 oraz 4 [15]. W populacji dziecięcej występowanie poszczególnych genotypów jest nieco odmienne niż u dorosłych: 1a 51,7%, 1b 45%, 3a 3,3% [16]. Wszystkie obecnie znane genotypy HCV wykazują hepatotropizm i są patogenne. Uważa się, że różnią się one stopniem zakaźności i patogenności, a w konsekwencji tempem progresji do marskości wątroby i ryzykiem rozwoju raka wątrobowokomórkowego. Główną cechą HCV jest heterogeniczność jego genomu. Jednym z procesów wyjaśniających to zjawisko są błędy procesu replikacji. Wirusowa polimeraza RNA nie posiada zdolności naprawiania błędów, które powstają podczas syntezy potomnych cząsteczek RNA. Określona eksperymentalnie częstość mutacji wynosi 10^4 – 10^5 zasad na cykl replikacyjny [17]. Opisano także przebudowę genomu wirusowego w wyniku rekombinacji – decydującej o zmienności genetycznej. Do wymiany fragmentów informacji genetycznej dochodzi w obrębie genomu tego samego wirusa, pomiędzy różnymi szczepami wirusowymi oraz pomiędzy wirusem a komórką gospodarza [18]. Procesy te, jak również odpowiedź immunologiczna gospodarza odpowiedzialne są za fakt, że w zakażonym organizmie jest różnorodna populacja HCV złożona z quasi – gatunków czyli spokrewnionych ze sobą wariantów HCV [19]. Uważa się, że obecność *quasi* – gatunków może być jednym z mechanizmów prowadzących do ominięcia odpowiedzi immunologicznej, powstania odporności na leki oraz niepowodzeniach przy tworzeniu skutecznej szczepionki [20].

1.3 Drogi przenoszenia oraz naturalny przebieg zakażenia HCV

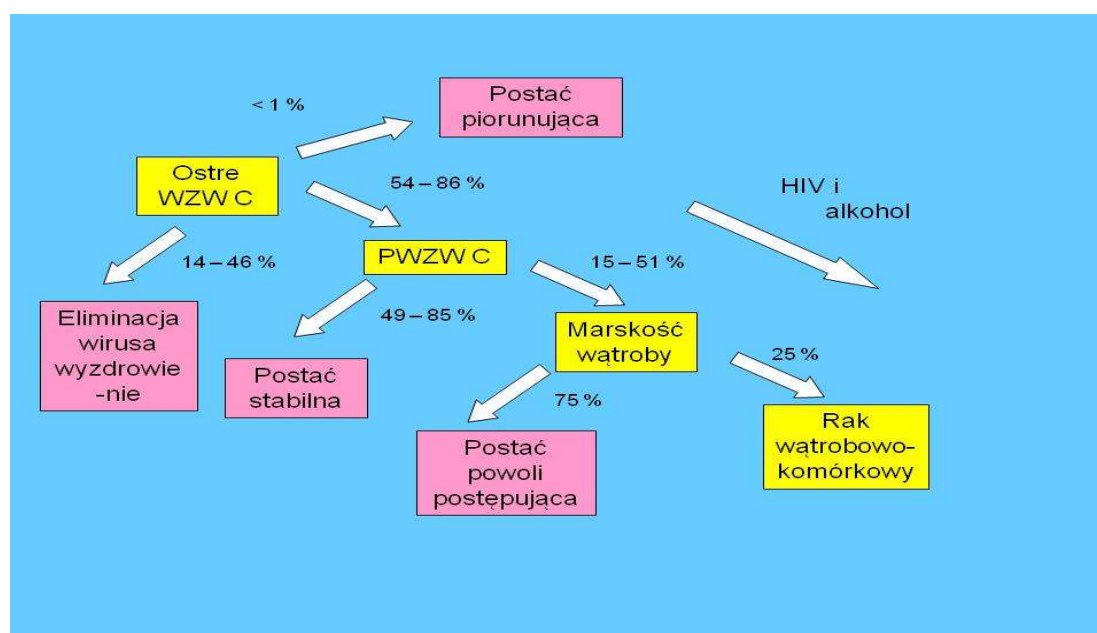
Zakażenie HCV jest przenoszone drogą parenteralną, wertykalną i horyzontalną (Rycina 2). Najczęściej HCV przenosi się w związku ekspozycją uszkodzonej skóry lub błon śluzowych na krew i produkty krwiopochodne. Główne czynniki ryzyka to przetaczanie zakażonej krwi i preparatów krwiopochodnych, przeszczepianie narządów od zakażonych dawców, używanie sprzętu zanieczyszczonego krwią chorego, przypadkowe zakłucia pracowników ochrony zdrowia igłą zanieczyszczoneą krwią chorego, kontakt seksualny z zakażonym partnerem [21]. Do zachowań ryzykownych związanych z możliwością zakażenia

HCV zaliczamy również tatuowanie, przekłuwanie części ciała, stosowanie dożylnych środków odurzających [142]. W populacji dziecięcej największe znaczenie w transmisji HCV ma leczenie preparatami krwio pochodnymi, dializoterapia, zabiegi operacyjne [143]. Obecnie podkreśla się dużą rolę zakażenia odmatczynego jako częstą przyczynę zakażeń HCV u dzieci. Na podstawie obserwacji prowadzonych przez wielu autorów ryzyko wertykalnego zakażenia HCV ocenia się na 5-6% [22,23]. Nie stwierdzono jednak wpływu genotypu wirusa, wiremii matki, sposobu rozwiązania ciąży czy też karmienia piersią na ryzyko przeniesienia zakażenia HCV z matki na dziecko [24]. Do mniej prawdopodobnych dróg zakażenia dziecka należy przeniesienie poziome w rodzinie – głównie od matki czy zakażonego rodzeństwa. Częstość tych zdarzeń znacznie zmniejsza się wraz z przestrzeganiem podstawowych zasad higieny, zabezpieczeniem przed kontaktem z zakażoną krwią (Rycina 2) [143].



Ryc. 2 Drogi przenoszenia zakażenia HCV (wg Alter MJ. Prevention of spread of hepatitis C. Hepatology 2002; 36:93-98)

Przebieg zakażenia HCV u dorosłych jest najczęściej różny od obserwowanego u dzieci i młodzieży – mają na niego wpływ liczne czynniki ryzyka występujące w okresie życia dojrzałego takich jak nadużywanie alkoholu, niewłaściwe odżywianie, przyjmowanie leków hepatotoksycznych. Współistnienie takich infekcji jak ludzkim wirusem upośledzenia odporności HIV (ang. *human immunodeficiency virus*), HBV oraz chorób ogólnoustrojowych jak cukrzyca, dyslipidemie, zaburzenia hormonalne, niewydolność krążenia mogą mieć również istotne znaczenie. Istnieją dowody na szybszą progresję włóknienia u chorych płci męskiej, nadużywających alkoholu i osób powyżej 50 roku życia [25]. Zakażenie HCV ma przebieg najczęściej bezobjawowy. Okres wylęgania wynosi 15-150 dni, średnio 50 dni. Zwiastuny u chorych z postacią klinicznie jawną to głównie objawy dyspeptyczne. U niewielkiego odsetka zakażonych występuje żółtaczka – wg różnych autorów jest to 5-20% [26]. Istnieją doniesienia o sporadycznie występującej ostrej niewydolności wątroby (<1%) [27]. Wyleczeniu samoistnemu ulega 14-46% chorych, a u pozostałych 54-86% zakażenie przechodzi w stan przewlekły [28,144]. Kryterium potwierdzającym przewlekłe zakażenie jest obecność materiału genetycznego HCV w surowicy chorego przez okres dłuższy niż 6 miesięcy. Około 40% zakażonych przez 10 – 20 lat może nie mieć żadnych objawów lub są one słabo zaznaczone. Marskość wątroby rozwija się u 15-20% chorych najczęściej po upływie 20 lat. Pierwotny rak wątroby może wystąpić u części zakażonych po 30 latach (Rycina 3) [29].



Ryc. 3 Przebieg naturalny zakażenia HCV (Wg Maasoumy B, Wedemeyer H Natural history of acute and chronic hepatitis C. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2012; 26:401-12)

1.4 Odrębności zakażenia HCV u dzieci

PWZW C jest istotnym problemem zdrowotnym nie tylko u dorosłych, ale także u dzieci. Doniesienia na temat ewolucji klinicznej tej choroby u dzieci są jednak skąpe. Wiadomo, że postaci ostre WZW C, które u dzieci występują bardzo rzadko, mają u części chorych charakter samoograniczający się, podczas gdy u pozostałych prowadzą do przewlekłej choroby, a w przyszłości do rozwoju marskości, a nawet pierwotnego raka wątroby [30]. Wg wielu autorów do wyzdrowienia i całkowitej samoistnej eliminacji wirusa dochodzi u 14-46%. Istnieją doniesienia, że w populacji dziecięcej zdarza się to nieco częściej niż u dorosłych. Jeśli jednak zakażenie HCV utrzymuje się kilka lat istnieje duże prawdopodobieństwo, że będzie się utrzymywać długoterminowo [31, 144]. Wiele aspektów dotyczących przebiegu zakażenia nie zostało dotąd dokładnie wyjaśnionych. Ze względu na młody wiek pacjenta w momencie zakażenia HCV, przebieg choroby jest długofalowy, najczęściej bezobjawowy, a jego skutki odległe trudne do przewidzenia. Mało charakterystyczny obraz kliniczny wynika z bardzo skąpych dolegliwości subiektywnych dziecka. W przypadku jawnej symptomatologii zakażenie HCV może manifestować się jako ostre WZW C. Objawy kliniczne w ostrej fazie zakażenia jak zażółcenie powłok skórnych i białkówki z odbarwieniem stolca u dzieci stwierdza się bardzo rzadko [32]. U części chorych dzieci przebieg może być agresywny, prowadząc do niewydolności wątroby jeszcze w dzieciństwie. Różne tempo progresji zmian w przebiegu PWZW C przypisuje się wzajemnej interakcji wirusa i komórek zakażonego organizmu. Czynniki wpływające na przebieg kliniczny choroby u dzieci nie zostały dotąd w pełni określone. Szybki rozwój marskości dotyczy prawie wyłącznie dzieci ze współistniejącymi ciężkimi schorzeniami ogólnoustrojowymi lub dzieci po terapii z powodu rozrostowych chorób hematologicznych [33]. U dzieci nieobciążonych żadnymi dodatkowymi schorzeniami, mimo wieloletniego trwania zakażenia, w badaniu histopatologicznym stwierdza się niewielkie nasilenie zmian zapalnych i brak lub niewielkiego stopnia zwłóknienie [34].

1.5 Możliwości terapii PWZW C u dzieci

Celem leczenia PWZW C u dzieci jest uzyskanie trwałej odpowiedzi wirusologicznej (ang. *sustained viral response*- SVR) o czym świadczy ujemny wynik HCV-RNA w surowicy 6 miesięcy po zakończeniu leczenia, a tym samym zmniejszenie zakaźności oraz ryzyka marskości i hepatokarcynogenezy w wieku dorosłym. Schematy leczenia PWZW C zmieniały się na przestrzeni lat. Początkowo stosowano interferon alfa (IFN alfa) w monoterapii, później wprowadzono terapię skojarzoną łącząc IFN alfa z analogiem guanozynowym – rybawiryną (RBV). Od 2000 r. wprowadzono interferon pegylowany (PegIFN). Połączenie białek z glikolem polietylenowym, czyli tzw. pegylacja jest znaną metodą wydłużenia ich okresu półtrwania w ustroju. W przypadku interferonu pozwoliło to na zwiększenie oddziaływania biologicznego tej cytokiny poprzez długotrwałe utrzymywanie stężenia leku na jednakowym poziomie. Poprawia to jego skuteczność terapeutyczną oraz hamuje dynamikę mutacji [35]. Terapia skojarzona PWZW C PegIFN oraz RBV stanowi obecnie standard leczenia na całym świecie, również w Polsce [36]. W przypadku stosowania PegIFN i RBV u dzieci z PWZW C SVR uzyskuje 61-77% chorych, w porównaniu do 47% skuteczności w przypadku klasycznej terapii IFN alfa i RBV [37,149]. Ścisłe stosowanie się do wymogów terapii stanowi bardzo ważny czynnik powodujący wzrost skuteczności leczenia. Do terapii powinni być kwalifikowani chorzy z ostrym i przewlekłym WZW C, wyrównaną marskością wątroby, reaktywacją zakażenia po przeszczepieniu wątroby, jak również schorzeniami pozawątrobowymi wywołanymi HCV. Celem terapii jest zahamowanie oraz cofnięcie się zmian histopatologicznych w wątrobie. Standardem leczenia ostrego WZW C jest monoterapia z zastosowaniem preparatów IFN. Nową alternatywą leczenia osób dorosłych z PWZW C zakażonych genotypem 1 i 4 HCV jest terapia trójlekowa obejmująca PegIFN alfa 2, RBV oraz inhibitory proteazy HCV tj. boceprewir (BOC) lub telaprevir (TVR). Dołączenie do leczenia inhibitorów replikacji HCV znacznie podnosi skuteczność stosowanej dotąd terapii dwulekowej [38,145]. Zakażenia innymi genotypami HCV u dorosłych i wszystkimi genotypami HCV u dzieci (po ukończeniu 3 roku życia) leczymy rutynowo terapią dwulekową. Oznaczenie genotypu HCV oraz wysokości wirerii jest niezbędne przed wyborem schematu leczenia PWZW C. Aktywność ALT pozostaje bez wpływu na decyzję terapeutyczną. Czas terapii uzależniony jest od genotypu HCV zakażonych pacjentów, wartości wirerii przed leczeniem oraz po 4 i 12 tygodniach terapii i może wynosić 16, 24, 36, 48, 72 tygodni [146].

1.6. Cechy układu odpornościowego u człowieka

W trakcie ewolucji rozwinęły się liczne mechanizmy obronne, których celem jest identyfikacja i neutralizacja różnych patogenów. W układzie odpornościowym człowieka rozróżniamy bariery fizyczne i chemiczne tj.: skóra, błony śluzowe, niskie pH żołądka, enzymy wydzielane przez błony śluzowe układu pokarmowego. Ponadto wyróżniamy wrodzone i nabyte mechanizmy odporności, których składowe znajdują się niemal we wszystkich tkankach i narządach [39]. Odporność nabyta cechuje się klonalnością limfocytów B i T powstałą w wyniku przegrupowania genów receptora limfocytów T - TCR (ang. *T Cell Receptor*) i genów immunoglobulinowych [40]. Warunkuje to powstanie dużej swoistości i pamięci immunologicznej. Swoistość i pamięć nabyta w ciągu życia nie jest przekazywana kolejnym pokoleniom. Do składowych odporności nabytej zaliczamy czynniki zdolne w sposób swoisty rozpoznać antygeny różnego rodzaju, większość wytwarzanych przez limfocyty B przeciwciał i większość limfocytów T. Antygeny prezentowane są limfocytom T przez APC (ang. *Antigen Presenting Cells*), które posiadają na swojej powierzchni antygeny kompleksu zgodności tkankowej MHC (ang. *Major Histocompatibility Complex*) klasy I i II. Molekuły MHC II znajdujące się na komórkach warunkują prezentację antygeny limfocytom T pomocniczym. Antygeny zewnątrzkomórkowe np. pochodzenia bakteryjnego są prezentowane przez APC i MHC II limfocytom T helper, które udzielają pomocy limfocytom B w produkcji swoistych przeciwciał (odpowiedź swoista humoralna) lub limfocytom T cytotoksycznym (odpowiedź swoista komórkowa). Antygeny wewnątrzkomórkowe np. własne, wirusowe są prezentowane głównie za pomocą MHC I przez zakażone komórki, co prowadzi do powstania swoistych limfocytów T cytotoksycznych. Znany jest również mechanizm prezentacji krzyżowej antygenów wewnątrzkomórkowych. Odbywa się to za pomocą MHC I przez APC, najczęściej zakażone danym patogenem. Odporność wrodzona, która realizowana jest głównie za pomocą granulocytów, monocytów, makrofagów i części białek surowicy krwi, jest starą ewolucyjnie, a zarazem uniwersalną formą odporności organizmów przeciw patogenom. Badanie ostatnich lat wykazały, że wiele aspektów odporności wrodzonej jest bardzo podobnych między odległymi ewolucyjnie organizmami jak owady i ssaki, nawet między roślinami i zwierzętami [41]. Głównym zadaniem odporności wrodzonej w rozumieniu infekcyjnym jest rozróżnienie charakterystycznych struktur związanych z patogenami PAMPs (ang. *Pathogen Associated Molecular Patterns*). Zadanie to jest wykonywane perfekcyjnie ponieważ nie poznano dotychczas choroby autoimmunizacyjnej spowodowanej przez odporność wrodzoną [42]. Kolejnym zadaniem

odporności wrodzonej jest szybka reakcja na patogen poprzez uruchomienie mechanizmów efektorowych oraz aktywowanie i orientacja odporności nabytej. Odporność wrodzona przekazywana jest kolejnym pokoleniom przez komórki linii zarodkowej, a w ciągu życia człowieka nie nabiera ona większej swoistości ani pamięci immunologicznej. Rozpoznanie PAMPs w organizmie ludzkim realizowane jest głównie przez rodzinę receptorów Toll – podobnych TLRs (ang. *Toll-like Receptors*), które odgrywają zasadniczą rolę w inicjacji odporności wrodzonej przez wzmożenie reakcji zapalnej i pobudzenie wybuchu tlenowego [43]. Reakcja zapalna jest wynikiem syntezy cytokin prozapalnych. Dodatkowo indukowana jest ekspresja cząsteczek kostymulujących i antygenów MHC klasy I i II na komórkach prezentujących antygen, przyspieszone dojrzewanie komórek dendrytycznych, co jest niezbędne do właściwej aktywacji odporności nabytej [44]. Wspomniane mechanizmy współdziałają na różnych etapach w odpowiedzi przeciwko danemu patogenowi lub komórce nowotworowej. Zaburzenia czynności któregośkolwiek z nich może doprowadzić do nieadekwatnej – niewystarczającej lub nadmiernej odpowiedzi immunologicznej, prowadzącej do zjawisk patologicznych. Układ odpornościowy u dzieci wykazuje upośledzenie czynnościowe, jego poszczególne składowe osiągają pełną dojrzałość wraz z wiekiem, co niewątpliwie nie pozostaje bez wpływu na interakcje pomiędzy wirusem a gospodarzem. Manifestuje się to brakiem lub niższą zdolnością do produkcji niektórych cytokin, słabszym działaniem cytotoksycznym komórek, niższym potencjałem czynnościowym układu dopełniacza [45]. Mechanizmy odporności wrodzonej kształtują się wcześnie w przebiegu ontogenezy- noworodek ma większość jej czynników zdolnych do działania. Odporność nabyta tworzy się natomiast później i niektóre jej składowe, jak np. stężenie IgA osiąga wartości dorosłych dopiero u nastolatków. Stąd można przypuszczać, że odporność wrodzona może mieć istotne znaczenie w chorobach infekcyjnych.

1.7 Wpływ HCV na układ odpornościowy

Obecnie mało wiadomo o udziale odporności wrodzonej w PWZW C, zwłaszcza u dzieci. WZW C jest częstą chorobą zakaźną populacji dziecięcej. Jego przebieg najczęściej ma charakter przewlekły, co można tłumaczyć zaburzeniami odporności, także wrodzonej. Wydaje się, że odgrywa ona istotną rolę jako, że układ odpornościowy człowieka, a zwłaszcza odporność nabyta jest niedojrzały i pozostaje w stanie ciągłego rozwoju [46]. Sam wirus posiada również właściwości hamujące odpowiedź immunologiczną. Wykazano, że

białko rdzeniowe HCV odgrywa znaczącą rolę w supresji indukcji limfocytów Th1 poprzez hamowanie syntezy interleukiny 12 (IL-12) i tlenku azotu [47,48]. Mechanizm prowadzący do rozwoju PWZW C budzi wciąż wiele pytań. Jedną z możliwości jest unikanie przez HCV odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Zmienność w obrębie regionu hiperzmiennego HVR-1 (ang. *hypervariable region 1*) powoduje nieefektywne działanie przeciwciał neutralizujących swoistych dla HCV [49]. Ponadto uważa się, że mutacje w epitopach dla cytotoksycznych limfocytów T pozwalają ominąć odpowiedź komórkową [50,51]. Znaczenie ma również niska antygenowość HCV, w wyniku której aktywność cytotoksycznych limfocytów T swoistych dla HCV jest dużo niższa niż komórek swoistych dla HBV [52]. HCV uszkadza również wiele składników odporności wrodzonej – białka otoczki E1, CE1, hamują dojrzewanie komórek dendrytycznych [53]. Komórki te jako komórki prezentujące antygen mogą aktywować naiwne (przed kontaktem z antygenem) limfocyty T. Z kolei białko E2 HCV hamuje kinazę białkową aktywowaną przez dsRNA, co znosi działanie przeciwwirusowe IFN alfa. To samo białko hamuje funkcje komórek „naturalnych zabójców” - NK (ang. *Natural Killers*), jednego z najważniejszych czynników przeciwwirusowych [54,55]. Ponadto białka rdzenia wirusa i NS3 indukują produkcję IL-10, znanej z silnego efektu immunosupresyjnego [56]. Wskazuje to, że HCV w wyniku selekcji wytworzył szereg mechanizmów przeciwko odporności wrodzonej i że odporność ta miała ważne znaczenie protekcyjne wobec niego w przeszłości.

1.8 Odpowiedź układu odpornościowego na obecność HCV

Patogeneza zakażenia HCV jest ściśle związana z odpowiedzią immunologiczną na antygeny wirusa. Peptydy antygenowe wirusa prezentowane limfocytom T CD4⁺ przez komórki prezentujące antygen, powodują stymulację układu immunologicznego, co może zarówno sprzyjać eliminacji zakażonych hepatocytów, jak i powodować degradację niezajętego miąższu wątroby. Pobudzenie układu immunologicznego będące następstwem zakażenia wirusowego powoduje zmiany składu subpopulacji krwinek białych a zwłaszcza limfocytów, co znajduje odbicie w składzie komórkowym krwi obwodowej [57]. Zakażony organizm reaguje na pojawienie się antygenów wirusowych produkcją przeciwciał oraz uczulonych limfocytów T. Obecność wykładników nabytej odporności humoralnej obserwuje się najczęściej po okresie 7-8 tygodni od zakażenia HCV. Rola ochronna tych przeciwciał jest dyskusyjna - ich zdolności neutralizujące wobec HCV są niewielkie. Powstające przeciwciała

mają głównie znaczenie prognostyczne i diagnostyczne, lecz nie odgrywają roli w patogenezie choroby [58]. Zakażenie HCV indukuje również swoistą odpowiedź komórkową poprzez produkcję uczulonych limfocytów T. Mimo, że ich liczba jest niewielka 1-2% [57] uważa się, że odpowiadają one za gromadzenie się nacieków zapalnych w zajętej wątrobie oraz eliminację zakażonych hepatocytów. Uruchomienie mechanizmów odporności komórkowej prowadzi więc do powstania tzw. martwicy kęsowej komórek wątrobowych [59]. Uważa się również, że zaburzenia odporności komórkowej prowadzą do przewlekania się zakażenia HCV. Przyczyną może być pierwotna niewystarczająca odpowiedź limfocytów T CD4+ lub ich „zużycie” [60], upośledzona prezentacja antygeny przez komórki dendrytyczne, supresja limfocytów T, komórek NK i komórek dendrytycznych poprzez białka strukturalne i niestrukturalne HCV. Duże znaczenie przypisuje się też upośledzonemu dojrzewaniu prowadzącemu do nieodpowiedniego efektu cytotoksycznego swoście uczulonych limfocytów T CD8+, supresji efektu cytotoksycznego poprzez regulatorowe limfocyty T CD8+ lub „tolerogenicznego” środowiska wątroby będącego wynikiem działania komórek nabłonkowych zatok wątrobowych, komórek Borowicza-Kupffera, komórek gwiazdzistych i komórek dendrytycznych [61]. Udowodniono również, że żywa odpowiedź subpopulacji Th1 limfocytów CD4 produkujących IFN-gamma zapewnia zanik replikacji HCV, niższą aktywność aminotransferazy alaninowej, a także mniejsze włóknienie w wątrobie. Zmniejszenie puli limfocytów CD4+ u zakażonych HCV niektórzy autorzy wiążą z przyspieszeniem progresji przewlekłego zapalenia wątroby typu C [62]. Istnienie swoistej odporności przeciwwirusowej ma ograniczony wpływ na przebieg zakażenia, choć u niewielkiego odsetka zakażonych HCV dochodzi do eliminacji wirusa. U większości chorych poddanych leczeniu przeciwwirusowemu, u których doszło do serokonwersji serologicznej możliwe jest wykrycie materiału genetycznego wirusa w różnych komórkach organizmu, zwłaszcza makrofagach [63]. Wiele badań potwierdziło związek PWZW C z upośledzeniem odporności komórkowej oraz mutacjami HCV i ucieczką wirusa spod kontroli immunologicznej gospodarza. Dotychczasowe strategie terapeutyczne PWZW C uwzględniają leki o uznanym działaniu immunomodulacyjnym (IFN, RBV). Ze względu jednak na nadal niesatysfakcjonującą skuteczność leczenia, zwłaszcza zakażonych genotypem 1 HCV, poszukiwane są nowe rozwiązania terapeutyczne oparte głównie na oddziaływaniu na mechanizmy odpowiedzi immunologicznej. Sugeruje się również uwzględnienie supresji komórek regulatorowych w strategiach opracowywania szczepionki przeciwko HCV [64].

1.9 Rola odporności wrodzonej w zakażeniu HCV

Ostatnie lata przynoszą coraz więcej informacji na temat odporności wrodzonej i jej zaburzeń w PWZW C u dzieci. Odporność wrodzona obejmuje szeroką gamę czynników zarówno humoralnych, jak i komórkowych. Znacznie starsza od odporności nabytej, choć pozostaje niezależna od antygeny, pozwala na rozpoznanie „swoj”- „obcy” [42]. Jej składowe wspomagają często mechanizmy efektorowe odporności nabytej. W skład czynników odporności wrodzonej wchodzi zarówno elementy humoralne - cytokiny, chemokiny, układ dopełniacza, cząsteczki adhezyjne, jak i komórkowe - NK, limfocyty NKT (ang. *Natural Killers T-cells*), limfocyty z receptorem gamma/delta, monocyty/makrofagi, komórki dendrytyczne i inne. HCV nie wywołuje bezpośredniego efektu cytopatycznego na komórki wątroby. Zmiany patologiczne w tym narządzie są wynikiem aktywacji układu odpornościowego. Nabyta odporność (swoista) może spowodować zarówno eliminację wirusa, jak i uszkodzenie hepatocytów prowadząc do marskości wątroby włącznie. Istnieją dane wskazujące, że odporność nieswoista (wrodzona) może znacznie zredukować wiramię we wczesnych okresach zakażeń HCV, gdy brak jeszcze mechanizmów efektorowych odporności nabytej. Sugeruje to, że odporność wrodzona może mieć istotne znaczenie w patogenezie zapalenia wątroby także w późniejszych okresach PWZW C [147].

W wątrobie występują lub są produkowane liczne czynniki odporności wrodzonej m.in. białka ostrej fazy, cytokiny tj. IL-6, transformujący czynnik wzrostu beta 1 - TGF-beta 1 (ang. *transforming growth factor-beta 1*), czynnik martwicy guza alfa - TNF-alfa (ang. *tumor necrosis factor-alfa*) oraz składowe dopełniacza, makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki NK i NKT. Może to wynikać z faktu, iż wątroba jest narządem narażonym w sposób ciągły na kontakt z antygenami docierającymi przez układ żyły wrotnej. Udowodniono także, że zakażone wirusami hepatocyty produkują czynniki chemotaktyczne powodujące gromadzenie limfocytów T w wątrobie [65]. Występowanie i produkcja czynników odporności wrodzonej w wątrobie pozwalają sądzić, że mogą one mieć istotny wpływ na przebieg procesu chorobowego w tym narządzie. Szczególną rolę przypisuje się cytokinom zwłaszcza IFN gamma, IL-18, IL-10 i TGF - beta. IL-10 wzmacnia replikację wirusów, a TGF-beta stymuluje fibrogenezę w wątrobie [66,67]. O roli cytokin świadczy również fakt, że jednym z głównych czynników stosowanych w terapii zapaleń wątroby jest cytokina – IFN alfa.

Chemokiny są odmianą cytokin biorących udział w gromadzeniu się limfocytów T w mięszu wątroby, powstawaniu nacieków komórkowych oraz inicjowaniu fibrogenezy w pzw [68].

W wątrobie mamy do czynienia z kilkoma subpopulacjami komórek limfoidalnych – limfocyty T z receptorem TCR gamma-delta (rozpoznają i wykonują reakcje cytotoksyczne bez udziału MHC), komórki NK (zabijają komórki zakażone wirusami, a także komórki transformowane w kierunku nowotworzenia, hamowanie ich funkcji przyczynia się do przetrwania wirusa i powstania PWZW [69], komórki NKT (rozpoznają glikolipidy znajdujące się na powierzchni hepatocytów i są zdolne zabijać te komórki). Wszystkie populacje komórek limfoidalnych mają udział w cytotoksyczności skierowanej przeciwko zakażonym i nie zakażonym wirusami hepatocytom. Ponadto gromadzą się one w zakażonej wirusami hepatotropowymi wątrobie. Czynnikiem stymulującym ten proces jest chemokina IP-10 [70].

Ważną populacją komórek biorących udział w odporności wrodzonej są również komórki prezentujące antygen – głównie komórki dendrytyczne. Funkcje APC mogą pełnić aktywowane makrofagi, w tym komórki Browicza-Kupffera w wątrobie. Istnieją przesłanki wskazujące na niską jakość prezentacji antygenów wirusowych jako jedną z przyczyn niepomyślnego przebiegu wirusowych zapaleń wątroby u dzieci [71].

Znacznym osiągnięciem w zrozumieniu odporności wrodzonej było odkrycie receptorów rozpoznających wzorce molekularne - PRR (ang. *Pattern Recognition Receptors*). Receptory te są zdolne rozpoznawać różne molekuły takie jak cukry, złożone lipidy, fragmenty kwasów nukleinowych obecne na różnych drobnoustrojach. Dotychczas zidentyfikowano trzy rodziny receptorów wykrywających patogeny: TLR, receptory NOD-podobne - NLR (ang. *Nod-like receptors*) oraz receptory RIG-podobne - RLR (ang. *Rig-like receptors*). TLR są białkami przezbłonowymi, a także cytoplazmatycznymi, rozpoznającymi cząsteczki patogenów – bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, mykobakterii, wirusów DNA i RNA, grzybów i pierwotniaków, głównie poprzez fragmenty bogate w powtórzenia leucynowe (ang. *leucine-rich repeats* – LRR) w ich domenach zewnątrzkomórkowych. Indukują one następnie ekspresję wielu genów, których produkty wywołują proces zapalny, apoptozę [72] lub odpowiednią odpowiedź immunologiczną konieczną do eliminacji danego patogenu. TLR występują na komórkach układu krwiotwórczego, wykryto je także na komórkach nabłonkowych, zarówno nabłonka pokrywającego, jak i gruczołowego. W wątrobie

stwierdzono obecność 9 z 11 rodzin TLR, co sugeruje ważną rolę tych receptorów jako potencjału obronnego tego narządu. W niektórych chorobach wątroby, jak np. w marskości stwierdzono znaczny wzrost ekspresji TLR2 i TLR4 na komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej [73].

Według ostatnich doniesień zakażenie wirusami hepatotropowymi może prowadzić do istotnych zmian immunofenotypu krwi obwodowej [74]. Zaburzenia odporności u dzieci w WZW C wydają się dotyczyć głównie czynników i mechanizmów odporności wrodzonej. Ponadto udowodniono, że u dzieci z PWZW C, pomimo braku najczęściej objawów klinicznych, dochodzi do pobudzenia układu odpornościowego, czego wyrazem jest wzrost komórek efektorowych o potencjale cytotoksycznym i spadek stosunku limfocytów T CD4:CD8 [65]. Tego rodzaju informacje mogą mieć znaczenie w planowanej terapii przeciwwirusowej.

1.10 Limfocyty krwi obwodowej i jej subpopulacje

Limfocyty T dojrzewają i przechodzą proces różnicowania w grasicy, do której dostają się jako komórki pro-T ze szpiku [75], choć pewna część limfocytów T ma pochodzenie pozagrasicze [76]. Limfocyty T stanowią populację o niejednorodnym immunofenotypie i zróżnicowanych funkcjach, w której zwykle wyróżnia się subpopulacje. Wraz z rozwojem immunologii a także cytometrii przepływowej jako zasadniczej metody badawczej immunofenotypu komórkowego, w ostatnich latach opisano kilka nowych subpopulacji limfocytów T o charakterystycznym immunofenotypie i związanymi z tym funkcjami w procesach odporności komórkowej organizmu. Najwięcej badań dotyczy subpopulacji limfocytów T regulatorowych, które stanowią subpopulację pomocniczych limfocytów T oraz tzw. limfocytów NKT, które wykazują zarówno cechy limfocytów T, jak i komórek NK [77,78].

Komórki T regulatorowe oznaczane CD4+CD25+ (T Reg) odgrywają znaczącą rolę w powstawaniu i utrzymywaniu tolerancji immunologicznej organizmu. Ich niedobór sprzyja powstawaniu zjawisk autoimmunologicznych, a nadmiar zwiększa tolerancję immunologiczną co może sprzyjać hamowaniu odporności przeciwnowotworowej. Stanowią one 5-10% subpopulacji limfocytów T CD4+ i są identyfikowane poprzez ekspresję CD25+ - receptora dla interleukiny 2, cząsteczki CTLA-4 (ang. *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*), a

także wewnątrzkomórkowego czynnika transkrypcyjnego FoxP3 (ang. *forkhead box protein 3*) [77]. Brak tego receptora wg niektórych autorów może przyczynić się do powstawania zjawisk autoimmunologicznych [79]. Limfocyty T Reg powstają w grasicy skąd wędrują do krwi obwodowej, występują też w węzłach limfatycznych oraz krwi pępowinowej, wytwarzają IL-10 oraz czynnik transformujący wzrostu TGF-beta [77]. Mechanizm ich regulacyjnego działania jest niecałkowicie poznany i nie jest ostatecznie ustalone czy Treg regulują liczebność limfocytów T pomocniczych CD4+, czy wpływają tylko na ich aktywność. Według ostatnich danych supresja limfocytów T CD4+ przez limfocyty Treg zachodzi poprzez wewnątrzkomórkowy szlak sygnalizacyjny z udziałem jądrowych czynników transkrypcyjnych w limfocytach CD4+ [80]. Liczebność subpopulacji limfocytów Treg jest regulowana na dwóch etapach - podczas ich powstawania w grasicy, a następnie podczas ich uwalniania do krwi obwodowej. Pula Treg we krwi obwodowej jest kontrolowana przez limfocyty B [81]. Do najistotniejszych procesów w których uczestniczą Treg należą: hamowanie aktywności autoreaktywnych limfocytów T, tolerancja na antygeny podane doustnie, tolerancja na tzw. zmienione ligandy peptydowe, tolerancja na antygeny związane z nowotworem, tolerancja transplantacyjna, ochrona płodu przed odrzuceniem przez układ odpornościowy matki, hamowanie nadmiernej reakcji nadwrażliwości.

Limfocyty NKT stanowią subpopulację, która jest zdolna wytwarzać niemal natychmiast po zadziałaniu czynnika stymulacyjnego wiele cytokin w tym IL-4 i IFN gamma, ale także IL-13, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów - GM-CSF (ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), TNF, limfotoksyny, a więc cytokiny zarówno typu Th1 i Th2. [82]. Choć rola ich nie jest do końca poznana, to wydaje się, że ważną ich funkcją jest immunoregulacja, a zaburzenia ich czynności sprzyjają rozwojowi chorób autoimmunizacyjnych. Komórki NKT o immunofenotypie CD3+CD56+ uczestniczą w reakcjach odporności wrodzonej i wykazują działanie przeciwwirusowe, antybakteryjne, przeciwpasożytnicze oraz przeciwnowotworowe [83]. Szczególną rolę odgrywają komórki NKT w procesach odporności w wątrobie, która jest wyjątkowo bogata w te komórki, szczególnie w zakażeniach pierwotniakowych np. *Leishmania donovani* [84].

Limfocyty T pomocnicze wspomagają odpowiedź typu humoralnego jak i komórkowego zarówno przez kontakt bezpośredni, jak i poprzez wydzielane cytokiny. Ułatwiają one aktywację, proliferację i różnicowanie limfocytów B, prekursorów limfocytów T cytotoksycznych, a także pobudzają makrofagi. Limfocyty Th mają na swojej powierzchni cząsteczki CD4 i rozpoznają antygen prezentowany w połączeniu z cząsteczkami MHC II

oraz obejmują subpopulacje różniące się pod względem czynnościowym, z których dwie zasadnicze to limfocyty Th1 i Th2. Limfocyty Th1 i Th2 zostały najpierw opisane u myszy [85], a w kilka lat później u człowieka [86]. Limfocyty Th1 produkują IL-2 (stymulującą m.in. cytotoxyczność limfocytów), IFN gamma (aktywujący makrofagi), TNF-beta i mają wybitny udział we wspomaganiu odpowiedzi typu komórkowego. Pod względem profilu wydzielanych cytokin limfocyty Th1 przypominają limfocyty T cytotoksyczne CD8+. Limfocyty Th2 wytwarzają interleukiny: 4, 5, 10, 13, będące czynnikami wzrostu i różnicowania limfocytów B i wspomagają głównie odpowiedź humoralną, w szczególności syntezę IgE, IgA i IgG4, stymulują odporność na poziomie błon śluzowo-surowiczych. IL 5 pobudzając różnicowanie i aktywację eozynofiliów sprawia, że do obrazu odpowiedzi immunologicznej mediowanej przez Th2 należy także eozynofilia [87].

Limfocyty cytotoksyczne TcCD8+ określane jako CTL (ang. *cytotoxic T lymphocytes*) zabijają komórki rozpoznając obce (allogeniczne) cząsteczki MHC klasy I lub antygeny obce połączone z własnymi (autogenicznymi) cząsteczkami MHC klasy I. Ich główną rolą jest niszczenie komórek zakażonych przez wirusy i inne mikroorganizmy, a także niszczenie komórek nowotworowych [88]. Profil wydzielanych przez nie cytokin przypomina profil cytokin wydzielanych przez limfocyty Th1. Cytotoksyczne limfocyty T CD4+ rozpoznają antygeny prezentowane przez cząsteczki MHC klasy II. Limfocyty dysponują dwoma zasadniczymi drogami zabijania komórek przez indukcję w nich apoptozy: zależną od uwalniania perforyny, granzymów i granulizyny z ziaren cytolitycznych oraz zależnej od interakcji cząsteczek TNF w błonie komórki efektorowej oraz TNF-R w błonie komórki docelowej. Wszystkie pobudzone limfocyty T mają w swojej błonie cząsteczki Fas (CD95, Apo-1) oraz FasL. Dlatego limfocyty T mogą zabijać „bratobójczo” inne pobudzone limfocyty T i limfocyty B, a nawet zabijać same siebie w następstwie interakcji cząsteczek Fas i FasL w błonie tej samej komórki. Wydaje się, że zjawiska te uczestniczą w eliminacji limfocytów autoreaktywnych, a także ograniczeniu nadmiernej ekspansji limfocytów odpowiadających na antygeny obce [89].

Komórki NK są to duże ziarniste limfocyty, które pełnią funkcje cytotoksyczne oraz immunoregulatorowe [90]. Komórki NK mają zdolność spontanicznego zabijania komórek nowotworowych i zakażonych wirusem, dzięki czemu odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi na nowotwory i infekcje [91]. Są także uważane za elementy łączące procesy odporności wrodzonej i nabytej, w której uczestniczą min. poprzez kontakty z komórkami dendrytycznymi [92]. Populacja komórek NK stanowi 10-15% wszystkich limfocytów krwi obwodowej. Cechą wspólną wszystkich komórek NK jest brak ekspresji molekuly CD3 oraz

ekspresja cząsteczek CD16 i CD 56. W zależności od stopnia ekspresji tych cząsteczek wyróżnia się komórki NK1 i NK2 – różniące się funkcją. Komórki NK posiadają 3 grupy receptorów: z nadrodziny cząsteczek Ig podobnych, występujące u człowieka; receptory lektynowe z grupy CD94/NKG2 – charakterystyczne dla człowieka i gryzoni; receptory lektynowe typu Ly-49- obecne u gryzoni [93]. Reakcja komórki NK jest wynikiem proporcji liczby receptorów stymulujących i inhibitorowych na komórce oraz równowagi pomiędzy aktywnością receptorów o własnościach stymulujących proces cytolizy i hamujących ten proces [94]. Główną rolę w modulacji aktywności NK odgrywa IL-2, która z jednej strony stymuluje proliferację komórek NK, z drugiej wzmacnia aktywność cytotoksyczną. IL-15 jest czynnikiem stymulującym rozwój komórek NK w szpiku i podtrzymującym ich przeżycie w tkankach i narządach. Bezpośrednio hamująco na aktywność NK wpływa prostaglandyna PGE2.

Limfocyty B uczestniczą we wszystkich fazach odpowiedzi nabytej, a część z nich, syntetyzująca autoprzeciwciała naturalne, pełni ważną rolę w odporności wrodzonej. Limfocyty B rozpoznają antygeny w formie natywnej (nieprzetworzonej) używając w tym celu immunoglobuliny Ig związane z błoną komórki, które tworzą receptor powierzchniowy BCR. Limfocyty B syntetyzują również Ig w formie rozpuszczalnej (przeciwciała), które mają taką samą swoistość jak BCR. Na limfocytach występują także cząsteczki zwane antygenami różnicowania należącym do tzw. kompleksu różnicowania – CD (ang. *cluster of differentiation*): CD19, CD20, CD21, CD22, CD32, CD35, CD40, CD72, CD80, CD86. Biorą one udział w regulacji różnych funkcji limfocytów B: ich aktywacji, przekazywaniu sygnałów kostymulujących oraz jako receptory dla białek dopełniacza lub fragmentu Fc Ig [95]. Limfocyty B wytwarzają około 10^{11} przeciwciał o różnej swoistości. Jest to możliwe dzięki szczególnej organizacji genów immunoglobulinowych. [96]. Limfocyty B syntetyzują także liczne cytokiny, które wpływają na ich aktywność i dojrzewanie, aktywują komórki dendrytyczne, ukierunkowują odpowiedź immunologiczną zależną od limfocytów Th1 (np. IFN gamma) lub Th2 (IL-4), a także mają silne działanie chemotaktyczne [97]. Poprzez wydzielane cytokiny (limfotoksynę alfa i beta, TNF alfa) i bezpośrednie oddziaływania z limfocytami T i komórkami dendrytycznymi uczestniczą także w tworzeniu tkanki limfoidalnej we wtórnych narządach limfatycznych, np. w śledzionie [98].

2. CEL PRACY

Podstawowym celem pracy była ocena wybranych elementów odporności wrodzonej u dzieci w PWZW C oraz próba określenia ich roli w patogenezie i ewolucji omawianej choroby.

Realizacja tego zadania wymagała sformułowania celów szczegółowych:

- ustalenia częstości występowania wybranych subpopulacji komórek odporności wrodzonej u badanych dzieci
- określenia zależności między wybranymi elementami odporności wrodzonej a parametrami klinicznymi, przebiegiem zakażenia HCV oraz skutecznością terapii PWZW C w badanej grupie dzieci

3. PACJENCI, MATERIAŁ, METODY

Badaniem objęto 80 dzieci w wieku od 1 do 18 lat hospitalizowanych w Klinice Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego oraz będących pod opieką Poradni Hepatologicznej w Szpitalu Klinicznym im. Karola Jonschera w Poznaniu w latach 2004-2011.

Wyodrębniono 2 grupy pacjentów:

Grupa 1- grupa badana – 50 dzieci z udokumentowanym PWZW C

Grupa 2 – grupa kontrolna – 30 dzieci, u których wykluczono zakażenie HCV

Kryteria kwalifikacji do grup badanych obejmowały:

Grupa 1

Rozpoznanie PWZW C ustalono na podstawie:

- Wywiadu świadczącego o co najmniej półrocznym okresie trwania zakażenia HCV
- Utrzymywania się przeciwciał anty HCV w surowicy krwi przez co najmniej pół roku
- Potwierdzenia obecności HCV-RNA w surowicy metodą RT-PCR z zastosowaniem testów jakościowych (czułość testu 50 IU/ml) i ilościowych (czułość testu 600 IU/ml).
- Analizy parametrów biochemicznych w surowicy (aktywność aminotransferaz) i histopatologicznych (ocena wątroby – materiał pobrany podczas biopsji cienkoigłowej narządu)

Potwierdzenie rozpoznania w badaniu histopatologicznym nie było bezwzględnie wymagany kryterium. Dzieci z grupy badanej, które przebyły leczenie PegIFN i RVB (44 pacjentów) miały pobraną próbkę krwi po zakończonej terapii. U wszystkich chorych z grupy badanej oceniano obecność autoprzeciwciał (panel wątrobowy) oraz analizowano występowanie chorób przewlekłych np. chorób tarczycy, chorób reumatoidalnych, przebytych schorzeń onkologicznych.

Grupa 2

Do grupy kontrolnej zakwalifikowano dzieci, u których wykluczono na podstawie badań serologicznych zakażenie:

- HCV (przeciwciała anty HCV ujemne)
- HBV (antygen HBs ujemny)
- Wirusem cytomegalii (ang. *Cytomegalovirus* – CMV) (przeciwciała anty-CMV IgM, IgG ujemne)
- Wirusem Epsteina – Barr (ang. *Epstein-Barr Virus* – EBV) (przeciwciała anty-EBV IgM, IgG ujemne)

Ponadto u dzieci z grupy kontrolnej nie wykazano zaburzeń parametrów biochemicznych (aktywność aminotransferaz w normie), nie stwierdzono obecności autoprzeciwciał (panel wątrobowy), nie wykazano również istotnych zaburzeń odporności.

3.1 Zastosowane metody oceny parametrów klinicznych

- Badanie podmiotowe
- Badanie przedmiotowe

W analizie danych uwzględniono następujące parametry: wiek i płeć dzieci, czas trwania zakażenia HCV, przebieg i efekt dotychczasowego leczenia. W celu ustalenia czasu trwania WZW C brano pod uwagę przebyte choroby (w tym nowotworowe), obecność chorób przewlekłych (chorób tarczycy, chorób reumatoidalnych), przetoczenia preparatów krwiopochodnych, zabiegi operacyjne i przyjmowanie leków immunosupresyjnych (chemioterapii, sterydoterapii systemowej). Za prawdopodobny moment zakażenia w przypadku dzieci z chorobą nowotworową w wywiadzie przyjmowano okres leczenia onkologicznego. W przypadku stwierdzenia w wywiadzie innych procedur inwazyjnych obarczonych ryzykiem zakażenia, za prawdopodobny moment zakażenia uznawano czas wykonywania danej procedury.

3.2 Zastosowane metody oceny parametrów laboratoryjnych

Przewlekłe zakażenie HCV stwierdzano na podstawie obecności przeciwciał anty-HCV w surowicy krwi. Badanie wykonywano metodą ilościową (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA) w Centralnym Laboratorium Szpitala Klinicznego im. K. Jonschera Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (Kierownik: mgr Maria Glema).

U wszystkich dzieci oznaczano również w Centralnym Laboratorium Szpitala Klinicznego im. K. Jonschera Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu następujące parametry laboratoryjne:

- morfologię krwi obwodowej (metoda konduktometrii stałoprądowej)
- aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) i asparaginowej (AST), gamma-glutamylotranspeptydazy (GGTP) w surowicy (metoda enzymatyczna, kinetyczna)
- stężenie bilirubiny całkowitej (TBIL) (metoda kolorymetryczna z kwasem sulfanilowym), białka całkowitego (metoda biuretowa), albumin, gamma-globulin (metoda elektroforetyczna na żelu agarozowym), fibrynogenu (metoda koagulologiczna)
- stężenie żelaza (metoda kolorymetryczna z ferenem S)

Wartości referencyjne powyższych parametrów zamieszczono w Tabeli 1.

Tab. 1 Wartości referencyjne parametrów laboratoryjnych oznaczanych w Centralnym Laboratorium Szpitala Klinicznego im. K. Jonschera UM w Poznaniu

Parametr	Wiek dzieci				
	< 12 m.ż.	1 - 3 lat	4 - 6 lat	7 - 12 lat	13 - 17 lat
Leukocyty (WBC) G/l	4,0-20,0	4,5-13,0		4,0-12,0	4,0-10,0
Hemoglobina (HGB)g/dl	10,0-13,0	11,0-14,0	10,9-14,2	12,0-15,5	12,0-16,0 (DZ) 14,0-18,0 (CHŁ)
Płytki (PLT) G/l	150-400				
Aminotransferaza alaninowa (ALT) U/l	<57	<39	<29	<39	<23(DZ) <26(CHŁ)
Aminotransferaza asparaginowa (AST) U/l	<82	<48	<36	<47	<25(DZ) <29 (CHŁ)
Gammaglutamylotranspeptydaza (GGTP) U/l	<57	<39	<29	<39	<23(DZ) <26(CHŁ)
Bilirubina całkowita mg/dl	0,18-1,23				
Białko całkowite (TP) g/dl	4,8-7,6	6,0-8,0			
Albuminy (ALB) g/dl	3,5-5,2				
Gammaglobuliny (GGB) g/dl (%)	0,66-1,68 (11-21)				
Fibrynogen mg/dl	180-350				
Żelazo(Fe) ug/dl	36-156	43-184			
Legenda: DZ - dziewczęta, CHŁ – chłopcy					

Zakażenie potwierdzano obecnością HCV-RNA w surowicy metodą RT-PCR z zastosowaniem testów jakościowych (czułość testu 50 IU/ml) i ilościowych (czułość testu 600 IU/ml). Badano również genotyp HCV metodą RT-PCR oraz hybrydyzacji kwasów nukleinowych z zastosowaniem zestawu Versant HCV Genotype 2,0 Assay (Lipa). W/w badania wykonywano w Zakładzie Diagnostyki Medycznej w Poznaniu (Kierownik: prof. dr hab. Danuta Januszkiewicz-Lewandowska).

Ilość kopii wirusa HCV-RNA w ml obliczano wg przelicznika: 1 IU/ml = 2,7 kopii/ml. Za wysoki poziom wirerii uznano wartości przekraczające 600 000 IU/ml [99,100].

3.3 Badanie histopatologiczne biopsjaty wątroby

Cienkoigłową biopsję wątroby metodą Menghiniego wykonywano w Klinice Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Uzyskane biopsjaty wątroby oceniano w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (dr hab. med. Aldona Woźniak). Ocena histopatologiczna obejmowała aktywność zapalną (z ang. *grading*) oraz stopień zaawansowania włóknienia (z ang. *staging*) w oparciu o zmodyfikowaną skalę numeryczną HAI wg Ishaka (G0-G5; S0-S5) [101].

3.4 Badania immunologiczne

U wszystkich dzieci oznaczono obecność autoprzeciwciał tj.: przeciwciała przeciwjądrowe ANA (ang. *anti-nuclear antibodies*), przeciwciała przeciw mięśniom gładkim ASMA (ang. *anti-smooth muscle antibodies*), przeciwciała przeciwmityochondrialne AMA (ang. *antimitochondrial antibodies*), przeciwciała przeciw mikrosomom wątroby i nerek typu 1 anti-LKM 1 (ang. *anti-liver-kidney microsomal antibodies*). Badanie wykonywano metodą immunofluorescencji w Katedrze i Zakładzie Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinowskiego w Poznaniu (Kierownik: Prof. UM dr hab. med. Grzegorz Dworacki).

Wszyscy pacjenci zakażeni HCV oraz pacjenci z grupy kontrolnej mieli wykonane badania oceniające układ odpornościowy: skład odsetkowy leukocytów i niektóre wzajemne proporcje limfocytów: CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD4:CD8 oraz komórek NK.

W/w badania wykonywano w Katedrze i Zakładzie Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (Kierownik prof. UM dr hab. med. Grzegorz Dworacki) oraz w Pracowni Cytometrii przy Klinice Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej Szpitala Klinicznego im. K. Jonschera w Poznaniu (Kierownik prof. dr hab. Jacek Wachowiak). Wartości referencyjne powyższych parametrów zamieszczono w Tabeli 2.

Tab. 2 Wartości referencyjne subpopulacji limfocytów oznaczanych w Katedrze i Zakładzie Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w Pracowni Cytometrii przy Klinice Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej SK im. K. Jonschera w Poznaniu

Subpopulacja	Wiek pacjentów					
	2 - 3 mies.	4 - 8 mies.	12 - 23 mies.	2 - 5 lat	7 - 17 lat	≥18 lat
Limfocyty [%]	55-78	45-79	44-72	38-64	36-43	28-39
CD 3 (limfocyty T) [%]	55-78	45-79	53-81	62-80	66-76	61-84
CD 4 [%]	41-64	36-61	31-54	35-51	33-41	32-60
CD 8 [%]	16-35	16-34	16-38	22-38	27-35	13-40
CD 19 (limfocyty B) [%]	19-31	19-31	19-31	21-28	12-22	10-31
CD 4 : CD 8	1,3 - 3,5	1,2 - 3,5	1,0 - 3,0	1,0 - 2,1	1,1 - 1,4	0,9 - 4,5
Komórki NK [%]	8,0 – 15				9,0 - 16	10 – 19

Do wykonywania w/w badań pobierano ok. 2 ml krwi żyłnej do plastikowej probówki zawierającej heparynę (10 U/ml, Polfa) i opracowywano ją w ciągu 4-6 godzin. Wykonywano ocenę subpopulacji limfocytów komórek krwi obwodowej stosując standardowe techniki dla immunofluorescencyjnego znakowania pełnej krwi pobranej na heparynę [102].

100 µg krwi mieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej z odpowiednimi ilościami zastosowanych przeciwciał monoklonalnych. Erytrocyty usuwano poprzez dodanie do probówek płynu lizującego (Becton-Dickinson), krótkiej inkubacji i odpłukania. Następnie próbki utrwalono 1% paraformaldehydem.

Stosowano zestaw IMKplus (Becton-Dickinson), który pozwala na ocenę następujących subpopulacji ludzkich limfocytów: CD3 (limfocyty T), CD19 (limfocyty B), CD4 (limfocyty T pomocnicze), CD 8 (limfocyty T supresorowe), komórki NK.

Do oceny stosowano cytometr przepływowy FACScan z argonowym laserem 488 nm (Becton-Dickinson). Do analizy wyników użyto programu SimulSet. Celem dokładnego parametrowania wczytywanych probówek stosowano odczynnik leucoGATE, który dzięki kombinacji przeciwciał CD45 i CD14 pozwala na dokładne określenie miejsca limfocytów w badanych próbkach. Wyniki badań podano jako procent pozytywnych komórek w badanej próbce.

3.5 Zastosowane metody statystyczne:

Z uzyskanych danych obliczano średnie ($\bar{x}$) i odchylenie standardowe (SD). Istotność statystyczną oceniano za pomocą nieparametrycznych testów: U Manna-Whitney'a dla zmiennych niezależnych oraz Wilcoxona dla prób zależnych. Za granicę istotności przyjęto wartość $p \leq 0.05$.

Obliczenia statystyczne wykonano przy pomocy specjalistycznych programów komputerowych w Katedrze i Zakładzie Informatyki i Statystyki Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (Kierownik prof. dr hab. Jerzy A. Moczko).

Badanie przeprowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu dnia 15.05.2008, uchwała nr 578/08

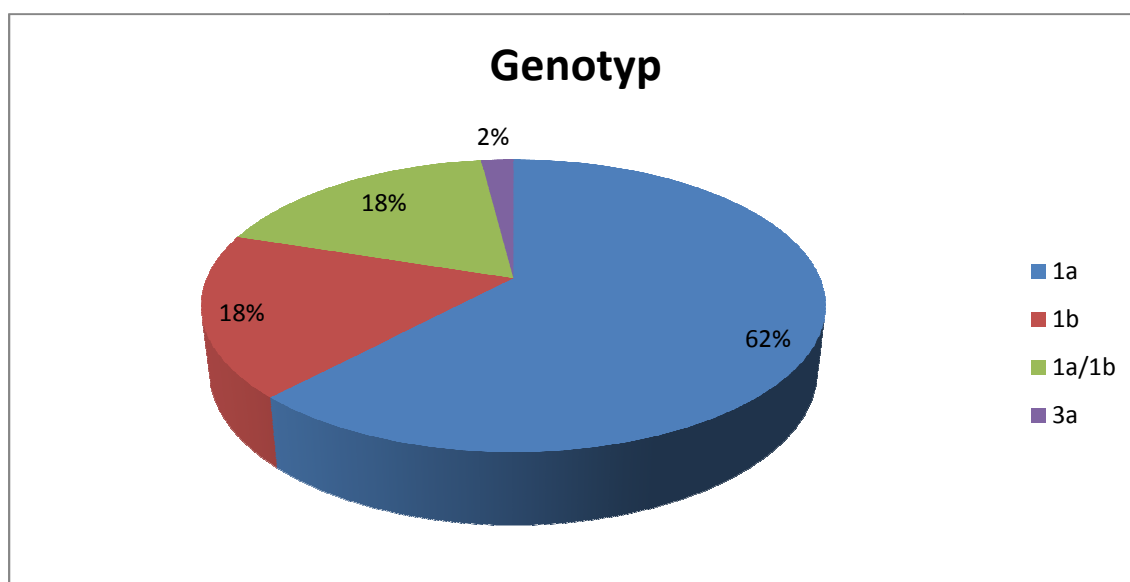
4. WYNIKI

4.1 Wiek i płeć pacjentów

Analizą objęto 80 dzieci: 38 dziewczynek (47,2 %) i 42 chłopców (52,5 %) w wieku od 1 do 18 lat (średnio 12,6 lat). Wyodrębniono 2 grupy główne pacjentów – grupę badaną obejmującą 50 dzieci (62,5%) z PWZWC oraz grupę kontrolną obejmującą 30 dzieci (37,5%), u których wykluczono zakażenie HCV. W grupie badanej liczba dziewcząt i chłopców była jednakowa - 25 (50%), w grupie kontrolnej płeć żeńska stanowiła 43%, a męska 56,6% . Wiek dzieci w grupie badanej wahał się od 7 do 18 lat (średnio 15,9 lat), a w grupie kontrolnej od 1 roku do 17 lat (średnio 7,1) lat.

4.2 Dane epidemiologiczne

W grupie badanej (n=50) domniemany czas trwania zakażenia HCV wahał się od 2 do 16 lat (średnio 8,5 lat). Obecność przeciwciał anty HCV oraz HCV RNA w surowicy krwi stwierdzono u wszystkich dzieci w grupie badanej. Średni poziom wirerii wynosił 2 232 728 IU/ml (SD 942778 IU/ml). Dominującym genotypem u chorych z grupy badanej był genotyp 1a (62%). Rozkład poszczególnych genotypów w grupie badanej przedstawiono na Ryc.4



Ryc. 4 Rozkład częstości genotypów w grupie badanej (n=50)

4.3 Badania laboratoryjne

Zarówno w grupie badanej jak i w kontrolnej oznaczono szereg parametrów laboratoryjnych wykazując istotne statystycznie różnice między obiema grupami. Rozkład wartości poszczególnych parametrów przedstawiają tabele 3 i 4.

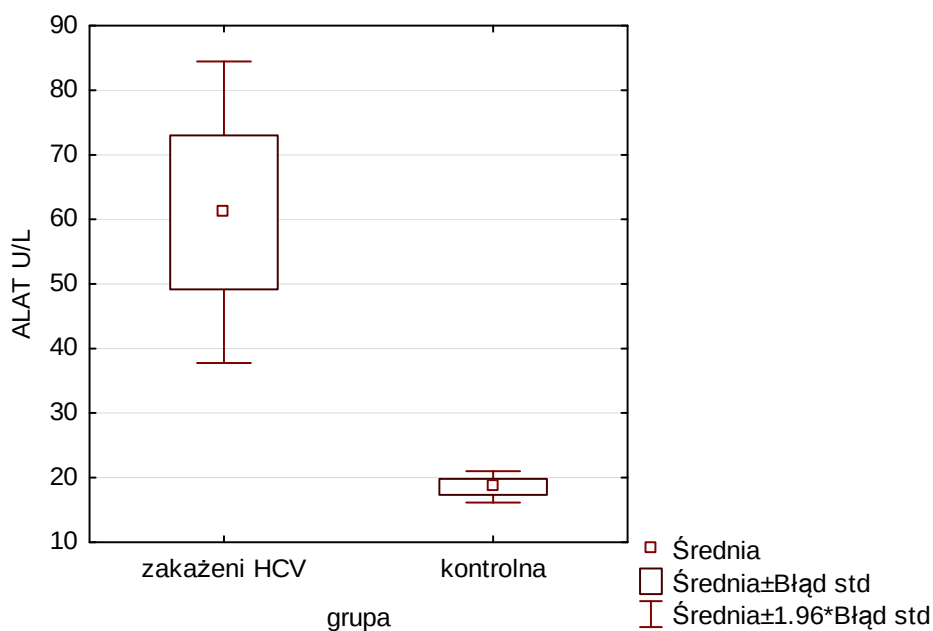
Tab. 3 Rozkład wartości parametrów laboratoryjnych w grupie badanej

Badany parametr	Grupa badana (pacjenci zakażeni HCV) n=50					
	N ważnych	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
ALT U/L	49	61.10	33.00	9.00	500.00	83.48
AST U/L	49	55.46	39.00	14.00	465.00	67.98
GGTP U/L	50	22.18	19.50	10.00	88.00	13.29
TBIL mg/dl	47	0.83	0.60	0.29	3.45	0.67
ALP U/L	47	373.78	405.00	117.00	602.00	109.23
białko g/dl	47	7.15	7.12	6.12	8.10	0.39
albuminy g/l	47	51.91	51.00	44.50	68.50	5.34
gamma-globuliny %	47	21.16	19.70	8.10	101.00	12.53
Fe ug/dl	10	87.43	84.80	22.90	135.00	35.70

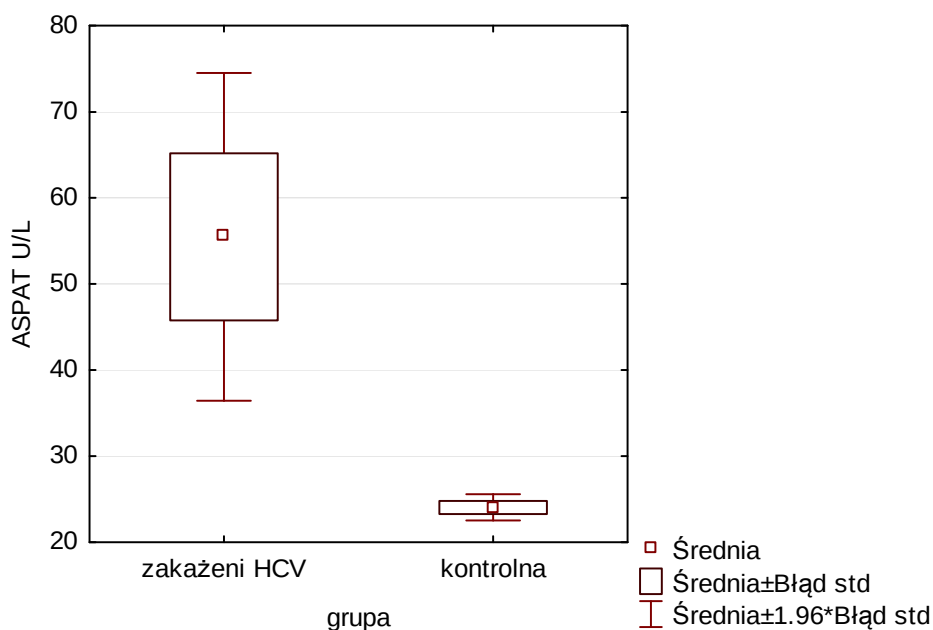
Tab. 4 Rozkład wartości parametrów laboratoryjnych w grupie kontrolnej

Badany parametr	Grupa kontrolna n=30					
	N ważnych	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
ALT U/L	30	18.56	16.00	11.00	33.00	6.79
AST U/L	30	24.03	24.50	16.00	30.00	4.23
GGTP U/L	15	17.53	18.00	8.00	28.00	5.43
TBIL mg/dl	6	1,37	0.48	0.26	4.49	1.69
ALP U/L	5	160.60	169.00	129.00	183.00	21.55
białko g/dl	28	6.82	7.07	0.00	8.79	1.63
albuminy g/l	25	62.06	66.20	38.20	75.40	10.66
gamma-globuliny %	26	17.52	13.10	7.60	102.00	18.01
Fe ug/dl	12	54.83	38.00	10.00	194.00	48.53

U 79 dzieci zbadano aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) i aminotransferazy asparaginowej (AST). Średnia wartość ALT w obu grupach wynosiła 44,94 IU/ml, AST 43,53IU/ml. Rozkład wartości ALT i AST w poszczególnych grupach przedstawiają Ryc.5 i 6



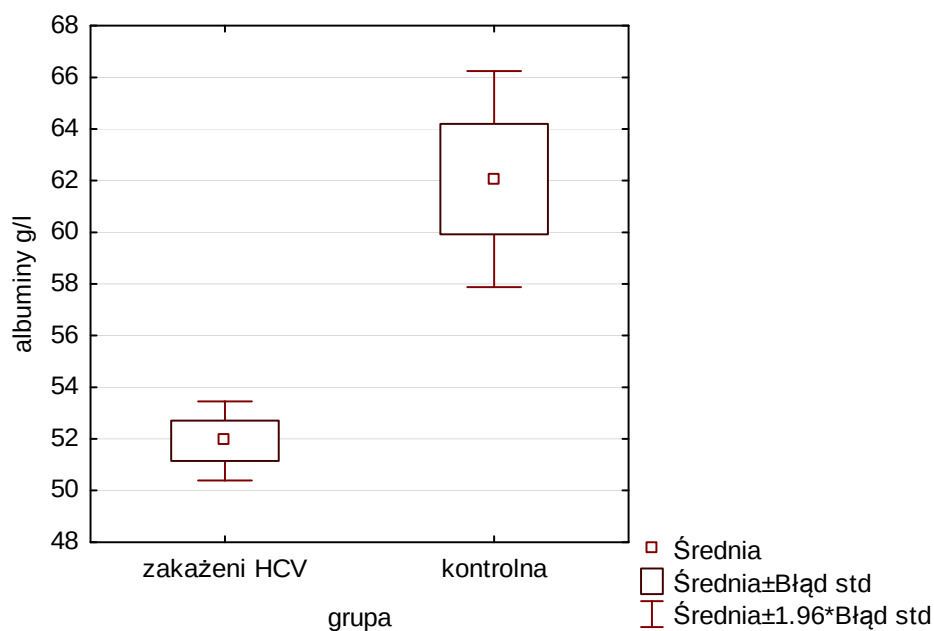
Ryc. 5 Rozkład wartości ALT w grupie badanej i grupie kontrolnej



Ryc. 6 Rozkład wartości AST w grupie badanej i grupie kontrolnej

W grupie badanej wykazano istotnie statystycznie wyższą wartość ALT i AST w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,000$).

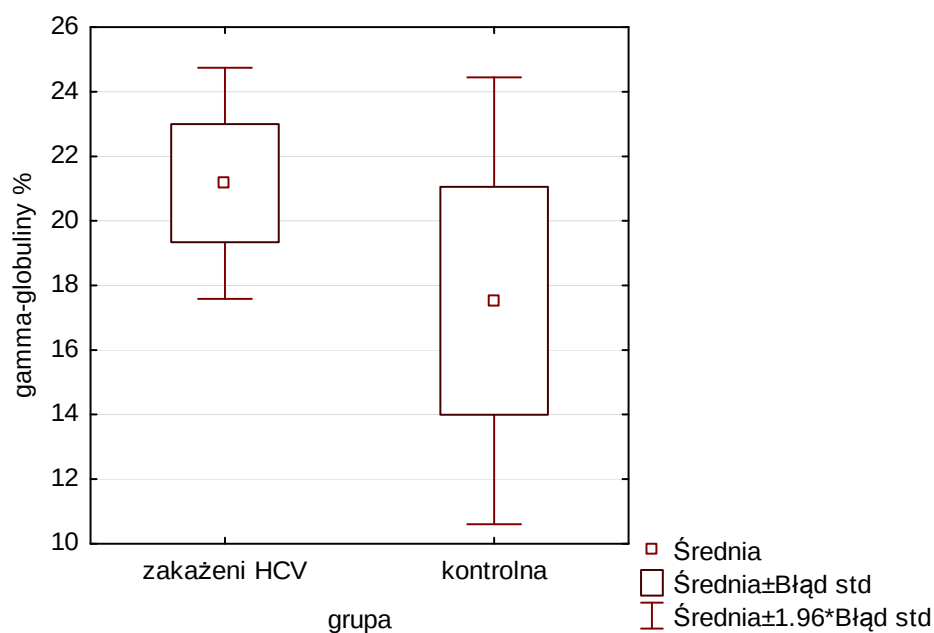
Średni poziom albumin w surowicy krwi w obu grupach wynosił 55,44 g/l, w tym w grupie badanej 51,91 g/l, a w grupie kontrolnej 62,06 g/l. Rozkład wartości albumin w obu grupach przedstawia ryc. 7



Ryc. 7 Rozkład wartości albumin w obu grupach

W grupie badanej wykazano istotnie statystycznie niższy poziom albumin w surowicy krwi w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,0001$).

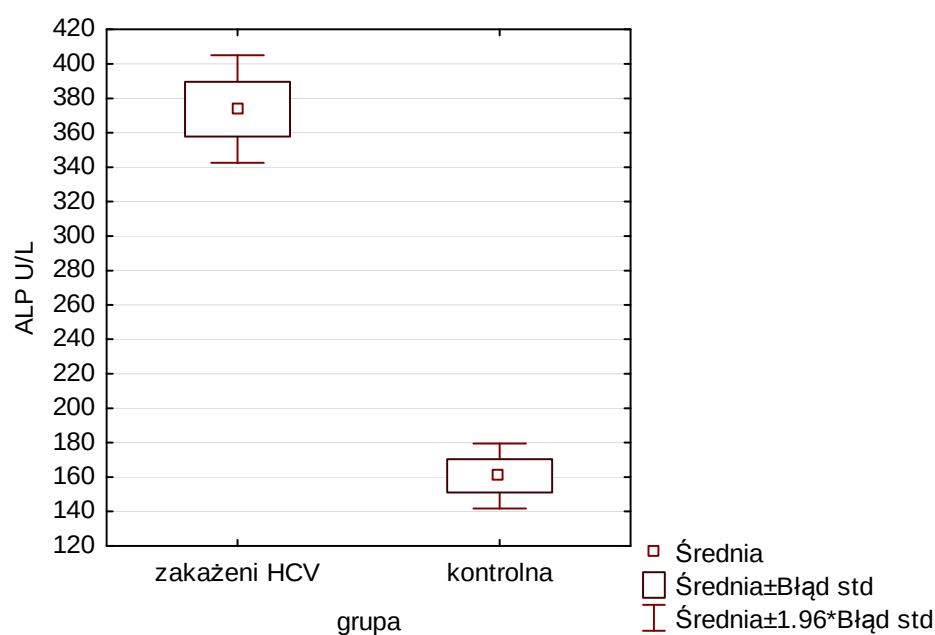
U 73 dzieci oceniono stężenie gamma-globulin w surowicy krwi – średni poziom w obu grupach wynosił 19,87 % , w grupie badanej 21,16%, a w grupie kontrolnej 17,52%. Rozkład wartości gammaglobulin w surowicy krwi przedstawia Ryc.8



Ryc. 8 Rozkład wartości gammaglobulin w obu grupach

W grupie badanej stwierdzono istotnie statystycznie wyższą wartość gammaglobulin w surowicy krwi w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,0001$).

U 52 dzieci oceniono stężenie ALP w surowicy krwi. Średnia wartość tego parametru w obu grupach wyniosła 353,28 U/l, w tym a grupie badanej 373,78 U/l, w grupie kontrolnej 160,60 U/l. Rozkład wartości ALP w surowicy krwi przedstawia Ryc. 9

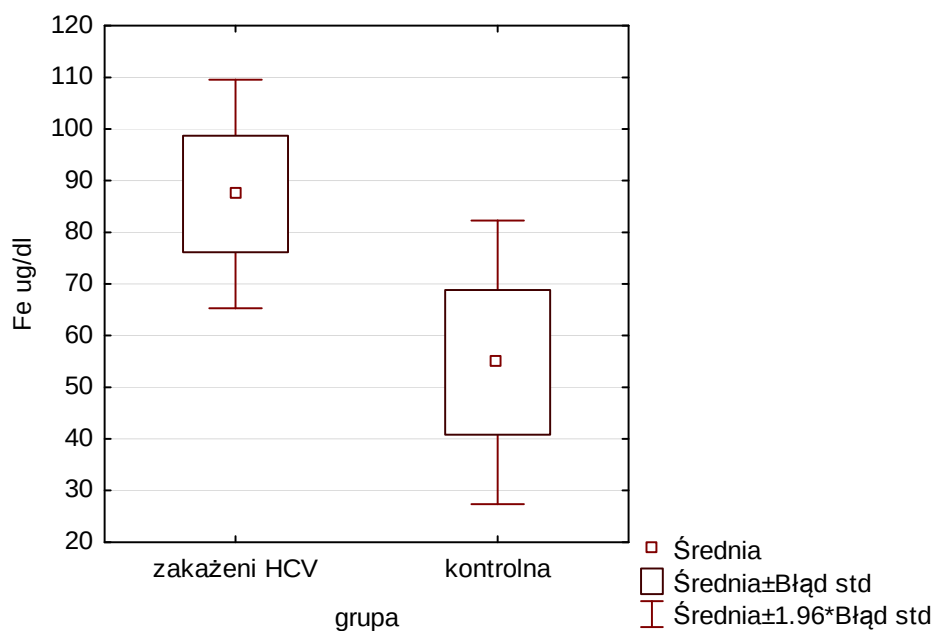


Ryc. 9 Rozkład wartości ALP w obu grupach

W grupie badanej wykazano istotnie statystycznie wyższy poziom ALP w surowicy krwi w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,000$).

U 22 dzieci oznaczono stężenie żelaza w surowicy krwi. Średni poziom tego parametru w grupie badanej wynosił 87,43 $\mu\text{g/dl}$, a w grupie kontrolnej 54,83 $\mu\text{g/dl}$. Rozkład wartości poziomu żelaza w surowicy krwi w obu grupach przedstawia ryc. 10

W grupie badanej wykazano istotnie statystycznie wyższy poziom żelaza w surowicy krwi w stosunku do grupy kontrolnej ($p=0,0320$).



Ryc. 10 Rozkład wartości stężenia żelaza w obu grupach

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomie GGTP, TBIL oraz białka w surowicy krwi między obiema grupami.

4.4 Analiza wybranych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej

Wszyscy pacjenci z grupy badanej oraz grupy kontrolnej mieli wykonane badania oceniające układ odpornościowy. Aby określić zależność między poszczególnymi elementami immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej a parametrami klinicznymi, przebiegiem zakażenia HCV oraz efektem terapii PWZW C dzieci z grupy badanej podzielono na następujące podgrupy:

- Uwzględniając płeć:

dziewczynki

chłopcy

- Uwzględniając czas trwania zakażenia

pacjenci zakażeni HCV >10 lat

pacjenci zakażeni HCV ≤10 lat

- Uwzględniając poziom wiremii

pacjenci z wiremią wysoką (> 600 000 IU/ml)

pacjenci z wiremią niską

- Uwzględniając aktywność aminotransferaz

pacjenci z aktywnością aminotransferaz w zakresie wartości referencyjnych

pacjenci z aktywnością aminotransferaz powyżej wartości referencyjnych

- Uwzględniając przebyte leczenie przeciwwirusowe

pacjenci leczeni PegIFN i RBV

pacjenci nieleczeni

- Uwzględniając efekt terapii

pacjenci którzy uzyskali SVR

pacjenci którzy nie uzyskali SVR

- Uwzględniając obecność innych chorób przewlekłych

pacjenci z obecnością innych chorób przewlekłych

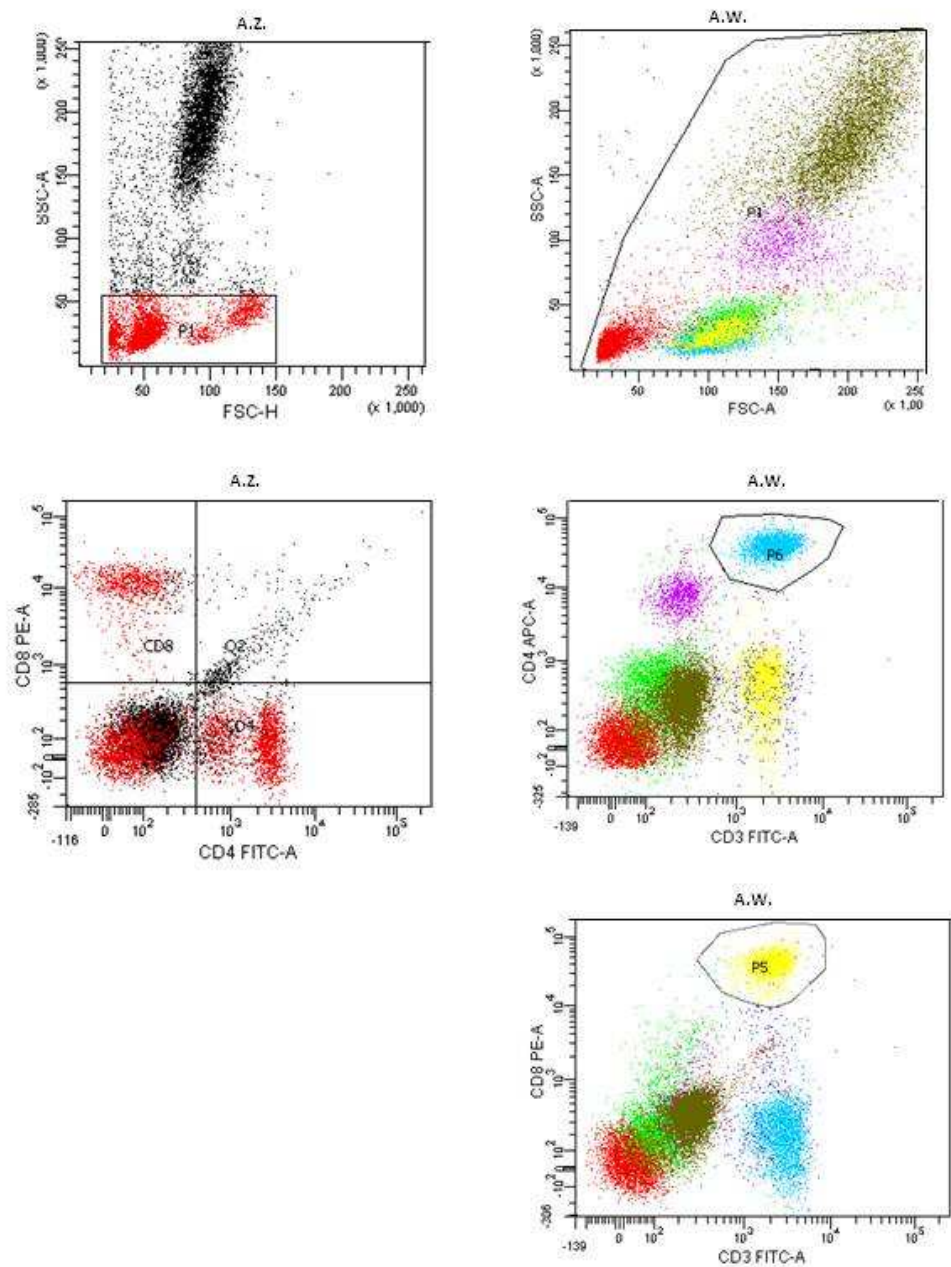
pacjenci bez obecności innych chorób przewlekłych

- Uwzględniając obecność autoprzeciwciał

pacjenci z obecnością autoprzeciwciał

pacjenci bez autoprzeciwciał

Wyniki immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej porównano między poszczególnymi podgrupami i grupą kontrolną (Rycina 11).



Ryc.11 Przykładowy rozkład subpopulacji limfocytów T CD4 i CD8 u dziecka z grupy badanej A.Z. i z grupy kontrolnej A.W.

4.4.1 Analiza immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem płci pacjentów w obu grupach

W Tab. 5, 6 porównano średnie wartości odsetkowe poszczególnych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału na płeć

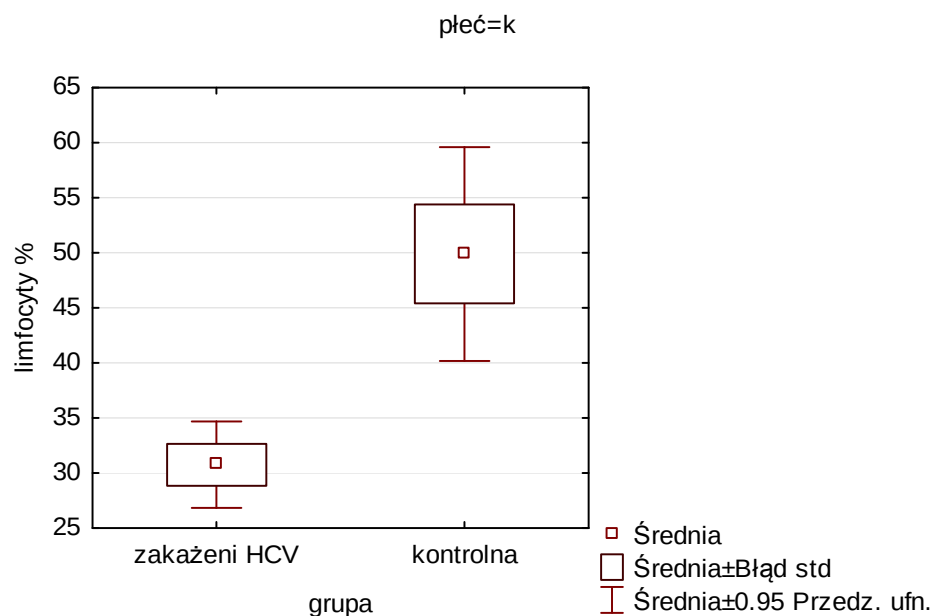
Tab. 5 Rozkład wartości odsetkowych (%) elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej u dziewczynek z grupy badanej oraz kontrolnej

Zmienna	Dziewczynki grupa badana n=25		Dziewczynki grupa kontrolna n=14	
	Średnia	SD	Średnia	SD
limfocyty %	30.73	9.50	49.88	16.82
monocyty %	5.65	1.75	7.34	3.47
neutrofile %	45.28	11.05	35.92	11.52
kwasochłonne %	0.74	0.55	2.12	2.19
bazofile %	0.83	0.67	0.41	0.30
CD4%	31.74	7.12	36.71	5.84
CD8%	34.19	8.53	25.15	5.98
CD4:CD8	1.00	0.36	1.64	0.58
NK%	11.61	6.15	10.42	5.83
CD19%	14.24	7.76	19.61	5.00

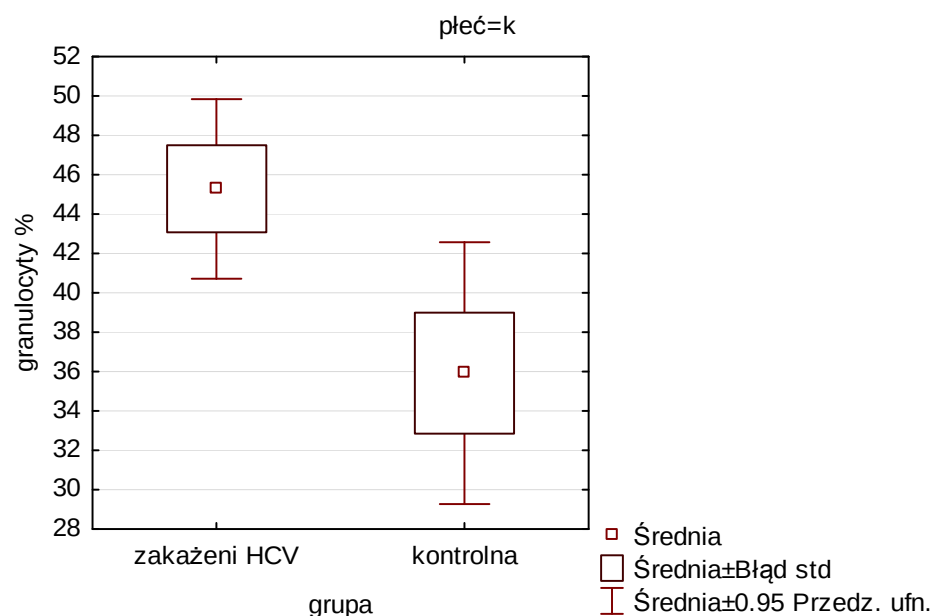
Tab. 6 Rozkład wartości odsetkowych (%) elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej u chłopców z grupy badanej i kontrolnej

Zmienna	Chłopcy grupa badana n=25		Chłopcy grupa kontrolna n=16	
	Średnia	SD	średnia	SD
limfocyty %	29.80	10.03	43.49	19.83
monocyty %	6.07	2.35	7.84	3.21
neutrofile %	40.43	10.01	41.45	23.24
kwasochłonne %	1.00	0.97	3.23	2.70
bazofile %	1.12	1.00	0.30	0.24
CD4 %	31.06	8.21	33.65	8.21
CD8 %	33.46	8.11	25.03	7.73
CD4:CD8	0.96	0.45	1.49	0.78
NK %	14.10	5.83	11.45	6.20
CD19 %	12.25	4.57	19.86	10.48

Wykazano, iż średni odsetek limfocytów (Ryc.12) u dziewczynek z grupy badanej był istotnie statystycznie niższy w porównaniu do dziewczynek z grupy kontrolnej ($p=0,001$). Średni odsetek monocytów nie różnił się istotnie między obiema grupami. W grupie badanej stwierdzono również istotnie statystycznie wyższy odsetek granulocytów (Ryc.13) w stosunku do dziewczynek z grupy kontrolnej ($p=0,014$).

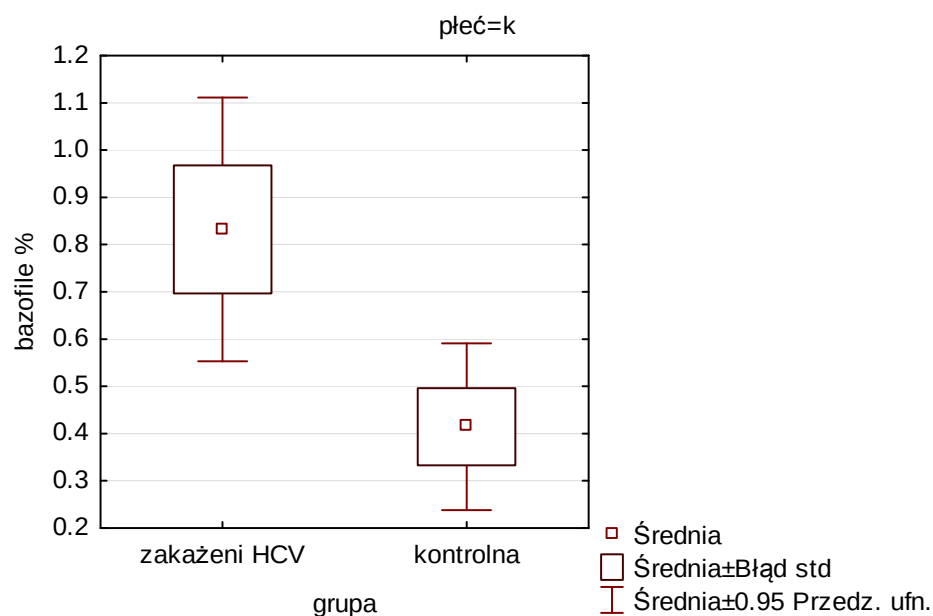


Ryc. 12 Rozkład odsetkowy limfocytów u dziewcząt w grupie badanej i kontrolnej

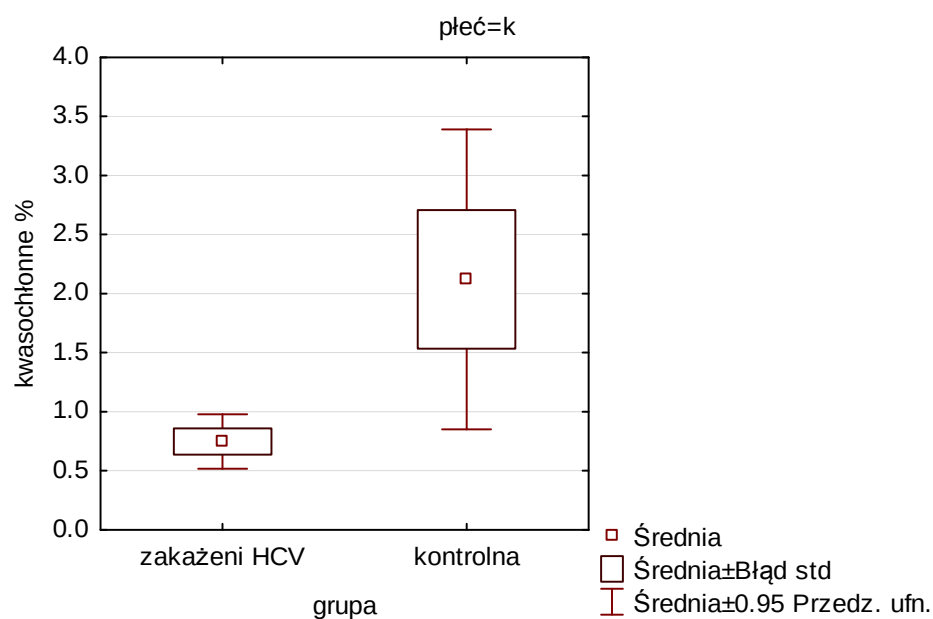


Ryc. 13 Rozkład odsetkowy granulocytów obojętnochłonnych u dziewcząt w grupie badanej i grupie kontrolnej

Wykazano również istotne statystycznie różnice w wartościach odsetkowych bazofilów i komórek kwasochłonnych między obiema grupami. Średni odsetek bazofili (Ryc.14) u dziewczynek zakażonych HCV był znacząco wyższy w stosunku do dziewczynek z grupy kontrolnej ($p=0,02$), średni odsetek komórek kwasochłonnych (Ryc.15) był istotnie statystycznie wyższy w grupie kontrolnej ($p=0,001$).

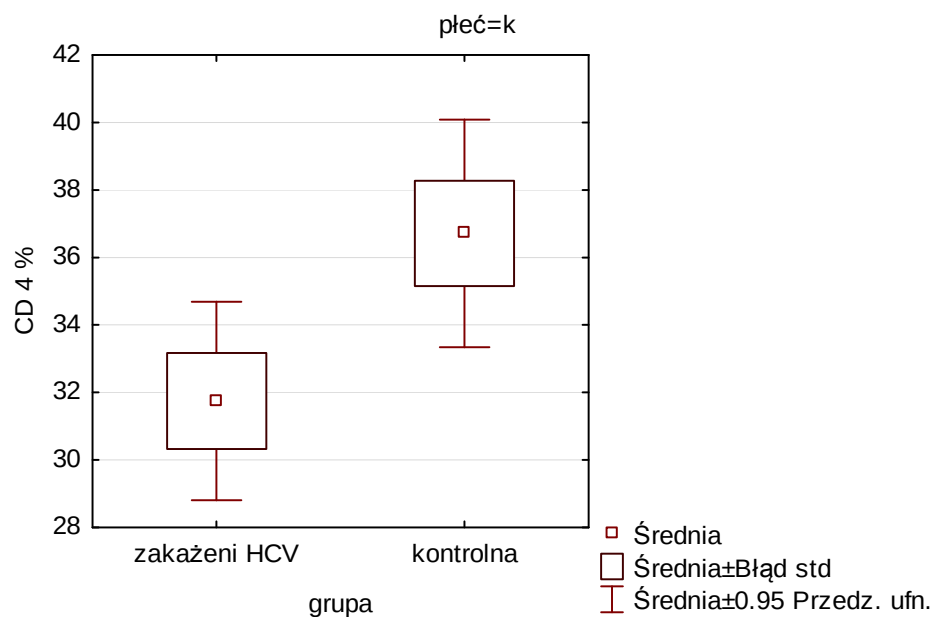


Ryc. 14 Rozkład wartości odsetkowych bazofili u dziewczynek w grupie badanej i kontrolnej

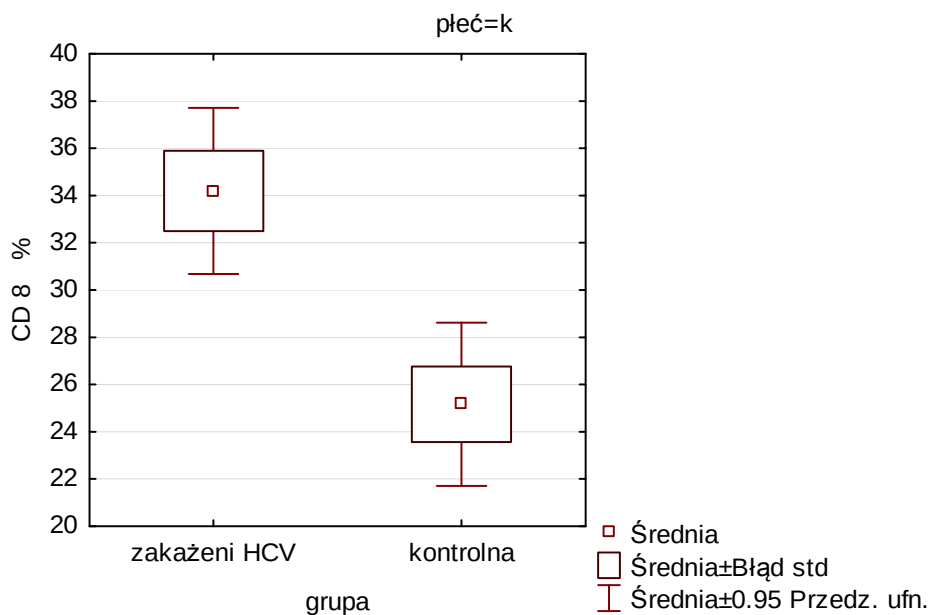


Ryc.15 Rozkład wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych u dziewczynek z grupy badanej i kontrolnej

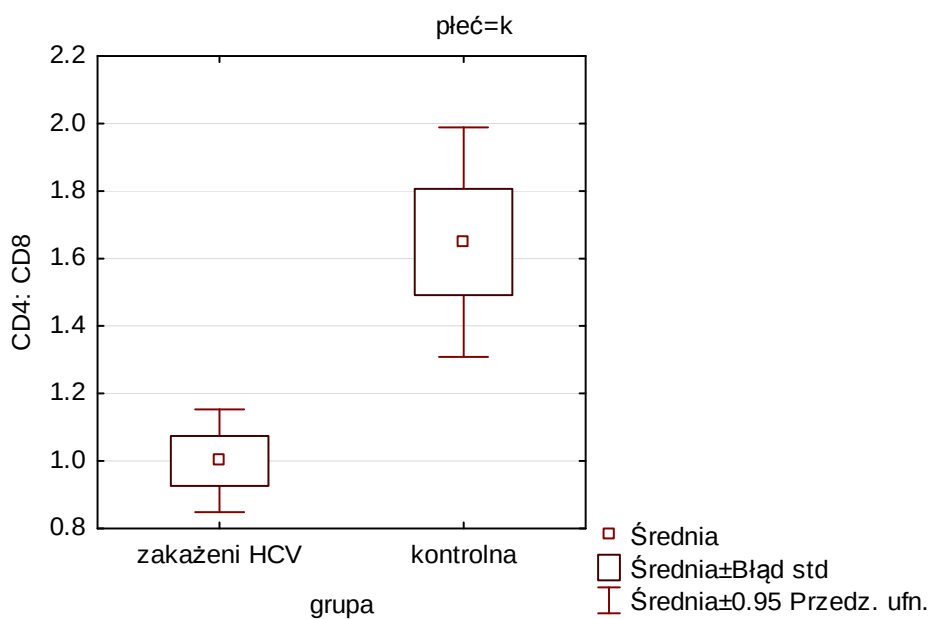
Wykazano istotne statystycznie różnice w wartościach odsetkowych limfocytów CD4, CD8 oraz w stosunku CD4:CD8 u dziewczynek między obiema grupami. Średni odsetek limfocytów CD4 (Ryc.16) i stosunek CD4:CD8 (Ryc.17) był z namiennie wyższe w grupie kontrolnej ($p=0,020$, $p=0,000$). W grupie dziewczynek zakażonych HCV średni odsetek limfocytów CD8 (Ryc.18) był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,002$).



Ryc.16 Rozkład wartości odsetkowych limfocytów CD4 u dziewczynek w grupie badanej i kontrolnej

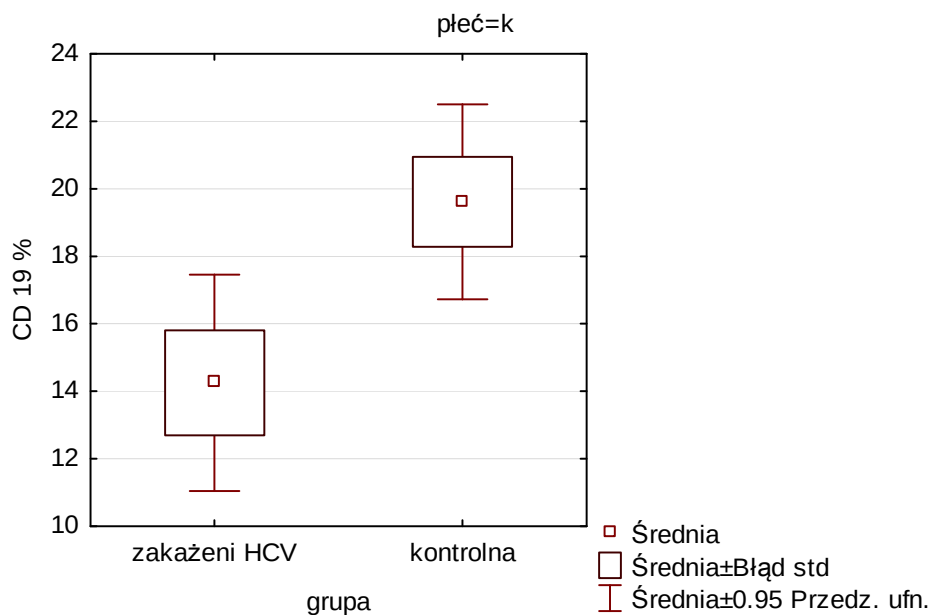


Ryc.17 Rozkład wartości odsetkowych limfocytów CD8 u dziewczynek w grupie badanej i kontrolnej



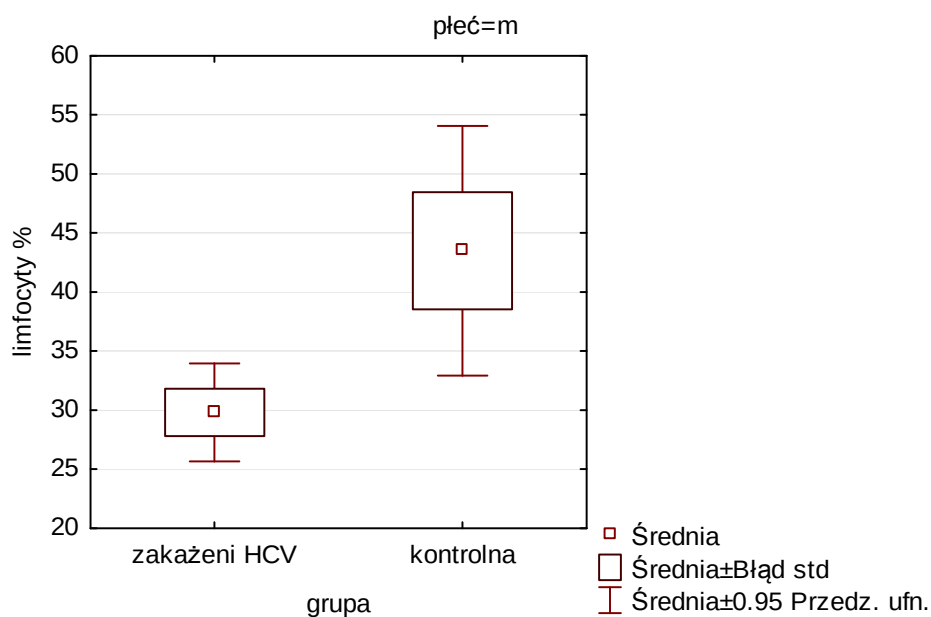
Ryc. 18 Rozkład wartości stosunku CD4:CD8 w dziewczynkach w grupie badanej i kontrolnej

Nie wykazano istotnych różnic w wartościach odsetkowych limfocytów NK u dziewczynek w obu grupach. Średni odsetek limfocytów CD19 (Ryc.19) był znacząco wyższy w grupie kontrolnej ($p=0,003$).



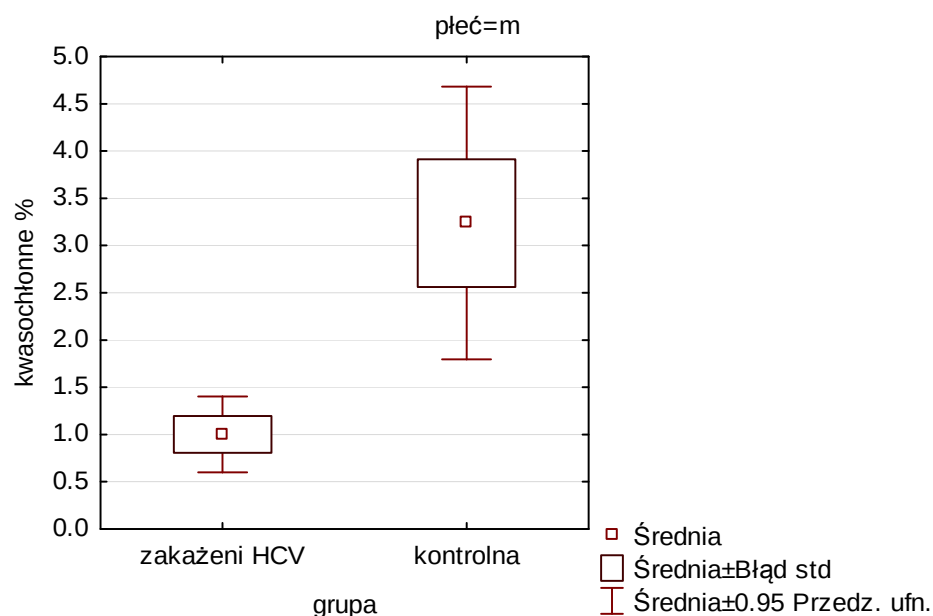
Ryc.19 Rozkład wartości odsetkowych limfocytów CD 19 u dziewczynek w grupie badanej i grupie kontrolnej

W grupie chłopców zakażonych HCV oraz w grupie kontrolnej rozkład wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej kształtował się podobnie jak w grupie dziewczynek. Wykazano, że średni odsetek limfocytów (Ryc.20) u chłopców w grupie kontrolnej był znacząco wyższy ($p=0,01$). Średnia wartość odsetkowa monocytów i granulocytów nie różniła się istotnie statystycznie u chłopców w obu grupach.

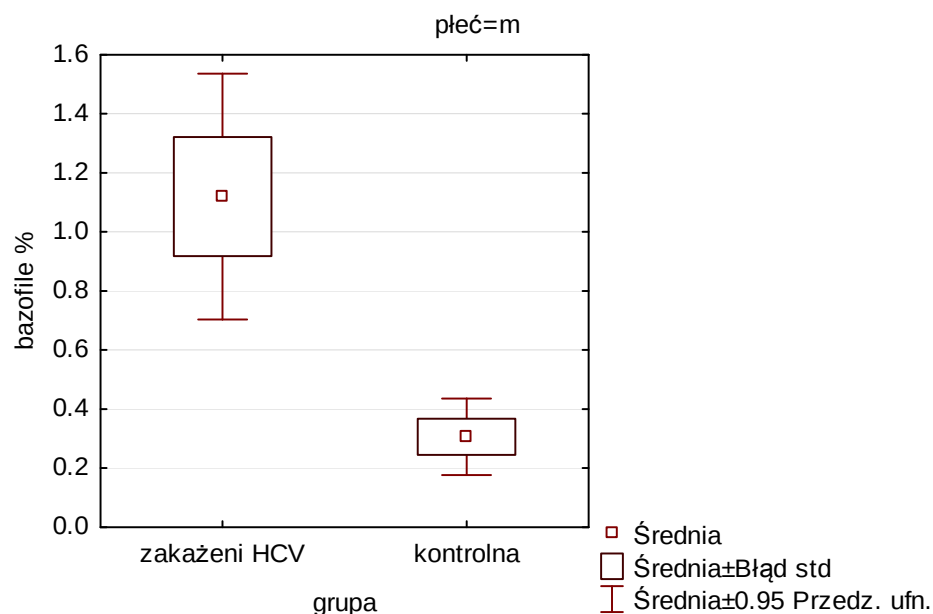


Ryc. 20 Rozkład wartości odsetkowych limfocytów u chłopców w grupie badanej i w grupie kontrolnej

W grupie chłopców zakażonych HCV odsetek komórek kwasochłonnych (Ryc.21) był istotnie statystycznie niższy ($p=0,000$) w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast średnia wartość odsetkowa bazofilów (Ryc.22) była znacząco wyższa w stosunku do chłopców zdrowych ($p=0,000$).



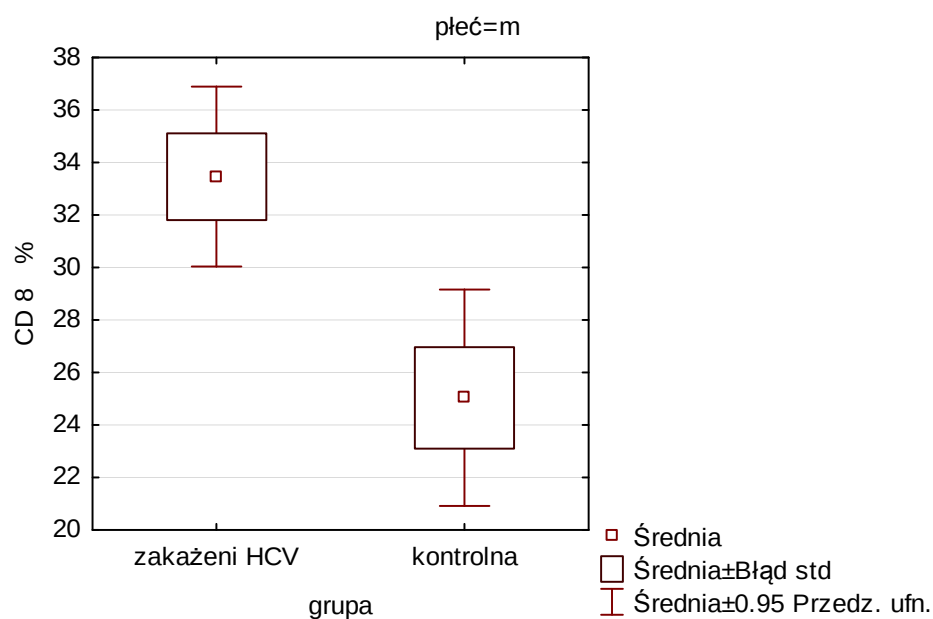
Ryc. 21 Rozkład wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych u chłopców w grupie badanej i w grupie kontrolnej



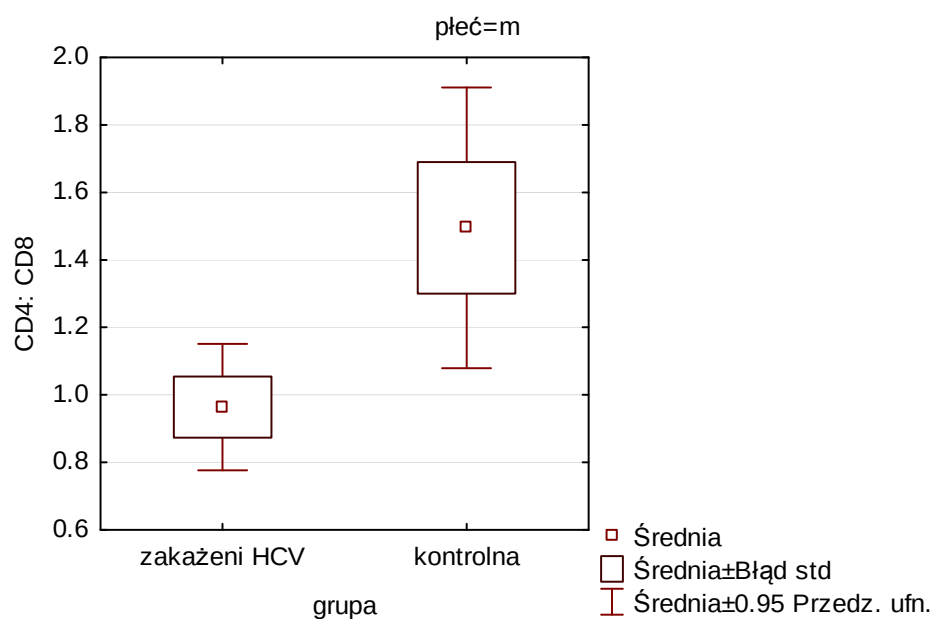
Ryc. 22 Rozkład wartości odsetkowych bazofilów u chłopców w grupie badanej i w grupie kontrolnej

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w średniej wartości odsetkowej limfocytów CD4 i komórek NK u chłopców w grupach.

Odsetek limfocytów CD8 (Ryc.23) u chłopców w grupie badanej był znamienne wyższy w stosunku do grupy kontrolnej ($p=0,003$), natomiast stosunek CD4:CD8 (Ryc.24) był istotnie statystycznie wyższy w grupie kontrolnej ($p=0,02$).

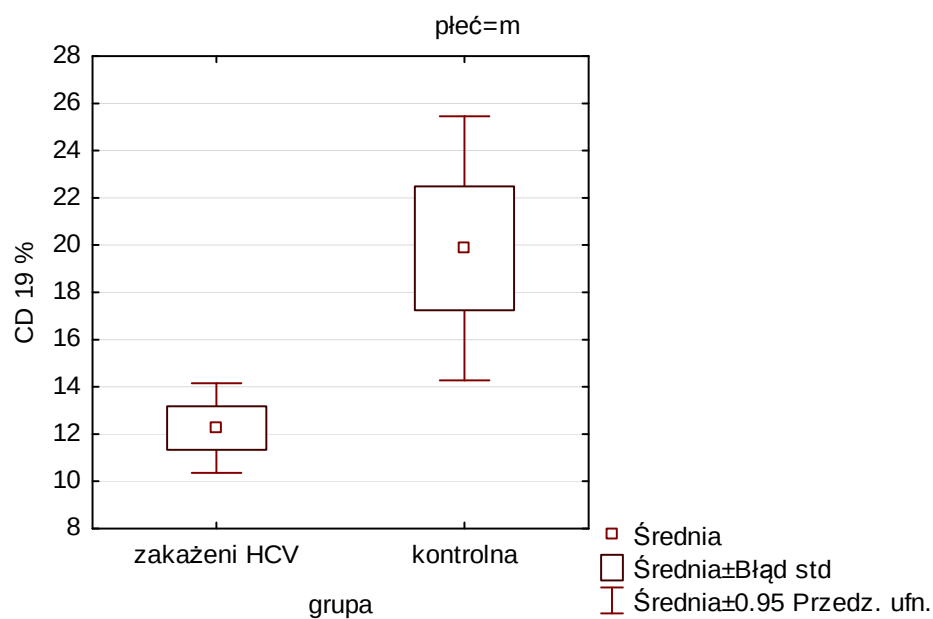


Ryc. 23 Rozkład wartości odsetkowych limfocytów CD8 u chłopców w grupie badanej i w grupie kontrolnej



Ryc. 24 Rozkład wartości stosunku CD4:CD8 u chłopców w grupie badanej i w grupie kontrolnej

Odsetek limfocytów CD19 (Ryc.25) w grupie chłopców zakażonych HCV był znacząco niższy w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,007$).



Ryc. 25 Rozkład wartości odsetkowych limfocytów CD19 u chłopców w grupie badanej i w grupie kontrolnej

Analiza średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej nie wykazała istotnych różnic między płciami zarówno w grupie badanej jak i w kontrolnej.

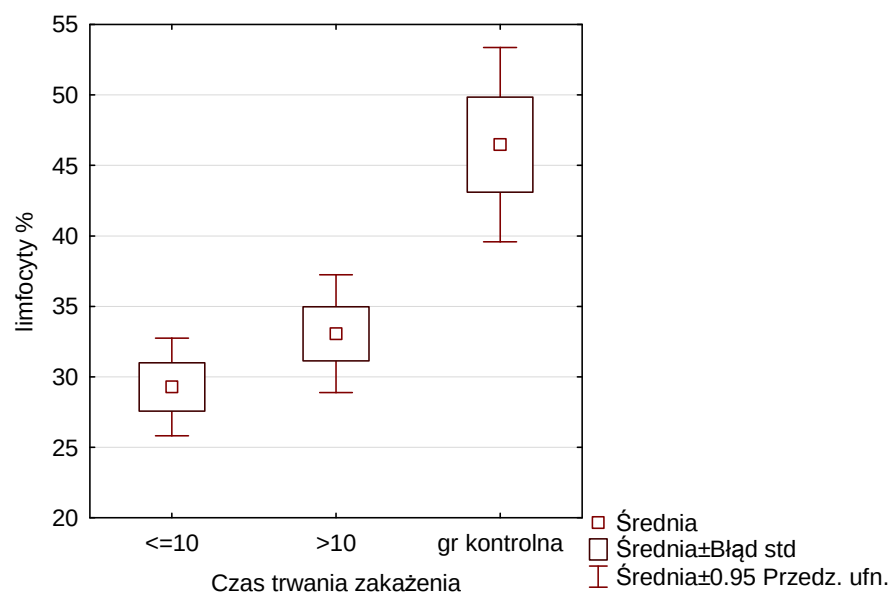
4.4.2 Analiza immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV pacjentów grupie badanej

W Tab. 7 porównano średnie wartości odsetkowe poszczególnych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV pacjentów z grupy badanej.

Tab. 7 Rozkład wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV pacjentów

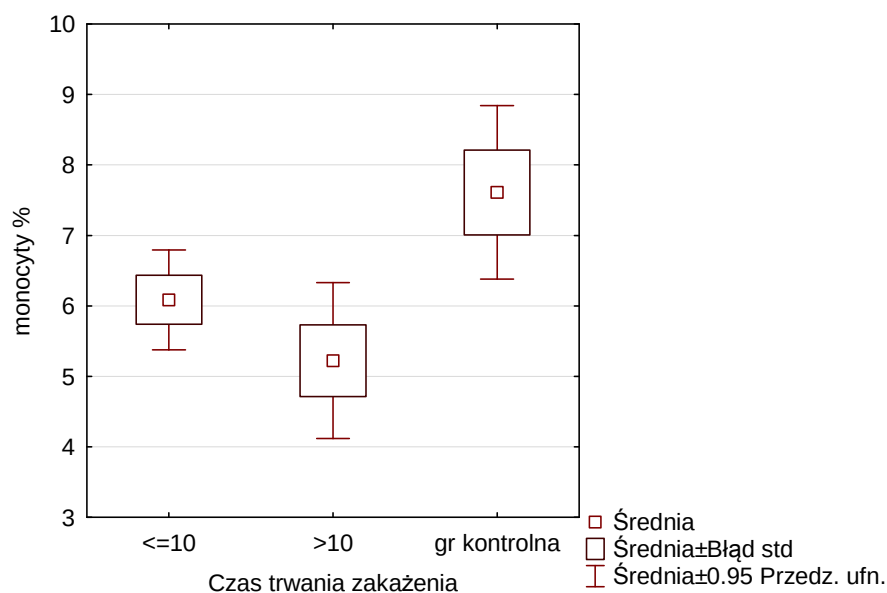
Zmienna	zakażeni HCV >10 lat n=13		zakażeni HCV ≤10 lat n=37		grupa kontrolna n=30	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
limfocyty %	33.06	6.91	29.29	10.39	46.47	18.46
monocyty %	5.22	1.83	6.08	2.11	7.61	3.29
neutrofile %	42.84	11.01	42.86	10.77	38.87	18.62
kwasochnonne %	0.78	0.60	0.90	0.85	2.71	2.50
bazofile %	1.17	1.20	0.90	0.71	0.35	0.27
CD4 %	30.43	6.85	31.74	7.92	35.08	7.25
CD8 %	28.79	6.96	35.65	7.98	25.09	6.85
CD4:CD8	1.08	0.30	0.94	0.43	1.56	0.69
NK %	12.00	6.03	13.15	6.13	10.97	5.95
CD19 %	14.61	9.56	12.77	4.91	19.74	8.25

Średni odsetek limfocytów (Ryc.26) był statystycznie wyższy u dzieci z grupy kontrolnej ($p=0,000$), nie różnił się istotnie w obu podgrupach z grupy badanej.



Ryc. 26 Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV w grupie badanej

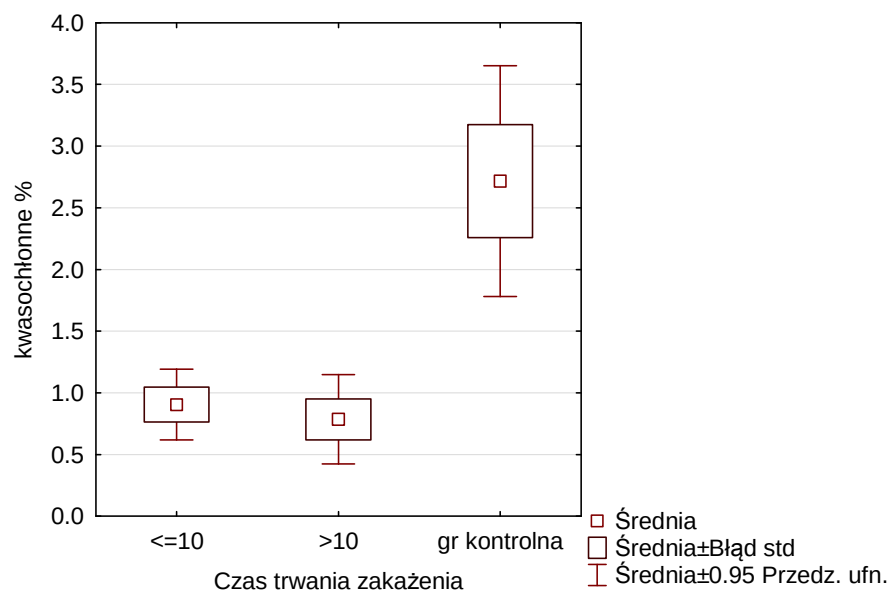
Średnia wartość odsetkowa monocytów (Ryc.27) była najwyższa w grupie kontrolnej, a z kolei najniższa w grupie dzieci z zakażeniem HCV trwającym >10 lat ($p=0,03$).



Ryc. 27 Rozkład średnich wartości odsetkowych monocytów z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV w grupie badanej

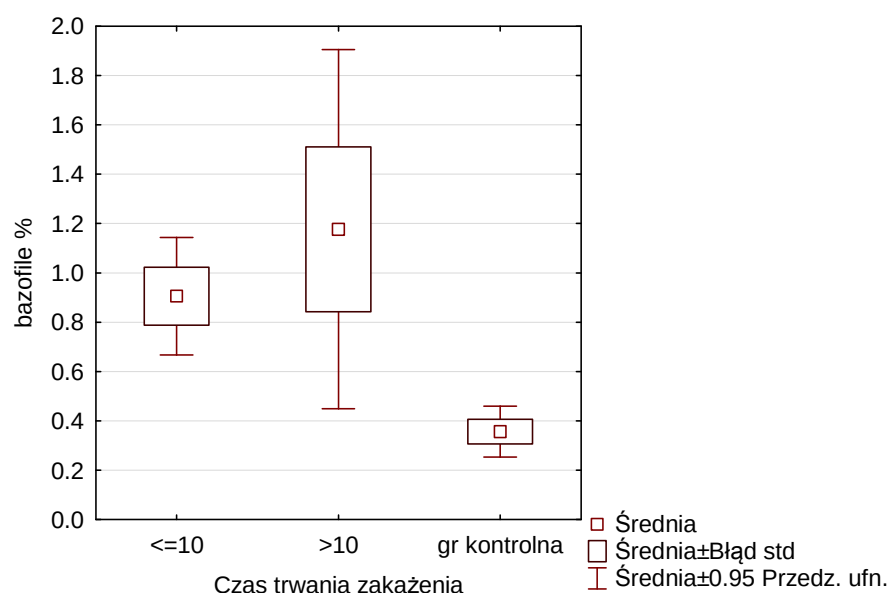
Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy między średnią wartością odsetkową neutrofilów u dzieci zakażonych HCV >10 lat, ≤10 lat oraz w grupie kontrolnej.

W grupie kontrolnej średni odsetek komórek kwasochłonnych (Ryc.28) był istotnie statystycznie najwyższy ($p=0,001$), nie wykazano znaczących różnic między obiema podgrupami w grupie badanej.



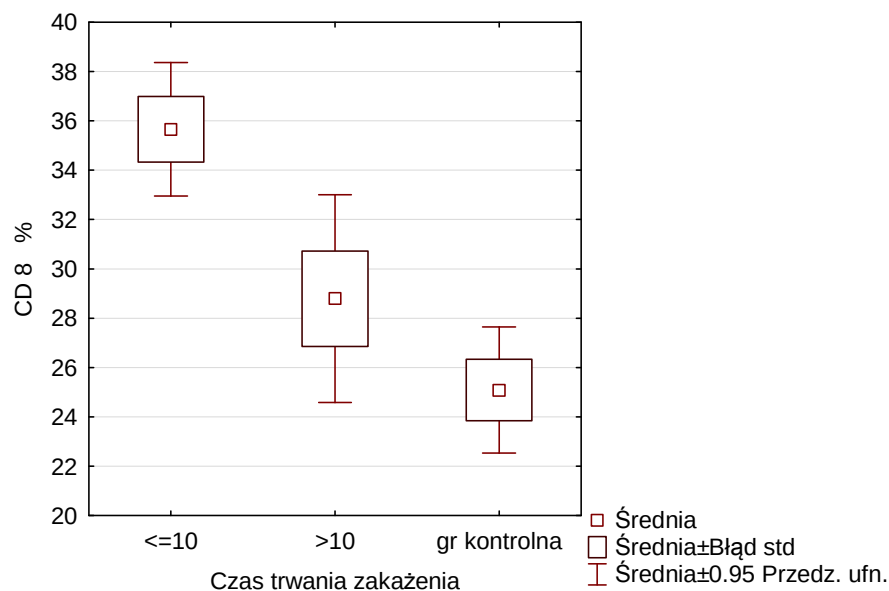
Ryc. 28 Rozkład średnich wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV w grupie badanej

Odsetek bazofilów (Ryc. 29) nie różnił się istotnie między obiema podgrupami z grupy badanej, był zmiennie najniższy w grupie kontrolnej ($p=0,001$).



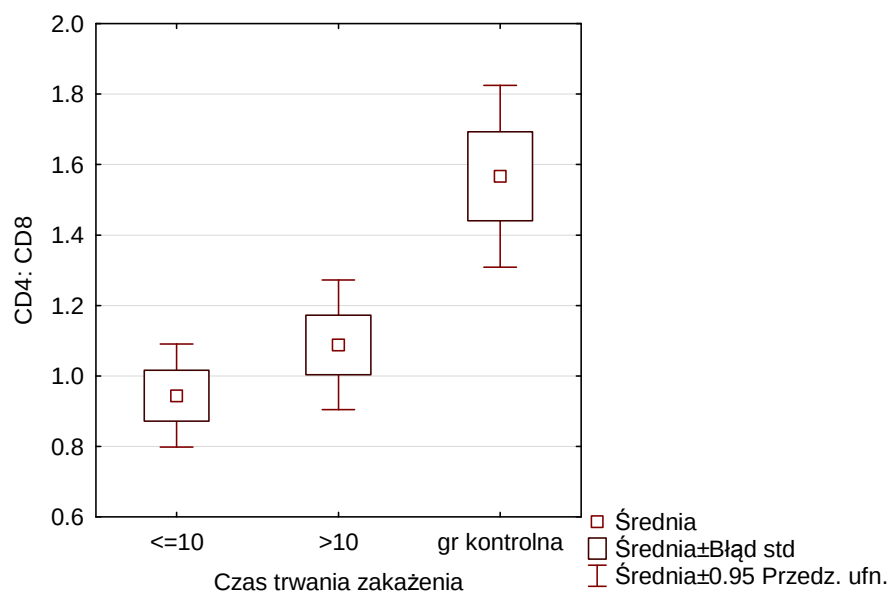
Ryc. 29 Rozkład średnich wartości odsetkowych bazofilów z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV w grupie badanej

Analiza średnich wartości odsetkowych limfocytów CD4 i NK zarówno w grupie dzieci zakażonych HCV >10 lat, ≤10 lat jak i grupie kontrolnej nie wykazała istotnych statystycznie różnic. Wartości odsetka limfocytów CD8 były najwyższe u pacjentów, u których czas trwania zakażenia HCV ≤10 lat, najniższe w grupie kontrolnej ($p=0,000$)(Ryc.30)



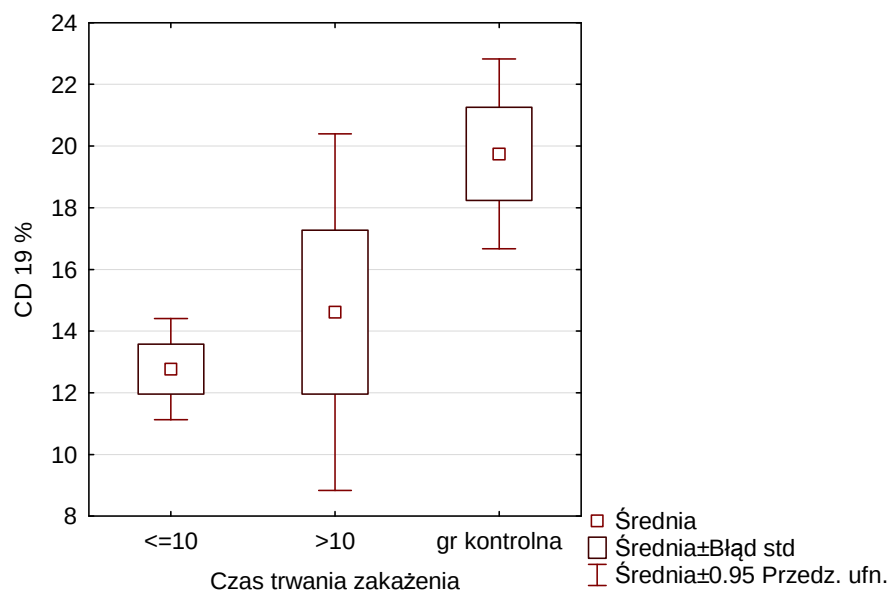
Ryc. 30 Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów CD8 z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV w grupie badanej

Średnia wartość stosunku CD4:CD8 (Ryc.31) była porównywalna w obu podgrupach grupy badanej, zmiennie najwyższa w grupie kontrolnej ($p=0,0002$).



Ryc.31 Rozkład średnich wartości stosunku CD4:CD8 z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV w grupie badanej

Wykazano, że średni odsetek limfocytów CD19 (Ryc.32) był zmiennie najwyższy w grupie kontrolnej, obniżał się wraz z czasem trwania zakażenia HCV ($p=0,0003$).



Ryc.32 Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów CD19 z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV w grupie badanej

4.4.3 Analiza immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem wysokości wirerii HCV u pacjentów z grupy badanej

Wśród dzieci z grupy badanej wyodrębniono dwie podgrupy uwzględniając wysokość wirerii HCV:

- pacjenci z wirerią wysoką
- pacjenci z wirerią niską

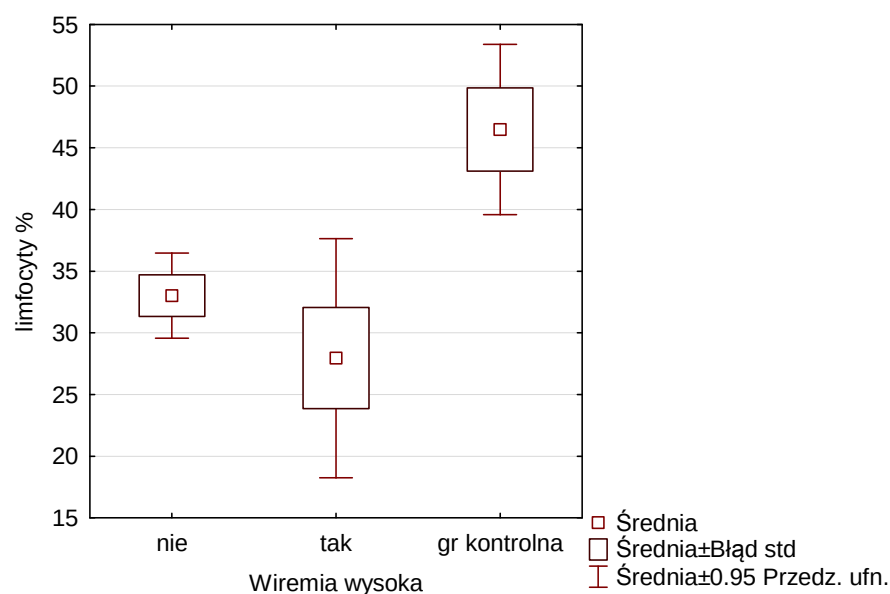
Za wysokie wartości wirerii uznano wartości przekraczające 600 000 IU/ml.

Rozkład średnich wartości odsetkowych poszczególnych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem wysokości wirerii w grupie badanej przedstawia Tab. 8

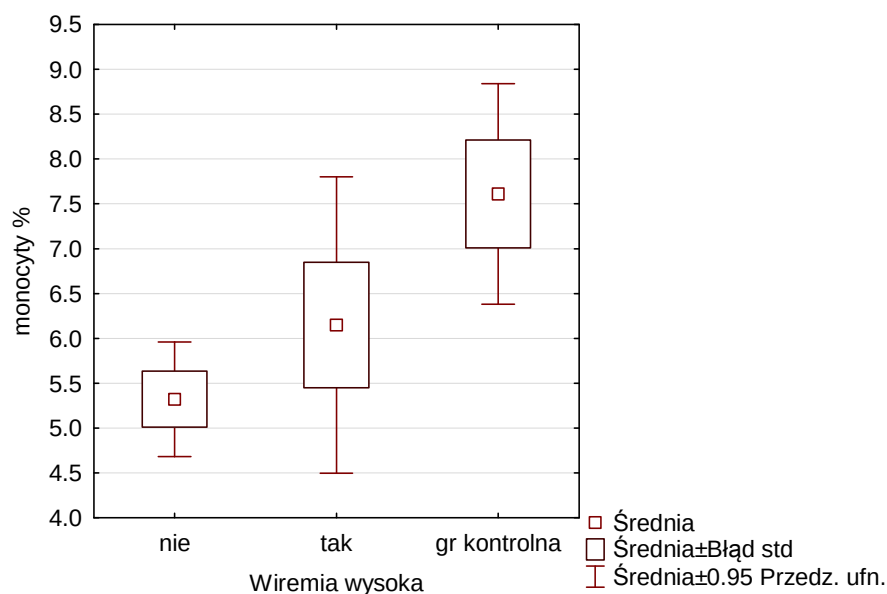
Tab. 8 Rozkład średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem wysokości wirerii w grupie badanej

Zmienna	pacjenci z wiracją wysoką n=18		pacjenci z wiracją niską n=32		grupa kontrolna n=30	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
limfocyty %	27.95	11.59	33.01	9.24	46.47	18.46
monocyty %	6.15	1.97	5.32	1.71	7.61	3.29
neutrofile %	42.46	14.79	40.10	9.76	38.87	18.62
kwasonochłonne %	1.11	0.82	0.77	0.70	2.71	2.50
bazofile %	0.73	0.53	1.03	0.96	0.35	0.27
CD4 %	29.71	6.87	32.50	6.93	35.08	7.25
CD8 %	34.98	7.82	33.55	8.87	25.09	6.85
CD4:CD8	0.90	0.26	1.02	0.45	1.56	0.69
NK %	14.25	6.64	12.83	6.39	10.97	5.95
CD19 %	12.93	6.18	12.87	4.98	19.74	8.25

Wykazano, że średnia wartość odsetkowa limfocytów (Ryc.33) była istotnie statystycznie najwyższa w grupie kontrolnej ($p=0,000$), odsetek monocytów (Ryc.34) korelował z wysokością wirerii, lecz w grupie kontrolnej był zamiennie najwyższy ($p=0,000$). Średni odsetek granulocytów nie różnił się istotnie statystycznie w żadnej z grup.

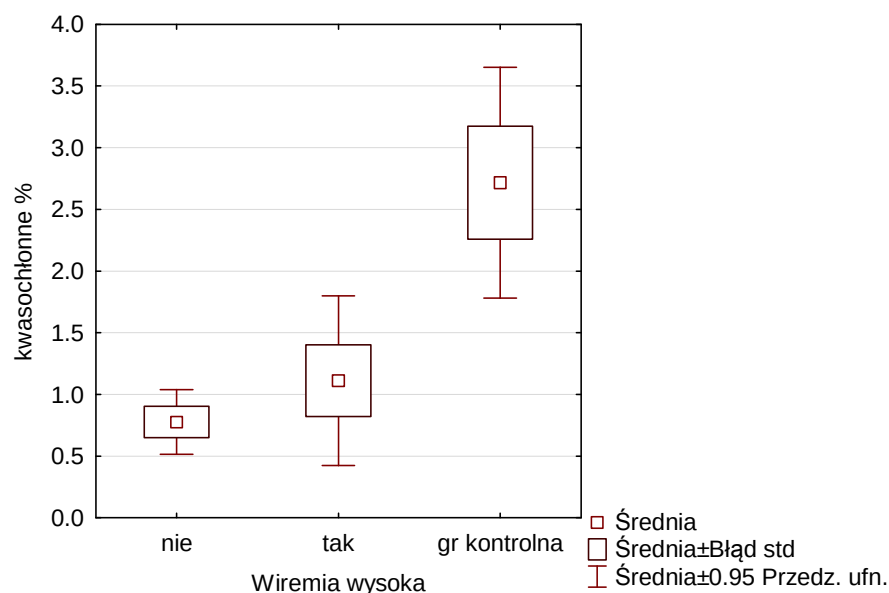


Ryc. 33 Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów z uwzględnieniem wysokości wirerii w grupie badanej

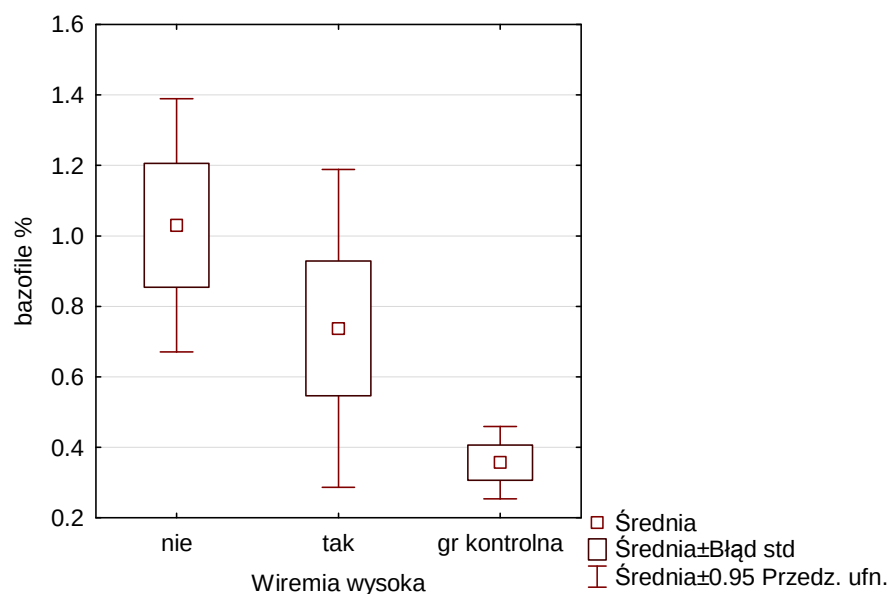


Ryc.34 Rozkład średnich wartości odsetkowych monocytów z uwzględnieniem wysokości wiremii w grupie badanej

Średnia wartość odsetkowa komórek kwasochłonnych (Ryc.35) była najniższa w podgrupie z niską wiremią, zmiennie najwyższa w grupie kontrolnej ($p=0,0001$). Wartość odsetka bazofilów (Ryc.36) była istotnie statystycznie najwyższa w podgrupie z wiremią niską, najniższa w grupie kontrolnej ($p=0,0001$).

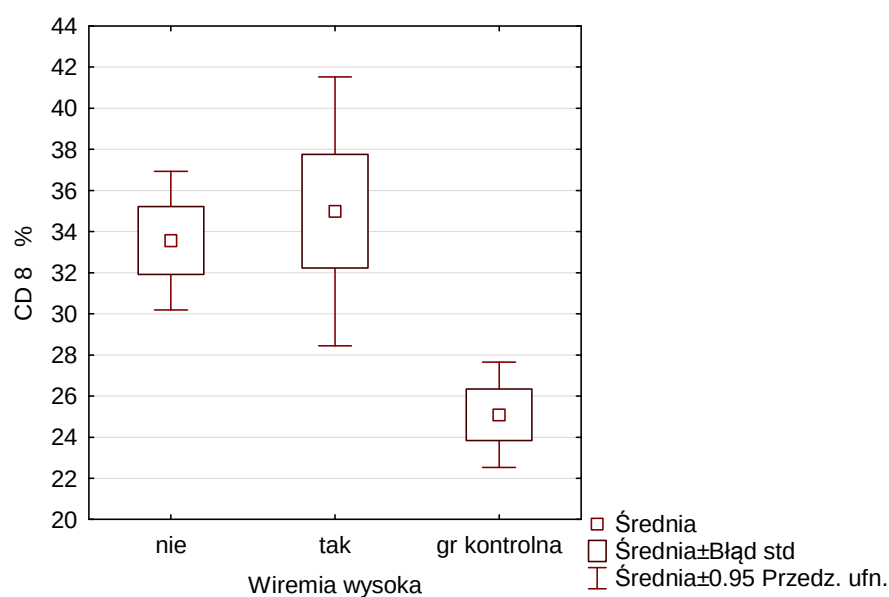


Ryc.35 Rozkład średnich wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych z uwzględnieniem wysokości wiremii w grupie badanej

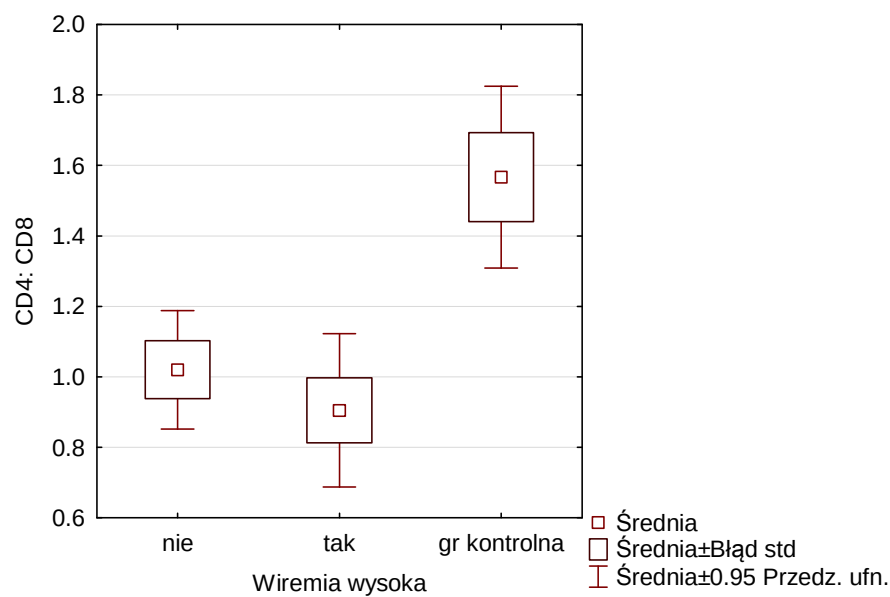


Ryc. 36 Rozkład średnich wartości odsetkowych bazofilów z uwzględnieniem wysokości wiremii w grupie badanej

Analiza średnich wartości odsetkowych limfocytów CD4 i NK nie wykazała istotnych statystycznie różnic między podgrupami niezależnie od wysokości wiremii oraz grupą kontrolną. Odsetek limfocytów CD8 (Ryc.37) był znacząco najniższy w grupie kontrolnej, nie różnił się istotnie między obiema podgrupami grupy badanej ($p=0,0002$). Stosunek CD4:CD8 (Ryc.38) był istotnie statystycznie najwyższy w grupie kontrolnej, nie różnił się niezależnie od wysokości wiremii ($p=0,0007$).

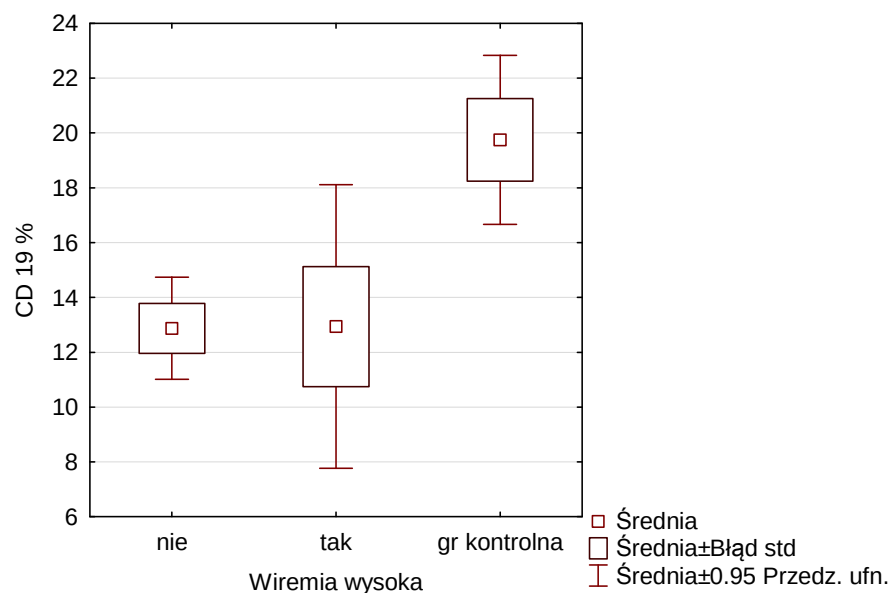


Ryc.37 Rozkład średnich wartości odsetkowych CD8 z uwzględnieniem wysokości wiremii w grupie badanej



Ryc.38 Rozkład wartości stosunku CD4:CD8 z uwzględnieniem wysokości wiremii w grupie badanej

Średnia wartość odsetkowa limfocytów CD19 (Ryc.39) była istotnie statystycznie najwyższa w grupie kontrolnej ($p=0,0005$), nie wykazano znamiennych różnic między obiema podgrupami grupy badanej.



Ryc.39 Rozkład średnich wartości odsetkowych CD19 z uwzględnieniem wysokości wiremii w grupie badanej

4.4.4 Analiza immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem wartości aminotransferaz u pacjentów w grupie badanej

Wśród pacjentów z grupy badanej wyodrębniono dwie podgrupy uwzględniając wartość aminotransferaz:

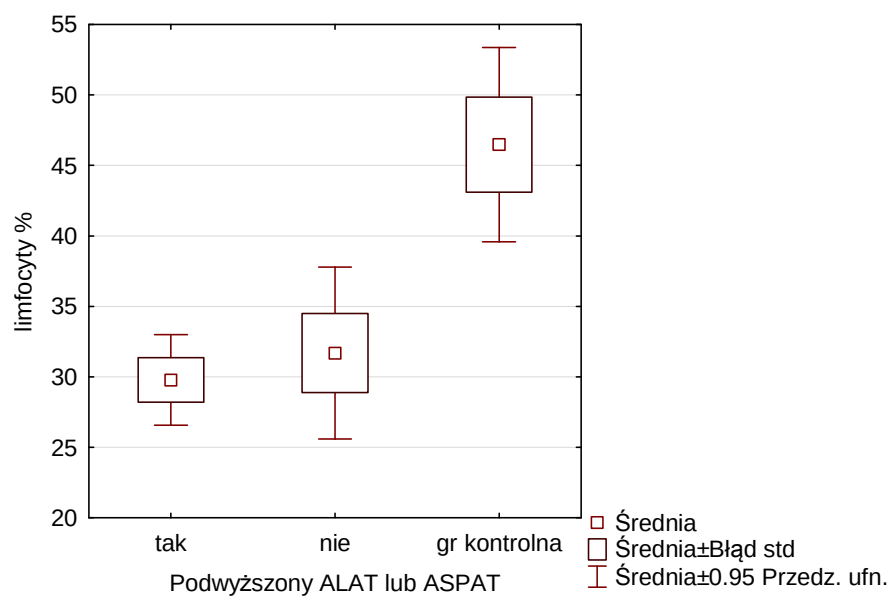
- pacjenci z podwyższoną wartością ALT lub AST lub ALT i AST
- pacjenci z wartością aminotransferaz w zakresie norm

W tab. 9 przedstawiono rozkład średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od wartości aminotransferaz.

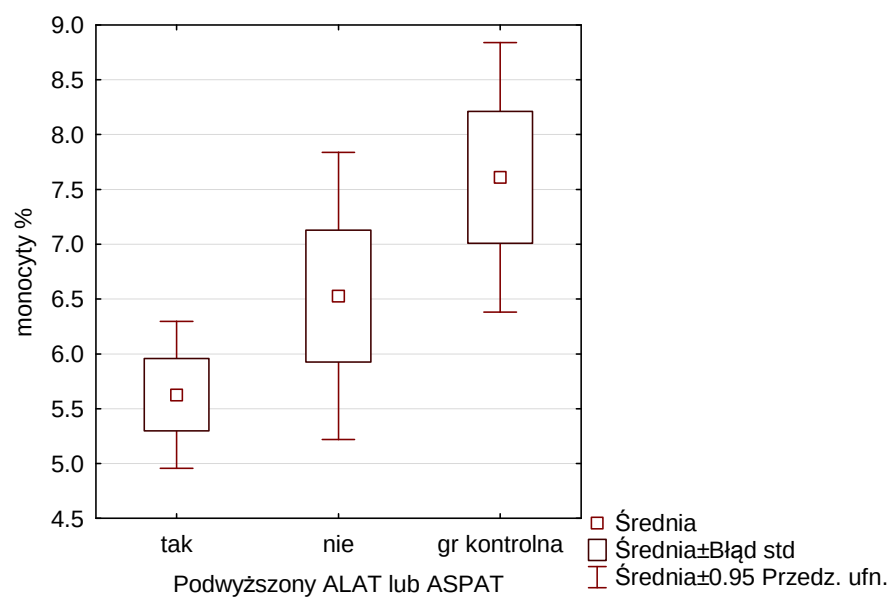
Tab. 9 Rozkład średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od wartości aminotransferaz

Zmienna	pacjenci z podwyższoną wartością aminotransferaz n=37		pacjenci z prawidłową wartością aminotransferaz n=13		grupa kontrolna n=30	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
limfocyty %	29.77	9.63	31.68	10.09	46.47	18.46
monocyty %	5.62	2.00	6.52	2.16	7.61	3.29
neutrofile %	42.43	10.68	44.07	11.16	38.87	18.62
kwasonophilne %	0.91	0.84	0.75	0.64	2.71	2.50
bazofile %	0.97	0.95	0.96	0.55	0.35	0.27
CD4 %	31.74	7.78	30.43	7.34	35.08	7.25
CD8 %	34.14	7.69	32.98	9.93	25.09	6.85
CD4:CD8	0.97	0.43	0.98	0.35	1.56	0.69
NK %	12.82	5.64	12.95	7.41	10.97	5.95
CD19 %	12.81	5.39	14.47	8.79	19.74	8.25

Analiza statystyczna wykazała, że średnia wartość odsetkowa limfocytów (Ryc.40) była statystycznie najwyższa w grupie kontrolnej ($p=0,000$), nie stwierdzono istotnej różnicy między obiema podgrupami grupy badanej. Odsetek monocytów (Ryc.41) był najniższy w podgrupie z podwyższoną wartością aminotransferaz, najwyższy w grupie kontrolnej ($p=0,000$). Nie wykazano znaczących różnic w średniej wartości odsetkowej granulocytów w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

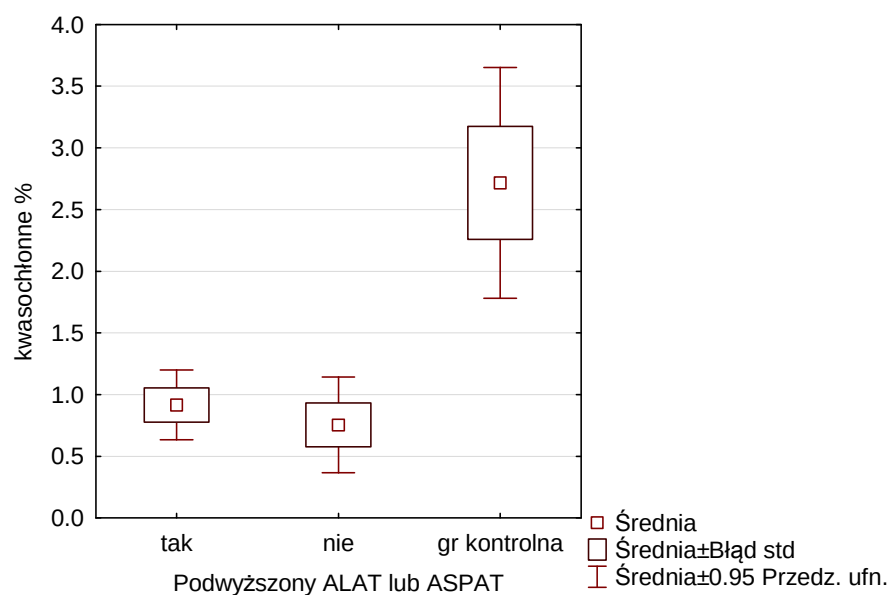


Ryc.40 Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów z uwzględnieniem wartości aminotransferaz w grupie badanej

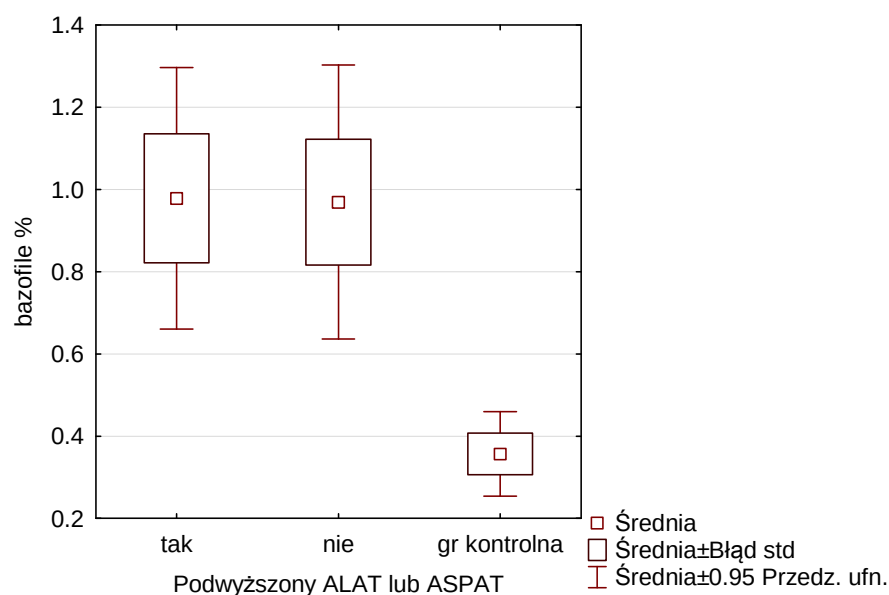


Ryc.41 Rozkład średnich wartości odsetkowych monocytów z uwzględnieniem wartości aminotransferaz w grupie badanej

Odsetek komórek kwasochłonnych (Ryc. 42) nie różnił się istotnie w podgrupach niezależnie od wartości aminotransferaz, był znamienne najwyższy w grupie kontrolnej ($p=0,0001$). Rozkład średnich wartości odsetkowych bazofilów (Ryc.43) podobnie kształtował się w obu podgrupach grupy badanej, w grupie kontrolnej był istotnie statystycznie najniższy ($p=0,000$).

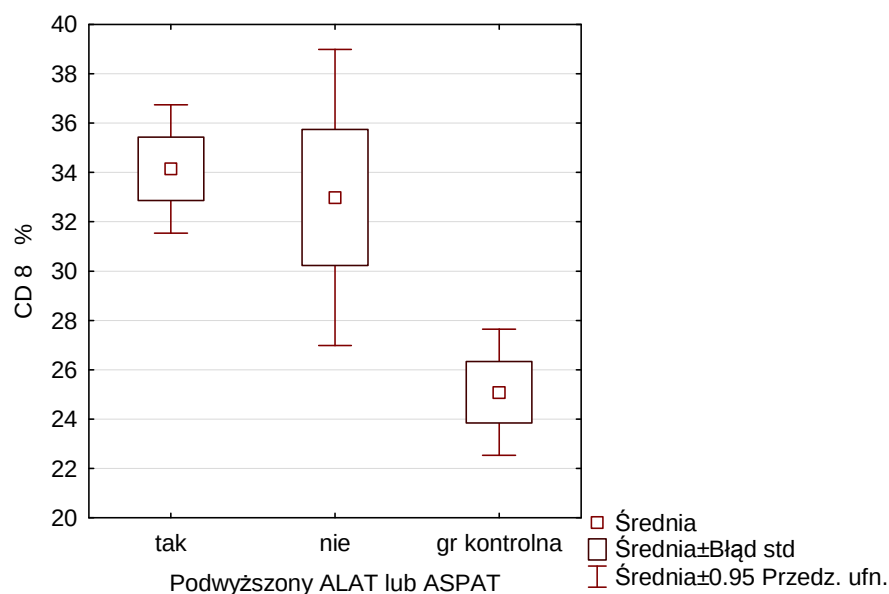


Ryc.42 Rozkład średnich wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych z uwzględnieniem wartości aminotransferaz w grupie badanej



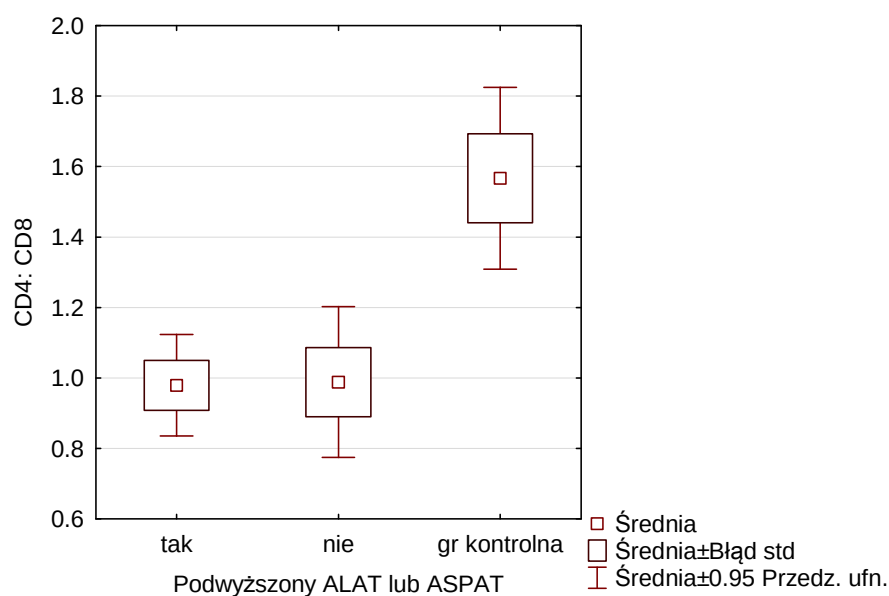
Ryc.43 Rozkład średnich wartości odsetkowych bazofilów z uwzględnieniem wartości aminotransferaz w grupie badanej

Wykazano, że średni odsetek limfocytów CD4 i NK nie różnił się istotnie statystycznie w podgrupach grupy badanej i grupie kontrolnej. Średnia wartość odsetkowa limfocytów CD8 (Ryc.44) była znacząco najniższa w grupie kontrolnej ($p=0,000$), nie wykazano istotnych różnic niezależnie od wartości aminotransferaz w podgrupach grupy badanej.

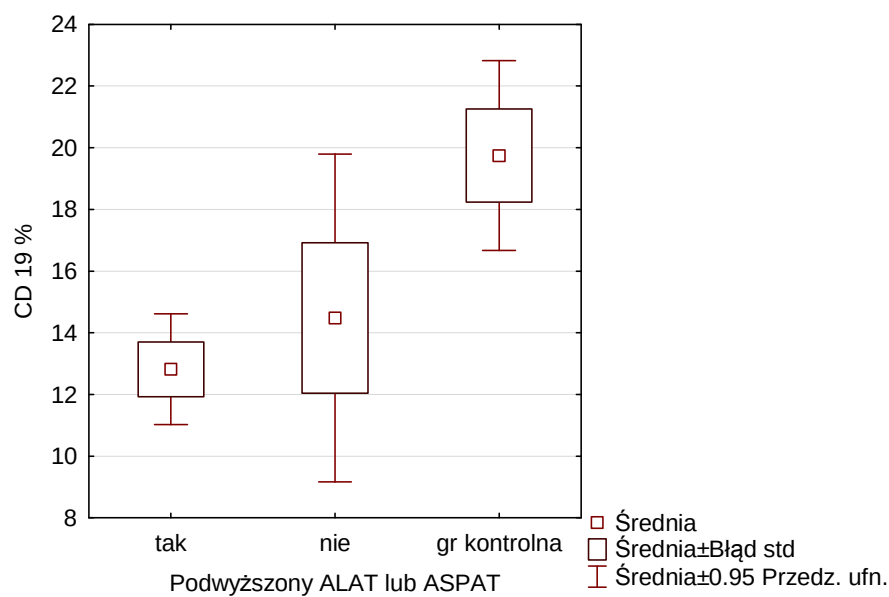


Ryc.44 Rozkład średnich wartości odsetkowych CD8 z uwzględnieniem wartości aminotransferaz w grupie badanej

Analiza statystyczna wykazała, że wartość stosunku CD4:CD8 (Ryc.45) nie różniła się istotnie między obiema podgrupami grupy badanej, była zmiennie najwyższa w grupie kontrolnej ($p=0,0004$). Średni odsetek limfocytów CD19 (Ryc.46) był najniższy w podgrupie z podwyższoną wartością aminotransferaz, najwyższy w grupie kontrolnej ($p=0,0003$).



Ryc.45 Rozkład wartości stosunku CD4:CD8 z uwzględnieniem wartości aminotransferaz w grupie badanej



Ryc.46 Rozkład średnich wartości odsetkowych CD19 z uwzględnieniem wartości aminotransferaz w grupie badanej

4.4.5 Analiza immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem przebytego leczenia przeciwwirusowego pacjentów z grupy badanej

Wśród pacjentów z grupy badanej wyodrębniono dwie podgrupy uwzględniając leczenie przeciwwirusowe:

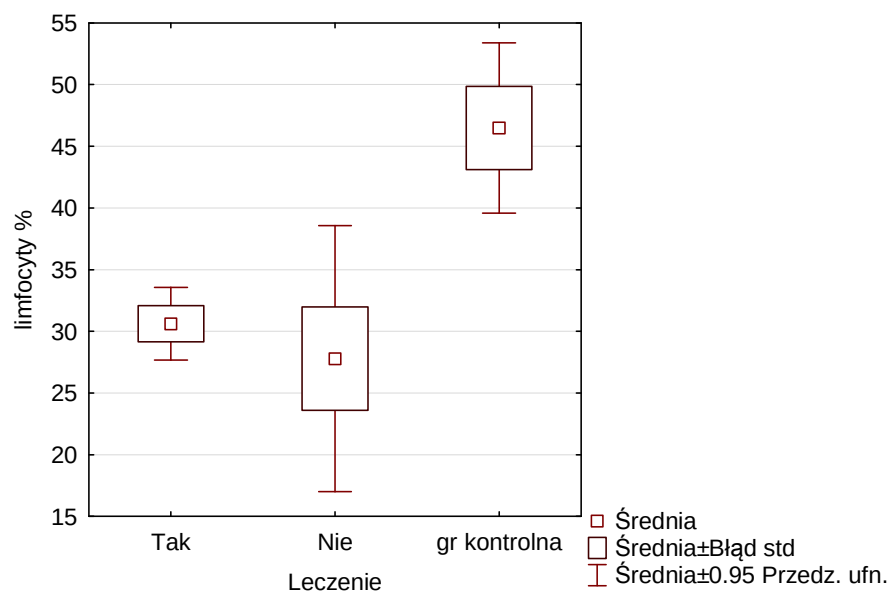
- pacjenci dotychczas nieleczeni
- pacjenci, którzy przebyli terapię PegIFN i RBV

W Tab. 10 przedstawiono rozkład średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od przebytego leczenia przeciwwirusowego.

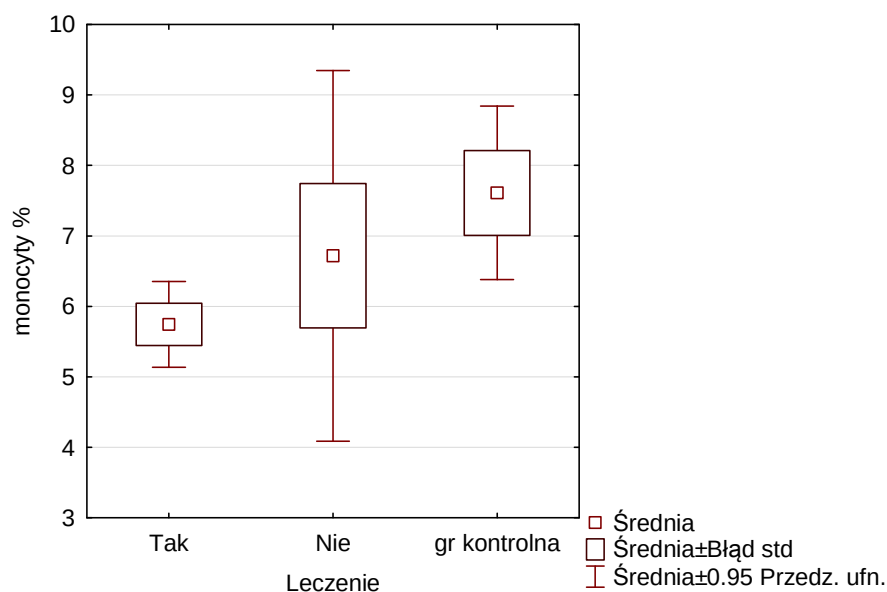
Tab. 10 Rozkład średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od przebytego leczenia przeciwwirusowego

Zmienna	pacjenci leczeni n=44		pacjenci nieleczeni n=6		grupa kontrolna n=30	
	Średnia	SD	Średnia	SD	średnia	SD
limfocyty %	30.61	9.67	27.78	10.27	46.47	18.46
monocyty %	5.74	2.00	6.71	2.50	7.61	3.29
neutrofile %	42.21	10.92	47.56	8.35	38.87	18.62
kwasochłonne %	0.81	0.73	1.31	1.12	2.71	2.50
bazofile %	0.97	0.89	0.98	0.61	0.35	0.27
CD4 %	31.86	6.78	28.01	12.55	35.08	7.25
CD8 %	33.40	8.29	36.90	7.90	25.09	6.85
CD4:CD8	1.00	0.39	0.81	0.48	1.56	0.69
NK %	12.43	6.21	15.93	4.02	10.97	5.95
CD19 %	13.46	6.67	11.66	3.70	19.74	8.25

Średnia wartość odsetkowa limfocytów (Ryc.47) była istotnie statystycznie najwyższa w grupie kontrolnej ($p=0,000$), nie wykazano znaczących różnic między podgrupami grupy badanej. Odsetek monocytów (Ryc.48) był najniższy w podgrupie dzieci leczonych, najwyższy w grupie kontrolnej ($p=0,000$). Nie wykazano znamiennych różnic w średniej wartości odsetka granulocytów między obiema podgrupami grupy badanej i grupą kontrolną.

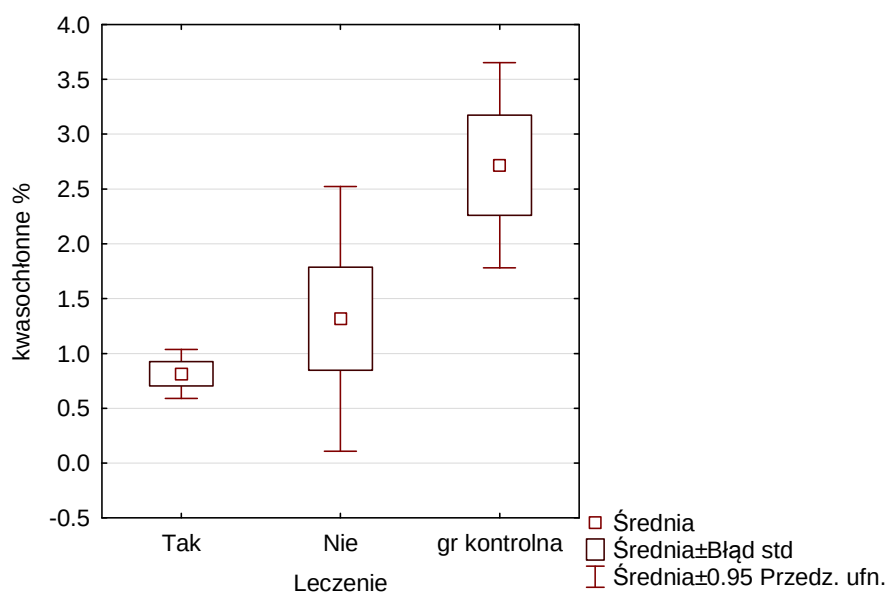


Ryc.47 Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów z uwzględnieniem przebytego leczenia przeciwwirusowego pacjentów grupy badanej

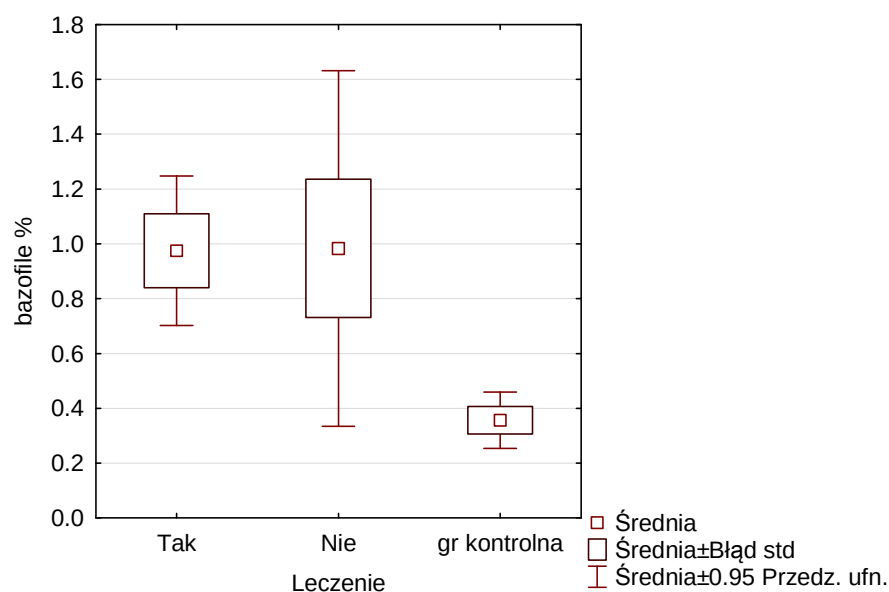


Ryc.48 Rozkład średnich wartości odsetkowych monocytów z uwzględnieniem przebytego leczenia przeciwwirusowego pacjentów grupy badanej

Średnia wartość odsetkowa komórek kwasochłonnych (Ryc.49) była istotnie statystycznie najniższa w podgrupie pacjentów leczonych, najwyższa w grupie kontrolnej ($p=0,0001$). Nie wykazano znaczących różnic w średnim odsetku bazofilów (Ryc.50) między podgrupami grupy badanej, znamienne niską wartość stwierdzono w grupie kontrolnej ($p=0,0001$).

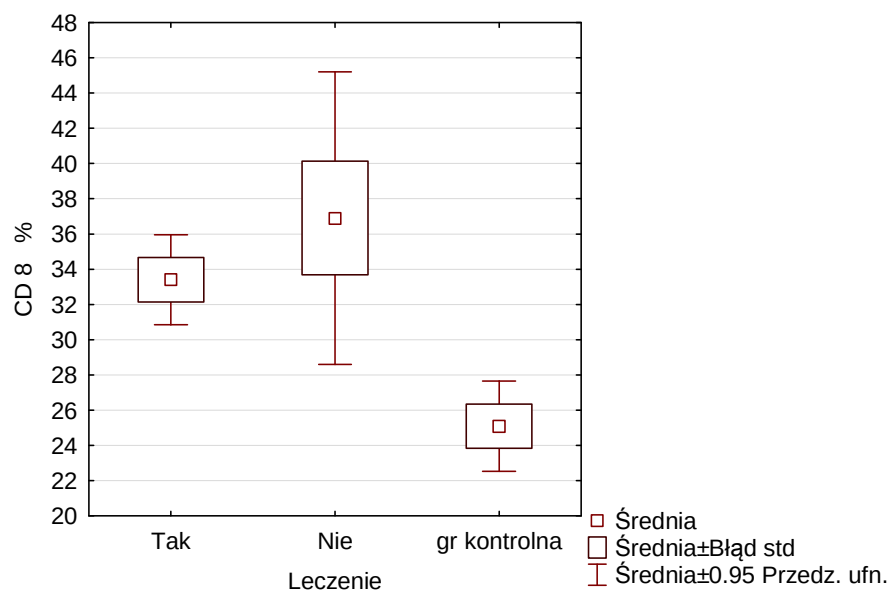


Ryc.49 Rozkład średnich wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych z uwzględnieniem przebytego leczenia przeciwwirusowego pacjentów grupy badanej



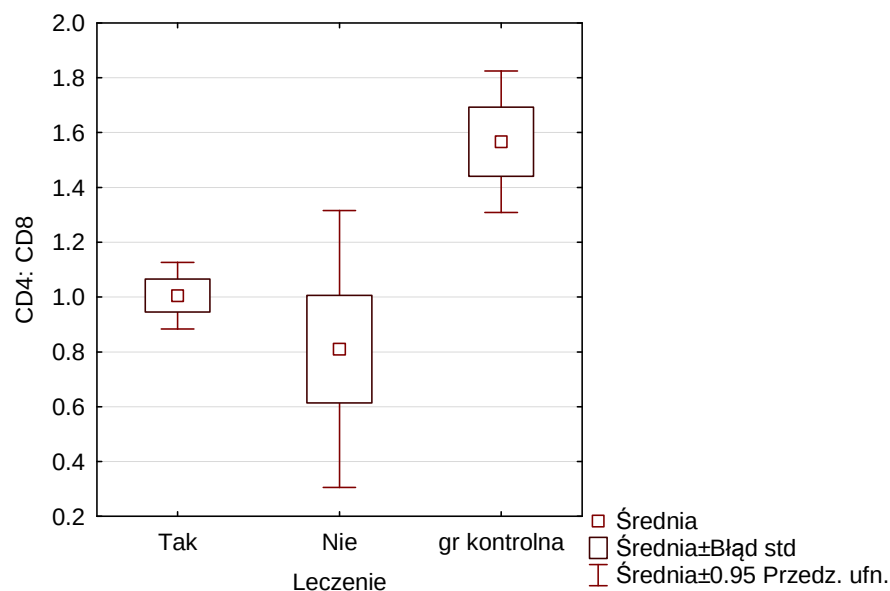
Ryc. 50 Rozkład średnich wartości odsetkowych bazofilów z uwzględnieniem przebytego leczenia przeciwwirusowego pacjentów grupy badanej

Średnia wartość odsetkowa limfocytów CD4 i NK nie różniła się istotnie statystycznie między podgrupami grupy badanej i grupą kontrolną. Odsetek limfocytów CD8 (Ryc.51) był najniższy w grupie kontrolnej ($p=0,000$), porównywalny w podgrupie dzieci leczonych i nieleczonych.

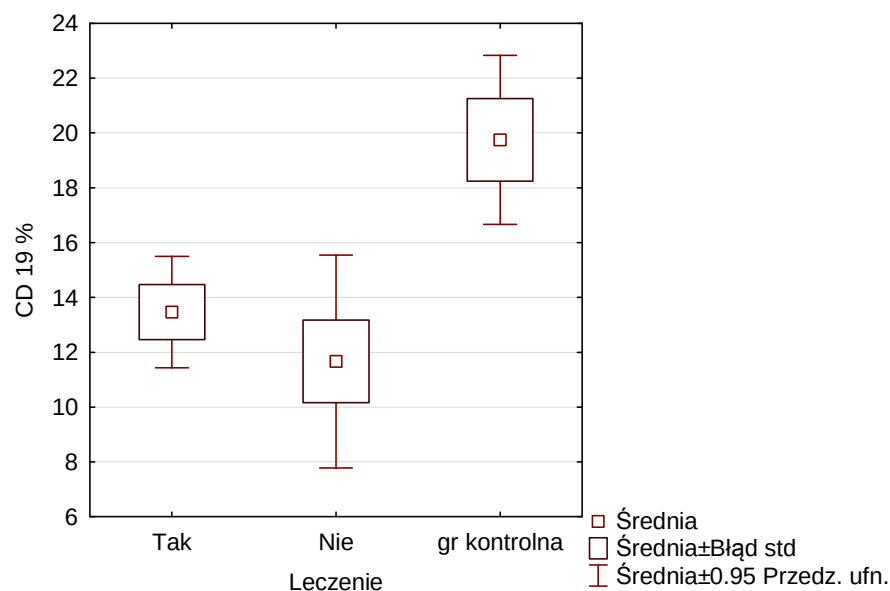


Ryc.51 Rozkład średnich wartości odsetkowych CD8 z uwzględnieniem przebytego leczenia przeciwwirusowego dzieci grupy badanej

Wykazano, że stosunek limfocytów CD4:CD8 (Ryc.52) był znacząco najwyższy w grupie kontrolnej, porównywalny w obu podgrupach grupy badanej ($p=0,000$). Podobną zależność stwierdzono analizując średni odsetek limfocytów CD 19 ($p=0,0003$) (Ryc.53).



Ryc.52 Rozkład wartości stosunku CD4:CD8 z uwzględnieniem przebytego leczenia przeciwwirusowego pacjentów grupy badanej



Ryc. 53 Rozkład średnich wartości odsetkowych CD19 z uwzględnieniem przebytego leczenia przeciwwirusowego pacjentów grupy badanej

4.4.6 Analiza immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem efektów leczenia przeciwwirusowego pacjentów z grupy badanej

Wśród dzieci z grupy badanej wyodrębniono dwie podgrupy uwzględniając efekt leczenia przeciwwirusowego:

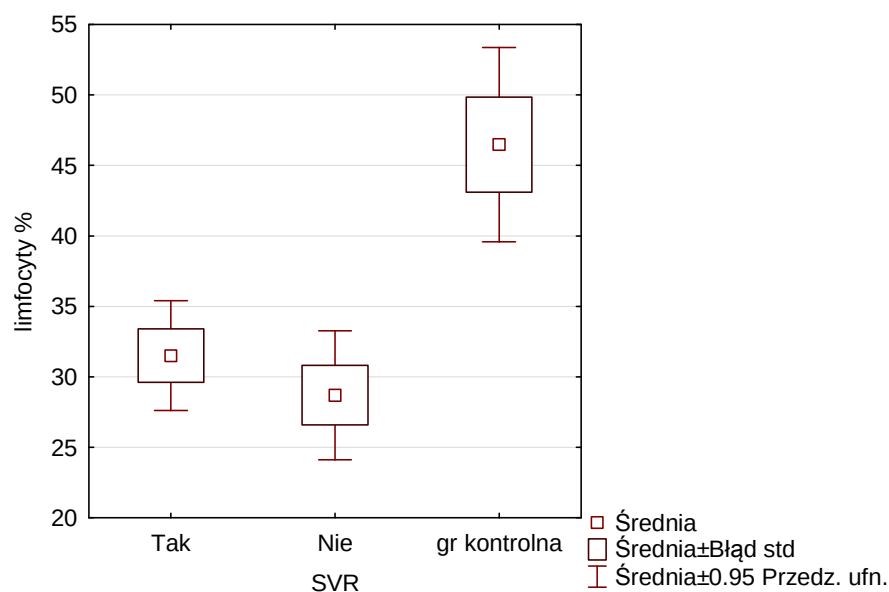
- pacjenci którzy uzyskali SVR
- pacjenci którzy nie uzyskali SVR

W Tab. 11 przedstawiono rozkład średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od efektów terapii przeciwwirusowej.

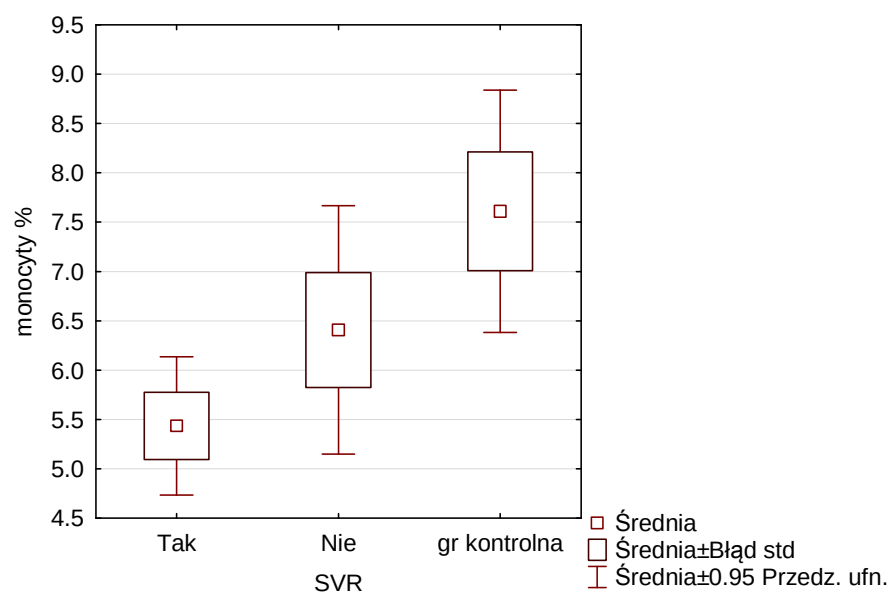
Tab. 11 Rozkład średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od efektów terapii przeciwwirusowej

Zmienna	pacjenci którzy uzyskali SVR n=30		pacjenci którzy nie uzyskali SVR n=14		grupa kontrolna n=30	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
limfocyty %	31.50	10.39	28.70	7.91	46.47	18.46
monocyty %	5.43	1.87	6.40	2.17	7.61	3.29
neutrofile %	41.11	11.35	44.59	9.92	38.87	18.62
kwasochłonne %	0.86	0.84	0.71	0.41	2.71	2.50
bazofile %	0.93	0.97	1.07	0.71	0.35	0.27
CD4 %	32.29	6.09	30.96	8.23	35.08	7.25
CD8 %	34.36	7.61	31.42	9.54	25.09	6.85
CD4:CD8	0.98	0.39	1.05	0.40	1.56	0.69
NK %	12.66	6.55	11.95	5.62	10.97	5.96
CD19 %	13.91	7.25	12.50	5.31	19.74	8.25

Średni odsetek limfocytów (Ryc.54) nie różnił się istotnie statystycznie między obiema podgrupami grupy badanej, był najwyższy w grupie kontrolnej ($p=0,000$). Średnia wartość odsetkowa monocytów (Ryc.55) była najniższa w podgrupie dzieci, które uzyskały SVR, najwyższa w grupie kontrolnej ($p=0,000$). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic między odsetkiem neutrofilów między obiema podgrupami grupy badanej i grupą kontrolną.

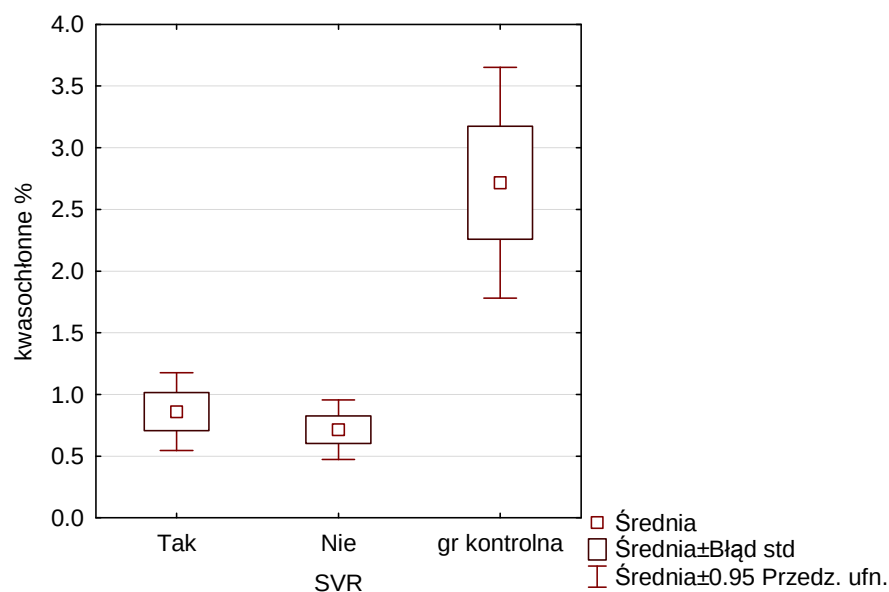


Ryc.54 Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od efektów terapii przeciwwirusowej

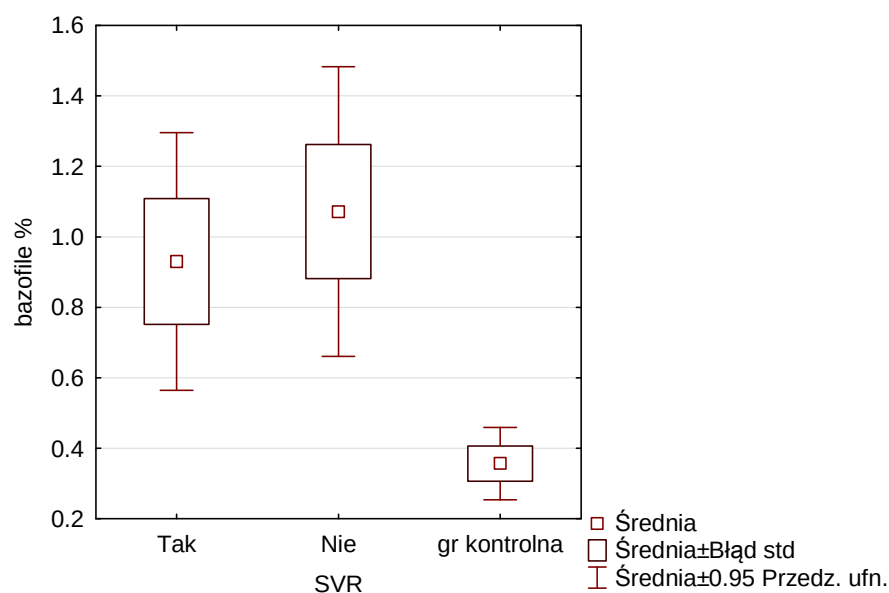


Ryc.55 Rozkład średnich wartości odsetkowych monocytów z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od efektów terapii przeciwwirusowej

Analiza średnich wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych (ryc.56) nie wykazała istotnych różnic między obiema podgrupami grupy badanej, stwierdzono najwyższą wartość w grupie kontrolnej ($p=0,0001$). Odsetek bazofilów był najniższy w grupie kontrolnej, porównywalny w obu podgrupach grupy badanej (ryc. 57) ($p=0,0001$).

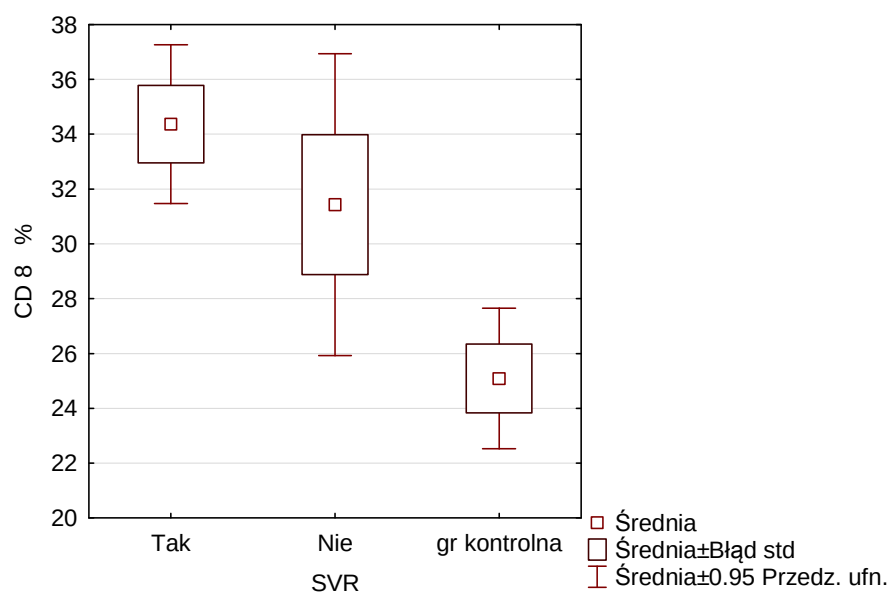


Ryc. 56 Rozkład średnich wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od efektów terapii przeciwwirusowej



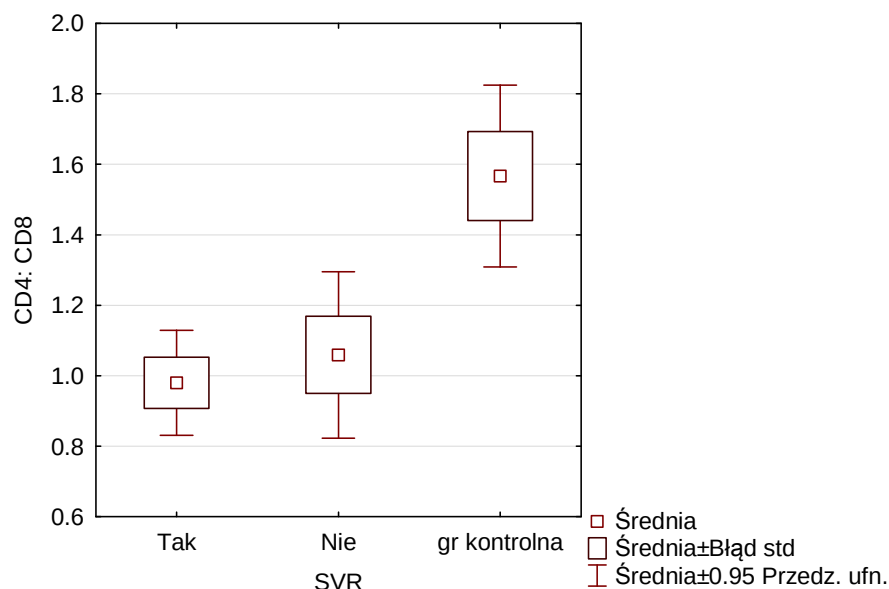
Ryc.57 Rozkład średnich wartości odsetkowych bazofilów z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od efektów terapii przeciwwirusowej

Nie wykazano znamiennej różnicy w średniej wartości odsetkowej limfocytów CD4 i NK między obiema podgrupami grupy badanej oraz grupą kontrolną. Najwyższy średni odsetek CD 8 stwierdzono w podgrupie pacjentów którzy uzyskali SVR, najniższy – w grupie kontrolnej ($p=0,0001$)(Ryc.58)

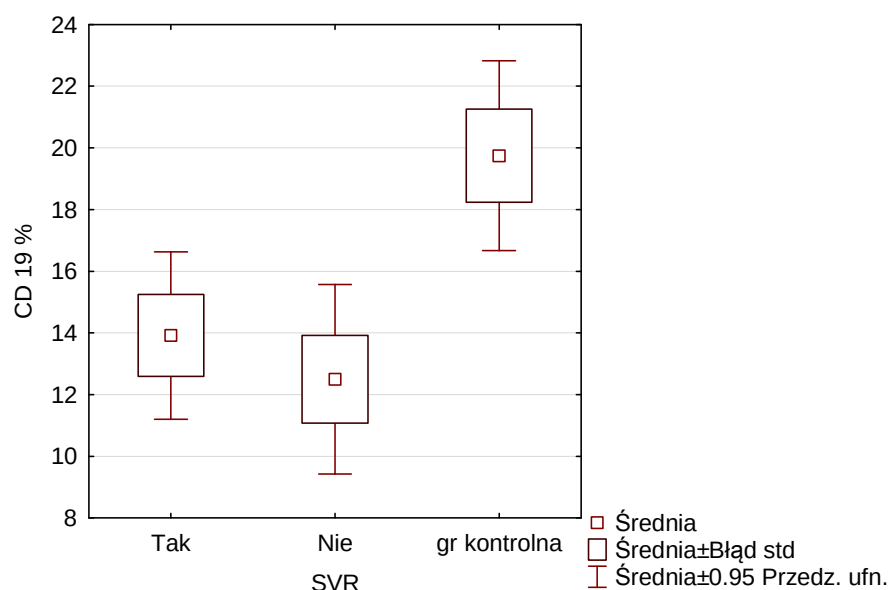


Ryc.58 Rozkład średnich wartości odsetkowych CD8 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od efektów terapii przeciwwirusowej

Średni stosunek CD4:CD8 (Ryc.59) był najniższy w podgrupie pacjentów, którzy uzyskali SVR, nieco wyższy w podgrupie pacjentów, którzy nie uzyskali SVR, istotnie statystycznie najwyższy w grupie kontrolnej ($p=0,0009$). Odsetek limfocytów CD19 (Ryc.60) był najwyższy w grupie kontrolnej, porównywalny w obu podgrupach grupy badanej ($p=0,0005$).



Ryc.59 Rozkład średnich wartości stosunku CD4:CD8 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od efektów terapii przeciwwirusowej



Ryc.60 Rozkład średnich wartości odsetkowych CD19 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od efektów terapii przeciwwirusowej

4.4.7 Analiza immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności innych chorób dodatkowych

Wśród pacjentów z grupy badanej wyodrębniono dwie podgrupy uwzględniając obecność innych chorób przewlekłych:

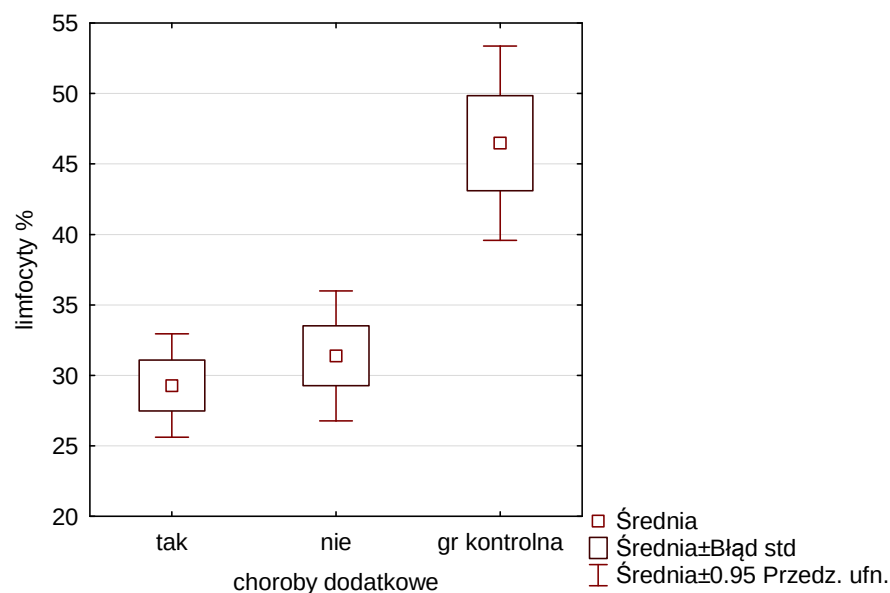
- pacjenci z innymi chorobami przewlekłymi (choroby reumatoidalne, choroby tarczycy, schorzenia onkologiczne)
- pacjenci bez innych chorób przewlekłych

W Tab. 12 przedstawiono rozkład średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności innych chorób przewlekłych.

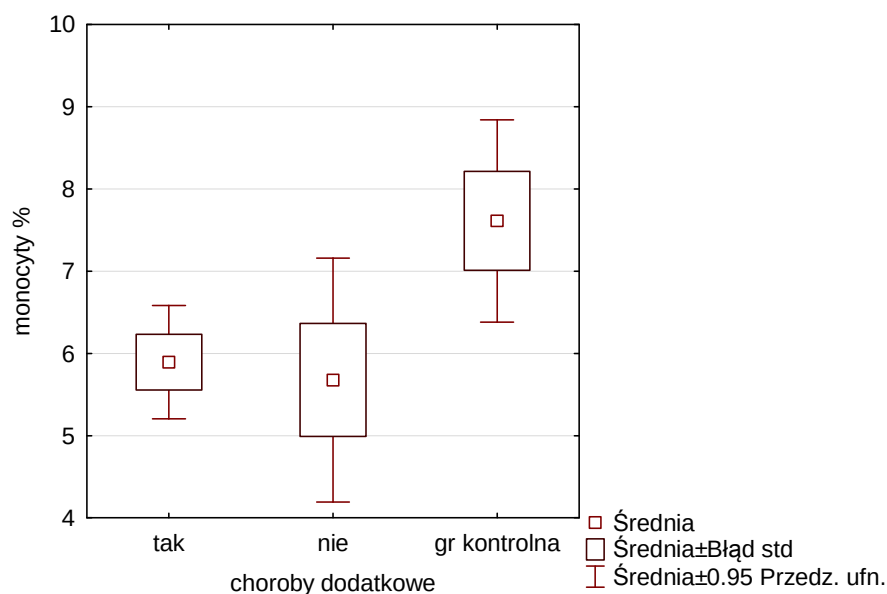
Tab. 12 Rozkład średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności innych chorób przewlekłych

Zmienna	pacjenci z chorobami przewlekłymi n=36		pacjenci bez chorób przewlekłych n=14		grupa kontrolna n=30	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
limfocyty %	29.28	10.36	31.39	7.97	46.47	18.46
monocyty %	5.89	1.94	5.67	2.56	7.61	3.29
neutrofile %	43.27	11.26	42.65	10.59	38.87	18.62
kwasonocytne %	0.86	0.68	1.05	1.05	2.71	2.50
bazofile %	0.84	0.67	1.23	1.21	0.35	0.27
CD4 %	30.85	7.54	33.06	8.52	35.08	7.25
CD8 %	35.51	8.19	30.19	7.15	25.09	6.85
CD4:CD8	0.91	0.42	1.13	0.38	1.56	0.69
NK %	12.27	5.55	13.60	6.52	10.97	5.95
CD19 %	13.35	7.15	12.86	5.01	19.74	8.25

Średni odsetek limfocytów (Ryc.61) nie różnił się istotnie statystycznie między obiema podgrupami grupy badanej, był najwyższy w grupie kontrolnej ($p=0,000$). Wartość odsetka monocytów (Ryc.62) była nieco wyższa w grupie kontrolnej w porównaniu do obu podgrup grupy badanej ($p=0,045$). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w średniej wartości odsetkowej neutrofilów między obiema podgrupami grupy badanej i grupą kontrolną.

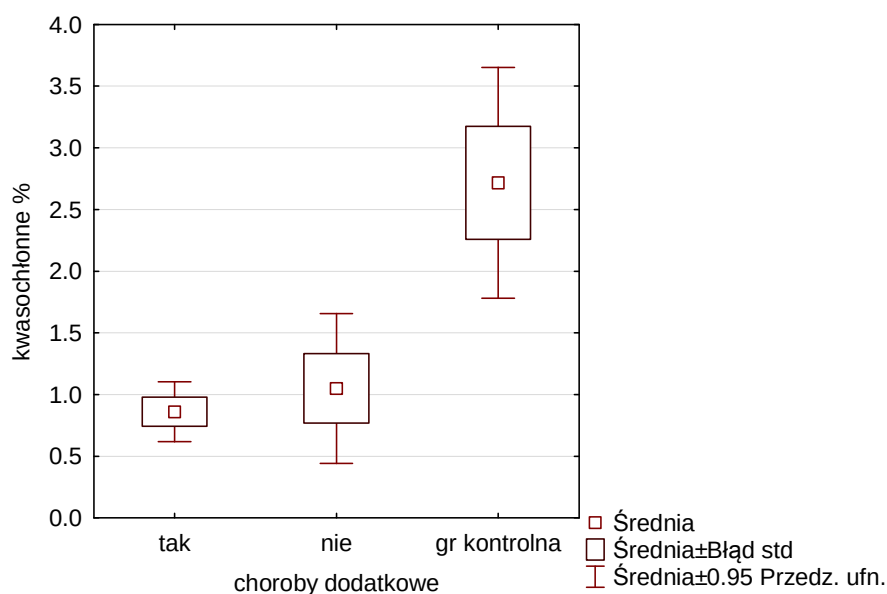


Ryc.61 Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności chorób dodatkowych

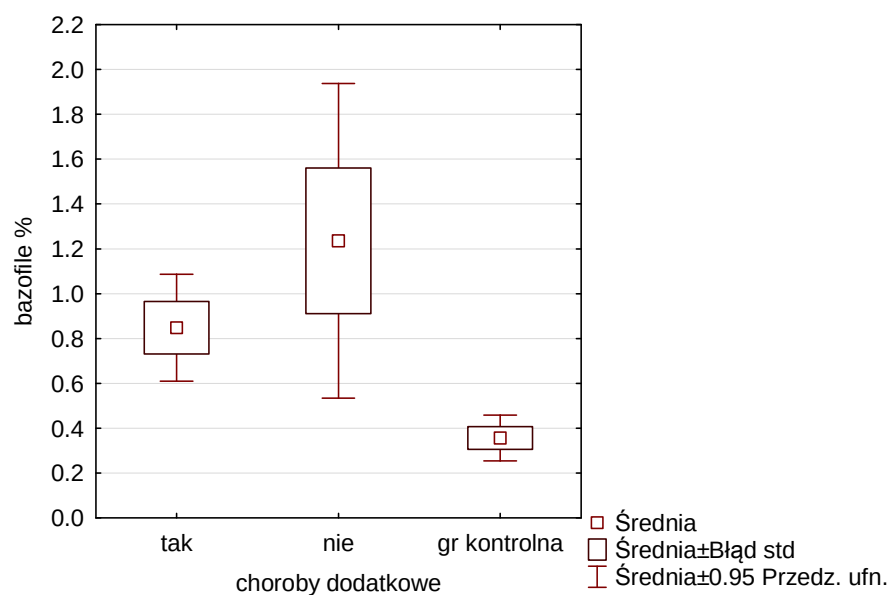


Ryc. 62 Rozkład średnich wartości odsetkowych monocytów z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności chorób dodatkowych

Średnia wartość odsetkowa komórek kwasochłonnych (Ryc.63) była najniższa w podgrupie z obecnością chorób dodatkowych, najwyższa w grupie kontrolnej ($p=0,0002$). Średni odsetek bazofilów (Ryc.64) był istotnie statystycznie najniższy w grupie kontrolnej, najwyższy w podgrupie pacjentów bez chorób dodatkowych ($p=0,0001$).

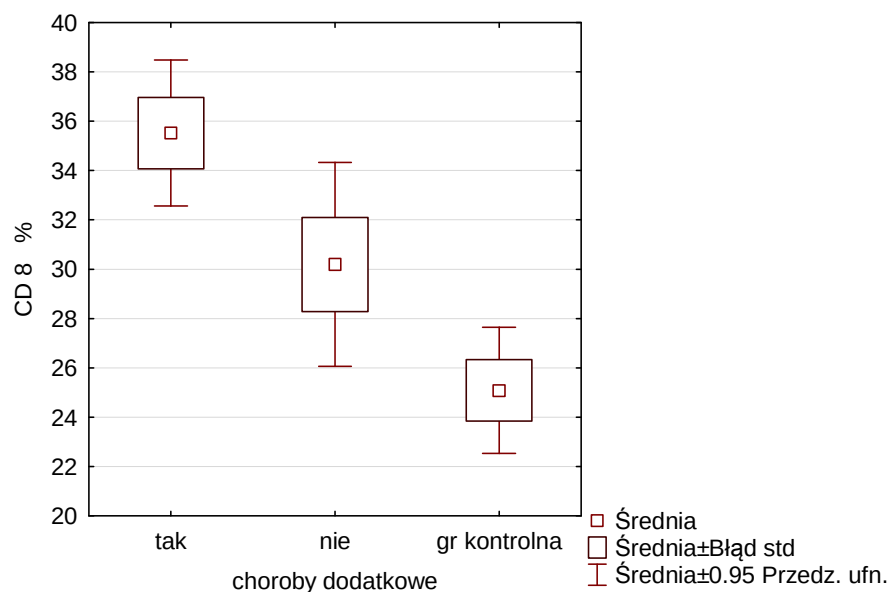


Ryc.63 Rozkład średnich wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności chorób dodatkowych



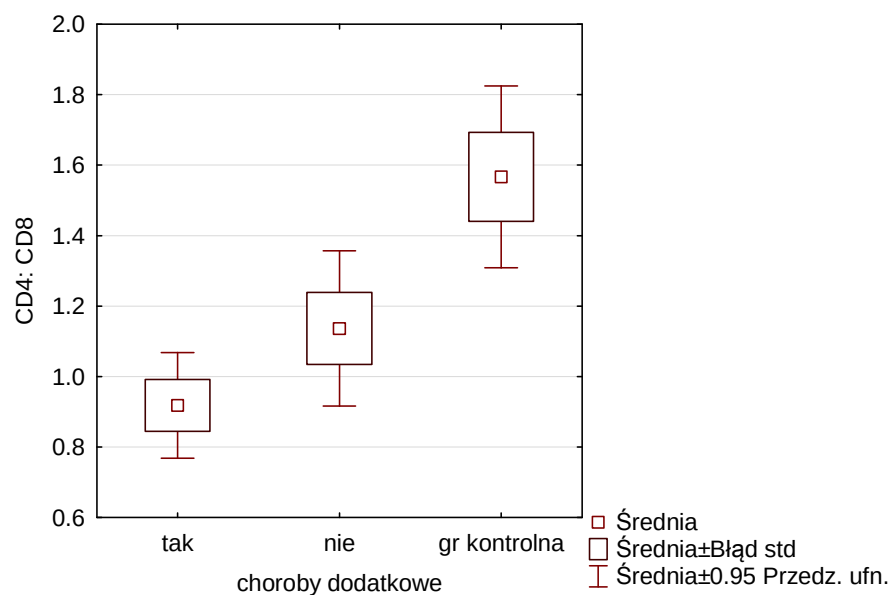
Ryc.64 Rozkład średnich wartości odsetkowych bazofilów z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności chorób dodatkowych

Nie wykazano znamiennej różnicy w średniej wartości odsetkowej limfocytów CD4 i NK między obiema podgrupami grupy badanej oraz grupą kontrolną. Najwyższy średni odsetek CD8 (Ryc.65) stwierdzono w podgrupie pacjentów z chorobami dodatkowymi, najniższy w grupie kontrolnej ($p=0,000$).

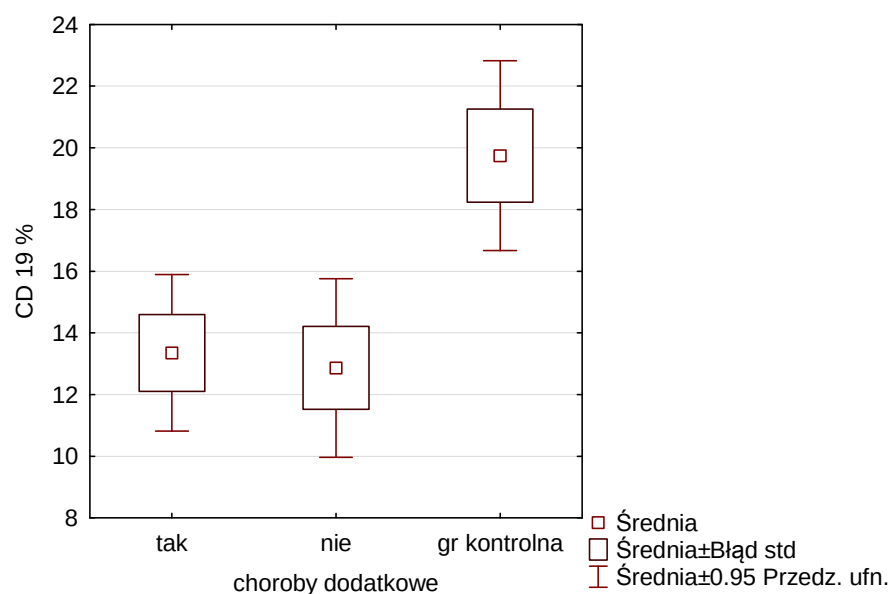


Ryc.65 Rozkład średnich wartości odsetkowych CD8 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności chorób dodatkowych

Średni stosunek CD4:CD8 (Ryc.66) był najniższy w podgrupie pacjentów z obecnością chorób dodatkowych, najwyższy w grupie kontrolnej ($p=0,0002$). Odsetek limfocytów CD19 (Ryc.67) był najwyższy w grupie kontrolnej, porównywalny w obu podgrupach grupy badanej ($p=0,0003$).



Ryc.66 Rozkład średnich wartości odsetkowych stosunku CD4:CD8 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności chorób dodatkowych



Ryc.67 Rozkład średnich wartości odsetkowych stosunku CD19 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności chorób dodatkowych

4.4.8 Analiza immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autoprzeciwciał

Wśród pacjentów z grupy badanej wyodrębniono dwie podgrupy uwzględniając obecność autoprzeciwciał:

- pacjenci z dodatnimi autoprzeciwciałami
- pacjenci bez obecności autoprzeciwciał

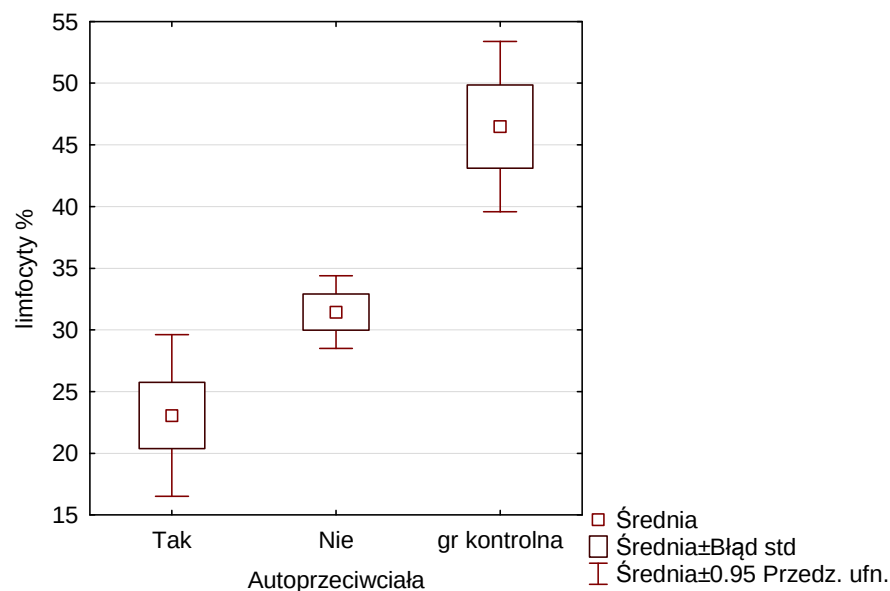
W Tab. 13 przedstawiono rozkład średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autoprzeciwciał.

Tab. 13 Rozkład średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autoprzeciwciał

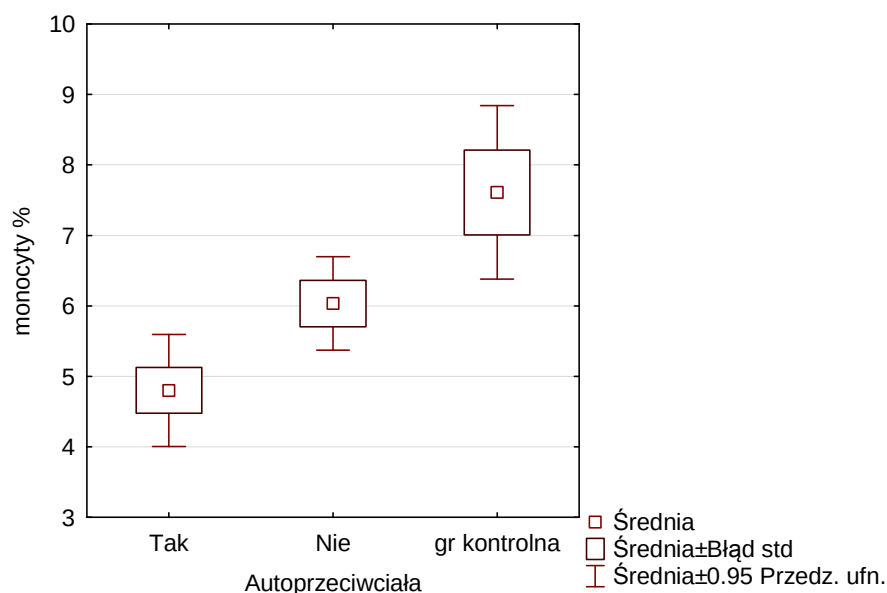
Zmienna	pacjenci z dodatnimi autoprzeciwciałami n=7		pacjenci z ujemnymi autoprzeciwciałami n=43		grupa kontrolna n=30	
	średnia	SD	Średnia	SD	średnia	SD
limfocyty %	23.07	7.08	31.44	9.60	46.47	18.46
monocyty %	4.80	0.85	6.03	2.15	7.61	3.29
neutrofile %	51.61	4.64	41.43	10.77	38.87	18.62
kwasonne %	1.10	1.03	0.83	0.75	2.71	2.50
bazofile %	0.52	0.27	1.04	0.90	0.35	0.27
CD4 %	30.44	4.99	31.56	7.99	35.08	7.25
CD8 %	38.47	8.36	33.06	8.07	25.09	6.85
CD4:CD8	0.82	0.30	1.00	0.42	1.56	0.69
NK %	10.84	4.39	13.18	6.28	10.97	5.95
CD19 %	13.07	6.78	13.27	6.40	19.74	8.25

Średnia wartość odsetkowa limfocytów (Ryc.68) była najniższa w podgrupie pacjentów z obecnością autoprzeciwciał, nieco wyższa w podgrupie z ujemnymi autoprzeciwciałami, znacznie najwyższa w grupie kontrolnej ($p=0,000$). Średni odsetek monocytów (Ryc.69) był najwyższy w grupie kontrolnej, najniższy w grupie pacjentów z obecnością

autoprzeciwciał ($p=0,000$). Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w średniej wartości odsetkowej neutrofilów między obiema podgrupami grupy badanej i grupą kontrolną.

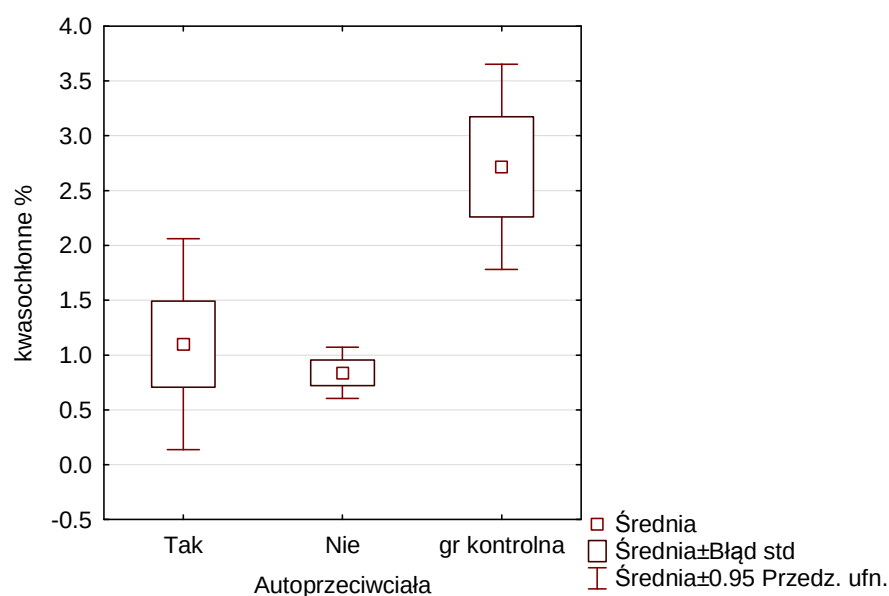


Ryc. 68 Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autoprzeciwciał

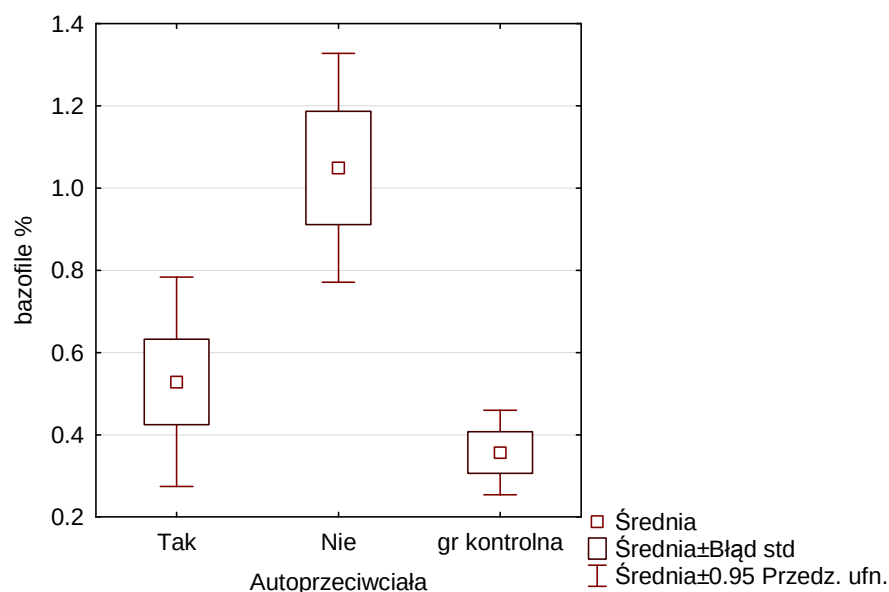


Ryc. 69 Rozkład średnich wartości odsetkowych monocytów z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autoprzeciwciał

Średnia wartość odsetkowa komórek kwasochłonnych (Ryc.70) była najniższa w podgrupie pacjentów bez autoprzeciwciał, najwyższa w grupie kontrolnej ($p=0,001$). Odsetek bazofilów (Ryc.71) był najwyższy w podgrupie pacjentów bez autoprzeciwciał, najniższy w grupie kontrolnej ($p=0,000$).

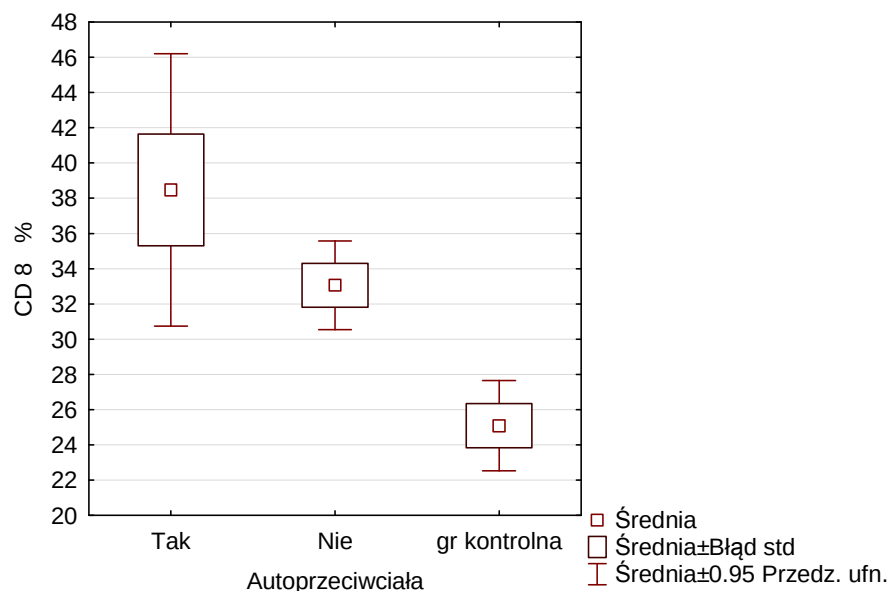


Ryc. 70 Rozkład średnich wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autoprzeciwciał



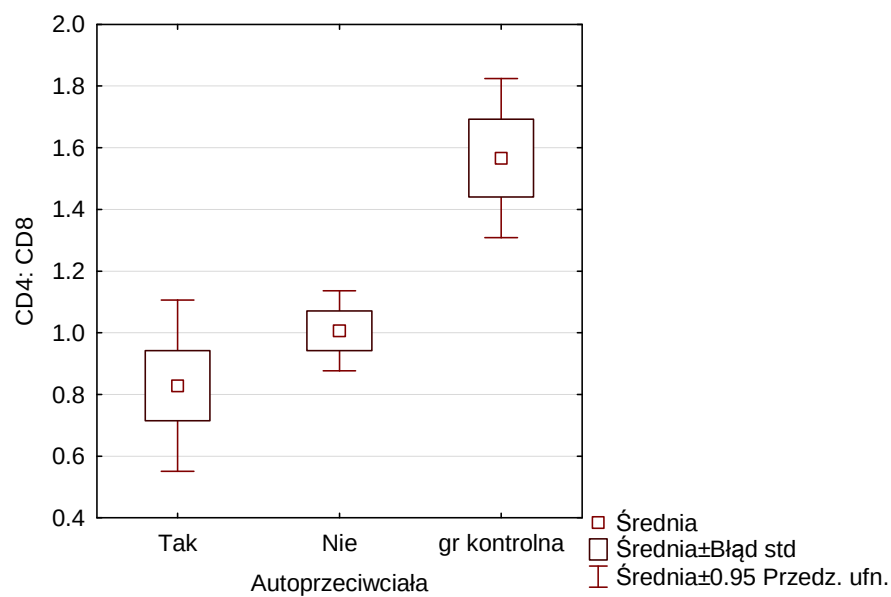
Ryc.71 Rozkład średnich wartości odsetkowych bazofilów z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autoprzeciwciał

Nie wykazano znamiennej różnicy w średniej wartości odsetkowej limfocytów CD4 i NK między obiema podgrupami grupy badanej oraz grupą kontrolną. Najwyższy średni odsetek limfocytów CD8 (Ryc.72) stwierdzono w podgrupie pacjentów z dodatnimi autoprzeciwciałami, najniższy w grupie kontrolnej ($p=0,000$).

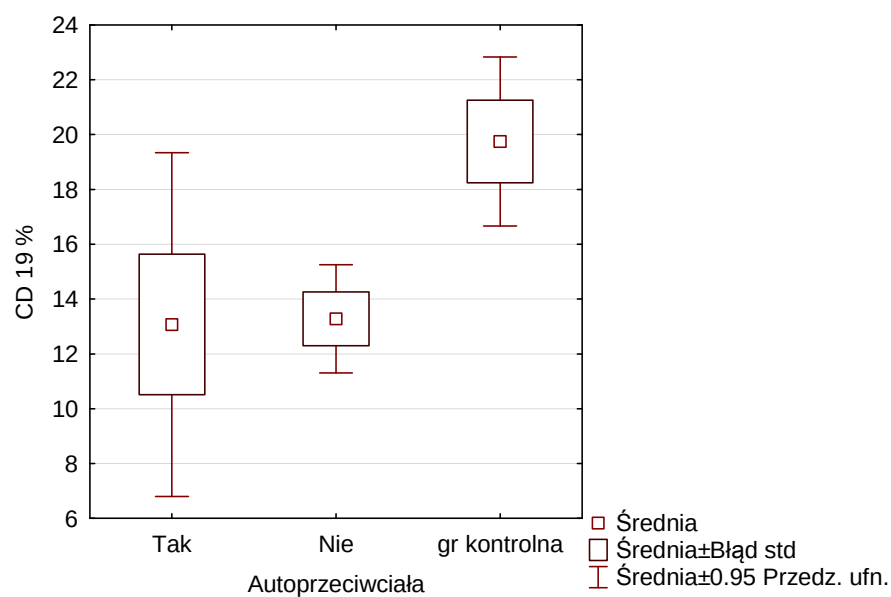


Ryc.72 Rozkład średnich wartości odsetkowych CD8 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autoprzeciwciał

Średni stosunek CD4:CD8 (Ryc.73) był najniższy w podgrupie pacjentów z dodatnimi autoprzeciwciałami, najwyższy w grupie kontrolnej ($p=0,0002$). Odsetek limfocytów CD19 (Ryc.74) był najwyższy w grupie kontrolnej, porównywalny w obu podgrupach grupy badanej ($p=0,0003$).



Ryc.73 Rozkład średnich wartości stosunku CD4:CD8 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autooprzeciwciał



Ryc.74 Rozkład średnich wartości odsetkowych CD19 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autooprzeciwciał

5. DYSKUSJA

Pomimo licznych badań nad PWZW C u dzieci, wiele aspektów dotyczących udziału układu odpornościowego w patogenezie oraz przebiegu choroby pozostaje nadal niejasnych. W ostatnich latach z uwagi na poprawę warunków opieki zdrowotnej maleje częstość zakażeń HCV u dzieci drogą parenteralną. Jednak ze względu na występowanie infekcji u około 2% populacji ludzi dorosłych oraz brak skutecznej profilaktyki czynnej i okołoporodowej rodzą się dzieci, które nabyły HCV drogą wertykalną. Stąd zakażenie HCV w grupie pediatrycznej jest obserwowane dość często. Przebieg zakażenia HCV ma na ogół charakter przewlekły, co może wynikać zarówno z cech biologicznych wirusa (m.in. jego aktywności replikacyjnej) jak i wrodzonych lub nabytych zaburzeń odporności chorego. U dzieci te ostatnie mogą odgrywać szczególnie istotną rolę. Układ odpornościowy człowieka pozostaje bowiem w stanie ciągłego rozwoju [46]. Patogeneza zakażenia HCV jest ściśle związana z odpowiedzią immunologiczną na antygeny wirusa. Jego peptydy antygenowe prezentowane limfocytom T CD4+ przez komórki prezentujące antygen, powodują stymulację układu immunologicznego, co może sprzyjać zarówno eliminacji zakażonych hepatocytów, jak i powodować degradację niezajętego procesem zapalnym miększu wątroby. Pobudzenie układu immunologicznego będące następstwem zakażenia wirusowego powoduje zmiany składu subpopulacji krwinek białych a zwłaszcza limfocytów, co znajduje odbicie w składzie komórkowym krwi obwodowej [57]. Zakażony organizm reaguje na pojawienie się antygenów wirusowych produkcją przeciwciał oraz uczulonych limfocytów T. Obecność wykładników nabytej odporności humoralnej obserwuje się najczęściej po okresie 7-8 tygodni od zakażenia HCV. Rola ochronna tych przeciwciał jest dyskusyjna - ich zdolności neutralizujące wobec HCV są niewielkie. Powstające przeciwciała mają głównie znaczenie prognostyczne i diagnostyczne, lecz nie odgrywają roli w patogenezie choroby [58].

Celem pracy była próba znalezienia odpowiedzi na pytanie czy istnieją różnice w składzie różnych subpopulacji krwinek białych, a zwłaszcza limfocytów krwi obwodowej u dzieci z PWZW C, w porównaniu z grupą pacjentów niezakażonych HCV. Poszukiwano również związku między płcią chorych dzieci, czasem trwania zakażenia, wysokością wirerii, aktywnością aminotransferaz, przebiegiem dotychczasowego leczenia oraz obecnością chorób współistniejących w konfrontacji ze zmianami w immunofenotypie leukocytów krwi obwodowej. Dostępne dane dotyczące powyższych aspektów zwłaszcza w grupie pediatrycznej są ograniczone, stąd podjęcie i opracowanie tego tematu wydaje się

uzasadnione. W pracy zaprezentowano wyniki składu odsetkowego leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem wszystkich elementów tj. limfocytów, monocytów, granulocytów obojętnochłonnych, komórek kwasochłonnych, bazofilów. Z uwagi na największy udział limfocytów w mechanizmach odpornościowych w dyskusji wykorzystano wyniki dotyczące tej subpopulacji.

W ostatnich latach coraz więcej jest doniesień na temat powiązań zaburzeń budowy lub/i funkcji poszczególnych składowych odporności wrodzonej z przebiegiem wirusowych zapaleń wątroby i nasileniem procesu jej włóknienia. Wirus zapalenia wątroby typu C nie wywołuje bezpośredniego efektu cytopatycznego wobec komórek wątroby. Zmiany patologiczne w tym narządzie są wynikiem aktywacji układu odpornościowego. Udowodniono, że efekt cytotoksyczny limfocytów TCD8+ odpowiedzialny jest za uszkodzenie hepatocytów do ich martwicy włącznie [59]. Włóknienie jest zazwyczaj procesem powolnym i trudnym do przewidzenia. Tempo zmian zachodzących w wątrobie często ulega przyspieszeniu lub zwolnieniu z niewyjaśnionych przyczyn. Progresja zmian włóknistych w wątrobie nasila się wraz z czasem trwania zakażenia, prowadząc do najgroźniejszych powikłań PWZW C jakimi są przebudowa marska i rozwój niewydolności wątroby [113]. Poznanie wzajemnych interakcji układu odpornościowego może mieć zastosowanie w monitorowaniu postępu włóknienia wątroby.

W pracy wykazano, że obie grupy pacjentów tj. dzieci z PWZW C oraz grupa kontrolna różnią się istotnie pod względem składu subpopulacji leukocytów krwi obwodowej. W grupie dzieci zakażonych HCV wzrastał odsetek limfocytów efektorowych, potencjalnie cytotoksycznych TCD8+. Wzrost subpopulacji limfocytów TCD8+ wpływał na obniżenie stosunku limfocytów T (CD4:CD8). Podobne obserwacje można znaleźć w wielu opracowaniach [103,104,105,106]. W materiale nie stwierdzono korelacji między zmianami wartości limfocytów TCD8+ oraz stosunku CD4:CD8 a płcią pacjentów, wysokością wirerii oraz aktywnością aminotransferaz. Wartość odsetka TCD8+ była wyższa w grupie dzieci, u których czas trwania zakażenia HCV był krótszy niż 10 lat w porównaniu do grupy chorych, u których czas trwania infekcji HCV od momentu wykrycia był dłuższy i wynosił ponad 10 lat. Wielu autorów podkreśla, iż duże znaczenie w rozwoju przewlekłego zakażenia HCV ma zmniejszenie liczby oraz pogorszenie funkcjonalności HCV–swoistych limfocytów TCD8+, a także wzrost liczby komórek regulatorowych TCD4+CD25+ [114, 115]. Wykazany w pracy niski odsetek limfocytów TCD8+ u dzieci z dłuższym trwającym zakażeniem może świadczyć, że z czasem trwania choroby zmniejsza się szansa na eliminację HCV. W pracy stwierdzono

również, że średnia wartość odsetkowa TCD8+ była porównywalna w podgrupie chorych leczonych i nieleczonych, natomiast istotnie statystycznie wyższa w grupie pacjentów, którzy uzyskali SVR po ukończeniu terapii przeciwwirusowej. Wyniki te zdają się potwierdzać istotną rolę limfocytów TCD8+ nie tylko w korzystnym przebiegu naturalnym choroby, ale także w skuteczności terapii. Inne badania wskazują jednak, że wartość odsetkowa limfocytów TCD8+ jest zmienna i zależy od fazy terapii PWZW C – znacząco maleje w trakcie leczenia i zdecydowanie rośnie po jego zakończeniu [109,110,111]. W pracy wykazano ponadto wyższy odsetek subpopulacji limfocytów TCD8+ w grupie chorych, którzy przebyli choroby nowotworowe. Podobne spostrzeżenia obserwowano także u pacjentów z potwierdzoną obecnością autoprzeciwciał. Natomiast inni autorzy w grupie dzieci zakażonych HCV z obecnością chorób onkologicznych obserwowali spadek liczby limfocytów T, zarówno TCD4+, TCD8+ jak i limfocytów naiwnych oraz komórek NK [107]. Obniżenie liczby limfocytów o profilu Th1 i ekspansji limfocytów Th2 stwierdzano również w grupie pacjentów zakażonych HCV w trakcie leczenia immunosupresyjnego [108]. Kovacs i wsp. donoszą, że podwyższona aktywność limfocytów TCD8+ u chorych z PWZW C oraz koinfekcją HIV może mieć znaczenie w przyspieszonym rozwoju pełnoobjawowego zespołu nabytego niedoboru odporności AIDS (ang. *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) co wymusza konieczność szybszego wprowadzenia leczenia zakażenia HCV [112].

Poglądy co do roli limfocytów TCD4+ w immunopatogenezie PWZW C są rozbieżne. W pracy wykazano istotny statystycznie spadek średniej wartości odsetkowej limfocytów TCD4+ w grupie dziewcząt z PWZW C w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie obserwowano natomiast takiej zmiany w profilu subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w grupie zakażonych chłopców. Spadek wartości odsetkowej komórek TCD4+ u dzieci z PWZW C jest opisywany w piśmiennictwie [116, 117]. Wykazane w prezentowanej pracy różnice wartości odsetkowej TCD4+ między dziewczętami a chłopcami nie znajdują potwierdzenia w innych opracowaniach. Niektórzy autorzy wiążą zmniejszenie puli limfocytów TCD4+ u zakażonych HCV z przyspieszeniem progresji PWZW C [117,122]. Inni udowodnili, że żywa odpowiedź subpopulacji limfocytów TCD4 o profilu Th1 produkujących IFN-gamma skutecznie zapewnia zanik replikacji HCV, wpływa na niższą aktywność ALT, a co z tym idzie w konsekwencji zmniejsza włóknienie wątroby i opóźnia postęp choroby [62, 121]. Istnieją również doniesienia sugerujące, iż przyczyną przewlekania się zakażenia HCV może być pierwotna niewystarczająca odpowiedź limfocytów TCD4+ lub ich „zużycie”, upośledzona prezentacja antygeny przez komórki dendrytyczne, supresja

limfocytów T, komórek NK i komórek dendrytycznych poprzez ich interakcje z białkami strukturalnymi i niestukturalnymi HCV [60].

W niniejszej pracy stwierdzono również wyższą średnią wartość odsetkową limfocytów TCD4⁺ (różnica nieistotna statystycznie) w podgrupie pacjentów z zakażeniem trwającym ≤ 10 lat oraz u dzieci, które nie były obciążone obecnością chorób dodatkowych. Podobne obserwacje poczyniono u pacjentów z niższą wiremiami, chorych leczonych przeciwwirusowo oraz u dzieci, które uzyskały SVR. Wyniki te są zgodne z doniesieniami w piśmiennictwie, gdzie opisywana jest odwrotna korelacja między wysokością wiremii a liczbą TCD4⁺ oraz wzrost puli limfocytów TCD4⁺ u pacjentów leczonych, którzy uzyskali SVR [118,119,120]. W innych opublikowanych badaniach dotyczących dzieci z wertykalnym zakażeniem HCV autorzy donoszą, że nie obserwuje się istotnego związku między liczbą limfocytów TCD4⁺ a poziomem wiremii oraz aktywnością aminotransferaz [123, 124].

W ostatnich latach podnosi się również rolę komórek NK w immunopatogenezie PWZW C i procesu włóknienia wątroby. Komórki NK są główną składową odpowiedzi przeciwwirusowej poprzez rozpoznanie i eliminację komórek zakażonych wirusem. W badanym materiale nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w średniej wartości odsetkowej komórek NK między grupą pacjentów z PWZW C a kontrolną. Nie wykazano także różnic w wartościach odsetkowych komórek NK między podgrupami pacjentów w zależności od płci, czasu trwania zakażenia, aktywności aminotransferaz, obecności chorób dodatkowych w wywiadzie a grupą kontrolną. Obserwowano natomiast wyższą średnią wartość odsetkową komórek NK, choć bez istotności statystycznej w podgrupie pacjentów, którzy uzyskali SVR po leczeniu przeciwwirusowym oraz z wysoką wiremiami HCV w przebiegu choroby. Istnieją doniesienia w piśmiennictwie, że komórki NK modulują swoją aktywność poprzez kombinację receptorów aktywujących i hamujących, które wiążą się z MHC klasy I bądź z cząsteczkami podobnymi w budowie. Część receptorów należy do nadrodziny immunoglobulin (ang. *Killer cell immunoglobulin-like receptors* – KIR) [125]. W obecności HCV na powierzchni komórek NK obserwuje się zwiększoną ekspresję receptorów aktywujących aKIR (ang. *activatory Killer cell immunoglobulin-like receptors* – aKIR) oraz redukcję liczby komórek NK z ekspresją receptorów hamujących iKIR (ang. *inhibitory Killer cell immunoglobulin-like receptors* – iKIR). Skutkiem tego jest znacznie wyższa funkcja cytotoksyczna komórek NK u osób zakażonych HCV w porównaniu do zdrowych. Dlatego uważa się, że stała stymulacja komórek NK przez HCV może mieć udział w przewlekłym stanie zapalnym wątroby [126, 128, 129]. W badaniach Paladino i wsp. wykazano związek

między zwiększoną cytotoksycznością komórek NK, wzrostem ekspresji receptorów aKIR i brakiem eliminacji wirusa HCV oraz gorszym przebiegiem choroby [127]. Wielu autorów wykazuje związek pomiędzy zwiększoną ilością komórek NK a skutecznością zastosowanego leczenia przeciwwirusowego rekombinowanym IFN alfa 2b lub PegIFN z RBV [129, 130, 131]. Z badań Gonzaleza i wsp. wynika, że podwyższony poziom komórek NK pozbawionych markera CD56 koreluje z brakiem odpowiedzi na leczenie przeciwwirusowe. Wskazuje również na możliwość wykorzystania tej subpopulacji limfocytów do określenia stopnia prawdopodobieństwa skuteczności planowanej terapii PWZW C [132]. Uzyskany w prezentowanej pracy wyższy odsetkowy udział komórek NK w puli wszystkich limfocytów u pacjentów, którzy uzyskali eliminację HCV RNA z surowicy krwi po terapii przeciwwirusowej zdaje się potwierdzać tę sugestię. W wielu opracowaniach zauważono korelację między zróżnicowaną ekspresją receptorów TLR na powierzchni hepatocytów i komórek gwiaździstych, a zmienną aktywnością komórek NK [133]. Na modelu zwierzęcym wykazano większe nasilenie włóknienia w wątrobach myszy pozbawionych komórek NK. Stwierdzono również stymulowanie apoptozy ludzkich komórek gwiaździstych HSC (ang. *hepatic stellate cells*) przez komórki NK w hodowli komórkowej [134]. Poznanie wzajemnych interakcji HSC, limfocytów TCD8⁺ oraz komórek NK może przyczynić się do wyjaśnienia patogenezy włóknienia wątroby w przebiegu PWZW C u dzieci.

W pracy badano także elementy odporności humoralnej i wykazano niższą średnią wartość odsetkową limfocytów B w grupie dzieci z PWZW C w porównaniu z grupą kontrolną. Wynik ten jest odmienny od uzyskiwanych w badaniach prowadzonych w populacji dorosłych z PWZW C, gdzie najczęściej obserwuje się wzrost limfocytów B naiwnych i to zwykle bez cech aktywacji [135]. Przyczyną tych różnic może być upośledzona aktywność limfocytów TCD4⁺ co osłabia wzrost i różnicowanie się w limfocytów B w komórki plazmatyczne. W pracy nie stwierdzono związku między średnią wartością odsetkową CD19⁺ a płcią pacjentów z PWZW C, wysokością wirerii, obecnością chorób przewlekłych oraz zastosowanym leczeniem. Zauważono natomiast korelację między średnim odsetkiem limfocytów B a czasem trwania zakażenia – najniższy odsetek obserwowano w podgrupie, w której czas trwania zakażenia był ≤ 10 lat, wyższy w podgrupie pacjentów zakażonych HCV >10 lat, najwyższy w grupie kontrolnej. Wyniki te potwierdzają powszechnie akceptowany pogląd o dominującej roli limfocytów T w odpowiedzi immunologicznej w infekcjach wirusowych. Podobną tendencję wykazano między odsetkiem CD19⁺ a aktywnością aminotransferaz – najniższą wartość stwierdzono w podgrupie dzieci

zakażonych HCV z podwyższoną aktywnością, wyższą w podgrupie z prawidłową aktywnością, najwyższą w grupie kontrolnej. W piśmiennictwie można znaleźć doniesienia mówiące o spadku odsetka limfocytów B w trakcie terapii IFN alfa2a oraz terapii skojarzonej PegIFN alfa2a z RBV [148]. Ponadto autorzy wykazywali w swoich pracach wyższą średnią wartość odsetkową limfocytów B CD19+ przed zastosowanym leczeniem w porównaniu do wartości po zakończonej terapii oraz wyższą ekspresję molekuly CD81 na limfocytach B CD 19+ u pacjentów którzy nie odpowiedzieli na leczenie w porównaniu do pacjentów którzy uzyskali utrwaloną odpowiedź wirusologiczną - SVR [136]. Powyższe wyniki mogą sugerować, że poszczególne subpopulacje komórek immunokompetentnych ulegają fluktuacji w trakcie terapii przeciwwirusowej. Można zatem sądzić że oznaczenie ekspresji CD81 na limfocytach B CD19+ może być czynnikiem prognostycznym dla przewidywania skuteczności zastosowanego leczenia przeciwwirusowego [137]. Kolejne badania wskazują, że limfocyty B nie tylko pełnią funkcję rezerwuaru HCV, ale odgrywają rolę w przewlekaniu się zakażenia oraz włóknieniu wątroby [138, 139, 140]. Mizuochi i wsp. udowadniają, że poszczególne antygeny HCV i ich nieprawidłowe interakcje z elementami komórkowymi odporności humoralnej jak limfocyty B mogą powodować wyraźną dysregulację tej subpopulacji. Wykładowiki kliniczne tych zaburzeń to pozawątrobowa manifestacja chorób o charakterze autoimmunologicznym czy występowanie B-komórkowych rozrostów limfoproliferacyjnych [141].

Podsumowując, wyniki pracy w konfrontacji z danymi z piśmiennictwa wskazują, że układ odpornościowy dzieci z PWZW C reaguje na istniejące zakażenie poprzez zmiany składu subpopulacji limfocytów krwi obwodowej. Wydaje się, że niektóre z opisywanych powyżej zmian mają charakter predykcyjny w zakresie przewlekania się zakażenia HCV, procesu włóknienia wątroby czy też zastosowanego leczenia. Nadal wiele aspektów dotyczących patogenezy tego procesu chorobowego nie zostało jeszcze do końca poznanych i wymaga dalszych badań.

6. WNIOSKI

1. Układ odpornościowy dziecka reaguje na zakażenie HCV poprzez zmianę składu subpopulacji limfocytów krwi obwodowej. Do istotnych zmian należy wzrost efektorowych komórek o potencjale cytotoksycznym limfocytów T CD8⁺ i spadek stosunku limfocytów T CD4⁺:CD8⁺
2. Spadek odsetka limfocytów T CD8⁺ u dzieci z zakażeniem HCV trwającym ponad 10 lat sugeruje, że z czasem trwania choroby zmniejsza się szansa eliminacji wirusa.
3. Wyższa średnia wartość limfocytów T CD4⁺ wykazuje związek z niższą wiremią, krótszym czasem trwania zakażenia oraz uzyskaniem utrwalonej odpowiedzi wirusologicznej (SVR)
4. U chorych dzieci z PWZW C niższy średni odsetek limfocytów CD19⁺ sugeruje spadek odpowiedzi humoralnej
5. Ocena immunofenotypu limfocytów krwi obwodowej u dzieci z PWZW C przed planową terapią przeciwwirusową może mieć wartość prognostyczną co do efektów leczenia

7. PIŚMIENNICTWO

1. Halota W, Pawłowska M. Zakażenia wirusami hepatotropowymi. *Med Sci Rev Hepatologia* 2001; 43-57.
2. World Health Report. World Health Organisation. 2002.
3. Armstrong GL, Wasley A, Smard EP, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med* 2006; 144: 705-14.
4. Rosińska M, Radziszewski F, Stępień M. Wirusowe zapalenie wątroby typu C w Polsce w 2010 roku. *Przegl Epidemiol* 2012; 66: 287-292.
5. Rosińska M, Stępień M. Wirusowe zapalenie wątroby typu C w Polsce w 2009 roku. *Przegl Epidemiol* 2011; 65: 265-269.
6. Miller RH, Purcell RH. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant viruses subgroups. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 2057-2061.
7. Clarke B. Molecular virology of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 1997; 78: 2397- 2410.
8. Friebe P, Lohmann V, Krieger N , et al. Sequences in 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 2001; 75: 12047-12057.
9. Cocquerel L, Wychowski C, Minner F, et al. Charged residues in transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of this envelope proteins. *J Virol* 2000; 74: 3623-3633.
10. Kato N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity and variation. *Microb Com Genome* 2000; 5: 128-151.
11. Simon K, Szymczak A. Wirusologia molekularna a leczenie przewlekłych zapaleń wątroby typu C. *Przegl Epidemiol* 2005; 59: 503-510.
12. Kato N. Molecular virology of HCV. *Acta Med Okayama* 2001; 55: 135-150.
13. Reed KE, Rice CM. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing and protein properties. *Curr Topics Microbiol Immunol* 2000; 242: 55-84.

14. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 1321-1324.
15. Chlabicz S, Flisiak R, Kowalczyk O, et al. Changing HCV genotypes distribution in Poland--relation to source and time of infection. *J Clin Virol* 2008; 42: 156-159.
16. Woźniakowska-Gęsicka T, Wiśniewska-Ligier M, Zeman K, et al. Źródła zakażenia a genotypy wirusa C zapalenia wątroby u dzieci. *Pol Mer Lek* 1999; 32: 65-67.
17. Martell M, Esteban JI, Quer J, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; 66: 3225-3229.
18. Cristina J, Colina R. Evidence of structural genomic region recombination in Hepatitis C Virus. *Virology J* 2006; 3: 53-55.
19. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 41-46.
20. Revie D, Alberti MO, Braich RS, et al. Analysis of in vitro replicated human hepatitis C virus (HCV) for the determination of genotypes and quasispecies. *Virol J* 2000; 74: 2391-2399.
21. Alter MJ. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: 93-98.
22. Resti M. Mother to infant transmission of hepatitis C virus. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31: 489-493.
23. Zanetti AR, Tanzi E, Romano L, et al. A Prospective Study On Mother- to- Infant Transmission of Hepatitis C Virus. *Intervirology* 1998;41: 208-212.
24. Mast EE, Hwang LY, Seto DS, et al. Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. *J Infect Dis* 2005; 192: 1880-1889.
25. De Torres M, Poynard T. Risk factors for liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Ann Hepatol* 2003; 2: 5-11.
26. Di Bisceglie AM. Natural history of hepatitis C: its impact on clinical management. *Hepatology* 2000; 31:1014-1018.

27. Kanda T, Yokosuka O, Saisho H. Acute hepatitis C virus infection, 1986-2001: a rare cases of fulminant hepatitis In Chiba, Japan. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 556-558.
28. Ozaras R, Tahan V. Acute hepatitis C: prevention and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 351-361.
29. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, et al. Rates and risk factors of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001; 34: 730-739.
30. Juszczak J. Wirusowe zapalenia wątroby. PZWL Warszawa 1999
31. Bortolotti F, Resti M, Marcellini M, et al. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in 373 Italian children with HCV infection: changing distribution and correlation with clinical features and outcome. *Gut* 2005; 54: 852-857.
32. Romero R., Levine J.E. Viral hepatitis in children. *Semin Liver Dis* 1994; 14: 289-302.
33. Guido M, Bortolotti F, Rugge M. Is liver biopsy needed in children with chronic hepatitis?. *Acta Gastroenterol Belg* 1998; 61:214-216.
34. Guido M, Rugge M, Jara P, et al. Chronic hepatitis C in children: pathological and clinical spectrum. *Gastroenterology* 1998; 115: 1525-1529.
35. Pawłowska M, Halota W. Postęp w leczeniu WZW C - interferon pegylowany. *Przegl Epidemiol* 2001; 55: 169-173.
36. Buli M, Casado MA, Fosbrook L, et al. Cost-effectiveness of combination therapy for naive patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2000; 33: 651-658.
37. Manns MP, McHutchinson JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa 2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* 2001; 358: 958-965.
38. Halota W, Flisiak R, Boroń-Kaczmoarska A, et al. Standardy leczenia wirusowych zapaleń wątroby typu C. Rekomendacje polskiej grupy ekspertów HCV-2011. *Przegl Epidemiol* 2012; 66:83-88.
39. McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, et al. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 1992; 10: 75-88.

40. Delves PJ, PhD, Roitt IM. The Immune System. *Adv Immunol* 2000; 343: 37-49.
41. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, et al. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999; 284: 1313-1318.
42. Janway CA, JR, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.
43. Remer KA, Brcic M, Jungi TW. Toll-like receptor-4 is involved In eliciting an LPS-induced oxidative burts In neutrophilis. *Immunol Lett* 2003; 85:75-80.
44. Barton GM, Medzhitov R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 380-383.
45. Kovarik J, Siegrist CA. Immunity in early life. *Immunol Today* 1998; 19: 150-154.
46. Mozer-Lisewska I, Kowala-Piaskowska A, Figlerowicz M, et al. Immunopatogeneza przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B. *Ped Prakt* 2001; 9: 13-15.
47. Satoi J, Murata K, Lechman M, et al. Genetic immunization of wild-type and hepatitis C virus transgenic mice reveals a hierarchy of cellular immune response and tolerance induction against hepatitis C structural proteins. *J Virol* 2001; 75: 12121-12127.
48. Lee CH, Choi YH, Yang SH, et al. Hepatitis C virus core protein inhibits interleukin 12 and nitric oxide production from activated macrophages. *Virology* 2001; 279: 271-279.
49. Higashi K, Tsukiyama-Kohara K, Tanaka T, et al. Characterization of hypervariable region in hepatitis C virus envelope protein during acute and chronic infection. *Arch Virol* 2005; 150: 883-898.
50. Timm J, Lauer GM, Kavanagh DG, et al. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J Exp Med* 2004; 200: 1593-1604.
51. Guglietta S, Garbuglia AR, Pacciani V, et.al Positive selection of cytotoxic T lymphocyte escape variants during acute hepatitis C virus infection. *Eur J Immunol* 2005; 35: 2627-2637.
52. Gerlach JT, Ulsenheimer A, Gruner H, et al. Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4⁺ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins. *J Virol* 2005; 79: 12425-12433.

53. Sarobe P, Lasarte JJ, Zabaleta A, et al. Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune response. *J Virol* 2003; 77: 10862-10871.
54. Bertoletti A, Ferrari C. The differential immune responses during HBV and HCV infection: mechanisms of diseases and response. *Hepatology* 2003; 38: 1-14.
55. Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 2002; 195: 43-49.
56. Dolganiuc A, Kodys K, Kopasz A, et al. Hepatitis C virus core and non-structural protein 3 induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J Immunol* 2003; 170: 5615-5624.
57. Freeman AJ, Marinos G, Ffrench RA, et al. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol* 2001; 79: 515-536.
58. Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2003; 7: 89-105.
59. Leroy V, Vigan I, Mosnier JF, et al. Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 829-841.
60. Ulsenheimer A, Gerlach JT, Gruener NH, et al. Detection of functionally altered hepatitis C virus – specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 37: 1189-1198.
61. Kanto T, Hayashi N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaced strategies subverting innate and adaptive immunity. *Int Medicine* 2006; 33: 183-191.
62. Grakouia A, Shoukry NH, Wollard DJ, et al. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 2003; 302: 659-699.
63. Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J, et al. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41: 106-114.
64. Pawłowska M. Mechanizmy immunologiczne zakażeń HCV – kierunek poszukiwań terapeutycznych. *Przegl Epidemiol* 2005; 59: 519-523.

65. Arai K, Liu ZX, Lane T, Dennert G: IP-10 and Mig facilitate accumulation of T cells in the virus-infected liver. *Cell Immunol* 2002; 219: 48-56.
66. Ray S, Broor SL, Vaishnav Y, Sakar C, et al.: Transforming growth factor beta in hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro findings. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 393-403.
67. Nelson DR, Tu Z, Soldevila-Pico C, et al. Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect. *Hepatology* 2003; 38: 859-868.
68. Bonacchi A, Petrai I, Defranco R.M. et al. The chemokine CCL21 modulates lymphocyte recruitment and fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003; 125: 1060-1076.
69. Tseng CT, Klimpel GR Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer functions. *J Exp Med* 2002; 95: 43-49.
70. Agrati C, Nisii C, Oliva A, et al. Lymphocyte distribution and intrahepatic compartmentalization during HCV infection: a main role for MHC – unrestricted T cells. *Arch.Immunol. Ther Exp* 2002; 50: 307-316.
71. Rehmann B, Nascimbeni. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature* 2005, 5: 215-229.
72. O' Neill LA. Toll-like receptor signal transduction and tailoring of innate immunity: a role for Mal? *Trends Immunol* 2002; 23: 296-300.
73. Manigold T, Bocker U, Hanck C et al: Differential expression of toll-like receptors 2 and 4 in patients with liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 275-282.
74. Mozer-Lisewska I, Dworacki G, Kaczmarek E, et al. Zmiany w obrębie subpopulacji krwinek białych krwi obwodowej u dzieci z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C przed leczeniem pegylowanym interferonem i rybawiryną. *Przegl Epidemiol* 2005; 59: 483-489.
75. Kopeć-Szlęzak J. Grasicja jako mikrośrodowisko dojrzewania limfocytów T. *Onkol Pol* 2003; 6: 167-171.
76. Abo T. Extrathymic pathways of T-cell differentiation and immunomodulation. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 261-273.

77. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Human CD4+CD25+ regulatory T-cells. *Semin Immunol* 2004; 16: 89-98.
78. Kronenberg M. Toward and understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 150-160.
79. Antony PA, Restifo NP. CD4+CD25+ T regulatory cells, immunotherapy of cancer and interleukine 2. *J Immunother* 2005; 28: 120-128.
80. Bopp T, Palmetshofer A, Serfiling E, et al. NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4+ lymphocytes by CD4+CD25+ regulatory cells. *J Exp Med* 2005; 201: 181-187.
81. Cozzo C, Larkin J, Caton AJ. Self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003; 171: 5678- 5682.
82. Ken-ichiro S, Masaru T. NKT cells: A regulator in both innate and acquired immunity. *Curr Med Chem* 2005; 4: 59-64.
83. Kopeć- Szlęzak J. Subpopulacje limfocytów T. *Onkol Pol* 2005; 8, 1: 17-20.
84. Ampery JL, Im S, Turco SJ, et al. A subset of liver NKT is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglykan. *J Exp Med* 2004; 200: 895-904.
85. Mossman TR, Cherwinski K, Bond MW, et al. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-2357.
86. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, et al. Differing lymphokine profiles and functional subsets of CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 1991; 254: 279-282.
87. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Ann Rev Immunol* 1994; 12: 227-257.
88. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature Rev Immunol* 2002; 2: 401-409.
89. Zhou F. Expression of multiple granzymes by cytotoxic T lymphocyte implies that they activate diverse apoptotic pathways in target cells. *Int Rev Immunol* 2010; 29: 38-55.
90. Lanier LL. Natural Killer cells: roundup. *Immunol Rev* 2006; 214: 5-8.

91. O'Connor GM, Hart OM, Gardiner CM. Putting the natural killer cell in its place. *Immunology* 2005; 117: 1-10.
92. Cooper M, Fehniger TA, Fuchs A, et al. NK cell and dendritic cell interaction. *Trends Immunol* 2004; 25: 47-52.
93. Hsu KC, Dupont B. Natural killer cell receptors: regulating innate immune responses to hematologic malignancy. *Semin Hematol* 2005; 103: 42-49.
94. Kopeć- Szlęzak J, Podstawka U. Biologia komórek NK (Natural Killer). *Onkol Pol* 2007; 10, 3: 115-119.
95. Kontny E, Maśliński W. Limfocyty B – funkcje fizjologiczne i udział patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów. *Reumatologia* 2006; 44, 3:150-161.
96. Grimaldi MCh, Hicks R, Diamond B. B cell selection and susceptibility to autoimmunity. *J Immunol* 2005; 174: 1775-1781.
97. Bayry J, Lacroix-Desmanez S, Kazatchkine MD, et al. Modulation of dendritic cell maturation and function by B lymphocytes. *J Immunol* 2005; 175: 15-20.
98. Husson H, Lugi SM, Ghia P, et al. Functional effects of TNF and lymphotoxin alpha1beta2 on FDC-like cells. *Cell Immunol* 2000; 203: 134-143.
99. Gheorghe L, Iacob S, Sporea I, et al. Efficacy, tolerability and predictive factors for early and sustained virologic response in patients with weight-based dosing regimen of PegIFN alpha-2b ribavirin in real-life health-care setting. *J Gastrointestin Liver Dis* 2007; 16: 23-9.
100. Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourlier M, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *J Hepatol* 2004;40: 993-9.
101. Ishak KG, Baptista A, Binchi L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22: 696-9.
102. Zeman K, Bąk-Romaniszyn L, Fornalczyk-Wachowska E, et al. Analiza cytofluorymetryczna oraz ocena pomiotogenowej odpowiedzi proloferacyjnej limfocytów krwi obwodowej dzieci z chorobą wrzodową. *Gastroenterol Pol* 1995;2: 135-140.

103. Dong Y, Zhang HF, Chen H, et al. Peripheral blood T cell subsets and TH1/TH2 cytokines secretion in children with chronic hepatitis C virus infection. *Zhonghua Shi Yan He Lon Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2007; 21: 26-8.
104. Voiculescu CL, Balasoiu M, Turculeanu A, et al. Different patterns of some systemic immunological cell markers in HIV only, and HIV/hepatitis C-infected children. *Pediatr AIDS HIV Infect* 1996; 7: 31-6.
105. Panasiuk A, Prokopowicz D, Zak J, et al. Peripheral blood T, B and NK cells in relation to histological hepatitis activity and fibrosis stage in chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 178-82.
106. Mozer-Lisewska I, Dworacki G, Kaczmarek E, et al. Significance of alterations in PBMC immunophenotype of children with chronic viral hepatitis C – the role of dendritic cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 2006; 63: 311-19.
107. Ek T, Mellander L, Andersson B, et al. Immune reconstitution after childhood acute lymphoblastic leukemia is most severely affected in the high risk group. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 44: 461-8.
108. Zhang XL, Komada Y, Chipeta J, et al. Intracellular cytokine profile of T cells from children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49: 165-72.
109. Woźniakowska-Gęsicka T, Wiśniewska-Ligier M, Borowska-Rybus B, et al. Influence of interferon-alpha therapy on the count and function of T lymphocytes in children with chronic hepatitis C. *Pol Merkur Lekarski* 2001; 11: 344-7.
110. Tomasiewicz K, Modrzewska R, Korbowicz E. Impact of pegylated interferon alpha and ribavirin therapy of chronic hepatitis C on peripheral blood and intrahepatic lymphocytes. *Pol Merkur Lekarski* 2009; 26: 19-23.
111. Soldevila B, Alonso N, Martinez-Arconada MJ, et al. A prospective study of T- and B-lymphocyte subpopulations, CD81 expression levels on B cells and regulatory CD4+CD25+ CD127(low/-)FoxP3(+) T cells in patients with chronic HCV infection during pegylated interferon-alpha2a plus ribavirin treatment. *J Viral Hepat* 2011; 18: 384-92.
112. Kovacs A, Karim R, Mack WJ, et al. Activation of CD8 T cells predicts progression of HIV infection in women coinfecting with hepatitis C virus. *JID* 201; 201: 823-34.

113. Albanis E, Friedman SL. Diagnosis of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Liver Dis* 2006;10: 821-33.
114. Lobzin IuV, Nikitin Vku, Sukhina IA, et al. Immunopathogenesis of viral hepatitis C. Immunological markers of disease progression. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2007; 6: 75-84.
115. Wedemeyer H, Xiao-Song He, Nascimbeni M, et al. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002; 169: 3447-3458.
116. Yonkers NL, Sieg S, Rodriguez B, et al. Reduced naive CD4 T cell numbers and impaired induction of CD27 in response to T cell receptor stimulation reflect a state of immune activation in chronic hepatitis C virus infection. *JID* 2011; 203: 635-45.
117. Filimonov PN, Gavrilova NI, Ivanov Gla, et al. Interrelation between the activity of hepatitis, liver fibrosis and immune status in children with chronic hepatitis B and C. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2004; 2: 50-6.
118. Qiuroga JA, Llorente S, Castillo I, et al. Virus-specific T-cell responses associated with hepatitis C virus (HCV) persistence in the liver after apparent recovery from HCV infection. *J Med Virol* 2006; 78: 1190-7.
119. Burton JR, Klarquist J, Kyung Im, et al. Prospective analysis of effector and regulatory CD4T cells in chronic HCV patients undergoing combination antiviral therapy. *J Hepatol* 2008; 49: 329-38.
120. Pillai V, Lee WM, Thiele DL, et al. Clinical responders to antiviral therapy of chronic HCV infection show elevated antiviral CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses. *J Viral Hepatol* 2007; 14: 18-29.
121. Ishii S, Koziel MJ. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. *Clin Immunol* 2008; 128: 133-47.
122. Romo EM, Munoz-Robles JA, Castillo-Rama M, et al. Peripheral blood lymphocyte populations in end-stage liver diseases. *J Clin Gastroenrol* 2007; 41: 713-21.
123. Giovannetti A, Mazzatta F, coviello R, et al. T-cell immune activation in children with vertically transmitted hepatitis C virus infection. *Viral Immunol* 2001; 14: 169-79.

124. Della Bella S, Riva A, Tanzi E, et al. Hepatitis C virus-specific reactivity of CD4+ lymphocytes in children born from HCV-infected women. *J Hepatol* 2005; 43: 394-402.
125. Krueger PD, Lassen MG, Qiao H, et al. Regulation of NK cell repertoire and function in the liver. *Crit Rev Immunol* 2011; 31: 43-52.
126. Oliviero B, Varchetta S, Cerino A, et al. Enhanced NK cell cytolytic activity in chronic HCV infection. *J Hepatol* 2008; 48:S51.
127. Paladino N, Flores AC, Marcos CY, et al. Increased frequencies of activating natural killer receptors are associated with liver injury in individuals who do not eliminate hepatitis V virus. *Tissue Antigens* 2007; 69:109-11.
128. Żeromski J, Mozer-Lisewska I, Kaczmarek M, et al. NK cells prevalence, subsets and function in viral hepatitis C. *Arch Immunol Ther Exp* 2011; 59: 449-455.
129. Par G, Rukavina D, Podack ER, et al. Decrease in CD3-negative-CD8dim(+) and Vdelta2/Vgamma9 TcR+ peripheral blood lymphocyte counts, low perforin expression and the impairment of natural killer cell activity is associated with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2002; 37: 514-22.
130. Par G, Berki T, Palinkas L, et al. Immunology of HCV infection: the causes of impaired cellular immune response and the effect of antiviral treatment. *Orv Hetil* 2006; 147: 591-600.
131. Harrison RJ, Ettorre A, Little A-M, et al. Association of NKG2A with treatment for chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 2010; 161: 306-314.
132. Gonzalez VD, Falconer K, Bjorkstrom NK, et al. Expansion of functionally skewed CD56-NK cells in chronic hepatitis C virus infection: correlation with outcome of pegylated IFN-alpha and ribavirin treatment. *J Immunol* 2009; 183: 6612-6618.
133. Takehara T, Hayashi N. Natural killer cells in hepatitis C virus infection: from innate immunity to adaptive immunity. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 78-81.
134. Melhem A, Muhanna N, Bishara A, et al. Antifibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *J Hepatol* 2006; 45:60-71.
135. Ni J, Hembrador E, Di Bisceglie AM, et al. Accumulation of B lymphocytes with a naive, resting phenotype in subset of hepatitis C patients. *J Immunol* 2003; 170: 3429-39.

136. Soldevila B, Alonso N, Martinez-Arconada MJ, et al. A prospective study of T- and B-lymphocyte subpopulations, CD81 expression levels on B cells and regulatory CD4+CD25+CD127(low/-)FoxP3+ T cells in patients with chronic HCV infection during pegylated interferon-alpha2a plus ribavirin treatment. *J Viral Hepatol* 2011; 18: 384-92.
137. Panasiuk A, Prokopowicz D, Zak J. Immunological response in chronic hepatitis C virus infection during interferon alpha therapy. *Hepatogastroenterol* 2004; 51: 1088-92.
138. Stamataki Z, Shannon-Lowe C, Shaw J, et al. Hepatitis C virus association with peripheral blood B lymphocytes potentiates viral infection of liver-derived hepatoma cells. *Blood* 2009; 113: 585-93.
139. Mizuochi T, Ito M, Takai K, et al. Peripheral blood memory B cells are resistant to apoptosis in chronic hepatitis C patients. *Virus Res* 2011; 155: 349-51.
140. Ito M, Masumi A, Mochida K, et al. Peripheral B cells may serve as a reservoir for persistent hepatitis C virus infection. *J Innate Immun* 2010; 2: 607-17.
141. Mizuochi T, Ito M, Saito K, et al. Possible recruitment of peripheral blood CXCR3+CD27+CD19+ B cells to the liver of chronic hepatitis C patients. *J Interferon Cytokine Res* 2010; 30: 243-52.
142. Flisiak R, Halota W, Horban A, et al. Prevalence and risk factors of HCV infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011;23: 1213-7.
143. Le Campion A, Larouche A, Fauteux-Daniel S, et al. Pathogenesis of Hepatitis C During Pregnancy and Childhood. *Viruses* 2012; 4: 3531-50.
144. Maasoumy B, Wedemeyer H. Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012; 26: 401-12.
145. Maasoumy B, Port K, Markova AA, et al. Eligibility and safety of triple therapy for hepatitis C: lessons learned from the first experience in a real world setting. *Plos One* 2012; 8: e55285
146. Naggie S. Management of hepatitis C virus infection: the basics. *Top Antivir Med* 2012; 20: 154-61.

147. Li K, Lemon SM. Innate immune responses in hepatitis C virus infection. *Semin Immunopathol* 2012; 35: 53-72.
148. Soldevila B, Alonso N, Martinez-Arconada MJ, et al. A prospective study of lymphocyte subpopulations and regulatory T cells in patients with chronic hepatitis C virus infection developing interferon-induced thyroiditis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 75: 535-43.
149. Służewski W, Kowala-Piaskowska A, Wysocki J, et al. Treatment of chronic hepatitis C in children with pegylated interferon alpha2a and ribavirin – a multi-center study. *Acta Pol Pharm* 2012; 69: 319-26.

8. SPIS RYCIN

Rycina 1. Model budowy ludzkiego wirusa zapalenia wątroby typu C

Rycina 2. Drogi przenoszenia zakażenia HCV

Rycina 3. Przebieg naturalny zakażenia HCV

Rycina 4. Rozkład częstości genotypów w grupie badanej (n=50)

Rycina 5. Rozkład wartości ALT w grupie badanej i grupie kontrolnej

Rycina 6. Rozkład wartości AST w grupie badanej i grupie kontrolnej

Rycina 7. Rozkład wartości albumin w obu grupach

Rycina 8. Rozkład wartości gammaglobulin w obu grupach

Rycina 9. Rozkład wartości ALP w obu grupach

Rycina 10. Rozkład wartości stężenia żelaza w obu grupach

Rycina 11. Przykładowy rozkład subpopulacji limfocytów T CD4 i CD8 u dziecka z grupy badanej A.Z. i grupy kontrolnej A.W.

Rycina 12. Rozkład odsetkowy limfocytów u dziewcząt w grupie badanej i kontrolnej

Rycina 13. Rozkład odsetkowy granulocytów u dziewcząt w grupie badanej i grupie

Rycina 14. Rozkład wartości odsetkowych bazofili u dziewczynek w grupie badanej i kontrolnej

Rycina 15. Rozkład wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych u dziewczynek z grupy badanej i kontrolnej

Rycina 16. Rozkład wartości odsetkowych limfocytów CD4 u dziewczynek w grupie badanej i kontrolnej

Rycina 17. Rozkład wartości odsetkowych limfocytów CD8 u dziewczynek w grupie badanej i kontrolnej

Rycina 18. Rozkład wartości stosunku CD4:CD8 w dziewczynkach w grupie badanej i kontrolnej

Rycina 19. Rozkład wartości odsetkowych limfocytów CD 19 u dziewczynkach w grupie badanej i grupie kontrolnej

Rycina 20. Rozkład wartości odsetkowych limfocytów u chłopców w grupie badanej i w grupie kontrolnej

Rycina 21. Rozkład wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych u chłopców w grupie badanej i w grupie kontrolnej

Rycina 22. Rozkład wartości odsetkowych bazofili u chłopców w grupie badanej i w grupie kontrolnej

Rycina 23. Rozkład wartości odsetkowych limfocytów CD8 u chłopców w grupie badanej i w grupie kontrolnej

Rycina 24. Rozkład wartości stosunku CD4:CD8 u chłopców w grupie badanej i w grupie kontrolnej

Rycina 25. Rozkład wartości odsetkowych limfocytów CD 19 u chłopców w grupie badanej i w grupie kontrolnej

Rycina 26. Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV w grupie badanej

Rycina 27. Rozkład średnich wartości odsetkowych monocytów z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV w grupie badanej

Rycina 28. Rozkład średnich wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV w grupie badanej

Rycina 29. Rozkład średnich wartości odsetkowych komórek bazofili z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV w grupie badanej

Rycina 30. Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów CD8 z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV w grupie badanej

Rycina 31. Rozkład średnich wartości stosunku CD4:CD8 z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV w grupie badanej

Rycina 32. Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów CD19 z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV w grupie badanej

Rycina 33. Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów z uwzględnieniem wysokości wiremii w grupie badanej

Rycina 34. Rozkład średnich wartości odsetkowych monocytów z uwzględnieniem wysokości wiremii w grupie badanej

Rycina 35. Rozkład średnich wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych z uwzględnieniem wysokości wiremii w grupie badanej

Rycina 36. Rozkład średnich wartości odsetkowych bazofili z uwzględnieniem wysokości wiremii w grupie badanej

Rycina 37. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD8 z uwzględnieniem wysokości wiremii w grupie badanej

Rycina 38. Rozkład wartości stosunku CD4:CD8 z uwzględnieniem wysokości wiremii w grupie badanej

Rycina 39. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD19 z uwzględnieniem wysokości wiremii w grupie badanej

Rycina 40. Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów z uwzględnieniem wartości aminotransferaz w grupie badanej

Rycina 41. Rozkład średnich wartości odsetkowych monocytów z uwzględnieniem wartości aminotransferaz w grupie badanej

Rycina 42. Rozkład średnich wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych z uwzględnieniem wartości aminotransferaz w grupie badanej

Rycina 43. Rozkład średnich wartości odsetkowych bazofili z uwzględnieniem wartości aminotransferaz w grupie badanej

Rycina 44. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD8 z uwzględnieniem wartości aminotransferaz w grupie badanej

Rycina 45. Rozkład wartości stosunku CD4:CD8 z uwzględnieniem wartości aminotransferaz w grupie badanej

Rycina 46. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD19 z uwzględnieniem wartości aminotransferaz w grupie badanej

Rycina 47. Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów z uwzględnieniem przebytego leczenia przeciwwirusowego pacjentów grupy badanej

Rycina 48. Rozkład średnich wartości odsetkowych monocytów z uwzględnieniem przebytego leczenia przeciwwirusowego pacjentów grupy badanej

Rycina 49. Rozkład średnich wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych z uwzględnieniem przebytego leczenia przeciwwirusowego pacjentów grupy badanej

Rycina 50. Rozkład średnich wartości odsetkowych bazofili z uwzględnieniem przebytego leczenia przeciwwirusowego pacjentów grupy badanej

Rycina 51. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD8 z uwzględnieniem przebytego leczenia przeciwwirusowego pacjentów grupy badanej

Rycina 52. Rozkład wartości stosunku CD4:CD8 z uwzględnieniem przebytego leczenia przeciwwirusowego pacjentów grupy badanej

Rycina 53. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD19 z uwzględnieniem przebytego leczenia przeciwwirusowego pacjentów grupy badanej

Rycina 54. Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy z w zależności od efektów terapii przeciwwirusowej

Rycina 55. Rozkład średnich wartości odsetkowych monocytów z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy z w zależności od efektów terapii przeciwwirusowej

Rycina 56. Rozkład średnich wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy z w zależności od efektów terapii przeciwwirusowej

Rycina 57. Rozkład średnich wartości odsetkowych bazofili z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy z w zależności od efektów terapii przeciwwirusowej

Rycina 58. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD8 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy z w zależności od efektów terapii przeciwwirusowej

Rycina 59. Rozkład średnich wartości stosunku CD4:CD8 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy z w zależności od efektów terapii przeciwwirusowej

Rycina 60. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD19 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy z w zależności od efektów terapii przeciwwirusowej

Rycina 61. Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności chorób dodatkowych

Rycina 62. Rozkład średnich wartości odsetkowych monocytów z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności chorób dodatkowych

Rycina 63. Rozkład średnich wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności chorób dodatkowych

Rycina 64. Rozkład średnich wartości odsetkowych bazofili z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności chorób dodatkowych

Rycina 65. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD8 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności chorób dodatkowych

Rycina 66. Rozkład średnich wartości odsetkowych stosunku CD4:CD8 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności chorób dodatkowych

Rycina 67. Rozkład średnich wartości odsetkowych stosunku CD19 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności chorób dodatkowych

Rycina 68. Rozkład średnich wartości odsetkowych limfocytów z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autoprzeciwciał

Rycina 69. Rozkład średnich wartości odsetkowych monocytów z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autoprzeciwciał

Rycina 70. Rozkład średnich wartości odsetkowych komórek kwasochłonnych z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autoprzeciwciał

Rycina 71. Rozkład średnich wartości odsetkowych bazofili z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autoprzeciwciał

Rycina 72. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD8 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autoprzeciwciał

Rycina 73. Rozkład średnich wartości stosunku CD4:CD8 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autoprzeciwciał

Rycina 74. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD19 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autoprzeciwciał

9. SPIS TABEL

Tabela 1. Wartości referencyjne parametrów laboratoryjnych oznaczanych w Centralnym Laboratorium Szpitala Klinicznego im. K. Jonschera UM w Poznaniu

Tabela 2. Wartości referencyjne subpopulacji limfocytów oznaczanych w Katedrze i Zakładzie Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinowskiego w Poznaniu oraz w Pracowni Cytometrii przy Klinice Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej SK im. K. Jonschera w Poznaniu

Tabela 3. Rozkład wartości parametrów laboratoryjnych w grupie badanej

Tabela 4. Rozkład wartości parametrów laboratoryjnych w grupie kontrolnej

Tabela 5. Rozkład wartości odsetkowych (%) elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej u dziewczynek z grupy badanej oraz kontrolnej

Tabela 6. Rozkład wartości odsetkowych (%) elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej u chłopców z grupy badanej i kontrolnej

Tabela 7. Rozkład wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem czasu trwania zakażenia HCV pacjentów

Tabela 8. Rozkład średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem wysokości wirerii w grupie badanej

Tabela 9. Rozkład średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy z w zależności od wartości aminotransferaz

Tabela 10. Rozkład średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy z w zależności od przebytego leczenia przeciwwirusowego

Tabela 11. Rozkład średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy z w zależności od efektów terapii przeciwwirusowej

Tabela 12. Rozkład średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności innych chorób przewlekłych

Tabela 13. Rozkład średnich wartości odsetkowych elementów immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od obecności autoprzeciwciał

10. STRESZCZENIE

Wstęp: Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C (PWZW C) jest istotnym problemem zdrowotnym o stale rosnącym znaczeniu na świecie nie tylko u dorosłych, ale również u dzieci. Wiele aspektów dotyczących przebiegu PWZW C u dzieci nie zostało dotąd dokładnie wyjaśnionych. Mało wiadomo również o udziale odporności wrodzonej w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu C, zwłaszcza u dzieci. Przebieg zakażenia HCV ma najczęściej charakter przewlekły, co można tłumaczyć zaburzeniami odporności, także wrodzonej. Wydaje się, że odgrywa ona istotną rolę jako, że układ odpornościowy człowieka, a zwłaszcza odporność nabyta jest niedojrzały i pozostaje w stanie ciągłego rozwoju

Cel: Podstawowym celem pracy była ocena wybranych elementów odporności wrodzonej w PWZW C u dzieci oraz próba określenia ich roli w immunopatogenezie i ewolucji omawianej choroby. Realizacja tego zadania wymagała sformułowania celów szczegółowych: ustalenia liczby i funkcji komórkowych parametrów odporności wrodzonej u badanych dzieci oraz określenia zależności między wybranymi elementami odporności wrodzonej a parametrami klinicznymi, przebiegiem zakażenia HCV oraz skutecznością leczenia PWZW C w badanej grupie.

Metody: Badaniem objęto 80 dzieci w wieku od 1 do 18 lat hospitalizowanych w Klinice Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego oraz Poradni Hepatologicznej w Szpitalu Klinicznym im. Karola Jonschera w Poznaniu w latach 2004-2011. Wyodrębniono 2 grupy pacjentów: grupę badaną -50 dzieci z PWZW C potwierdzonym na podstawie standardowych kryteriów oraz grupę kontrolną – 30 dzieci, u których wykluczono zakażenie HCV. W analizie danych uwzględniono następujące parametry: wiek i płeć dzieci, czas trwania zakażenia HCV, przebieg i efekt dotychczasowego leczenia. Oceniano biochemiczne wykładniki funkcji wątroby, ilościowe i jakościowe oznaczenia HCV-RNA z genotypem wirusa, wynik badania histopatologicznego biopsji wątroby. Wszystkie dzieci zakażone HCV oraz z grupy kontrolnej miały wykonane badania oceniające układ odpornościowy: skład odsetkowy i niektóre wzajemne proporcje limfocytów: TCD3+, BCD19+, TCD 4+, TCD 8+, CD4:CD8 oraz komórek NK. Aby określić zależność między poszczególnymi elementami immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej a parametrami klinicznymi, przebiegiem zakażenia HCV oraz efektem terapii PWZW C

pacjentów z grupy badanej podzielono na podgrupy uwzględniając płeć, czas trwania zakażenia HCV, poziom wirerii, aktywność aminotransferaz, przebyte leczenie przeciwwirusowe i jego skuteczność, obecność chorób współistniejących oraz występowanie autoprzeciwciał.

Wyniki: W grupie badanej domniemany czas trwania zakażenia HCV wahał się od 2 do 16 lat (średnio 8,5 lat). Obecność przeciwciał anti-HCV oraz HCV RNA w surowicy krwi stwierdzono u wszystkich pacjentów w grupie badanej. Średni poziom wirerii wynosił 2232728 IU/ml (SD 942778 IU/ml). Dominującym genotypem u pacjentów z grupy badanej był genotyp 1 (61,25%). W grupie badanej wykazano istotnie statystycznie wyższą wartość ALT, AST, gammaglobulin, ALP, Fe w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w aktywności GGTP, wartości TBIL oraz białka w surowicy krwi między obiema grupami. W pracy wykazano, że obie grupy pacjentów tj. dzieci z PWZW C oraz grupa kontrolna różnią się istotnie pod względem składu subpopulacji leukocytów krwi obwodowej. W grupie dzieci zakażonych HCV wzrastał odsetek limfocytów efektorowych, potencjalnie cytotoksycznych TCD8+. Wzrost subpopulacji limfocytów TCD8+ wpływał na obniżenie stosunku limfocytów T (CD4:CD8). W badanym materiale nie stwierdzono korelacji między zmianami wartości limfocytów TCD8+ oraz stosunku CD4:CD8 a płcią pacjentów, wysokością wirerii oraz aktywnością aminotransferaz. Wartość odsetka limfocytów T CD8+ była wyższa w grupie dzieci, u których czas trwania zakażenia HCV był krótszy niż 10 lat, u dzieci, które przebyły choroby nowotworowe oraz u tych, u których wykazano obecność autoprzeciwciał. W pracy stwierdzono istotny statystycznie spadek średniej wartości odsetkowej limfocytów T CD4+ w grupie dziewcząt z PWZW C, w porównaniu do grupy kontrolnej. Obserwowano również wyższą średnią wartość odsetkową limfocytów T CD4+ w podgrupie pacjentów z zakażeniem trwającym ≤ 10 lat oraz u dzieci, które nie przebyły chorób dodatkowych. Podobne obserwacje poczyniono u pacjentów z niższą wirerią, chorych leczonych przeciwwirusowo oraz u dzieci, które uzyskały SVR. Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w średniej wartości odsetkowej komórek NK między grupą pacjentów z PWZW C a kontrolną. Wykazano również niższą średnią wartość odsetkową subpopulacji limfocytów B w grupie dzieci z PWZW C w porównaniu z grupą kontrolną.

Wnioski: W podsumowaniu, wyniki pracy w konfrontacji z danymi z piśmiennictwa wskazują, że układ odpornościowy dzieci z PWZW C reaguje na istniejące zakażenie poprzez zmiany składu subpopulacji limfocytów krwi obwodowej. Do istotnych zmian należy wzrost

efektorowych komórek o potencjale cytotoksycznym limfocytów T CD8⁺ i spadek stosunku limfocytów T CD4:CD8. Wydaje się, że spadek odsetka limfocytów T CD8⁺ u dzieci z zakażeniem trwającym ponad 10 lat sugeruje mniejszą szansę eliminacji wirusa wraz z czasem trwania choroby. Z kolei wyższa średnia wartość limfocytów T CD4⁺ wykazuje związek z niższą wiremią, krótszym czasem trwania zakażenia oraz uzyskaniem utrwalonej odpowiedzi wirusologicznej (SVR). U chorych dzieci z PWZW C niższy średni odsetek limfocytów CD19⁺ sugeruje spadek odpowiedzi humoralnej. Wydaje się również, że ocena immunofenotypu limfocytów krwi obwodowej u dzieci z PWZW C przed planowaną terapią przeciwwirusową może mieć wartość prognostyczną co do efektów leczenia. Nadal wiele aspektów dotyczących immunopatogenezy PWZW C nie zostało jeszcze do końca poznanych i wymaga dalszych badań.

11. SUMMARY

Background: Chronic hepatitis C (CHC) is a major health problem of growing importance in the world, seen not only in adults but also in children. Many aspects of the course of CHC in children has not yet been thoroughly explained. Little is known about the involvement of the innate immunity in chronic hepatitis C, especially in children. Hepatitis C is a common infectious disease in the pediatric population. Its course is usually a chronic condition, which can be explained by impaired immunity, including innate one. It seems that it plays an important role in the human immune system, especially since human immune system, and in particular acquired immunity is immature and remains in a state of constant growth.

Objective: The primary objective of this study was to evaluate selected elements of innate immunity in CHC in children and attempt to define their role in the pathogenesis and evolution of the disease in question. This task required the formulation of specific objectives: to determine the number and function of cellular innate immunity parameters of the children, and determine the relationships between selected elements of innate immunity and the clinical parameters, the course of HCV infection and the effect of CHC therapy in the study group.

Methods: The study included 80 children aged 1 to 18 hospitalized at the Clinic of Infectious Diseases and Pediatric Neurology at Karol Marcinkowski University of Medical Sciences and at the Outpatient Liver Clinic at the Charles Jonscher Hospital in Poznan in the years 2004-2011. Patients were divided into 2 groups: a group of 50 children with CHC confirmed on the basis of standard criteria and a control group of 30 children in whom HCV infection was excluded. The data analysis included the following parameters: age and gender of the children, duration of HCV infection, and the effect of the current course of treatment. The assessed were: biochemical markers of liver function, quantitative and qualitative HCV-RNA viral genotype, and liver biopsy. All children infected with HCV, and the control group had taken tests assessing the immune system: the composition of interest and some of the relative proportions of lymphocytes: T CD3 +, B CD19 +, T CD 4 +, T CD 8 +, as well as NK cells. To determine the relationship between the various elements of the peripheral blood leukocyte immunophenotype and clinical parameters, the course of HCV infection and the effect of treatment of CHC, the patients from the study group were divided into subgroups taking into account their sex, the duration of HCV infection, viral load, the activity of aminotransferases,

history of the antiviral treatment and the effect of therapy, the presence of additional diseases and the presence of auto-antibodies.

Results: In the study group the duration of HCV infection ranged from 2 to 16 years (an average of 8.5 years). The presence of anti HCV antibodies and HCV RNA in serum was found in all patients in the study group. The average level of viral load was 2232728 IU/ml (SD 942778 IU/ml). The predominant genotype in patients was genotype 1 (61.25%). In the study group a significantly higher value of ALT, AST, gamma globulin, ALP, Fe were demonstrated, comparing to the control one. There were no statistically significant differences in the level of GGT, TBIL and protein in serum between two groups. It was shown, that both groups of patients, namely the children with CHC and the control group differ significantly in the content of leukocyte subpopulations in peripheral blood. In the group of children infected with HCV the percentage of effector lymphocytes increased, potentially T CD8 + cytotoxic. The increase in T CD8 + lymphocyte subpopulations influenced the reduction of the ratio of T lymphocytes (CD4: CD8). There was no correlation found between the changes of T CD8 + lymphocytes and the ratio of CD4: CD8 and the sex of patients, the amount of viral load and the activity of aminotransferases. The value of the percentage of T CD8 + cells was higher in the group of children in whom the duration of HCV infection was less than 10 years, in children with a history of cancer, and those with the presence of auto-antibodies. The study demonstrated a statistically significant decrease in mean T CD4+ value of lymphocytes among girls with CHC compared to the control group. There was also a higher average percent T CD4 + lymphocytes in a subset of patients with infection lasting ≤ 10 years and in children who have not gone through additional diseases. Similar observations were made in patients with a lower viral load, antiviral-treated patients and in patients who achieved SVR. There was no statistically significant difference in the average interest of NK cells between the group of patients with CHC and the control group. There was also demonstrated a lower average value of B lymphocytes in children with CHC compared with the control group.

Conclusions: In conclusion, the results of work in the confrontation with data from the literature suggest that the immune system of children with CHC responds to an existing infection by changing the composition of peripheral blood lymphocyte subsets. The most important changes are the increase of percentage of effector lymphocytes, potentially cytotoxic T CD8 + and reduction of the ratio of T lymphocytes (CD4: CD8). The decrease of the percentage of T CD8 + cells in the group of children in whom the duration of HCV

infection was longer than 10 years suggests that the longer the disease lasts, the chance to eliminate the virus is smaller. A higher average percent T CD4 + lymphocytes correlates with a lower viral load, shorter lasting infection and achieving SVR. A lower average value of B lymphocytes in children with CHC suggests the decrease of humoral immunity. The analysis of the peripheral blood leukocyte immunophenotype in children with CHC can be predictive in terms of antiviral treatment. Still many aspects of the pathogenesis of CHC are not yet fully known and require further study.