

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Možnosti diagnostiky a terapie těžkých kombinovaných imunodeficiencí
Bakalářská práce

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Possibilities of Diagnosis and Therapy of Severe Combined Immunodeficiencies
Bachelor Thesis

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Natália Šamajová**
Osobní číslo: **C17221**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Možnosti diagnostiky a terapie těžkých kombinovaných imunodeficiencí**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Seznamte se s literárními údaji o těžkých kombinovaných imunodeficiencích a vypracujte teoretickou rešerši na toto téma. V úvodní části popište příčiny, příznaky a dědičné faktory onemocnění.
2. Dále zpracujte přehled diagnostických metod, které se v současné době používají v souvislosti s tímto typem onemocnění, včetně uvedení principů jednotlivých metod.
3. Uveďte také terapeutické možnosti tohoto onemocnění, včetně diskuze míry úspěšnosti jednotlivých přístupů.
4. Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, schémata a grafy a ze získaných literárních údajů vyvodte závěry o současném stavu znalostí v této oblasti.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prehlasujem:

Túto prácu som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., O autorskom práve, o právach súvisiacich s autorským právom a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon) v znení neskorších predpisov, najmä so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzavretie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 ods. 1 autorského zákona, a s tým, že pokiaľ dôjde k užitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia o použití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorenie diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Na vedomie, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Zb., O vysokých školách a o zmene a doplnení niektorých zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov, a smernice Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidlá pre odovzdávanie, zverejňovanie a formálnu úpravu záverečných prác, v znení neskorších dodatkov, bude práca zverejňovaná prostredníctvom Digitálnej knižnice Univerzity Pardubice.

V Pardubiciach dňa

Natália Šamajová

Pod'akovanie

Rada by som touto cestou chcela poďakovať Mgr. Jankovičovej Barbore, Ph.D. za odborné vedenie bakalárskej práce, za jej trpezlivosť a cenné rady, ktoré mi pomohli prácu skompletizovať. V neposlednej rade patrí poďakovanie aj mojej rodine, ktorá ma podporovala počas celej tvorby práce.

ANOTACE

Bakalářská práce přibližuje základní znaky protiinfekční imunity. Zaměřuje se především na poruchy imunity, konkrétně na onemocnění těžké kombinované imunodeficiency (SCID), při kterém je zvýšená náchylnost k infekcím. Uvedeny jsou příčiny, možnosti diagnostiky a terapie tohoto onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

protiinfekční imunita, SCID, diagnostika, terapie

NÁZOV

Možnosti diagnostiky a terapie těžkých kombinovaných imunodeficiencií

ANOTACIA

Bakalárska práca približuje základné znaky protiinfekčnej imunity. Zameriavam sa predovšetkým na poruchy imunity, konkrétne na ochorenie ťažkej kombinovanej imunodeficiency (SCID), pri ktorej je zvýšená náchylnosť k infekciám. Uvedené sú príčiny, možnosti diagnostiky a terapie tohto ochorenia.

KEÚČOVÉ SLOVÁ

protiinfekčná imunita, SCID, diagnostika, terapia

TITLE

Possibilities of diagnosis and therapy of severe combined immunodeficiencies

ANNOTATION

Bachelor thesis clarifies the basic featur of anti-infective immunity. It is focused mainly on immune disorder, exactly on severe combined immunodeficiency disease (SCID), in which there is an increased susceptibility to infections. The causes, possibilities of diagnosis and therapy of this disease are presented.

KEYWORDS

anti-infective immunity, SCID, diagnostic, therapy

OBSAH

ZOZNAM ILUSTRÁCIÍ A TABULIEK.....	10
ZOZNAM GRAFOV	11
ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK.....	12
ÚVOD.....	14
1 PROTIINFEKČNÁ IMUNITA	15
1.1 Nešpecifické mechanizmy imunitného systému	16
1.1.1 Bunková zložka vrodenej imunity	16
1.1.2 Humorálna zložka vrodenej imunity.....	18
1.2 Špecifické mechanizmy imunitného systému	19
1.2.1 Bunková zložka adaptívnej imunity	20
1.2.2 Humorálna zložka adaptívnej imunity	21
1.3 Obrana proti nežiadúcim mikroorganizmom	22
1.3.1 Obrana proti baktériám	23
1.3.2 Obrana proti vírom.....	24
1.4 Imunitný systém v detstve.....	24
2 IMUNODEFICIENCIE.....	26
2.1 Primárne imunodeficiencie	26
2.1.1 Protilátkové (humorálne) imunodeficiencie	27
2.1.2 Fagocytárne imunodeficiencie.....	28
2.1.3 Komplementové imunodeficiencie	29
2.1.4 Kombinovane T/B bunkové imunodeficiencie.....	29
2.2 Sekundárne imunodeficiencie.....	30
3 ŤAŽKÁ KOMBINOVANÁ IMUNODEFICIENCIA (SCID)	31
3.1 Príčiny ochorenia	31
3.2 Klinický obraz.....	33
3.3 Kategórie ochorení SCID T- B+	34
3.3.1 X-SCID	35
3.3.2 Deficit α -reťazca receptora IL-7 (IL-7RA).....	35

3.3.3	Deficit Janusovej kinázy 3	36
3.3.4	Deficit reťazcov CD3 a CD45	36
3.4	Kategórie ochorení SCID T-B-	37
3.4.1	Deficit adenosín deaminázy.....	37
3.5	Ďalšie typy SCID.....	38
3.5.1	SCID A	38
3.5.2	Omenov syndróm.....	39
4	DIAGNOSTIKA OCHORENIA SCID.....	40
4.1	Rodinná a osobná anamnéza	40
4.2	Laboratórne vyšetrenie	40
4.2.1	Vyšetrenie krvného obrazu	41
4.2.2	Imunofenotypizácia lymfocytov	42
4.2.3	Mikrobiologické vyšetrenie <i>Pneumocystis jirovecii</i>	43
4.3	Skríning novorodencov.....	45
4.3.1	TREC test.....	46
5	MOŽNOSTI TERAPIE OCHORENIA SCID.....	49
5.1	Transplantácia hematopoetických kmeňových buniek.....	49
5.1.1	Výber vhodného darcu.....	50
5.1.2	Predtransplantačná príprava.....	51
5.1.3	Priebeh transplantácie	51
5.2	Substitučná enzýmová liečba	53
5.3	Génová terapia	53
	ZÁVER	56
	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	57

ZOZNAM ILUSTRÁCIÍ A TABULIEK

Obrázok 1: Mechanizmy imunitného systému.....	15
Obrázok 2: Uchytenie fagocytov na endoteliálnom povrchu a ich preniknutie do tkaniva	18
Obrázok 3: Aktivácia komplementu	19
Obrázok 4: Štruktúra protilátky IgG	21
Obrázok 5: TLR receptory pre mikróby.....	23
Obrázok 6: Signalizačný komplex TCR ukazujúci, kde ZAP70 zapadá do signalizačnej kaskády	32
Obrázok 7: Analyzátor XE-5000 SYSMEX	41
Obrázok 8: Prietokový cytometer FACS Canto™ II; Schéma prietokovej cytometrie	43
Obrázok 9: Vzorka alveolárneho exsudátu so závažným chronickým intersiciálnym zápalom spôsobeným Pneumocystis jirovecii.....	45
Obrázok 10: Shematické znázornenie QPCR.....	47
Obrázok 11: Princíp procesu génovej terapie	54
Obrázok 12: Mechanizmus in vivo / ex vivo génovej terapie.....	55
Tabuľka 1: T-lymfocyty a ich vlastnosti.....	20
Tabuľka 2: Typy receptorov rozpoznávajúcich molekulárne vzory spojené s patogénitou PAMPs.....	23
Tabuľka 3: Počty pacientov registrovaných v databáze Európskej spoločnosti pre imunodeficiencie zo 41 zemí pre rok 2004-2011	27
Tabuľka 4: Genetické defekty asociované s ťažkou kombinovanou imunodeficienciou	33
Tabuľka 5: Referenčné hodnoty KO	41
Tabuľka 6: Diagnostické kritéria pri imunofenotypizácii T-lymfocytov	43
Tabuľka 7: Porovnanie senzitivity záchytu spôsobené Pneumocystis jirovecii podľa typu odobratého materiálu	44
Tabuľka 8: Skriningové testy novorodencov prebiehajúce na Slovensku	46

ZOZNAM GRAFOV

Graf 1: Frekvencia PID.....	27
------------------------------------	----

ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK

ADA	adenozín deamináza
Ag	antigén
BCG	Calmettov-Guérinov bacil (z angl. bacillus Calmette-Guérin)
BL	B-lymfocyt
C	komplement
CBC	kompletný krvný obraz (z angl. complete blood count)
CD	diferenciační antigén (z angl. cluster of differentiation)
CR	komplementový receptor
CVID	bežná variabilná imunodeficiencia (z angl. common variable immunodeficiency)
DBS	suchá krvná kvapka (z angl. dried blood spot)
DSB	dvojvláknové zlomy DNA (z angl. double-strand breaks)
FAS	fragment stimulujúci apoptózu (z angl. apoptosis-stimulating fragment)
FcεR	receptor s vysokou afinitou pre IgE
GVHD	ochorenie reakcie štepú proti hostiteľovi (z angl. graft-versus-host-disease)
G-CSF	faktor stimulujúci kolónie granulocytov (z angl. granulocyte colony stimulating factor)
HLA	ľudský leukocytárny antigén (z angl. human leukocyte antigen)
IFN	interferón
Ig	imunoglobulín
IgA	imunoglobulín A
IgG	imunoglobulín G
IgM	imunoglobulín M
IL	interleukín
IPV	inaktivovaná polio vakcína
JAK3	Janusova kináza 3 (z angl. Janus kinase 3)
KD	kostná dreň
LAD	deficit adhézie leukocytov (z angl. leukocyte adhesion deficiency)
LPS	lipopolysacharid
MAC	komplex atakujúci membrány (z angl. membrane attack complex)
MCP	membránový proteínový kofaktor (z angl. membrane cofactor protein)
MHC	hlavný histokompatibilný komplex (z angl. major histocompatibility complex)

MHC-I	hlavný histokompatibilný komplex 1. triedy
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NHEJ	nehomologické spájanie koncov (z angl. non-homologous end joining)
NK bunka	prirodzene zabíjačská bunka (z angl. natural killer cell)
OPV	živá perorálna vakcína proti detskej obrne
PAMPs	molekulárne vzory spojené s patogénom (z angl. pathogen associated molecular patterns)
PID	primárne imunodeficiencie
PMNL	polymofonukleárne leukocyty
PRKDC	proteinkinázou aktivovaný katalytický polypeptid (z angl. protein kinase DNA-activates catalytic polypeptide)
PRRs	receptory rozpoznávajúce patogén (z angl. pathogen recognition receptors)
RAG	gén pre aktiváciu rekombinácie (z angl. recombination activating gene)
SCID	ťažká kombinovaná imunodeficiencia (z angl. severe combined immunodeficiency)
Tc	cytotoxický T-lymfocyt
TCR	T-bunkový receptor (z angl. T cell receptor)
TGF-β	transformujúci rastový faktor β (z angl. transforming growth factor β)
Th	pomocný T-lymfocyt (z angl. T helper cells)
TL	T-lymfocyt
TLR	receptor podobný génu Toll (z angl. Toll-like receptor)
TNF	tumor nekrotizujúci faktor (z angl. tumor necrosis factor)
TRAIL	TNF-príbuzný ligand indukujúci apoptózu (z angl. related apoptosis inducing ligand TNF)
TREC	excízne kruhy T bunkových receptorov (z angl. T cell receptor excision circles)

ÚVOD

Imunitný systém a imunita ako taká ma značný vplyv na procesy, ktoré prebiehajú v organizme. Obranyschopnosť jedinca je vystavovaná mnohým vplyvom okolia ako je nadmerný stres, nespavosť, psychické vypätie či nezdravý životný štýl, ktoré ju môžu poškodiť. Systém taktiež môže ovplyvniť zmena v genetickom kóde či vypuknutie závažnej infekcie. Organizmus trpiaci poškodením imunity má zníženú reaktivitu imunitných buniek k cudzorodým látkam a náchylnosť k infekciám je vyššia. Medzi ochorenia trpiace poškodením imunity patria aj imunodeficiencie.

Pri imunodeficiencii je jedna z častí imunitného systému poškodená. Podľa vzniku poškodenia ich môžeme rozdeliť na primárne a sekundárne. Primárne imunodeficiencie vznikajú už pri poruche v embryonálnom vývine, ide o geneticky podmienené poruchy. Častejšie sa vyskytujúce sú sekundárne imunodeficiencie, ktoré vzniknú ako možný následok infekcie, nadmerného užívania alkoholu, nesprávnym liečebným postupom alebo sú dôsledkom chronického ochorenia.

Diagnostiku týchto ochorení vykonávame laboratórnym vyšetrením na základe klinických príznakov a možných komplikácií. Vyšetrujeme poruchy funkcie B lymfocytov, poruchy zápalovej odpovede a poruchy počtu a funkcie buniek myeloidnej a lymfoidnej rady. K zachyteniu ťažkých vrodených imunitných porúch by pomohlo zavedenie celoplošného testovania novorodencov v rámci skríningu vrodených ochorení.

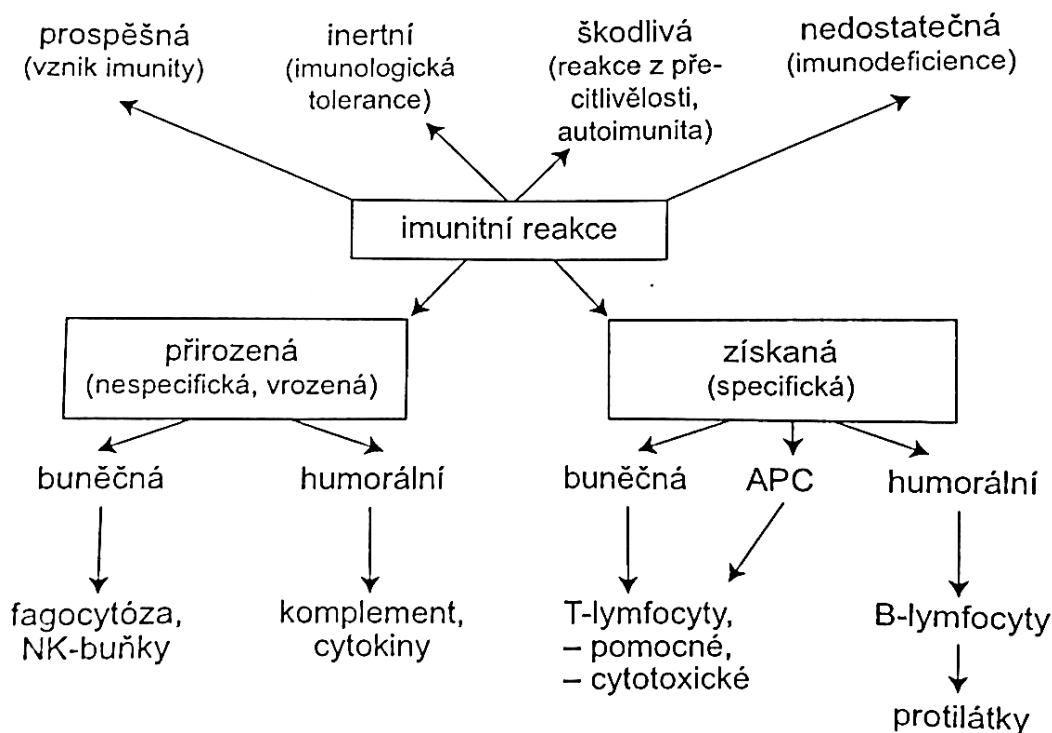
Vo svojej práci budem podrobne rozoberať ťažkú kombinovanú imunodeficienciu (SCID), ktorá je najzávažnejšia forma z primárnych imunodeficiencií. Zaoberať sa budem predovšetkým diagnostikou a možnosťami jej terapie. SCID sa prejavuje predovšetkým behom prvých mesiacoch života a býva doprevádzaná zvýšenou náchylnosťou k infekciám, preto bude zaradená tiež kapitola venovaná protiinfekčnej imunite a imunitnej odpovede v detskom veku.

1 PROTIINFEKČNÁ IMUNITA

Imunita je schopnosť organizmu reagovať voči cudzorodým mikróbom, brániť ich vniknutiu do organizmu a následne likvidovať škodlivé patogény. Imunitnú odpoveď zabezpečuje organizmus pomocou imunitnej reakcie, čo je súhrn procesov, ktorými telo reaguje na stretnutie s antigénom (Bartůňková, 2011).

Antigén (Ag) je látka, ktorá má možnosť vyvolať imunitnú odpoveď. Medzi takéto látky môžeme zaradiť bielkoviny na povrchu baktérií, vírusov, polysacharidy, nukleové kyseliny, lipidy, lipoproteíny. Ag môže byť aj chemická látka zložitejšieho usporiadania, ktorá nemá prirodzený výskyt v tele. Môžeme ich rozdeliť na exoantigény a autoantigény. Exoantigény sú cudzorodé častice z vonkajšieho prostredia ako napr. infekčné mikroorganizmy a ich produkty. Autoantigény pochádzajú z vlastného organizmu, nie sú cudzorodé. Časť molekuly Ag rozpoznávaná imunitným systémom nazývame epitop (Hořejší, 2002).

Mechanizmy imunitného systému môžeme rozdeliť na nešpecifické (neadaptívne) a špecifické (adaptívne). Oba systémy obsahujú bunkovú a humorálnu časť (viz. Obr. 1).



Obrázok 1: Mechanizmy imunitného systému (prevzaté z: Ferenčík, 2005).

1.1 Nešpecifické mechanizmy imunitného systému

Neadaptívne mechanizmy nazývame aj ako vrodené, oproti špecifickým mechanizmom sú evolučne staršie. Bunky nešpecifickej imunity sú predom pripravené v organizme a na patogénny podnet reagujú rýchlo, v rádoch niekoľko minút až hodín. Vrodený imunitný systém nedisponuje imunologickou pamäťou (Hořejší, 2005).

Medzi bunkovú časť vrodených mechanizmov patria NK-bunky, mastocyty, a fagocyty. Do humorálnej časti zaradujeme komplementový systém a niektoré cytokíny (Ferenčík, 2005). K týmto zložkám pripisujeme aj prirodzenú rezistenciu, ktorá patrí medzi prirodzené neimunitné obranné mechanizmy. Tieto mechanizmy obstaráva napr. koža, tá poskytuje pri neporušenom povrchu integritu voči okoliu. Ďalej ich ide rozdeliť na chemické, medzi tie patria enzýmy ako je pepsín (v žalúdku) a lysozým (v slinách, slzách, potu), mechanické, čo zabezpečuje pohyb riasiniek alebo tekutiny v močových cestách, mikrobiálne kde cudzorodý mikroorganizmus súťaží s normálnou nepatogénnou flórou o živiny a následne o receptorové miesta (sprostredkujú adhéziu a tvorbu antibakteriálnej látky). Vrodené mechanizmy sa zapájajú ako prvé do obranných reakcií voči patogénu a sú dôležité pre súhrnný výsledok tejto reakcie. Rozoznávajú typické chemické štruktúry mikróbov a aktivujú efektorové mechanizmy buniek nešpecifickej imunity. Aktivované fagocyty viažu fragmenty bielkovín patogénov cez MHC glykoproteíny a prezentujú ich potom na svojom povrchu, kde sú rozpoznávané T-lymfocytmi (TL). Zahajujú sa tak antigénne špecifické procesy (Hořejší, 2005).

1.1.1 Bunková zložka vrodenej imunity

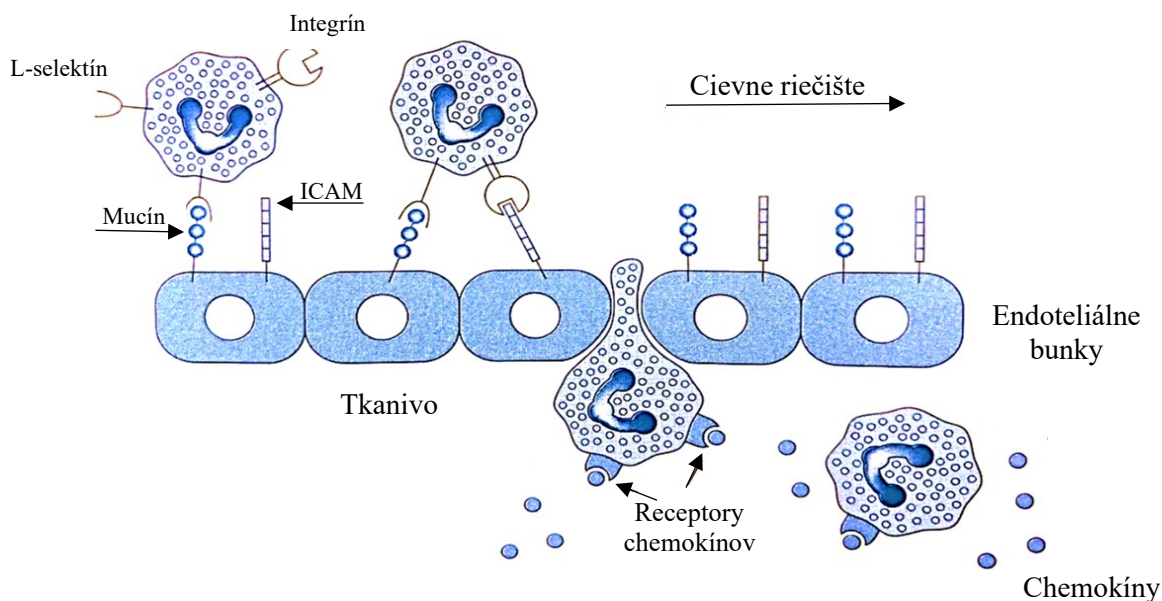
NK bunky v priebehu vývoja prešli mnohými adaptačnými mechanizmami a svojimi črtami prispievajú k obom typom imunity či už prirodzenej alebo špecifickej.

Produkujú cytokíny a chemokíny ovplyvňujúce imunitnú odpoveď jedinca prostredníctvom granzýmov alebo perforínov, ktoré majú schopnosť aktivácie tzv. receptorov smrti ako napr. Fas alebo TRAIL a tie po naviazaní na ligand môžu spôsobiť smrť bunky (Mocikat, 2003). Prirodzeným ligandom pre Fas je FasL, membránovo viazaný ligand, tvoriaci homotrimery, exprimované najmä pri NK bunkách a aktivovaných TL. Pomocou metaloproteináz môže dôjsť k odštiepeniu a prejsť tak do solubilnej formy (Black, 1997). TRAIL, ligand indikujúci apoptózu, sa syntetizuje ako transmembranový proteín. Odštiepením extracelulárnej domény vzniká rozpustná forma ligandu. Ako aj FasL tak aj TRAIL, tvorí homotrimery, ktoré sa viažu na špecifické receptory na povrchu buniek (Kimberley, 2004).

Naviac je na povrchu NK buniek vyjadrený Fc fragment IgG (CD16), umožňujúci zničiť cieľovú bunku alebo patogén, ktorý je obalený protilátkou, s vyššou efektívnosťou. Majú vyvinutý mechanizmus, ktorý sprostredkujú špecifické inhibičné receptory MHC slúžiace k rýchlej eliminácii a detekcii potencionalne nebezpečných buniek (Moretta, 2002).

MHC gp.I. rozoznáva inhibičné receptory. Signály, ktoré sa dostanú k bunke cez tieto receptory, sú negatívne tzn. inhibujú cytotoxické mechanizmy. Tieto receptory rozdeľujeme do dvoch štruktúrnych skupín, C-lektínové a imunoglobulínové. V NK-bunkách sa nenachádza univerzálny receptor, rozoznávajúci všetky izotopy a alelické formy MHC gp.I., pretože jednotlivé klony NK buniek exprimujú na svojom povrchu mnoho kombinácií týchto inhibičných receptorov, rozoznávajúce niektoré formy molekúl MHC gp.I. Medzi inhibičné imunoglobulínové receptory zaradujeme KIR (Killer inhibitor receptors), ktorého aktivita je založená na asociácii s cytoplazmatickými fosfatázami, ktoré rušia signalizačné dráhy zahájene stimulačnými receptormi asociovanými s proteinkinázami. Podobne inhibičné receptory ako KIR sú LIR, pomáhajúce tlmiť aktivitu leukocytov. Do C-lektínových receptorov patrí CD94/NKG2 (Hořejší, 2005).

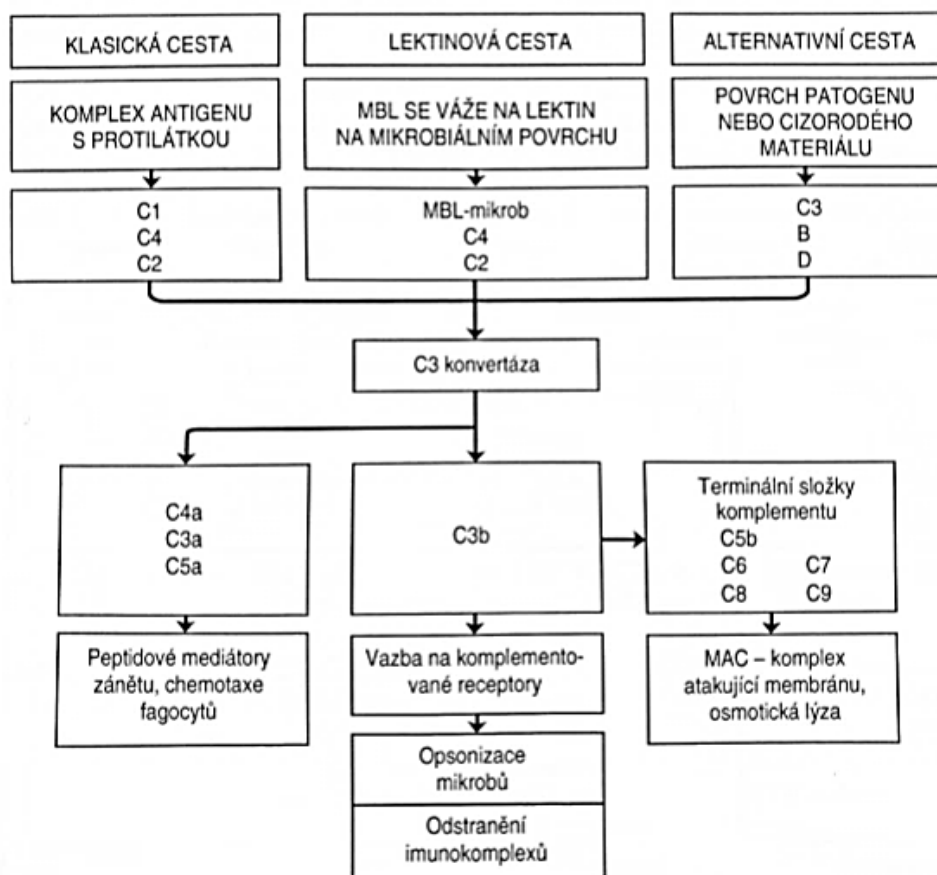
Ďalšie bunky vrodenej imunity sú **fagocytujúce bunky**, ktoré majú schopnosť fagocytózy, čo zahŕňa prichytenie fagocytov k endotéliam ciev, vniknutie do tkanív a sledovanie škodlivej látky. Fagocyt škodlivú látku rozozná, pohltí a následne odstráni. Medzi takéto bunky patria polymorfonukleárne granulocyty, monocyty, makrofágy. Fagocyty odpovedajú na infekciu pomocou cirkulujúcich PMNL granulocytov a monocytov, ktoré reagujú na signály ohrozenia tzv. SOS signály, ktoré sú vytvárané v mieste infekcie. Tieto signály zahŕňajú N-formyl-metionín obsahujúce peptidy koagulačného systému, peptidy uvoľňujúce baktériami, cytokíny uvoľnené z makrofágov po styku s baktériami v tkanive a produkty komplementu. SOS signály podporujú endotelové bunky v okolí miesta infekcie aby došlo k exprimácii bunkových adhézných molekúl ako napr. ICAM-1 a selektíny, ktoré sa viažu na komponenty na povrchu fagocytárnych buniek, čím spôsobia adhéziu fagocytov na endotel. V mieste infekcie sú produkované vazodilatačné látky, ktoré spôsobujú uvoľnenie spojov medzi endotelovými bunkami. Cez endotelovú bariéru neskôr prechádzajú fagocyty vtlačením sa medzi endotelové bunky v procese diapedézy. Hneď ako sa v tkanivových priestoroch vyskytnú SOS signály, pritiahnu fagocyt chemotaxiou do miesta infekcie a aktivujú fagocyt, čo spôsobuje vyššiu fagocytózu a usmrtenia nežiadúcich organizmov (*viz. Obr.2*) (Mayer, 2010).



Obrázok 2: Uchytenie fagocytov na endoteliálnom povrchu a ich preniknutie do tkaniva (prevzaté a upravené podľa: Hořejší, 2005).

1.1.2 Humorálna zložka vrodenej imunity

Na vrodenej imunite sa v neposlednej rade podieľa taktiež **komplement**. Ide o zložitý systém 40 regulačných glykoproteínov, ktoré obsahuje krvné sérum alebo sú na povrchu buniek, kde tvoria rôzne receptory. V krvnom séru sa nachádzajú zložky C1-C9, faktory B,D,P a regulátory aktivity H, I, DAF, MCP. Za normálnych podmienok tieto zložky komplementu v krvnom séru cirkulujú v neaktívnej forme. Aktivácia nastane po styku komplementu s jeho aktivátorom (napr. imunokomplex antigénu s protilátkou). Môže sa uskutočniť klasickou, alternatívnou alebo lektínovou cestou (viz. Obr. 3). Prvá neaktívna forma C1 sa premení na proteolytický enzým, ktorý rozdelí molekulu ďalšej zložky na dva fragmenty z nich jeden je opäť proteolytický enzým. Takýmto stupňovitým mechanizmom sa rozštiepi päť zložiek komplementu. Piata zložka sa rozdelí na fragmenty C5a a C5b. Na povrch bunky v blízkosti sa naviaže fragment C5b a neskôr sa k nemu naviažu aj C6,C7,C8 s pár molekul C9, tie sa už ďalej neštiepia. Vzniká komplex, ktorého molekuly sa zabudujú do cytoplazmatickej membrány cieľovej bunky, ktorú atakujú. To spôsobí vznik dier, cez ktoré do atakujúcej bunky začína vtekať voda čím nastane nabobtnanie bunky až jej samostatná lýza a smrť (Ferenčík, 2005).



Obrázok 3: Aktivácia komplementu: MBL-lektín viažuci manózu (prevzaté z: Bartůňková, 2007).

1.2 Špecifické mechanizmy imunitného systému

Špecifické zložky imunity taktiež môžeme označiť ako adaptívne, sú evolučne mladšie. Po styku s príslušným antigénom prebieha ich konečný vývoj, kedy sa aktivujú tie zložky, ktoré majú pre daný Ag antigénne špecifické receptory. Vzniká tu imunologická pamäť tzn. že, systém, reaguje rýchlejšie pri kontakte s mikroorganizmom ak už sa s ním v minulosti stretol (Bartůňková, 2007).

V organizme je pripravené značné množstvo B a T lymfocytov (BL a TL) predom. Bunky TL a BL od seba odlišíme detailmi na štruktúre väzbových miest antigénne špecifických povrchových receptorov. Tento princíp nazývame klonálny a anticipačný. Ak sa Ag dostane do organizmu, po určitej dobe dôjde k styku s lymfocytmi, ktoré nesú náležité receptory. Tie vytvoria klony buniek rovnakej špecifity, ktoré sú následne schopné Ag eliminovať. Imunitný systém môže anticipovať styk s akýmkoľvek antigénom, na čo reagujú pomnožením klonov. Funguje na princípu druhého signálu, čo znamená, že je potrebný tzv. pomocný signál od povrchovej molekuly CD28 TL, ktorá sa viaže na CD80 alebo CD86 antigén-prezentujúcich

buniek imunitného systému. To zabezpečuje aby nedošlo k nebezpečnej aktivácii lymfocytov (Hořejší, 2002).

1.2.1 Bunková zložka adaptívnej imunity

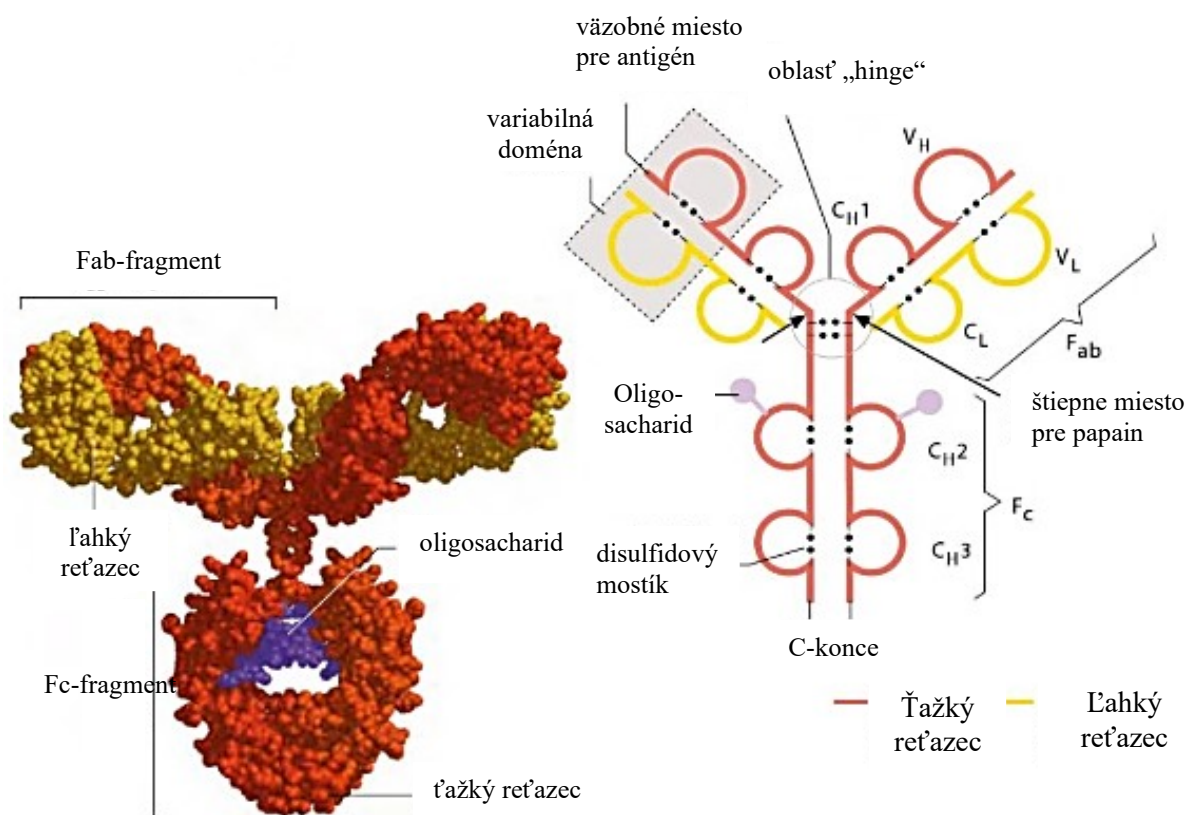
T-lymfocyty patria medzi dôležité bunky špecifickej imunity. Zaisťujú obranu proti nebezpečným patogénom. Pomocou špecifického receptoru (TCR) rozoznávajú patogénne antigény. Taktiež sa podieľajú na vývoji BL na plazmatickú bunku produkujúcu protilátky, ktoré sú na TL závislé. TL majú rôzne subpopulácie a následnú variabilitu, na ktorú poukazuje tabuľka č.1. Cytotoxické TL (Tc) tvorí jednu zo základných skupín majúce za úlohu likvidáciu a usmrcovanie buniek. Charakteristický znak je pre nich prítomnosť koreceptorovej molekuly CD8 a produkcia cytokínov INF- γ a TNF- α . Detegujú antigén spracovaný TL intracelulárne, ktorý sa presunie na povrch bunky na kontrolu molekulou MHC-I v imunitnom systéme. Pováčšine ide o zákrok proti bunkám napadnutých patogénom, vírom alebo iným poškodením. U pomocných TL (Th) je typický výskyt koreceptoru CD4. Medzi najznámejšie subpopulácie patria Th₁ a Th₂. Th₁ podskupina reguluje najmä imunitnú reakciu proti bakteriálnym patogénom nachádzajúcich sa vo vnútri bunky. Produkujú TNF- β , INF- γ a IL-2, aktivujúce makrofágy, zaisťujúce likvidáciu napadnutých buniek. Th₂ podskupina je zameraná na obranu proti extracelulárnym mikroorganizmov. Produkujú látky na stimuláciu BL (tvorba protilátok), hlavne IL-4,5,6 (Duan, 2014).

Tabuľka 1: T-lymfocyty a ich vlastnosti (zdroj: Bartůňková, 2011).

<i>Populácia TL</i>	<i>Skupina</i>	<i>Membránové molekuly</i>	<i>Funkcie</i>	<i>Produkty</i>
Th-lymfocyty	Th1	CD4	Aktivácia makrofágov	INF- γ
	Th2	CD4	Spolupráca BL pri tvorbe protilátok	IL-4
	Th3	CD3, CD4	Úprava imunitnej reakcie	TGF- β
	Th17	CD4	Antibakteriálne procesy	IL-17
Tc-lymfocyty		CD8	Cytolýza infikovaných buniek	Perforíny

1.2.2 Humorálna zložka adaptívnej imunity

B-lymfocyty tvoria základ humorálnej špecifickej imunity. Diferencujú na plazmatické bunky po styku s neznámym antigénom, pri čom tvoria špecifické protilátky (viz. Obr.4) a vytvárajú pamäťové BL. Vývoj BL sa odvíja od prítomnosti antigénu v organizme (Buc, 2012). Bunka v dôsledku diverznej receptorovej molekule tzv. B-bunkového receptora (BCR), môže odpovedať na rôzne typy antigénu. Táto diverzita je dôsledok V(D)J rekombinácie, kedy dôjde k spojeniu a preskupeniu V-variable, D-diversity a J-joining génových segmentov, čím vznikne obrovské spektrum ťažkých a ľahkých reťazcov. Tento proces začína už v štádiu pro-BL (Scott, 2010).



Obrázok 4: Štruktúra protilátky IgG: Štruktúra imunoglobulínu je tvorená z dvoch ťažkých a dvoch ľahkých reťazcov spojených disulfidickými mostíkmi. Ťažké reťazce sú tvorené piatimi doménami α , γ , δ , ϵ , μ . Ľahké reťazce disponujú doménami λ , κ . Fab fragment obsahuje vlastné variabilné miesto pre antigén. Na Fc fragmente leží väzbové miesto pre proteíny komplementu a Fc receptory makrofágov, neutrofilov. Oblasť „hinge“ umožňuje lepšie prispôsobenie väzbových antigénov, vďaka svojej určitej ohybnosti. (prevzaté a upravené podľa: Koolman, 2012).

Protilátky, vytvárané v BL rozdeľujeme na izotypy triedy: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. Najväčšie uplatnenie v protiinfekčnej imunite majú protilátky triedy IgM, ktoré sa tvoria

prvotne pri imunitnej reakcii. Molekula IgM aktivuje klasickú cestu komplementu. V sére sa vyskytuje molekula vo forme pentaméru. Spomenúť môžeme aj protilátky IgE, ktoré sa uplatňujú pri alergickej a parazitárnej reakcii. Bazofilne aj žirne bunky na svojom povrchu nesú vysoko-afinitné receptory FcεR pre IgE. Po ich aktivácii sa tieto bunky degradujú a do extracelulárneho priestoru uvoľnia histamín a biologické aktívne mediátory. Latky po uvoľnení do priestoru naštartujú reakciu k vypudenia parazita z tela von. V sére sa protilátka nachádza vo forme monoméru. Immunoglobulíny IgG tvorí štyri izotopy (IgG1-IgG4), líšiac sa počtom cytosinových mostíkov v pentovej oblasti, ich dĺžkou, flexibilitou, schopnosťou aktivovať komplement. Uplatňujú sa tiež pri opsonizácii patogénnych agens. Ako jediné sú schopné prechádzať cez placentárnu bariéru, čím zabezpečujú pasívnu imunitnú ochranu plodu a novorodenca (Hořejší, 2009), (Kehry, 1980).

1.3 Obrana proti nežiadúcim mikroorganizmom

Aby mohol organizmus začať bojovať antimikrobiálne a zabrániť invázií mikróbov do hostiteľa, museli sa vyvinúť na povrchu leukocytov určité biosenzory-receptory. Receptory majú schopnosť rozoznávať určitú typickú štruktúru nie len na jednom druhu mikroorganizme ale aj na iných typoch. Táto štruktúra by mala mať stabilné zloženie, nemala by podliehať zmenám a mutáciám.

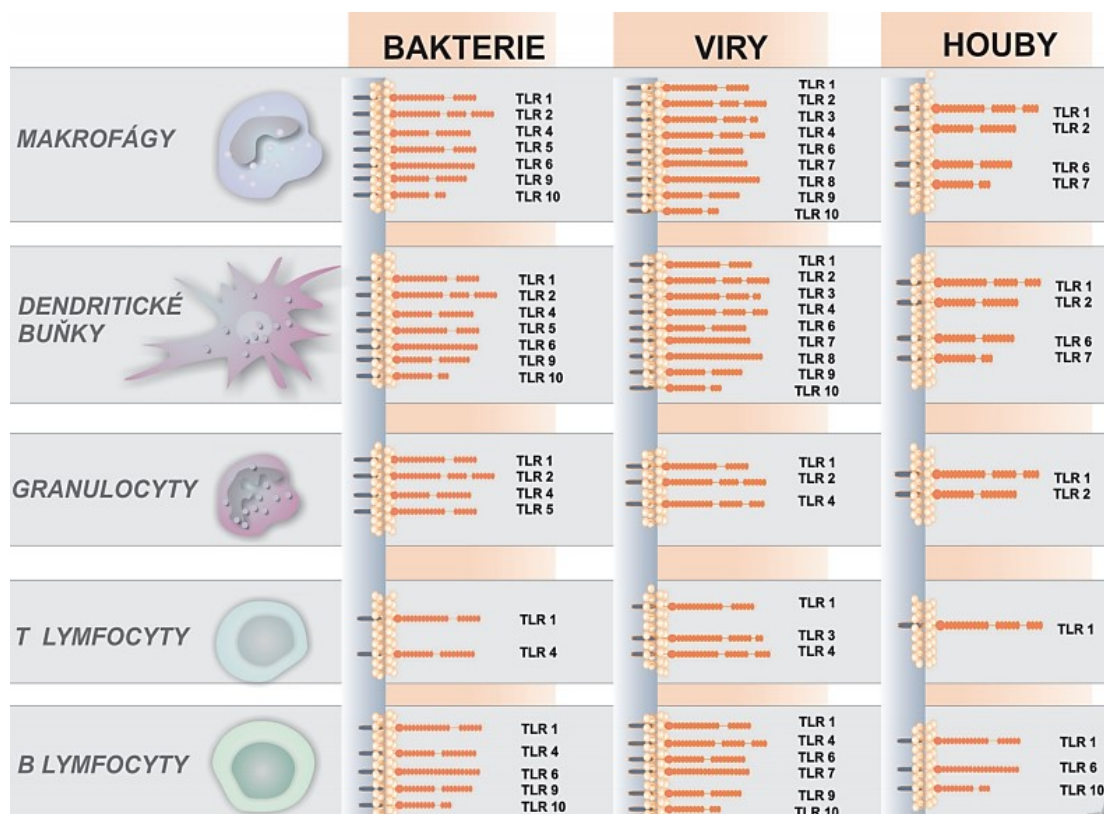
Medzi takéto molekuly na povrchu mikróba patria molekulárne vzory spojené s patogenitou - PAMPs. Ako príklad danej molekuly môžeme uviesť LPS alebo kyselinu lipoteichovú. LPS sa vyskytuje na povrchu gramnegatívnych baktérii, kdežto kyselinu lipoteichovú nájdeme na grampozitívnych baktériách. Všetky tieto baktérie majú vo svojej DNA nemetylovavé dinukleotidy CpG, ktoré slúžia ako motívy charakterizujúce baktérie. Preto aby sme rozoznali PAMPs je nutné mať receptory rozoznávajúce vzory (resp. patogenitu, PRRs). Tie sú uložené na bunkách organizmu, ktoré prichádzajú do styku s patogénom prvotne. Bunky prirodzenej imunity a epitelové bunky na povrchu slizníc obsahujú dva typy týchto receptorov na rozlíšenie PAMPs, ktoré sú uvedené v tabuľke č.2. Do prvej kategórie zaraďujeme receptory, sprostredkujúce fagocytózu. Fc aj komplementové receptory disponujú širokou špecifnosťou, vďaka ktorej rozpoznávajú akékoľvek patogény opsonizované komplementom alebo protilátkami. V druhej kategórii sa nachádzajú receptory, aktivujúce zápalovú reakciu po rozpoznananí PAMPs (Ferenčík, 2005).

Toll like membránové receptory (TLR) identifikujú nebezpečné signály extracelulárnych patogénov. V malej miere sú exprimované TLR receptory na granulocytárnych elementoch

(neutrofilý, eozinofily) aj na TL a BL. Tieto membránové receptory sú schopné vzájomne synergovať alebo sú aktívne s ďalšími receptormi PRRs. Receptory pre nebezpečné vzory patogénnych mikrobov, zahrnujúce víry, baktérie a parazity sú veľmi rozmanité (viz. Obr.5) (Krejsek, 2005).

Tabuľka 2: Typy receptorov rozpoznávajúcich molekulárne vzory spojené s patogenitou PAMPs (prevzaté z: Ferenčík, 2005).

<i>Prvá kategória</i>	<i>Druhá kategória</i>
Fc-receptory	IL-1R receptory
Komplementové receptory (CR1, CR3, CR4)	TLRs receptory



Obrázok 5: TRL receptory pre mikroby (zdroj: Krejsek, 2005).

1.3.1 Obrana proti baktériám

Baktérie podľa možnej spôsoby obrany hostiteľa rozdeľujeme na extracelulárne a intracelulárne. Z pohľadu zraniteľnosti sú chýlostivejšie extracelulárne baktérie, keďže sa rozmnožujú mimo buniek v tzv. extracelulárnom prostredí. K zneškodňovaniu extracelulárných baktérií imunitný systém využíva neutrofilý formou fagocytózy. Patogény,

ktoré preniknú do tela sa opsonizujú protilátkami alebo C3b fragmentom komplementu. Obalené baktérie sú následne naviazané na komplemetový receptor CR1, CR3 a Fc-receptory nachádzajúce sa na povrchu neutrofila. Aby bolo usmrtenie účinné musia látky ako je peroxid vodíka, kyselina chlórna a iné toxické formy kyslíku byť plne funkčné. Možná nedostatočná aktivita týchto látok spôsobí prežívanie a rozmnožovanie baktérii pohltých neutrofilmi, čo vedie k prepuknutiu ochoreniu. Prepuknutie infekčného ochorenia môže nastať tiež ak dôjde k zvýšeniu počtu baktérií, ktoré vnikli do obehu alebo fagocytóza neutrofilov je pomalšia. Potom sa zmobilizujú bunky získanej imunity a tie bojujú s patogénmi, ktoré neutrofily nedokázali odstrániť.

Intracelulárne baktérie majú schopnosť ujsť z fagolizozómu. Po ich pohltení im neutrofily poskytnú prostredie pre ich rozmnožovanie. Aktivované makrofágy absorbujú agens ako sú kvasinky, pliesne, listérie, brucelly, mykobaktérie. Aktivovaná forma makrofágov, ktorých antimikrobiálna aktivita je zvýšená oproti neaktívnym, sú schopné pohltiť aj neutrofilov infikovaných intracelulárnymi baktériami. Túto aktiváciu spôsobujú cytokíny, IFN- γ a TNF uvoľnené z Th lymfocytov. Na infekcie spôsobené intracelulárnymi parazitmi sú najviac náchylní jedinci s poruchou aktivácie makrofágov a Tc (Ferenčík, 2005).

1.3.2 Obrana proti vírom

Ako prvé sa do obrany zapojujú interferóny a NK-bunky. V bunkách napadnuté vírmi sa tvoria interferóny α a β , ktoré zabraňujú replikáciu víru a v doposiaľ neinfikovaných bunkách navodzujú antivírový stav. Makrofágy infikované vírmi produkujú aktivátor IL-12 a ten aktivuje NK-bunky. NK-bunky spôsobujú lýzu a smrť buniek, do ktorých sa vír dostal. Pri cytopatických víroch sa najviac v obrane uplatňujú protilátky brániace infekciám ďalších buniek. Sekrečné IgA, ktoré sú na slizniciach blokujú prichytenie vírov na mukózný epitel. IgG alebo IgM neutralizačné protilátky sa uplatňujú ak vír prenikne až do krvného obehu. Vznik protilátok pri vírovej infekcii má preventívny efekt na sekundárnu infekciu. Vtedy môže napr. IgA zabrániť adhéncii víru na slizničný povrch alebo IgG neutralizujú víri, ktoré vnikli do obehu. Pre jedincov, ktorí majú protilátkový deficit môže byť infekcia fatálna. Taktiež sú ohrození jedinci, ktorí majú imunodeficit TL a kombinované poruchy imunity (Hořejší, 2005).

1.4 Imunitný systém v detstve

Imunitný systém v období dieťaťa zaradujeme medzi tzv. pasívnu imunitu (nemá vyvinutú špecifickú pamäť). V tomto období je dieťa chránené protilátkami od matky, ktoré prechádzajú placentou a napomáhajú k prežitiu prvých mesiacov života. Pasívna imunita

pokračuje dojčením, keďže materské mlieko, hlavne kolostrum, čo je jeho skorá forma, obsahuje množstvo ochranných imunoglobulínov chrániace dieťa prechodne pred vírusmi a baktériami. Protilátky chránia dieťa, avšak nie sú absorbované z čreva do krvi. Koľko protilátok matka odovzdá dieťaťu závisí na jej imunite. V priebehu pol roka klesá koncentrácia protilátok od matky a jedinec si začne postupne vyrábať vlastné. Vznikajú ako imunitná odpoveď organizmu na cudzorodú látku. Na začiatku je koncentrácia veľmi nízka. Novorodenec dosahuje hodnoty dospelých až okolo tretieho roku života (Mocková, 2014). Ako už bolo spomenuté protilátky, ktoré dieťa dostáva od matky rapídne klesajú a preto sú malé deti najviac ohrozované infekciami, ktoré majú v tomto veku veľmi ťažký priebeh, niekedy až život ohrozujúcu formu. Preto začína vakcinácia alebo tiež očkovanie v útlom veku (SEVS, 2009).

„Očkovanie je chápané ako proces vpravenia vakcíny do ľudského organizmu (Beran, 2008).“ Vakcína zahŕňa zložky infekčného organizmu, ktoré podporujú imunitný systém tvoriť protilátky. Tie navodzujú ochranu proti neskoršej infekcii, ktorý spôsobil tento organizmus a tým sa vytvára získaná imunita (IPOPI, 2013).

Očkovacie látky okrem antigénnej zložky obsahujú tiež zložky, ktoré aktívne pôsobia na imunitný systém ako adjuvantný prostriedok. Adjuvantný prostriedok pochádza z latinského slova *„adjuvare“*, čo v preklade znamená pomáhať. Taktiež sa tam nachádzajú neaktívne zložky vakcíny ako sú stabilizátory (ľudský albumín), konzervačné prostriedky (thiomersal) a antibiotiká (neomycin, kanamycin). Tieto látky nevytvárajú protektívnu ochranu organizmu ale majú dôležitú úlohu v zložení vakcíny. Antigénom očkovanej látky môže byť akákoľvek substancia, ktorá organizmu nenavodzuje imunitnú reakciu (Beran, 2008).

Ľuďom trpiacim poruchou imunitného systému, konkrétne poruchou T-lymfocytov ako je u choroby ťažkej kombinovanej imunodeficiencie (SCID) sa neodporúča podávať živú perorálnu vakcínu proti detskej obrne (OPV), Calmettov-Guérinov bacil (BCG), taktiež podanie rotavírusu pri pacientoch s týmto ochorením a pri deťoch, ktoré mali v rodine príbuzných trpiacim ochorením SCID, pokiaľ neboli vyšetrené na možný imunodeficit. Odporúčané je tieto vakcíny nahradiť inaktivovanou polio vakcínou (IPV) (IPOPI, 2013).

2 IMUNODEFICIENCIE

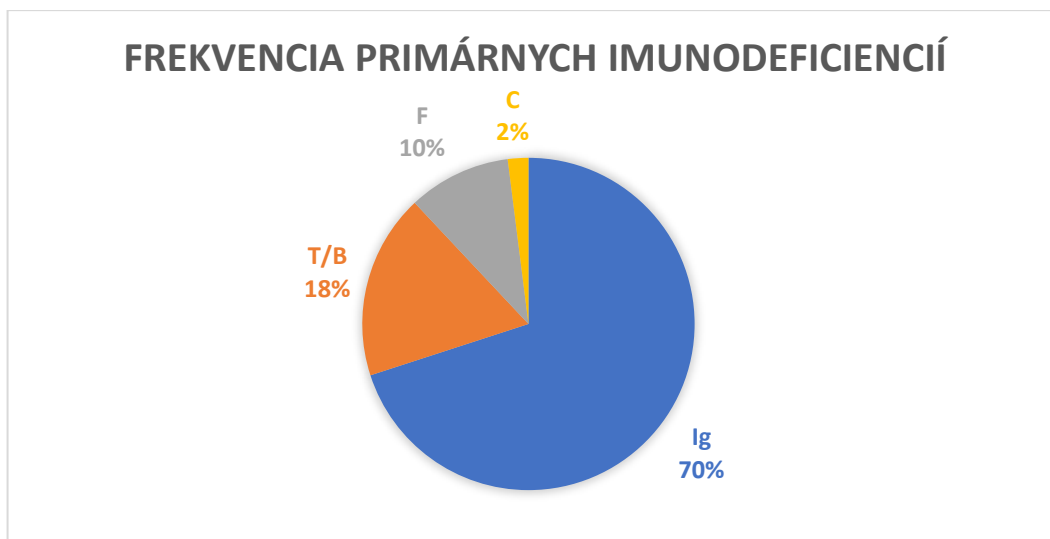
Ako už bolo zmienené imunitný systém zabezpečuje integritu organizmu a jeho následnú ochranu pred infekčnými agens. Imunodeficiencia vznikne funkčným alebo morfológickým defektom v jednej z časti imunitného systému, ktorý spôsobí zvýšenú citlivosť na vzniknutú infekciu. Porucha ktorejkoľvek zložky systému sa prejaví navonok. Pri vynechaní protiinfekčnej obrany sa to zobrazí zvýšeným a opakovateľným počtom infekcií. Klinické skúsenosti ukazujú, že ten istý defekt môže mať rôzny klinický obraz. U detí bývajú závažnejšie klinické poruchy, pretože imunitný systém je v štádiu dozrievania. Podozrenie na možný imunodeficit pozorujeme u pacientov, ktorí majú pozitívnu rodinnú anamnézu s ťažko liečiteľnými a recidivujúcimi infekciami (Winklestein, 2007).

Imunodeficiencie rozdeľujeme podľa postihnutej zložky alebo príčiny. Podľa príčiny ich rozdeľujeme na primárne a sekundárne defekty (Hořejší, 2009).

2.1 Primárne imunodeficiencie

Primárne imunodeficiencie (PID) patria do skupiny genetických heterogénnych, vrodených porúch funkcie či štruktúry jednej alebo viacerých zložiek imunity. K varovným príznakom PID zaradujeme opakované zápal stredného ucha, opakujúce sa infekcie svalov, pečene, abnormálne reakcie organizmu na živé vakcíny, pneumónie (Coico, 2000).

Klasifikujeme ich z hľadiska fenotypového delenia na poruchy protilátkové, bunkové, kombinované, fagocytárne a komplementové. Samostatnú skupinu predstavujú poruchy so zväčšenou lámavosťou chromozómov. Celková frekvencia PID je 1:2 000 živých novonarodených detí, pri tom napr. bežná variabilná imunodeficiencia (CVID), jedna z najčastejších porúch, má frekvenciu 1:10 000 a ťažká kombinovaná imunodeficiencia (SCID) až 1:100 000. Väčšina z postihnutých sú chlapi, pretože na chromozóm X, sú viazané dedičné poruchy a taktiež tam je lokalizovaná rada génov kódujúcich molekuly, ktoré ovplyvňujú imunitné reakcie. 80% z PID sa prejaví už v detstve avšak CVID má najvyššiu incidenciu v období medzi 20-30. rokom života. Frekvencia PID je uvedená v grafe č.1 (Bartůňková, 2007), (Čížnár, 2008).



Graf 1: Frekvencia PID: Ig-protilátkové, T/B-ťažké kombinované a bunkové, F-fagocytárne, C-komplementové (zdroj: Bartůňková, 2007)

2.1.1 Protilátkové (humorálne) imunodeficiencie

Pacienti pri tomto type ochorenia majú poruchy funkcie BL a tvorby protilátok prejavujúca sa zníženými hladinami imunoglobulínov v séru a tiež minimálnou reakciou na polysacharidové antigény (Winklestein, 2007).

Do skupiny významných humorálnych PID patrí najmä CVID, Brutonová agamaglobulinémia, hyper IgM syndróm, deficit podtriedy IgG a selektívny nedostatok IgA uvedené v tabuľke č.3 (Moise, 2010).

Tabuľka 3: Počty pacientov registrovaných v databáze Európskej spoločnosti pre imunodeficiencie zo 41 zemí pre rok 2004-2011 (prevzaté a upravené podľa: Gathmann, 2012).

<i>Protilátkové imunodeficiencie</i>	<i>Počet pacientov</i>	<i>Percentuálne zastúpenie z celkových PID [%]</i>
CVID	2880	21
Deficit IgA	1424	10,4
Deficit podtriedy IgG	887	6,5
X-viazaná agamaglobulinémia	813	5,9
Hyper IgM syndróm	297	2,2

- **Brutonová agamaglobulinémia:** viazaná na chromozóm X. U pacientov je neschopnosť B-lymfocytárnych prekurzorov dozrievať v BL a na plazmatické bunky. Pre nedostatok buniek tvoriace imunoglobulíny majú pacienti deficit protilátok (IPOPI, 2007).
- **Hyper-IgM syndróm:** pacienti s týmto syndrómom nie sú schopní prepnúť tvorbu imunoglobulínov z IgM na IgG, IgA, IgE. To má za následok znížené hodnoty IgG a IgA, hodnoty IgM môžu byť normálne alebo zvýšené. Syndróm má niekoľko genetických porúch, avšak najčastejšia forma je na chromozóme X, ktorá postihuje iba mužské pohlavie. Genetická mutácia postihuje antigénny ligand CD40, ktorý je potrebný pre interakciu medzi TL a BL, pred zahájením izotopového prešmyku z IgM na ďalšie triedy imunoglobulínov (IPOPI, 2007).
- **CVID:** vyznačuje sa nízkou hladinou imunoglobulínov v krvi, ktorý má za následok stratu protilátok a zníženú schopnosť bojovať proti napádajúcim mikroorganizmom, toxínom alebo iným cudzím látkam. Nástup príznakov, vrátane častých a nezvyčajných infekcií, sa môže prvýkrát objaviť počas detstva a dospievania. U mnohých pacientov diagnóza môže byť stanovená až v tretej až štvrtej dekáde života (Salzer, 2012).

2.1.2 Fagocytárne imunodeficiencie

Defekt fagocytózy sa prejavuje hnisavými infekciami slizníc, kože a vnútorných orgánov vyvolaných baktériami najmä *Staphylococcus aureus* a plesňami rodu *Candida* a *Aspergily*, často s ťažkým priebehom. Tvorba abscesov alebo lymfadenitída je častým prejavom. Vrodené fagocytárne poruchy sa najčastejšie prejavujú krátko po narodení. Ako prvý prejav je reakcia na BCG očkovanie alebo zápal pupka pri novorodencoch tzv. omfalitída. Zvýšenou náchylnosťou k mykobaktériálnym infekciám sa prejavuje porucha v činnosti monocytov a makrofágov.

Medzi fagocytárne defekty patria chronická granulomatózna choroba a deficiencia adhezivity leukocytov (LAD syndróm) (Stites, 1994).

Chronická granulomatózna choroba je dedičná vada fagocytov vyznačujúcich sa poruchou NADPH-oxidázy, kedy fagocyt nedokáže pohltené patogény likvidovať a dochádza k hromadeniu fagocytárnych molekúl a vznik granulómu, čo má za následok opakujúce sa

infekcie, ohrozujúci zdravotný stav pacienta. Defektné sú neutrofilné granulocyty, makrofágy a monocyty. Poväčšine ide o formu viazanú na chromozóm X, patrí medzi najčastejšie, taktiež sa môže vyskytovať vo forme autozomálne recesívnej (Moghtaderi, 2012).

LAD syndróm a syndróm poruchy adhezivity leukocytov sú spôsobené slabou expresiou β_2 -integrínovej podjednotky, potrebnou pre chemotaxiu a prichytenie leukocytov k endoteliálnym bunkám. Pri tomto type poruchy je dôležitá rýchla a razantná liečba antibiotikami (Winklestein, 2007).

2.1.3 Komplementové imunodeficiencie

Zo skupiny PID sú komplementové imunodeficiencie najmenej časté. Defekt C1- inhibítora patria medzi najzávažnejšie, vyvoláva hereditárny angiotén, kde dochádza k nekontrolovanej aktivácii komplementového systému napr. pri traumách, infekciách, menštruácií a stomatologických výkonoch (Hořejší, 2009).

K autoimunitnému ochoreniu, ako je systémový lupus erythematoses predurčuje porucha zložky komplementového systému C2 a C4. K zvýšenému riziku infekcií, ktoré spôsobujú opúzdrené mikróby (pneumokoky, meningokoky), má za následok deficit zložky C2 a C3. Poškodenie terminálnych zložiek komplementového systému zložiek C5-C9 môžu mať jedinci s opakovanými infekciami vyvolanými baktériou *Neisseria*. Liečebný proces zahŕňa antibiotiká avšak výnimkou je hereditárny angiotén (Stites, 1994).

2.1.4 Kombinovane T/B bunkové imunodeficiencie

Sú spôsobené poruchou funkcie TL a následne postihujúce aj BL, pretože niektoré TL napomáhajú BL tvoriť protilátky. Poruchy sa prejavujú v rannom štádiu vývoja jedinca ťažkými infekciami, ktoré môžu byť v tomto období fatálne. Taktiež trpia dermatitídami, chronickým preháňaním a infekciami dolných dýchacích ciest.

Predstavujú 20% celkových PID. Sú zriedkavejším druhom ako sú protilátkové, avšak ich priebeh je závažnejší a je nutné skoré rozpoznanie s následnou liečbou. Bez liečby umierajú pacienti do prvého roku života. DiGeorov syndróm zaradujeme medzi kvantitatívne poruchy TL. Príčinou choroby je delécia na 10. alebo 22. chromozóme spôsobujúca vývojový defekt 3. a 4. rebrovej výchlipky. Porušený vývoj týmusu má za následok nedostatočný vývoj TL a pacienti trpia celkovým poškodením organizmu najmä ciev a srdca. Komplexná liečba spočíva z antimikrobiálnej terapie, zo substitučnej liečby imunoglobulínmi, z transplantácie kmeňových

buniek a u niektorých diagnóz aj z génovej terapie (Jeseňák, 2010), (Hořejší, 2009), (Coico, 2000).

2.2 Sekundárne imunodeficiencie

Sekundárnu imunodeficienciu pacient získa v priebehu života na základe faktorov z vonkajšieho alebo vnútorného prostredia. Vzniká v dôsledku iných ochorení, ktoré prebiehajú v organizme alebo zmene celkového stavu organizmu (Hořejší, 2009). Medzi najčastejšie príčiny vo svetovom meradle patrí podvýživa, za ktorou nasleduje infekcia vírom HIV. V ekonomicky vyspelých krajinách sa na vzniku sekundárnych imunodeficiencií podieľajú značnou mierou iatrogenné zásahy ako sú operácie, ožarovanie, imunosupresívna terapia po organových transplantáciách. Zvýšenú náchylnosť k infekciám spôsobuje taktiež poruchy prirodzených bariér (popáleniny, poranenie, toxické poranenie kože a sliznice, chronické zápaly).

Sekundárne imunodeficiencie je možné deliť z rôznych hľadísk, pretože postihujú obvykle viac zložiek imunitného systému naraz. Striktne rozdelenie na poruchy jednotlivých zložiek imunity tu nie je možné. Na obraze imunodeficiencie sa podpisuje vo výsledku niekoľko faktorov naraz (napr. pri nádorových chorobách je výsledná imunodeficiencia zapríčinená kombináciou vplyvu samotného základného ochorenia spolu s vplyvom chemoterapie alebo rádioterapie) (Barůňková, 2007).

3 ŤAŽKÁ KOMBINOVANÁ IMUNODEFICIENCIA (SCID)

Ochorenie SCID, z anglického „*Severe Combined Immunodeficiency Disease*“, patrí medzi ťažké kombinované imunodeficiencie. Ide o závažné ochorenie majúce vrodenú poruchu imunity, ktorá je väčšinou dedičná. Dochádza k poruche protilátkovej aj bunkovej imunity, kde absentujú funkcie lymfocytov TL aj BL a u mnohých prípadov aj funkcia NK-buniek.

Tieto defekty majú za následok extrémnu náchylnosť na ťažké infekcie a známky ochorenia sú viditeľné už v detstve. Ide najmä o vírusové infekcie majúce za následok zápal pľúc a chronickú hnačku. Bežné sú infekcie kvasiniek rodu *Candida* v oblastiach plienok a úst. Zápal pľúc sú spôsobené najčastejšie plesňou rodu *Pneumocystis jirovecii*.

SCID patrí medzi vzácne ochorenia preto správna diagnóza je niekedy veľmi náročná. Novorodenecký skrining dopomohol k detekcii SCID skôr, ako sa prvé príznaky objavia. To zaisťuje aby deti dostali včas život zachraňujúcu liečbu. Deti trpiace touto chorobou častokrát nazývame aj ako „bublinové deti“, pretože väčšinu času svojho života strávia výhradne v sterilnom prostredí, oddelení plastovou fóliou. Bez liečby tieto deti umierajú do prvého roku života (Dorsey, 2017), (NIH, 2019). Viac než 80% detí postihnuté ochorením SCID nemá určenú rodinnú anamnézu. Prevalencia SCID zo všetkých genetických príčin dohromady je približne 1 z 50 000, hoci v niektorých regiónoch môže byť vyššia.

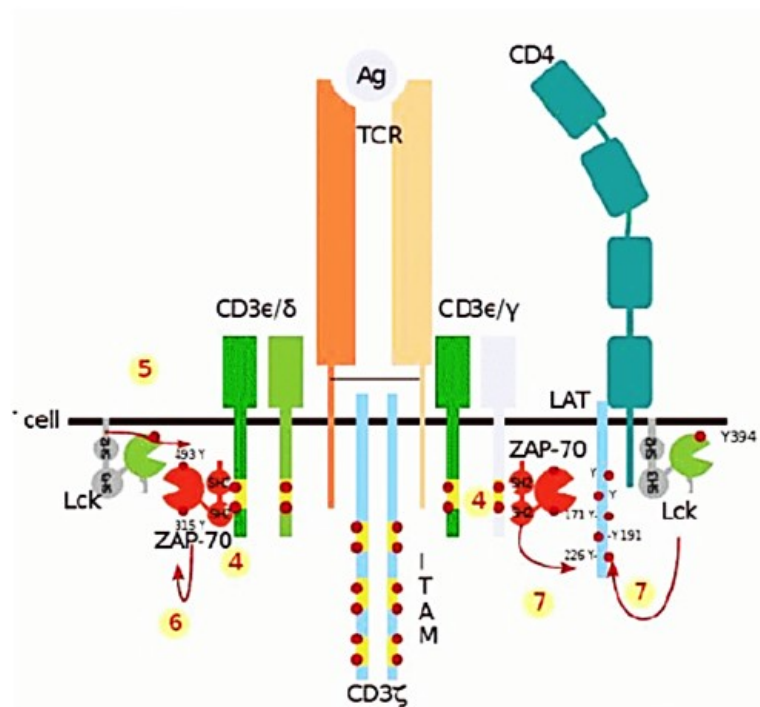
3.1 Príčiny ochorenia

Je viac než pravdepodobné, že všetky typy SCID-u, sú následkom genetickej poruchy. Dedia sa v dôsledku novej mutácie vzniknutej u postihnutého dieťaťa alebo sa môžu dediť od rodičov. „*Dedičnosť je schopnosť organizmu uchovávať súbor dedičných informácií (génov) o vytvorení najrôznejších morfológických znakov a fyziologických vlastností a schopnosť predávať tento súbor viac-menej nezmenený svojim potomkom (Chalupová-Karlovská, 2010)*“.

Tieto mutácie sa dedia v súvislosti s viazanosťou chromozómu X, ktorý je viazaný na pohlavie, kde je gén zdedený od matky. Najčastejšie sa SCID dedí autozomálne recesívne, kedy obe kópie konkrétneho génu, jednu zdedenú od matky a druhú od otca, obsahujú defekty. Predísť sa to dá podstúpením genetických vyšetrení oboch rodičov a tým vyhnúť sa rizík budúcich tehotenstiev. Mnohé rodiny trpiace zasiahnuté týmto ochorením nezamýšľajú v budúcnosti ďalšie potomstvo, avšak toto rozhodnutie nemá správne ani nesprávne riešenie. Toto rozhodnutie by malo vyplývať z konkrétnych parametrov danej rodiny, kde zohľadnia náboženské presvedčenie a zázemie, vplyv ochorenia na ich život a život ich okolia, hodnotové nastavenie rodičov. Existuje mnoho faktorov, ktoré sa líšia od danej situácie a rodiny.

V dnešnej dobe je známych 12 genetických (*viz. Tab.4*). Najčastejšou formou SCID je mutácia na chromozóme X, ktorá predstavuje takmer 45% všetkých prípadov. Medzi zriedkavú poruchu patrí SCID súvisiaci s mutáciou v géne ZAP70. Bolo identifikovaných iba 20 postihnutých jedincov. Gén ZAP70 kóduje informáciu pre produkciu proteínu zeta asociovaná proteínkináza 70 (ZAP70). Ide o cytoplazmatickú tyrozínkinázu nachádzajúcu sa hlavne v TL (Tc aj Th), je dôležitá tak pre ich vývoj, ako aj pre signalizáciu receptorov TL (TCR), ktoré identifikujú cudzie látky a chránia telo pred infekciami (*viz. Obr.6*).

Mutácie v géne ZAP70 bránia produkcií proteínkinázy spojenej so zeta-reťazcom alebo vedú k proteínu, ktorý je nestabilný a nemôže plniť svoju funkciu. Strata funkčnej proteínovej kinázy asociovannej so zeta-reťazcom vedie k neprítomnosti CD8⁺ TL a prebytku neaktívnych CD4⁺ TL (Genetics Home Reference, 2015), (Demitrovičová, 2014).



Obrázok 6: Signalizačný komplex TCR ukazujúci, kde ZAP70 zapadá do signalizačnej kaskády (prevzaté z: EMBL-EBI, 2020).

Rôzne špecifické TL adaptívneho imunitného systému sa vyvíjajú výlučne v týmuse. Tvorba excízných kruhov T bunkových receptorov (TREC), DNA vedľajších produktov génovej prestavby TCR, sa vyskytuje počas naprogramovaných prestavieb variabilných, diverzifikovaných a spájajúcich sa segmentov génov TCR, ktorým prechádzajú lymfocyty. Neprítomnosť TREC koreluje s nedostatkom produkcie TL. Všetky deti so SCID nedokážu generovať rôznorodú zásobu zrelých TL, preto majú nezistiteľný alebo veľmi nízky

počet TREC. Základný defekt génu ZAP70 u ochorenia SCID, bráni samotnému procesu rekombinácie TCR, narušuje cytokínmi sprostredkovanú signalizáciu nevyhnutnú pre dozrievanie a aktiváciu TL alebo umožňuje akumuláciu toxických purínových metabolitov, ako je deficit ADA. Všetky genotypy sa vyznačujú nedostatkom posledných týmických TL a TREC (Dorsey, 2017).

Tabuľka 4: Genetické defekty asociované s ťažkou kombinovanou imunodeficienciou (prevzaté z: Čižnár, 2014).

	<i>Fenotyp</i>	<i>Názov ochorenia</i>	<i>Gén</i>
1.	T-B+	<i>Deficit reťazca IL-7Ra</i>	IL7RA
2.		<i>Deficit CD3δ</i>	CD3D
3.		<i>Deficit CD3ε</i>	CD3E
4.		<i>Deficit CD3ζ</i>	CD3Z
5.		<i>Deficit CD45</i>	PTPRC
6.		<i>Deficit ZAP70</i>	ZAP79
7.		<i>Deficit spoločného γ reťazca</i>	IL2RG
8.	T-B-	<i>Deficit Janusovej kinázy 3</i>	JAK3
9.		<i>Deficit rekombinázy aktivujúcej gény 1</i>	RAG1
10.		<i>Deficit rekombinázy aktivujúcej gény 2</i>	RAG2
11.		<i>Deficit génu Artemis</i>	DCLRE1C
12.		<i>Deficit adenzin deaminázy</i>	ADA

3.2 Klinický obraz

Charakteristickým prejavom ochorenia u detí je zreteľne vysoké množstvo infekcií. Zvyčajne nie sú také isté ako u zdravých detí, napr. časté nádchy. Infekcie, ktoré postihujú dieťa so SCID sú omnoho závažnejšie a dokonca život ohrozujúce, napr. zápal pľúc, infekcie krvného obehu alebo meningitída. Spôsob prezentácie SCID-u zmenilo častejšie používanie antibiotík už pri najmenších infekciách, preto lekár musí byť vo vyššej miere podozrievavý, aby odhalil ochorenie.

Mikróby, ktoré vyvolávajú infekcie aj u detí, ktoré sú zdravé môžu spôsobiť infekcie aj pri deťoch s ochorením SCID, avšak príčinou infekcie bývajú často očkovacie látky alebo mikroorganizmy, ktoré sú neškodné pre zdravé deti. *Pneumocystis jirovecii* patrí medzi

najnebezpečnejší mikroorganizmus, ktorý pri neskorej diagnostike a liečení, môže vyvolať prudký smrteľný zápal pľúc. *Cytomegalovírus*, ktorý sa vyskytuje u takmer všetkých ľudí v slinných žľazách, má taktiež za následok ohrozujúci zápal pľúc u detí so SCID. Nebezpečná je aj *Varicella*, vírus ovčích kiahní, ktorý môže byť smrteľný pre deti so SCID, hoci aj u zdravých detí sú ovčie kiahne nepríjemne a obyčajne sa obmedzujú na pokožku a sliznice, no po niekoľkých dňoch odznejú. U detí so SCID nevymiznú, ale naopak, zasahujú pľúca, pečeň a mozog. Medzi ďalšie nebezpečné vírusy patria, vírus oparu, parachrípka 3, adenovírus, rotavírus, vírus detskej obrny, vírus Epstein-Barrovej. Ako už bolo zmienené (viz kap.1.4), niektoré očkovacie látky, ktorými sú deti očkované proti osýpkam, ovčím kiahňam alebo rotavírusu sú živými vakcínami a deti so SCID sa môžu týmito vakcínami nakaziť. Kvasinkové infekcie sú taktiež veľmi ťažko liečiteľné. Kandidové plesňové infekcie nachádzajúce sa v ústnej dutine spôsobujú afty, ktoré sa u detí vyskytujú bežne a zvyčajne aj vymiznú spontánne alebo po nenáročnej perorálnej liečbe. U detí trpiace SCID-om tieto afty pretrvávajú aj napriek liečbe, môžu sa dočasne zlepšiť, no úplne nevymiznú a hneď po skončení liečby sa vrátia. Koža môže byť taktiež chronicky infikovaná rovnakou plesňou *Candida*, spôsobujúca v ústach afty. Častým problémom, kvôli ktorému dieťa neprospieva je aj pretrvávajúca hnačka. Môže spôsobiť úbytok hmotnosti a podvýživu. Pri SCID je však veľmi ťažké sa zbaviť baktérií, vírusov alebo parazitov, ak do organizmu už prenikli. Deti so SCID trpia aj vyrážkou, ktorá je často nesprávne považovaná za ekzém. Príčina tejto vyrážky je reakcia TL od matky, ktoré prenikli do krvného obehu plodu pred narodením, voči tkanivám dieťaťa. Jedná sa o reakciu štepu proti hostiteľovi (GVHD) (IPOPI, 2007).

3.3 Kategórie ochorení SCID T- B+

SCID T- B+ patrí do skupiny častých porúch imunodeficiencie charakterizované s absenciou TL a prítomnosťou BL v periférnej krvi v neaktívnej forme, pretože k správne fungovaniu im chýbajú TL. Predstavuje asi 60% zo všetkých prípadov SCID, z toho 70% ochorení je viazané na X chromozóm (X-SCID). Táto forma je spôsobená mutáciou spoločného γ -reťazca receptora vybraných IL (IL2, IL4, IL7, IL9, IL15, IL21).ktorý sa podieľa na prenose signálu z ligovaného receptora do vnútra bunky, následkom je funkčná porucha na úrovni mnoho cytokínov. Častokrát dôjde aj k absencií NK-buniek. Nasledujúcich 30% ochorenia je dedené autozomálne recesívne a medzi príčiny patrí absencia povrchovej molekuly CD45, absencia δ -reťazca molekuly CD3, poškodenie Janusovej kinázy (JAK-3), absencia α -reťazca receptora pre IL-7 (Bartůňková, 2007).

3.3.1 X-SCID

X-viazaná SCID je najbežnejšou formou ťažkej kombinovanej imunodeficiencie. Jeho presný výskyt nie je známy, ale stav pravdepodobne postihuje najmenej 1 z 50 000 až 100 000 novorodencov.

Ochorenie všeobecne postihuje iba chlapcov. Dievčatá môžu byť nositeľmi ale nebudú ovplyvnené. Gén spojený s týmto stavom je umiestnený na chromozóme X, ktorý je jedným z dvoch pohlavných chromozómov. U mužov, ktorí majú iba jeden chromozóm X, stačí jedna zmenená kópia génu v každej bunke, aby spôsobila tento stav. U žien, ktoré majú dva chromozómy X, by musela dôjsť k mutácii v oboch kópiách génu, ktoré spôsobia poruchu. Pretože je nepravdepodobné, že ženy budú mať dve zmenené kópie tohto génu, sú muži postihnutí recesívnymi poruchami spojenými s chromozómom X oveľa častejšie ako ženy. Charakteristickým rysom dedičstva spojeného s chromozómom X je, že otcovia nemôžu svojím synom odovzdať na X chromozóm spojené vlastnosti.

X-SCID spôsobuje mutácia v géne *IL2RG*. *IL2RG* gén kóduje spoločný γ -reťazec, ktorý poskytuje inštrukcie pre prípravu proteínu (CD132), ten je rozhodujúci pre normálnu funkciu imunitného systému. Tento proteín je nevyhnutný pre rast a dozrievanie vyvíjajúcich lymfocytov. X-SCID je charakterizovaný veľmi nízkymi TL a nefunkčnými BL. Mutácie v géne *IL2RG* bránia týmto bunkám v normálnom vývoji a fungovaní. Bez týchto buniek sa dieťa so SCID nakazí infekciou rýchlo a telo nie je schopné proti nim bojovať (Genetics Home Reference, 2016).

3.3.2 Deficit α -reťazca receptora IL-7 (*IL-7RA*)

Tento stav je v dôsledku mutácie génu na 5. chromozóme, ktorý kóduje ďalší komponent rastového receptora - α -reťazca receptora IL-7. Funkcia IL-7 je sprostredkovaná receptorom IL-7, membránovým receptorom zloženým zo špecifického reťazca IL-7Ra a reťazcom γ -reťazca zdieľaným receptormi pre iné cytokíny (IL-2, -4, -9, -15 a -21). Deti trpiace s týmto ochorením majú BL a NK-bunky ale žiadne TL. Mutácie v géne *IL7R* bránia produkcií α -reťazca α -7 receptora, ktorý zhoršuje signalizáciu receptora IL-7, čo spôsobuje nedostatok TL, zatiaľ čo možný nedostatok NK je spôsobený stratou signalizácie IL-15R. BL nefungujú kvôli nedostatku T buniek. Asi 10% pacientov s SCID vykázalo špecifické mutácie v géne *IL7RA*, čo malo za následok autozomálne recesívne SCID so špecifickým fenotypom T-B+NK+. Neskôr sa ukázalo, že vývoj BL u dospelých ľudí pravdepodobne závisí od IL-7, zatiaľ čo vývoj novorodeneckých BL závislý nebol. Pacienti s SCID sú novorodenci a bez transplantácie

kostnej drene neprežijú do dospelosti. Tým by sa vysvetlilo, prečo BL, ktorých novorodenecký vývoj je nezávislý od IL-7, ale aby mohli prežiť do dospelosti, je pravdepodobné, že BL by chýbali, čo odráža ich vývoj závislý od IL-7 (IPOPI, 2007), (Mazzucchelli, 2012).

3.3.3 Deficit Janusovej kinázy 3

JAK3 gén poskytuje inštrukcie pre prípravu proteínu Janusovej kinázy 3, ktorý je kritický pre normálny vývoj a funkciu imunitného systému. Proteín JAK3 je súčasťou signálnej dráhy nazývanej JAK/STAT, ktorá prenáša chemické signály z vonkajšej strany bunky do jadra bunky. Signály prenášané proteínom JAK3 regulujú rast a dozrievanie TL a NK-buniek. Okrem toho je JAK3 dôležitá pre normálne dozrievanie BL.

Mutácie v géne JAK3 na 19. chromozóme, bráni produkcii proteínu JAK3 alebo vedú k produkcii nefunkčného proteínu. Strata funkčnosti proteínu JAK3 má za následok neprítomnosť TL, NK-buniek a normálny počet zle fungujúcich BL. Tento nedostatok funkčných lymfocytov spôsobuje, že ľudia so SCID s nedostatkom JAK3 sú náchylní na infekcie. JAK3- deficitný SCID predstavuje odhadom 7 až 14% prípadov SCID.

Jedinci so SCID s nedostatkom JAK3 nemajú potrebné imunitné bunky, aby odolali určitým baktériám, vírusom a plesniam. Sú náchylné na opakované a pretrvávajúce infekcie, ktoré môžu byť veľmi vážne alebo život ohrozujúce. Organizmy, ktoré spôsobujú infekciu u ľudí so SCID s nedostatkom JAK3, sú často popisované ako oportunistické, pretože u zdravých ľudí zvyčajne nespôsobujú choroby. U postihnutých dojčiat sa typicky vyvinie chronická hnačka, plesňová infekcia v ústach, zápal pľúc a kožné vyrážky. Pretrvávajúce ochorenie tiež spôsobuje, že postihnuté osoby rastú pomalšie ako iné deti. Bez liečby títo ľudia zvyčajne žijú iba v ranom detstve (Genetics Home Reference, 2017).

3.3.4 Deficit reťazcov CD3 a CD45

CD3 nazývaný tiež komplex receptorov TL sú molekuly na povrchu TL. Komplex sa podieľa na aktivácii Tc lymfocytov (diferenciácia na CD8), ako aj Th lymfocytov (diferenciácia na CD4). Deficit CD3 reťazca obsahuje tri ďalšie formy SCID: CD3D, CD3E a CD247, tiež známe ako CD3Z. Tieto formy SCID sú spôsobené mutáciami v génoch, ktoré kódujú tri jednotlivé proteínové reťazce, ktoré tvoria časť molekúl na povrchu TL. Následný nedostatok CD3 reťazca vedie k poškodeniu TL

Ďalším typom SCID sú mutácie v géne kódujúcom CD45, proteín nachádzajúci sa na povrchu všetkých bielych krviniek, ktorý je potrebný pre funkciu TL. CD45 (proteín tyrozín

fosfatáza) reguluje antigénnu receptorovú signalizáciu TL a BL. Defosforyluje v TL a BL inhibičný tyrozín v Scr kinázach. Výsledkom je pozitívna regulácia TL a BL. Nadmerná hladina CD45 vedie k pozastaveniu signalizácie TCR a podpore signalizácie BCR (Bartůňková, 2007), (IPOPI, 2007), (Zikherman, 2012).

3.4 Kategórie ochorení SCID T-B-

Tento typ poruchy patrí do skupiny zriedkavých monogénnych porúch primárnej imunodeficiencie, charakterizovaná nedostatkom periférnych TL a BL. To má dopad na rozvíjajúce a opakujúce sa respiračné vírusové, bakteriálne infekcie. Typickým znakom niektorých podtypov je precitlivosť na ionizujúce žiarenie. Medzi najčastejšie ochorenie patrí deficit adenzín deaminázy (ADA). Deficit enzýmu vedie k akumulácií toxických metabolitov purínov v lymfoidných bunkách.

Ostatné imunodeficity, ktorým chýbajú TL a BL sú autozomálne recesívne dedičné ochorenia. Veľká časť lymfocytov obsahuje imunofenotyp NK-buniek. Doposiaľ odhalené molekulárne príčiny patrí absencia rekombináz RAG1 alebo RAG2, zodpovedné za rekombináciu génov kódujúcich premenlivé oblasti antigénne špecifických receptorov BL a TL (BCR a TCR). Retikulárna dysgenezia patrí medzi veľmi vzácne ochorenia s TL/BL deficitom, postihujúca už kmeňovú bunku s typickým blokom v lymfoidnej aj myeloidnej diferenciácii. Prejavy pozorujeme hneď po narodení nekrotizujúcimi zápalmi slizníc a v dôsledku agranulocytózy septickými stavmi (Bartůňková, 2007).

3.4.1 Deficit adenzín deaminázy

Tento typ SCID-u spôsobujú mutácie génu kódujúci enzým adenzín deamináza (ADA), ktorý sa nachádza v tele, ale najaktívnejší je v špecializovaných TL. Úlohou ADA je eliminovať molekulu deoxyadenosínu, ktorá sa generuje pri štiepení DNA. ADA premieňa deoxyadenosín, ktorý môže byť toxický pre lymfocyty, na deoxyinozín, ktorý nie je škodlivý. Mutácie v géne ADA znižujú alebo eliminujú aktivitu adenzín deaminázy a umožňujú nahromadenie deoxyadenosínu na hladiny, ktoré sú toxické pre lymfocyty, na ktoré sú nezrelé lymfocyty v týmuse obzvlášť citlivé. Tieto bunky odumierajú skôr, ako môžu dozrieť, aby pomohli v boji proti infekcii. Počet lymfocytov v iných lymfoidných tkanivách je tiež výrazne znížený. Strata buniek bojujúcich s infekciou vedie k príznakom a symptómom SCID.

Nedostatok ADA je veľmi zriedkavý a odhaduje sa, že sa vyskytuje približne u 1 z 200 000 až 1 000 000 novorodencov na svete. Táto porucha je zodpovedná za cca 15% prípadov SCID.

Hlavnými príznakmi nedostatku ADA sú pneumónia, chronická hnačka a rozsiahle vyrážky. Postihnuté deti tiež rastú oveľa pomalšie ako zdravé deti a niektoré majú vývojové oneskorenie.

Väčšina jedincov s deficitom ADA má diagnostikovaní SCID v prvých 6 mesiacoch života. Bez liečby tieto deti obvykle neprežijú do 2 rokov. Približne v 10 až 15% sa nástup imunodeficiencie oneskorí na 6 až 24 mesiacov alebo dokonca do dospelosti. Imunitná deficiencia v týchto neskorších prípadoch býva menej závažná a spôsobuje primárne opakujúce sa infekcie horných dýchacích ciest a uší. Po čase sa u postihnutých jedincov môže vyvinúť chronické poškodenie pľúc, podvýživa a ďalšie zdravotné problémy (Genetics Home Reference, 2013).

3.5 Ďalšie typy SCID

3.5.1 SCID A

Mutácie v géne DCLRE1C môžu spôsobiť Artemis SCID, tiež známy ako SCID A a niekedy označovaný ako SCID typu Athabasca. Tento typ SCID sa vyskytuje predovšetkým v národe Navajo. Mutácie v géne DCLRE1C môžu tiež spôsobiť Omennov syndróm.

Tento gén sa vyžaduje na rekombináciu V (D) J, proces, ktorým sa exóny kódujúce antigény viažuce domény imunoglobulínov a proteínov receptorov TL zostavujú z jednotlivých segmentov génov V, (D) a J. V(D)J rekombinácia je iniciovaná lymfoidným špecifickým RAG endonukleázovým komplexom, ktorý generuje miestne špecifické DNA dvojlákové zlomy (DSB). Tieto DSB predstavujú dva typy koncových štruktúr DNA: vlásenky uzavreté kódujúce konce a fosforylované tupé signálne konce. Tieto konce sú nezávisle opravené cestou nehomologického spájania koncov, aby sa vytvorilo kódovanie a signálne spojenia. Tento proteín vykazuje izolovanú 5'-3' exonukleázovú aktivitu špecifickú pre jedno vlákno a získava endonukleolytickú aktivitu na 5' a 3' vlásenkách a previsy, keď je v komplexe s proteinkinázou aktivovaným katalytickým polypeptidom (PRKDC). Táto posledná aktivita sa vyžaduje špecificky na rozlíšenie uzavretých vlásenkou pred vytvorením kódovacieho kľbu. Môže byť tiež potrebné na opravu komplexných DSB indukovaných ionizujúcim žiarením, ktoré si pred uvoľnením pomocou nehomologického spájania koncov (NHEJ), vyžadujú podstatné spracovanie (Genetics Home Reference, 2020).

3.5.2 Omennov syndróm

Omennov syndróm spadá pod ľahšiu formu ochorenia SCID. Molekulárna podstata je v mutácií génu RAG1, RAG2. Aktivita týchto rekombináz je znížená, no naďalej prítomná. Syndróm je charakteristický neprítomnosťou cirkulujúcich BL. Aktivované TL oligoklonálneho charakteru, typu Th2, ktorého produkty IL-4 a IL-5 vedú k eosinofílii, spôsobujú infiltráciu kože a sliznice čriev.

Dojčatá s Omennovým syndrómom majú zvyčajne zápal pľúc a chronickú hnačku. Organizmy, ktoré spôsobujú infekciu u ľudí s touto poruchou, sa často opisujú ako oportunistické.

Okrem imunodeficiencie sa u detí s Omennovým syndrómom rozvíja autoimunita, pri ktorej imunitný systém útočí na vlastné tkanivá a orgány tela. Táto abnormálna imunitná reakcia môže spôsobiť veľmi červenú pokožku (erythrodermu), stratu vlasov (alopéciu) a zväčšenú pečeň a slezinu (hepatosplenomegáliu). Okrem toho majú postihnutí jedinci zväčšené tkanivá, ktoré produkujú biele krvinky bojujúce proti infekcii. Ak sa neliečia spôsobom, ktorý obnovuje imunitné funkcie, deti s Omennovým syndrómom obvykle prežijú iba do veku 1 alebo 2 rokov (Genetics Home Reference, 2017), (Bartůňková, 2007).

4 DIAGNOSTIKA OCHORENIA SCID

Diagnostiku ochorenia tvorí mozaika z mnohých vyšetrení ako sú bežné alebo špecializované laboratórne vyšetrenia spolu s rodinou a osobnou anamnézou. Molekulárno-genetické vyšetrenie môže objasniť molekulovú podstatu daného postihnutia.

4.1 Rodinná a osobná anamnéza

Genetické choroby, medzi ktoré patria aj PID, konkrétne SCID, je ochorenie, pri ktorom sa môžeme čiastočne oprieť o údaje z rodinnej anamnézy v diagnostickom procese. Otázky sú smerujúce hlavne na pohlavie postihnutých osôb, výskyt predčasných úmrtí a na možnosť príbuzenských sobášov. Pri chorobách viazaných na chromozóm X (X-SCID) sa vyskytujú úmrtia chlapcov z matkinej strany, keďže matky sú ako prenášačky a nemávajú zvyčajne prejavy ochorenia. Príbuzenský sobáš zvyšuje riziko autozomálne recesívnych chorôb.

PID sa najčastejšie prejavujú zvýšenou náchylnosťou na závažné infekcie. V niektorých prípadoch sa k infekčným prejavom pridávajú aj prejavy alergie alebo auto-imunitných chorôb. Tieto príznaky sú niekedy v popredí pred klinickou manifestáciou alebo prvým možným príznakom imunodeficiencie. V niektorých prípadoch je defekt kompenzovaný inými mechanizmami, preto sa prejaví len čiastočne alebo vôbec, závislé od situácie.

Kedy sa prvé príznaky imunodeficiencie objavia, závisí od toho, ktorá zložka imunity je abnormálna. Kombinované imunodeficiencie postihujú bunkovú ako aj humorálnu imunitu. Častokrát sa prejaví hneď po narodení v prvých mesiacoch života. U ťažkých kombinovaných imunodeficiencií patria prejavy ochorenia buď k základnému obrazu choroby alebo ide o dôsledok reakcie štepu proti hostiteľovi pri materofetálnom engraftmentu, alebo pri transfúzií neoziarenej krvi. Pojem materofetálny engraftment sa označuje prítomnosť materských lymfocytov v cirkulácii imunodeficitného novorodenca či kojenca. Aj za normálnych okolností sa môžu materské lymfocyty dostať do obehu plodu, avšak nijako sa táto skutočnosť neprejaví. U imunodeficitného novorodenca môžu spôsobiť reakciu štepu proti hostiteľovi, to znamená cytotoxickú reakciu proti orgánom a tkanivám, ktoré poškodzujú. Materofetálne lymfocyty často nesú znaky aktivovaného Tc ($CD8^{+}DR^{+}$) a menej často pomocných Th ($CD4^{+}$) lymfocytov (Bartůňková, 2007).

4.2 Laboratórne vyšetrenie

Niektoré anomálie sú schopné upozorniť na imunodeficiencie už v bežných laboratórnych vyšetreniach. Na prvom mieste sú to hlavne zmeny v krvnom obraze.

4.2.1 Vyšetrenie krvného obrazu

Krvný obraz (KO) je skriningové vyšetrenie, ktoré sa vykonáva pri prijatí do nemocnice tak ako aj pri podozrení na hematologické alebo vážnejšie infekčné ochorenie. Poskytuje údaje o počte krvných elementoch, krvného farbiva, hemoglobínu a hematokritu.

Postup:

1. Príprava vzorky

- Odobratie žilnej krvi
- Premiešanie s protizrážlivou látkou (EDTA, citrát sodný)
- Stabilizácia vzorky

2. Spracovanie vzorky (Obr. 7)

- Aspirácia vzorky
- Meranie vzorky

3. Zhodnotenie výsledkov (Tab.5)

Tabuľka 5: Referenčné hodnoty KO (zdroj: Mikšová, 2006).

Erythrocyty (RBC)	ženy:	$3,5-5,18 \cdot 10^{12} / l$
	muži:	$4,2-5,8 \cdot 10^{12} / l$
Leukocyty (WBC)		$4,5 - 11,0 \cdot 10^9 / l$
Trombocyty (PLT)		$150-300 \cdot 10^9 / l$
Hemoglobín (HGB)	ženy:	115-160 g/l
	muži:	120-174 g/l
Hematokrit (HCT)	ženy:	34-47
	muži:	37-50



Obrázok 7: Analyzátor XE-5000 SYSMEX (prevzaté z: © SelectScience, 2020)

Pri SCID je typická lymfopénia, tzn. znížený počet lymfocytov v krvi. Maternofetálny engraftment môže byť pri novorodencovi maskovaný cirkulujúcimi materskými lymfocytmi, a hodnoty percentuálneho zastúpenia lymfocytov býva nižšia než odpovedá veku. Ak sa prevedie fenotypizácia lymfocytov tak materské lymfocyty nesú poväčšine fenotyp $CD8^+DR^+$ (Mikšová, 2006).

4.2.2 Imunofenotypizácia lymfocytov

V dnešnej dobe je imunofenotypizácia lymfocytov jedným z najpoužívanejších postupom vyšetrenia pre TL a BL. Ich identifikácia je na základe detekcie povrchových znakov (tzv. CD znakov) pomocou monoklonálnych protilátok. Povrchový znak je molekula alebo komplex molekúl, ktoré bunka exprimuje na svojom povrchu. CD znak je jedinečný a okrem typu alebo subtypu bunky môžeme určiť aj jej maturačné štádium a pod. Imunofenotypizáciu lymfocytov vyšetrujeme metódou prietokovej cytometrie.

Metóda je založená na meraní fyzikálnych a chemických vlastností bunkových suspenzií. Analýzu svetelného rozptylu a fluorescenčného signálu jednotlivých častíc, sústredených v prúde kvapaliny, zaisťuje optický merací systém- prietokový cytometer. Monoklonové protilátky označené fluorescenčným farbivom, sa naviažu na špecifické povrchové alebo intracelulárne antigény danej bunky. Zafarbené bunky sú unášané laminárnym prúdom nosnej kvapaliny cez prietokovú komôrku, ktorú pretína svetelný lúč, exponovaný zväzkom laserových lúčov. Rozptýlené svetlo následne zaznamená *forward scatter* (FSC), ktorý je mierou veľkosti bunky a *side scatter* (SSC), ktorý je mierou granularity bunky. Fluorescenčné farbivo absorbuje svetlo z lasera a vysiela do rôznych častí spektra. Stanovením množstva každej farby na bunkách, určíme molekulárne vlastnosti bunky (*viz. Obr.8*).

Postup:

1) Príprava vzorku

- Odber krvi do skúmavky s EDTA

2) Spracovanie vzorku

- Prietokový cytometer

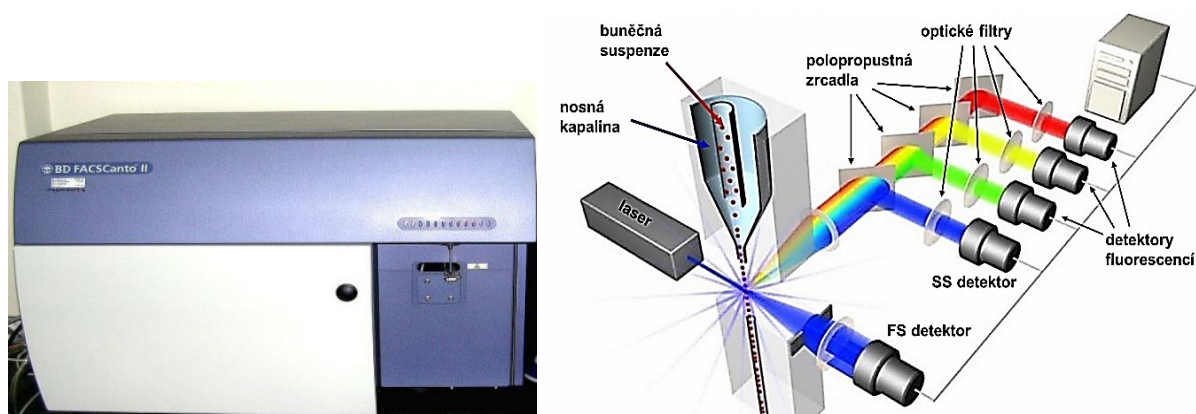
3) Zhodnotenie výsledkov (Tab.6)

- Na základe negatívnej kontroly sa uskutočňuje členenie medzi pozitívnu a negatívnu populáciu. Pre vyhodnotenie ako pozitívnu expresiu platí, že povrchový antigén musí byť exprimovaný vo viac ako 20% a intracelulárny antigén vo viac ako 10%.

Tabuľka 6: Diagnostické kritériá pri imunofenotypizácii T-lymfocytov (prevzaté z: Dobrotová, 2006).

	<i>Diagnostické kritérium</i>	<i>Pozorované javy</i>
1	<i>Aberantné expresia Ag (líniová nespoľahlivosť)</i>	Určitá línia zaznamenaná netypickú expresiu Ag ako napr. CD5 pozitivita na BL
2	<i>Asynchronná expresia Ag</i>	Expresia Ag netypická pre určitý stupeň zrelosti, napr. CD34-Ag skorej diferenciácie na zreých myeloidných radách buniek
3	<i>Chýbajúca expresia líniov špecifických Ag</i>	Chýbanie Ag na zreých bunkách
4	<i>Patologický svetelno-rozptylový obraz</i>	
5	<i>Zvýšená / znížená expresia Ag</i>	Vyššia / nižšia hustota znaku na povrchu bunky

Jedným z klinických kritérií u detí so SCID < 2roky, je hodnota CD3+ lymfocytov menej ako 20% a ich koncentrácia pod 3000/mm³. Taktiež prítomnosť materských TL, ktoré vyvolávajú reakciu graft versus host, poväčšine nesú znaky CD8+DR+ (Dobrotová, 2006).



Obrázok 8: (A) Prietokový cytometer FACS Canto™ II; (B) Schéma prietokovej cytometrie (prevzaté z: Harrachová, 2017).

4.2.3 Mikrobiologické vyšetrenie *Pneumocystis jirovecii*

Ťažká kombinovaná imunodeficiencia je typická zápalmi pľúc spôsobené *Pneumocystis jirovecii*. V prípade častých opakovaných infekciách sa využíva mikrobiologické vyšetrenie materiálu, ktorý priamo súvisí s pľúcny tkanivom. Pri dôkaze tohto mikróba rozlišujeme

viaceré druhy materiálu. Najčastejšie sú bronchoalveolárna tekutina, indukované sputum, neindukované sputum, pľúcne tkanivo získané biopsiou. Rozdielnú senzitivitu pri každom záchytu popisuje tabuľka č.7.

*Tabuľka 7: Porovnanie senzitivity záchytu spôsobené *Pneumocystis jirovecii* podľa typu odobratého materiálu (prevzaté z: Skříčková, 2005).*

<i>Materiál</i>	<i>Senzitivita</i>
<i>transbronchiální biopsie + BAL</i>	95 - 100%
<i>otevřená plicní biopsie</i>	99%
<i>transbronchiální biopsie</i>	88 - 97%
<i>bronchoalveolární laváž (BAL)</i>	79 - 97%
<i>indukované sputum</i>	55 - 80%
<i>bronchiální brushing</i>	39 - 79%
<i>neindukované sputum</i>	30%

Neindukované sputum patrí medzi najľahšie získaný biologický materiál pre diagnostiku *Pneumocystis jirovecii*. Toto sputum pacient vykašľáva samovoľne do plastovej skúmavky, avšak ide o materiál, v ktorom mikróba zachytíme s malou pravdepodobnosťou.

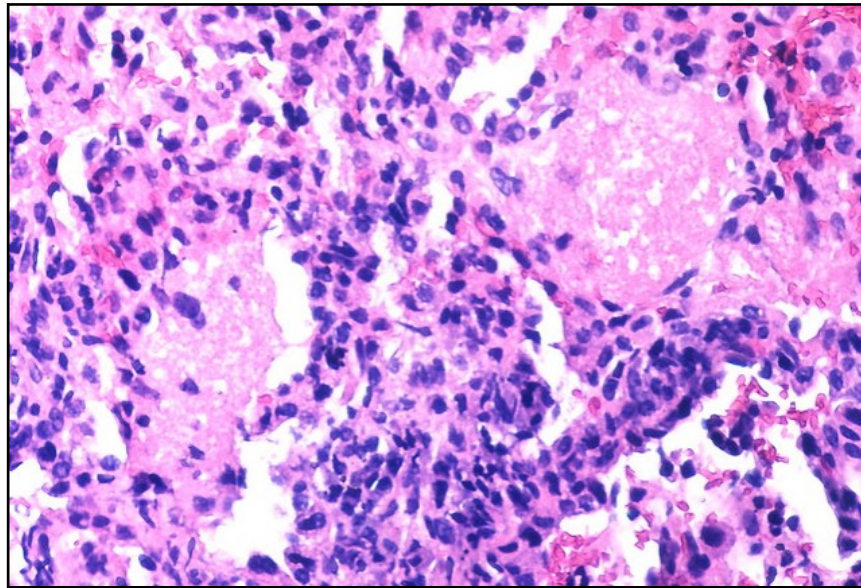
Indukované sputum sa získava technikou, kedy sa pacientovi pred odberom nebulizérom navlhčia dýchacie cesty, vďaka tomu sa odoberie kvalitnejší materiál a zvýši sa možnosť záchytu.

Bronchoalveolárna laváž sa odoberá pomocou hadičky, ktorá sa zavádza do dýchacích ciest. Biopsia patrí medzi najdokonalejšiu a najnáročnejšiu metódu odoberania materiálu. Je to závažný zásah do organizmu pacienta, na úkor získania kvalitného materiálu so skoro stopercentným záchytom (Skříčková, 2005).

Nasleduje **mikroskopia** a **diagnostické farbenie**. Bronchoalveolárna tekutina, indukované sputum, neindukované sputum alebo bioptické tkanivo sú hlavné materiály pre farbenie. Materiály môžeme rozdeliť na prirodzene sterilné, kde neočakávame výskyt žiadnych iných Ag, napr. bronchoalveolárna laváž. Medzi prirodzene nesterilné patrí sputa, ktorá obsahuje širokú radu mikróbov fyziologicky, avšak s možnosťou skreslenia výsledkov.

V praxi sa využívajú farbenia podľa Gram-Weigerta, Giemsi-Romanovského (viz. Obr.9). Ďalšou možnosťou je imunoflorescencia zvyšujúca senzitivitu a pravdepodobnosť pozitívneho

záchytu. Princíp imunoflorescenčného stanovenia využíva monoklonálnych protilátok, ktoré reagujú s ľudskými kmeňmi *Pneumocystis jirovecii* (Kovacs, 2001), (Skříčková, 2005).



Obrázok 9: Vzorka alveolárneho exsudátu so závažným chronickým intersticiálnym zápalom spôsobeným *Pneumocystis jirovecii* (prevzaté z: Rosen, 2009).

4.3 Skríning novorodencov

„Novorodenecký skríning je dôležitý celoplošný preventívny program vyhľadávajúci v populácii zdravých novorodencov liečiteľné ochorenia v ich včasnom asymptomatickom štádiu (Lysinová, 2015)“.

V širšom slova zmysle do novorodeneckého skríningu môžeme zahrnúť aj pravidelné klinické vyšetrenia detským lekárom pri hľadaní vrodených vývojových vad. V užšom slova zmysle rozumieme pod pojmom novorodenecký skríning tzv. novorodenecký laboratórny skríning (NLS), ktorý spočíva v diagnostike skríningových chorôb na základe stanovenia koncentrácie špecifickej látky alebo dôkazu génovej mutácie na tzv. novorodeneckej skríningovej kartičke, ktorá je všetkým novorodencom odoberaná na území štátu

Medzi 48. až 72. hodinou po narodení sa z päty dieťaťa odoberie niekoľko kvapiek na dve samoprepisovacie skríningové kartičky. Na prvej kartičke vyšetrujeme vrodené ochorenie ako je kongenitálna hypotyreóza, kongenitálna adrenálna hyperplazia a cystická fibróza. Z druhej kartičky sa vyšetrujú dedičné ochorenia látkovej výmeny.

Na základe zmeneného množstva určitých látok novorodenca (bielkoviny, enzýmy, hormóny, aminokyseliny a acylkarnitín) sa zisťujú ochorenia (Lab tests, 2016).

Na Slovensku funguje novorodenecký skrining ako dobre prepracovaný celoplošný preventívny program (viz. Tab.8), s ktorého pomocou sa zachytávajú sledované ochorenia už v asymptomatickom štádiu, čím sa zlepšujú prognóza a kvalita života postihnutých jedincov (Lysinová, 2015).

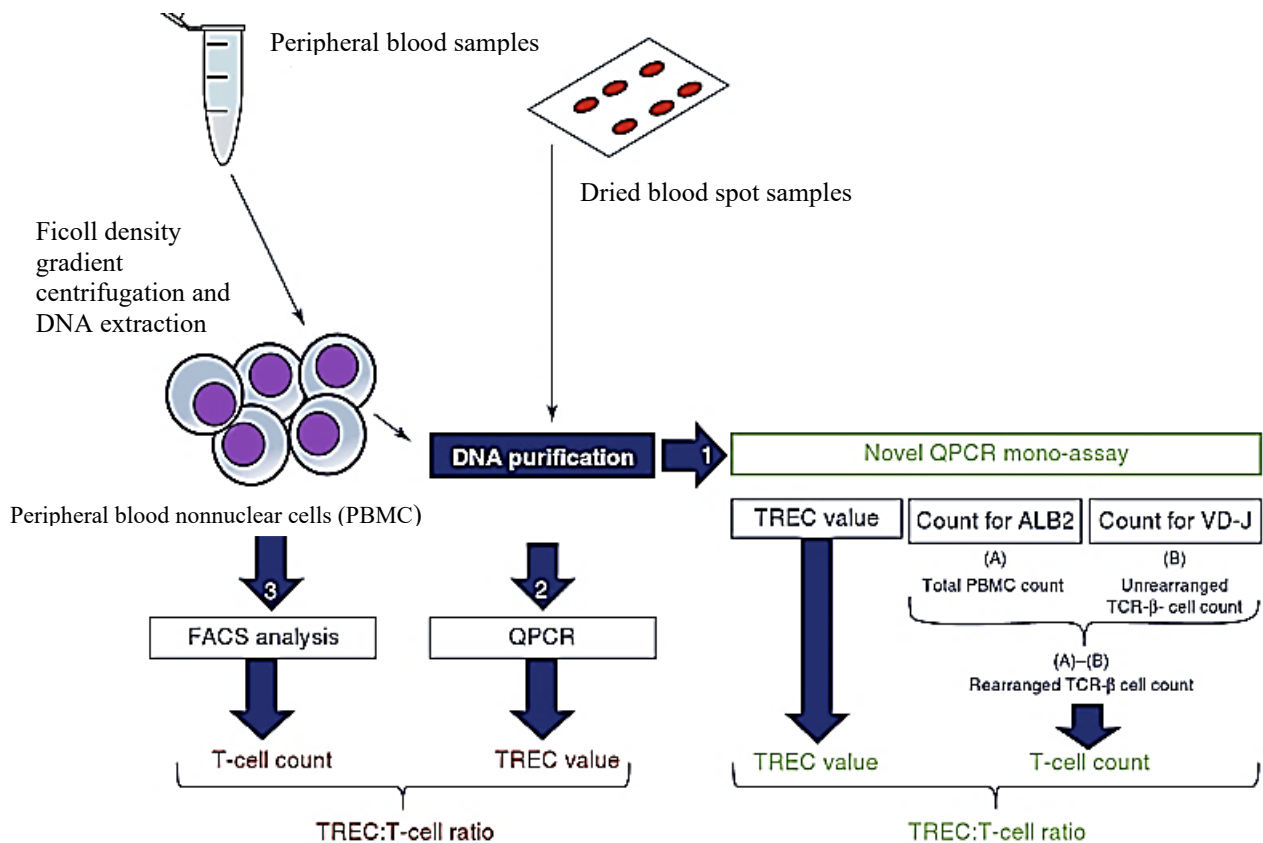
Tabuľka 8: Skriningové testy novorodencov prebiehajúce na Slovensku (prevzaté z: Čižnár, 2014).

	<i>Názov</i>	<i>Incidencia</i>	<i>Test</i>
1.	<i>Fenylketonúria a hyperfenylalaninémia</i>	1 : 5 600 – 7 000	MS2
2.	<i>Kongenitálna hypotyreóza</i>	1 : 4 000 – 6 000	TSH
3.	<i>Kongenitálna adrenálna hyperplázia</i>	1 : 18 000	17-OHP
4.	<i>Cystická fibróza</i>	1 : 2 500	IRT
5.	<i>Leucinóza alebo choroba javorového sirupu</i>	1 : 180 000	MS2
6.	<i>Ťažké kombinované imunodeficiencie</i>	<i>1 : 35 000</i>	<i>TREC</i>
7.	<i>Izovalerová acidúria</i>	1 : 12 500	MS2
8.	<i>Glutarová acidúria typ I</i>	1 : 80 000	
9.	<i>Deficit karnitínacylkarnitíntranslokázy</i>	-	
10.	<i>Deficit karnitínpalmitoyltransferázy I</i>	-	
11.	<i>Deficit karnitínpalmitoyltransferázy II</i>	-	
12.	<i>Deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselín s veľmi dlhým reťazcom</i>	1 : 66 000	
13.	<i>Deficit 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenázy mastných kyselín s dlhými reťazcom</i>	1 : 60 000	
14.	<i>Deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom</i>	1 : 20 000	

4.3.1 TREC test

Počas posledných niekoľkých rokov sa prvá SCID a súvisiace stavy s nízkym počtom TL, stala identifikovateľnou pomocou skriningu novorodencov. Je to prvý skriningový test novorodencov, ktorý používa DNA ako primárny analyt. TREC sa tvoria ako produkty kruhovej excízie počas preskupenia génov receptora pri vývoji TL v týmuse. Preto sú TREC markerom nedávno vytvorených TL, zatiaľ čo naopak, neprítomnosť alebo silne znížená hladina TREC naznačuje nízky obsah novovytvorených TL.

Meranie TREC uskutočňujeme pomocou kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie (qPCR) (viz. Obr.10), hodnoty TL sa spracujú pomocou analýzy triedenia buniek aktivovaných fluorescenciou (FACS) (Massoud, 2014). TREC nebudú detegované v prípade prítomnosti materských transplantovaných TL a tiež u pacientov s Omennovým syndrómom. TREC budú chýbať kvôli oligoklonálnej expanzii autológnych TL, čo robí test TREC tiež užitočným v týchto podtypoch SCID. Diagnóza SCID však môže byť stanovená iba po imunofenotypizácii a môže byť potvrdená genetickým testovaním (Van der Burg, 2019).



Obrázok 10: Shematické znázornenie QPCR pre stanovenie SCID - Test meria pomer buniek TREC: TL vo vzorkách krvi vrátane vzoriek suchej kvapky krvi (DBS). Tento QPCR mono-test berie do úvahy vzorky DNA purifikované buď z periférnych mononukleárných buniek (PBMC) izolovaných gradientovou centrifugáciou Ficoll-Hypaque alebo zo vzoriek DBS. Tento obrázok znázorňuje, ako sa aproximácia počtu VD-J k T bunkám odvodí pomocou nového testu QPCR mono. Zo vzoriek plnej krvi alebo vzoriek DBS sa celková bunková DNA kvantifikuje pomocou počtu pre ALB2 (albumínový gén) (A). Podobne sa nereorganizovaný počet TCR kvantifikuje podľa úrovne VD-J, neriadené TCR bunky zodpovedajú celkovému počtu zárodočných buniek (B). Nepripravený počet TCR-PBMC odpočítaný z celkového počtu PBMC nám preto poskytuje konečný počet preusporiadaných TCR, a teda počet TL. ((A) – (B)) (zdroj: Massoud, 2014).

Neprítomné TREC možno identifikovať aj u detí so syndrómami poškodenia TL ako je DiGeorgeov syndróm, Downov syndróm alebo Ataxia Telangiectasia, sekundárne u detí so

zníženým TL v dôsledku iných novorodeneckých stavov alebo u pacientov s idiopatickým lymfómom. Ďalej treba poznamenať, že nízke hladiny TREC sa dajú nájsť aj u predčasne narodených detí (Van der Burg, 2019). Test a validita bola vyskúšaná prvý krát v meste Wisconsin v USA v roku 2008. Skrining ale nezachytáva viaceré poruchy funkcie TL ako sú napr. deficit CD40L, deficit ZAP-70 a ďalšie. Relatívnym problémom nastáva aj pri vyšetrení predčasne narodených detí, pretože majú veľmi nízke hodnoty lymfocytov v dôsledku svojej nezrelosti. Skrining pri týchto deťoch sa musí prispôsobovať gestačnému veku (Čižnár, 2014).

Cutoff hodnoty pre kópie génu TREC a p-aktínu / ul krvi sa stanovujú pomocou súpravy PerkinElmer Enlite. Vzorky s viac ako 18 TREC / μ l pri počiatocnom testovaní sa považujú za normálne. Vzorky s 18 TREC / μ l alebo menej majú opakované testovanie TREC a β -aktínu; z toho sú vzorky menej ako 3 TREC urgentné pozitívne, pričom stanovenie podskupiny lymfocytov prietokovou cytometriou je okamžité. Vzorky so 4–18 TREC / μ l sa kategorizujú ako pozitívne, ak sú hodnoty β -aktínu nad 35 a je zhotovené stanovenie podskupiny lymfocytov prietokovou cytometriou. Vzorky s nedostatočnou kontrolnou amplifikáciou aktínovej DNA sa označujú ako DAF (zlyhanie amplifikácie DNA). Tieto deti si vyžadujú opakovanú vzorku päty alebo, ak už ide o druhú vzorku, stanovujú sa podskupiny lymfocytov pomocou jednotky novorodeneckej intenzívnej starostlivosti-NICU. Výsledkom zo suchej krvnej kvapky (DBS) je nízke TREC a nízke číslo p-aktínu. Následne sa spracuje kompletný krvný obraz (CBC) (Dorsey, 2017).

5 MOŽNOSTI TERAPIE OCHORENIA SCID

Liečebné postupy závisia od obťažnosti a druhu defektu. Kauzálnu liečbu poskytuje transplantácia hematopoetických kmeňových buniek alebo génová terapia. Transplantácia kmeňových buniek sa stala bežným, ale náročným terapeutickým postupom. Génová terapia patrí ešte k experimentálnym metódam. Všetky liečebné možnosti sú dopĺňované adekvátnou antimikrobiálnou terapiou, nutričným a režimovým opatrením a psychologickým zásahom.

5.1 Transplantácia hematopoetických kmeňových buniek

Ťažké kombinované imunodeficiencie sú indikované k transplantácií kmeňových buniek získaných z kostnej drene, či pupočníkovej krvi. Transplantáciu je možné podstúpiť od batol'at'a do dovŕšenia 65. roku života. Úspešnosť liečby je odkázaná na mnoho faktorov, z ktorých je najdôležitejší, skoré diagnostikovanie ochorenia a vhodný darca. Transplantácia prináša značné riziká, no napriek tomu dáva úspešnosť u pacientov so SCID najmenej 50%, u HLA identických skoro 90% na vyliečenie (Bartůňková, 2007), (Böhrem, 2015).

Typy transplantácie:

1. **Autológna transplantácia:** Pri tomto type transplantácie sa využívajú krvotvorné kmeňové bunky pacienta. Medzi ich úlohu patrí náhrada kostnej drene po vysoko dávkovanej, myeloablatívnej liečbe.
2. **Alogénna transplantácia:** Využíva sa v liečbe nádorových aj nenádorových ochorení, kde sa dosadí, zväčša poškodená KD alebo sa nahradí imunitný systém pacienta zdravými krvotvornými kmeňovými bunkami darcu. Za úspešnosťou transplantácie stojí zhodný HLA systém pacienta a darcu vo všetkých antigénoch.
3. **Syngénna transplantácia:** Patrí medzi formu alogénnej transplantácie, pri ktorej je darcom jednovaječné dvojča.

Pri autológnej a alogénej transplantácií bola tradičným zdrojom krvotvorných kmeňových buniek **kostná dreň (KD)**. **Periférna krv** sa začala využívať neskôr a ako najnovší zdroj sa začala využívať **pupočníková krv**.

1. Kmeňové bunky sa z KD získavajú opätovanými aspiráciami, najmä zo zadnej časti bedrovej kosti darcu v lokálnej alebo celkovej anestézii.
2. Krvotvorné bunky v KD sa môžu mobilizovať do periférnej krvi. Stimulujú sa vo forme subkutánnej injekcie hematopoetického rastového faktoru, ako napr. G-CSF. V procese aferézy sa po mobilizácii na separátore z periférnej krvi, izolujú periférne kmeňové

bunky (PKB). PKB sa môžu použiť aj o niekoľko mesiacov až rokov, vďaka zamrazeniu a uskladneniu v tekutom dusíku pri 196 °C. Pri alogénnej transplantácii sa podávajú pacientovi hneď po separácii.

3. Pupočniková krv a krv z placenty je bohatá na krvotvorné kmeňové bunky. Po pôrode sa odoberie cca 40-70ml tejto krvi (Ladická, 2007).

5.1.1 Výber vhodného darcu

Medzi najvhodnejšieho darcu patrí súrodenec, ktorý je zhodný v HLA systéme. Medzi vhodných darcov zaradujeme aj rodičov, hlavne rodiča rovnakého pohlavia, kvôli prítomnosti komplexov antigénov „minor-histocompatibility“, ktoré sú pohlavne špecifické. Alternatívne sa môže prevádzať aj transplantácia od nepríbuzenského darcu, čo najviac zhodného v hlavných HLA antigénoch. Výber správneho darcu sťažuje aj existencia stoviek alelických foriem HLA A,B,C a DR. Počet možných individuálnych kombinácií je cca $2 \cdot 10^{10}$, pričom nájdenie vhodného identického darcu je veľmi obťažné (Bartůňková, 2007).

Hlavný histokompatibilný systém sú antigény glykoproteínovej štruktúry, ktoré sa nachádzajú v membráne všetkých jadrových buniek. Štruktúra HLA je daná geneticky. Súbor génov, ktoré kódujú tieto molekuly sa nazýva Major Histocompatibility Complex (MHC).

Na základe vysokej polymorfности, nesie každý človek v bunkách jedinečnú zostavu HLA antigénov. Tieto antigény sú rozdelené do I. a II. triedy. Vďaka rozdielu dochádza medzi jedincami k tkanivovej nezlučiteľnosti a prípadne k potransplantačnej reakcii, ktorá vyvoláva akútnu reakciu odvrhnutia štep (Penka, 2012).

Reakcia štepu proti hostiteľovi (GVHD) v akútnej forme predstavuje priame ohrozenie života transplantovanému pacientovi. Vo svojej chronickej forme v dlhšom odstupe od transplantácie ovplyvňuje kvalitu života a prežívania. Reakciu vyvolávajú TL v štepu. Existujú mnohé postupy, ktoré minimalizujú ich obsah, avšak na druhej strane zaisťujú TL v štepu aspoň čiastočne antiinfekčnú imunitu príjemca. Pri imunodeficienciách sa zvyšuje riziko vírusových infekcií a lymfoproliferatívnych komplikácií, odstránením TL zo štepu (Bartůňková, 2007).

HLA antigény sa zúčastňujú na imunitných reakciách. Na svoje špecifické miesto sú schopné naviazať endogénny alebo exogénny peptid a predkladajú ho TL. Endogénne časti sú naviazané na HLA I. triedy a následne sú rozpoznávané CD8⁺ TL. Exogénne častice majú vysokú afinitu k HLA II. triedy, ktoré rozpoznávajú CD4⁺ TL (Penka, 2012).

5.1.2 Predtransplantačná príprava

Základom prípravy na transplantáciu je odstránenie patologickej krvotvorby a následné potlačenie reziduálnej aktivity vlastnej imunity, s cieľom vyhnúť sa rejekcií transplantátu. Pri SCID s lymfocytózou nie je vyžadovaná príprava ak NK- bunky nie sú prítomné. U týchto pacientov je vyššie riziko GVHD.

Rejekcia štetu sa vyskytuje pri imunodeficienciách, kde je zachovaná reaktivita vlastnej imunity ako napr. u SCID je zachovaná aktivita NK-buniek (Bartůňková, 2007).

Pred vykonaním transplantácie musí pacient prejsť mnohými predoperačnými vyšetreniami aby bola liečba bez možných komplikácií. K základným vyšetreniam patria:

- ✓ **pohovor s lekárom transplantačného tímu** (zistenie predchádzajúcich ochorení a chorôb v rodine)
- ✓ **fyzikálne vyšetrenie** (odber vzoriek krvi a moču)
- ✓ **mikrobiologické a serologické vyšetrenie** (odber vzoriek na určenie baktérií v tele pacienta)
- ✓ **echokardiografia** (posúdenie funkcie srdca)
- ✓ **spirometria a vyšetrenie krvných plynov** (posúdenie funkcie pľúc)
- ✓ **gynekologické vyšetrenie** (u žien na vylúčenie tehotenstva)
- ✓ **urologické vyšetrenie** (u mužov)
- ✓ **vyšetrenie očného pozadia**
- ✓ **zubné vyšetrenie vrátane röntgenového snímku celého chrupu, ORL vyšetrenie** (vylúčenie možných ukrytých ložísk infekcie)

5.1.3 Priebeh transplantácie

Po absolvovaní predtransplantačného vyšetrenia je prijímaný pacient do transplantačného centra. Priebeh rozdelíme do 3 častí:

- Prípravná fáza (3-10 dní)
- Podanie transplantátu (deň „0“)
- Potransplantačné obdobie

5.1.3.1 Prípravná fáza

Lekár po stanovení diagnózy začína pacienta pripravovať na transplantáciu, čo zahŕňa nájdenie vhodného darcu. Taktiež to zahŕňa informovanie pacienta o náročnosti terapie a príprava na tento výkon. Prípravný režim trvá 3-10 dní. Pacient je pred začatím prijímaný na

lôžko aby mu bola poskytnutá potrebná starostlivosť. Zvyčajne sa zavádza centrálny venózný katéter, aby liečba prebehla bezpečne a pacient bol monitorovaný.

Dôležitú úlohu v celom procese transplantácie ma podporná liečba (intenzívna hematologická starostlivosť), ktorej súčasťou je zabezpečenie dostatočne potrebnej hydratácie, adekvátnej výživy pacienta, profylaxia a liečba možných komplikácií a zníženej krvotvorby (Cetkovský, 2004).

5.1.3.2 Podanie transplantátu

Kmeňové bunky sa podávajú pacientovi pri alogénnej transplantácii vo forme transfúzie, v ktorej sú čerstvo zozbierané krvotvorné bunky. Podávajú sa rovno do žily a proces trvá niekoľko hodín. Z krvného obehu sa kmeňové bunky dostávajú do kostí, kde sa usadia v KD a začínajú sa množiť.

Podávanie transplantátu prebieha bez závažnejších problémov, no môže objaviť nevoľnosť, nutkanie na zvracanie, zmeny krvného tlaku alebo prechodná alergická reakcia.

5.1.3.3 Potransplantačné obdobie

V prvých dňoch po transplantácii dochádza k poklesu bielych krviniek, ktorých hladina klesne prakticky až na nulové hodnoty. V tomto období začína zvýšene riziko vzniku infekcií. Pacient má vysokú náchylnosť k bakteriálnym, vírusovým či hubovým infekciám. Na zvýšenie ochrany pacienta sa dodržiava sterilný režim a jeho izolácia. Taktiež sú nízke aj hodnoty krvných doštičiek. Pri nedostatku je zvýšene riziko krvácania, aby sa tomu zabránilo, podávajú sa trombocyty vo forme transfúzie podľa potreby erytrocytov.

S poklesom krvného obrazu sa pomaly prejavujú nežiadúce účinky chemoterapie, pri ktorej pacient pociťuje bolesť v ústnej dutine pri prehĺtaní. Sliznica je zapálená, citlivá, vytvárajú sa afty. Vzniká zápal v ústnej dutine tzv. orálna mukozitída (Bojtárová, 2012). Obnova krvotvorby po transplantácii závisí na mnohých faktoroch ako je množstvo podaných kmeňových buniek, typ transplantácie, vek príjemcu, spôsob spracovania štepu atď. Granulopoéza sa pri autológnej transplantácii objavuje už okolo 10. dňa, prípadné rozmedzie je 9-35 dní. Pri alogénnej je medián okolo 13. dňa. Lymfocyty spolu s ich subpopuláciami sa objavujú rôzne. Najskôr prevládajú TcL (CD8), koncentrácia ThL (CD4) aj po 6. mesiacoch od transplantácie je nízka. BL a NK bunky sú detegované od transplantácie okolo 35. dňa, avšak pri veľkom počte pacientov dochádza k deficite BL a je potrebná substitučná liečba imunoglobulínmi (Bartůňková, 2007).

5.2 Substitučná enzýmová liečba

Pacientom s ADA-SCID je možné podať substitučnú enzýmovú liečbu, ktorým sa podáva enzým adenosín deamináza konjugovaný na nosiči polyetylglykol (PEG-ADA). Táto náhrada enzýmu vyžaduje celoživotné podávanie injekcií do svalu 30 U/kg 1-2 týždne, čo je mimoriadne nákladné. Na základe skúsenosti, ktorým je podávaná liečba, sú pacienti oveľa náchylnejší na infekcie. Terapia je výnimočná, ale nie je autorizovaná nikde na území Európskej únie (Bartůňková, 2007), (Kyselovič, 2016).

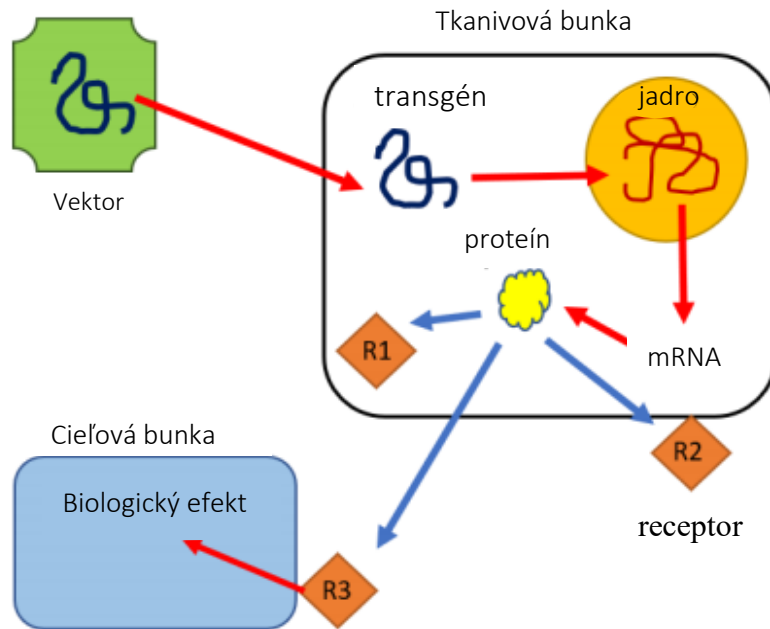
5.3 Génová terapia

Génovú terapiu zatiaľ považujeme len ako experimentálnu ale alternatívnu liečbu, dostupnú pre deti s ADA deficitom, X-SCID alebo SCID A. Terapia umožňuje opravu poškodeného génu alebo jeho expresie pomocou nahradenia tohto génu. Pre úspešnú génovú terapiu sú predpokladom terapeuticky vhodné gény, zapríčiňujúce pozorovaný patologický stav, vhodné vektory na prenos génov a informácie o ich účinnosti. Medzi neprehliadnuteľný faktor patrí aj správna konštrukcia vnášaného génu, aby nedošlo k zmnoženiu negatívneho účinku defektného génu.

Pre liečbu, uzdravenie a prevenciu proti ľudským génovým poruchám terapia zahŕňa použitie nukleových kyselín. Od typu ochorenia závisí dosiahnutie tejto liečby s pomocou vnesenia funkčného génu ako náhradu za nefunkčný prípadne chýbajúci gén alebo zmiernenie úrovne škodlivosti nefunkčného génu, pomocou sofistikovaných metód zahrňujúce vírové a nevírové vektory alebo jednoduché oligonukleotidy (Kaufmann, 2013), (Ramamoorth 2015), (Rubanyi, 2001).

Proces začína rozoznaním mutantného, prípadne defektného génu, zodpovedajúceho za patologický stav. Následne je zavedenie vektoru do tela pacienta, čo môže byť lokálne priamou injekciou do tkaniva alebo systémovo do krvného obehu. Pod pojmom vektor rozumieme nosičovú molekulu DNA, do ktorej sa vkladá pomocou reštrikčných miest potrebný gén-inzert. Ak ma za úlohu vektor namnoženie počtu kópií génu hovoríme o klonovacom vektore. Najčastejším klonovacím vektorom sa používa rekombinantný plazmid. V súčasnej dobe sú preferované vírové vektory (ide najmä o adenovíry a retrovíry, ktoré sú schopné inzerovať svoju genetickú informáciu do genómu hostiteľskej bunky). Vektor na nájdenie cieľového tkaniva, musí preniknúť do cytozolu postihnutej bunky a dostať sa až do jadra bunky. V jadre sa začlení do genómu a transkribuje sa na mRNA, ktorá sa v procese translácie premení na výsledný produkt-proteín. Produkt reaguje s jeho receptorom, nachádzajúceho sa v bunke, ktorá ho vyrobila alebo na proti susediacich bunkách, alebo na vzdialených miestach, kde sa

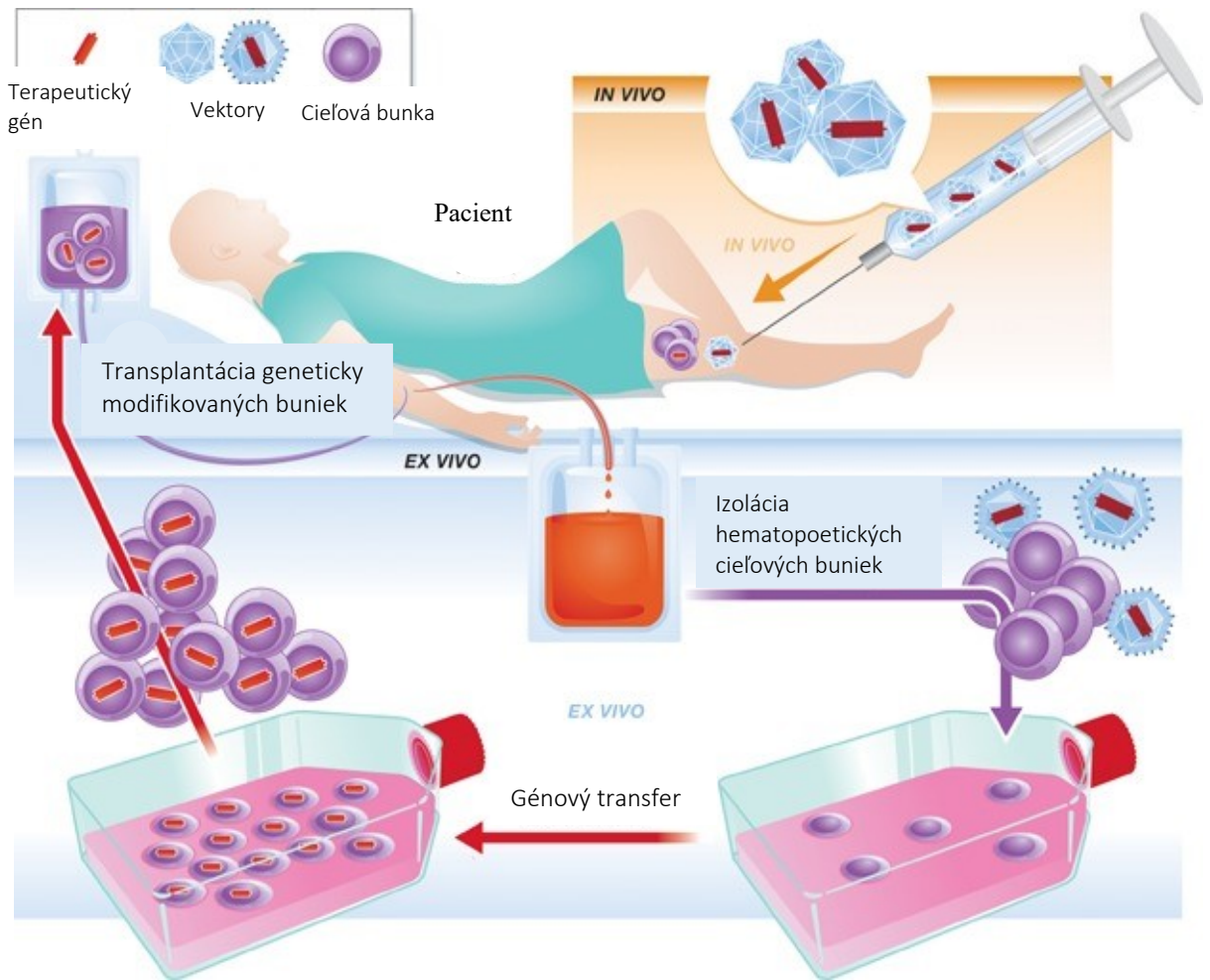
doproví pomocou krvného zásobenia (viz. Obr.11). Po interakcií dôjde k vyvolaniu priaznivej biologickej odpovede, ktorá ma za následok chcený účinok (Ramamoorth, 2015), (Rubanyi, 2001).



Obrázok 11: Princíp procesu génovej terapie : R- receptor (prevzaté a upravené podľa: Ramamoorth, 2015).

Doposiaľ bola prevedená u pár detí s deficitom ADA cez génový transfer pomocou myšieho retrovírového vektora. Pripravuje sa z vlastných buniek KD, s diferenciálnym znakom CD34+, do ktorých je vložený funkčný gén pre enzým adenzín deamináza. Takto upravené bunky sa po transfekcii vrátia do organizmu pacienta, pripravené na svoju diferenciáciu (krvné, imunitné bunky). Použitím vlastných buniek postihnutého pacienta, sa eliminuje imunitná odpoveď na bunky od darca, zároveň sa znižuje nutnosť používania imunosupresív a aj riziko následných reinfekcií. Takýto terapeutický postup znižuje aj dávky chemoterapie, ktorá je potrebná pred predoperačnou prípravou na transplantáciu kostnej drene (Kyselovič, 2016).

Génová terapia sa prevádza dvomi možnými postupmi, a to *in vivo*, *ex vivo*. V *in vivo* aplikácií je gén vnorený priamo do tela, resp. svalu, pacienta. Pri procese *ex vivo* sú pacientové bunky najskôr izolované z tela, resp. svalu. Neskôr sú mimo telo geneticky modifikované a vrátené späť pacientovi v autológnej transplantácii, ktorá znižuje riziko nechcených efektov ako napr. toxicita vďaka ektopickej expresii liečeného génu v necielených orgánoch (viz. Obr.12) (Kaufmann, 2013).



Obrázok 12: Mechanizmus in vivo / ex vivo génovej terapie (prevzaté a upravené podľa: Kaufmann, 2013).

ZÁVER

Imunitný systém je schopný reagovať na patogény a brániť organizmus pred poškodením. Poškodením génu (napr. ZAP70), súvisiaci s ochorením SCID, strácajú deti s týmto ochorením prakticky všetku imunitnú ochranu pred baktériami, vírusmi či hubami. Vďaka tomu sú náchylnejšie na opakované a pretrvávajúce infekcie, ohrozujúce ich na živote.

Deti so SCID bez liečby sa nedoživajú dospelého veku. Zomierajú okolo 1-2. rokom života. Príznaky sa objavujú okolo 6. mesiaca po narodení, keďže v obehú dieťaťa kolujú ešte TL od matky. V minulosti pre záchranu ich života bola jediná možnosť izolácia v sterilnom prostredí pred okolitým svetom, preto dostali aj prívlastky ako „bubble boy“.

Na základe vypuknutia príznakov realizujeme diagnostické vyšetrenia ako je krvný obraz, na určenie počtu krvných buniek, mikroskopické vyšetrenie baktérie rodu *Pneumocystis jirovecii*, ktorý pri tomto ochorení spôsobuje závažne zápaly pľúc. Metódou prietokovej cytometrie praktizujeme imunofenotypizáciu lymfocytov, na zistenie povrchových CD znakov. Pomocou jednoduchého testu TREC, ktorý prevedieme zo suchej kvapky krvi, zistíme hladinu TL, eventuálne BL. Celoplošný skrining novorodencov dopomáha k rýchlemu zachyteniu vrodenej choroby. Skriningové centrum pre novorodencov sa na Slovensku nachádza v Banskej Bystrici. Test je zo zákona povinný, preplácaný poisťovňou a podstupuje ho každý novorodenec. Presný počet jedincov s diagnózou SCID sa neevduje, avšak v Detskej fakultnej nemocnici s poliklinikou v Bratislave bolo diagnostikovaných 10 detí s týmto ochorením z toho u 6 prípadoch bola dosiahnutá imunitná rekonštrukcia a dobrá prognóza do budúcnosti. Na území Českej republiky je test dostupný v Prahe a Brne. Doteraz bol zavedený celoplošný skrining novorodencov len v jednotlivých štátoch USA, v Európskej únii sa zatiaľ praktizuje v Nórkku a v ďalších krajinách je v štádiu plánovania a pilotných príprav.

Na zlepšenie možnosti liečby, inak tohto smrteľného ochorenia sa desaťročia vyvíjala génová terapia, v ktorej revolúciu spôsobila modifikácia ľudského genómu. Táto terapia umožňuje vložiť nový gén namiesto chybného. Paradoxom je, že vírus HIV, ktorý spôsobuje sekundárne imunodeficiencie, je modifikovaný pri génovej terapii a umožňuje pacientom žiť funkčný život. Medzi najčastejšie liečebné postupy patrí transplantácia hematopoetických kmeňových buniek, pri ktorej je dôležitý výber vhodného darcu na základe zhody HLA systému. Napriek tomu, že transplantácia patrí medzi zdĺhavejšie liečebné postupy, má priaznivú úspešnosť liečby. Terapia prostredníctvom PEG-ADA patrí medzi liečebné možnosti pre pacientov s deficitom ADA (ADA-SCID). Táto terapia je celoživotnou liečbou, pretože pacienti sú povinní si dávkovať injekcie s enzýmom adenosín deamináza 1-2x týždenne.

POUŽITÁ LITERATÚRA

BARTUŇKOVÁ, Jiřina, Anna ŠEDIVÁ a Aleš JANDA. *Imodeficiencie*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1980-1.

BARTUŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN ISBN978-80-247-3533-7.

BERAN, Jiří a Jiří HAVLÍK. *Lexikon očkování*. Praha: Maxdorf, c2008, 27. Jessenius. ISBN 978-80-7345-164-6.

BLACK, Roy A., Charles T. RAUCH, Carl J. KOZLOSKY, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* [online]. 1997, 385: 729-733 [cit. 2020-05-11]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/385729a0>.

BOJTÁROVÁ, Eva. *Transplantácia krvotvorných buniek* [online]. 2012 [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: http://www.ebmt.sk/wp-content/uploads/2013/03/transplantacna_brozura.pdf.

BÖHMER, Daniel, Ľuboš DANIŠOVI a Vanda REPISKÁ. *Lekárska biológia a genetika 1*. Bratislava: Univerzita Komenského Bratislava, 2015. ISBN 978-80-7167-161-9.

BUC, Milan. *Základná a klinická imunológia*. Veda, 2012. ISBN 978-802-2412- 353.

CHALUPOVÁ-KARLOVSKÁ, Vlastimila. *Obecná biologie: Evoluce, biologie buňky, genetika*. 2. opravené vydání. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2010, 124. ISBN 978-80-7182-282-0.

CETKOVSKÝ, Petr. *Intenzivní péče v hematologii*. Praha: Galén, c2004. ISBN 80-726-2255-2.

COICO, R. J.; SUNSHINE, G.; BENJAMINI, E. *Immunology a short course*. 4th ed., New York: John Wiley & Sons, 2000. ISBN 0-471-34890-2.

ČIŽNÁR, Peter. *Primárne imunodeficiencie a pohľad do činnosti imunitného systému* [online]. 2008, 4:192-197 [cit. 2020-03-25]. Dostupné z: <http://www.solen.sk/pdf/fe6afb691040a8bbc0a8640b1d421a42.pdf>

ČIŽNÁR, Peter a Júlia HORÁKOVÁ. Novorodenecký skrining primárnych imunodeficiencií. *Pediatrica pre prax* [online]. 2014, 15(2): 52-56 [cit. 2020-06-26]. Dostupné z: <http://www.solen.sk/pdf/07415f7902a22493bca79025cd029343.pdf>

DEMITROVIČOVÁ, Ludmila a Eva MIKUŠKOVÁ. *Onkohematologické repetitórium: Patogenéza chronickej lymfocytovej leukémie*, [online]. 2014, 9(2): 94-99 [cit. 2020-06-24]. Dostupné z: http://www.onkologiapreprax.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=7146&magazine_id=10

DUAN, Min-Chao, Xiao-Ning ZHONG, Guang-Nan LIU a Jin-Ru WEI. *Journal of Immunology Research: The Treg/Th17 Paradigm in Lung Cancer* [online]. 2014 [cit. 2020-03-11]. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2014/730380/>

DOBROTOVÁ, Miroslava a Peter KUBISZ. *Hematológia a transfuziológia: učebnica*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-809-0000-0.

DORSEY, Morna a Jennifer PUCK. *Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in the US: Current Status and Approach to Management* [online]. 2017, 3(2): 15 [cit. 2020-04-21]. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2409-515X/3/2/15/html#B16-neonatalscreening-03-00015>

EMBL-EBI. *Guided example 1: ZAP70 as a potential target for immunosuppressive therapy* [online]. In: . 2020 [cit. 2020-06-26]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/bioinformatics-terrified/bioinformatics-experimental-science/types-bioinformatics-2>

FERENČÍK, Miroslav. *Imunitní systém: informace pro každého*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-1196-6.

GATHMANN, B., N. BINDER, S. EHL a G. KINDLE. *The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: update 2011* [online]. 2012, **167**(3:, 479–491 [cit. 2020-06-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3374280/>.

GENETICS HOME REFERENCE. *Adenosine deaminase deficiency* [online]. 2013 [cit. 2020-04-07]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/adenosine-deaminase-deficiency#statistics>.

GENETICS HOME REFERENCE. *ZAP70-related severe combined immunodeficiency* [online]. 2015 [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/zap70-related-severe-combined-immunodeficiency#genes>.

GENETICS HOME REFERENCE. *X-linked SCID* [online]. 2016 [cit. 2020-04-14]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/x-linked-severe-combined-immunodeficiency#inheritance>.

GENETICS HOME REFERENCE. *Omenn syndrome* [online]. 2017 [cit. 2020-04-10]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/omenn-syndrome>.

GENETICS HOME REFERENCE. *JAK3-deficient severe combined immunodeficiency* [online]. 2017 [cit. 2020-04-17]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/jak3-deficient-severe-combined-immunodeficiency#genes>.

GENETICS HOME REFERENCE. *DCLRE1C gene* [online]. 2020 [cit. 2020-04-10]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/DCLRE1C#normalfunction>.

HARRACHOVÁ, D., K. NIKLOVÁ, M. SKRAKOVÁ, M. MISTRÍK a BÁTOROVÁ. *Význam multiparametrovej prietokovej cytometrie pre diagnostiku a efekt liečby* [online]. In: . 2017 [cit. 2020-06-26]. Dostupné z: http://myelom.sk/uploads/02_Odborn%C3%A1%20sekcia/04_Myel%C3%B3mov%C3%A9%20f%C3%B3rum/2_Harrachova13_05_2017.pdf.

HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 2. vyd. Praha: Triton, 2002. ISBN 80-725-4215-X.

HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 3. vyd. Praha: Triton, 2005. ISBN 80-7254-686-4.

HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009. ISBN 978-80-7387-280-9.

IPOPI. *HYPER IGM SYNDRÓM* [online]. 2007, 5-10, [cit. 2020-03-18]. Dostupné z: https://www.imunodeficit.sk/data/page/imunodeficit.sk/6190/web_hyperigmsyndrome_eslovaco.pdf.

IPOPI. *Ťažká kombinovaná imunodeficiencia* [online]. 2007, 5-15 [cit. 2020-03-28]. Dostupné z: https://www.imunodeficit.sk/data/news_files/imunodeficit.sk/8985/t-az-ka-kombinovana-imunodeficiencia.pdf.

IPOPI. *X-viazaná agamaglobulinémia* [online]. 2007, 5-9 [cit. 2020-03-19]. Dostupné z: https://www.imunodeficit.sk/data/page/imunodeficit.sk/6190/web_x-linkedagammaglobulinemia_eslovaco.pdf.

IPOPI. *Primárne imunodeficiencie: Očkovanie a primárne imunodeficiencie*, 1.vydanie, [online]. 2013, 3-11 [cit. 2020-03-12]. Dostupné z: https://ipopi.org/wp-content/uploads/2018/11/WEB_IPOPI_Vaccines_ESLOVACO.pdf.

JESEŇÁK Miloš, Zuzana RENNEROVÁ a Peter BÁNOVČIN. *Pediatrica: Primárne poruchy imunity v detskom veku-8. časť: Kombinované a bunkové imunodeficiencie* [online]. 2010, 5(5): 214-251, [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: <https://www.amed.sk/primarne-poruchy-imunity-v-detskom-veku-5-cast-kombinovane-t-a-b-bunkove-imunodeficiencie-a5080,5080,2.html>.

KAUFMANN, KB, H BÜNING, A SCHAMBACH, A GALY a M GREZ. *Gene therapy on the move*. [online].2013, 5(11):1642-1661 [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24106209>.

KEHRY, M., S. EWALD, R. DOUGLAS, C. SIBLEY, W. RASCHKE, L. HOOD a D. FRAMBROURG. *The immunoglobulin μ chains of membrane-bound and secreted IgM molecules differ in their C-terminal segments* [online]. 1980; 393-406 [cit. 2020-05-13]. Dostupné z: [https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(80\)90476-6.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867480904766%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(80)90476-6.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867480904766%3Fshowall%3Dtrue).

KIMBERLEY, Fiona C. a Gavin R. SCREATON. *Following a TRAIL: Update on a ligand and its five receptors* [online]. 14: 359–372, 2004 [cit. 2020-05-11]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/7290236>.

KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.

KOVACS, J.A, V.J GILL, S. MESHNICK a H. New insights into transmission, diagnosis, and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. [online]. 286(19): 2450-2460, 2001 [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11712941>.

KREJSEK, J., P. KUNEŠ, C. ANDRÝS, M. HOLICKÁ, J. NOVOSAD, M. KUDLOVÁ a M. KOLÁČKOVÁ. *Přirozená imunita, receptory pro exogenní a endogenní nebezpečné vzory v imunopatogenezi aterosklerózy: Receptory TLR, význam polymorfizmu receptorů pro nebezpečné vzory* [online]. 144(12): 777-864, 2005 [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: prolekare.cz/casopisy/casopis-lekaru-ceskych/2005-12/download?hl=cs.

KYSELOVIČ, Ján. FARMAKOLÓGIA: Európska lieková agentúra odporúča na schválenie novú génovú terapiu pre deti s ultra vzácnou poruchou imunitného systému-STRIMVELIS. *Medikom* [online]. Bratislava, 2016(2), 50 [cit. 2020-04-23]. ISSN 1338-340X. Dostupné z: https://lekom.sk/upload/medikom/2016/2_2016_MEDIKOM.pdf.

LAB TESTS,. *Co je novorozenecký screening* [online]. 2016 [cit. 2020-04-21]. Dostupné z: <https://www.labtestsonline.cz/screening-novorozencu.html>.

LADICKÁ, Miriam. *Transplantácia krvotvorných buniek a praktický lekár* [online]. 2007, 4 (7/8): 344–347 [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <http://www.solen.sk/pdf/04126e179103faf64a39f0aa1d4a9254.pdf>.

LYSINOVÁ, Miroslava, Mária KNAPKOVÁ, Svetozár DLUHOLUCKÝ a Karol KRÁLINSKÝ. *Pediatrica pre prax: Novorodenecký skrining v súčasnosti* [online]. 2015, 16(5): 188-191 [cit. 2020-04-21]. Dostupné z: <http://www.solen.sk/pdf/24a35a080089142cecf57d6db1358c1c.pdf>.

MASSOUD, Ahmad a Nima REZAEI. *Immunology of Aging*. London: Springer, 2014. ISBN 978-3-642-39494-2.

MAYER, Gene. *IMMUNOLOGY - CHAPTER ONE: INNATE (NON-SPECIFIC) IMMUNITY* [online]. 2010 [cit. 2020-03-05]. Dostupné z: <https://www.microbiologybook.org/Slovak-immunol/slovak-imm1.htm>.

MAZZUCHELLI, Renata I., Agostino RIVA a Scott K. DURUMC. *The Human IL-7 Receptor Gene: Deletions, Polymorphisms and Mutations* [online]. 2012, 24(3): 225–230.[cit. 2020-04-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6326362/>.

MIKŠOVÁ, Zdeňka, Marie FRONKOVÁ a Marie ZAJÍČKOVÁ. *Kapitoly z ošetrovateľskej péče*. Aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2006. Sestra (Grada). ISBN 80-247-1443-4.

MOCIKAT, Ralph, Heidi BRAUMÜLLER, Alain GUMY, et al. *Natural Killer Cells Activated by MHC Class I Low Targets Prime Dendritic Cells to Induce Protective CD8 T Cell Responses* [online]. 2003, 19(4): 561-569 [cit. 2020-03-10]. Dostupné z: [https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613\(03\)00264-4?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761303002644%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(03)00264-4?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761303002644%3Fshowall%3Dtrue).

MOCKOVÁ, Alice. *Ovlivnění vývoje imunity v prenatálním a perinatálním období* [online]. 2014, 15(4), 197-200 [cit. 2020-03-11]. Dostupné z: https://www.pediatricpropraxi.cz/artkey/ped-201404-0004_Ovlivneni_vyvoje_imunity_v_prenatalnim_a_perinatalnim_obdobi.php.

MOGHTADERI, Mozghan, Sara **KASHEF** a Nima **REZAEI**. *Interstitial Lung Disease in a Patient with Chronic Granulomatous Disease* [online]. 2012, 22(1): 129-133 [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3448230/>.

MOISE, **NEDELCU**, **TOADER**, **SORA**, **TICA**, **FERASTRAOARU** a **CONSTANTINESCU**. *Primary immunodeficiencies of the B Lymphocyte* [online]. 2010, 3(1):60-63 [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3019034/>.

MORETTA, Lorenzo, Cristina **BOTTINO**, Daniela **PENDE**, Maria Cristina **MINGARI**, Roberto **BIASSONI** a Alessandro **MORETTA**. *Human natural killer cells: their origin, receptors and function*. [online]. 2002, 32(5):1205-1211 [cit. 2020-03-10]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1521-4141%28200205%2932%3A5%3C1205%3A%3AAID-IMMU1205%3E3.0.CO%3B2-Y?sid=nlm%3Apubmed>.

NIH. Severe Combined Immunodeficiency (SCID) [online]. 2019 [cit. 2020-04-02]. Dostupné z: <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/severe-combined-immunodeficiency-scid>.

PENKA, Miroslav, **TESAŘOVÁ**, Eva. Hematologie a transfuzní lékařství. Praha: Grada, 2012, 192 s. ISBN 9788024734606.

RAMAMOORTH, Murali a Aparna **NARVEKAR**. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *Journal of Clinical & Diagnostic Research* [online]. 9(1), 2015 [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4347098/>.

ROSEN, Yale. *Pneumocystis jiroveci infection* [online]. In: . 2009 [cit. 2020-06-26]. Dostupné z: https://www.flickr.com/photos/pulmonary_pathology/3833203709/in/photostream/.

RUBANYI, GM. *The future of human gene therapy.* [online]. 22(3):113-42, 2001 [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470139>.

SALZER, Ulrich, Klaus WARNATZ a Hans Hartmut PETER. *Common variable immunodeficiency - an update: Arthritis Res Ther,* [online]. **14**, 223, 2012 [cit. 2020-03-19]. Dostupné z: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar4032>.

SCOTT, Gina B, Erika A DE WYNTER a Graham P COOK. *Detecting variable (V), diversity (D) and joining (J) gene segment recombination using a two-colour fluorescence system: Mobile DNA* [online]. **1**, 9 2010 [cit. 2020-03-08]. Dostupné z: <https://mobilejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1759-8753-1-9>.

© **SELECTSCIENCE.** *XE-5000 Hematology Analyzer by Sysmex* [online]. In: . 2020 [cit. 2020-06-26]. Dostupné z: <https://www.selectscience.net/products/xe-5000-hematology-analyzer/?prodID=113286>.

SEVS. *Prečo očkovať?* [online]. 2009 [cit. 2020-02-25]. Dostupné z: <http://www.ockovanieinfo.sk/sekcia-sk-16-Preo-okova>.

SKŘIČKOVÁ, Jana. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 19(2): 79-81,2005 [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/magno/far/2005/mn2.php>.

STITES, Daniel P. a Abba I. TERR. *Základní a klinická imunologie.* 4. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1994. ISBN 80-856-0537-6.

VAN DER BURG, Mirjam, Nizar MAHLAOUI a Sung-Yun PAI. *Universal Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency (SCID)* .*Front Pediatr.* [online]. ;7:3732019 [cit. 2020-04-21]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6759820/>.

WINKELSTEIN, J. A.; ACKERMAN, G. *Patient & Family Handbook for Primary Immunodeficiency Diseases.* 4th ed., USA: Immune Deficiency Foundation, 2007. ISBN 800-296-4433.

ZIKHERMAN, Julie, Kristin DOAN,, Ramya PARAMESWARAN, William RASCHKE a Arthur WEISS. *Quantitative differences in CD45 expression unmask functions for CD45 in B-cell development, tolerance, and survival* [online]. 109 (1), 2012 [cit. 2020-06-22]. Dostupné z: <https://www.pnas.org/content/109/1/E3>.