

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXVI
2 0 0 6
SUPPLEMENT 6**

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Tomasz Smiatacz

**ANALIZA PRZYDATNOŚCI BADANIA
SUBPOPULACJI LIMFOCYTÓW KRWI OBWODOWEJ
I PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO
W DIAGNOSTYCE CHOROÓB ZAKAŻNYCH**

*Peripheral blood and cerebrospinal fluid
lymphocyte subsets analysis –
a new diagnostic tool in infectious diseases*

Rozprawa habilitacyjna

Klinika Chorób Zakaźnych
Akademii Medycznej w Gdańsku

p.o. kierownika: dr med. Hanna Trocha

GDAŃSK 2006

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

REDAKTOR NACZELNY
PRESIDENT OF THE EDITORIAL BOARD
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
Z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Marek Latoszek
sekretarz redakcji – dr Włodzimierz Kuta,
prof. dr Andrzej Hellmann, prof. dr Józef Jordan, prof. AMG,
mgr Józefa de Laval, prof. dr Jerzy Łukasiak,
prof. dr Zbigniew Machaliński, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,
80-210 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@amg.gda.pl

Artykuły opublikowane w Annales AMG
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published In Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Akademia Medyczna w Gdańsku

Podziękowania

Pierwsze podziękowanie kieruję do śp. Profesor Władysławy Zielińskiej: za inicjatywę wykonywania badań immunologicznych – nie tylko subpopulacji limfocytów i nie tylko u chorych na AIDS – za Jej ciekawość tego, co nieznanie; za umiejętność stawiania trudnych pytań, a także za praktyczne stworzenie pracowni cytometrii przepływowej.

Dr med. Hannie Trocha gorąco dziękuję za opiekę, pomoc, wsparcie, stworzenie warunków do realizacji pracy oraz krytyczny jej przegląd.

Mgr Barbarze Ołtuszewskiej serdecznie dziękuję za długie lata ciepłej i pracowitej, a czasem stresującej, współpracy.

Dziękuję dr. n. przyr. Mikołajowi Własiukowi, dr med. Irenie Bonin oraz mgr Elżbiecie Wójcickiej – kierującym kolejno Zakładem Diagnostyki Laboratoryjnej Wojewódzkiego Szpitala Zakaźnego w Gdańsku – za lekcje pokory w laboratorium, cierpliwość i życzliwe wsparcie mojej aktywności cytometrycznej.

Panu Profesorowi dr. hab. med. Walentemu Nyce dziękuję za udostępnienie części próbek krwi od pacjentów ze stwardnieniem rozsianym i udarem niedokrwinnym, dzięki czemu możliwe było przeprowadzenie pełnej analizy porównawczej u chorych z zakażeniami ośrodkowego układu nerwowego.

Dr. med. Krzysztofowi Lewandowskiemu – dziękuję za wieloletnią współpracę i niezawodną pomoc w trudnych chwilach technicznych awarii cytometru.

Na koniec – dziękuję Przyjaciołom z Kliniki Chorób Zakaźnych i Wojewódzkiego Szpitala Zakaźnego w Gdańsku – licznym, choć niewymienionym tu z imienia – za ich wiedzę, doświadczenie i trud rzetelnego prowadzenia chorych; za udostępnienie zbieranych informacji oraz pomoc w wykonywaniu badań i przeprowadzeniu całości pracy.

Wszystkim Państwu serdecznie DZIĘKUJĘ!

Spis treści

1. Wykaz używanych skrótów.....	9
2. Wstęp	11
3. Cele pracy	29
4. Materiał i metody.....	30
4.1. Krytyczne uwagi dotyczące metodologii badania	35
5. Wyniki.....	37
5.1. Ocena subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej.....	37
5.1.1. Osoby zdrowe.....	37
5.1.2. Ostre choroby zakaźne o etiologii bakteryjnej	41
5.1.3. Ostre choroby zakaźne o etiologii wirusowej.....	46
5.1.4. Przewlekłe choroby zakaźne o etiologii wirusowej – przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby.....	48
5.1.5. Zakażenia wywołane wirusami <i>Herpes</i>	51
5.1.6. Zakażenie HIV – faza ostra (ostra choroba retrowirusowa).....	55
5.1.7. Zakażenie HIV – faza przewlekła; historia naturalna.....	62
5.1.8. Infekcje oportunistyczne i inne jednostki chorobowe występujące w przebiegu zakażenia HIV	72
5.1.9. Wpływ terapii antyretrowirusowej na liczbę limfocytów T CD4 ⁺ we krwi obwodowej u pacjentów zakażonych HIV	75
5.1.10. Wpływ współistniejących zakażeń wirusowych na liczbę limfocytów T CD4 ⁺ we krwi obwodowej u osób zakażonych HIV.....	80
5.1.11. Choroby zakaźne ośrodkowego układu nerwowego	85
5.2. Choroby zakaźne ośrodkowego układu nerwowego – wyniki badań płynu mózgowo-rdzeniowego	91
5.3. Podsumowanie wyników.....	94
6. Dyskusja.....	100
6.1. Osoby zdrowe – zakres normy	100
6.2. Ostre choroby zakaźne o etiologii bakteryjnej	101
6.3. Ostre choroby zakaźne o etiologii wirusowej.....	103

6.4. Przewlekłe choroby zakaźne o etiologii wirusowej – przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby	104
6.5. Zakażenia wywołane wirusami <i>Herpes</i>	106
6.6. Zakażenie HIV	110
6.6.1. Ostra choroba retrowirusowa	110
6.6.2. Historia naturalna zakażenia HIV	113
6.6.3. Infekcje oportunistyczne	116
6.6.4. Wpływ terapii antyretrowirusowej na liczbę limfocytów T CD4 ⁺	118
6.6.5. Wpływ współistniejących zakażeń wirusowych na liczbę limfocytów T CD4 ⁺	121
6.7. Choroby zakaźne ośrodkowego układu nerwowego	123
6.8. Choroby zakaźne ośrodkowego układu nerwowego – wyniki badań płynu mózgowo-rdzeniowego	126
7. Wnioski	128
8. Streszczenie	130
9. Summary	132
10. Wykaz cytowanego piśmiennictwa:.....	134
11. Aneks 1 – pozostałe wyniki badań	153
12. Aneks 2 – tłumaczenie wyrażeń i skrótów używanych na rycinach	168

1. Wykaz używanych skrótów

AIDS	– zespół nabytych niedoborów odpornościowych – <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AIH	– autoimmunologiczne zapalenie wątroby – <i>AutoImmune Hepatitis</i>
AMG	– Akademia Medyczna w Gdańsku
APOBEC	– <i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme complex</i>
BD	– Becton Dickinson
CDC	– <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CMV	– wirus cytomegalii
CTLA-4	– 4 antygen związany z cytotoksycznością limfocytów T – <i>Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4</i>
Δ32CCR5	– delecja w pozycji 32 genu kodującego receptor CCR5
EBV	– wirus Epstein-Barr
FITC	– izotiocyanian fluoresceiny
HAART	– terapia antyretrowirusowa
HAV	– wirus zapalenia wątroby typu A
HBV	– wirus zapalenia wątroby typu B
HCV	– wirus zapalenia wątroby typu C
HIV	– ludzki wirus niedoboru odporności – <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HSV	– wirus opryszczki zwykłej/pospolitej
ICOS	– <i>inducible costimulatory molecule</i>
IFN	– interferon
IL	– interleukina
IVDA	– osoba/osoby stosujące narkotyki dożylnie – <i>IntraVenous Drug Abusers</i>
JC	– wirus <i>Papova</i> , nazwa pochodzi od inicjałów pacjenta
MAC	– <i>Mycobacterium Avium Complex</i> – prątki atypowe, ptasie
MHC	– antygeny zgodności tkankowej
NK	– komórki NK, „naturalni zabójcy”
NPV	– wartość predykcji wyników ujemnych – <i>Negative Predictive Value</i>
n.s.	– różnica nieznamienista statystycznie
OCR	– ostra choroba retrowirusowa
OWZM	– ostre wirusowe zapalenie mózgu
PCP	– pneumocystozowe zapalenie płuc
OR	– iloraz szans – <i>Odds Ratio</i>
PE	– fikoerytryna
PerCP	– <i>Peridinin Chlorophyll Protein</i>
PML	– postępująca wieloogniskowa leukoencefalopatia
PMR	– płyn mózgowo-rdzeniowy
PPV	– wartość predykcji wyników dodatnich – <i>Positive Predictive Value</i>
SAP	– białko związane ze SLAM – <i>SLAM-Associated Proteine</i>
SARS	– ostry zespół ciężkiej niewydolności oddechowej – <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
SARS-CoV	– wirus SARS (<i>Coronaviridae</i>)

SD	– odchylenie standardowe
siRNA	– małe interferujące/inhibitorowe RNA
SLAM	– powierzchniowy marker aktywacji limfocytów – <i>Surface Lymphocyte Activation Marker</i>
SM	– stwardnienie rozsiane
SSPE	– podostre stwardniające zapalenie mózgu
TBC	– gruźlica
TCR	– receptor limfocytów T – <i>T-Cell Receptor</i>
TNF	– Kachektyna – <i>Tumor Necrosis Factor</i>
Treg	– limfocyty T regulatorowe o fenotypie CD4 ⁺ CD25 ⁺
WZW	– wirusowe zapalenie wątroby

2. Wstęp

Istotą działu medycyny zwanego chorobami zakaźnymi jest interakcja pomiędzy drobnoustrojem chorobotwórczym, układem odpornościowym człowieka i otaczającym je środowiskiem.

W ostatnich dziesięcioleciach obserwuje się, przede wszystkim w krajach wysoko rozwiniętych, wyraźną poprawę w zakresie epidemiologii **chorób zakaźnych**. Odnotowywany jest systematyczny spadek liczby zachorowań na większość chorób zakaźnych, takich jak zatrucia pokarmowe, czerwotka, dur brzuszny, cholera, wirusowe zapalenia wątroby, gruźlica (TBC), tężec, błonica, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu, wścieklizna, dżuma, grypa, odra, polio, świnka i inne. Poprawa sytuacji epidemiologicznej jest wynikiem m.in. powszechnie dostępnych swoistych szczepień ochronnych, ale także szeroko zakrojonych nieswoistych działań profilaktycznych w zakresie edukacji, poprawy warunków higieny osobistej i komunalnej, nadzoru sanitarnego nad otaczającym nas środowiskiem, a w szczególności nad wytwarzaniem i dystrybucją żywności i wody. Osiągnięcia te są jednoznacznymi sukcesami w ograniczaniu szerzenia się chorób zakaźnych.

Z drugiej strony - w tym samym okresie odkryto kilkadziesiąt nowych patogenów człowieka, takich jak ludzki wirus niedoboru odporności (HIV), SARS-CoV, wirus zapalenia wątroby typu C (HCV), *Helicobacter pylori* czy priony. Liczba osób zakażonych niektórymi z nowo odkrytych drobnoustrojów, takimi jak HIV i HCV, systematycznie wzrasta pomimo intensywnych działań badawczych i profilaktycznych. Inne mikroorganizmy, łącząc w sobie takie cechy jak łatwość przenoszenia się drogą kropelkową i wysoką śmiertelność wywoływanych przez nie chorób, stworzyły znaczące zagrożenia epidemiczne, czego przykładem może być epidemia SARS [60, 143]. Z kolei ospa prawdziwa stała się zagrożeniem powracającym, wprowadzając jak dotąd tylko potencjalnym, jednak niosącym w sobie realne ryzyko śmierci dla ponad 2 miliardów ludzi.

Stosunkowo nową jakością w chorobach zakaźnych są zakażenia oportunistyczne i wewnątrzszpitalne, nabierające coraz większego znaczenia w patologii człowieka. Sprzyja temu dokonujący się szybki rozwój nowoczesnej medycyny, związany ze wzrostem inwazyjności metod diagnostycznych i terapeutycznych, co nieuchronnie prowadzi do naruszania ciągłości skóry i błon śluzowych pacjenta. Wiąże się to także ze zwiększoną ekspozycją klinicysty na bezpośredni kontakt z tkankami i płynami ustrojowymi chorego. Ponadto coraz powszechniej w terapii wykorzystywane są różne formy immunosupresji, stosowanej obecnie już nie tylko w ramach procedur wysokospecjalistycznych, ale także przez lekarzy pierwszego kontaktu. Są to okoliczności sprzyjające występowaniu zakażeń drobnoustrojami o stosunkowo niskiej patogenności.

W ostatnich kilkudziesięciu latach opracowano i wprowadzono do rutynowej diagnostyki klinicznej wiele nowoczesnych metod z zakresu mikrobiologii, serologii czy biologii molekularnej. To dzięki nim było możliwe między innymi wykrycie większości nowych drobnoustrojów, znaczący postęp w pojmowaniu etiopatogenezy znanych od dawna chorób zakaźnych, a pośrednio także sukcesy w ich profilaktyce i leczeniu. Jednak skutkiem ubocznym tak znaczących sukcesów w dziedzinie epidemiologii było stopniowe zmniejszanie się zainteresowania badaczy zagadnieniami związanymi z patogenizacją chorób zakaźnych i ich wpływem na układ odpornościowy człowieka. Nie miały one priorytetu w zakresie finansowania. Jedynym wyjątkiem były badania prowadzone

głównie w USA i związane z nowopojawiającymi się zagrożeniami biologicznymi, takimi jak gorączki krwotoczne, HCV, HIV czy SARS.

Ilustracją braku zainteresowania badaniami nad wzajemnymi relacjami pomiędzy chorobami zakaźnymi a układem odpornościowym może być analiza bazy literaturowej Medline zawarta w tabeli 1. Przedstawia ona liczbę publikacji na temat poszczególnych chorób zakaźnych i innych stanów chorobowych, w połączeniu z hasłem „subpopulacje limfocytów” i obrazuje stan z sierpnia 2006 r. Hasło „subpopulacje limfocytów” odnosi się do jednego z najprostszych badań układu immunologicznego. Jak widać schorzenia niezakaźne, takie jak: nowotwór, stwardnienie rozsiane (SM), schorzenia autoimmunologiczne, zapalenie stawów (reumatyczne) budzą w tym względzie większe zainteresowanie badaczy niż klasyczne choroby infekcyjne. Ponadto część doniesień ma bardzo luźny związek z przebiegiem klinicznym choroby i dotyczy np. badań wirusologicznych *in vitro* lub eksperymentów na zwierzętach. Ilościowym wyjątkiem są jedynie prace dotyczące zakażenia HIV, co jest o tyle zrozumiałe, że wirus ten obrał sobie za cel ataku właśnie układ odpornościowy i wciąż, pomimo ogromnych nakładów finansowych i logistycznych skierowanych na opanowanie pandemii HIV/AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*), stanowi narastające zagrożenie. Tak niewielka liczba pozostałych publikacji budzi zdziwienie, gdyż to właśnie choroby zakaźne stanowią naturalny bodziec uruchamiający działanie układu odpornościowego.

W okresie dającym się ogarnąć pamięcią jednego pokolenia, w wyniku nakładania się na siebie wielu równoległych i różnokierunkowych procesów - choroby zakaźne wyraźnie zmieniły swój charakter, znalazły sobie nowe nisze i ekosystemy lub czasowo wycofały się poza obrzeża świata dostatniego, rozwiniętego i uporządkowanego. Błędem byłoby jednak niedostrzeganie związanych z nimi zagrożeń, zarówno nowych jak i powracających, a przede wszystkim błędne byłoby zaniechanie dalszych prac nad epidemiologią, etiopatogenezą, profilaktyką czy leczeniem chorób zakaźnych – tym bardziej, że wciąż otrzymujemy do dyspozycji nowe metody badawcze w tym zakresie.

Klasycznym przykładem takiego błędu popełnionego w odniesieniu do profilaktyki było porzucenie w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku jakichkolwiek prac nad unowocześnianiem szczepionki przeciwko ospie prawdziwej, jeszcze przed ogłoszeniem aktu eradykacji tej jednostki chorobowej. Spowodowało to obecnie poważne zagrożenie związane z koniecznością przeprowadzenia szczepień przeciwko tej chorobie, które nadal wykonuje się metodą skaryfikacji, niemal identycznie jak w wieku XVIII, przy użyciu szczepionki wyprodukowanej jeszcze w latach pięćdziesiątych i zawierającej oczyszczoną, liofilizowaną wydzielinę z wykwitów chorobowych sztucznie wywołanych u krów. Szczepienia te, mimo iż związane z zagrożeniem dla zdrowia i życia osób podlegających uodpornieniu i ich otoczenia, zostały wymuszone groźbą użycia wirusa ospy prawdziwej w działaniach bioterrorystycznych i związanego z nią widma powrotu pandemii tej choroby.

Tabela 1. Liczba publikacji odnotowanych w bazie Medline Pubmed, dotyczących poszczególnych haseł, łącznie z określeniem „subpopulacje limfocytów”; dotyczy badań u ludzi, sierpień 2006

Table 1. Number of publications found in Medline Pubmed database related to listed terms together with “lymphocyte subsets” phrase; human studies, August 2006

Hasło (łącznie z „ <i>lymphocyte subsets</i> ”)/ <i>Expression (together with “lymphocyte subsets”)</i>	Liczba publikacji/ <i>Number of articles</i>
Nowotwór / <i>Cancer</i>	2959
HIV/AIDS	1636
Choroby autoimmunologiczne / <i>Autoimmunity</i>	1109
Zapalenie stawów / <i>Arthritis</i>	638
Stwardnienie rozsiane / <i>Multiple sclerosis</i>	311
Gruźlica / <i>Tuberculosis</i>	301
Toczeń / <i>Lupus</i>	271
Posocznica / <i>Sepsis</i>	167
CMV	157
HCV	98
Grypa / <i>Influenza</i>	89
<i>Malaria</i>	84
Mononukleoz / <i>Mononucleosis</i>	71
Odra / <i>Measles</i>	69
HBV	66
Zapalenie mózgu / <i>Encephalitis</i>	43
Zapalenie opon / <i>Meningitis</i>	42
Ospa wietrzna / <i>Varicella</i>	41
Półpasiec / <i>Herpes zoster</i>	32
Borelioza / <i>Borreliosis</i>	25
Zawał serca / <i>Myocardial infarct</i>	13
Róża / <i>Erysipelas</i>	1
Wąglik / <i>Anthrax</i>	1
Zatrucie pokarmowe / <i>Food poisoning</i>	0
Angina / <i>Tonsillitis</i>	0

Z powyższych powodów przedmiotem niniejszego opracowania stała się interakcja pomiędzy różnorodnymi czynnikami etiologicznymi chorób zakaźnych a układem odpornościowym człowieka, oceniana przy użyciu stosunkowo niedawno wprowadzonej metody badawczej, jaką jest cytometria przepływowa.

Wzajemne oddziaływanie na siebie mikro- i makroorganizmu może mieć bardzo różny przebieg – od komensalizmu, poprzez bezobjawowe kolonizacje, aż do pasożytnictwa i ciężkiej patologii. Podstawowym czynnikiem determinującym przebieg takiej interakcji jest rodzaj drobnoustroju chorobotwórczego. Patogeny, jak i jednostki chorobowe przez nie wywoływane, podlegają wielu różnorodnym klasyfikacjom i podziałom, z których każdy obrazuje inne ich cechy charakterystyczne.

Rutynowo choroby zakaźne, w zależności od rodzaju wywołującego je czynnika etiologicznego, są klasyfikowane na:

- bakteryjne,
- wirusowe,
- grzybicze,
- wywołane przez riketsje, chlamydie i priony,
- inwazje pasożytnicze.

Każda z wymienionych grup mikroorganizmów podlega dalszym klasyfikacjom i podziałom, cechuje się inną budową i odmiennymi cyklami życiowymi, a ponadto wykorzystuje odrębne mechanizmy patogenetyczne w procesie wnikania do organizmu ludzkiego i namnażania się w nim. Tematyka ta stanowi domenę mikrobiologii [115, 165].

Ponadto wszelkie jednostki chorobowe są tradycyjnie dzielone na ostre i przewlekłe – w zależności od patomechanizmu i czasu trwania wspomnianej powyżej interakcji.

Z epidemiologicznego punktu widzenia można podzielić choroby zakaźne, w zależności od drogi wnikania do organizmu człowieka, na zakażenia przenoszone:

- drogą powietrzno-kropelkową
- drogą pokarmową
- poprzez przedmioty codziennego użytku, owady, glebę itd.
- drogą płciową
- poprzez krew i płyny ustrojowe
- łożyskową i okołoporodową
- poprzez kontakt bezpośredni, np. badanie lekarskie itd. [116].

Nieco zbliżony do poprzedniego jest podział wykorzystujący jako podstawę klasyfikacji lokalizację anatomiczną kluczowych objawów i głównych procesów patogenetycznych zakażenia. Wyróżnia się w ten sposób zakażenia:

- skóry (róża, węglik)
- przewodu pokarmowego, w tym również wątroby (zatrucia pokarmowe, wirusowe zapalenia wątroby)
- układu oddechowego (zapalenia płuc, angina, grypa)
- układu nerwowego (zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu)
- układu moczowo-płciowego
- zakażenia uogólnione, wśród których szczególne miejsce zajmują zakażenia krwi, obejmujące również układ odpornościowy (posocznica, malaria, zakażenie HIV, odra).

Symptomatologia chorób zakaźnych również w dużej mierze zależy od lokalizacji anatomicznej patogenu: *Escherichia coli* obecna w przewodzie pokarmowym lub paciorkowiec na skórze nie wywołują objawów chorobowych, jednak wprowadzone do krwi lub płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR) stanowią zagrożenie dla życia chorego.

Wszelkie drobnoustroje wnikając do wnętrza organizmu ludzkiego muszą pokonać wielorakie bariery związane z opornością i odpornością na zakażenia. Dokonują tego z różną skutecznością i za pomocą różnorodnych mechanizmów, jak enzymy, otoczki bakteryjne, rzęski i fimbrie, egzo- i endotoksyny etc. [115, 165]. Zdolność mikroorganizmów do zakażenia przedstawicieli gatunku *Homo sapiens* jest wyrażana tzw. wskaźnikiem podatności i pozwala podzielić patogeny, w zależności od ich zdolności do pokonywania barier odpornościowych, na:

- drobnoustroje wysoko zakaźne, z łatwością wywołujące zachorowania epidemiczne, do których zaliczamy czynniki etiologiczne odpowiedzialne za występowanie chorób „kwarantannowych”, takich jak ospa prawdziwa, dżuma, cholera i dur brzuszny, ale także typowe schorzenia wieku dziecięcego – np. różyczka i ospa wietrzna,
- patogeny umiarkowanie zakaźne, szerzące się w formie epidemicznej jedynie w sprzyjających warunkach i będące czynnikami etiologicznymi większości typowych chorób zakaźnych (paciorkowce, *Salmonella*, wirusy zapalenia wątroby typu B (HBV), typu C (HCV)),
- drobnoustroje oportunistyczne, bezwarunkowo wykorzystujące w patogenizie stany upośledzenia odporności organizmu człowieka (*Pneumocystis carinii*, *Candida*) lub mechanicznego naruszenia ciągłości skóry i błon śluzowych, jak to się dzieje w zakażeniach szpitalnych (*Staphylococcus epidermidis*),
- mikroorganizmy niepatogenne wobec człowieka, dla których występuje naturalna oporność gatunku *Homo sapiens*, wynikająca m.in. z braku odpowiednich receptorów błonowych lub ochronnej aktywności enzymów (np. grupy APOBEC).

Symptomatologia chorób zakaźnych każdorazowo zawiera w sobie dwojakie, zazwyczaj przeplatające się ze sobą, elementy: wywołane bezpośrednio wniknięciem i namnażaniem się drobnoustroju (żółtaczka, biegunka, wykwity w miejscu wniknięcia, przeżenia w przebiegu tężca, zaburzenia widzenia i połykania w zatruciu jadem kiełbasianym) oraz znacznie częstsze objawy reakcji ustroju na zakażenie (gorączka, wysypki, miejscowy naciek zapalny, obrzęk, powiększenie węzłów chłonnych, wymioty, bóle o różnorodnej lokalizacji). W zależności od stopnia nasilenia objawów i zdolności danego patogenu do wywoływania procesów chorobowych można podzielić drobnoustroje na:

- silnie patogenne, w których objawy zakażenia i rozwijającej się reakcji zapalnej są jawne klinicznie i najczęściej znacznie nasilone, przebieg choroby bywa ciężki i może stanowić trwałe zagrożenie dla zdrowia, a nawet życia pacjenta (posocznica, ospa prawdziwa, zatrucie jadem kiełbasianym, tężec)
- mikroorganizmy o niskiej patogenności, wywołujące zakażenia podkliniczne lub bezobjawowe, a występujące w ich przebiegu nawet łagodne dolegliwości chorobowe należą do rzadkości (wirus cytomegalii (CMV), HBV, HCV, HIV) [56, 128, 265].

W praktyce klinicznej choroby zakaźne bardzo często wykraczają poza jednoznacznie określone linie podziałów i systematykę, łączą w sobie elementy wszystkich powyższych klasyfikacji i nierzadko stwarzają poważne trudności w tym względzie (np. zdefiniowanie pojęcia ostrego zakażenia HCV, czy klasyfikacja *Pneumocystis carinii*). Przytoczone powyżej podziały chorób zakaźnych odzwierciedlają odmienne aspekty wzajemnej interakcji pomiędzy drobnoustrojem a organizmem człowieka i w różnym stopniu zostały wykorzystane w niniejszym opracowaniu.

Układ odpornościowy człowieka wykształcił się w przebiegu rozwoju filogenetycznego kręgowców w niezwykle złożony strukturalnie i skomplikowany funkcjonalnie system. Jego zadaniem jest obrona integralności organizmu przed atakami ze strony wszelkiego rodzaju zewnętrznych drobnoustrojów i wewnętrznych komórek nowotworowych. Odbiciem różnorodności zagrożeń jest wielokierunkowość działania układu odpornościowego i precyzyjne, zarówno ilościowe i jakościowe, dopasowywanie aktual-

nie uruchamianych mechanizmów odpornościowych do rodzaju zagrożenia i stopnia jego nasilenia.

Fundamentalnym celem działania układu odpornościowego jest ochrona tkanek i komórek gospodarza, w tym również przed własnymi mediatorami reakcji zapalnej rozwijanej w odpowiedzi na zakażenie. Widoczne jest to w złożonych mechanizmach regulatorowych, a także w tendencji do samoograniczania się i wyhamowywania reakcji zapalnych. Podstawową umiejętnością układu odpornościowego jest również jego zdolność do szybkiego rozpoznawania zagrożeń, odróżniania ich od własnych prawidłowych komórek i tkanek. Natomiast zdolność do samodzielnego uczenia się warunkuje nieograniczony potencjał wytwarzania skutecznej odpowiedzi immunologicznej ściśle dopasowanej do wszelkiego typu zagrożeń, również tych nieokreślonych, które dopiero mogą pojawić się w przyszłości.

W prawidłowym funkcjonowaniu systemu odpornościowego, wśród bardzo wielu jego elementów, centralną rolę spełniają limfocyty. Są to komórki jednojądrzaste, wielkości od 6 do 15 μm , cechujące się mnogością receptorów powierzchniowych i praktycznie pozbawione zdolności do fagocytozy. W czasach, gdy autor niniejszego opracowania podjął studia medyczne na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Gdańsku (AMG) studenckie podręczniki medycyny dzieliły limfocyty na duże i małe. Wyróżniano komórki B, żyjące krótko i odpowiedzialne za reakcje humoralne oraz limfocyty T – żyjące długo i związane z odpornością komórkową; limfocytom przypisywano „zmienną witalność” i „małą ruchliwość” [201, 302].

Obecnie znanych jest kilkadziesiąt rodzajów i podtypów w obrębie różnych subpopulacji limfocytów, a wiedza na ten temat nieustannie rośnie. Daleko większe znaczenie od wielkości komórki przypisywane jest dziś markerom wykrywanym na jej powierzchni, wydzielanym przez nią cytokinom czy rodzajom mRNA produkowanego spontanicznie lub pod wpływem określonej stymulacji. Co więcej, pierwotne nazwy fenotypowe limfocytów, wywodzące się z ekspresji antygenów powierzchniowych, nie zawsze pokrywają się już z aktualnie przypisywaną im funkcją i wtórnym do niej nazewnictwem – przykładowo wiemy dziś, że np. funkcja cytotoksyczności czy supresji cechuje nie tylko limfocyty T o fenotypie CD8^+ (zwyczajowo określane jako *supressor/cytotoxic*), ale także CD4^+ (których funkcja pierwotnie opisywana była wyłącznie jako *helper/inducer*) [120, 145, 284].

Stosunkowo wcześniej poznano limfocyty posiadające na powierzchni marker CD19 i opisano ich rolę w działaniu układu odpornościowego. Komórki CD19^+ są zwyczajowo nazywane limfocytami B, a nazwa ta pochodzi od łacińskiego określenia *Bursa Fabricii* (torebka Fabrycjusza) – narządu występującego u ptaków i związanego z wytwarzaniem tych komórek. U ludzi limfocyty B powstają głównie w obwodowym układzie chłonnym. Ich funkcja polega na zdolności do przekształcania się w komórki plazmatyczne i produkcji różnych klas i podtypów przeciwciał (IgG , IgM , IgA , IgE , IgD), które następnie wiążą się ze ściśle określonym antygenem i w ten sposób inicjują kaskadę zdarzeń immunologicznych określanych mianem reakcji humoralnych. Funkcja limfocytów B podlega regulacji ze strony limfocytów T, jednak może również dokonywać się niezależnie od nich. Antygen CD19 odgrywa ważną rolę w regulacji proliferacji limfocytów B, łącząc się w kompleks z antygenami CD21 (receptor dla fragmentu 3d dopełniacza i wirusa Epstein-Barr (EBV)), CD81 i antygenami zgodności tkankowej klasy II. Zanika wraz z przekształceniem się limfocyta B w komórkę plazmatyczną. Zdolność limfocytów B do wytwarzania przeciwciał jest powszechnie wykorzystywana w profilaktyce czynnej (szczepienia), biernej (przetaczanie surowic odpornościowych) jak i w diagno-

stycie laboratoryjnej (badania serologiczne z użyciem przeciwciał monoklonalnych) [13, 22, 98, 176, 253, 275].

Wśród podstawowych subpopulacji limfocytów spotykanych we krwi obwodowej na szczególną uwagę zasługują komórki o fenotypie $CD3^+$, zwyczajowo nazywane limfocytami T od łacińskiej nazwy *Thymus-grasica*. Określenie to jest wynikiem wczesnych obserwacji sugerujących, że komórki te powstają w grasicy i w jakiś sposób pozostają od niej zależne również poza nią. Współczesne badania, dotyczące np. interleukiny 7 (IL-7), silnie stymulującej produkcję limfocytów $CD3^+$ w grasicy i będącej w swej istocie tymopoetyną (limfocytarnym odpowiednikiem erytropoetyny), wydają się potwierdzać te obserwacje [164].

Limfocyty T definiowane są między innymi właśnie poprzez ekspresję błonową antygeny $CD3$, zwanego również TCR (*T-cell receptor*). Jego podstawowa funkcja polega na przekazywaniu sygnałów w trakcie prezentacji antygeny. Stymulacja receptora $CD3$ prowadzi także do proliferacji tych komórek. Limfocyty T dzieli się na dwie linie fenotypowe komórek, w zależności od obecności na ich powierzchni antygenów $CD4$ lub $CD8$. We krwi obwodowej można wykazać również minimalną ilość komórek T o podwójnie dodatnim fenotypie - $CD4^+CD8^+$ - są to najprawdopodobniej komórki młode, które opuściły grasicę przed ostatecznym zakończeniem różnicowania się w kierunku jednej z dwu opcji, a ich ilość zazwyczaj nie przekracza 1% [238, 214].

Antygen $CD4$ wykrywany jest nie tylko na limfocytach, ale także na części monocytów. Jego rolą jest wiązanie się z antygenami zgodności tkankowej klasy II, np. w celu przekazania dodatkowych sygnałów w trakcie prezentacji antygeny. Wirus HIV wykorzystuje receptor $CD4$ do zakażenia i indukowania apoptozy w komórkach będących obiektem ataku. Limfocyty $CD4^+$ określane są zwyczajowo mianem „pomocniczych” i przypisywana jest im funkcja inicjowania i wzmacniania reakcji limfocytów B, choć obecnie wiadomo, że funkcjonalnie można wyróżnić wiele odmiennych podrodzajów limfocytów $CD4^+$, a niektóre mediują również reakcje cytotoksyczne, regulatorowe, a także warunkują powstawanie komórek pamięci immunologicznej [189].

Antygen $CD8$ również służy do przekazywania dodatkowych sygnałów, m.in. w procesie prezentacji obcych antygenów, z tym że łączy się on z antygenami zgodności tkankowej klasy I. Limfocytom T $CD8^+$ klasycznie przypisuje się reakcje cytotoksyczne oraz aktywność hamującą w odniesieniu do limfocytów B [189, 209, 290]. Komórki NK również wykazują niewielką ekspresję antygeny $CD8$, co może stanowić przyczynę błędów technicznych w ocenie liczby limfocytów T $CD8^+$.

Na powierzchni limfocytów T wykazać można obecność kilkudziesięciu różnych antygenów. Szczególne znaczenie mają cząsteczki przekazujące dodatkowe sygnały stymulujące (*costimulatory signals*). Jedną z nich jest antygen $CD28$, będący częścią adhezyjną, ligandem m.in. receptorów $CD80$ i $CD86$ obecnych na powierzchni limfocytów B, monocytów i komórek dendrytycznych. $CD28$ odgrywa istotną rolę w interakcji pomiędzy limfocytami T i B, biorąc udział w przekazywaniu sygnałów drogą równoległą do tej, w której uczestniczy $CD3$ [39, 44, 83, 85, 107, 286]. Stan aktywacji komórki wzmacnia ekspresję $CD28$. Limfocyty T $CD4^+CD28^-$ wykazują reakcję cytotoksyczności mediuwanej poprzez receptor $CD3$ i wytwarzają znaczne ilości interleukiny 2, interferonu gamma ($IFN-\gamma$) oraz TNF. Natomiast subpopulacja limfocytów T o fenotypie $CD4^+CD28^+$ nie wykazuje takiej aktywności. W obrębie limfocytów T $CD8^+$ również można wydzielić komórki $CD28^-$, będące najprawdopodobniej komórkami efektorowymi, oraz limfocyty $CD28^+$ cechujące się długotrwałą zdolnością do proliferacji [39, 83, 107, 286].

Drugą ważną grupę markerów powierzchniowych stanowi rodzina antygenów CD45, wykrywana, w różnym natężeniu, na wszystkich rodzajach krwinek białych - także na granulocytach i monocytach. Choć nie został jednoznacznie określony ligand wchodzący w wiązanie z nimi, to wiadomo dziś, że są one niezbędne do skutecznego przekazywania sygnałów za pośrednictwem innych receptorów. Pod względem diagnostycznym obecność antygenów CD45 wiąże się z podziałem limfocytów na „naiwne” (*naïve*) i komórki pamięci immunologicznej [96, 141, 182].

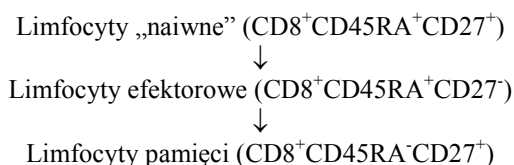
Odrębną, filogenetycznie starą i funkcjonalnie niezwykle ważną, grupę komórek stanowią „naturalni zabójcy”, czyli komórki NK. Fenotypowo definiowane są one poprzez obecność na ich powierzchni antygenów CD16 (receptor dla fragmentu Fc immunoglobulin G, mediujący cytotoksyczność zależną od przeciwciał) oraz CD56 (neuronalna cząstka adhezyjna), przy braku antygenu CD3. Rolę i znaczenie komórek NK – głównie w odporności przeciwnowotworowej i przeciwwirusowej – opisano stosunkowo niedawno. Działają one w prosty i niezwykle skuteczny sposób, poprzez nieomal automatyczne niszczenie wszelkich napotkanych komórek – stąd wzięło ich się barwne określenie. Jednak zdrowe komórki organizmu człowieka mogą skutecznie powstrzymać tę naturalną cytotoksyczność poprzez prezentację na swojej powierzchni prawidłowych antygenów zgodności tkankowej. Jeżeli z jakichś względów antygeny te nie są w pełni eksponowane na powierzchni komórki (transformacja nowotworowa, zakażenie wirusowe) wtedy atak ze strony komórek NK nie zostanie zablokowany i sprawnie zniszczą one napotkaną komórkę [98].

W opisie działania układu odpornościowego istotne znaczenie ma zjawisko prezentacji antygenów limfocytom T i B, które dokonuje się w bezpośrednim ich kontakcie z komórkami prezentującymi antygen, np. komórkami dendrytycznymi. Komórki te zlokalizowane są w obrębie węzłów chłonnych i śledziony, ale także płytko pod powierzchnią skóry i błon śluzowych, a także w innych tkankach i narządach. Mają zdolność migracji pomiędzy tkankami, narządami i kompartmentami (również w obrębie ośrodkowego układu nerwowego), a ponadto potrafią znacznie zmieniać swój kształt i strukturę. Są wyspecjalizowane w nawiązywaniu pierwszego kontaktu z obcym patogenem i temu zadaniu podporządkowana jest ich swoista budowa, odzwierciedlona nazwą. Napotkany patogen podlega wchłonięciu, przetwarzaniu, a ostatecznie zostaje zaprezentowany limfocytom tak, aby mogły one nauczyć się precyzyjnego rozpoznawania go, a następnie rozwinąć cały wachlarz zharmonizowanych reakcji odpornościowych. Istnieją również komórki prezentujące nieprzetworzone obce antygeny – w ten sposób dokonuje się sprawdzanie swoistości immunoglobulin wytwarzanych przez limfocyty B. Wszelkie reakcje odpornościowe – humoralne i komórkowe, naturalne (w przebiegu infekcji) i sztuczne (poszczepienne) na pierwszym swoim etapie wymagają udziału komórek dendrytycznych. Jeśli z jakichś względów etap ten nie będzie przebiegał prawidłowo – nie nastąpią żadne dalsze fazy reakcji odpornościowej. Komórki dendrytyczne trudno poddają się badaniom w warunkach klinicznych, gdyż nie występują w istotnych ilościach we krwi obwodowej, a zasadniczym miejscem ich bytowania są tkanki [133, 222, 242].

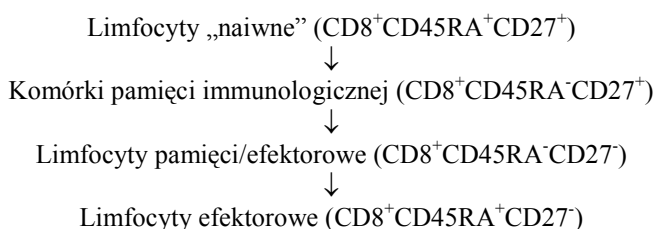
Limfocyty T, które uprzednio nie zetknęły się z antygenem określane są mianem „naiwnych”. Wykazują one m.in. ekspresję błonową antygenu CD45RA. Na skutek pierwotnej prezentacji antygenu limfocyty „naiwne” przekształcają się w komórki efektorowe. W wyniku tego procesu stopniowo ulega znacznemu zmniejszeniu ekspresja antygenu CD45RA, który zostaje zastąpiony antygenem CD45RO. Limfocyty T, uprzednio „nauczone” struktury danego antygenu przez komórki prezentujące antygen,

nie tylko potrafią go precyzyjnie rozpoznawać, ale także w kontakcie z nim uruchamiają przypisaną im aktywność i funkcję – cytotoksyczną, inicjującą lub supresorową, regulatorową itd. W wyniku wtórnego kontaktu z antygenem limfocyty efektorowe giną, fizjologicznie pozostawiają jednak po sobie efektorowe komórki pamięci immunologicznej. Ekspresja CD45RO przypisywana jest komórkom pamięci immunologicznej, które już uprzednio weszły w kontakt z antygenem. Komórki pamięci immunologicznej wykazują ponadto ekspresję antygenów CD27, CD62L i CCR7; niestety, markery te nie mogły być równolegle analizowane w niniejszej pracy ze względu na ograniczenia techniczne cytometru [61, 97, 141, 182].

Proces przemiany limfocytów „naiwnych” w komórki pamięci immunologicznej jest procesem ciągłym i długotrwałym. W badaniach na myszach wykazano następującą sekwencję ewolucji limfocytów T CD8 w wyniku pierwotnego zakażenia/kontaktu z antygenem:



Natomiast w badaniach nad przewlekłymi latentnymi zakażeniami u ludzi wykazano następującą sekwencję zmian w dojrzewaniu limfocytów T CD8:



Prawdopodobnie są możliwe również alternatywne szlaki przemian i dojrzewania limfocytów T [91, 97, 98, 141, 182, 189, 291].

Podczas wtórnej prezentacji antygeny komórka dendrytyczna przekazuje efektorowym limfocytom T odpowiednie sygnały i bodźce przy użyciu dwóch kanałów informacyjnych.

1. Pierwszy kanał dostarcza informacji o strukturze prezentowanego antygeny, będącego np. fragmentem obcego patogenu. Przekazanie tej informacji dokonuje się poprzez prezentację uprzednio przetworzonego antygeny na receptorach zgodności tkankowej (MHC klasy I lub II), komórki dendrytycznej łączących się z receptorem CD3 (TCR: *T-cell receptor*), przy współudziale receptorów CD4 lub CD8.
2. Drugi kanał informacyjny służy do przekazywania dodatkowych informacji, tzw. sygnałów kostymulacyjnych, określających i uruchamiających dalsze zachowanie limfocyta po kontakcie z prezentowanym antygenem w następujący sposób:

- a. Bodźce aktywujące komórkę przekazywane są m.in. poprzez interakcję receptora CD28 lub np. ICOS na powierzchni limfocyta z antygenami CD80 lub CD86 na powierzchni komórki prezentującej antygen; łącznie z informacją o strukturze prezentowanego antygeny, przekazywaną poprzez CD3, powoduje to wydzielanie interleukiny 2, aktywację komórki, jej proliferację i różnicowanie z następowym wytworzeniem komórek efektorowych i komórek pamięci immunologicznej.
- b. Bodźce hamujące aktywność limfocyta przekazywane są poprzez receptory błonowe np. CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4*) lub PD-1, stymulowane również poprzez wiązanie z CD80 lub CD86; tego rodzaju sygnał hamujący – przekazany równolegle do interakcji TCR-MHC – blokuje wydzielanie interleukiny 2 i wstrzymuje aktywację komórki, a ostatecznym jego efektem jest zjawisko tolerancji immunologicznej; brak tego typu interakcji wiązany jest z wystąpieniem m.in. schorzeń autoimmunologicznych i cukrzycy typu 1.

Oba mechanizmy, zarówno pobudzające jak i hamujące, podlegają bardzo precyzyjnej regulacji [39, 83, 107, 120, 145, 247, 286].

W ten sposób dokonuje się fizjologiczna stymulacja limfocytów T prowadząca do wyzwolenia przypisanej im funkcji. Jednak dwukanałowość przekazu danych pozwala dodatkowo na przesyłanie szerszej gamy poleceń, zależnie od liczby wykorzystywanych kanałów, ich rodzaju oraz siły oddziaływania na nie:

1. Typowym i najbardziej pożądanym efektem stymulacji antygenowej jest opisana powyżej fizjologiczna aktywacja, proliferacja i różnicowanie komórek w kierunku limfocytów Th₁ lub Th₂, będąca wynikiem adekwatnej stymulacji obu receptorów; ostatecznym rezultatem jest tu odporność komórkowa i humoralna.
2. Jeżeli stymulacja jest wyjątkowo silna – prowadzi do śmierci komórki poprzez wywołanie jej apoptozy; fizjologicznie mechanizm ten prowadzi do destrukcji i eliminacji klonów limfocytów reaktywnych wobec własnych antygenów tkanekowych.
3. Jeżeli stymulacja dotyczy tylko jednego receptora/kanału informacyjnego – jej wynikiem jest anergia komórki, czyli brak reakcji na zewnętrzne bodźce stymulujące, trwający kilkadziesiąt godzin.

Dwa ostatnie mechanizmy są wykorzystywane przede wszystkim w procesach regulatorowych odpowiedzi immunologicznej [83, 107, 120, 145, 189, 248].

Fizjologicznym wynikiem kontaktu limfocyta ze swoistym dla niego antygenem jest stan aktywacji komórki. W badaniach nad patogenezą chorób zakaźnych potencjalnie istotne znaczenie diagnostyczne mogą mieć właśnie markery aktywacji limfocytów T, podlegające ekspresji po pobudzeniu komórki w kontakcie z antygenem. Teoretycznie ich obecność może dokumentować reakcję układu odpornościowego na kontakt z patogenem.

Wyróżnia się wczesne markery aktywacji, pojawiające się na powierzchni komórki w okresie kilku godzin/dni po ekspozycji, oraz późne markery aktywacji, wykrywane po upływie dni/tygodni od stymulacji, najczęściej przewlekłej [95, 102, 153, 218]. Do pierwszej grupy zaliczyć można antygen CD69, którego ekspresja osiąga szczyt po upływie około 18 godzin od stymulacji, przed pojawieniem się na powierzchni komórki pozostałych markerów aktywacji. Jego obecność można wykazać na aktywowanych limfocytach T, B, komórkach NK, a nawet trombocytach. Funkcja tego antygeny nie została w pełni wyjaśniona. Wiadomo, że podlega on ekspresji w miejscach gdzie toczy

się przewlekły proces zapalny i prawdopodobnie odgrywa on istotną rolę w wytwarzaniu m.in. przeciwzapalnej cytokiny TGF- β [102, 235].

Bardzo ciekawym wczesnym markerem aktywacji jest antygen CD25, będący w istocie receptorem interleukiny 2. Jego ekspresja ulega wzmożeniu pod wpływem stymulacji receptora CD3, a także działania fitohemaglutyniny i konkanawaliny-A. Ekspresja tego antygeny ma ścisły związek z procesami regulatorowymi. Wczesnym markerem aktywacji jest także CD71, receptor transferynowy, obecny na powierzchni wszelkich komórek poddanych aktywacji; w niniejszej pracy ekspresja tego antygeny nie była mierzona [214].

Późnym markerem aktywacji jest antygen CD38, wykrywalny m.in. na limfocytach T i komórkach NK. W zakażeniu HIV obserwuje się znaczny odsetek limfocytów T CD8⁺CD38⁺. Cząstki CD38 uczestniczą w metabolizmie cADP-rybozy i wapnia, odgrywając prawdopodobnie istotną rolę w procesach regulatorowych proliferacji i różnicowania komórek. Antygen CD38 ma szczególne zastosowanie w izolacji komórek macierzystych (CD34⁺) [75, 171, 218]. Późnym markerem aktywacji jest również antygen HLA-DR, należący do grupy antygenów zgodności tkankowej typu II. Można go wykryć na powierzchni limfocytów B, aktywowanych limfocytów T, komórek NK i monocytów [95, 153, 214].

W opisie zjawiska aktywacji limfocytów T należy wspomnieć, że obok aktywacji wywołanej kontaktem komórki ze swoistym antygenem opisano również aktywację nieswoistą dla antygeny, wywołaną, tzw. superantygenami. Dzieje się tak m.in. w zakażeniu HIV czy gronkowcowym zatruciu pokarmowym [111, 193, 197, 274, 276]. Jednak w przebiegu większości zakażeń nie obserwuje się znaczącego wzrostu ekspresji markerów aktywacji, najprawdopodobniej dzięki niezwyklej precyzji działania systemu odpornościowego oraz jego silnej tendencji do kontroli i samoograniczania reakcji zapalnej. W praktyce analiza markerów aktywacji może być cennym narzędziem diagnostycznym – pod warunkiem posiadania możliwości wyizolowania komórek specyficznych dla danego patogenu i poddaniu ich dalszym stymulacjom i analizom *in vitro*.

Sprawne funkcjonowanie układu odpornościowego jest wynikiem wielowarstwowego i chronologicznego nakładania się na siebie bardzo wielu przeciwstawnych procesów – rozpoznawania antygenów, aktywacji i supresji, kooperacji, migracji, proliferacji, martwicy i apoptozy, mutacji, uczenia się i eliminacji zbędnych elementów reakcji zapalnej. Wszystko to wymaga precyzyjnej regulacji szybko po sobie następujących zdarzeń. Nieskuteczna i zbyt słaba reakcja immunologiczna sprzyja uogólnianiu się infekcji i może stanowić poważne zagrożenie dla życia pacjenta. Jednak z drugiej strony uogólnienie się nieadekwatnie silnej reakcji zapalnej (sepsa), zarówno w wyniku rozsiewu zakażenia jak i na skutek wymknięcia się jej spod kontroli niedostatecznie wydolnych procesów supresyjnych, jest groźna dla zdrowych tkanek i narządów, jak i całego organizmu i również stanowi zagrożenie dla życia [120].

Mechanizmy regulujące rodzaj i siłę reakcji immunologicznej poddawane są w ostatnich latach intensywnym badaniom. W procesach tych można wyróżnić przeciwstawne zjawiska aktywacji i supresji, a w ostatecznym etapie także eliminacji elementów biorących udział w reakcji zapalnej, z pozostawieniem komórek pamięci immunologicznej [9, 22, 164]. Szczególną rolę w kontroli nad przebiegiem odpowiedzi immunologicznej przypisuje się limfocytom T regulatorowym, utożsamianym z subpopulacją o fenotypie CD4⁺CD25⁺, określanych również mianem Treg. Odgrywają one znaczącą rolę w procesie tolerancji immunologicznej, przypisuje się im aktywność regulatorową określaną jako supresyjno-inicjującą. Zaburzenia ich funkcji prowadzą do zjawiska limfoprolif-

feracji i są jedną z prawdopodobnych przyczyn schorzeń autoimmunologicznych – wykazano m.in., że ich liczba ulega istotnemu zmniejszeniu w przebiegu stwardnienia rozsianego [9, 23, 41, 70, 107, 120, 145, 147, 164, 232, 250, 284]. W obrębie subpopulacji $T\ CD4^+CD25^+$ wyróżnia się komórki „naturalne”, wywodzące się z grasicy, których hamujące działanie jest niezależne od stymulacji antygenowej i odnosi się prawdopodobnie głównie do reakcji skierowanych przeciwko własnym tkankom gospodarza. Wykazano również istnienie limfocytów Treg „adaptacyjnych”, powstających w wyniku aktywacji i stymulacji naiwnych limfocytów T przez komórki dendrytyczne przy użyciu receptora TCR prezentującego konkretny antygen. Hamującej aktywności tej subpopulacji przypisuje się kluczowe znaczenie w patogenezie przewlekłych chorób zakaźnych, a w szczególności w zjawisku tolerancji immunologicznej w odniesieniu do patogenów wirusowych, takich jak np. CMV, *Herpes simplex* (HSV), HCV czy HIV. Patogeny te miałyby więc zdolność do inicjowania reakcji immunologicznych aktywnie hamujących fizjologiczną odpowiedź układu odpornościowego, prowadzącą do eliminacji zakażenia z organizmu.

Prawidłowo funkcjonujące mechanizmy regulacji wymagają m.in. stałej i kontrolowanej migracji komórek, a także ich zdolności do nawiązywania bezpośredniego fizycznego kontaktu ze sobą, dokonującego się za pomocą receptorów powierzchniowych i synaps. Dopiero tak bezpośredni fizyczny kontakt umożliwia precyzyjną i skuteczną wymianę sygnałów i informacji na poziomie indywidualnej komórki. Część z tych informacji ma charakter strukturalny – informuje o budowie i kształcie antygenów – inne są dodatkowymi poleceniami wypełnienia różnorodnych działań i funkcji, czasem nawet samobójczych. Zdolność komórki do odczytania i zrozumienia przekazywanych jej sygnałów uwarunkowana jest obecnością lub brakiem na jej powierzchni właściwych receptorów. Nawet drobne nieprawidłowości w tym zakresie mogą być przyczyną głębokiej patologii.

Regulacja procesów immunologicznych może również odbywać się bez fizycznego kontaktu komórek ze sobą – za pomocą cytokin i właściwych im receptorów. Dobrym przykładem może być tu wydzielanie przez komórki dendrytyczne interleukiny 7, w odpowiedzi na spadek liczby limfocytów T mierzony ilością nawiązywanych z nimi kontaktów. Interleukina 7 oddziałuje pobudzająco na odległą anatomicznie grasicę, pobudzając wytwarzanie w niej limfocytów. Jednak w większości przypadków zjawiska immunologiczne mają silną tendencję do samoograniczania się, zamykania reakcji zapalnej na możliwie jak najwęższym obszarze anatomicznym.

Dokładne zrozumienie zasad działania komórek regulatorowych i innych mechanizmów kontrolujących odpowiedź immunologiczną może mieć istotne praktyczne znaczenie nie tylko w chorobach zakaźnych, ale także np. w transplantologii [9, 23, 41, 70, 120, 145, 147, 164, 187, 232, 250, 284].

Jak widać limfocyty, a w szczególności limfocyty T, stanowią kluczowe ogniwo w sprawnie funkcjonującym układzie odpornościowym człowieka. Wspólnie z komórkami prezentującymi antygen spełniają one rolę „komputera immunologicznego”, precyzyjnie przetwarzającego znaczne ilości informacji dotyczących rodzaju, struktury, lokalizacji i pochodzenia patogenu, a jednocześnie generują szybkie, wielokierunkowe i skuteczne reakcje odpornościowe, precyzyjnie kontrolowane i zazwyczaj nieuchronnie eliminujące obce mikroorganizmy i własne komórki zmienione nowotworowo. Wszystko to dokonuje się przy możliwie minimalnych zniszczeniach w obrębie własnych tkanek i narządów. Zrozumienie skomplikowanych zasad funkcjonowania tego układu z pewnością pozwoli

w przyszłości na precyzyjne i wybiórcze kierowanie reakcjami odpornościowymi w sposób korzystny dla zdrowia i życia pacjenta.

Analizowana w niniejszej pracy zmiana liczby poszczególnych subpopulacji limfocytów stanowi więc drobny, prosty do zmierzenia, element odpowiedzi immunologicznej. Wzrost lub spadek liczby komórek danej subpopulacji w badanym kompartmentcie (krew obwodowa, płyn mózgowo-rdzeniowy, układ chłonny) jest sumarycznym wynikiem przeciwstawnych procesów migracji limfocytów do wnętrza jak i poza dany przedział. Poszczególne subpopulacje są wytwarzane – w grasicy, układzie chłonnym, śledzionie itd. – a następnie poprzez krew migrują do tkanek, narządów i węzłów chłonnych, podlegają wtórnej recyrkulacji do krwi i innych tkanek, a ostatecznie giną – na skutek reakcji efektorowej lub eliminowane w śledzionie. Procesy te wzajemnie nakładają się na siebie, podlegają precyzyjnym i nie do końca zdefiniowanym mechanizmom regulacji, między innymi poprzez ekspresję różnorodnych receptorów na powierzchni komórek oraz ich oddziaływanie z ligandami-cytokinami. Markerami umożliwiającymi przechodzenie limfocytów z krwi obwodowej poza światło naczyń, do układu chłonnego, są CCR7 oraz CD62L, nieoznaczane w niniejszym badaniu. Należy przy tym pamiętać, że np. pula limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej stanowi około 1% wszystkich limfocytów T CD4⁺ w organizmie człowieka i dlatego nawet niewielkie migracje pomiędzy poszczególnymi pulami mogą w efekcie dawać bardzo znaczne zmiany liczby względnej jak i bezwzględnej tej populacji, a ponadto zmiany dokonujące się we krwi obwodowej mogą słabo odzwierciedlać procesy toczące się w innych kompartmentach.

Limfocytoza całkowita krwi obwodowej stanowi jedynie sumę wszystkich wspomnianych powyżej procesów dokonujących się w odniesieniu do wszelkich subpopulacji.

Na zakończenie – spośród wielu innych elementów składowych reakcji odpornościowej, takich jak immunoglobuliny, układ dopełniacza, cytokiny, granulocyty, trombocyty, śródbłonek naczyń itd. – w szczególny sposób należy wspomnieć o nowo odkrywanych mechanizmach odporności wewnątrzkomórkowej, szczegółowo opisanych już w bieżącym stuleciu. Wykraczają one daleko poza tradycyjny podział odporności na humoralną i komórkową. Ich istotą są reakcje enzymatyczne, nierzadko przebiegające z udziałem kwasów nukleinowych. Przykładem tego typu reakcji jest działanie siRNA (ang. „small interfering RNA”) lub enzymy z grupy APOBEC [48, 186, 211, 243]. Układy te wydają się pełnić ważną rolę w ochronie przed zakażeniami wirusowymi, w szczególności w odniesieniu do zakażeń retrowirusowych. Być może one właśnie będą stanowiły rozwiązanie problemu stworzenia skutecznej szczepionki przeciwko tym patogenom, wobec których tradycyjne reakcje odpornościowe, będące połączeniem odpowiedzi humoralnej i komórkowej, okazały się nieskuteczne. Dotyczy to głównie zakażeń HCV oraz HIV [30].

Znaczącą rolę w rozwoju wiedzy na temat budowy i zasad funkcjonowania układu odpornościowego człowieka odegrała pandemia **HIV/AIDS**, której jesteśmy naocznymi świadkami w ostatnim ćwierćwieczu. Wirus HIV należy do rodziny *Retroviridae*, posiadających unikalny enzym - odwrotną transkryptazę, która umożliwia przepisanie wirusowego RNA w DNA, a następnie wbudowanie prowirusowego DNA w genom komórek człowieka. Podstawowym celem tej grupy wirusów jest wbudowanie się w materiał genetyczny komórek rozrodczych człowieka, co pozwala im na wykorzystywanie przedstawicieli *Homo sapiens* jako przenosicieli – z pokolenia na pokolenie – prowirusowego DNA.

Infekcje retrowirusowe dokonywały się wielokrotnie w przeszłości. Analiza genomu człowieka wykazała, że do 40% ludzkiego materiału genetycznego stanowią retrowirusy, które wbudowały się w chromosomy naszych przaprzodków. Porównanie genomu człowieka z genomem innych naczelnych pozwoliło na określenie kolejności i czasu rozejścia się ewolucyjnej drogi rozwojowej człowieka i innych naczelnych. Odrębne zagadnienie stanowi otwarte i coraz bardziej frapujące pytanie o stopień aktywności retrowirusów, tak licznie zakodowanych w naszym genomie oraz o ich wpływ na fizjologię i patologię człowieka.

Wśród szympanśów ostatnia epidemia retrowirusowa miała miejsce stosunkowo niedawno, bo przed kilku tysiącami lat. W jej wyniku doszło najprawdopodobniej do wyselekcjonowania się osobników, które wprawdzie ulegają zakażeniu, jednak nie chorują i nie umierają po kontakcie z wirusem. Obserwacje dokonywane na tych zwierzętach dają nam w przybliżeniu pogląd na to jak potoczyłaby się ewolucja naszego gatunku poddanego presji nowego retrowirusa, gdybyśmy nie stosowali profilaktyki i leczenia. Znana jest m.in. mutacja genu kodującego receptor CCR5, jednej z dróg wnikania HIV do wnętrza komórek, zwana $\Delta 32\text{CCR5}$. Występuje ona, zależnie od regionu, u kilku do kilkunastu procent populacji. Osoby będące homozygotami $\Delta 32\text{CCR5}$ są odporne na zakażenie HIV, a jeżeli mimo to do zakażenia dojdzie – objawowy zespół AIDS rozwijają po bardzo wielu latach lub wcale. Można przypuszczać, że również wśród ludzi doszłoby z czasem do wyselekcjonowania się osobników częściowo opornych na zakażenie, które wprawdzie mogą ulec zakażeniu, jednak najczęściej nie chorują [146, 215].

Najnowsza epidemia retrowirusowa u gatunku *Homo sapiens* rozpoczęła się prawdopodobnie w latach dwudziestych ubiegłego stulecia, wśród myśliwych na terenie dzisiejszego Senegalu i Wybrzeża Kości Słoniowej. W wyniku kolejnych mutacji małpi retrowirus nabrał zdolności do replikacji w układzie chłonnym człowieka – nastąpiła zmiana rezerwuaru, pokonanie bariery międzygatunkowej i wytworzenie się nowego gatunku wirusa. Przypuszcza się, że proces ten dokonywał się trzykrotnie w przypadku HIV1 i jednorazowo w odniesieniu do HIV2. Wystąpienie nowej epidemii zakażeń retrowirusowych uświadomiliśmy sobie na początku lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku, gdy dotarła ona do terytorium USA.

Wirus HIV, paradoksalnie, wyspecjalizował się w zakażaniu i niszczeniu komórek układu odpornościowego. Podstawowym celem ataku są limfocyty T CD4^+ , których liczba zmniejsza się w miarę trwania zakażenia HIV. W początkowym okresie, zwanym ostrą chorobą retrowirusową (OCR) niszczenie limfocytów T CD4^+ dokonuje się w mechanizmie martwicy. Obecnie szacuje się, że w ciągu pierwszych trzech tygodni od zakażenia ulega martwicy około 80% wszystkich limfocytów T CD4^+ , głównie w obrębie układu chłonnego przewodu pokarmowego. W drugiej fazie zakażenia niszczenie limfocytów T CD4^+ dokonuje się przede wszystkim w mechanizmie apoptozy. Fizjologicznie proces apoptozy w odniesieniu do limfocytów T dokonuje się w grasicy i służy eliminowaniu tych klonów limfocytów, które rozpoznają i reagują z własnymi tkankami, ulegając aktywacji w kontakcie z antygenami człowieka. Wirus HIV uruchamia ten mechanizm poprzez silną stymulację receptora CD4 powierzchniową glikoproteiną gp120. Tak więc w celu wywołania apoptozy wirus nie musi replikować w komórce, ani nawet wnikać do jej wnętrza – wystarczy że zwiąże się z receptorem CD4 na jej powierzchni, co wyzwała kaskadę zdarzeń prowadzących do pocięcia przez endonukleazy materiału genetycznego i śmierci komórki [4, 12, 55, 58, 65, 66, 74, 85, 86, 103, 104, 123, 133, 138, 166, 173, 188, 197, 203, 244, 248, 257].

Jednak głównym miejscem replikacji HIV w fazie ustabilizowanej zakażenia nie są limfocyty $CD4^+$, lecz komórki prezentujące antygen, głównie komórki dendrytyczne i makrofagi. Wirus wnika do ich wnętrza m.in. poprzez receptory $CD4$, jednak nie giną one w kontakcie z wirusem, stając się właściwym rezerwuarem zakażenia i miejscem aktywnej, długotrwałej jego replikacji. Komórki te, dzięki zdolności do migracji, pełnią również rolę „konja trojańskiego”, przenosząc HIV w swoim wnętrzu z miejsca zakażenia do lokalnych węzłów chłonnych, a następnie do innych tkanek i narządów, także tych trudno dostępnych dla innych wirusów (tzw. „sanktuariów”), jak na przykład układ nerwowy. Ponieważ komórki dendrytyczne odgrywają kluczową rolę w patogenezie zakażenia HIV – stały się obiektem intensywnych prac dotyczących szczepionki (terapeutycznej jak i profilaktycznej) a także farmakokinetyki leków antyretrowirusowych [20, 58, 65, 78, 81, 123, 133, 173, 207, 242, 244, 257, 258, 281, 294].

Wśród komórek układu odpornościowego szczególnie ważną rolę w zakażeniu HIV odgrywają limfocyty $CD8^+$. To one skutecznie blokują replikację wirusa i przez wiele lat skutecznie obniżają wiramię, która bezpośrednio po zakażeniu – w pierwszych dwóch-trzech tygodniach – osiąga niezwykle wysokie wartości, później ulegając znacznemu obniżeniu. Aktywność antywirusowa limfocytów $CD8^+$ dokonuje się poprzez wydzielanie chemokin – RANTES, $MIP1\alpha$, $MIP1\beta$ – skutecznie blokujących replikację wirusa w komórkach dendrytycznych. Dlatego limfocyty $CD8^+$ stały się obiektem badań i programów terapeutycznych z zastosowaniem interleukiny 2, jak i prac nad szczepionką terapeutyczną. Ich funkcja podlega również hamującym wpływom regulatorowych limfocytów Treg ($CD4^+CD25^+$) [4, 11, 12, 14, 17, 31, 44, 76, 102, 104, 123, 129, 133, 173, 187, 188, 210, 236, 244, 246, 257, 304]. Podobną rolę hamowania replikacji HIV odgrywają komórki NK, jednak ich aktywność ulega wygaszeniu pod wpływem intensywnej replikacji tego wirusa [192].

Limfocyty B w początkowym okresie zakażenia HIV wytwarzają cały wachlarz przeciwciał skierowanych przeciwko różnorodnym antygenom i fragmentom wirusa, nie udało się jednak jak dotąd zidentyfikować żadnego przeciwciała, które skutecznie wiązałoby wszelkie możliwe podtypy wirusa. W miarę trwania zakażenia słabnie aktywność inicjująca i regulatorowa ze strony limfocytów T, a narasta patologiczna aktywacja limfocytów B, stymulowana produkcją lekkiego łańcucha ferrytyny, dokonującą się w makrofagach pod wpływem wirusowej cząstki regulatorowej *Nef*. Następstwem tej aktywacji jest hipergammaglobulinemia, stwierdzana przede wszystkim u zakażonych dzieci [123, 133, 173, 244, 257].

Wirus HIV w trakcie replikacji stosuje taktykę umykania układowi odpornościowemu poprzez zmienność genetyczną i generowanie olbrzymich ilości mutacji – rzędu 10^9 /dobę. Mutacje te powstają w wyniku m.in. omyłności odwrotnej transkryptazy, która myli się przeciętnie raz na cykl replikacji. Pomimo wytworzenia przez układ odpornościowy całego spektrum różnorodnych przeciwciał i cytotoksycznych reakcji komórkowych – żadne z nich nie są w stanie zneutralizować wszystkich możliwych podtypów i mutacji wirusa. Dodatkowo w momencie wbudowania się HIV w genom gospodarza w postaci prowirusowego DNA eliminacja wirusa może polegać jedynie na zniszczeniu zakażonej komórki. Dlatego decydujące dla losów zakażenia są pierwsze dni po ekspozycji. Wśród wielu mechanizmów ucieczki układowi odpornościowemu stosowanych przez HIV na podkreślenie zasługuje rola wirusowego białka *Nef* w zaburzaniu procesu prezentacji antygenów wirusowych w kontekście antygenów zgodności tkankowej [17, 76, 122, 257].

Mutacje powstają także w następstwie modulowania poprzez wirusową cząstkę regulatorową *Vif* aktywności enzymu APOBEC3G; enzym ten, będący w istocie deaminazą cytydyny, katalizuje w genomie wirusa reakcję przemiany cytozyny w uracyl i jest częściowo blokowany aktywnością *Vif*. Wytwarzanie tak wielkich ilości podtypów i mutacji, ich nakładanie się na siebie, a nierzadko wzajemne znoszenie przeciwstawnych efektów – jest główną przyczyną braku rozwoju naturalnej odporności na zakażenie HIV, braku skutecznej szczepionki, jak i niepowodzeń terapeutycznych w zakresie eradykacji zakażenia [17, 156].

Dzięki badaniom nad zakażeniem HIV udało się opisać rolę grasicy w fizjologicznym odtwarzaniu limfocytów. Wyliczono, że proces niszczenia limfocytów T jest u osób zakażonych HIV nawet 8-krotnie intensywniejszy niż u osób zdrowych i w takim też stopniu nasilają się fizjologiczne procesy ich regeneracji dokonujące się w grasicy. Jednak HIV potrafi również zakażać i niszczyć młode tymocyty obecne w tym narządzie, co uniemożliwia odtwarzanie limfocytów T. Zjawisko to stanowi ważny fragment patogenезы zespołu AIDS i prawdopodobnie jest jedną z przyczyn skrócenia przebiegu historii naturalnej zakażenia HIV u dzieci [170, 177, 185, 238, 257].

Ostatecznym efektem działania wirusa HIV jest skrajne upośledzenie poszczególnych funkcji układu odpornościowego, co umożliwia wniknięcie do organizmu człowieka szczególnego rodzaju drobnoustrojów, zwanych oportunistycznymi, które do zakażenia i wywołania objawów chorobowych wymagają głębokiego upośledzenia funkcji układu immunologicznego. Wystąpienie u osoby zakażonej HIV schorzeń oportunistycznych, a także pewnych rodzajów nowotworów, tzw. wskaźnikowych, stanowi podstawę rozpoznania klinicznego AIDS, schyłkowego okresu zakażenia [123, 156, 163].

Stosowane obecnie leki antyretrowirusowe (HAART – *Highly Active AntiRetroviral Therapy*) hamują replikację HIV poprzez blokowanie aktywności odwrotnej transkryptazy, proteazy lub procesu wnikania wirusa do wnętrza komórki docelowej. Zablokowanie replikacji wirusa jak i wtórnych mechanizmów niszczenia limfocytów CD4 stwarza możliwość fizjologicznej regeneracji układu odpornościowego. Jednocześnie prowadzone są intensywne prace nad zastosowaniem szczepionki terapeutycznej (pobudzającej naturalne reakcje odpornościowe skierowane przeciwko HIV), czynników stymulujących aktywność układu odpornościowego, w szczególności limfocytów cytotoksycznych (interleukina 2) i substancji nasilających regenerację układu odpornościowego (hormon wzrostu, interleukina 7). Żadna z tych metod jak dotąd nie stawia sobie za cel eradykacji wirusa. W uzasadniony sposób można przewidywać, że zakażenie HIV będzie jednym z pierwszych działań medycyny, w których zostanie zastosowana terapia genowa [59, 76, 139, 185].

Wśród szerokiej gamy badań stosowanych w ocenie układu odpornościowego – szczególne miejsce w niniejszym opracowaniu zajmuje **cytometria przepływowa**. Technika ta, wypracowana na początku lat osiemdziesiątych ubiegłego stulecia, łączy w sobie i wykorzystuje w praktyce odkrycia dokonane w drugiej połowie dwudziestego wieku: przeciwciała monoklonalne, laser, fluorochromy oraz komputer. Pozwala ona na wybiórcze i precyzyjne barwienie komórek lub innych struktur mikroskopowych (tzw. beads-y). Zabarwione komórki dzięki układowi hydraulicznemu cytometru linearnie, kolejno przepływają przez promień lasera, który wzbudza różnokolorową fluorescencję barwników skoniugowanych z przeciwciałami monoklonalnymi. Powstające impulsy świetlne są precyzyjnie mierzone ilościowo w zakresie odpowiednich długości fal przez filtrowane fotonowielacze, a następnie przetworzone na sygnały elektroniczne. Natężenie sygnałów emitowanych przez każdą z przepływających komórek jest mierzone

i opisywane przy użyciu od dwóch do ośmiu parametrów ilościowych, zależnie od liczby użytych przeciwciał. Należy podkreślić, że obecnie dostępne cytometry mają możliwość zbierania danych z prędkością kilkuset komórek na sekundę, a sumarycznie analizują dane dotyczące nawet setek tysięcy komórek, co jest szczególnie istotne w analizowaniu tzw. rzadkich populacji. Precyzja i tempo pomiarów ilościowych daleko przekraczają więc zakres możliwości tradycyjnych ocen dokonywanych okiem badacza przy użyciu mikroskopu, bez udziału komputera. Ponadto bardziej złożone cytometry dysponują możliwością sortowania zabarwionych komórek, w celu poddania ich dalszej preparatyce.

Dodatkowo na podkreślenie zasługuje względna prostota preparatyki, pozwalająca na użycie do badania stosunkowo niewielkich ilości materiału biologicznego (objętości rzędu kilkudziesięciu mikrolitrów), co stanowi szczególną zaletę w badaniu takich płynów ustrojowych jak krew, płyn mózgowo-rdzeniowy czy łyż.

Z powyższych względów cytometria przepływowa znalazła szczególnie ważne praktyczne zastosowanie w analizie antygenów powierzchniowych leukocytów krwi obwodowej, głównie limfocytów. Jest jednym z podstawowych narzędzi pracy hematologa i immunologa.

Metoda ta ma jednak również istotne ograniczenia. Może być zastosowana niemal wyłącznie do komórek swobodnie zawieszonych w płynnym nośniku. Umożliwia to wprowadzić swobodną analizę komórek uzyskanych z płynów ustrojowych (krew obwodowa, łyż, płyn mózgowo-rdzeniowy, otrzewnowy, opłucnowy, stawowy), jednak istotnie utrudnia ocenę materiału pobranego z tkanek i narządów litych, jak wątroba, nerki czy guzy nowotworowe. Podejmowano wprowadzić próby oceny metodą cytometrii przepływowej tkanek litych, jednak w trakcie upłynniania materiału dochodzi do znacznych uszkodzeń komórek, szczególnie w zakresie antygenów powierzchniowych. Metodyka ta okazała się natomiast bardzo użyteczna w analizie zawartości DNA w jądrach tkanek nowotworowych i ich ploidii. Jednak do analizy tkanek litych – w szczególności antygenów zlokalizowanych na powierzchni i w cytoplazmie komórek – znacznie bardziej przydatne są techniki łączące w sobie barwienie przeciwciałami monoklonalnymi z użyciem tradycyjnego mikroskopu i komputerowej analizy uzyskanych obrazów.

Należy również zaznaczyć, że badania cytometryczne wciąż nie są badaniami taniymi.

Przedmiotem niniejszego opracowania nie jest wyczerpujące omówienie zagadnień dotyczących mikrobiologii, epidemiologii, etiopatogenezy czy kliniki chorób zakaźnych. Nie jest nim również analiza szczegółowych zasad budowy i funkcjonowania układu odpornościowego człowieka. Treścią pracy jest zarysowanie interakcji pomiędzy różnorodnymi czynnikami etiologicznymi szeroko rozumianych chorób zakaźnych (w miarę dostępnych możliwości – wszelkich typów i rodzajów: ostrych i przewlekłych, bakteryjnych i wirusowych, wykorzystujących różne drogi zakażenia i o różnej lokalizacji anatomicznej) a układem odpornościowym człowieka. Interakcji wyrażonej prostymi zmianami liczby głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej i płynu mózgowo-rdzeniowego i zmierzonej przy użyciu stosunkowo nowej metody badawczej, jaką jest cytometria przepływowa.

Istotą działu medycyny zwanego chorobami zakaźnymi jest interakcja pomiędzy drobnoustrojem chorobotwórczym i układem odpornościowym człowieka oraz otaczającym je środowiskiem.

W tej interakcji zawiera się epidemiologia, profilaktyka, etiopatogeneza, symptomatologia, diagnostyka, leczenie jak i ocena rokowania w chorobach zakaźnych.

Dotychczasowy postęp w tej dziedzinie dokonywał się poprzez przeprowadzanie takich zmian w obrębie środowiska (stosowanie antybiotyków, środków czystości, sterylizacji, edukacja), aby były one niekorzystne dla chorobotwórczych mikroorganizmów.

Jednak dalszy postęp będzie prawdopodobnie możliwy m.in. również poprzez precyzyjne modulowanie aktywności układu odpornościowego [107].

3. Cele pracy

1. Analiza wpływu chorób zakaźnych na liczbę i rodzaj limfocytów we krwi obwodowej i płynie mózgowo-rdzeniowym.
2. Ocena przydatności badania składu głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej i płynu mózgowo-rdzeniowego w diagnostyce różnicowej i ocenie klinicznej pacjentów chorych na choroby zakaźne, ze szczególnym uwzględnieniem osób zakażonych HIV.

4. Materiał i metody

Niniejsza praca jest badaniem obserwacyjnym, polegającym na retrospektywnym podsumowaniu wyników badań subpopulacji limfocytów krwi obwodowej i płynu mózgowo-rdzeniowego przeprowadzanych metodą cytometrii przepływowej. W odniesieniu do osób zakażonych HIV jest to badanie kohortowe; w stosunku do pozostałych jednostek chorobowych ma charakter badania przekrojowego (*cross sectional*).

Ocenie poddano wyniki badań krwi obwodowej i płynu mózgowo-rdzeniowego pobieranych do rutynowych badań diagnostycznych przeprowadzanych u pacjentów hospitalizowanych w Klinice Chorób Zakaźnych AMG w okresie od 18 listopada 1992 r. do 8 maja 2006 r. Sumarycznie przeprowadzono analizę wyników badań 7776 próbek krwi obwodowej i 143 próbek płynu mózgowo-rdzeniowego pobranych łącznie od 1551 dorosłych osób. U pacjentów zakażonych HIV były to badania mające na celu określenie stopnia niedoboru odporności, kwalifikację do terapii antyretrowirusowej oraz monitorowanie wyników leczenia. U osób tych początkowo, zgodnie z zaleceniami Centers for Disease Control and Prevention (CDC), rutynowo oznaczano liczbę limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ oraz stosunek CD4/CD8, a ponadto liczbę limfocytów B, komórek NK oraz aktywowanych limfocytów T. Ze względu na znaczny koszt tego rodzaju analiz – w miarę wzrostu liczby osób zakażonych ograniczono zakres badań do oceny jedynie trzech pierwszych parametrów, a pełny panel wykonywano przy pierwszorazowym oznaczeniu oraz w szczególnie uzasadnionych przypadkach. Znacznie poszerzony panel badań (m.in. markery aktywacji, CD28, CD45RA i CD45RO) wykonywano w przypadku podejrzenia wczesnego okresu zakażenia – rzadko obserwowanej ostrej choroby retrowirusowej. Wśród osób leczonych antyretrowirusowo ocena podstawowych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej była wykonywana regularnie i w tej grupie liczba przeprowadzonych badań była największa. Analizowano zmiany w zakresie liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w czasie, dzieląc pacjentów na kohorty w zależności od wyjściowej wartości liczby CD4 oraz okresu rozpoczęcia terapii.

Ocena naturalnego przebiegu zakażenia HIV dokonana została na podstawie znacznie mniejszej liczby wyników badań. Zostały one wykonane u osób, które nie były leczone – z powodu braku wskazań do wdrożenia terapii antyretrowirusowej, a także u pacjentów obserwowanych na początku lat dziewięćdziesiątych, gdy nie były dostępne skuteczne leki. Uwzględniono również te osoby, które nie podjęły leczenia, odmawiając przyjmowania leków i/lub współpracy z lekarzami prowadzącymi terapię.

Stosunkowo dużą liczbę badań wykonano w grupie pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B i C. Badania miały na celu określenie roli układu odpornościowego w mechanizmie uszkodzenia komórek wątrobowych, a także w rozwoju powikłań pozawątrobowych tych zakażeń. Podjęto również próbę oceny immunostymulującego działania interferonu alfa stosowanego w leczeniu przewlekłych wirusowych zapaleń wątroby. Badania wykonywano także u osób z autoimmunologicznym zapaleniem wątroby, jednak ponieważ żadna z tych analiz nie przyniosła oczekiwanych rezultatów stopniowo zostały one zaniechane.

W pozostałych przypadkach ocena subpopulacji limfocytów krwi obwodowej stanowiła poszerzenie rutynowych badań diagnostycznych, i miała na celu poszukiwanie współistniejących zaburzeń odporności. Po raz pierwszy wykonano je u dziesięcioletniego chłopca z zapaleniem mózgu w przebiegu różyczki. Ze względu na szczególnie ciężki i przedłużający się przebieg choroby, łącznie z długotrwałą niewydolnością oddechową,

początkowo podejrzewano współistnienie wrodzonego niedoboru odporności. W badaniach stwierdzono znaczny spadek liczby limfocytów T CD4⁺ i stosunku CD4/CD8. Wartości stopniowo wróciły do normy wraz z poprawą stanu ogólnego pacjenta. Nie wykazano wrodzonych niedoborów odpornościowych, a obserwowane zaburzenia były prawdopodobnie następstwem infekcji wirusowej, a nie przyczyną nietypowego i ciężkiego jej przebiegu klinicznego. Pacjent ten, ze względu na wiek, nie został włączony do przedstawionych poniżej analiz, jednak ta obserwacja spowodowała, że badania liczby i rodzaju subpopulacji limfocytów krwi obwodowej zaczęto wykonywać również u pacjentów z chorobami zakaźnymi innymi niż choroba HIV/AIDS. Szczególnie liczną grupę porównawczą stanowiły osoby z wirusowym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych – badania wykonano przede wszystkim w trakcie epidemii w roku 1996. W celu przeprowadzenia efektywnej analizy porównawczej część próbek krwi obwodowej od pacjentów z grup porównawczych (stwardnienie rozsiane, udar niedokrwienny) uzyskano z Kliniki Neurologii AMG.

Osoby zdrowe poddane analizie w niniejszej pracy to pacjenci hospitalizowani z powodu podejrzenia choroby zakaźnej, u których wykluczono schorzenia infekcyjne, a także osoby zgłaszające się do poradni retrowirusowej w związku z ekspozycją na zakażenie HIV. Grupa ta zawierała również ochotników, pracowników służby zdrowia zainteresowanych stanem własnego układu odpornościowego. W analizie wpływu wieku na skład głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej wykorzystano wyniki uzyskane od 83 zdrowych dzieci, które były badane i obserwowane ze względu na okoloporodową ekspozycję na zakażenie HIV. Szczegółową charakterystykę pacjentów poddanych badaniom krwi obwodowej i ujętych w analizach niniejszego badania przedstawiono w tabeli 2. Natomiast liczbę osób, u których wykonano badanie subpopulacji limfocytów w płynie mózgowo-rdzeniowym, przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 2. Dorośli pacjenci u których wykonano badana subpopulacji limfocytów krwi obwodowej

Table 2. Adult patients in whom peripheral blood lymphocyte subsets were determined

Rozpoznanie / <i>Diagnosis</i>	Liczba badanych / <i>Number of cases</i>	Kobiety / <i>Females</i>	Mężczyźni / <i>Males</i>	Średnia wieku / <i>Mean age</i>
Zakażenie HIV – ogółem / <i>HIV total</i>	799	184	615	31,9
– Obserwowani, nieleczeni <i>Observed/untreated</i>	304	62	242	30,7
– Obserwowani i leczeni HAART <i>Observed on HAART</i>	227	62	165	34,3
– Tylko 1 oznaczenie <i>Single measurement</i>	268	60	208	31,2
Przewlekłe WZW HCV / <i>Chronic hepatitis C</i>	142	52	90	39,8*
Przewlekłe WZW HBV / <i>Chronic hepatitis B</i>	82	31	51	39,8*
Zapalenie opon wirusowe / <i>Viral meningitis</i>	78	35	43	26,5*
Zapalenie mózgu / <i>Encephalitis</i>	46	21	25	35,9*

Rozpoznanie / <i>Diagnosis</i>	Liczba badanych/ <i>Number of cases</i>	Kobiety/ <i>Females</i>	Mężczyźni/ <i>Males</i>	Średnia wieku/ <i>Mean age</i>
Zapalenie opon ropne/ <i>Purulent meningitis</i>	28	9	19	48,2*
Zespół Guillain-Barré/ <i>Guillain-Barré syndrome</i>	21	8	13	40,2*
Zatrucie pokarmowe / <i>Food poisoning</i>	21	14	7	47,0*
AIH / <i>Autoimmune hepatitis</i>	20	17	3	32,8
Udar niedokrwieny / <i>Ischemic stroke</i>	19	4	15	46,6*
Przewlekłe WZW HBV+HCV/ <i>Chronic hepatitis B and C</i>	17	6	11	36,9
SM / <i>Multiple sclerosis</i>	15	7	8	35,9
Róża / <i>Erysipelas</i>	14	8	6	54,5*
Angina / <i>Tonsillitis</i>	13	7	6	18,7*
Borelioza / <i>Borreliosis</i>	13	6	7	43,1*
Posocznica / <i>Sepsis</i>	12	6	6	33,6
Półpasiec / <i>Herpes zoster</i>	9	3	6	58,3*
Włośnica / <i>Trichinosis</i>	8	4	4	28,0
Mononukleoz / <i>Mononucleosis</i>	8	4	4	20,4*
Ospa wietrzna / <i>Varicella</i>	7	4	3	23,7
Świnka – zapalenie opon/ <i>Mumps meningitis</i>	7	-	7	16,6
HIV OCR / <i>Acute retroviral syndrome</i>	7	3	4	25,3*
<i>Herpes simplex</i>	6	4	2	42,5
Ostre WZW HBV/ <i>Acute viral hepatitis B</i>	6	1	5	42,8
Cytomegalia / <i>Cytomegaly</i>	5	-	5	22,8*
Ostre WZW HAV/ <i>Acute viral hepatitis A</i>	4	3	1	20,0
Ostre WZW HCV/ <i>Acute viral hepatitis C</i>	4	2	2	56,5
Odra / <i>Measles</i>	3	1	2	24,3
Świnka (bez zapalenia opon)/ <i>Mumps (with no meningitis)</i>	3	1	2	18,3
Zapalenie rdzenia / <i>Myelitis</i>	3	-	3	33,3
Udar krwotoczny / <i>Hemorrhagic stroke</i>	3	1	2	36,7
Różyczka / <i>Rubella</i>	1	1	-	31,0
Grypa / <i>Influenza</i>	1	-	1	17,0
<i>Hepatitis fulminans HBV</i>	1	1	-	41,0
<i>Malaria</i>	1	1	-	34,0
Osoby zdrowe / <i>Healthy individuals</i>	117	55	62	31,2

* różnica wieku znamienna statystycznie w porównaniu do grupy osób zdrowych

* statistically significant difference compared to healthy individuals

Tabela 3. Liczba osób poddanych badaniu subpopulacji limfocytów w płynie mózgowo-rdzeniowym w zależności od rozpoznania klinicznego

Table 3. Number of patients in whom cerebrospinal fluid lymphocyte subsets were determined

Rozpoznanie / <i>Diagnosis</i>	Liczba badanych / <i>Number of cases</i>
Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych wirusowe / <i>Viral meningitis</i>	78
Ostre wirusowe zapalenie mózgu / <i>Acute viral encephalitis</i>	16
Borelioza / <i>Borreliosis</i>	14
Zakażenie HIV / <i>HIV infection</i>	6
Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych ropne / <i>Purulent meningitis</i>	4
HIV – OCR / <i>Acute retroviral syndrome</i>	3
Świnka – zapalenie opon / <i>Mumps meningitis</i>	3
SM / <i>Multiple sclerosis</i>	1
Mononukleozę zakaźną / <i>Infectious mononucleosis</i>	1
Angina / <i>Tosillitis</i>	1
Zespół Guillain-Barré / <i>Guillain-Barré syndrome</i>	1
Ogółem / <i>Total</i>	128
Osoby zdrowe / <i>Healthy individuals</i>	8

Rozpoznanie kliniczne jednostek chorobowych stawiane były zgodnie z rutynowymi zasadami diagnostyki chorób zakaźnych, na podstawie danych uzyskanych z wywiadu, badania przedmiotowego, badań dodatkowych krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego, badań obrazujących, mikrobiologicznych i serologicznych. Mimo iż w większości przypadków ocena subpopulacji limfocytów dokonywana była w pierwszych dniach hospitalizacji, to ostateczne rozpoznanie ustalane było *ex post*, przy wypisie, na podstawie całości obrazu klinicznego i dostępnych wyników badań dodatkowych [19].

W przypadku pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi – niezależnie od etiologii – w analizie statystycznej uwzględniono wyłącznie wyniki pierwszego pobrania krwi, dokonywanego w ciągu 48 godzin od przyjęcia na oddział. U osób zakażonych HIV w analizie uwzględniono wszystkie dostępne wyniki, w części analiz uśredniając je dla kolejnych lat obserwacji. W odniesieniu do pozostałych pacjentów ze schorzeniami przewlekłymi i osób zdrowych – w przypadku wykonywania więcej niż jednego oznaczenia, dalszej analizie poddano wartości uśrednione dla danej osoby. W analizie statystycznej nie uwzględniono badań wykonanych u osób w wieku poniżej 16 lat (poza analizą wpływu wieku na subpopulacje limfocytów krwi obwodowej u dzieci zdrowych oraz w pojedynczych przypadkach ostrych chorób zakaźnych występujących głównie u dzieci), pacjentów z wrodzonymi lub nabytymi niedoborami immunologicznymi innymi niż związane z wystąpieniem choroby zakaźnej (np. związane z chorobami hematologicznymi, nowotworowymi, po przeszczepie narządowym oraz w trakcie steryd- lub chemioterapii).

Barwienie materiału i akwizycja wyników przeprowadzana była w ciągu 24 godzin od pobrania. Próbkę były barwione i analizowane zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta cytometru przepływowego i odczynników, a także zgodnie z wytycznymi CDC dla oznaczeń subpopulacji limfocytów krwi obwodowej u osób zakażonych HIV [36, 37, 38]. Stosowano technikę *dual platform* z liszą erytrocytów (*BD Lysing solution*)

i płukaniem, przy czym wartości bezwzględne leukocytozy całkowitej, bezwzględnej limfocytozy i odsetka limfocytów uzyskiwano na aparacie hematologicznym Sysmex K-4500. Od 2006 r. stosowano technikę *single platform* z użyciem probówek „TrueCount”, również przy zastosowaniu lizy erytrocytów w pełnej krwi, bez wirowania i płukania. Próbkę płynu mózgowo-rdzeniowego były opracowywane zgodnie z metodyką stosowaną do krwi obwodowej, z tym że w pierwszym etapie PMR był odwirowywany przy 300 g, a osad ponownie zawieszany w 200 µl nadsącza – w celu odzyskania i poddania barwieniu jak największej liczby komórek. Dlatego wyniki badań płynu mózgowo-rdzeniowego wyrażane były jedynie procentowo. Nie analizowano próbek płynu mózgowo-rdzeniowego w widoczny sposób zanieczyszczonych krwią.

Oceniano podstawowe subpopulacje limfocytów: CD19⁺ (limfocyty B), CD3⁺ (limfocyty T), CD3⁺CD4⁺ (limfocyty T *helper/inducer*), CD3⁺CD8⁺ (limfocyty T *suppressor/cytotoxic*), CD3⁺HLA-DR⁺ (aktywowane limfocyty T) oraz CD3⁺CD16&56⁺ (komórki NK). W przypadku pacjentów zakażonych HIV najczęściej rutynowej ocenie podlegały jedynie subpopulacje CD3⁺CD4⁺ oraz CD3⁺CD8⁺ i stosunek CD4/CD8. Do barwienia używano zestawów przeciwciał monoklonalnych firmy Becton Dickinson (BD): Simulset Leucogate (CD45 FITC CD14 PE), Simulset γ1γ2 Control, Simulset CD3/CD19 (CD3 FITC CD19 PE), Simulset CD3/CD4 (CD3 FITC CD19 PE), Simulset CD3/CD8 (CD3 FITC CD8 PE), Simulset CD3/HLA-DR (CD3 FITC HLA-DR PE) oraz Simulset CD3/CD16&56 (CD3 FITC CD16+56 PE). Dodatkowo w szczególnych przypadkach (ostra choroba retrowirusowa, mononukleozą zakaźną, część osób zdrowych, barwienie niewielkich ilości płynu mózgowo-rdzeniowego) stosowano barwienia trójkolorowe, zgodnie z procedurą *dual platform*, przy użyciu kombinacji pojedynczych przeciwciał monoklonalnych: CD19 FITC, CD45RA FITC, CD3 FITC, CD69 PE, CD25 PE, CD38 PE, CD28 PE, CD45RO PE, CD3 PerCP, CD4 PerCP oraz CD8 PerCP.

Badania przeprowadzano na cytometrze przepływowym FACSsort firmy BD (nr seryjny B0106) w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Wojewódzkiego Szpitala Zakaźnego w Gdańsku. Cytometr w latach 1992–2000 wyposażony był w komputer Hewlett Packard z systemem operacyjnym Consort 32 i oprogramowaniem Lysis II (v. 1.1) oraz Simulset (v. 2.3.2), a w latach 2001–2006 w komputer Apple G4 z systemem MacOS 9.1 oraz oprogramowaniem Simulset (v. 3.1), Multiset i CellQuest (v. 3.3). Pracownia cytometryczna uczestniczyła w kolejnych cyklach programu kontroli jakości CEQUAL [282].

Przedstawiono analizy uzyskanych wyników badań krwi obwodowej w postaci wartości bezwzględnych liczby komórek poszczególnych subpopulacji, gdyż uznano, że analiza wyłącznie wyników procentowych jest podatna na błędy związane ze wzrostami/spadkami w zakresie innych ocenianych subpopulacji. Od tej zasady zastosowano jeden wyjątek – odsetek ekspresji markerów aktywacji limfocytów T, tak aby wartość tę niezależnie od wahań liczby bezwzględnej limfocytów T.

Natomiast w odniesieniu do wyników badań płynu mózgowo-rdzeniowego przedstawiono jedynie wyniki procentowe, niezależne od wahań cytozy w PMR. Uznano, że technika barwienia *dual platform* opracowana dla krwi obwodowej nie pozwala na rzetelną ocenę liczby bezwzględnej komórek poszczególnych subpopulacji, szczególnie w przypadku wyjściowo bardzo niskiej cytozy.

Analizę statystyczną – testy Anova, t-Studenta, Chi-kwadrat, Fishera, Bartleta, test F, analizy trendów – przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Microsoft Access

2000 i Access 2003, Excel 2000 i Excel 2003, Statistica 6 oraz Epi-Info v.3.3.2. Tekst opracowano przy użyciu programu Microsoft Word 2000 i 2003.

Praca była finansowana z grantów W-967 oraz ST-79 AMG.

4.1. Krytyczne uwagi dotyczące metodologii badania

Przedstawiona praca jest badaniem retrospektywnym z wszelkimi ograniczeniami związanymi z tego typu analizami. Zwiera ona w sobie dwie odmienne metodologicznie części.

Pierwsza stanowi podsumowanie bardzo licznej grupy badań subpopulacji limfocytów krwi obwodowej wykonywanych u osób zakażonych HIV. Ma ona charakter badania kohortowego, m.in. analizującego zmiany liczby limfocytów, głównie subpopulacji T CD4⁺, w czasie. Niestety nie było możliwe przeprowadzenie szczegółowej analizy w odniesieniu do wyników wirerii HIV RNA. W początkowym okresie badania te w ogóle nie były dostępne; później, ze względu na wysoką cenę i trudności natury technicznej i organizacyjnej, były wykonywane rzadko, najczęściej bez związku czasowego z badaniami subpopulacji limfocytów. Nie było również możliwe przeprowadzanie badań czynnościowych limfocytów.

W przypadku osób nieleczonych antyretrowirusowo istotnym problemem była niewielka liczba i brak regularności wykonywanych badań. Natomiast w grupie pacjentów leczonych antyretrowirusowo znaczną trudność stanowiły częste zmiany liczby i rodzaju stosowanych leków, a także zmieniające się zasady prowadzenia tej terapii. Nie była również możliwa do przeprowadzenia ocena tzw. adherencji pacjentów. Podsumowując, pomimo poddania analizie stosunkowo dużej liczby wyników badań – sumarycznie analizowana grupa pacjentów była zbyt mała, aby konkurować ze znacznie większymi, wieloośrodkowymi, randomizowanymi badaniami prospektywnymi. Zagadnienie zaburzeń w układzie odpornościowym występujących w przebiegu choroby HIV/AIDS jest jednym z najbardziej szczegółowo analizowanych problemów w medycynie i podlega dalszym, niezwykle skomplikowanym metodologicznie analizom. Nawet znaczące poszerzenie panelu markerów ocenianych u chorych z ostrą chorobą retrowirusową nie mogło przynieść takiego przełomu w rozumieniu patogenyzy tej jednostki chorobowej, jaki dokonał się w ciągu ostatnich dwóch lat na podstawie badań zmian zachodzących w węzłach obwodowych i grudkach chłonnych przewodu pokarmowego, wykonywanych w tej grupie pacjentów. Przeprowadzenie porównywalnych analiz w prezentowanej pracy nie było możliwe technicznie, logistycznie ani finansowo.

Należy również zaznaczyć, że dla uproszczenia graficznej formy przedstawianych wyników hasłem „HAART” określano stosowanie u chorych jakichkolwiek leków antyretrowirusowych, co w przypadku podawania mniej niż 3 leków (powszechne w latach 1992-1995) powinno być określane jako ART (*antiretroviral therapy*), bez określenia *highly active*.

Druga część pracy była badaniem przekrojowym, bez możliwości śledzenia zmian zachodzących w czasie. Dotyczyła pacjentów z chorobami zakaźnymi innymi niż choroba HIV/AIDS oraz osób zdrowych. Analizowane grupy przypadków były tu znacząco mniej liczne, co obrazuje rzadkie obecnie występowanie wielu, dawniej powszechnych, jednostek chorobowych. Jednak ciekawe obserwacje i znamienne rezultaty analiz statystycznych uzyskane nawet w tak niewielkiej liczbie przypadków stanowią podstawę do

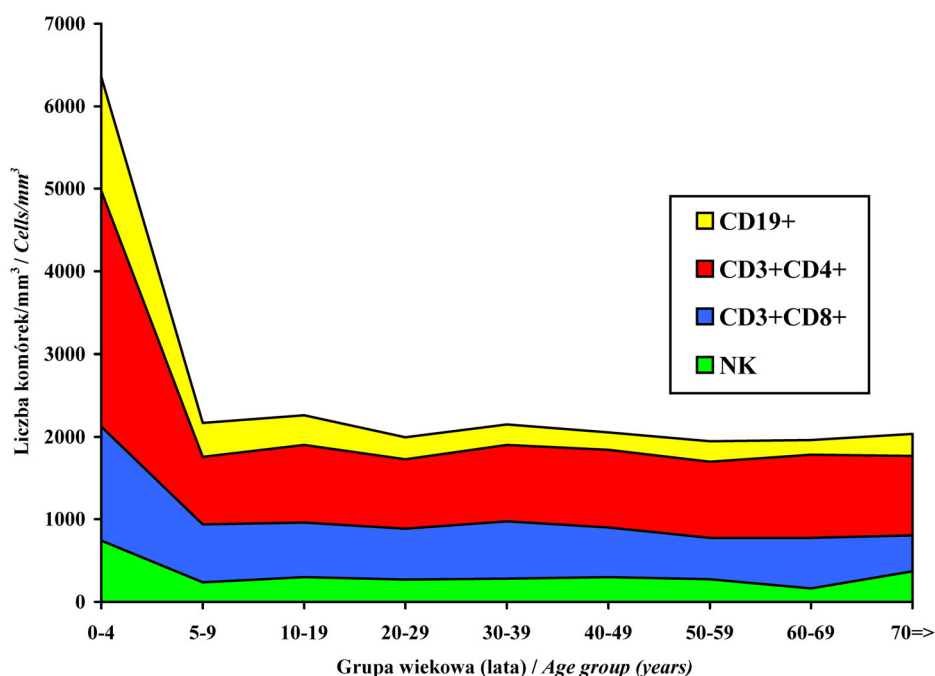
dalszych, ukierunkowanych badań prospektywnych. Co więcej, w odniesieniu do ostrego wirusowego zapalenia mózgu i neuroboreliozy prezentowane wyniki mogą mieć już obecnie zastosowanie w rutynowej praktyce klinicznej. W przypadku niektórych analiz niewielka liczba dostępnych wyników badań wymusiła uwzględnienie w obliczeniach pojedynczych przypadków osób w wieku poniżej 16 lat. Z tego samego powodu część obliczeń statystycznych w ogóle nie mogła być przeprowadzona. Mimo to autor zdecydował się na przedstawienie wyników nawet pojedynczych badań (patrz aneks 1), gdyż wynikające z nich obserwacje są ciekawe i inspirujące, a doniesienia literaturowe w tym zakresie stosunkowo rzadkie.

5. Wyniki

5.1. Ocena subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej

5.1.1. Osoby zdrowe

Ocenę podstawowych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej (ogółem 291 oznaczeń) przeprowadzono u 212 osób bez rozpoznanych chorób mogących mieć wpływ na wynik badania – 93 kobiet i 125 mężczyzn w wieku od 0 do 82 lat, średnia wieku 19,5 roku. Podsumowanie uzyskanych wyników składu subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w zależności od wieku przedstawiono na ryc. 1 i w tabeli 4.



Ryc. 1. Wartości głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w poszczególnych grupach wiekowych – osoby zdrowe (skumulowane liczby bezwzględne komórek)
Fig. 1. Main peripheral blood lymphocyte subsets by consecutive age groups in healthy persons (cumulated absolute counts)

Wartości głównych subpopulacji limfocytów uzyskane w badaniach 134 próbek krwi obwodowej pobranych od 117 dorosłych osób zdrowych (55 kobiet i 62 mężczyzn w wieku 16–82 lat, średnia wieku 31,2 lata) przedstawiono w tabeli 5. Dane te stanowiły grupę porównawczą dla dalszych badań wykonywanych u pacjentów z chorobami zakaźnymi. W przypadku, gdy u danej osoby wykonano więcej niż jedno badanie – otrzymane wyniki były uśredniane.

Porównanie uzyskanych średnich wartości subpopulacji limfocytów krwi obwodowej u osób zdrowych w zależności od płci przedstawia tabela 6.

Tabela 4. Główne subpopulacje limfocytów krwi obwodowej w poszczególnych grupach wiekowych – osoby zdrowe (wartości średnie dla liczb bezwzględnych i odsetek)

Table 4. Main peripheral blood lymphocyte subsets by age groups in healthy persons (mean absolute counts and percentages)

Subpopulacje limfocytów krwi obwodowej/ <i>Peripheral blood lymphocyte subsets</i>	Grupa wiekowa (lata) / <i>Age group (years)</i>								
	0-4	5-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	≥70
Liczba komórek/mm ³ / <i>Number of cells/mm³</i>									
Limfocytoza całkowita/ <i>Lymphocytosis</i>	6316	2357	2254	2000	2118	2129	2000	2000	1900
CD19 ⁺	1383	412	360	267	247	212	248	177	267
CD3 ⁺	4148	1690	1621	1413	1565	1467	1366	1578	1298
CD3 ⁺ CD4 ⁺	2851	820	941	840	929	942	922	1011	965
CD3 ⁺ CD8 ⁺	1380	701	661	618	692	602	499	612	433
CD4/CD8	2,30	1,27	1,51	1,48	1,44	1,69	1,97	1,99	2,40
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	415	158	162	176	174	343	152	164	217
CD3 ⁺ CD16 ⁺ &56 ⁺	742	236	301	269	282	299	276	162	370
Procent całkowitej limfocytozy / <i>Percentage of total lymphocytosis</i>									
%CD19 ⁺	22,7	17,4	15,7	13,5	11,6	10,6	14,0	10,5	14,3
%CD3 ⁺	66,1	71,4	70,9	72,8	74,9	73,9	70,3	79,0	68,5
%CD3 ⁺ CD4 ⁺	46,7	34,8	41,6	41,9	43,9	43,8	46,0	51,7	50,8
%CD3 ⁺ CD8 ⁺	22,6	29,1	29,0	30,7	32,5	28,8	24,8	29,3	23,0
%CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	6,1	6,4	7,1	8,8	8,6	17,0	7,7	10,0	11,3
%CD3 ⁺ CD16 ⁺ &56 ⁺	11,7	10,2	13,2	13,7	13,4	16,1	14,3	9,5	19,0
Liczba osób/ <i>Number of cases</i>	71	7	24	52	32	16	4	3	3

Tabela 5. Zakresy wartości bezwzględnych i odsetkowych głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w grupie 117 dorosłych osób zdrowych

Table 5. Main peripheral blood lymphocyte subsets - normal value ranges in 117 healthy adults

Subpopulacje limfocytów krwi obwodowej/ <i>Peripheral blood lymphocyte subsets</i>	Średnia/ <i>Mean</i>	SD	Percentyl/ <i>Percentile</i> 5	Percentyl/ <i>Percentile</i> 25	Mediana/ <i>Median</i>	Percentyl/ <i>Percentile</i> 75	Percentyl/ <i>Percentile</i> 95
Liczba komórek/mm ³ / <i>Number of cells/mm³</i>							
Limfocytoza / <i>Lymphocytosis</i>	2079	494	1300	1700	2000	2400	2920
CD19 ⁺	266	113	115	178	246	345	480
CD3 ⁺	1502	404	940	1211	1480	1700	2242
CD3 ⁺ CD4 ⁺	899	257	568	706	860	1050	1400
CD3 ⁺ CD8 ⁺	634	229	318	482	590	820	1050
CD4/CD8	1,55	0,56	0,89	1,20	1,40	1,80	2,70
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	192	127	60	110	160	230	432
CD3 ⁻ CD16 ⁺ &56 ⁺	282	129	98	170	260	380	500
Procentowe całkowitej limfocytozy / <i>Percentage of total lymphocytosis</i>							
%CD19 ⁺	12,9	4,6	6,0	10,0	13,0	15,8	20,0
%CD3 ⁺	73,2	6,2	64,0	69,3	73,0	77,5	84,0
%CD3 ⁺ CD4 ⁺	43,2	6,6	33,0	39,0	43,0	48,0	55,0
%CD3 ⁺ CD8 ⁺	30,2	7,2	18,0	25,4	30,0	35,0	42,0
%CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	9,4	5,9	3,0	6,0	8,0	11,0	20,2
%CD3 ⁻ CD16 ⁺ &56 ⁺	13,8	6,1	6,0	8,3	13,0	19,0	25,5

Tabela 6. Podstawowe subpopulacje limfocytów krwi obwodowej w zależności od płci w grupie 117 dorosłych osób zdrowych.

Table 6. Main peripheral blood lymphocyte subsets by gender in 117 healthy adults.

Subpopulacja limfocytów/ <i>Lymphocyte subset</i>	Średnia/ <i>mean</i> ±SD		Znamienność statystyczna/ <i>Statistical significance</i>
	Kobiety/ <i>Females</i>	Mężczyźni/ <i>Males</i>	
Liczba komórek/mm ³ / <i>Number of cells/mm³</i>			
Limfocytoza / <i>Lymphocytosis</i>	2029 ±472	2124 ±509	n.s.
CD19 ⁺	268 ±122	265 ±103	n.s.
CD3 ⁺	1496 ±421	1508 ±387	n.s.
CD4 ⁺	907 ±248	893 ±264	n.s.
CD8 ⁺	611 ±234	654 ±223	n.s.
CD4/CD8	1,66 ±0,62	1,45 ±0,40	p=0,0239
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	194 ±142	190 ±112	n.s.
NK	249 ±112	311 ±136	p=0,01043
Procent całkowitej limfocytozy / <i>Percentage of total lymphocytosis</i>			
%CD19 ⁺	13,3 ±5,2	12,6 ±3,8	n.s.
%CD3 ⁺	74,3 ±5,9	72,2 ±6,4	p=0,054
%CD4 ⁺	44,7 ±6,8	41,9 ±6,2	p=0,0100
%CD8 ⁺	29,7 ±7,7	30,7 ±6,7	n.s.
%CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	9,8 ±6,4	9,2 ±5,3	n.s.
%NK	12,4 ±5,3	15,0 ±6,4	p=0,01839
Wiek / <i>Age</i>	33,7	28,9	p=0,02129
Liczba osób / <i>Number of cases</i>	55	62	

n.s. – różnica niezamienna statystycznie

n.s. – insignificant difference

5.1.2. Ostre choroby zakaźne o etiologii bakteryjnej

Charakterystykę pacjentów dorosłych (powyżej 16 roku życia) z chorobami zakaźnymi o etiologii bakteryjnej poddanych badaniom podstawowych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej przedstawiono w tabeli 7. Do grupy tej dołączono też podsumowanie nielicznych wyników badań wykonanych u pacjentów z włośnicą i malarią. W odniesieniu do anginy i włośnicy, ze względu na małą ilość przypadków, uwzględniono także wyniki pacjentów w wieku poniżej 16 lat (cztery osoby z rozpoznaniem anginy w wieku 8, 13, 14 i 14 lat oraz dwie osoby z włośnicą w wieku 11 i 14 lat).

Tabela 7. Charakterystyka pacjentów z chorobami zakaźnymi o etiologii bakteryjnej i pasożytniczej poddanych badaniom subpopulacji limfocytów krwi obwodowej
Table 7. Patients with acute bacterial infections and parasitic diseases in whom peripheral blood lymphocyte subsets were obtained

Rozpoznanie/ <i>Diagnosis</i>	Liczba badanych/ <i>Number of cases</i>	Kobiety/ <i>Females</i>	Mężczyźni/ <i>Males</i>	Średnia wieku/ <i>Mean age</i>
Zapalenie opon ropne/ <i>Purulent meningitis</i>	28	9	19	48,2*
Zatrucie pokarmowe/ <i>Food poisoning</i>	21	14	7	47,0*
Róża / <i>Erysipelas</i>	14	8	6	54,5*
Angina / <i>Tonsillitis</i>	13	7	6	18,7*
Borelioza / <i>Borreliosis</i>	13	6	7	43,1*
Posocznica / <i>Sepsis</i>	12	6	6	33,6
Włośnica / <i>Trichinosis</i>	8	4	4	28,0
<i>Malaria</i>	1	1	-	34,0
Ogółem / <i>Total</i>	110	55	55	36,0
Osoby zdrowe/ <i>Healthy individuals</i>	117	55	62	31,2

* różnica wieku znamienista statystycznie w porównaniu do grupy osób zdrowych

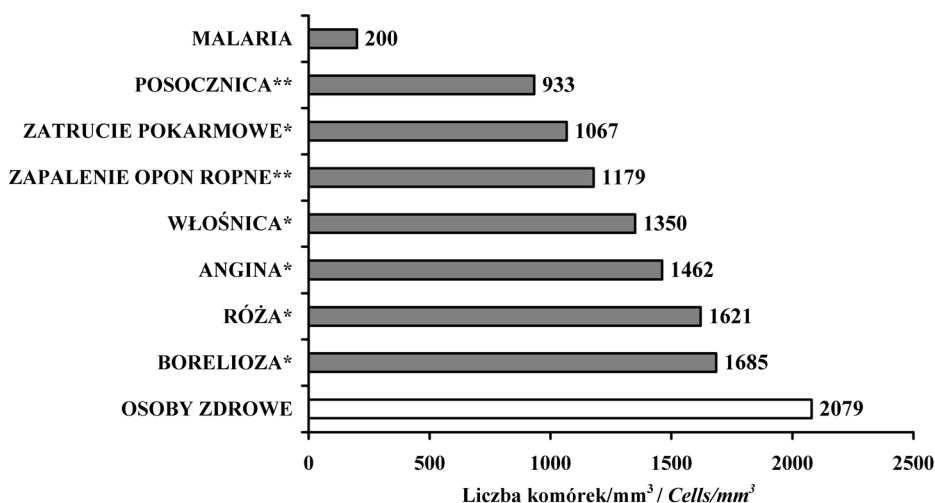
* *statistically significant age difference compared to healthy individuals*

Wyniki badań podstawowych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej u pacjentów z chorobami zakaźnymi o etiologii bakteryjnej i pasożytniczej przedstawiono na rycinach 2–9.

Przyjmując arbitralnie następującą subiektywną klasyfikację ciężkości przebiegu klinicznego i/lub ryzyka zgonu dla analizowanych jednostek chorobowych (w kolejności od najmniejszej do największej):

1 osoby zdrowe → 2 borelioza → 3 angina → 4 róża →
 → 5 zatrucie pokarmowe → 6 ropne zapalenie opon → 7 posocznica

i porównując ją z kolejnością występowania tych jednostek chorobowych w przedstawionych powyżej analizach poszczególnych subpopulacji limfocytów przy użyciu współczynnika korelacji rang – najwyższy współczynnik korelacji uzyskano dla limfocytów T (0,964), a także dla limfocytozy całkowitej, limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ (0,929 dla każdej z tych populacji).



Ryc. 2. Średnia całkowita limfocytoza u pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii bakteryjnej i pasożytniczej

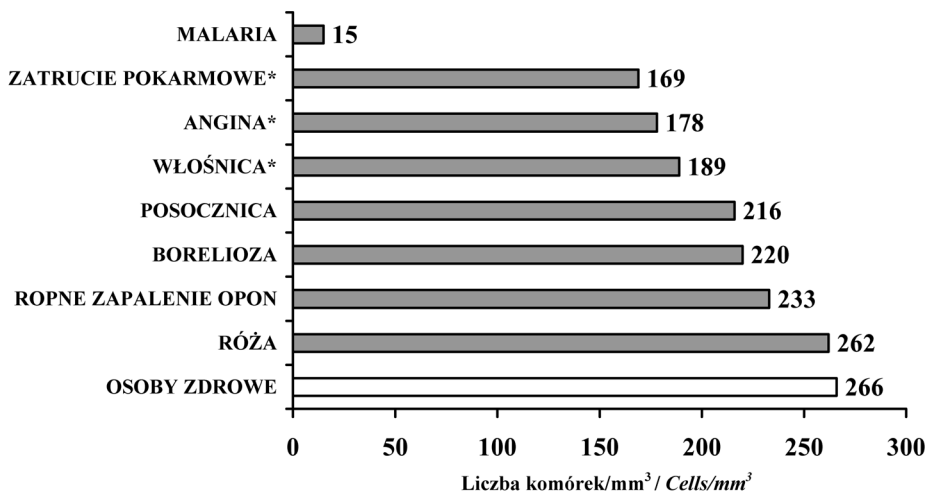
* różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 2. Mean total peripheral blood lymphocytosis in patients with acute bacterial and parasitic infections; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)

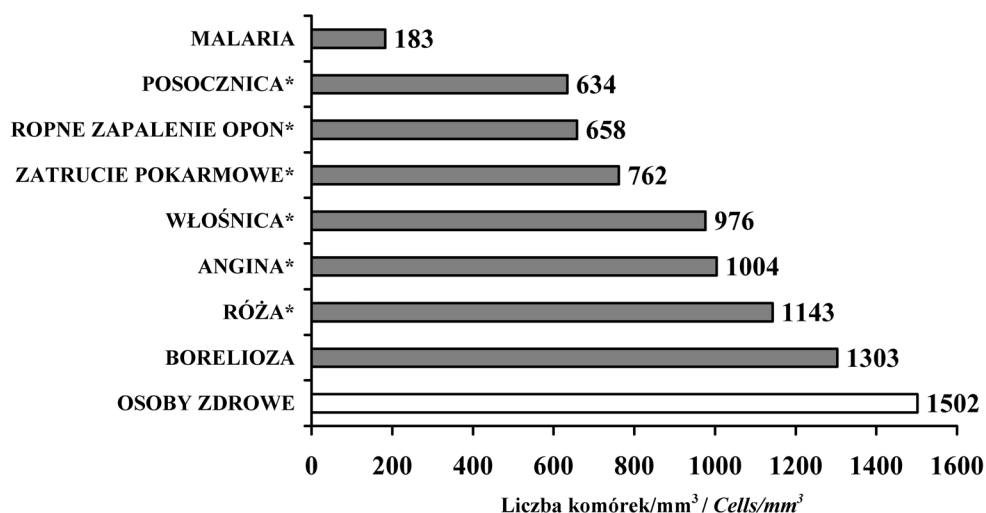


Ryc. 3. Średnia liczba limfocytów B we krwi obwodowej u pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii bakteryjnej i pasożytniczej

* różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

Fig. 3. Mean peripheral blood lymphocyte B count in patients with acute bacterial and parasitic infections; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

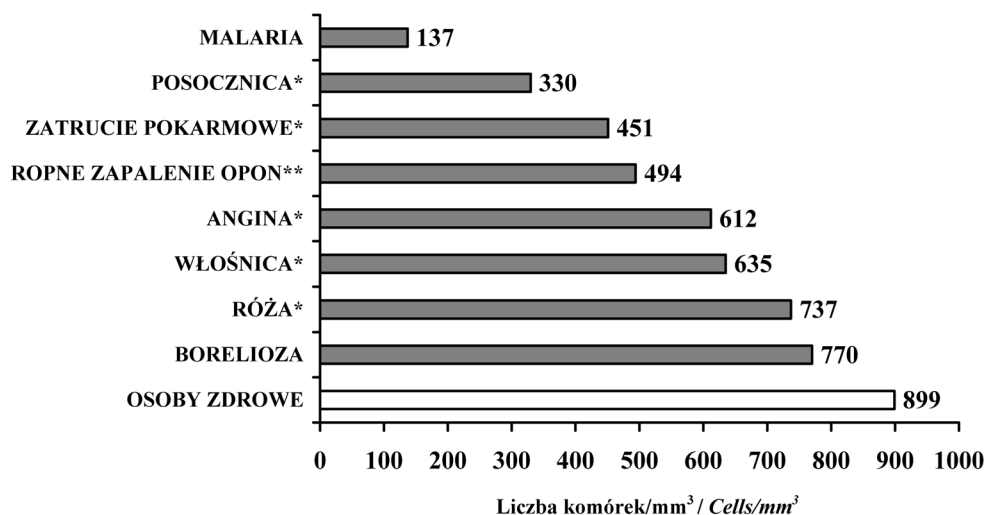


Ryc. 4. Średnia liczba limfocytów T we krwi obwodowej u pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii bakteryjnej i pasożytniczej

* różnica znamionna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

Fig. 4. Mean peripheral blood lymphocyte T count in patients with acute bacterial and parasitic infections; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

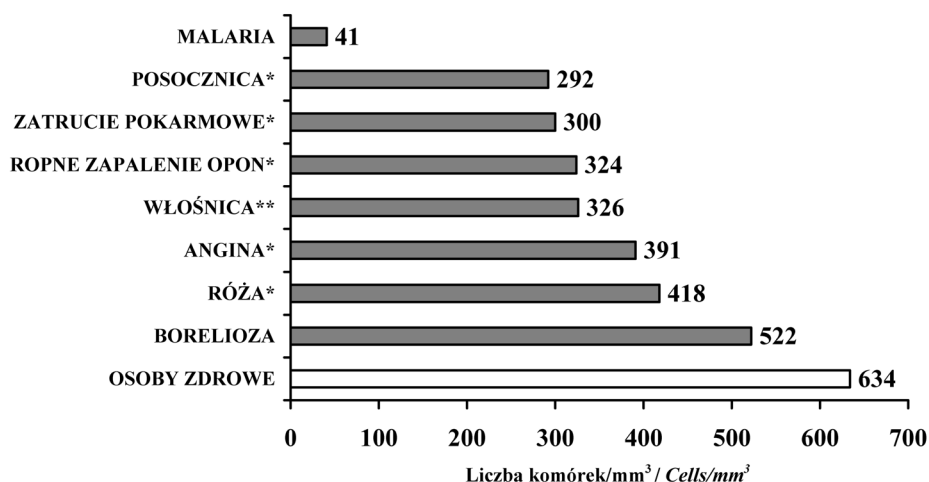


Ryc. 5. Średnia liczba limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej u pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii bakteryjnej i pasożytniczej

* różnica znamionna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

Fig. 5. Mean peripheral blood lymphocyte T CD4⁺ count in patients with acute bacterial and parasitic infections; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)



Ryc. 6. Średnia liczba limfocytów T CD8⁺ we krwi obwodowej u pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii bakteryjnej i pasożytniczej

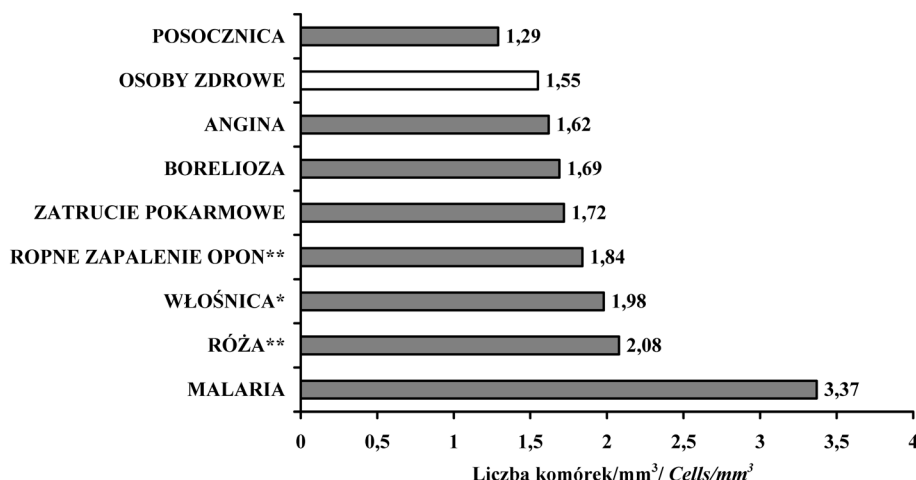
* różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 6. Mean peripheral blood lymphocyte T CD8⁺ count in patients with acute bacterial and parasitic infections; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)



Ryc. 7. Średnia wartość stosunku CD4/CD8 we krwi obwodowej u pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii bakteryjnej i pasożytniczej

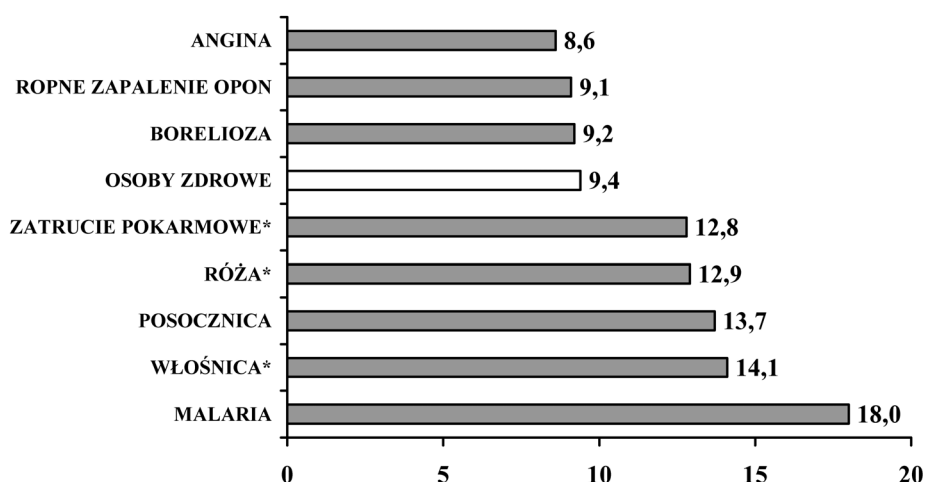
* różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 7. Mean peripheral blood CD4/CD8 ratio in patients with acute bacterial and parasitic infections; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)

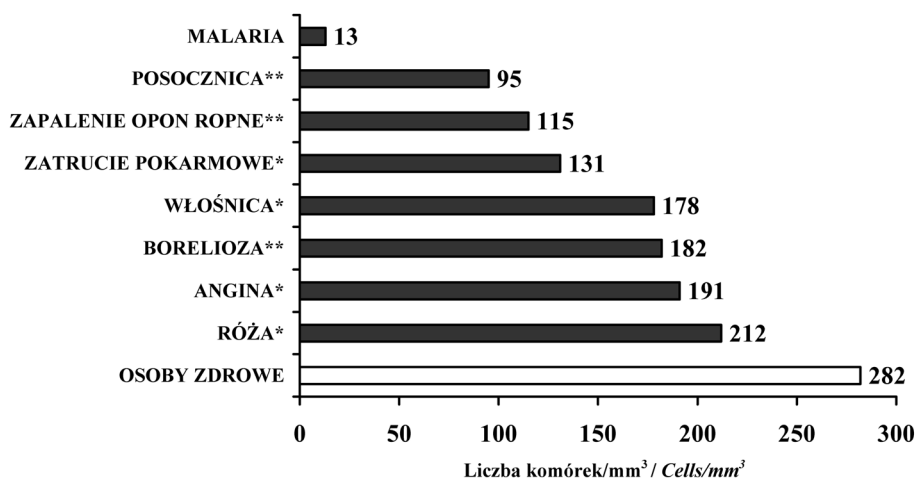


Ryc. 8. Średni odsetek aktywowanych limfocytów T ($CD3^+HLA-DR^+$) we krwi obwodowej u pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii bakteryjnej i pasożytniczej

* różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

Fig. 8. Mean percentage of peripheral blood activated T lymphocytes ($CD3^+HLA-DR^+$) in patients with acute bacterial and parasitic infections; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)



Ryc. 9. Średnia liczba komórek NK we krwi obwodowej u pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii bakteryjnej i pasożytniczej

* różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 9. Mean peripheral blood NK-cells count in patients with acute bacterial and parasitic infections; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)

Ponadto wykazano, że zakażenia paciorkowcowe analizowane łącznie (angina+róża) różniły się statystycznie znamienne od osób zdrowych niższymi wartościami limfocyty całkowitej (odpowiednio: 1544 vs. 2079, $p<0,001$ w teście t-Studenta), liczby limfocytów T (odpowiednio: 1079 vs. 1502, $p<0,001$ w teście t-Studenta), $CD4^+$ (677 vs. 899, $p<0,001$ w teście t-Studenta), $CD8^+$ (405 vs. 634, $p<0,001$ w teście t-Studenta) i komórek NK (202 vs. 282, $p<0,01$ w teście t-Studenta) przy znamienne wyższym stosunku $CD4/CD8$ (1,86 vs. 1,55, ANOVA $p<0,05$). Angina znamienne różniła się od różny niższą liczbą limfocytów B (178 vs. 262 ANOVA $p<0,037$) pomimo znamienne niższego wieku pacjentów z anginą (18,7 vs. 54,5, ANOVA $p<0,001$). Natomiast róża cechowała się wyższym odsetkiem i liczbą bezwzględną aktywowanych limfocytów T ($214/mm^3$ vs. $120/mm^3$ i 12,9% vs. 8,6%; ANOVA $p<0,017$).

W badanej grupie posocznica różniła się od ropnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych znamienne niższymi wartościami limfocytów T $CD4^+$ ($330/mm^3$ vs. $492/mm^3$, ANOVA $p=0,031$) oraz wtórnie niższym stosunkiem $CD4/CD8$ (1,29 vs. 1,84 ANOVA $p=0,016$).

5.1.3. Ostre choroby zakaźne o etiologii wirusowej

Ogólną charakterystykę pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii wirusowej poddanych badaniom podstawowych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej przedstawiono w tabeli 8. W grupie tej, ze względu na niską liczbę przypadków poszczególnych jednostek chorobowych, uwzględniono także osoby poniżej 16 roku życia – jedna pacjentka ze świnką w wieku 12 lat oraz po jednej osobie w wieku 7, 10 i 15 lat z zapaleniem opon w przebiegu świnki.

Z powodu niewielkiej liczby chorych na rzadko obecnie występujące ostre choroby zakaźne o etiologii wirusowej obserwowane różnice w uzyskanych wynikach nie były znamienne statystycznie; dlatego też wyniki badań przedstawiono w aneksie 1 na rycinach od A1 do A8.

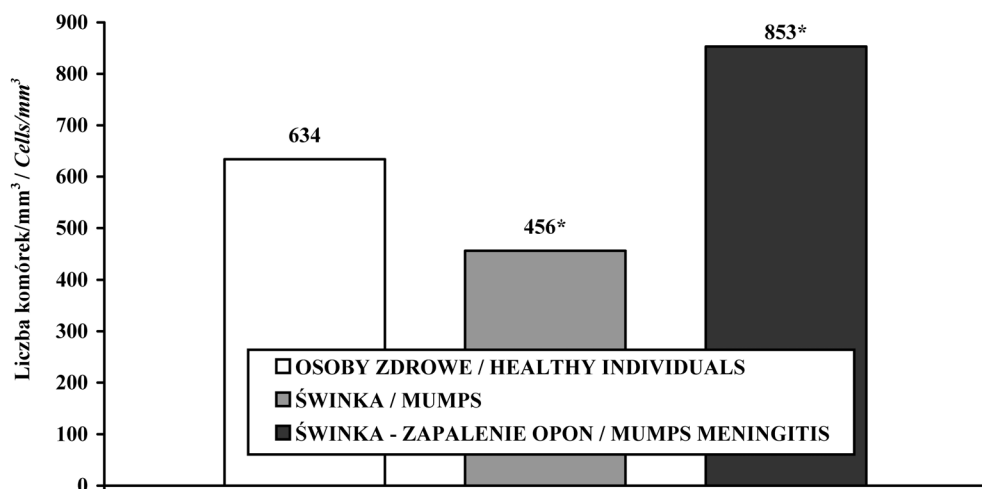
W większości przypadków obserwowano spadek liczby komórek w obrębie poszczególnych subpopulacji limfocytów (w szczególności dotyczyło to komórek NK). Jedyne statystycznie znamienne różnice uzyskano w odniesieniu do przypadków świnki: obserwowano spadek liczby limfocytów T o fenotypie $CD4^+$ w porównaniu do osób zdrowych (odpowiednio: $567/mm^3$ vs. $899/mm^3$, test t-Studenta $p<0,001$). Istotną różnicę odnotowano w liczbie limfocytów T $CD8^+$ pomiędzy chorymi na świnkę i świnkowe zapalenie opon mózgowo rdzeniowych (odpowiednio: $456/mm^3$ vs. $853/mm^3$, test t-Studenta $p=0,02$; wartość osób zdrowych: $634/mm^3$; patrz rycina 10). Sumarycznie - w obu jednostkach chorobowych obserwowano znamienny spadek stosunku $CD4/CD8$, głębszy w przebiegu świnkowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych.

Tabela 8. Pacjenci z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii wirusowej poddanych badaniom subpopulacji limfocytów krwi obwodowej; różnice wieku nieznamiennie statystycznie

Table 8. Patients with acute viral infections in whom peripheral blood lymphocyte subsets were obtained; age differences were statistically insignificant

Rozpoznanie/diagnosis	Liczba badanych/ Number of cases	Kobiety/ Females	Mężczyźni/ Males	Średnia wieku/ Mean age
Świnka – zapalenie opon/ <i>Mumps meningitis</i>	7	0	7	16,6
Ostre WZW typu B/ <i>Acute viral hepatitis B</i>	6	1	5	42,8
Ostre WZW typu A/ <i>Acute viral hepatitis A</i>	4	3	1	20,0
Ostre WZW typu C/ <i>Acute viral hepatitis C</i>	4	2	2	56,5
Odra / <i>Measles</i>	3	1	2	24,3
Świnka (bez zapalenia opon)/ <i>Mumps (without meningitis)</i>	3	1	2	18,3
Różyczka / <i>Rubella</i>	1	1	-	31,0
Grypa / <i>Influenza</i>	1	-	1	17,0
<i>Hepatitis fulminans</i> HBV	1	1	-	41,0
Ogółem / <i>Total</i>	30	10	20	36,0
Osoby zdrowe/ <i>Healthy individuals</i>	117	55	62	31,2

Ponadto w większości jednostek chorobowych obserwowano wzrost odsetka aktywowanych limfocytów T, jednak wartości znamienne statystycznie uzyskano jedynie u chorych ze świnką i świnkowym zapaleniem opon, analizowanych łącznie, w porównaniu do osób zdrowych (odpowiednio: 19,4% vs. 9,5%, ANOVA $p=0,008$).



Ryc. 10. Średnia liczba limfocytów T CD8⁺ we krwi obwodowej w przebiegu świnki

* różnica pomiędzy obydwoma wartościami znamienna statystycznie (test t-Studenta $p=0,02$)

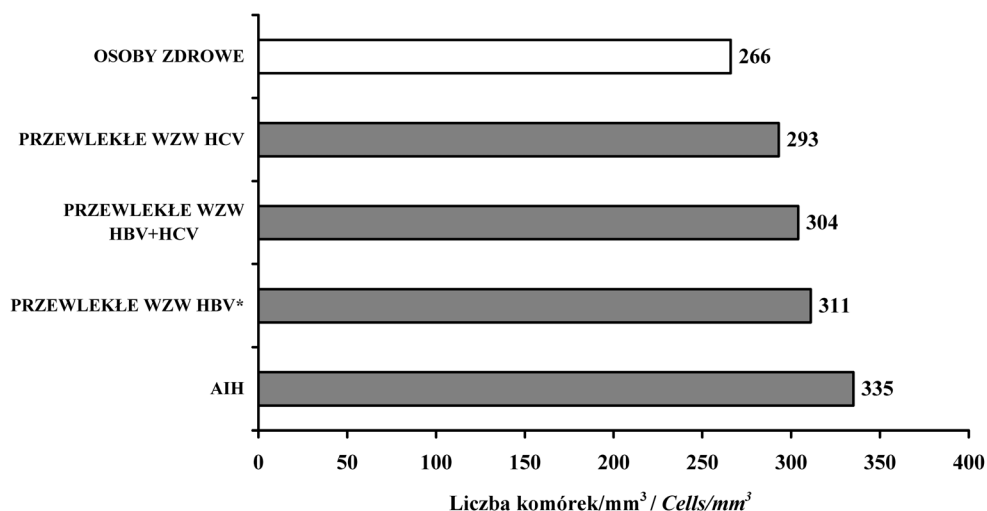
Fig. 10. Mean peripheral blood lymphocytes T CD8⁺ count in mumps patients

* statistically significant difference between these two values (Student's t-test $p=0,02$)

5.1.4. Przewlekłe choroby zakaźne o etiologii wirusowej – przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby

Analizą objęto 142 dorosłe osoby z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby (WZW) typu C (467 badań u 52 kobiet i 90 mężczyzn w wieku 17-73 lat, średnia 39,8 lat), 82 osoby z przewlekłym WZW typu B (325 badań u 31 kobiet i 51 mężczyzn w wieku 16-72 lat, średnia 39,8 lat) oraz 17 osób z przewlekłym WZW łącznie HBV i HCV (65 badań u 6 kobiet i 11 mężczyzn w wieku 18-69 lat, średnia 36,9 lat). Grupy porównawcze stanowiły osoby zdrowe opisane w poprzednim rozdziale (134 badania u 117 osób, 55 kobiet i 62 mężczyzn w wieku 16-82 lat, średnia 30,8 lat) oraz 20 osób z autoimmunologicznym zapaleniem wątroby (AIH) (32 badania u 17 kobiet i 3 mężczyzn w wieku 16-66 lat, średnia 32,8 lat).

Uzyskane wartości były uśredniane dla poszczególnych pacjentów. Wyniki przedstawiono na rycinach od 11 do 15 oraz w aneksie 1 od A9 do A11. Różnice średnich wartości limfocytów T i komórek NK nie były istotne statystycznie.

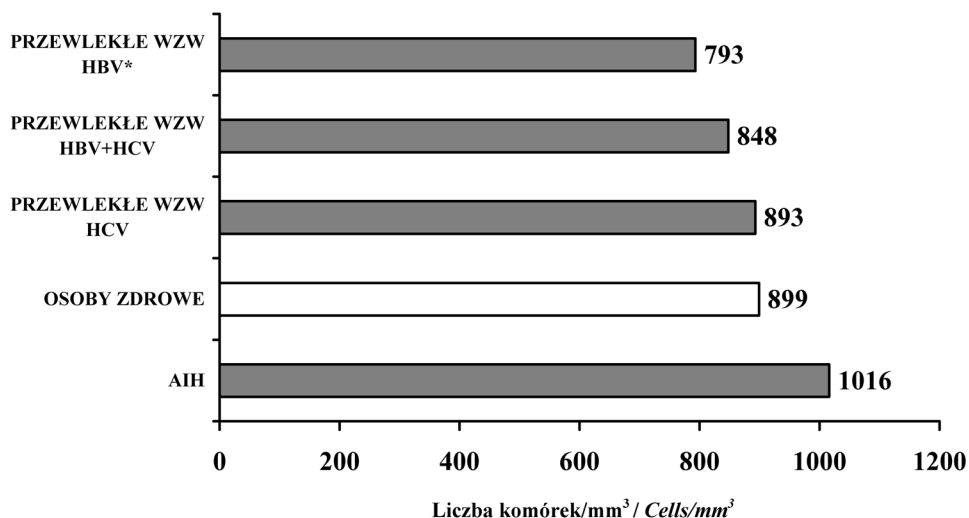


Ryc. 11. Średnia liczba limfocytów B we krwi obwodowej u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby

* różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

Fig. 11. Mean peripheral blood lymphocyte B count in patients with chronic hepatitis; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

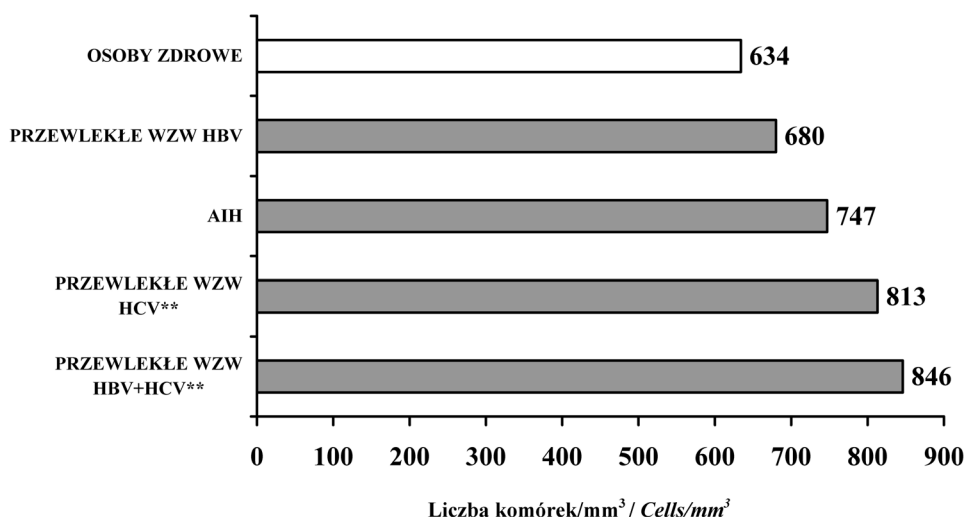


Ryc. 12. Średnia liczba limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby

* znamienność statystyczna w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

Fig. 12. Mean peripheral blood lymphocyte T CD4⁺ count in patients with chronic hepatitis; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

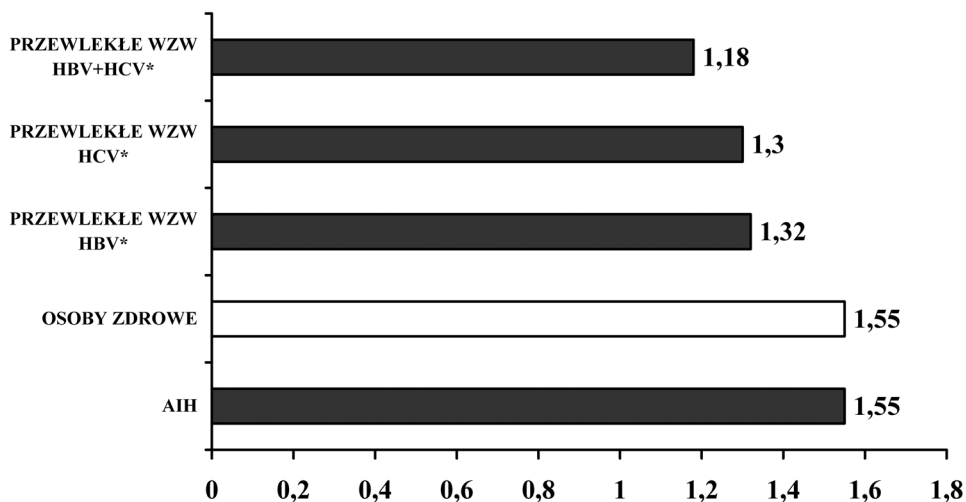


Ryc. 13. Średnia liczba limfocytów T CD8⁺ we krwi obwodowej u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby

** różnica znamienista statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 13. Mean peripheral blood lymphocyte T CD8⁺ count in patients with chronic hepatitis; see annex 2

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)

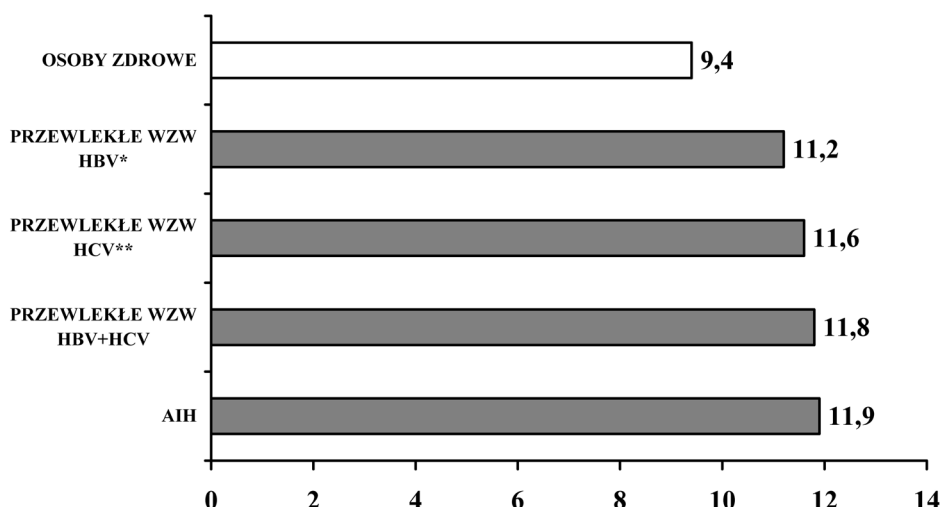


Ryc. 14. Średnia wartość stosunku CD4/CD8 we krwi obwodowej u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby

* znamienność statystyczna w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

Fig. 14. Mean peripheral blood CD4/CD8 ratio in patients with chronic hepatitis; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)



Ryc. 15. Średni odsetek aktywowanych limfocytów T ($CD3^+HLA-DR^+$) we krwi obwodowej u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby

* różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 15. Mean peripheral blood percentage of activated lymphocytes T ($CD3^+HLA-DR^+$) in patients with chronic hepatitis; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)

5.1.5. Zakażenia wywołane wirusami *Herpes*

Charakterystykę pacjentów z zakażeniami wywołanymi przez wirusy z rodziny *Herpesviridae* poddanych badaniom podstawowych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej przedstawiono w tabeli 9. W grupie tej, ze względu na niską liczbę przypadków poszczególnych jednostek chorobowych, uwzględniono także osoby poniżej 16 roku życia. Analizowane przypadki zakażeń *Herpes simplex* dotyczyły osób z nawracającą opryszczką.

Wyniki badań głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej u pacjentów z zakażeniami wywołanymi przez wirusy z rodziny *Herpesviridae* przedstawiono na rycinach 16-21. Odnotowano również nieznacznie statystycznie spadki liczby limfocytów B; nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie liczby limfocytów T $CD4^+$ (patrz aneks 1, ryciny A12 do A13).

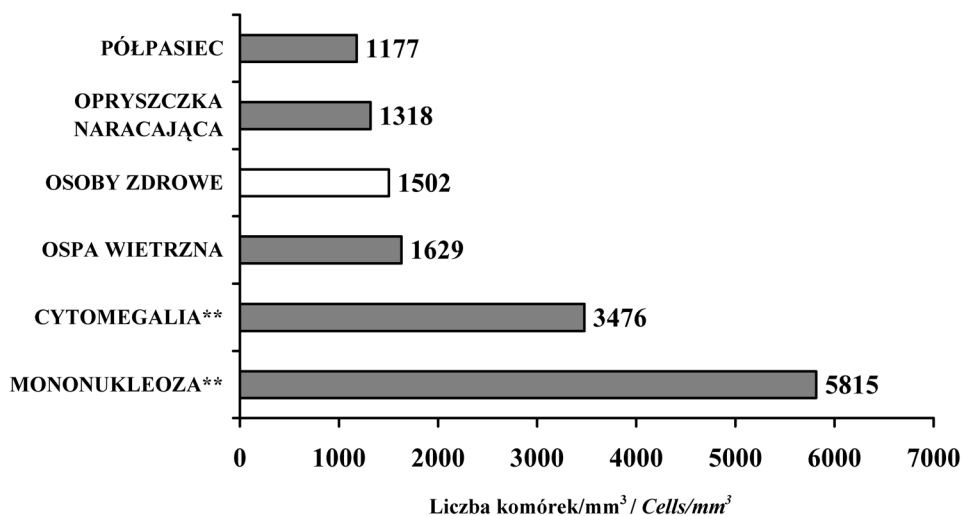
Tabela 9. Charakterystyka pacjentów z zakażeniami wywołanymi wirusami *Herpes* poddanych badaniom subpopulacji limfocytów krwi obwodowej

Table 9. Patients with *Herpes* infections in whom peripheral blood lymphocyte subsets were obtained

Rozpoznanie / <i>Diagnosis</i>	Liczba badanych / <i>Number of cases</i>	Kobiety / <i>Females</i>	Mężczyźni / <i>Males</i>	Średnia wieku / <i>Mean age</i>
Półpasiec / <i>Herpes zoster</i>	9	3	6	58,3*
Mononukleoza / <i>Mononucleosis</i>	8	4	4	20,4*
Ospa wietrzna / <i>Varicella</i>	7	4	3	23,7
Opryszczka nawracająca typ 1 lub 2 / <i>Recurrent Herpes simplex type 1 or 2</i>	6	4	2	42,5
Cytomegalia / <i>Cytomegaly</i>	5	-	5	22,8*
Ogółem / <i>Total</i>	35	15	20	34,9
Osoby zdrowe / <i>Healthy individuals</i>	117	55	62	31,2

* różnica wieku znamienne statystycznie w porównaniu do grupy osób zdrowych

* statistically significant age difference compared to healthy individuals

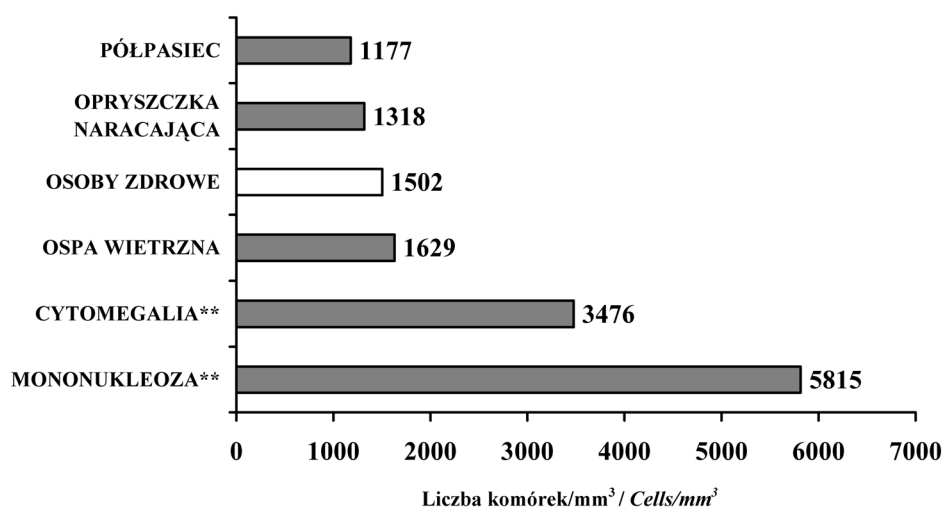


Ryc. 16. Średnia całkowita limfocytoza u pacjentów z zakażeniami wywołanymi wirusami *Herpes*

** różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 16. Mean peripheral blood lymphocytosis in patients with *Herpes* infections; see annex 2

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)

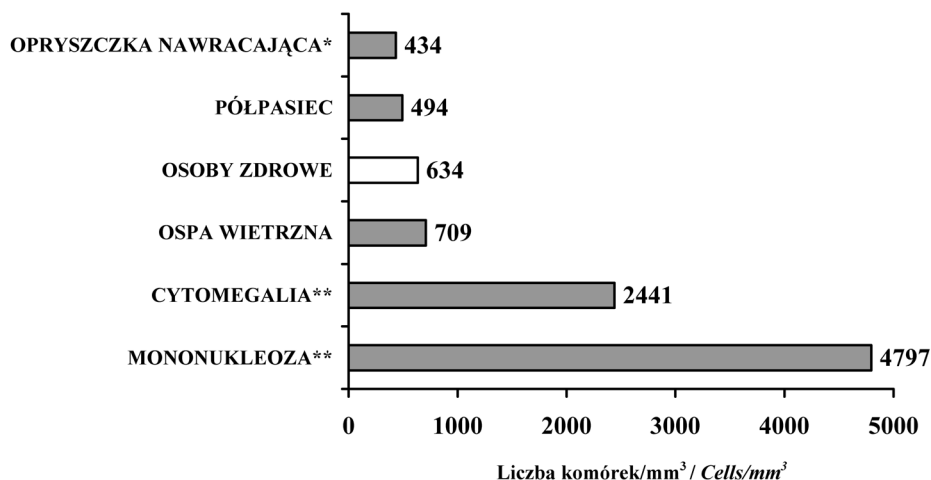


Ryc. 17. Średnia liczba limfocytów T we krwi obwodowej u pacjentów z zakażeniami wywołanymi wirusami *Herpes*

** różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 17. Mean peripheral blood lymphocyte T count in patients with *Herpes* infections; see annex 2

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)



Ryc. 18. Średnia liczba limfocytów T CD8⁺ we krwi obwodowej u pacjentów z zakażeniami wywołanymi wirusami *Herpes*

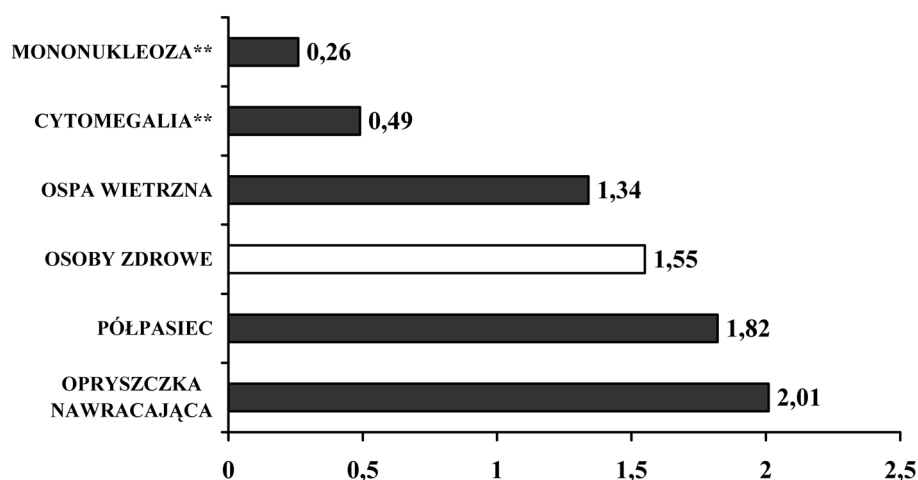
* różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 18. Mean peripheral blood lymphocyte T CD8⁺ count in patients with *Herpes* infections; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)

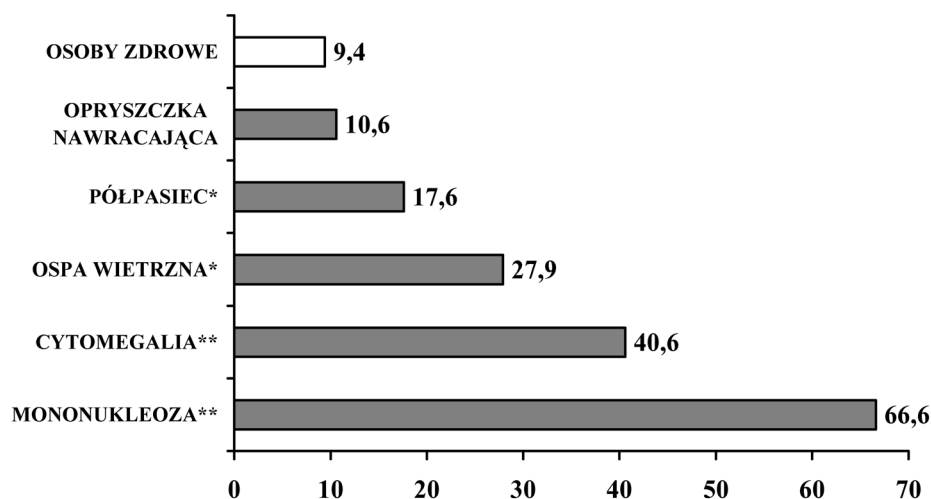


Ryc. 19. Średnia wartość stosunku CD4/CD8 we krwi obwodowej u pacjentów z zakażeniami wywołanymi wirusami *Herpes*

** różnica znamienista statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 19. Mean peripheral blood CD4/CD8 ratio in patients with *Herpes* infections; see annex 2

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)



Ryc. 20. Średni odsetek aktywowanych limfocytów T ($CD3^+HLA-DR^+$) we krwi obwodowej u pacjentów z zakażeniami wywołanymi wirusami *Herpes*

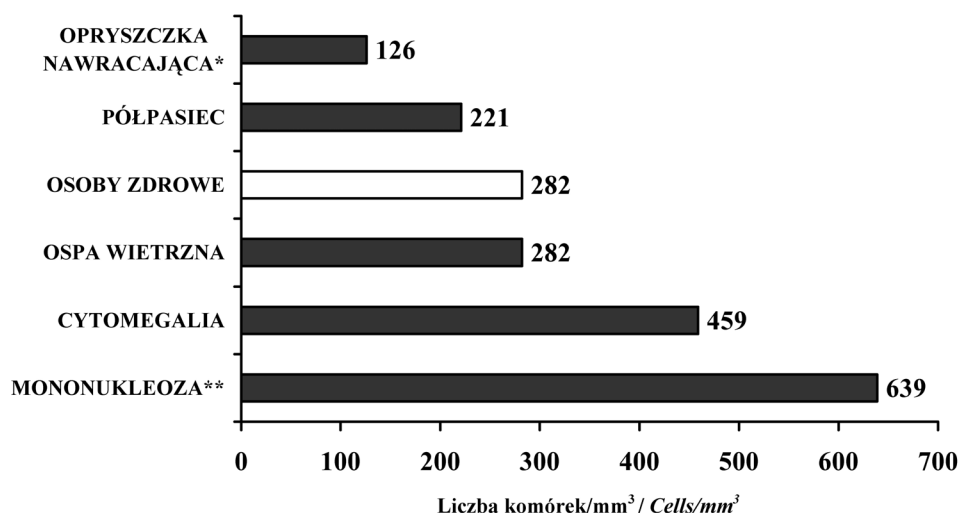
* różnica znamienista statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamienista statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 20. Mean peripheral blood percentage of activated lymphocytes T ($CD3^+HLA-DR^+$) in patients with *Herpes* infections; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)



Ryc. 21. Średnia liczba komórek NK we krwi obwodowej u pacjentów z zakażeniami wywołanymi wirusami *Herpes*

* różnica znamionna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamionna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

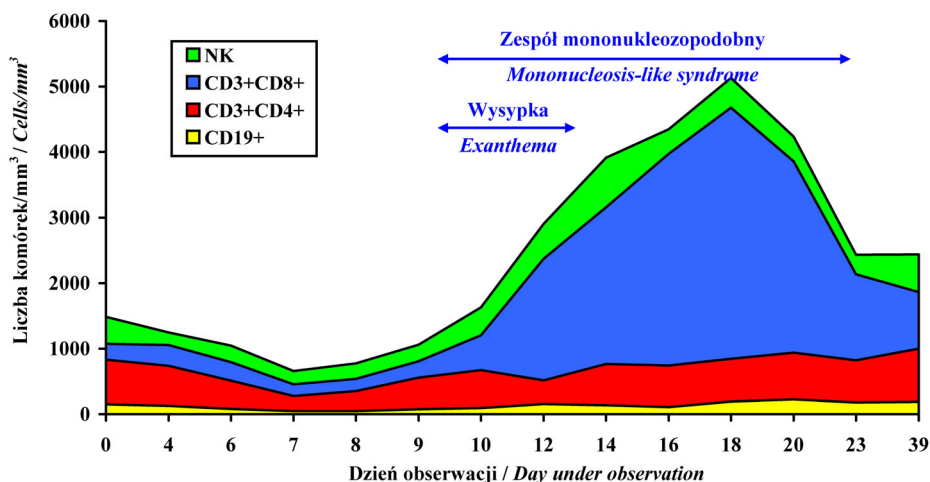
Fig. 21. Mean peripheral blood NK-cells count in patients with Herpes infections; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)

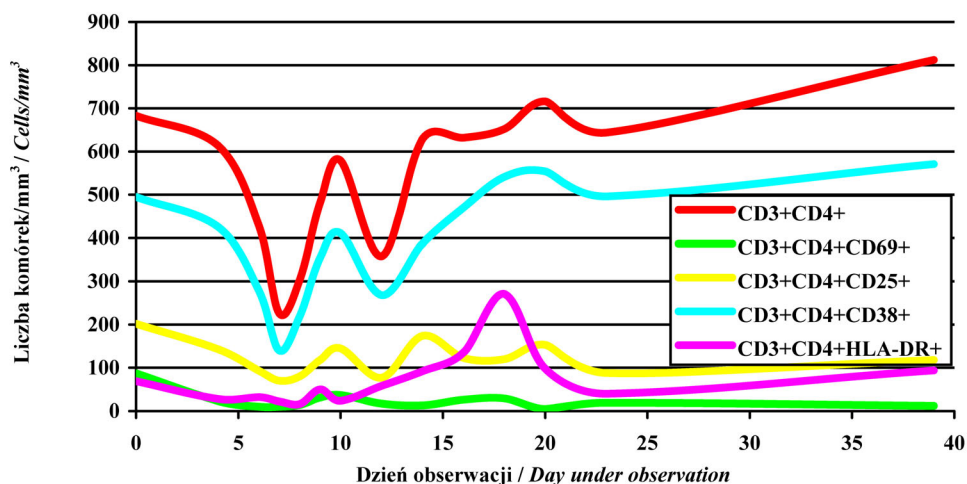
5.1.6. Zakażenie HIV – faza ostra (ostra choroba retrowirusowa)

Analizę zmian w obrębie głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w przebiegu ostrego zakażenia HIV w połączeniu z wybranymi parametrami klinicznymi u 31-letniej kobiety przedstawiono na rycinie 22. Szczegółowe zmiany składu subpopulacji limfocytów w przebiegu omawianego przypadku ostrej choroby retrowirusowej przedstawiono na rycinach 23, 24 i 25.



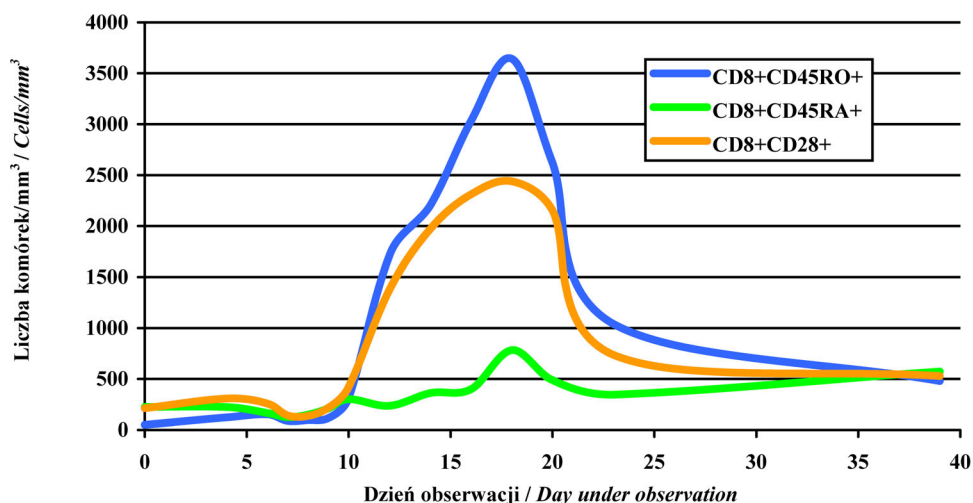
Ryc. 22. Zmiany w składzie głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej obserwowane w przebiegu ostrej choroby retrowirusowej

Fig. 22. Changes in peripheral blood lymphocyte subsets observed in acute retroviral disease



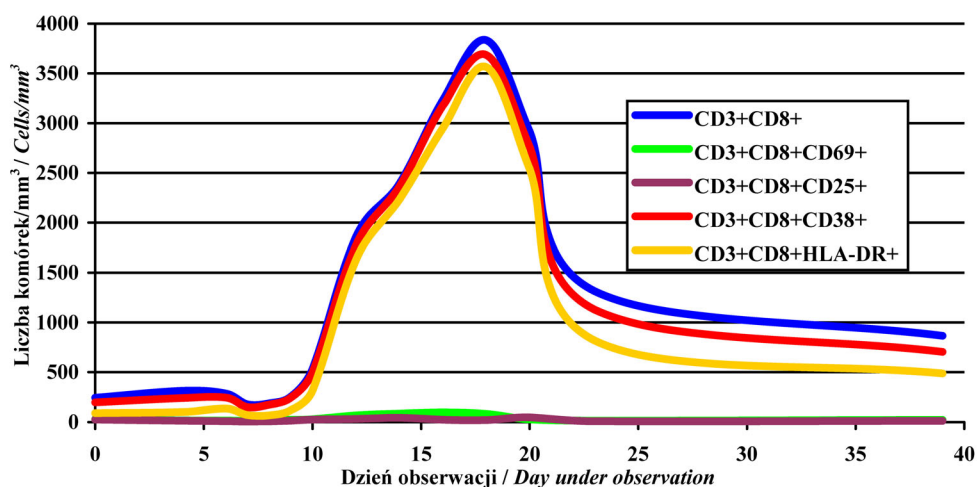
Ryc. 23. Ekspresja markerów aktywacji na limfocytach T CD4⁺ we krwi obwodowej obserwowana u pacjentki z ostrą chorobą retrowirusową

Fig. 23. Activation markers expressed on peripheral blood T CD4⁺ lymphocytes in a course of acute retroviral disease



Ryc. 24. Zmiany w składzie subpopulacji limfocytów $CD8^+$ we krwi obwodowej obserwowane u pacjentki z ostrą chorobą retrowirusową

Fig. 24. Changes in peripheral blood $CD8^+$ lymphocyte subsets observed in a course of acute retroviral disease



Ryc. 25. Ekspresja markerów aktywacji na limfocytach T $CD8^+$ we krwi obwodowej obserwowane u pacjentki z OCR

Fig. 25. Activation markers expressed on peripheral blood T $CD8^+$ lymphocytes in a course of acute retroviral syndrome

Porównanie wyników uzyskanych u pacjentów z ostrą chorobą retrowirusową z innymi przypadkami zespołu mononukleozopodobnego (mononukleozą zakaźną, cytomegalia) i osób zdrowych przedstawiono w tabeli 10 oraz na rycinach od 26 do 33.

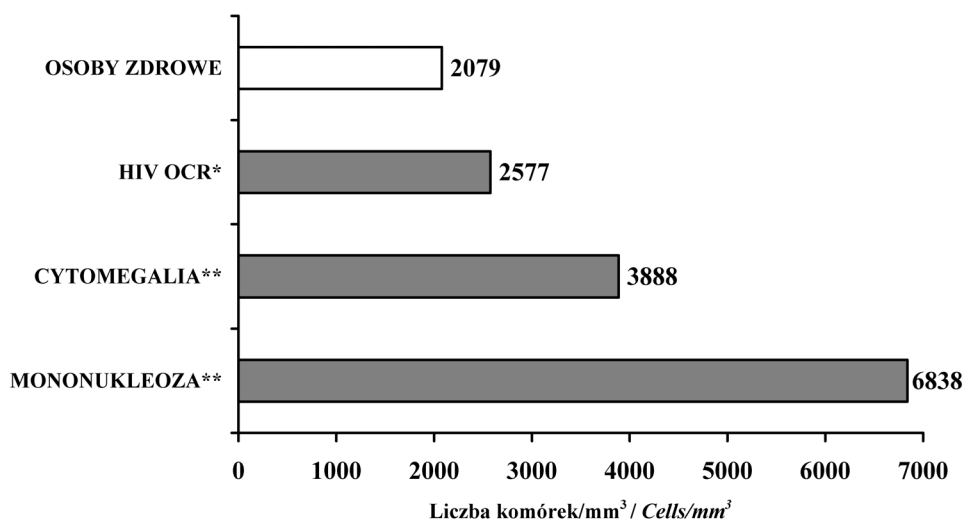
Tabela 10. Charakterystyka dorosłych pacjentów z zespołem mononukleozopodobnym u których przeprowadzono badania subpopulacji limfocytów krwi obwodowej

Table 10. Patients with mononucleosis-like syndrome in whom peripheral blood lymphocyte subsets were obtained

Rozpoznanie/ <i>Diagnosis</i>	Liczba badanych/ <i>Number of cases</i>	Kobiety/ <i>Females</i>	Mężczyźni/ <i>Males</i>	Średnia wieku/ <i>Mean age</i>
Mononukleozą / <i>Mononucleosis</i>	8	4	4	20,4*
HIV OCR / <i>Acute retroviral syndr.</i>	7	3	4	25,3*
Cytomegalia / <i>Cytomegaly</i>	5	-	5	22,8*
Ogółem / <i>Total</i>	20	7	13	22,7*
Osoby zdrowe/ <i>Healthy individuals</i>	117	55	62	31,2

* różnica wieku znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych

* statistically significant age difference compared to healthy individuals



Ryc. 26. Średnia całkowita limfocytoza u pacjentów z zespołem mononukleozopodobnym

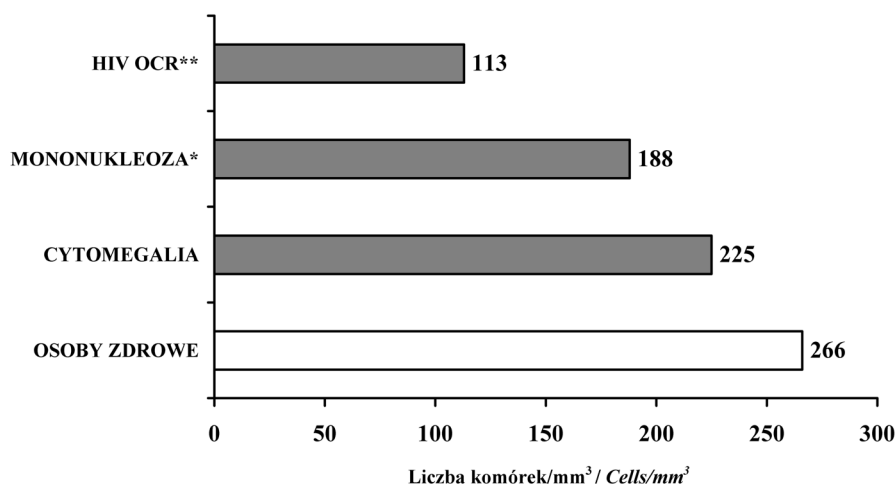
* różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 26. Mean total peripheral blood lymphocytosis in patients with mononucleosis-like syndrome; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)



Ryc. 27. Średnia liczba limfocytów B we krwi obwodowej u pacjentów z zespołem mononukleozopodobnym

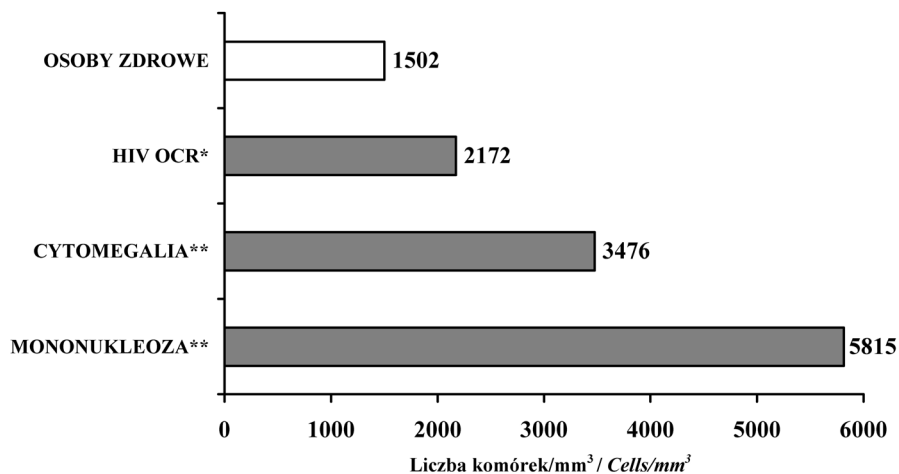
* różnica znamienista statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamienista statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 27. Mean peripheral blood lymphocyte B count in patients with mononucleosis-like syndrome; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)



Ryc. 28. Średnia liczba limfocytów T we krwi obwodowej u pacjentów z zespołem mononukleozopodobnym

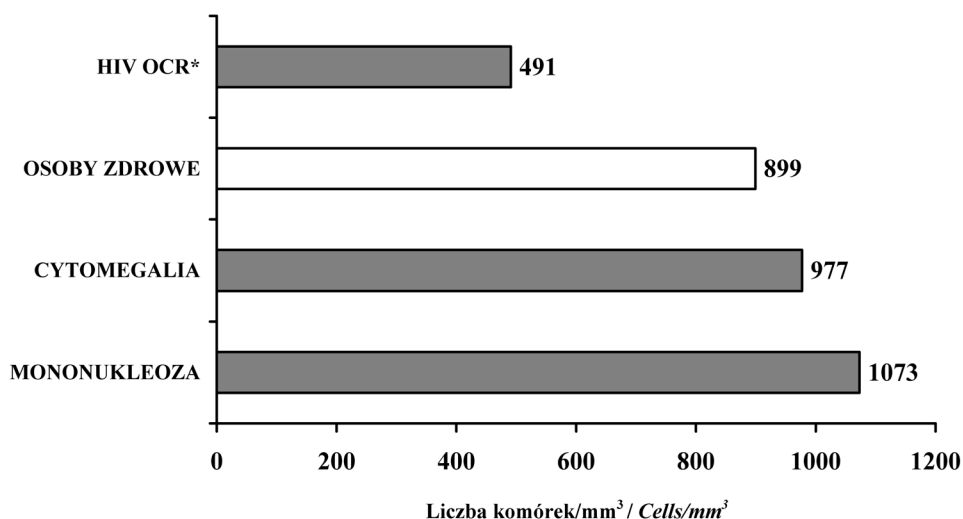
* różnica znamienista statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamienista statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 28. Mean peripheral blood lymphocyte T count in patients with mononucleosis-like syndrome; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)

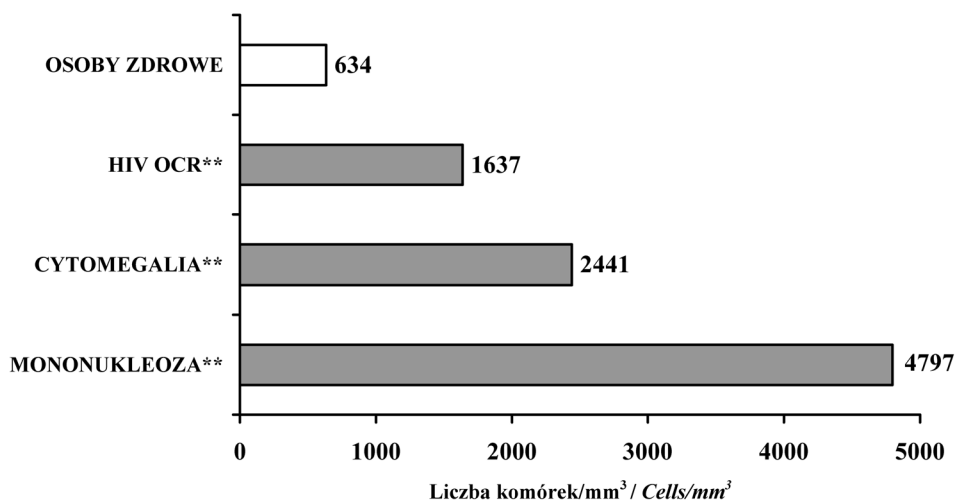


Ryc. 29. Średnia liczba limfocytów T $CD4^+$ we krwi obwodowej u pacjentów z zespołem mononukleozopodobnym

* różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

Fig. 29. Mean peripheral blood lymphocyte T $CD4^+$ count in patients with mononucleosis-like syndrome; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

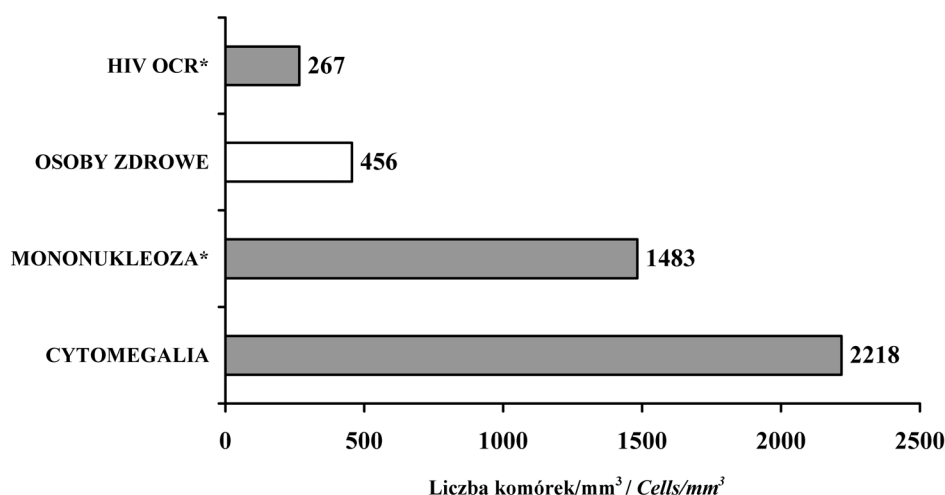


Ryc. 30. Średnia liczba limfocytów T $CD8^+$ we krwi obwodowej u pacjentów z zespołem mononukleozopodobnym

** różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 30. Mean peripheral blood lymphocyte T $CD8^+$ count in patients with mononucleosis-like syndrome; see annex 2

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)

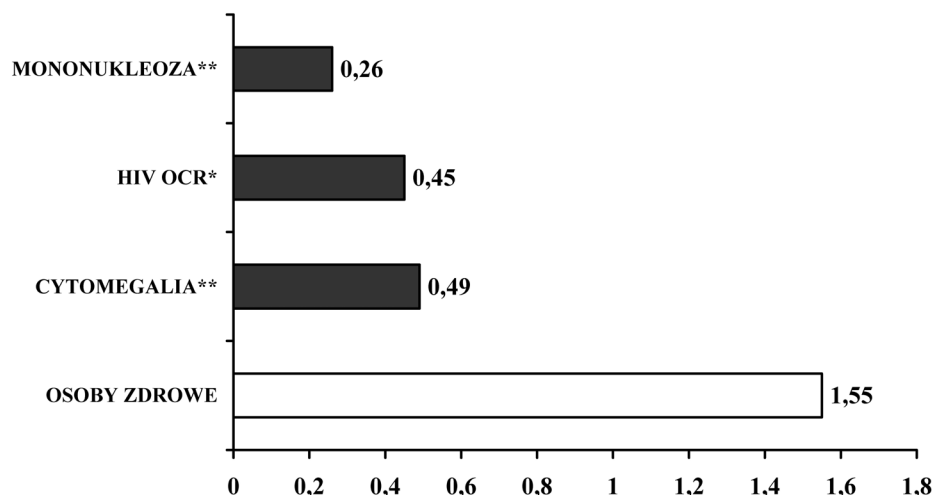


Ryc. 31. Średnia liczba limfocytów $CD8^+CD45RA^+$ we krwi obwodowej u pacjentów z zespołem mononukleozopodobnym

* różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

Fig. 31. Mean peripheral blood lymphocyte $CD8^+CD45RA^+$ count in patients with mononucleosis-like syndrome; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)



Ryc. 32. Średnia wartość stosunku CD4/CD8 we krwi obwodowej u pacjentów z zespołem mononukleozopodobnym

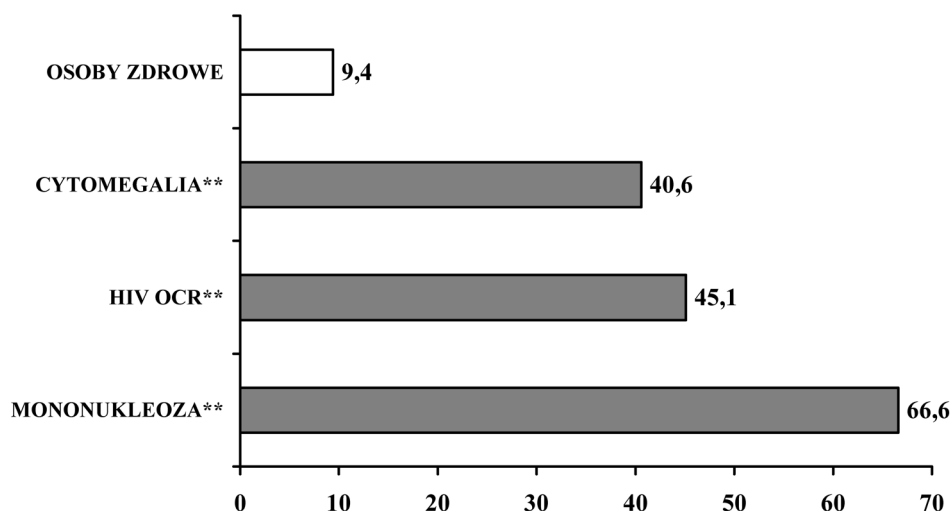
* różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 32. Mean peripheral blood CD4/CD8 ratio in patients with mononucleosis-like syndrome; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)



Ryc. 33. Średni odsetek aktywowanych limfocytów T ($CD3^+HLA-DR^+$) we krwi obwodowej u pacjentów z zespołem mononukleozopodobnym

** różnica znamienista statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 33. Mean percentage of peripheral blood activated T lymphocytes ($CD3^+HLA-DR^+$) in patients with mononucleosis-like syndrome; see annex 2

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)

Ponadto w przebiegu ostrej choroby retrovirusowej, w porównaniu do osób zdrowych, obserwowano znamienne statystycznie wzrost średniej liczby aktywowanych limfocytów T $CD8^+$ subpopulacji $CD38^+$ (1600 vs. 150, ANOVA $p < 0,01$) i $HLA-DR^+$ (1120 vs. 100, test t-Studenta $p = 0,019$), a także subpopulacji $CD8^+CD45RO^+$ (1485 vs. 247, test t-Studenta $p = 0,015$) i $CD3^+CD8^+CD28^+$ (889 vs. 311, test t-Studenta $p < 0,05$). Odnotowano spadki liczby limfocytów T $CD4^+CD45RA^+$ oraz $CD4^+CD45RO^+$, jednak były one najprawdopodobniej odzwierciedleniem ogólnego spadku liczby limfocytów T $CD4^+$. Poza tym nie obserwowano istotnych różnic w obrębie komórek $CD4^+$, ani w odniesieniu do ekspresji markerów $CD69$ i $CD25$ na obu powyższych subpopulacjach (T $CD4^+$ i T $CD8^+$). Nie odnotowano istotnych różnic w zakresie średniej liczby komórek NK.

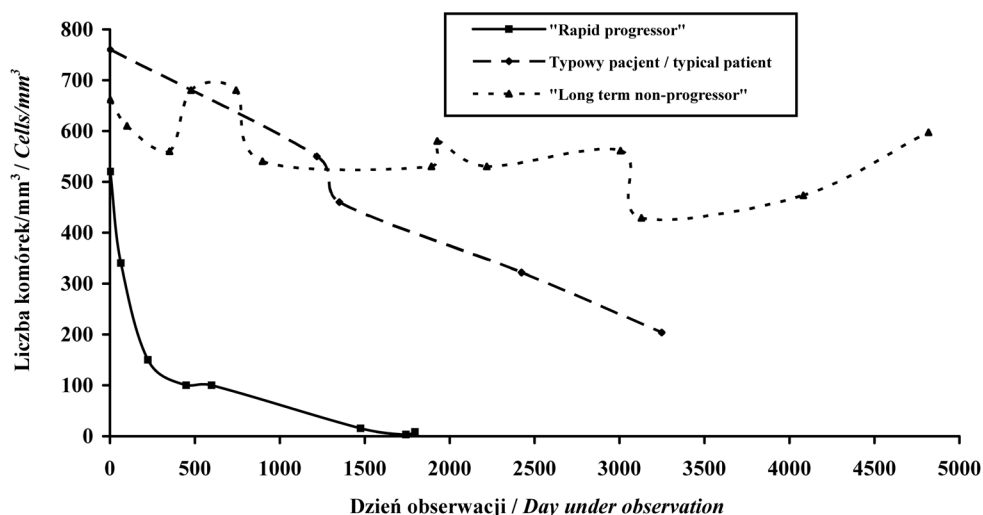
5.1.7. Zakażenie HIV – faza przewlekła; historia naturalna

Wpływ zakażenia HIV na skład głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej oceniano na podstawie 1780 badań przeprowadzonych wśród 572 dorosłych osób zakażonych HIV (122 kobiety i 450 mężczyzn w wieku od 16 do 64 lat, średnia wieku 30,7 roku), którzy nie byli leczeni antyretrowirusowo. W przypadku wykonania u jednego pacjenta wielu oznaczeń – wyniki zostały uśrednione dla poszczególnych osób; przedstawiono je w tabeli 11.

Tabela 11. Porównanie składu głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej u pacjentów zakażonych HIV nieleczonych antyretrowirusowo oraz osób zdrowych
Table 11. Main peripheral blood lymphocyte subsets in HIV-infected patients compared to healthy individuals – mean absolute counts and percentages

Subpopulacje limfocytów/ <i>Lymphocyte subsets</i>	Średnia/ <i>Mean</i> ($\pm$ SD)		Znamienność statystyczna/ <i>Statistical significance</i>
	Pacjenci HIV(+)/ <i>HIV (+) cases</i>	Osoby zdrowe/ <i>Healthy persons</i>	
Liczba komórek/mm ³ / <i>Number of cells/mm³</i>			
Limfocytoza / <i>Lymphocytosis</i>	1825	2079	ANOVA p<0,00001
	$\pm$ 757)	$\pm$ 497)	
CD19 ⁺ /mm ³	166	266	ANOVA p<0,00001
	$\pm$ 121)	$\pm$ 113)	
CD3 ⁺ /mm ³	1386	1502	ANOVA p=0,01886
	$\pm$ 683)	$\pm$ 406)	
CD4 ⁺ /mm ³	398	899	Test t-Studenta p<0,00001
	$\pm$ 253)	$\pm$ 258)	
CD8 ⁺ /mm ³	1045	634	ANOVA p<0,00001
	$\pm$ 489)	$\pm$ 230)	
CD4/CD8	0,41	1,55	ANOVA p<0,00001
	$\pm$ 0,27)	$\pm$ 0,57)	
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ /mm ³	589	192	ANOVA p<0,00001
	$\pm$ 407)	$\pm$ 128)	
NK/mm ³	170	282	Test t-Studenta p<0,00001
	$\pm$ 134)	$\pm$ 130)	
Procent całkowitej limfocytozy / <i>Percentage of total lymphocytosis</i>			
%CD19 ⁺	10,5	12,9	ANOVA p=0,0000468
	$\pm$ 6,3)	$\pm$ 4,6)	
%CD3 ⁺	79,3	73,2	ANOVA p<0,00001
	$\pm$ 9,5)	$\pm$ 6,3)	
%CD4 ⁺	20,8	43,2	ANOVA p<0,00001
	$\pm$ 9,8)	$\pm$ 9,5)	
%CD8 ⁺	57,9	30,2	ANOVA p<0,00001
	$\pm$ 11,3)	$\pm$ 7,2)	
%CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	35,2	9,4	ANOVA p<0,00001
	$\pm$ 13,5)	$\pm$ 5,9)	
%NK	10,7	13,8	Test t-Studenta p<0,00001
	$\pm$ 7,2)	$\pm$ 6,1)	
Wiek / <i>Age</i>	30,9	31,2	n.s.
Liczba osób / <i>Number of cases</i>	572	117	

Należy podkreślić, że przytoczone wyniki przedstawiają jedynie wartości średnie, natomiast skład głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej podlega znaczącym zmianom w miarę trwania zakażenia HIV. Zasadniczym problemem jaki napotykamy w opisie tych zmian w czasie stanowi fakt, iż większość pacjentów nie potrafi określić, nawet w przybliżeniu, momentu w którym doszło do zakażenia. Dlatego w niniejszym opracowaniu ocenę początkowego okresu zakażenia HIV przeprowadzono przyjmując za punkt wyjścia dzień wykonania pierwszego oznaczenia liczby limfocytów T CD4⁺, a następnie podjęto próbę określenia momentu zakażenia (uśrednionego dla całej populacji) metodami matematycznymi. Ponadto istotnym utrudnieniem były znaczne wahania liczby CD4 pomiędzy kolejnymi pobraniami krwi u indywidualnych pacjentów, a także znaczące różnice pod względem tempa zmian liczby limfocytów T CD4⁺ w czasie pomiędzy poszczególnymi pacjentami (patrz rycina 34).

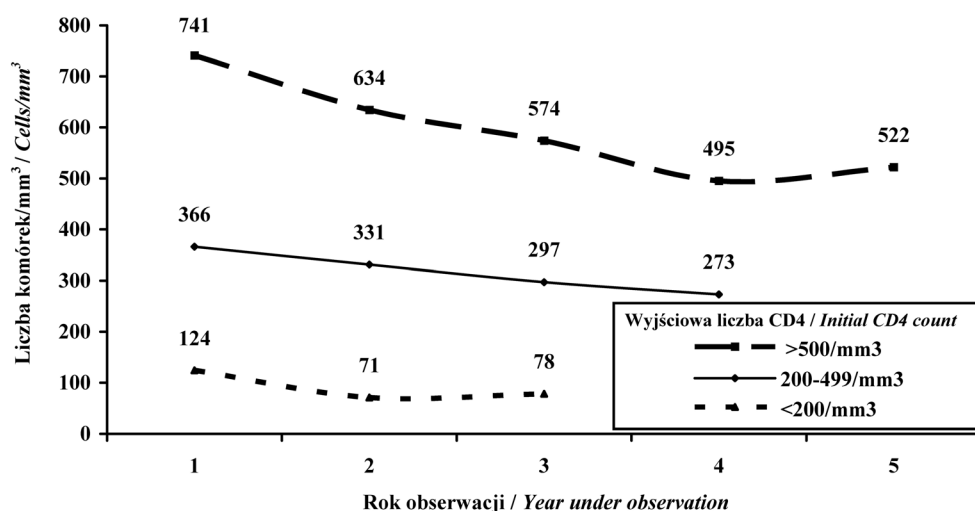


Ryc. 34. Przykładowe zmiany liczby CD4 we krwi obwodowej u wybranych osób zakażonych HIV, nieleczonych antyretrowirusowo

Fig. 34. Examples of peripheral blood CD4 count changes in HIV-infected untreated patients

Analizy zmian liczby limfocytów T CD4⁺ w początkowej fazie zakażenia HIV dokonano na podstawie 1025 wyników badań uzyskanych u 137 nieleczonych osób zakażonych HIV (30 kobiet i 107 mężczyzn w wieku od 16 do 57 lat, średnia wieku 31,3 lata) obserwowanych przez okres co najmniej 2 lat. Uzyskane wyniki – w zależności od wyjściowej wartości liczby limfocytów T CD4⁺ przedstawiono na rycinie 35. Średnie tempo spadku liczby limfocytów T CD4⁺ u pacjentów z wyjściową liczbą CD4 powyżej 500 komórek/mm³ w pierwszych czterech latach obserwacji wyniosło -80 komórek CD4⁺/mm³/rok (-10,8%/rok). W grupie z wyjściową liczbą CD4 pomiędzy 200 a 499/mm³ wartość ta była niższa i wynosiła -31 komórek CD4⁺/mm³/rok (-8,5%/rok). Natomiast w grupie z wyjściową liczbą CD4 poniżej 200/mm³ w pierwszych 3 latach

obserwacji wartość ta była procentowo ponownie wyższa i wyniosła odpowiednio -23 komórki T CD4⁺/mm³/rok i -18,5%/rok.



Ryc. 35. Zmiany średniej liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej u osób zakażonych HIV, nieleczonych, w zależności od wyjściowej wartości liczby CD4

Fig. 35. Changes of mean peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count in HIV-infected, untreated patients, in relation to initial value of CD4 count

Sumarycznie wyniki uzyskane łącznie dla wszystkich pacjentów – uśrednione dla poszczególnych osób i kolejnych lat obserwacji – przedstawiono na rycinie 36. W analizowanej grupie osób sumaryczną linię trendu zmian średniej liczby limfocytów T CD4⁺ w pierwszych czterech latach obserwacji dało się opisać następującym równaniem matematycznym:

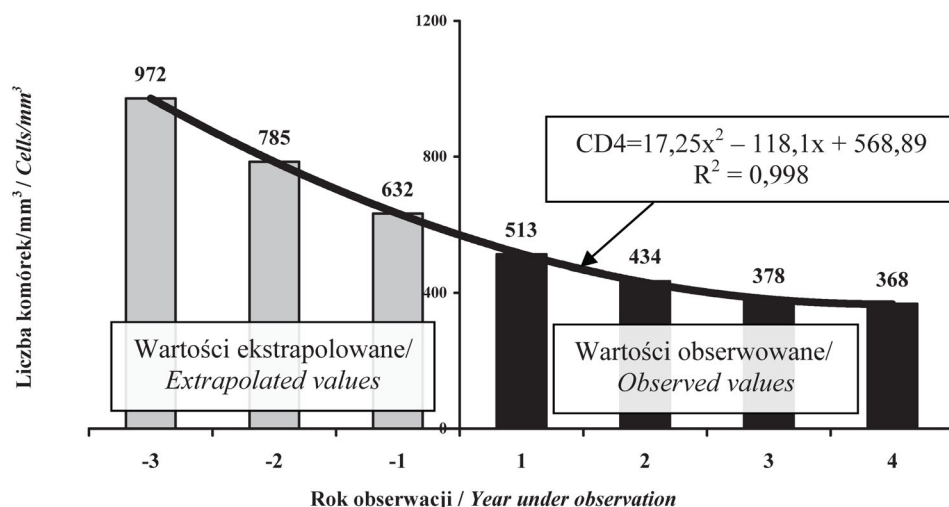
$$CD4 = 17,25x^2 - 118,1x + 568,89 \quad (R^2 = 0,998)$$

gdzie x=okres obserwacji (w latach). Na podstawie ekstrapolacji powyższego równania można wyliczyć, że wartość 899 limfocytów T CD4⁺/mm³ (średnia wartość dla osób zdrowych, niezakażonych HIV) występowała w analizowanej grupie chorych w okresie -2,13 roku przed rozpoczęciem obserwacji.

Rycina 37 przedstawia średnie wartości liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej **wyliczone** dla kolejnych lat po zakażeniu. Wyliczenia przeprowadzono z zastosowaniem ww. równania, przyjmując następujące dwa założenia:

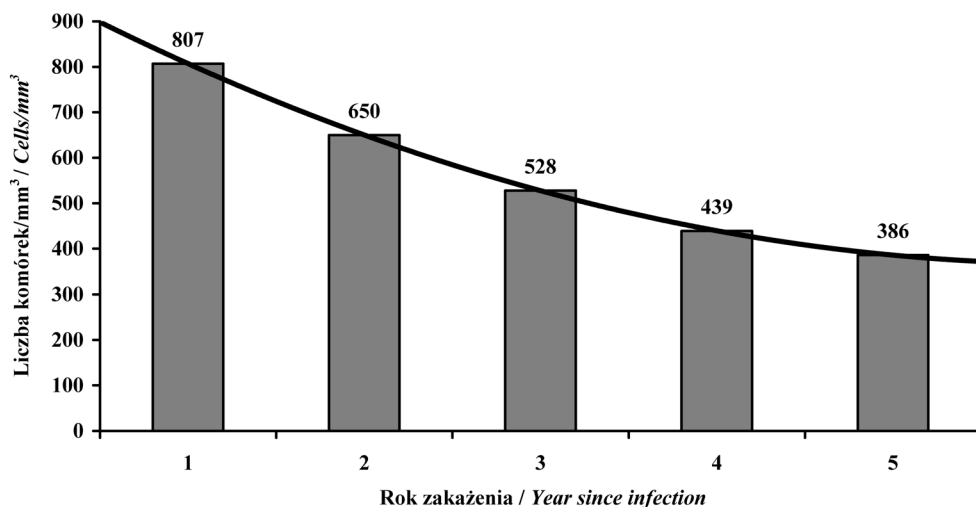
- średnia wyjściowa liczba CD4 wynosiła 899/mm³
- zakażenie HIV nastąpiło średnio -2,13 roku przed rozpoczęciem obserwacji.

Powyższe równanie może być jednak stosowane jedynie w ocenie okresu do 5 lat po zakażeniu (powyżej tego okresu zastosowane równanie daje w wyniku stopniowy wzrost liczby limfocytów T CD4⁺, niezgodny z wartościami obserwowanymi), a więc nie jest przydatne do opisu schyłkowego okresu zakażenia HIV.



Ryc. 36. Zmiany średniej liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej u osób zakażonych HIV, nieleczonych, w kolejnych latach obserwacji

Fig. 36. Changes of mean peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count in HIV-infected, untreated patients, observed in consecutive years



Ryc. 37. Przewidywane średnie wartości liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w analizowanej grupie nieleczonych osób zakażonych HIV w pierwszych 5 latach po zakażeniu

Fig. 37. Predicted mean values of peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count in analyzed HIV-infected untreated patients within initial 5 years of infection

W celu oceny końcowego etapu historii naturalnej zakażenia HIV, obejmującego okres ostatnich 5 lat przed zgonem pacjenta, przeprowadzono retrospektywną analizę wyników 474 badań subpopulacji limfocytów krwi obwodowej uzyskanych u 77 chorych zakażonych HIV, nieleczonych antyretrowirusowo, którzy zmarli w wyniku zakażenia HIV. Było to 17 kobiet i 60 mężczyzn w wieku od 18 do 64 lat (średnia wieku: 35,5 lat). Całość uzyskanych wyników, wraz z linią trendu, przedstawiono na rycinie 38. Wartości uśrednione dla poszczególnych chorych i okresów przeżycia przedstawiono na rycinie 39 oraz w tabeli 12; zwracają uwagę duże wartości odchyłeń standardowych.

Na rycinie 39 na osi odciętych przedstawiono odwrotność czasu przeżycia. W okresie 2–3 lat przed zgonem obserwowano wyraźny wzrost tempa spadku liczby limfocytów T CD4⁺, podczas gdy w poprzedzających latach było ono stosunkowo niewielkie.

Połączenie ze sobą wykresów 37 i 39 pozwala na sumaryczne odtworzenie przybliżonego, uśrednionego przebiegu historii naturalnej zakażenia HIV w badanej grupie pacjentów (patrz rycina 40). Na wykresie tym można wyróżnić trzy następujące po sobie fazy zmian liczby limfocytów T CD4⁺:

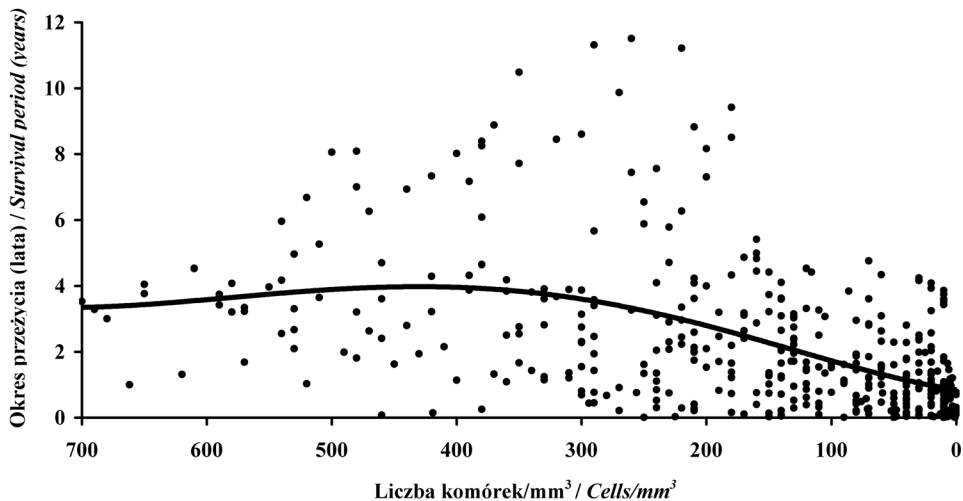
- początkowy, stosunkowo szybki, spadek liczby limfocytów T CD4⁺
- stabilizacja/niewielkie zmiany w zakresie tej subpopulacji,
- ponowny wzrostu tempa spadku liczby CD4 w okresie 2–3 lat przed zgonem.

Tabela 12. Średnie wartości liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej u 77 nieleczonych pacjentów zmarłych z powodu zakażenia HIV, w zależności od okresu przeżycia

Table 12. Mean values of peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count among 77 untreated patients who died due to HIV infection, in relation to their survival period

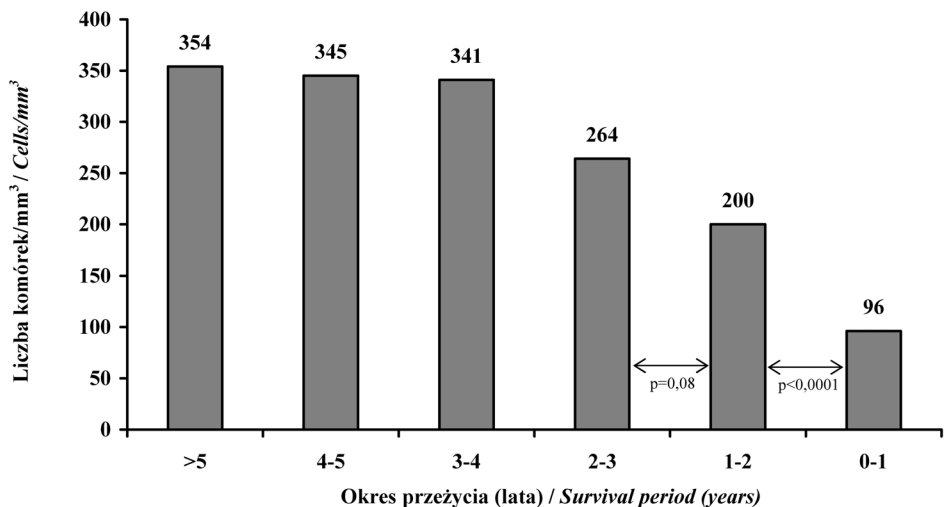
Średni okres przeżycia (lata)/ <i>Mean survival period (years)</i>	>5	4-5	3-4	2-3	1-2	<1
Średnia liczba CD4 ± SD / <i>Mean CD4 count ± SD</i>	354 ±133	345 ±235	341 ±196	264 ±179	200 ±175	96 ±114
Średnia zmiana liczby CD4 [%]/ <i>Mean CD4 count change [%]</i>	...	-2,5	-1,2	-22,6	-24,2	-52,2

Analizę przydatności oznaczania liczby limfocytów T CD4⁺ krwi obwodowej do oceny rokowania co do życia u pacjentów zakażonych HIV (nieleczonych antyretrowirusowo) przedstawiono na rycinie 41. Stanowi ona w swojej istocie odwrócenie analizy zawartej na rycinie 39 – tak aby była przydatna dla lekarza praktyka w określeniu rokowania.



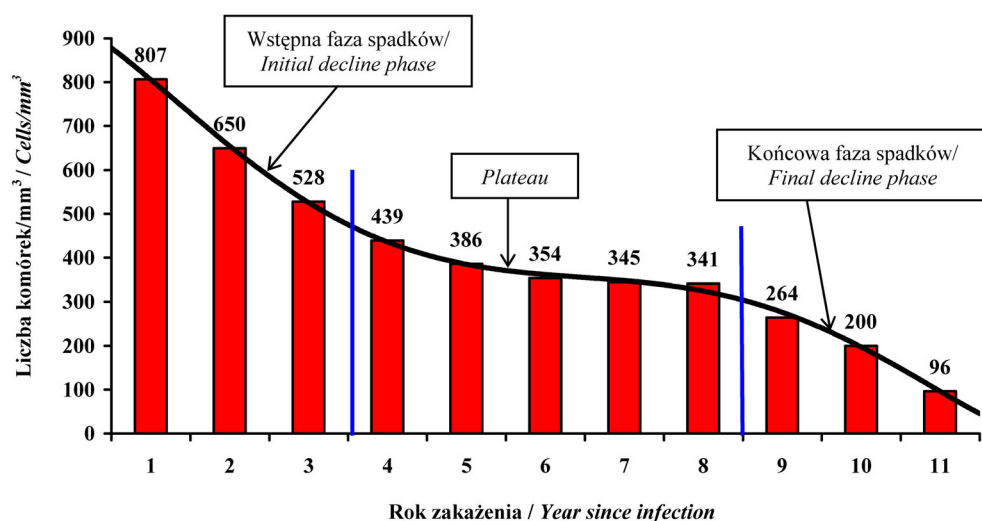
Ryc. 38. Okres przeżycia u 77 nieleczonych pacjentów zmarłych z powodu zakażenia HIV, w zależności od liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej

Fig. 38. Survival period in 77 untreated patients who died due to HIV infection, in relation to their peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count

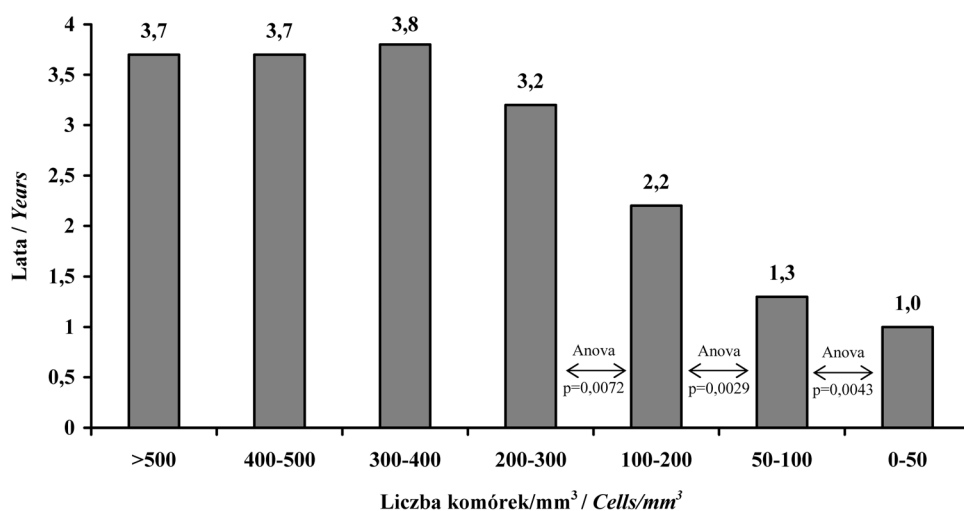


Ryc. 39. Zmiany średniej wartości liczby CD4 we krwi obwodowej u 77 nieleczonych pacjentów zmarłych z powodu zakażenia HIV w zależności od okresu przeżycia

Fig. 39. Changes of peripheral blood CD4 count among 77 untreated patients who died due to HIV infection in relation to their survival period



Ryc. 40. Historia naturalna zakażenia HIV w badanej grupie pacjentów
 Fig. 40. Natural history of HIV infection in analyzed group of patients



Ryc. 41. Ocena okresu przeżycia w zależności od liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w analizowanej grupie osób zakażonych, nieleczonej HAART
 Fig. 41. Predicted life-expectancy in analyzed group of HIV-infected patients with no antiretroviral therapy, in relation to peripheral blood CD4 count

Ponadto analizę przydatności zastosowania liczby bezwzględnej limfocytów T CD4⁺ w ocenie rokowania co do życia u pacjentów zakażonych HIV przeprowadzono na pod-

stawie 1558 oznaczeń tego parametru u 305 pacjentów nigdy nieleczonych antyretrowirusowo. Wyniki przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Zależność pomiędzy liczbą limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej a ryzykiem zgonu

Table 13. Relationship between peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count and a risk of death

Liczba CD4/ CD4 count	Okres przeżycia (miesiące)/ Survival period (months)		Ogółem/ Total
	< 6	> 6	
≤200/mm ³	95	361	456
>200/mm ³	16	1086	1102
Ogółem / Total	111	1447	1558

OR=17,86 (95% przedział ufności/confidence interval: 10,12-31,97);

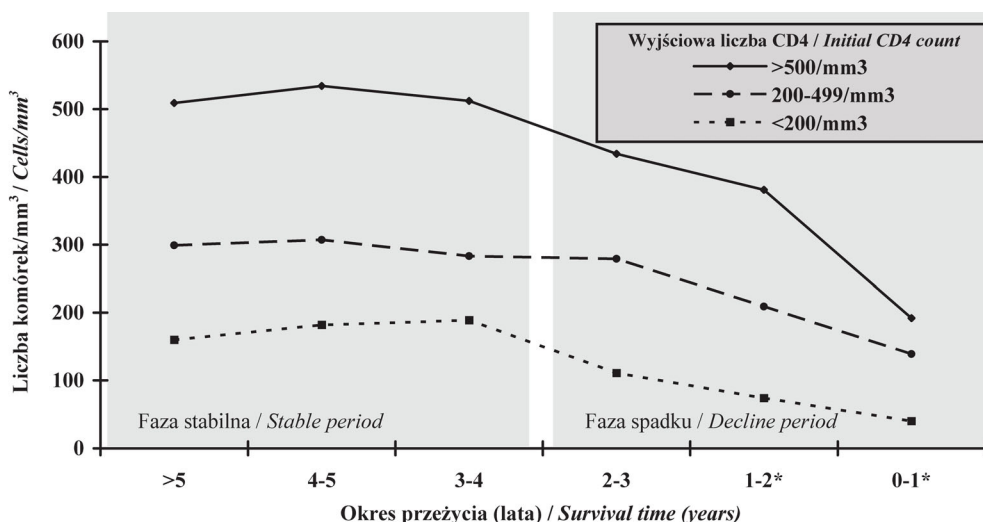
Mantel-Haenszel $\chi^2=182,98$, $p<0,0000001$

czułość/sensitivity: 0,86; swoistość/specificity: 0,75; PPV: 0,21; NPV: 0,98

W powyższej tabeli zwraca uwagę wysoka wartość predykcji wyników ujemnych (NPV) i wyjątkowo niska wartość predykcji wyników dodatnich (PPV) w odniesieniu do relacji pomiędzy niską liczbą CD4 ($\leq 200/\text{mm}^3$) a ryzykiem zgonu w ciągu 6 miesięcy. Wyjaśnienie tej obserwacji zawarto na rycinie 42, na której przedstawiono średnie wartości liczby limfocytów T CD4⁺ w zależności od okresu przeżycia (dane przedstawione już uprzednio na rycinie 39, przy czym zastosowano podział na grupy w zależności od wyjściowej wartości liczby limfocytów T CD4⁺ w pierwszym badaniu).

Pomimo stosunkowo niewielkiej liczebności analizowanych podgrup – we wszystkich obserwowano początkowo fazę stosunkowo stabilnych wartości liczby CD4, z następowym spadkiem w okresie poprzedzającym zgon. Ponadto zwraca uwagę grupa osób, które utrzymywały stabilnie niską wartość liczby limfocytów T CD4⁺ (wartości średnie poniżej $200/\text{mm}^3$), a mimo to ich okres przeżycia był porównywalny z osobami utrzymującymi stabilnie znacznie wyższe wartości CD4. Nasuwa to sugestię, że o rokowaniu decyduje nie tylko sama liczba CD4, ale także tempo jej spadku w czasie.

Ocenę wpływu tempa spadku liczby limfocytów T CD4⁺ na rokowanie co do życia u osób zakażonych HIV przedstawiono w tabeli 14 na podstawie analizy 776 pomiarów zmiany liczby limfocytów T CD4⁺ (wyrażonej w procentach, w porównaniu do poprzedzającego badania, w przeliczeniu na 1 rok obserwacji) u 77 pacjentów zakażonych HIV, nigdy nieleczonych antyretrowirusowo. Odstęp pomiędzy analizowanymi pomiarami wynosił od 90 do 720 dni.



Ryc. 42. Średnia liczba limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w zależności od okresu przeżycia i wyjściowej wartości liczby CD4

* różnica znamienista statystycznie (test t-Studenta $p < 0,05$)

Fig. 42. Mean peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count by survival period and initial CD4 count

* statistically significant difference (Student's t-test $p < 0.05$)

Tabela 14. Wpływ tempa spadku liczby limfocytów T CD4⁺ na ryzyko zgonu

Table 14. Relationship between rate of CD4 count decline and a risk of death

Tempo spadku liczby CD4/ CD4 count decline rate	Okres przeżycia (miesiące)/ Survival period (months)		Ogółem/ Total
	<6	>6	
Większe niż -60%/rok Greater than -60%/year	20	132	152
Mniejsze niż -60%/rok Less than -60%/year	17	607	624
Ogółem /Total	37	739	776

OR=5,41 (95% przedział ufności/confidence interval: 2,63-11,16);

Mantel-Haenszel $\chi^2=29,26$, $p=0,0000001$

czułość/sensitivity: 0,54; swoistość/specificity: 0,82; PPV: 0,13; NPV: 0,97

Rezultaty analizy zmian liczby limfocytów T CD8⁺, stosunku CD4/CD8, limfocytów B, komórek NK i odsetka aktywowanych limfocytów T w kolejnych latach obserwacji początkowego okresu zakażenia HIV u 137 nieleczonych osób zakażonych HIV obserwowanych przez okres co najmniej 2 lat przedstawiono na rycinach A14 i A15 (patrz Aneks). Analogiczne dane dla końcowego okresu zakażenia u 77 nieleczonych antyretrowirusowo pacjentów zmarłych z powodu choroby HIV/AIDS przedstawiono na rycinach A16 i A17. Wyniki uśredniono dla poszczególnych pacjentów i okresów ob-

serwacji/przeżycia. Ponieważ w żadnej z powyższych analiz nie wykazano jednoznacznych trendów ani istotnych zależności statystycznych - dlatego też wyników tych nie przedstawiono szczegółowo.

5.1.8. Infekcje oportunistyczne i inne jednostki chorobowe występujące w przebiegu zakażenia HIV

Charakterystykę pacjentów dorosłych (powyżej 16 roku życia) zakażonych HIV, u których rozpoznano infekcje oportunistyczne (a także inne, wybrane jednostki chorobowe występujące u osób zakażonych HIV – małopłytkowość, postępującą wieloogniskową leukoencefalopatię – PML, ropnie poinfekcyjne) i przeprowadzono badania podstawowych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej przedstawiono w tabeli 15. Grupę porównawczą każdorazowo stanowiły osoby zakażone HIV, u których nie wykazano odpowiednich jednostek chorobowych. Osoby, u których występowało więcej niż jedno zakażenie oportunistyczne były uwzględniane odrębnie w każdej z analiz.

Tabela 15. Charakterystyka dorosłych pacjentów z infekcjami oportunistycznymi i innymi wybranymi jednostkami chorobowymi występującymi w przebiegu zakażenia HIV poddanych badaniom subpopulacji limfocytów krwi obwodowej

Table 15. Analyzed HIV-infected adult patients with opportunistic infections and other selected disorders in whom peripheral blood lymphocyte subsets were evaluated

Rozpoznanie/ <i>Diagnosis</i>	Liczba badanych/ <i>Number of cases</i>	Kobiety/ <i>Females</i>	Mężczyźni/ <i>Males</i>	Średnia wieku/ <i>Mean age</i>	Liczba oznaczeń/ <i>Number of samples</i>
Kandydoza przełyku/ <i>Esophageal candidiasis</i>	139	23	116	35,3*	210
Zapalenie płuc/ <i>Bacterial pneumonia</i>	121	22	99	34,6*	178
Ropnie poinfekcyjne/ <i>Post-injection abscesses</i>	68	11	57	34,0*	78
TBC / <i>Tuberculosis</i>	48	10	38	34,8*	79
PCP	39	12	27	37,3*	45
Posocznica / <i>Sepsis</i>	36	7	29	35,7*	41
Małopłytkowość/ <i>Thrombocytopenia</i>	27	5	22	37,0*	38
<i>Herpes zoster</i>	24	9	15	38,3*	27
Toksoplazmoza mózgu/ <i>Brain toxoplasmosis</i>	21	5	16	36,4*	49
CMV <i>retinitis</i>	20	6	14	36,3*	38
PML	12	4	8	39,3*	22
MAC	11	1	10	32,6	19
Kryptokokoza mózgu/ <i>Brain cryptococcosis</i>	4	1	3	31,3	12

* różnica znamionna statystycznie w porównaniu do osób zakażonych HIV bez danej infekcji oportunistycznej

* statistically significant difference compared to HIV-infected individuals with no given opportunistic infection

Uzyskane wyniki – wartości średnie oraz 90 percentyl liczby limfocytów T CD4⁺ – u pacjentów z zakażeniami oportunistycznymi i innymi jednostkami chorobowymi występującymi u osób zakażonych HIV przedstawiono na rycinach 43, 44. W przypadku kilkakrotnego przeprowadzenia badania u tej samej osoby – wartości dla poszczególnych pacjentów zostały uśrednione. Na rycinie 44 przedstawiono podział tych zakażeń na dwie podgrupy: występujące poniżej wartości 560 oraz poniżej 200 limfocytów T CD4⁺/mm³.

Wyniki badań pozostałych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej umieszczono w aneksie – ryciny od A18 do A24. Obserwowane znamienne niższe wartości większości z tych subpopulacji były w dużej mierze związane z towarzyszącym spadkiem liczby CD4. Szczegółową analizę rang poszczególnych zakażeń oportunistycznych i innych jednostek chorobowych dla kolejnych subpopulacji limfocytów przedstawiono w tabeli 16. Jako wzorcową przyjęto kolejność rang w zakresie średnich wartości limfocytów T CD4⁺. Przyjmując za istotną różnicę rang większą niż ± 5 stwierdzono, że jedynie w nielicznych przypadkach występowanie danego zakażenia oportunistycznego mogło mieć związek ze zmianą liczby limfocytów innych niż T CD4⁺.

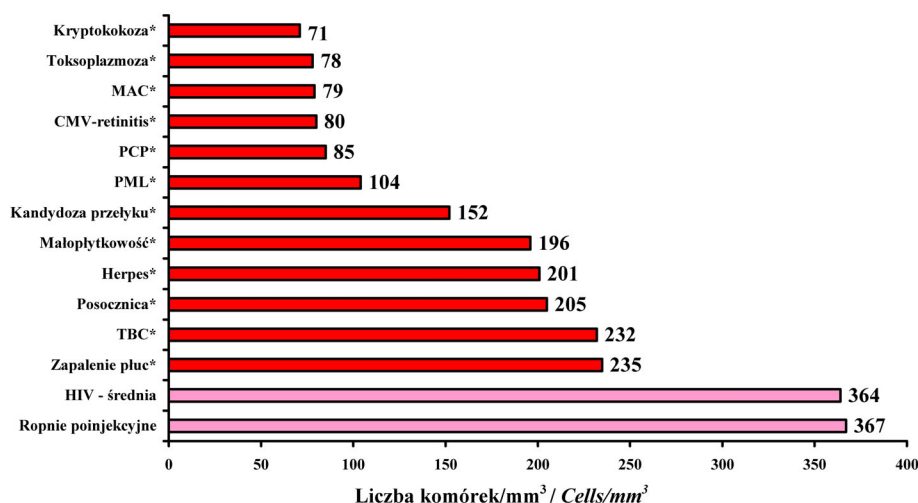
Tabela 16. Rangi poszczególnych zakażeń oportunistycznych i innych jednostek chorobowych w zakresie średnich wartości głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej u osób zakażonych HIV

Table 16. Ranks of opportunistic infections and other selected disorders in relation to mean values of main peripheral blood lymphocyte subsets among HIV-infected persons

Rozpoznanie/ <i>Diagnosis</i>	Ranga w subpopulacji / <i>Rank in given lymphocyte subset</i>							
	CD4	Limfocytoza/ <i>Lymphocytosis</i>	CD19	CD3	CD8	CD4/CD8	%HLA- DR	NK
Ropnie poinfekcyjne/ <i>Abscesses</i>	1	1	1	1	1	1	9*	4
Zapalenie płuc/ <i>bacterial pneumonia</i>	2	3	4	2	2	3	3	2
TBC / <i>Tuberculosis</i>	3	4	3	3	4	2	5	6
Posocznica / <i>Sepsis</i>	4	5	2	5	5	5	10*	9*
<i>Herpes</i>	5	2	11*	4	3	6	1*	10*
Małopłytkowość/ <i>Thrombocytopenia</i>	6	6	12*	6	6	4	7	5
Kandydoza przełyku/ <i>Esophageal candidiasis</i>	7	7	6	7	7	8	6	3
PML	8	9	5	8	8	12	2*	7
PCP	9	11	9	11	11	9	8	8
CMV <i>retinitis</i>	10	8	8	9	9	11	11	1*
MAC	11	12	10	10	12	10	12	12
Toksoplazmoza mózgu/ <i>Brain toxoplasmosis</i>	12	10	7*	12	10	13	4*	11
Kryptokokoza mózgu/ <i>Brain cryptococcosis</i>	13	13	13	13	13	7*	13	13

* różnica rang (w porównaniu do subpopulacji CD4) większa niż ± 5

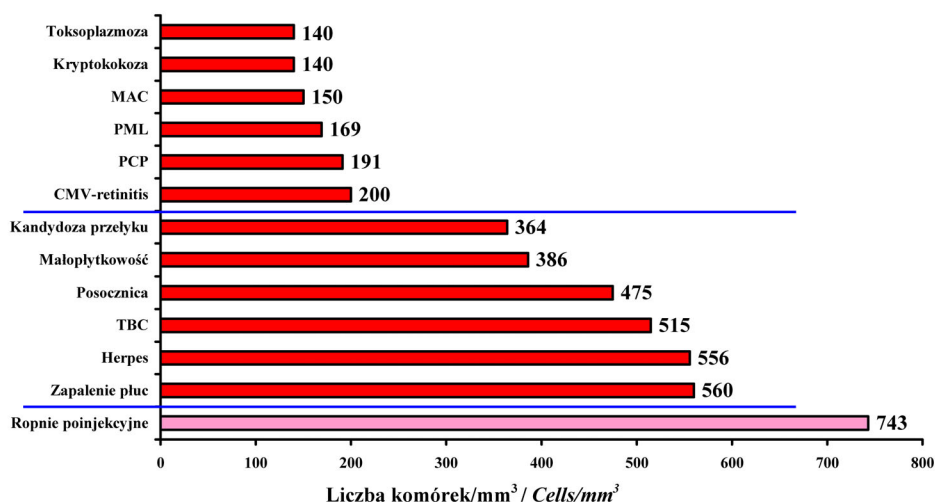
* *difference between ranks more than ± 5 (compared to CD4 count ranks)*



Ryc. 43. Średnia liczba limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej u pacjentów z infekcjami oportunistycznymi i innymi wybranymi jednostkami chorobowymi występującymi w przebiegu zakażenia HIV

* różnica statystycznie w porównaniu do osób zakażonych HIV bez danej infekcji oportunistycznej
Fig. 43. Mean peripheral blood lymphocyte T CD4⁺ count in HIV-infected patients with opportunistic infections and other selected disorders; see annex 2

* statistically significant difference compared to HIV-infected individuals with no given opportunistic infection



Ryc. 44. 90 percentyl liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej u pacjentów z infekcjami oportunistycznymi i innymi wybranymi jednostkami chorobowymi występującymi w przebiegu zakażenia HIV

* różnica statystycznie w porównaniu do osób zakażonych HIV bez danej infekcji oportunistycznej
Fig. 44. 90-th percentile of peripheral blood lymphocyte T CD4⁺ count in HIV-infected patients with opportunistic infections and other selected disorders; see annex 2

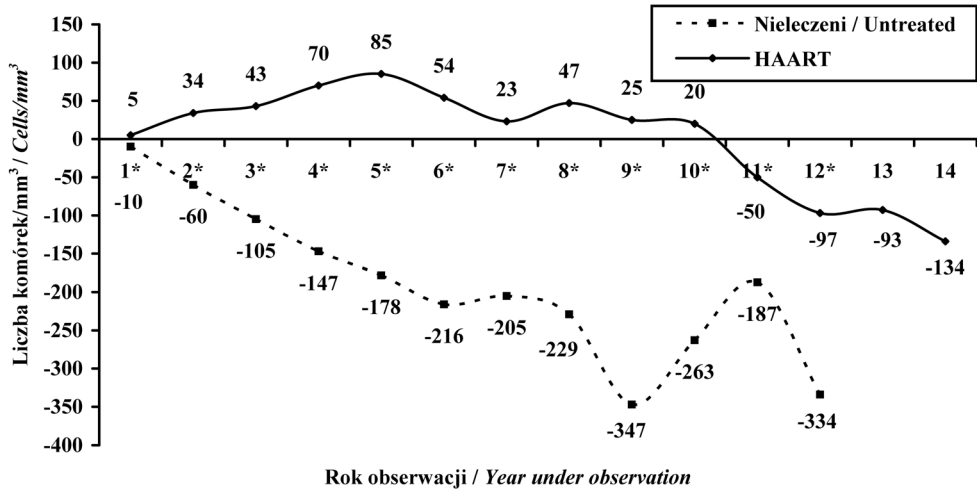
* statistically significant difference compared to HIV-infected individuals with no given opportunistic infection

5.1.9. Wpływ terapii antyretrowirusowej na liczbę limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej u pacjentów zakażonych HIV

Śród wszystkich 799 osób dorosłych zakażonych HIV analizowanych w niniejszej pracy obserwacja zmian liczby limfocytów T CD4⁺, czyli wykonanie co najmniej 2 (maksymalnie 52) oznaczeń, była możliwa u 531 osób dorosłych w wieku od 16 do 64 lat, średnia wieku wyniosła 35,6 roku – były to 304 osoby nieleczonych (62 kobiety i 242 mężczyzn) i 227 osób otrzymujących HAART (62 kobiety i 165 mężczyzn, pacjenci otrzymujący jakiegokolwiek leczenie antyretrowirusowe w dowolnym czasie). Okres obserwacji wynosił od 4 dni do 13,3 roku, średnio 4,2 roku. Sumaryczny czas obserwacji był równy 2200,9 roku. Analizowane wartości liczby CD4 zostały uśrednione dla poszczególnych pacjentów oraz lat obserwacji. Nie analizowano liczby, rodzaju leków antyretrowirusowych, czasu ich stosowania ani „adherencji” pacjentów. Podsumowanie uzyskanych wyników przedstawiono na rycinie 45. Dokumentuje ona utrzymywanie się, w grupie osób leczonych, liczby limfocytów CD4 powyżej wartości wyjściowych przez okres 10 lat obserwacji.

Średnie zmiany liczby limfocytów T CD4⁺ w kolejnych okresach terapii antyretrowirusowej przedstawiono na rycinie 46. Pacjentów leczonych HAART podzielono na trzy kohorty, w zależności od okresu rozpoczęcia obserwacji: 1992–1995, 1996–2000 oraz 2001–2006. Przedstawiciele tych kohort byli w miarę możliwości obserwowani do 2006 r. Pomiędzy osobami leczonymi HAART których obserwację rozpoczęto w latach 1992–1995 a osobami nieleczonymi znamienne statystycznie różnice wykazano dopiero w 9, 10 i 12 roku obserwacji. Osoby leczone HAART, których obserwację rozpoczęto w latach 1996–2000 w porównaniu do osób nieleczonych uzyskiwały znamienne wyższe wartości liczby CD4 już w drugim roku obserwacji i różnica ta utrzymywała się aż do końca okresu objętego obserwacją. Ponadto pomiędzy osobami z grupy 1996–2000 w stosunku do pacjentów z grupy 1992–1995 różnice były znamienne w okresie od 2 do 10 roku obserwacji. Natomiast nie wykazano znamienych statystycznie różnic pomiędzy osobami, których leczenie i obserwację rozpoczęto w okresach 1996–2000 i 2001–2006. Podsumowując – rycina ta obrazuje istotną poprawę skuteczności stosowanego leczenia, jaka dokonała się w drugiej połowie lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku.

Wpływ stosowanej terapii antyretrowirusowej na średnią liczbę limfocytów T CD4⁺, w porównaniu do osób nieleczonych, w zależności od wyjściowej liczby tych komórek uzyskanej w pierwszym oznaczeniu przedstawiono na rycinach 47 do 49. Te same dane, z uwzględnieniem podziału na okresy rozpoczęcia terapii antyretrowirusowej, przedstawiono na rycinach 50 do 52. Wykazano, że stosowanie HAART prowadziło do znaczącego wzrostu liczby limfocytów T CD4⁺ u osób z wyjściowo niskimi (<200/mm³) i pośrednimi (200–499/mm³) wartościami liczby CD4. Natomiast leczenie stosowane u osób z wyjściowo wysokimi wartościami liczby CD4 (>500/mm³) nie miało istotnego wpływu na zmianę liczby komórek tej subpopulacji. Prawidłowość ta była obserwowana niezależnie od okresu w którym pacjenci rozpoczynali obserwację i leczenie.

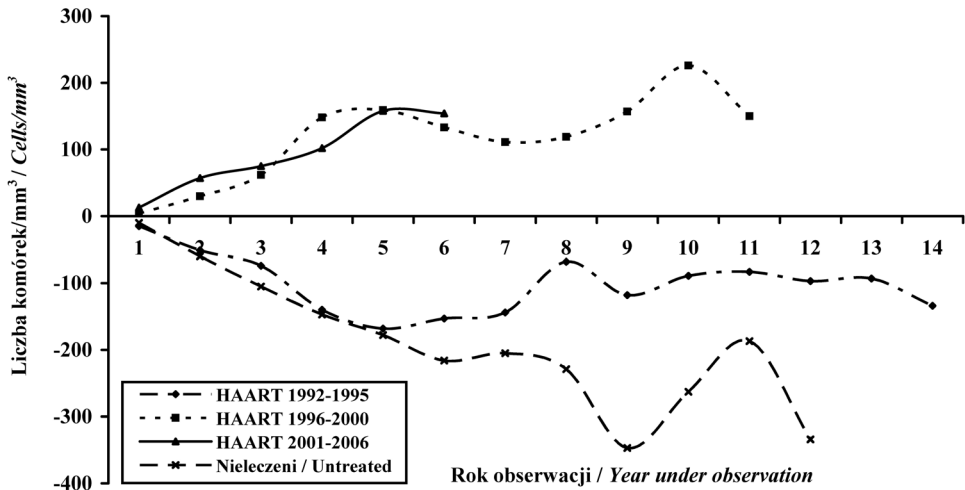


Ryc. 45. Średnie zmiany liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w stosunku do wartości wyjściowej u osób zakażonych HIV – leczonych i nieleczonych HAART

* różnica znamienne statystycznie (test t-Studenta $p < 0,05$)

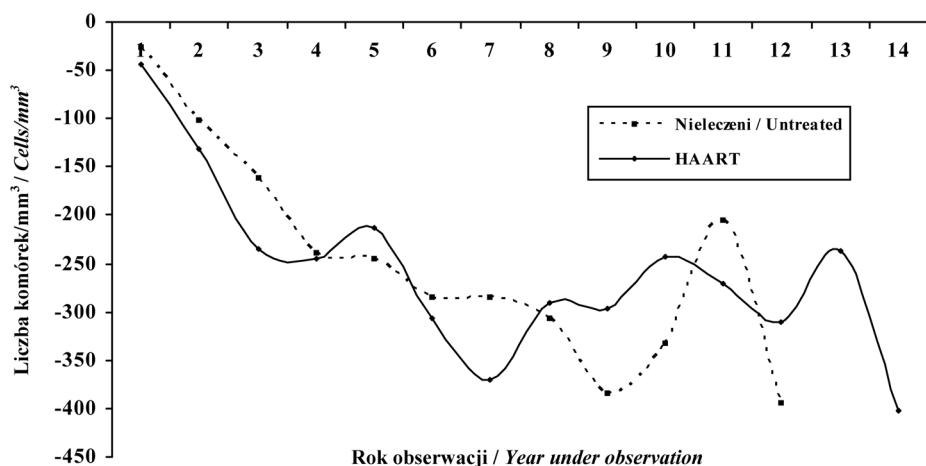
Fig. 45. Mean changes of peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count values compared to initial CD4 count value in HIV infected patients – with and without HAART

* statistically significant difference (Student's t-test $p < 0.05$)

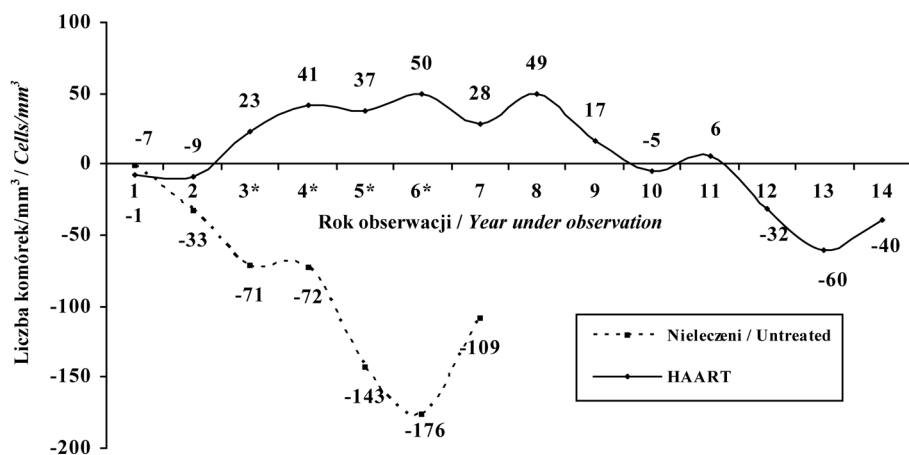


Ryc. 46. Średnie zmiany liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w stosunku do wartości wyjściowej u osób zakażonych HIV – leczonych i nieleczonych HAART, w zależności od okresu rozpoczęcia obserwacji

Fig. 46. Mean changes of peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count values compared to initial CD4 count value in HIV infected patients – with and without HAART, in relation to the moment of initial observation



Ryc. 47. Średnie zmiany liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w stosunku do wartości wyjściowej u osób zakażonych HIV – leczonych i nieleczonych HAART, z wyjściową liczbą CD4 powyżej 500/mm³; różnice nie były znamienne statystycznie
 Fig. 47. Mean changes of peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count values compared to initial CD4 count value in HIV infected patients – with and without HAART, with initial CD4 count greater than 500/mm³; the differences were statistically insignificant

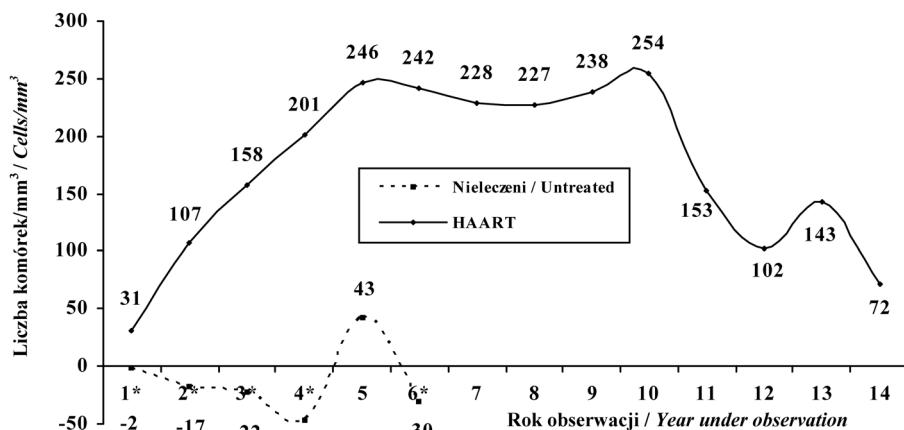


Ryc. 48. Średnie zmiany liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w stosunku do wartości wyjściowej u osób zakażonych HIV – leczonych i nieleczonych HAART, z wyjściową liczbą CD4 pomiędzy 200 i 499 komórek/mm³

* różnica znamienna statystycznie (test t-Studenta $p < 0,05$)

Fig. 48. Mean changes of peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ counts compared to initial CD4 count value in HIV-infected patients – with and without HAART, with initial CD4 count between 200 and 499 cells/mm³

* statistically significant difference (Student's t-test $p < 0.05$).

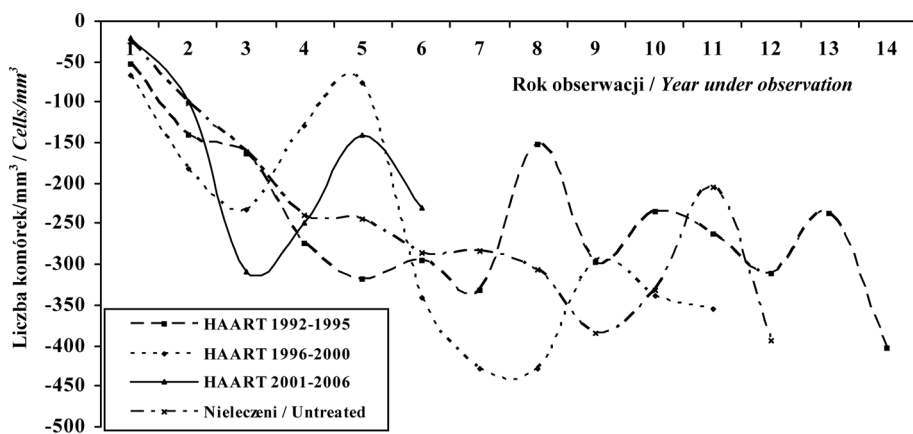


Ryc. 49. Średnie zmiany liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w stosunku do wartości wyjściowej u osób zakażonych HIV – leczonych i nieleczonych HAART, z wyjściową liczbą CD4 poniżej 200/mm³

* różnica znamionna statystycznie (test t-Studenta $p < 0,05$)

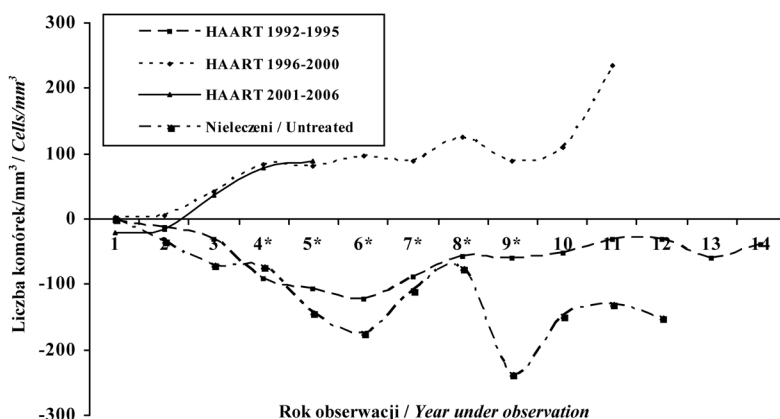
Fig. 49. Mean changes of peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count values compared to initial CD4 count value in HIV infected patients – with and without HAART, with initial CD4 count less than 200/mm³

* statistically significant difference (Student's t-test $p < 0.05$)



Ryc. 50. Średnie zmiany liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w stosunku do wartości wyjściowej u osób zakażonych HIV – leczonych i nieleczonych HAART, z wyjściową liczbą CD4 powyżej 500/mm³, w zależności od okresu rozpoczęcia obserwacji; różnice nie były znamienne statystycznie

Fig. 50. Mean changes of peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count values compared to initial CD4 count value in HIV infected patients – with and without HAART, with initial CD4 count greater than 500/mm³, in relation to the moment of initial observation; the differences were statistically insignificant

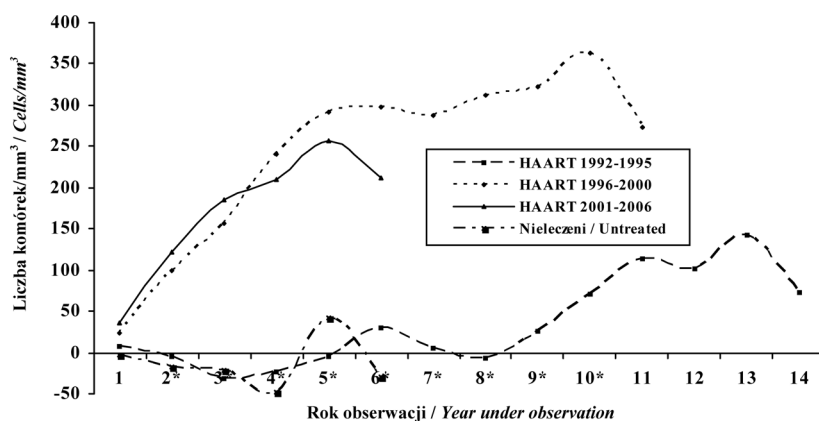


Ryc. 51. Średnie zmiany liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w stosunku do wartości wyjściowej u osób zakażonych HIV – leczonych i nieleczonych HAART, z wyjściową liczbą CD4 pomiędzy 200-499/mm³, w zależności od okresu rozpoczęcia obserwacji

* różnica pomiędzy okresami 1992-1995 i 1996-2000 znamienna statystycznie (test t-Studenta $p < 0,05$); nie wykazano znamiennych różnic pomiędzy okresami 1996-2000 a 2001-2005

Fig. 51. Mean changes of peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count values compared to initial CD4 count value in HIV infected patients – with and without HAART, with initial CD4 count between 200-499/mm³, in relation to the moment of initial observation

* statistically significant difference between 1992-1995 and 1996-2000 periods (Student's t-test $p < 0.05$); insignificant differences between 1996-2000 and 2001-2005 periods



Ryc. 52. Średnie zmiany liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w stosunku do wartości wyjściowej u osób zakażonych HIV – leczonych i nieleczonych HAART, z wyjściową liczbą CD4 poniżej 200/mm³, w zależności od okresu rozpoczęcia obserwacji

* różnica pomiędzy okresami 1992-1995 i 1996-2000 znamienna statystycznie (test t-Studenta $p < 0,05$); nie wykazano znamiennych różnic pomiędzy okresami 1996-2000 a 2001-2005

Fig. 52. Mean changes of peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count values compared to initial CD4 count value in HIV infected patients – with and without HAART, with initial CD4 count less than 200/mm³, in relation to the moment of initial observation

* statistically significant difference between 1992-1995 and 1996-2000 periods (Student's t-test $p < 0.05$); insignificant differences between 1996-2000 and 2001-2005 periods

Wpływ HAART na częstość zgonów w obserwowanej grupie pacjentów przedstawiono w tabeli 17.

Tabela 17. Zależność pomiędzy stosowaniem HAART a częstością występowania zgonów

Table 17. Relationship between HAART and mortality

HAART	Zgony / Deaths	Osoby żyjące / Survivors	Ogółem / Total
-	61	244	305
+	6	221	227
Ogółem / Total	67	465	532

OR=9,21 (95% przedział ufności/confidence interval: 3,74-24,14);

Mantel-Haenszel $\chi^2=35,55$, $p<0,0000001$

czułość/sensitivity: 0,91; swoistość/specificity: 0,48; PPV: 0,20; NPV: 0,97

Po uwzględnieniu w obliczeniach czasu obserwacji obu badanych populacji, wynoszącego 1277,3 roku dla osób nieleczonych i 923,6 roku dla osób leczonych, ostateczne ryzyko zgonu wyniosło:

- 4,78/100 osobolat w grupie osób nieleczonych
- 0,65/100 osobolat wśród osób leczonych antyretrowirusowo (7,35 razy niższe).

5.1.10. Wpływ współistniejących zakażeń wirusowych na liczbę limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej u osób zakażonych HIV

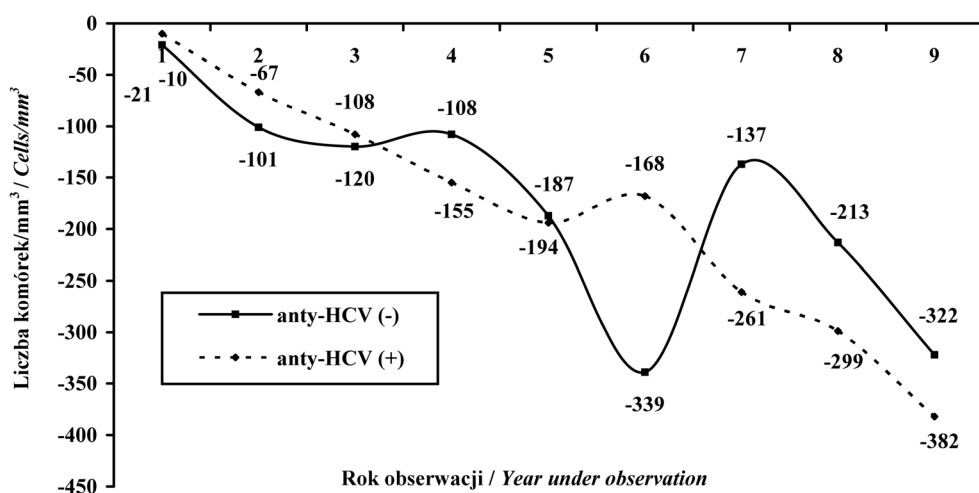
Analizę wpływu współistniejących zakażeń wirusowych (HCV, HBV i CMV) na zmianę liczby limfocytów T CD4⁺ u osób zakażonych HIV przeprowadzono w oparciu o grupę pacjentów opisywaną w poprzednim rozdziale (532 osoby dorosłe w wieku od 16 do 64 lat, 305 osób nieleczonych i 227 osób otrzymujących HAART) i według tych samych zasad, z tym że:

- ocena współistnienia zakażenia HCV na podstawie obecności przeciwciał anti-HCV była możliwa u 133 osób nieleczonych (31 kobiet i 102 mężczyzn w wieku od 16 do 62 lat, 28 osób bez przeciwciał anti-HCV i 105 pacjentów z obecnymi w surowicy przeciwciałami anti-HCV) oraz u 174 osób leczonych HAART (49 kobiet i 125 mężczyzn w wieku od 18 do 67 lat, 92 osoby bez przeciwciał anti-HCV w surowicy oraz 82 osoby z dodatnim testem na obecność tych przeciwciał)
- obecność współistnienia zakażenia HBV została przeprowadzona w grupie 106 osób nieleczonych (23 kobiety i 83 mężczyzn w wieku od 16 do 62 lat, 24 osoby bez obecnych w surowicy przeciwciał anti-HBc oraz 82 pacjentów z dodatnim testem serologicznym w kierunku obecności tych przeciwciał w surowicy, w tym 12 osób z dodatnim antygenem HBs i 4 osoby z dodatnim antygenem HBc) oraz 158 osób leczonych HAART (46 kobiet i 112 mężczyzn w wieku od 18 do 67 lat, 71 osób bez obecnych w surowicy przeciwciał anti-HBc i 87 pacjentów z dodatnim wynikiem badania w kierunku obecności tych przeciwciał)

w surowicy, w tym 13 osób z dodatnim antygenem HBs i 4 osoby z dodatnim antygenem HBe).

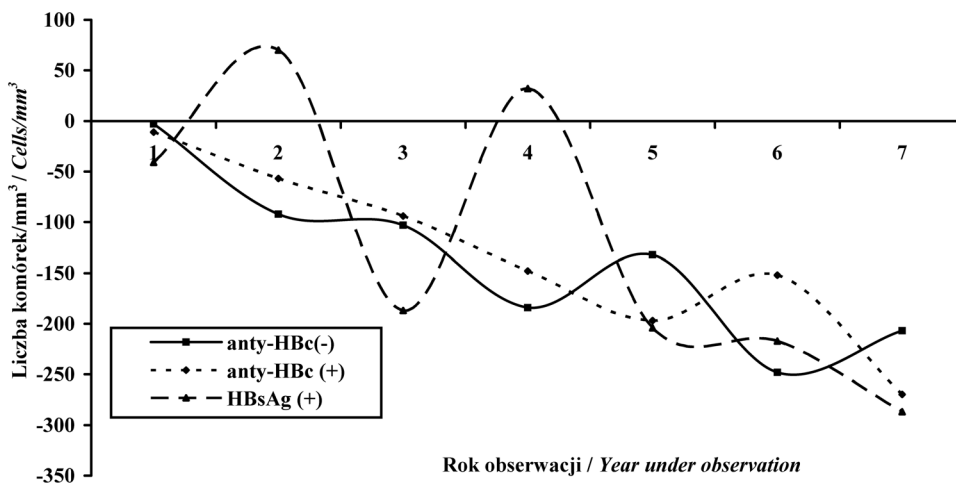
- wpływ zakażenia CMV oceniono na podstawie obecności w surowicy przeciwciał anti-CMV IgG u 80 osób nieleczonych (15 kobiet i 65 mężczyzn w wieku od 18 do 62 lat, 17 osób bez obecnych w surowicy przeciwciał anti-CMV IgG oraz 63 osoby z dodatnim testem w kierunku obecności tych przeciwciał w surowicy) oraz 133 osoby leczone HAART (34 kobiety i 99 mężczyzn w wieku od 18 do 67 lat, 35 osób bez obecnych w surowicy przeciwciał anti-CMV IgG oraz 98 pacjentów z dodatnim wynikiem badania serologicznego w kierunku obecności tych przeciwciał).

Wyniki uzyskane dla osób nieleczonych przedstawiono na rycinach 53, 54, 55 – nie wykazano istotnego wpływu współistniejących zakażeń HBV, HCV i CMV na tempo spadku liczby limfocytów T $CD4^+$. Natomiast wśród osób otrzymujących HAART – patrz ryciny od 56 do 58 – odległe wyniki leczenia (powyżej 3 lat) były wyraźnie gorsze przy współistniejącym zakażeniu HCV, HBV jak i CMV, jednak było to najprawdopodobniej związane z częstszym występowaniem tych infekcji u osób stosujących dożylnie środki odurzające. W tej grupie pacjentów odległe wyniki leczenia były znamienne gorsze (patrz rycina 59). Naomiast w grupie osób nieleczonych HAART fakt stosowania dożylnych środków odurzających nie miał wpływu na tempo spadku liczby $CD4$ w czasie (patrz rycina 60).



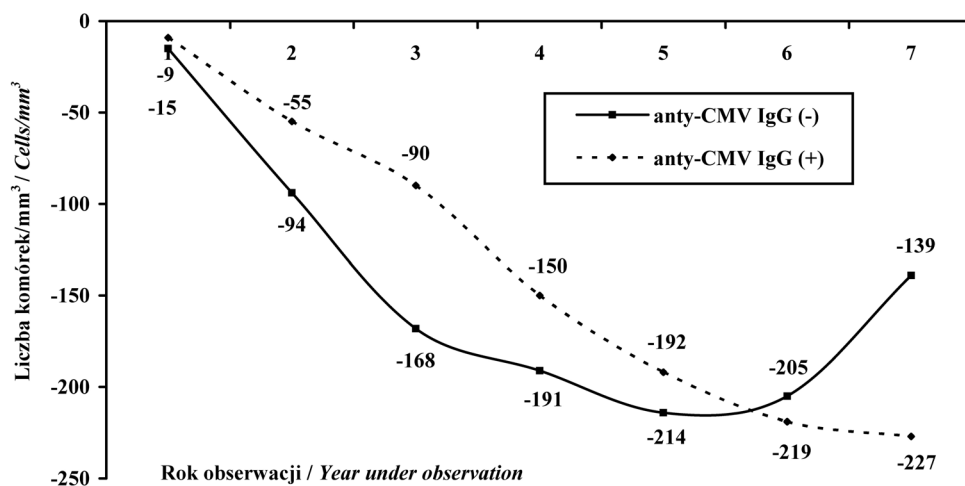
Ryc. 53. Średnie zmiany liczby limfocytów T $CD4^+$ we krwi obwodowej w stosunku do wartości wyjściowej u osób zakażonych HIV nieleczonych HAART, w zależności od współistnienia zakażenia HCV; różnice nie były znamienne statystycznie

Fig. 53. Mean changes of peripheral blood lymphocytes T $CD4^+$ count values compared to initial $CD4$ count value in HIV infected untreated patients, in relation to HCV coinfection; the differences were statistically insignificant



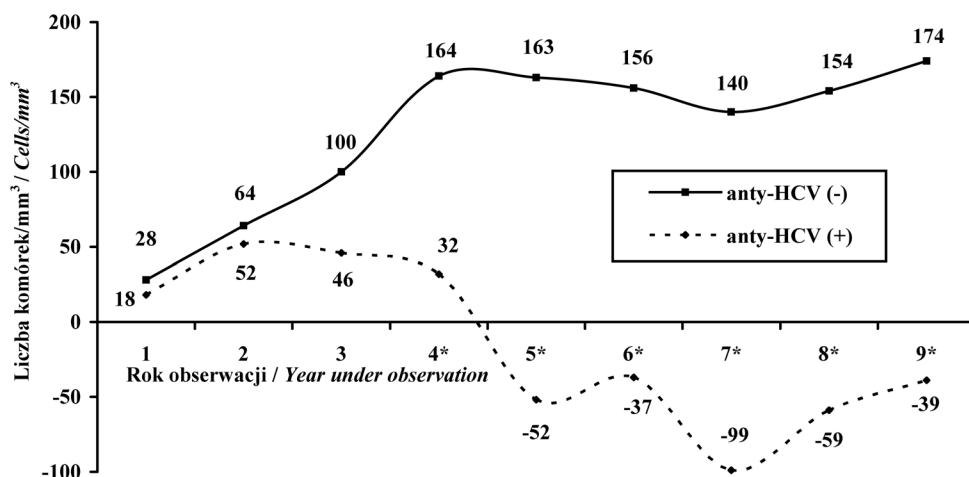
Ryc. 54. Średnie zmiany liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w stosunku do wartości wyjściowej u osób zakażonych HIV nieleczonych HAART, w zależności od współistnienia zakażenia HBV; różnice nie były znamienne statystycznie

Fig. 54. Mean changes of peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count values compared to initial CD4 count value in HIV infected untreated patients, in relation to HBV coinfection; the differences were statistically insignificant



Ryc. 55. Średnie zmiany liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w stosunku do wartości wyjściowej u osób zakażonych HIV nieleczonych HAART, w zależności od współistnienia zakażenia CMV; różnice nie były znamienne statystycznie

Fig. 55. Mean changes of peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count values compared to initial CD4 count value in HIV infected untreated patients, in relation to CMV coinfection; the differences were statistically insignificant

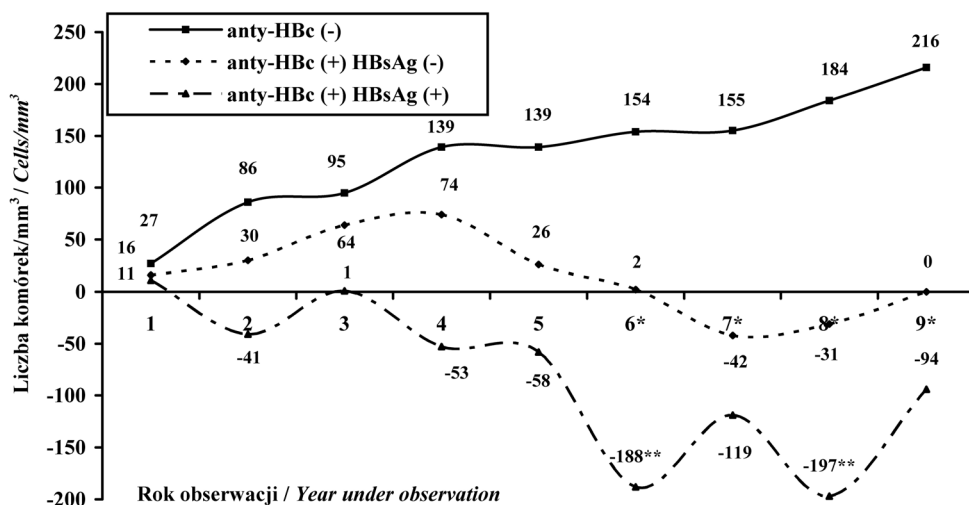


Ryc. 56. Średnie zmiany liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w stosunku do wartości wyjściowej u osób zakażonych HIV leczonych HAART, w zależności od współistnienia zakażenia HCV

* różnica znamionna statystycznie ($p < 0,01$)

Fig. 56. Mean changes of peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count values compared to initial CD4 count value in HIV infected patients on HAART, in relation to HCV coinfection

* statistically significant difference ($p < 0.01$)



Ryc. 57. Średnie zmiany liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w stosunku do wartości wyjściowej u osób zakażonych HIV leczonych HAART, w zależności od współistnienia zakażenia HBV

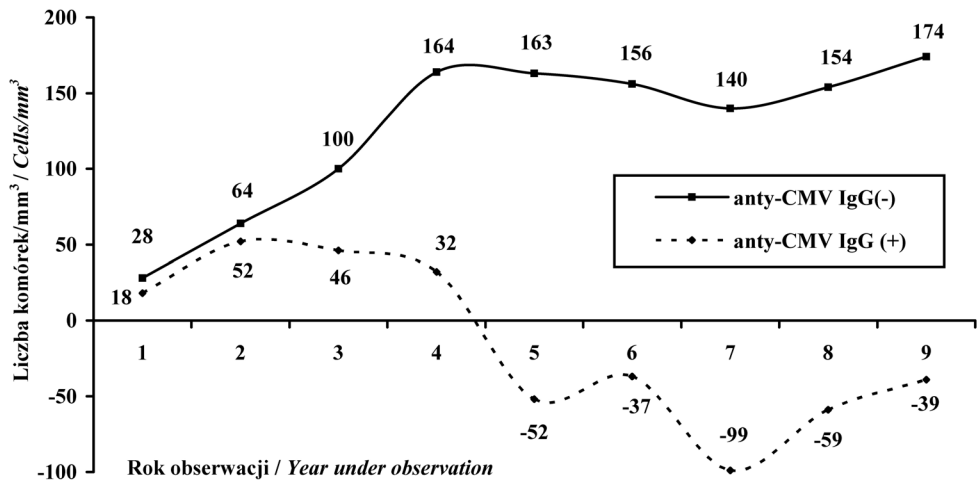
* różnica znamionna statystycznie pomiędzy osobami anti-HBc(+) i anti-HBc(-), $p < 0,05$

** różnica znamionna statystycznie pomiędzy osobami HBsAg(+) i HBsAg(-), $p < 0,05$

Fig. 57. Mean changes of peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count values compared to initial CD4 count value in HIV infected patients on HAART, in relation to HBV coinfection

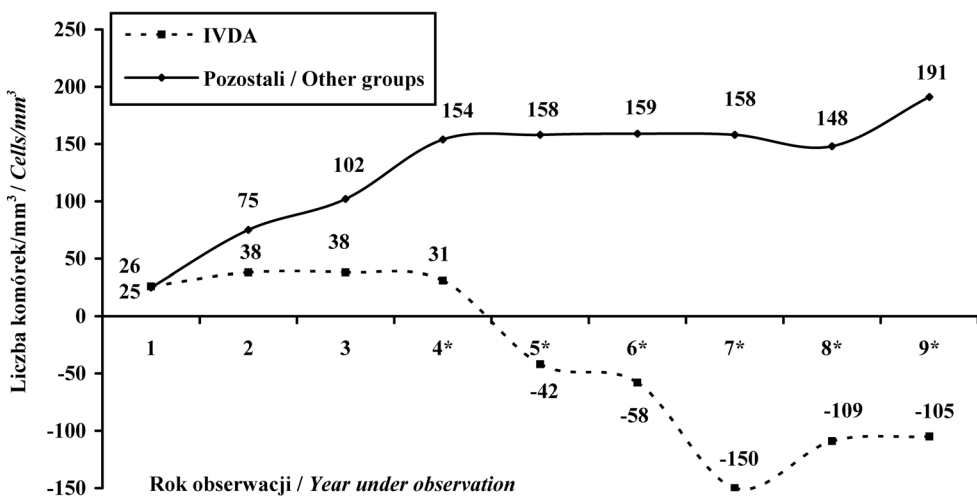
* statistically significant difference between anti-HBc(+) and anti-HBc(-) individuals, $p < 0.05$

** statistically significant difference between HBsAg(+) and HBsAg(-) individuals, $p < 0.05$



Ryc. 58. Średnie zmiany liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w stosunku do wartości wyjściowej u osób zakażonych HIV leczonych HAART, w zależności od współistnienia zakażenia CMV; różnice nie były znamienne statystycznie

Fig. 58. Mean changes of peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count values compared to initial CD4 count value in HIV infected patients on HAART, in relation to CMV coinfection; the differences were statistically insignificant

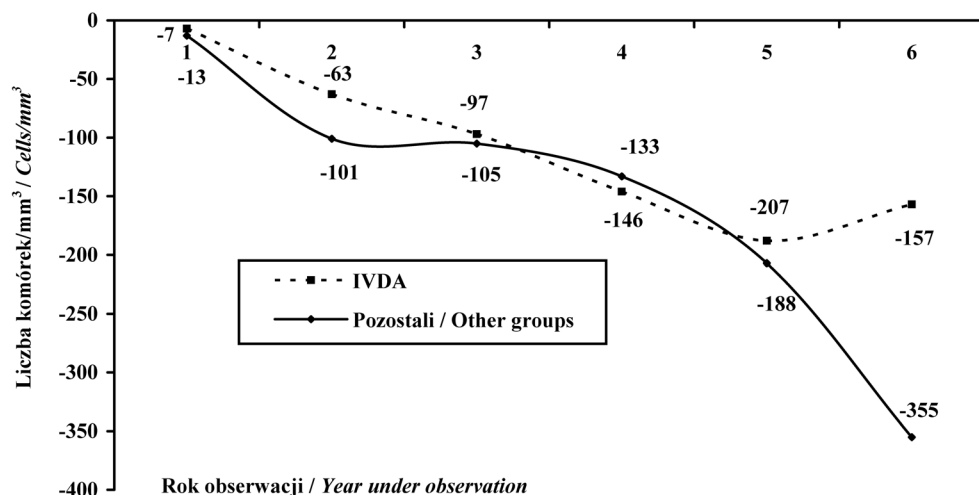


Ryc. 59. Średnie zmiany liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w stosunku do wartości wyjściowej u osób zakażonych HIV leczonych HAART, w zależności od współistnienia uzależnienie od narkotyków dożylnych w wywiadzie

* różnica znamienista statystycznie ($p < 0,05$)

Fig. 59. Mean changes of peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count values compared to initial CD4 count value in HIV infected patients on HAART, in relation to substance abuse history

* statistically significant difference ($p < 0.05$)



Ryc. 60. Średnie zmiany liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej w stosunku do wartości wyjściowej u nieleczonych osób zakażonych HIV, w zależności od współistnienia uzależnienia od narkotyków dożylnych w wywiadzie; różnice nie były istotne statystycznie

Fig. 60. Mean changes of peripheral blood lymphocytes T CD4⁺ count values compared to initial CD4 count value in HIV infected patients with no HAART, in relation to substance abuse history; the differences were statistically insignificant

5.1.11. Choroby zakaźne ośrodkowego układu nerwowego

Charakterystykę pacjentów z zakażeniami ośrodkowego układu nerwowego poddanych badaniom podstawowych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej przedstawiono w tabeli 18. Grupy porównawcze stanowiły osoby zdrowe, a także pacjenci ze stwardnieniem rozsianym (SM), udarem krwotocznym i niedokrwinnym.

Wyniki badań podstawowych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej u pacjentów z chorobami zakaźnymi ośrodkowego układu nerwowego oraz w grupach porównawczych przedstawiono na rycinach 61-66 oraz A24 i A25 w aneksie 1. We wszystkich jednostkach chorobowych obserwowano, różnego stopnia, spadki limfocytozy całkowitej, liczby limfocytów T CD4⁺, T CD8⁺ oraz komórek NK. Ponadto obserwowano znamienne statystycznie wzrost odsetka aktywowanych limfocytów T wśród chorych z zapaleniem mózgu (13,0%) i świnkowym zapaleniem opon (21,4%) w porównaniu do osób zdrowych (9,4%, test t-Studenta $p < 0,05$, patrz rycina A25 w aneksie 1), a także znamienne spadki liczby limfocytów B u chorych z udarem krwotocznym (86/mm³) i SM (198/mm³ w porównaniu do osób zdrowych (266/mm³, test t-Studenta $p < 0,05$, patrz rycina A24 w aneksie 1).

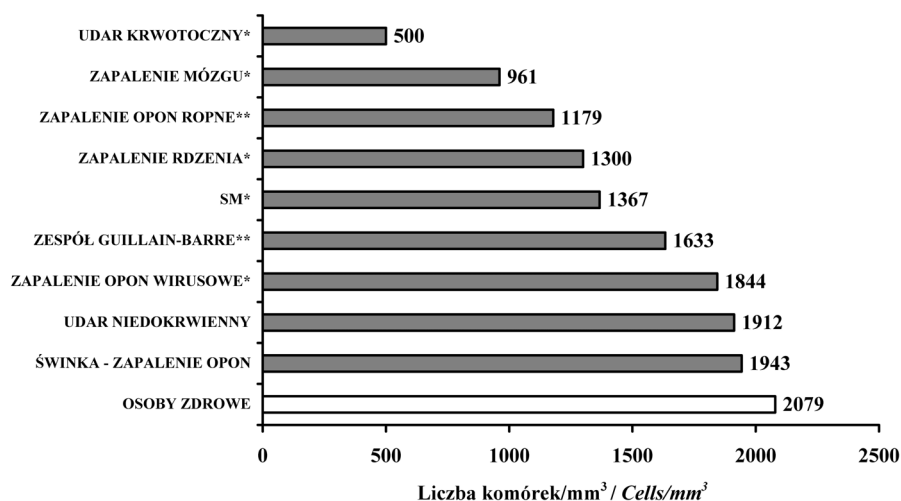
Tabela 18. Pacjenci z chorobami zakaźnymi układu nerwowego oraz osoby z grup porównawczych, u których wykonano badania subpopulacji limfocytów krwi obwodowej.

Table 18. Patients with nervous system disorders and persons from comparative groups in whom peripheral blood lymphocyte subsets were obtained

Rozpoznanie/ <i>Diagnosis</i>	Liczba badanych/ <i>Number of cases</i>	Kobiety/ <i>Females</i>	Mężczyźni/ <i>Males</i>	Średnia wieku/ <i>Mean age</i>
Zapalenie opon wirusowe/ <i>Viral meningitis</i>	78	35	43	26,5*
Zapalenie mózgu/ <i>Encephalitis</i>	46	21	25	35,9*
Ropne zapalenie opon/ <i>Purulent meningitis</i>	28	9	19	48,2*
Zespół Guillain-Barré/ <i>Guillain-Barré syndrome</i>	21	8	13	40,2*
Świnkowe zapalenie opon/ <i>Mumps meningitis</i>	7	0	7	16,6*
Zapalenie rdzenia/ <i>Myelitis</i>	3	–	3	33,3
Ogółem / <i>Total</i>	183	73	110	36,0
Grupy porównawcze / <i>Comparative groups</i>				
Udar niedokrwienny/ <i>Ischemic stroke</i>	19	4	15	46,6*
Stwardnienie rozsiane/ <i>Multiple sclerosis</i>	15	7	8	35,9
Udar krwotoczny/ <i>Hemorrhagic stroke</i>	3	1	2	36,7
Osoby zdrowe/ <i>Healthy individuals</i>	117	55	62	31,2

* różnica wieku znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (<0,05)

* statistically significant age difference compared to healthy individuals ($p < 0.05$)



Ryc. 61. Średnia całkowita limfocytoza u pacjentów z chorobami układu nerwowego

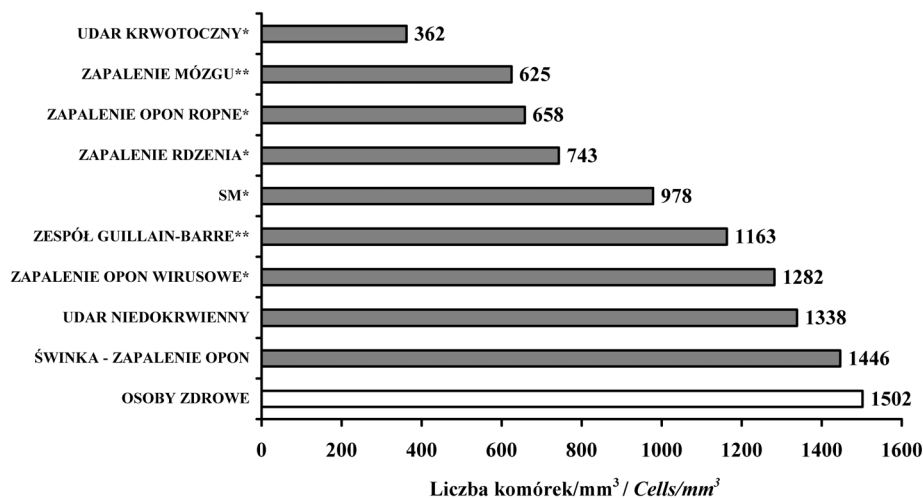
* różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 61. Mean total peripheral blood lymphocytosis in patients with nervous system disorders; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)



Ryc. 62. Średnia liczba limfocytów T we krwi obwodowej u pacjentów z chorobami układu nerwowego

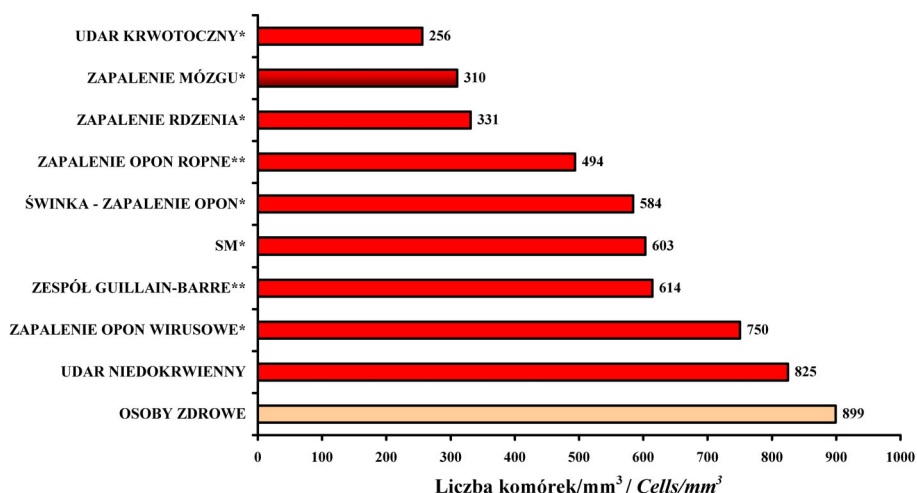
* różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 62. Mean peripheral blood lymphocyte T count in patients in patients with nervous system disorders; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)



Ryc. 63. Średnia liczba limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej u pacjentów z chorobami układu nerwowego

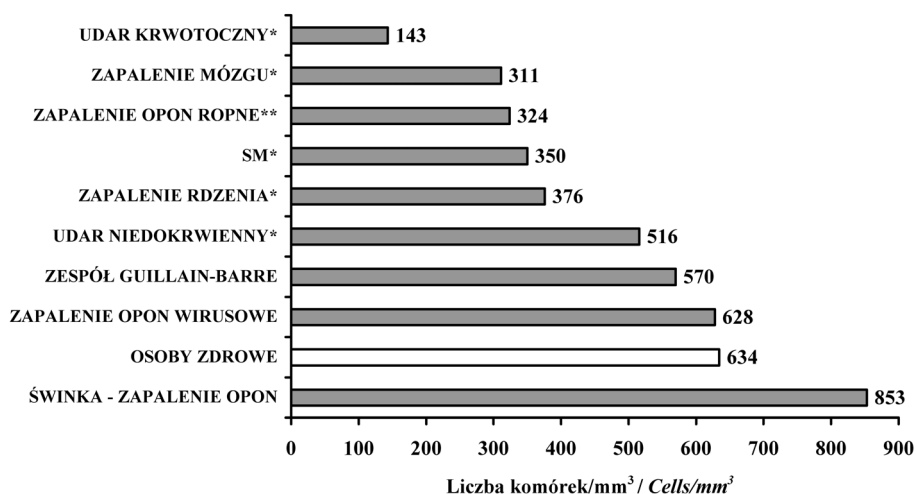
* różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 63. Mean peripheral blood lymphocyte T CD4⁺ count in patients with nervous system disorders; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)



Ryc. 64. Średnia liczba limfocytów T CD8⁺ we krwi obwodowej u pacjentów z chorobami układu nerwowego

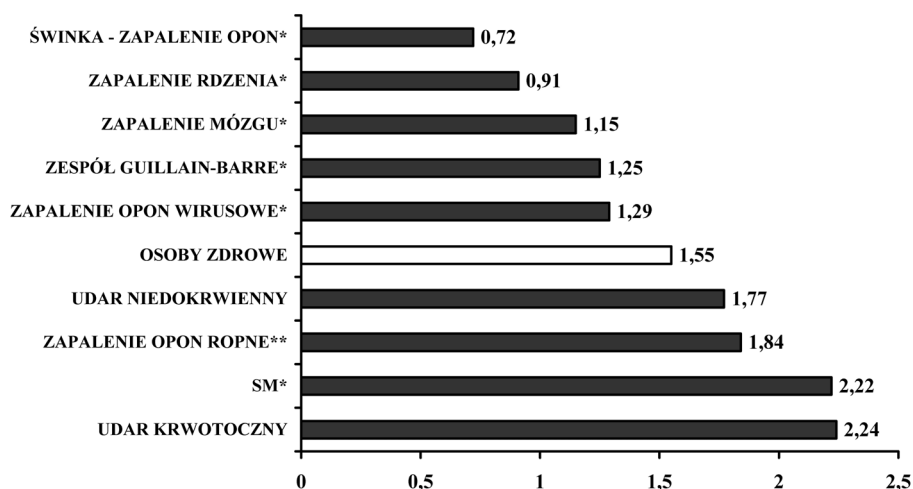
* różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 64. Mean peripheral blood lymphocyte T CD8⁺ count in patients with nervous system disorders; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)



Ryc. 65. Średnia wartość stosunku CD4/CD8 we krwi obwodowej u pacjentów z chorobami układu nerwowego

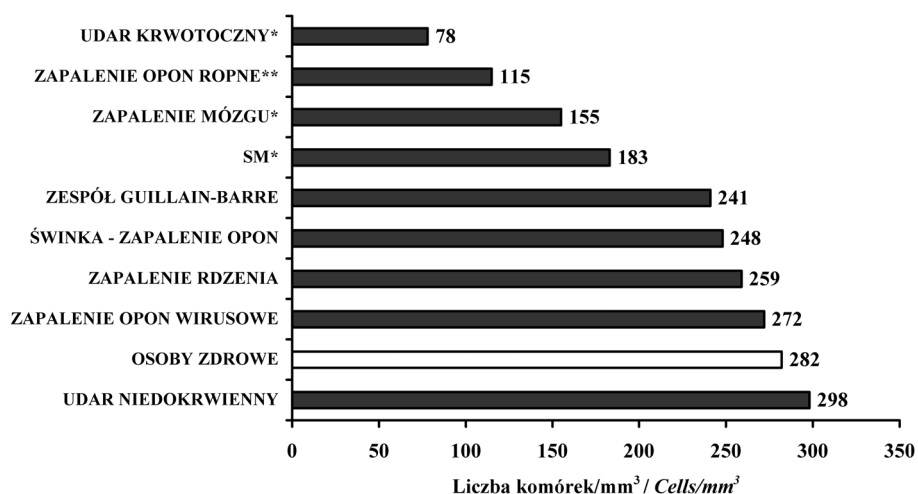
* różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 65. Mean peripheral blood CD4/CD8 ratio in patients with nervous system disorders; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0,05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0,05$)



Ryc. 66. Średnia liczba komórek NK we krwi obwodowej u pacjentów z chorobami układu nerwowego

* różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

** różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

Fig. 66. Mean peripheral blood NK-cells count in patients with nervous system disorders; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0,05$)

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0,05$)

Porównanie liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej u chorych z ostrym wirusowym zapaleniem mózgu i osób zdrowych przedstawiono w tabeli 19. Natomiast porównanie liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej u chorych z ostrym wirusowym zapaleniem mózgu i udarem niedokrwiennym przedstawiono w tabeli 20. Wykazano, że obserwowane spadki liczby limfocytów T CD4⁺ mogą mieć praktyczne zastosowanie w diagnostyce różnicowej ostrego wirusowego zapalenia mózgu.

Tabela 19. Wartości liczby bezwzględnej limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej u chorych z ostrym wirusowym zapaleniem mózgu i osób zdrowych

Table 19. Peripheral blood CD4 counts in patients with acute viral encephalitis and healthy individuals

Liczba CD4 / <i>CD4 count</i>	Zapalenie mózgu/ <i>Encephalitis</i>	Osoby zdrowe/ <i>Healthy individuals</i>	Ogółem/ <i>Total</i>
≤500/mm ³	45	2	47
>500/mm ³	1	115	116
Ogółem / <i>Total</i>	46	117	163

OR=2587,5 (95% przedział ufności/*confidence interval*: 197,21-22026,47),

Mantel-Haenszel $\chi^2=147,74$, $p<0,0000001$

czułość/*sensitivity*: 0,98; swoistość/*specificity*: 0,98; PPV: 0,96; NPV: 0,99

Tabela 20. Wartości liczby bezwzględnej limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej u chorych z ostrym wirusowym zapaleniem mózgu i udarem niedokrwiennym

Table 20. Peripheral blood CD4 counts in acute viral encephalitis and ischemic stroke patients

Liczba CD4 / <i>CD4 count</i>	Zapalenie mózgu/ <i>Encephalitis</i>	Udar niedokrwienny/ <i>Ischemic stroke</i>	Ogółem/ <i>Total</i>
CD4≤500/mm ³	45	4	49
CD4>500/mm ³	1	15	16
Ogółem / <i>total</i>	46	19	65

OR=168,75 (95% przedział ufności/*confidence interval*: 15,26-4516,13)

Mantel-Haenszel $\chi^2=42,05$, $p<0,0000001$; test Fishera/*Fisher exact* $p<0,0000001$

czułość/*sensitivity*: 0,98; swoistość/*specificity*: 0,79; PPV: 0,92; NPV: 0,94

Porównanie wartości stosunku CD4/CD8 we krwi obwodowej u chorych z ostrym wirusowym zapaleniem mózgu i stwardnieniem rozsianym przedstawiono w tabeli 21. Wyniki obliczeń wskazują, że parametr ten może mieć praktyczne znaczenie w różnicowaniu obu jednostek chorobowych.

Tabela 21. Wartości stosunku CD4/CD8 we krwi obwodowej u chorych z ostrym wirusowym zapaleniem mózgu i SM

Table 21. Peripheral blood CD4/CD8 ratios in acute viral encephalitis and multiple sclerosis patients

CD4/CD8	Zapalenie mózgu/ <i>Encephalitis</i>	<i>Sclerosis multiplex</i>	Ogółem/ <i>Total</i>
≤1,5	36	3	39
>1,5	10	12	22
Ogółem / <i>Total</i>	46	15	61

OR=14,40 (95% przedział ufności/*confidence interval*: 2,91–81,26)Mantel-Haenszel $\chi^2=16,38$, $p=0,0000519$ czułość/*sensitivity*: 0,78; swoistość/*specificity*: 0,80; PPV: 0,92; NPV: 0,55

5.2. Choroby zakaźne ośrodkowego układu nerwowego – wyniki badań płynu mózgowo-rdzeniowego

Liczbę przeprowadzonych badań podstawowych subpopulacji limfocytów w PMR przedstawiono w tabeli 3. Łącznie przeanalizowano 143 wyniki wykonane u 136 osób.

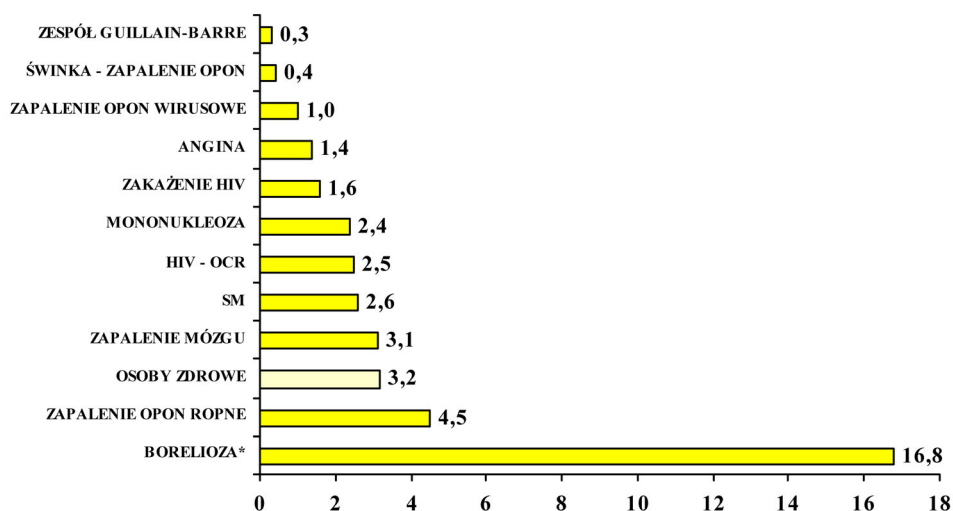
Porównanie wyników badań podstawowych subpopulacji limfocytów w płynie mózgowo-rdzeniowym i krwi obwodowej u osób zdrowych przedstawiono w tabeli 22.

Wyniki badań podstawowych subpopulacji limfocytów w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z chorobami zakaźnymi przedstawiono na rycinach od 67 do 70.

Tabela 22. Porównanie wyników badań podstawowych subpopulacji limfocytów w płynie mózgowo-rdzeniowym i krwi obwodowej u osób zdrowych – średnia ± SD

Table 22. Comparison of peripheral blood and cerebrospinal fluid lymphocyte subsets in healthy individuals – mean ± SD

Subpopulacja limfocytów/ <i>Lymphocyte subset</i>	PMR/ <i>Cerebrospinal fluid</i>	Krew/ <i>Blood</i>	Znamiennność statystyczna/ <i>Statistical significance</i>
Limfocytoza / <i>Lymphocytosis</i>	2 ± 2,07	2079 ± 497	p<0,0001 (ANOVA)
% CD19 ⁺	3,3 ± 3,3	12,9 ± 4,6	p<0,0001 (test t-Studenta)
%CD3 ⁺	89,6 ± 9,5	73,2 ± 6,3	p=0,0017 (test t-Studenta)
%CD4 ⁺	61,5 ± 13,9	43,2 ± 6,7	p=0,0064 (ANOVA)
%CD8 ⁺	26,9 ± 3,9	30,2 ± 7,2	p=0,0337 (test t-Studenta)
CD4/CD8	2,32 ± 0,56	1,55 ± 0,57	p=0,0053 (test t-Studenta)
%CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	18,5 ± 12,8	9,4 ± 5,9	n.s.
%NK	8,4 ± 9,9	13,8 ± 6,1	n.s.
Średnia wieku / <i>Mean age</i>	27,0 ± 12,3	31,2 ± 13,2	n.s.
Liczba osób/ <i>Number of cases</i>	7	117	

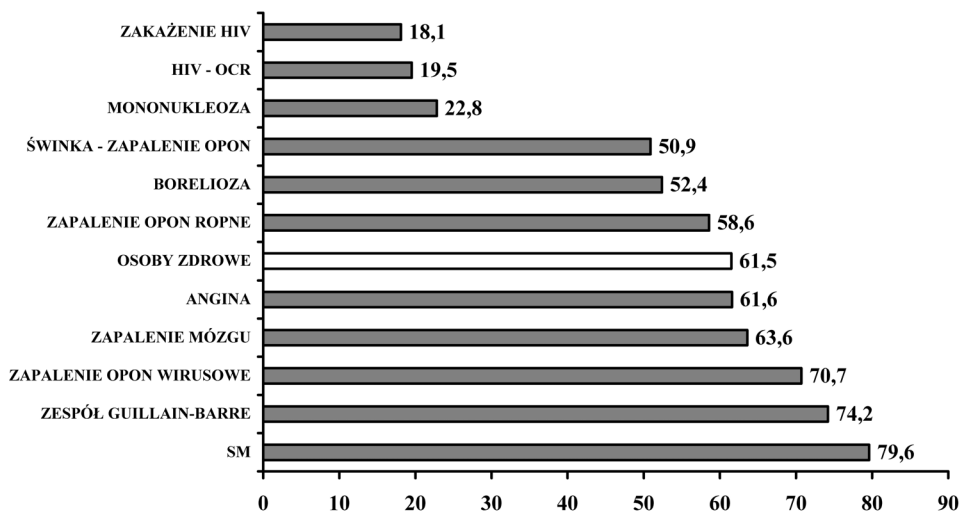


Ryc. 67. Średni odsetek limfocytów B w PMR u pacjentów z chorobami układu nerwowego

* różnica znamienne statystycznie w porównaniu do pozostałych wyników łącznie (ANOVA $p < 0,001$)

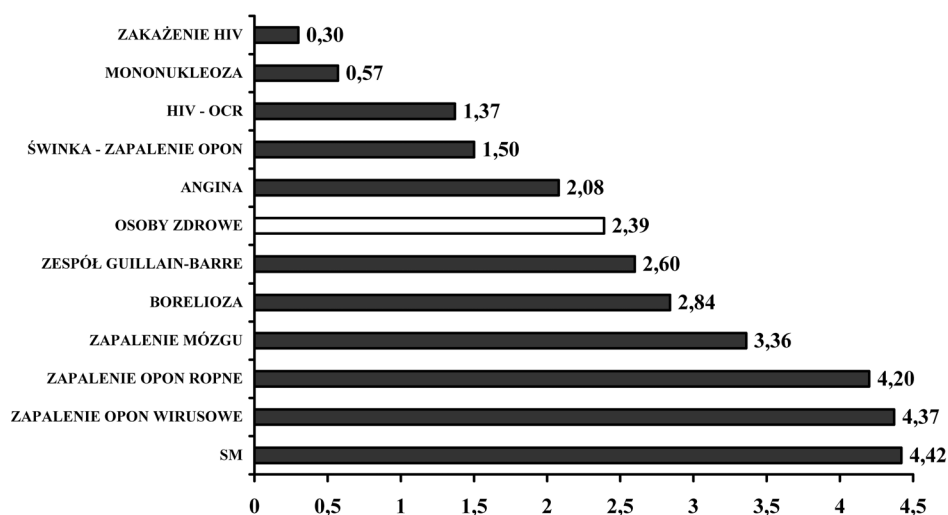
Fig. 67. Mean percentage values of lymphocytes B in cerebrospinal fluid of patients with nervous system disorders; see annex 2

* statistically significant difference compared to all other results taken together (ANOVA $p < 0.001$)



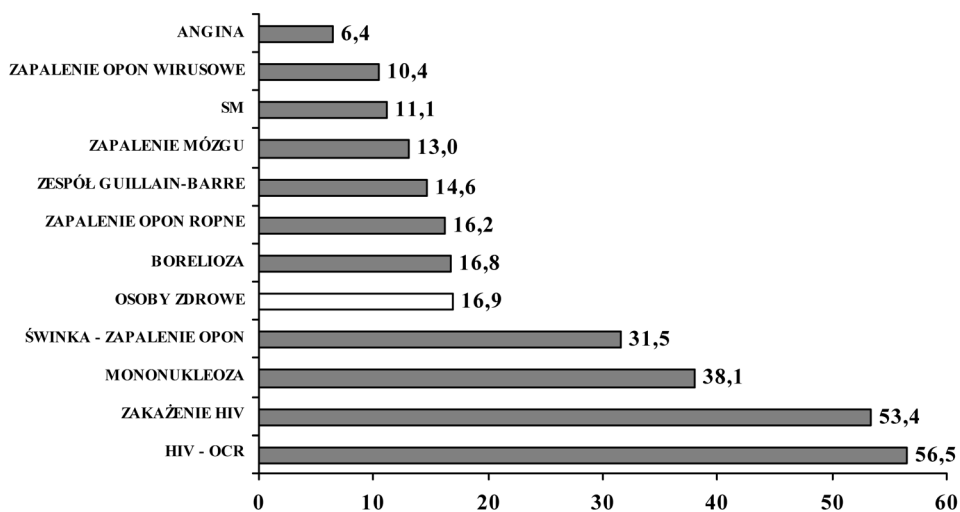
Ryc. 68. Średni odsetek limfocytów T CD4⁺ w PMR u pacjentów z chorobami układu nerwowego; różnice nie były znamienne statystycznie

Fig. 68. Mean percentage values of lymphocytes T CD4⁺ in cerebrospinal fluid of patients with nervous system disorders; the differences were statistically insignificant; see annex 2



Ryc. 69. Średnie wartości stosunku CD4/CD8 w PMR u pacjentów z chorobami układu nerwowego; różnice nie były znamienne statystycznie

Fig. 69. Mean values of CD4/CD8 ratio in cerebrospinal fluid of patients with nervous system disorders; the differences were statistically insignificant; see annex 2



Ryc. 70. Średnie odsetki aktywowanych limfocytów T (CD3⁺HLA-DR⁺) w PMR u pacjentów z chorobami układu nerwowego; różnice nie były znamienne statystycznie

Fig. 70. Mean percentage of activated T lymphocytes (CD3⁺HLA-DR⁺) in cerebrospinal fluid of patients with nervous system disorders; the differences were statistically insignificant; see annex 2

Powyższe obserwacje dokumentują wpływ chorób zakaźnych na skład głównych subpopulacji limfocytów w PMR. W szczególności odnosi się to do ostrych zakażeń wirusowych, takich jak mononukleozą zakaźną, ostra choroba retrowirusowa czy świnka, w których obserwowane zmiany wydają się być związane z zaburzeniami obserwowanymi we krwi obwodowej.

Jedyną obserwacją mogącą mieć praktyczne zastosowanie kliniczne był znacznego stopnia wzrost odsetka limfocytów B w PMR obserwowany w przebiegu neuroboreliozy. Porównanie wartości procentowych limfocytów B w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z neuroboreliozą i w pozostałych badaniach, a także obliczenia potwierdzające możliwość wykorzystania tej obserwacji w diagnostyce różnicowej, przedstawiono w tabeli 23.

Tabela 23. Porównanie wartości procentowych limfocytów B w PMR u pacjentów z neuroboreliozą i w pozostałych badanych przypadkach

Table 23. Comparison of cerebrospinal fluid lymphocytes B percentages in patients with neuroborreliosis and other analyzed cases

Limfocyty B w PMR/ <i>Cerebrospinal fluid lymphocytes B</i>	Neuroborelioza/ <i>Neuroborreliosis</i>	Pozostałe / <i>Other</i>	Ogółem/ <i>Total</i>
≥7%	11	6	17
<7%	3	116	119
Ogółem / <i>Total</i>	14	122	136

OR=70,89 (95% przedział ufności/*confidence interval*: 13,05-460,01)

Mantel-Haenszel $\chi^2=61,83$, $p<0,0000001$; test Fishera/*Fisher exact* $p<0,0000001$

czułość/*sensitivity*: 0,79; swoistość/*specificity*: 0,95; PPV: 0,65; NPV: 0,97

5.3. Podsumowanie wyników

I. Wyniki, które mogą mieć zastosowanie w rutynowej praktyce lekarskiej:

1. Ostre wirusowe zapalenie mózgu – badanie krwi obwodowej:

Ocena liczby limfocytów T CD4⁺ (spadek liczby bezwzględnej poniżej 500/mm³) może mieć zastosowanie w diagnostyce różnicowej ostrego wirusowego zapalenia mózgu; badanie to wykazywało szczególną przydatność w różnicowaniu początkowego okresu ostrego wirusowego zapalenia mózgu z takimi jednostkami chorobowymi jak udar niedokrwienny i SM.

2. Borelioza ośrodkowego układu nerwowego – badanie PMR:

Ocena odsetka limfocytów B (CD19⁺) w płynie mózgowo-rdzeniowym (wzrost >7%) może mieć zastosowanie w diagnostyce różnicowej neuroboreliozy.

3. Zakażenie HIV – badania krwi obwodowej:

a) Zespół mononukleozopodobny w przebiegu ostrej choroby retrowirusowej różnił się od zespołów o innej etiologii:

- znamienym spadkiem liczby limfocytów T CD4⁺ (w zakażeniu EBV i CMV obserwowano nieznamienny wzrost liczby komórek T CD4⁺),
- znamienym spadkiem subpopulacji CD8⁺CD45RA⁺.

- b) Obserwowano istotne pogorszenie rokowania co do życia po obniżeniu się liczby limfocytów T CD4⁺ poniżej 200/mm³, dlatego wyniki poniżej tej wartości powinny być traktowane jako wskazanie do rozpoczęcia terapii antyretrowirusowej (patrz tabela 13). Jednak wykazano również istnienie podgrupy pacjentów, u których liczba CD4 utrzymywała się na stabilnie niskim poziomie przez okres co najmniej 3 lat i nie wiązało się to ze złym rokowaniem co do życia.
- c) Spadek liczby limfocytów T CD4⁺ w tempie większym niż -60%/rok wiązał się z istotnym pogorszeniem rokowania co do życia (patrz tabela 14); dlatego znaczne spadki, nawet przy stosunkowo wysokich wartościach bezwzględnych liczby CD4, mogą być traktowane jako wskazanie do rozpoczęcia terapii antyretrowirusowej.
- d) Zakażenia oportunistyczne oraz inne jednostki chorobowe występujące u pacjentów zakażonych HIV mogą być podzielone na dwie podgrupy:
 - Występujące (90% przypadków) w zakresie poniżej 560 limfocytów T CD4⁺/mm³ (zapalenie płuc, gruźlica, posocznice, zakażenia *Herpes*, grzybica przełyku, a także małopłytkowość).
 - Występujące (90% przypadków) w zakresie poniżej 200 limfocytów T CD4⁺/mm³ (pneumocystozowe zapalenie płuc, cytomegalowirusowe zapalenie siatkówki, zakażenia prątkami atypowymi, toksoplazmoza, kryptokokoza, a także postępująca wieloogniskowa leukoencefalopatia) - patrz rycina 44.

II. Wyniki, które mają wartość poznawczą i mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań:

Ostre choroby zakaźne o etiologii bakteryjnej i pasożytniczej

1. W bakteryjnych chorobach zakaźnych obserwowano spadek liczby limfocytów, przede wszystkim subpopulacji T CD4⁺ i T CD8⁺ oraz komórek NK; spadek ten był proporcjonalny do ciężkości przebiegu klinicznego zakażenia.
2. W zakażeniach paciorkowcowych (róża, angina) obserwowano znamieny spadek liczby limfocytów T, głównie subpopulacji CD8⁺, w mniejszym stopniu CD4⁺.
3. Wykazano, że zakażenia paciorkowcowe nieznacznie różnią się między sobą pod względem składu głównych subpopulacji limfocytów obserwowanych w ich trakcie – w przypadku róży obserwowano wzrost odsetka aktywowanych limfocytów T (CD3⁺HLA-DR⁺), odmiennie niż w anginie.
4. W boreliozie zmiany składu subpopulacji limfocytów były bardzo niewielkie. Obserwowano przede wszystkim spadek liczby komórek NK; spadek liczby limfocytów T (zarówno subpopulacji CD4⁺ jak i CD8⁺) nie osiągnął wartości znamienych statystycznie.
5. W większości infekcji bakteryjnych obserwowano wzrost wartości stosunku CD4/CD8, co oznacza, że spadek liczby limfocytów T CD8⁺ był większy niż subpopulacji limfocytów T CD4⁺. Jedynie w posocznicy - jednej z najcięższych postaci zakażeń bakteryjnych - bardzo głęboki spadek dotyczył obu ww. subpopulacji w niemal jednakowym stopniu.

6. Posocznica różniła się od ropnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych niższą limfocytozą całkowitą, a w szczególności spadkiem liczby limfocytów T CD4⁺.
7. Odnotowane znaczne spadki większości głównych subpopulacji limfocytów w zatruciach pokarmowych świadczą o istotnej roli układu odpornościowego w patogenezie tej powszechnej jednostki chorobowej, a także o roli układu chłonnego jelit w funkcjonowaniu układu odpornościowego.
8. We włośnicy, pomimo niezbyt ciężkiego przebiegu klinicznego analizowanych przypadków, obserwowano znacznego stopnia spadki liczby bezwzględnej wszystkich limfocytów, przede wszystkim subpopulacji T o fenotypie CD8⁺ oraz komórek NK.

Ostre choroby zakaźne o etiologii wirusowej

9. Obserwowano również spadki liczby głównych subpopulacji limfocytów, jednak ze względu na niewielką ilość przypadków ostrych chorób zakaźnych o etiologii wirusowej analizy statystyczne nie wykazały istotnych różnic w porównaniu do wartości uzyskanych u osób zdrowych. Wykazano jedynie, że w przebiegu świnki:
 - a. dochodziło do spadku liczby limfocytów subpopulacji T CD4⁺, z wtórnym spadkiem stosunku CD4/CD8.
 - b. obserwowano wzrost odsetka aktywowanych limfocytów T (CD3⁺HLA-DR⁺).
 - c. w przebiegu świnkowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych odnotowano również znamienny wzrost liczby limfocytów T subpopulacji CD8⁺ we krwi obwodowej, dodatkowo obniżający stosunek CD4/CD8.

Przewlekłe choroby zakaźne o etiologii wirusowej – przewlekłe zapalenie wątroby

10. Zarówno w przewlekłym zapaleniu wątroby HBV jak i HCV obserwowano spadek wartości stosunku CD4/CD8, jednak dokonywał się on w odmiennym mechanizmie:
 - a. w przewlekłym zakażeniu HBV statystycznie znamienne obniżała się liczba bezwzględna limfocytów T o fenotypie CD4⁺;
 - b. w przewlekłym zakażeniu HCV statystycznie znamienne rosła liczba bezwzględna limfocytów T o fenotypie CD8⁺.
11. W przewlekłym zapaleniu wątroby typu B obserwowano statystycznie znamienne wyższe wartości limfocytów B.
12. Zarówno w przewlekłym zakażeniu HBV jak i HCV obserwowano statystycznie znamienne wyższe wartości procentowe aktywowanych limfocytów T.
13. W autoimmunologicznym zapaleniu wątroby odnotowano znamienne wyższe wartości liczby bezwzględnej limfocytów T w porównaniu do osób zdrowych.

Zakażenia wywołane wirusami *Herpes*

14. Zakażenia wywołane analizowanymi wirusami *Herpes* cechowały się znamienym wzrostem odsetka aktywowanych limfocytów T - z wyjątkiem zakażeń *Herpes simplex*.

15. Badania głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w zakażeniach wywołanych wirusami *Herpes* sugerują możliwość podziału tych zakażeń na dwie podgrupy:
 - a. Zakażenia *Herpes a*, związane z wystąpieniem wykwitów skórnych (*Herpes simplex*, *Varicella/Zoster*), w których uzyskane wyniki nie różniły się istotnie od osób zdrowych; zaobserwowano jedynie:
 - i. W zakażeniu *Herpes simplex* - znamieny **spadek** liczby komórek NK i limfocytów T subpopulacji $CD8^+$, z wtórnym wzrostem stosunku $CD4/CD8$.
 - ii. Porównując ze sobą wyniki uzyskane u pacjentów z ospą wietrzną i półpaścem obserwowano znamienne wyższy odsetek aktywowanych limfocytów T u chorych z ospą wietrzną (26,0% vs. 17,6%, $p=0,025$ w teście t-Studenta); poza tym nie wykazano istotnych różnic pomiędzy tymi jednostkami chorobowymi w zakresie składu głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej.
 - b. Zakażenia *Herpes β i γ*, z dominującymi ogólnoustrojowymi objawami klinicznymi (cytomegalia, mononukleozą zakaźną), w których rozwojowi zespołu mononukleozopodobnego towarzyszył znamieny wzrost całkowitej limfocytozy, a w szczególności wzrost liczby limfocytów T o fenotypie $CD8^+$, z wtórnym spadkiem wartości stosunku $CD4/CD8$ oraz wzrost liczby komórek NK.

Zakażenie HIV – faza ostra (ostra choroba retrowirusowa)

16. Zespół mononukleozopodobny, niezależnie od etiologii – w tym także w przebiegu ostrej fazy zakażenia HIV, cechował się:
 - a. przemijającym wzrostem liczby całkowitej limfocytów, a w szczególności limfocytów T o fenotypie $CD8^+$, z wtórnym spadkiem stosunku $CD4/CD8$,
 - b. wzrostem odsetka aktywowanych limfocytów T ($CD3^+CD8^+HLA-DR^+$, $CD3^+CD8^+CD38^+$),
 - c. spadkiem liczby limfocytów B ($CD19^+$).
17. Wzrost liczby limfocytów T $CD8^+$ w przebiegu zespołu mononukleozopodobnego był następstwem wzrostu liczby komórek pamięci immunologicznej ($CD8^+CD45RO^+$).

Zakażenie HIV – faza przewlekła; historia naturalna

18. W analizowanej grupie do zakażenia HIV dochodziło najprawdopodobniej średnio na około 2,13 roku przed rozpoczęciem obserwacji.
19. Zmiany liczby poszczególnych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w przebiegu zakażenia HIV u osób nieleczonych antyretrowirusowo cechowały się znaczną zmiennością i różnorodnością, populacyjną jak i osobniczą; spośród wszystkich subpopulacji największą regularnością wykazywały się zmiany w zakresie subpopulacji limfocytów T $CD4^+$.
20. Zmiany liczby limfocytów T $CD4^+$ krwi obwodowej w badaniach populacyjnych u osób zakażonych HIV i nieleczonych HAART wykazywały trójfazowość przebiegu (patrz rycina 40):
 - a. początkowy szybki spadek liczby $CD4$.
 - b. okres stabilizacji/niewielkich zmian liczby $CD4$; stabilizacja ta dokonywała się na indywidualnym osobniczo poziomie.

- c. ponownie szybszy spadek liczby CD4 w okresie 2-3 lat przed zgonem.
21. Nie wykazano istotnych klinicznie zależności w zakresie zmian liczby limfocytów B, CD8, NK ani markerów aktywacji limfocytów T (HLA-DR⁺) w przebiegu historii naturalnej zakażenia HIV u osób nieleczonych antyretrowirusowo.

Infekcje oportunistyczne i inne jednostki chorobowe występujące w przebiegu zakażenia HIV

22. Występowanie infekcji oportunistycznych jest najsilniej związane ze spadkami liczby limfocytów T CD4⁺. Inne subpopulacje (limfocyty T CD8⁺, limfocyty B, w mniejszym stopniu komórki NK) także wykazują niższe wartości u osób z zakażeniami oportunistycznymi, jednak różnice te są mniej nasilone.
23. Niskie wartości limfocytów B obserwowano w przypadku zakażeń *Herpes* oraz w przebiegu małopłytkowości. Natomiast w toksoplazmozie obserwowano nieproporcjonalnie wysokie liczby limfocytów B (patrz analiza rang, tabela 16).
24. Szczególnie niską liczbę komórek NK odnotowano w przebiegu zakażeń *Herpes*.
25. Wysoki odsetek aktywowanych limfocytów T stwierdzono w zakażeniach *Herpes*, w PML i toksoplazmozie.

Wpływ terapii antyretrowirusowej na liczbę limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej u pacjentów zakażonych HIV

26. Terapia antyretrowirusowa powodowała istotny wzrost liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej, a w szczególności:
- wartości liczby CD4 wśród pacjentów leczonych - w porównaniu do osób nieleczonych - były statystycznie znamienne wyższe w okresie co najmniej 12 lat obserwacji;
 - u osób leczonych HAART liczba CD4 powracała do wartości wyjściowych średnio po 10 latach;
 - w obserwowanej grupie stosowanie jakiejkolwiek terapii antyretrowirusowej wiązało się z siedmiokrotnie niższym ryzykiem zgonu.
27. Nie wykazano istotnego wpływu terapii antyretrowirusowej na liczbę limfocytów T CD4⁺ wśród osób z wyjściowo wysokimi wartościami liczby CD4 (> 500 komórek/mm³).
28. Obserwowano statystycznie znamienne wyższe wartości liczby limfocytów T CD4⁺ wśród osób rozpoczynających leczenie antyretrowirusowe HAART w okresie 1996–2006 w porównaniu do osób rozpoczynających leczenie w okresie 1992–1995; nie wykazano istotnych różnic pomiędzy osobami rozpoczynającymi leczenie w okresach 1996–2000 i 2001–2006.

Wpływ współistniejących zakażeń wirusowych na liczbę limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej u osób zakażonych HIV

29. Nie wykazano jednoznacznego wpływu współistnienia zakażeń HCV, HBV i CMV ani stosowania dożylnych środków odurzających na tempo zmian liczby limfocytów T CD4⁺ w badanej grupie osób zakażonych HIV, leczonych jak i nieleczonych.

30. Wykazano gorsze odległe (>3 lat) wyniki terapii antyretrowirusowej u osób zakażonych HIV w związku ze stosowaniem narkotyków dożylnych, w porównaniu do pozostałych pacjentów.

Choroby zakaźne ośrodkowego układu nerwowego

31. Wykazano wiele istotnych różnic w składzie głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w tej grupie chorych w porównaniu do wartości stwierdzonych u osób zdrowych, między innymi:
- a. w większości procesów patologicznych – zakaźnych, zapalnych jak i naczyniopochodnych – obserwowano znamienne spadki całkowitej limfocytozy, a w szczególności limfocytów T (subpopulacji $CD4^+$ jak i $CD8^+$), a także komórek NK;
 - b. zmiany wykazane u chorych z zapaleniem rdzenia kręgowego były zbliżone do obserwowanych u pacjentów z zapaleniem mózgu;
 - c. w ostrym wirusowym zapaleniu mózgu i w zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych w przebiegu świnki obserwowano znamienny wzrost liczby limfocytów T subpopulacji $CD8^+$ we krwi obwodowej.
32. W przebiegu świnkowego zapalenia opon obserwowano wzrost odsetka aktywowanych limfocytów T ($CD3^+HLA-DR^+$).

Choroby zakaźne ośrodkowego układu nerwowego – wyniki badań płynu mózgowo-rdzeniowego

33. Skład głównych subpopulacji limfocytów w płynie mózgowo-rdzeniowym różnił się od wartości obserwowanych we krwi obwodowej; w szczególności wykazano niskie odsetki limfocytów B i komórek NK oraz wyższe wartości stosunku $CD4/CD8$, a także wyższy odsetek aktywowanych limfocytów T, jednak różnice te nie były znamienne statystycznie.
34. Już w najwcześniejszych fazach zakażenia HIV (ostra choroba retrowirusowa) dochodzi do odwrócenia stosunku $CD4/CD8$ w płynie mózgowo-rdzeniowym i wzrostu odsetka aktywowanych limfocytów T.
35. Odwrócenie stosunku $CD4/CD8$ i wzrost liczby aktywowanych limfocytów T w płynie mózgowo-rdzeniowym obserwowano także w przebiegu mononukleozy zakaźnej.

6. Dyskusja

6.1. Osoby zdrowe – zakres normy

Ocena subpopulacji limfocytów u osób zdrowych nie stanowiła zasadniczego celu niniejszego badania. Niezbędne było jednak wyodrębnienie grupy porównawczej, do której można byłoby odnosić wyniki uzyskane u pacjentów z chorobami zakaźnymi.

W tabeli 5 zwraca uwagę fakt, że wartości średnie są wyższe niż mediany. Zjawisko to dotyczyło wszystkich badanych subpopulacji i odnotowywane było także w innych doniesieniach na ten temat [7, 47, 119, 237]. Oznacza to, że zakres normy, niezależnie od populacji i subpopulacji, jest szerszy po stronie wzrostów i istotnie zawężony po stronie spadków liczby poszczególnych subpopulacji limfocytów w stosunku do średniej/mediany. Obserwacja ta ma o tyle istotne znaczenie, że w większości dalszych analiz obserwowano właśnie spadki liczby komórek.

Sumaryczne wyniki uzyskane u osób zdrowych nie różnią się istotnie od zakresów normy publikowanych w literaturze dla populacji europejskiej – na podstawie wyników badań przeprowadzonych we Włoszech, Niemczech, Holandii i Szwajcarii. W porównaniu do populacji włoskiej odnotowano niższe wartości aktywowanych limfocytów T, zarówno bezwzględne jak i względne. Natomiast wśród Szwajcarów obserwowano znacząco niższe wartości dla wszystkich subpopulacji. Odbiegają one najbardziej od pozostałych doniesień. Rozbieżności te trudno jednoznacznie wyjaśnić, jednak zwraca uwagę fakt, że badanie to objęło jedynie 70 osób i było wykonywane według nieco odmiennej metodologii. Należy podkreślić, że w niniejszej pracy wszystkie analizy przeprowadzone zostały na jednym cytometrze, za pomocą jednej metody barwienia i przy użyciu odczynników jednej firmy, co jest o tyle istotne, że w analogicznym badaniu (choć znacznie większym, obejmującym 1311 osób badanych) Santagostino i wsp. wykazał, że każdy z tych elementów ma wpływ na uzyskiwane wartości [26, 119, 127, 198, 219, 228, 237].

Doniesienia z terenu Europy nierzadko istotnie różniły się od wyników uzyskiwanych wśród mieszkańców innych kontynentów: dane bardzo zbliżone do prezentowanych w niniejszej pracy opublikowano dla obywateli Arabii Saudyjskiej, natomiast w Indiach, Chinach i Etiopii obserwowano niższe wartości liczby bezwzględnej limfocytów T CD4⁺ (666–727/mm³) i stosunku CD4/CD8 (nawet 1,04), a w Japonii stwierdzono wyższe wartości liczby limfocytów T CD8⁺ (średnio 795/mm³). Najwyższe wartości liczby limfocytów T CD4⁺ odnotowano w Kamerunie (980/mm³). W populacji chińskiej wykazano ponadto wyższe wartości liczby limfocytów B i komórek NK. Co więcej, różne doniesienia z odległych geograficznie regionów Chin przyniosły odmienne wyniki w zakresie liczby CD4⁺ i CD8⁺. Przyczyną obserwowanych różnic mogą być uwarunkowania genetyczne, ale także, jak pokazuje praca z terenu Niemiec, styl życia osób badanych (palenie tytoniu, wysiłek fizyczny, a nawet stres) jak i metodyka badania [5, 7, 46, 79, 121, 127].

Porównanie uzyskanych wyników z wynikami innych badań przedstawiono w tabeli 24. Można w niej również zauważyć wyższą liczbę komórek NK wśród mieszkańców Azji.

Tabela 24. Porównanie średnich wartości głównych subpopulacji limfocytów uzyskanych w różnych populacjach osób zdrowych [5, 7, 26, 47, 119, 121, 198, 237]

Table 24. Peripheral blood lymphocyte subsets normal ranges in various populations

Badana populacja/ <i>Analyzed population</i>	Limfocytoza/ <i>Lymphocytosis</i>	CD19 ⁺	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4/ CD8	%CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	NK
Polacy	2079	266	1502	899	634	1,55	9,4	282
Włosi 1		231	1533	940	551	1,71	5,8	278
Włosi 2	2022	215	1441	878	482	1,82		231
Filipińczycy	2533	284	1547	825	653	1,26		756
Niemcy	1950	220	1320	870	460	1,9		280
Szwajcarzy		170	1075	691	347	2,1	3,7	184
Hindusi				720	679	1,16		
Chińczycy 1	2055			727	539	1,49		
Chińczycy 2	2375	353	1590	838	642	1,43		419
Saudyjczycy	2224	230	1618	869	615	1,41		262
Etiopczycy	1857	191	1555	775	747	1,04		250
Holendrzy	2054	313	1525	993	506	1,96		

Analiza składu subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w zależności od wieku – podobnie jak w populacji włoskiej, a przeciwnie do znacznie mniejszego badania z terenu Niemiec – nie wykazała istotnych zmian w składzie głównych subpopulacji limfocytów po 5 roku życia. Dlatego w niniejszej pracy włączenie do dalszych analiz nielicznych przypadków osób pomiędzy 8 a 16 rokiem życia nie powinno mieć istotnego wpływu na otrzymane wyniki. Jedynym wyjątkiem jest liczba limfocytów B, wyższa u dzieci i nastolatków; ta obserwacja również znajduje potwierdzenie w doniesieniach literaturowych [119, 198, 219, 237].

Porównanie wyników uzyskanych dla kobiet i mężczyzn wykazało istotnie niższe wartości liczby komórek NK oraz niższą wartość stosunku CD4/CD8 (wynikającą z sumowania się nieznamienne niższych wartości liczby limfocytów T CD4⁺ i wyższych CD8⁺) u kobiet. Podobne różnice odnotowano także w innych badaniach przeprowadzonych na terenie Europy – w Niemczech i Włoszech – a nawet w Etiopii. Jedną z prawdopodobnych przyczyn tego zjawiska może być wpływ hormonów na ekspresję błonową antygenów warunkujących migrację limfocytów [119, 127, 198, 219, 237].

Subpopulacje limfocytów wykazują również niewielkie wahania dobowe i roczne, jednak badania opisujące te wahania dotyczyły głównie wartości procentowych i wykonywane były zazwyczaj metodami innymi niż cytometria przepływowa [152, 280].

Powyższe obserwacje podkreślają konieczność stworzenia indywidualnego zakresu normy w odniesieniu do badanej populacji jak i przyjętej metodyki przeprowadzania badań. W dostępnej literaturze nie znaleziono tego typu danych dla populacji polskiej.

6.2. Ostre choroby zakaźne o etiologii bakteryjnej

Analiza wyników badań przeprowadzona wśród pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii bakteryjnej wykazała istotne spadki liczby wszystkich głównych

subpopulacji limfocytów krwi obwodowej. Spadki te były znamienne nawet w odniesieniu do stosunkowo łagodnie przebiegającego pod względem klinicznym zakażenia, jakim jest borelioza. Najpewniej zmniejszenie się liczby poszczególnych subpopulacji limfocytów jest wynikiem ich migracji poza światło naczyń, prawdopodobnie do tkanek i narządów, w następstwie zmiany ekspresji białek adhezyjnych na powierzchni tych komórek.

Odnotowane zmiany były odwrotne co do kierunku (spadki) w porównaniu do tych, które są zwykle obserwowane w odniesieniu do granulocytów w przebiegu chorób bakteryjnych – wzrost granulocytozy, a także pojawienie się form młodych w rozmazie, stanowią rutynowy, czuły choć nieswoisty, wykładnik etiologii bakteryjnej zakażenia. Należy podkreślić, że samo procentowe przesunięcie w rozmazie w stronę granulocytów nie musi świadczyć o infekcji bakteryjnej, gdyż może wynikać jedynie ze znacznego spadku liczby całkowitej limfocytów – tak dzieje się niejednokrotnie w przebiegu wirusowego zapalenia mózgu. Dlatego w diagnostyce różnicowej zakażeń bakteryjnych daleko bardziej swoiste jest pojawienie się w rozmazie postaci młodych granulocytów. Niestety, klasyczny rozmaz w trybie ostro-dyżurowym wykonywany jest coraz rzadziej.

W zakresie limfocytów T i komórek NK spadki te były w dużym stopniu proporcjonalne do ciężkości zakażenia i związanego z nim ryzyka zgonu. Fakt ten podkreśla znaczenie zaburzeń w układzie odpornościowym występujących w odpowiedzi na zakażenie bakteryjne i może stanowić jeden z elementów oceny rokowania w tej grupie chorych. Ponadto obserwowane spadki były większe w zakresie limfocytów T CD8⁺, o czym świadczy wzrost stosunku CD4/CD8. Tylko w posocznicy dominowały spadki liczby limfocytów T CD4⁺ i był to jedyny parametr znamienne różnicujący tę jednostkę chorobową od ropnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych [135].

Zwraca uwagę znaczna rozbieżność pomiędzy głębokimi odchyleniami od normy obserwowanymi u chorych na włośnicę, a stosunkowo dobrym klinicznie stanem ogólnym, pozwalającym na dalszą ambulatoryjną ich obserwację, przy braku wskazań do hospitalizacji.

Szczególnie ciekawą obserwacją były również znaczne spadki liczby poszczególnych subpopulacji limfocytów wśród chorych na zatrucie pokarmowe. Były one porównywalne z tymi, jakie obserwowano w przebiegu posocznicy. Wskazuje to na rolę aktywacji układu odpornościowego w patogenezie tej jednostki chorobowej, w której czynnik etiologiczny zazwyczaj pozostaje w świetle jelita, nie przedostając się poprzez barierę śluzówkową, a stan kliniczny w dużej mierze jest następstwem reakcji zapalnej. Klasycznym przykładem substancji silnie oddziałującej na układ odpornościowy jest enterotoksyna gronkowcowa, jeden z głównych czynników wywołujących zatrucia pokarmowe. Także w przypadku zakażeń *Shigella* wykazano ich istotny wpływ na aktywację układu immunologicznego [111, 196]. W dostępnej literaturze nie znaleziono doniesień na temat zmian w składzie subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w zatruciu pokarmowym. Natomiast badania ostatnich lat podkreślają znaczenie układu chłonnego jelit w przebiegu np. ostrej choroby retrowirusowej oraz fakt, że jest to prawdopodobnie najobszerniejsza struktura w układzie odpornościowym.

Pewną odmiennością w tej analizie cechowały się limfocyty B, których liczba nie zmieniała się znacząco w jednostkach chorobowych o ciężkim przebiegu klinicznym (posocznica, ropne zapalenie opon, róża), spadając istotnie w anginie i zatruciu pokarmowym. Może to świadczyć o stosunkowo mniejszym udziale tych komórek w patogenezie ostrej fazy zakażeń bakteryjnych.

Ponadto w niektórych jednostkach chorobowych (zatrucie pokarmowe, róża, włośnica) obserwowano wzrost aktywacji limfocytów T. Mimo iż uzyskane wyniki zazwyczaj mieściły się w granicach normy, obserwacja ta może świadczyć o uogólnianiu się reakcji zapalnej [193].

Na szczególną uwagę zasługują różnice odnotowane pomiędzy różą a anginą. Są to zakażenia paciorkowcowe o odmiennej lokalizacji i występujące w różnych grupach wiekowych. W obu jednostkach chorobowych obserwowano znamienne spadki liczby limfocytów T, głównie subpopulacji $CD8^+$, w mniejszym stopniu $CD4^+$. Natomiast tylko w różę obserwowano wzrost odsetka aktywowanych limfocytów T, podczas gdy w anginie parametr ten nie zmieniał się znacząco. Ponadto w anginie obserwowano niższe wartości limfocytów B i to pomimo statystycznie znamienne niższego wieku pacjentów (jak wiadomo odsetki limfocytów B są wyższe u dzieci). Różnice te mogą wynikać zarówno z przyczyn bakteryjnych (odmienne szczepy paciorkowców wywołujące obie jednostki chorobowe), różnej lokalizacji zmian chorobowych (angina zlokalizowana jest w początkowej części układu chłonnego przewodu pokarmowego i być może podlega precyzyjniejszej kontroli), jak i mogą być następstwem czynników zależnych od organizmu gospodarza (znamienna różnica wieku chorych na anginę i różę).

W dostępnej literaturze brak analogicznych doniesień, z którymi można by porównać uzyskane wyniki. Zmniejszanie się liczby poszczególnych subpopulacji limfocytów, tym bardziej nasilone im ciężiej klinicznie przebiega dana jednostka chorobowa, może stanowić odzwierciedlenie uogólnienia się reakcji zapalnej i przełamania mechanizmów prowadzących do jej ograniczenia i zamknięcia w obrębie konkretnej lokalizacji anatomicznej. Obserwacja ta potwierdza również istotną rolę reakcji zapalnej w symptomatologii chorób zakaźnych, a także jej wpływ na rokowanie.

Podsumowując – obserwowane zmiany stanowią punkt wyjścia do dalszych badań nad patogenezą analizowanych jednostek chorobowych, na obecnym etapie nie mogą być jednak stosowane w ocenie stanu klinicznego i rokowania w odniesieniu do indywidualnego pacjenta.

6.3. Ostre choroby zakaźne o etiologii wirusowej

Ze względu na małą liczbę dostępnych wyników nie odnotowano różnic istotnych statystycznie w porównaniu do osób zdrowych. W tej grupie pacjentów również obserwowano spadki – nieznamiennie – liczby poszczególnych subpopulacji limfocytów, w szczególności dotyczyło to komórek NK. Wyjątkiem były ostre wirusowe zapalenia wątroby typu A i B, w których obserwowano, również nieznamiennie, wzrosty liczby limfocytów B i T.

Interesujące obserwacje dotyczyły świnki. W niepowikłanym przebiegu tej jednostki chorobowej odnotowano spadek liczby limfocytów T $CD8^+$, odmiennie niż w przypadku zapalenia opon w przebiegu świnki, w którym wystąpił znamienny wzrost tej subpopulacji. Wyjaśnienie tej różnicy wymaga dalszych badań.

Jak widać ostre choroby zakaźne, niezależnie od etiologii, wytwarzają bodźce powodujące migrację głównych subpopulacji limfocytów poza krew obwodową i w efekcie zmniejszanie się ich liczby w analizie cytometrycznej. Zjawisko to ma charakter przejściowy i zostało szczegółowo opisane w przebiegu epidemii odry wśród dzieci afrykańskich – trwa ono około kilku tygodni w okresie okołochorobowym [158, 181, 230, 278,

283]. Mechanizm tych zmian wymaga wyjaśnienia – dane uzyskane w modelu zwierzęcym sugerują również możliwość wczesnego rozpadu limfocytów T, głównie o fenotypie $CD8^+$, w mechanizmie apoptozy. Obserwacje te znajdują częściowo potwierdzenie w badaniach u ludzi [135, 191, 278]. W odrze, podobnie jak w innych ostrych infekcjach wirusowych, podstawę mechanizmów obronnych stanowi $IFN\gamma$, natomiast elementami wspomagającymi są TNF, przeciwciała oraz limfocyty $CD4^+$ i $CD8^+$ [271, 290]. Wykazano, że komórkowym receptorem dla wirusa odrzy jest CD150 (określany też jako SLAMF7: Surface Lymphocyte Activation Marker), co częściowo tłumaczy limfotropizm tego wirusa oraz zaburzenia immunologiczne, głównie odpowiedzi limfoproliferacyjnych, obserwowane w przebiegu odrzy [299]. W eksperymentalnych modelach zwierzęcych odrzy wywoływała przemijającą immunosupresję, sprzyjającą wystąpieniu wtórnych zakażeń. Odpowiada to zwyczajowej opinii o zwiększonym ryzyku wystąpienia powikłań bakteryjnych, głównie zapaleń płuc, jako wczesnych następstw odrzy, wymaga jednak bliższej analizy epidemiologicznej i immunologicznej [254].

W dostępnej literaturze nie znaleziono analogicznych doniesień na temat subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w innych ostrych chorobach zakaźnych o etiologii wirusowej. M.in. dlatego zdecydowano się na dołączenie wyników pojedynczych obserwacji w tym zakresie do niniejszego opracowania.

6.4. Przewlekłe choroby zakaźne o etiologii wirusowej – przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby

W tej grupie pacjentów spadek liczby komórek obserwowano jedynie w odniesieniu do limfocytów T $CD4^+$, a różnica była statystycznie znamienna tylko w przypadku zakażenia HBV. W obrębie pozostałych subpopulacji odnotowano wzrosty liczby komórek. Był on znamienny również tylko w przypadku HBV. Należy podkreślić, że w zakażeniu HCV udokumentowano pozawątrobowe miejsce replikacji właśnie w obrębie limfocytów B. Wykazano, że HCV wnika do ich wnętrza poprzez receptor CD81. Jednak różnice liczby limfocytów B odnotowane w niniejszym badaniu w zakażeniu HCV nie były znamienne statystycznie [3, 63, 73, 150, 196, 202, 303].

W niniejszym badaniu wykazano natomiast wzrost liczby limfocytów T $CD8^+$ w zakażeniu HCV, lecz nie HBV [259]. Ponadto stwierdzono wzrost odsetka aktywowanych limfocytów T w obu tych zakażeniach. Obserwacja ta jest odmienna od doniesienia Cacoub i wsp. (w którym jednak analizowano wyłącznie ekspresję antygenu CD25) i stanowi ona prawdopodobnie rezultat uogólnienia się długotrwałego procesu zapalnego na skutek przewlekłej stymulacji ze strony nieprzerwanie replikującego patogenu [33].

Jak widać w przewlekłych zakażeniach wirusowych proste liczenie komórek nie może mieć zastosowania w praktyce klinicznej, ani nawet przyczynić się do opisu patogenez tych jednostek chorobowych. W tego typu analizach można wychwycić statystycznie znamienne różnice, które być może byłyby przydatne w prospektywnej ocenie rokowania i tempa progresji procesu chorobowego, jednak nie przybliżają nas one do zrozumienia szczegółów patogenez. Znacznie cenniejsze są badania nad funkcją i aktywnością poszczególnych grup limfocytów, a w szczególności tych, które są ukierunkowane na zwalczanie konkretnych patogenów, jak HBV czy HCV [3, 63].

Kolejna uwaga dotyczy doboru materiału do przeprowadzania badań. Należy pamiętać, że w przypadku przewlekłych zapaleń wątroby proces chorobowy ma swoją ścisłą

lokalizację narządową, a badania krwi obwodowej mogą nie być reprezentatywne dla procesów zapalnych toczących się miejscowo. Znacznie istotniejsze są badania limfocytów – zarówno ich rodzaju jak i aktywności – pobranych bezpośrednio z tkanki wątrobowej, a w szczególności badania mikroskopowe odzwierciedlające wzajemne relacje pomiędzy komórkami zapalnymi a hepatocytami. Są to badania niezwykle trudne metodologicznie, jednak niezwykle cenne. Przykładowo w zakażeniu HCV zaobserwowano odmienność reakcji immunologicznych skierowanych przeciwko HCV w obrębie tkanki wątrobowej (dominacja reakcji typu Th_1) w porównaniu do krwi obwodowej (wykazano głównie reakcje typu Th_2) [223].

Wykorzystywanie komórek układu odpornościowego jako miejsca pozawątrobowej replikacji jest zjawiskiem dobrze udokumentowanym we wzajemnych interakcjach pomiędzy systemem immunologicznym a wirusami hepatotropowymi. Dotyczy ono mononuklearów krwi obwodowej – w szczególności limfocytów B – w zakażeniu HCV i HBV, a także komórek NK w zakażeniu HBV [42, 43, 114, 151, 196, 202, 263, 303].

Biorąc pod uwagę, że HCV może replikować nie tylko w hepatocytach, ale także w limfocytach B (a być może również innych lokalizacjach pozawątrobowych, np. w mózgu [16, 151, 216]) – otrzymujemy model przewlekłego zakażenia, w którym istnieje kilka oddzielnych kompartmentów replikacji wirusa, ale także kilka znacząco odmiennych rodzajów reakcji immunologicznych rozwijanych w odpowiedzi na to zakażenie, w zależności od miejsca replikacji. Model ten sugeruje proces, w którym miejscowe reakcje zapalne w obrębie wątroby są na tyle skuteczne, że doprowadzają do skutecznej, ponawianej eliminacji wirusa z hepatocytów, jednak narząd ten podlega kolejnym reinfekcjom, HCV wywodzącym się z komórek krwi obwodowej. W tych ostatnich natomiast układ odpornościowy nie potrafi skutecznie wyeliminować patogenu. Dzieje się tak m.in. poprzez uaktywnienie regulatorowego działania supresyjnych limfocytów $CD4^+CD25^+$. W ten sposób w przebiegu zakażenia HCV wątroba jest wprawdzie narządem podlegającym największej destrukcji, jednak kluczowe patogenetycznie ognisko zakażenia znajduje się poza nią [3, 28, 29, 54, 63, 73, 109, 151, 159, 160, 196, 202, 227, 303].

Wzajemne interakcje pomiędzy układem odpornościowym a wirusami hepatotropowymi, w szczególności HBV, wielokrotnie były poddawane analizom. Z jednej strony wiadomo, że przebieg kliniczny zakażenia HBV w mniejszym stopniu zależy od patogenności samego wirusa, w większym od rodzaju i natężenia reakcji układu odpornościowego wytworzonej w odpowiedzi na zakażenie. W rzadkich przypadkach dochodzi do rozwoju postaci piorunujących (*hepatitis fulminans*), związanych z niezwykle poważnym rokowaniem co do życia i będących efektem gwałtownej odpowiedzi immunologicznej. Na przeciwnym krańcu skali reakcji rozwijanych w odpowiedzi na zakażenie tym wirusem hepatotropowym znajdują się odpowiedzi na tyle słabe, że niezdolne do skutecznej eliminacji wirusa. Dotyczy to przede wszystkim zakażeń HCV (aż w ok. 85% przypadków). Jednak również w przypadku HBV, pomimo zablokowania replikacji wirusa i dokonanej eliminacji antygenu HBs, można stwierdzić obecność wirusowego DNA zintegrowanego z materiałem genetycznym hepatocytów pacjenta.

Doniesienia literaturowe dotyczące limfocytów w zakażeniach wirusami hepatotropowymi koncentrują się na mechanizmach prowadzących do przewlekłania się procesu chorobowego i braku skutecznych reakcji limfocytów T $CD8^+$ prowadzących do eliminacji patogenu. Szczególną rolę przypisuje się ponownie dysfunkcji regulatorowych limfocytów T $CD4^+CD25^+$, a także przesunięciom reakcji zapalnej w kierunku limfocytów Th_2 , wywołanym w m.in. intensywnymi mutacjami w regionie NS3 HCV. Ponadto

bezpośrednie oddziaływanie HCV (a konkretnie regionu NS3 wirusa) na komórki regulatorowe może również wskazywać na jeden z możliwych patomechanizmów, za pomocą którego HCV wyzwała autoimmunologiczne zapalenie wątroby [3, 28, 29, 54, 63, 73, 109, 124, 151, 159, 160, 196, 202, 227, 303].

W doniesieniu autorstwa Cacoub i wsp., zbliżonym do niniejszej pracy, również nie wykazano istotnych zmian w zakresie liczby głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w przebiegu przewlekłego zapalenia wątroby typu C [33]. Wykazano również stosunkowo słabe reakcje cytotoksyczne skierowane przeciwko HCV ze strony limfocytów T CD8⁺ i komórek NK w przebiegu tej infekcji. Zanikają one stosunkowo szybko po eliminacji patogenu i prawdopodobnie w dłuższym okresie podtrzymywane są jedynie stałą replikacją wirusa. Natomiast reakcje cytotoksyczne ze strony limfocytów CD4⁺ mają bardzo różny stopień nasilenia, rzadko prowadząc do całkowitej eliminacji zakażenia [28, 29, 30, 40, 54, 148, 227, 289].

Podsumowując – niektóre z wirusów dążąc do wytworzenia stanu przewlekłej replikacji wytworzyły różnego rodzaju mechanizmy umożliwiające „umykanie” układowi odpornościowemu lub wyłączenie jego funkcji. Opisano między innymi:

1. Mechanizm intensywnej zmienności genetycznej poprzez szybko po sobie następujące mutacje; przykładem jest wirus HCV, a także HIV [30, 82, 157].
2. Wbudowywanie się w genom gospodarza (HBV, HIV) [156].
3. Oddziaływania modulujące i osłabiające aktywność układu odpornościowego skierowaną przeciwko tym wirusom (HCV poprzez NS3, HIV przy użyciu gp120 wywołującego zjawisko anergii, HBV poprzez antygen HBe zwany tolerogenem) [124, 156, 225].
4. Równoległe wykorzystywanie wielu odmiennych kompartmentów replikacji (HIV, HCV, w mniejszym stopniu HBV) o odmiennych właściwościach replikacyjnych i immunologicznych [42, 43, 114, 142, 151, 156, 216].

6.5. Zakażenia wywołane wirusami *Herpes*

Wirusy *Herpes* cechują się zdolnością do wywoływania zakażeń latentnych, co w literaturze anglosaskiej określane jest lapidarnym zdaniem: „once infected, always infected”. Historia naturalna zakażeń *Herpes* zawiera w sobie trzy okresy: pierwotne zakażenie, okres utajenia (latencji) oraz reaktywację replikacji wirusa, dokonującą się w sprzyjających okolicznościach i zakończoną ponowną latencją. W niniejszym materiale analizowano zakażenia objawowe, zarówno pierwotne (CMV, mononukleozą zakaźną, ospą wietrzną) jak i reaktywacje (półpasiec, nawracająca opryszczka). Zakażenia te w okresie latencji, przy braku replikacji wirusa, prawdopodobnie nie mają żadnego wpływu na obraz subpopulacji limfocytów krwi obwodowej, a może raczej należałoby powiedzieć: wywoływane przez nie zmiany są uznawane za wartości prawidłowe. Najprawdopodobniej przecież większość osób ujmowanych w tym jak i innych opracowaniach jako osoby zdrowe przebyła w przeszłości zakażenie wirusem ospy wietrznej, a także zakażenia, najczęściej bezobjawowe, pozostałymi wirusami, jak: CMV, HSV czy EBV. Można również założyć, że część różnic obserwowanych pomiędzy odmiennymi geograficznie populacjami osób zdrowych wynika właśnie ze współistnienia odmiennych utajonych infekcji wirusowych (*Herpes*, ale także np. retrowirusy, a nawet pasożyty). Udokumentowano np. wzrost liczby limfocytów CD8⁺, a w szczególności subpopulacji

CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻ w następstwie latentnego zakażenia CMV, podczas gdy zakażenie EBV związane było ze wzrostem liczby komórek CD8⁺CD45RO⁺CD27⁺. Ze względu na powszechność występowania tego i podobnych patogenów – szczególnie trudnym metodologicznie zadaniem byłoby stworzenie zakresu normy dla osób niezakażonych żadnym z wirusów latentnych. Byłyby to niezwykle interesujące poznawczo, jednak w praktyce mało przydatne zakresy wartości [21, 84, 94, 99, 101, 125, 144, 224, 241, 293].

Zakażenia *Herpes* w fazie jawnej klinicznie można podzielić na dwie podgrupy: jednostki chorobowe cechujące się występowaniem wykwitów skórnych (dotyczy to dermatotropowych wirusów z podrodziny *Herpes α*: ospa wietrzna/półpasiec, opryszczka) oraz związane z wystąpieniem w fazie ostrej uogólnionych objawów w postaci zespołu mononukleozopodobnego (wirusy klasyfikowane w obrębie podrodzin *Herpes β* – cytomegalia i *Herpes γ* – mononukleozą zakaźną). Obie grupy różniły się istotnie pod względem obserwowanych zmian w składzie głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej [292].

Pierwotne zakażenie wirusem *Varicella/zoster*, klinicznie określane jako ospa wietrzna, pomimo nasilonej replikacji wirusa nie wiązało się z istotnymi zmianami w składzie głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej. Jedyną znamioną statystycznie różnicą w porównaniu do osób zdrowych był wzrost odsetka aktywowanych limfocytów T, cecha obserwowana we wszystkich niemal zakażeniach wirusami rodziny *Herpes*, również u osób zakażonych HIV. Jak widać pod tym względem ospa wietrzna różniła się od innych ostrych chorób zakaźnych, w których zazwyczaj obserwowano spadki liczby komórek w poszczególnych subpopulacjach. Wirus *Varicella/zoster*, bezpośrednio cytopatogeny i zdolny do zakażenia bardzo różnorodnych komórek, nie wydaje się istotnie wpływać na skład głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w trakcie pierwotnego zakażenia.

Reaktywacje zakażeń *Herpes* (półpasiec, nawroty opryszczki) związane były ze spadkami limfocytozy całkowitej, a w szczególności limfocytów T (głównie subpopulacji CD8⁺, z towarzyszącym wzrostem stosunku CD4/CD8) i komórek NK. Różnice te były znamienne jedynie w przypadku opryszczki nawracającej. Można przyjąć, że spadek liczby limfocytów związanych z przeciwwirusową odpornością komórkową (komórki NK, limfocyty T CD8⁺, w mniejszym stopniu T CD4⁺) wyzwała replikację wirusa i sprzyja wystąpieniu wykwitów chorobowych. Jest mniej prawdopodobne, że dzieje się odwrotnie – obserwowane zmiany stanowią następstwo replikacji wirusa. Wskazuje na to brak istotnych odchyśleń od normy w analizowanych subpopulacjach limfocytów w fazie pierwotnej zakażenia (ospa wietrzna). W tym okresie replikacja wirusa jest szczególnie intensywna, a mimo to nie wpływa ona istotnie na skład subpopulacji limfocytów krwi obwodowej. Jednak ostateczne wyjaśnienie tego zagadnienia dałyby jedynie – trudne metodologicznie – badania prospektywne, określające zmiany w liczbie poszczególnych subpopulacji limfocytów bezpośrednio poprzedzające wystąpienie replikacji wirusa i pojawienie się wykwitów skórnych. Nie można również jednoznacznie wskazać mechanizmów prowadzących do tego typu spadków odporności komórkowej, gdyż niejednokrotnie nie są one klarowne pod względem klinicznym, jak stres czy nadmierny wysiłek fizyczny. U chorych z półpaścem czy nawracającą opryszczką nie zawsze współlistnieją czynniki obciążające w postaci typowej immunosupresji, np. w postaci współlistniejącej choroby nowotworowej, przeszczepu narządowego czy zakażenia HIV. Przykładowo – opryszczka wargowa nierzadko towarzyszy ciężkiej infekcji bakteryjnej (zapalenie płuc, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych). Ponieważ są to najczęściej

zakażenia wywołane przez *Streptococcus pneumoniae* – uzasadnione wydają się być badania dotyczących zaburzeń immunologicznych występujących w przebiegu pneumokokowego zapalenia płuc i sprzyjających replikacji wirusa *Herpes simplex*, a prawdopodobnie dotyczących limfocytów T CD8⁺ oraz komórek NK [57, 134, 180, 226, 292].

Można również przypuszczać, że nie każde zakażenie HSV przechodzi w fazę latentną, a niewielka część przypadków kończy się jednak eliminacją wirusa. Mogłyby wskazywać na to pojedyncze, choć dobrze udokumentowane, obserwacje dokonane w trakcie prac nad szczepionką przeciwko HSV. Jednak doniesienia te wymagają potwierdzenia, gdyż brak cech replikacji wirusa nie wyklucza całkowicie jego obecności w ustroju [208].

Pierwotne zakażenia wirusami *Herpes β* (CMV – cytomegalia) i *Herpes γ* (EBV – mononukleozą zakaźną) wywierają natomiast głęboki, choć przemijający, dobrze opisany wpływ na skład głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej. Towarzyszy im typowy zespół objawów klinicznych określanych jako zespół mononukleozopodobny, gdyż pierwotnie został on opisany w odniesieniu do tej właśnie jednostki chorobowej. W jego skład wchodzi: gorączka, uogólnione powiększenie węzłów chłonnych, wątroby i śledziony. Rzadziej mogą pojawić się również: wysypka o różnorodnej morfologii, a także obrzęki wokół oczu i alergizacja na niektóre antybiotyki. Przebieg kliniczny i nasilenie poszczególnych objawów mogą być nieco odmienne w zależności od etiologii zespołu. Dla mononukleozy zakaźnej typowe jest występowanie białych, mazistych nalotów zapalnych na znacznie powiększonych migdałkach, czyli w miejscu nasilonej replikacji EBV. Natomiast w zakażeniu HIV można zaobserwować dodatkowo objawy zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, towarzyszące wnikaniu wirusa do tego „sanktuarium” [18, 86, 101, 156, 241, 251].

W niniejszym badaniu rozwój zespołu mononukleozopodobnego w przebiegu zakażenia EBV czy CMV związany był ze statystycznie znamionymi wzrostami całkowitej limfocytozy, a w szczególności wzrostem liczby limfocytów T CD8⁺ i komórek NK. Równolegle nie stwierdzano istotnych zmian liczby limfocytów T CD4⁺, a wtórnie znacznemu obniżeniu ulegał stosunek CD4/CD8. Obserwowano również znaczny wzrost odsetka aktywowanych limfocytów T. Statystycznie znamienne spadki obserwowano jedynie w odniesieniu do liczby limfocytów B i jedynie w mononukleozie zakaźnej. Jak wiadomo EBV cechuje się tropizmem do tej subpopulacji limfocytów oraz zdolnością *in vitro* do replikacji niemal wyłącznie w tych komórkach. Spadek liczby limfocytów B może dowodzić ich destrukcji, będącej zarówno bezpośrednim następstwem intensywnej replikacji wirusa w ich wnętrzu, jak i lizy w wyniku reakcji zapalnej będącej odpowiedzią na ich zakażenie. Natomiast ekspansja klonalna limfocytów T i ich aktywacja w przebiegu mononukleozy zakaźnej, a także towarzyszący jej zespół mononukleozopodobny, są najprawdopodobniej odpowiedzią zapalną na ekspresję antygenów EBV na powierzchni zakażonych limfocytów B [24, 32, 34, 100, 149, 260, 295, 296].

Ponadto w przebiegu mononukleozy zakaźnej odnotowano wzrost liczby komórek NK, opisywany również przez Williamsa i wsp. Jak wiadomo komórki te mają znaczący udział w ograniczaniu replikacji wirusów już w najwcześniejszym okresie zakażenia i ten fakt może tłumaczyć obserwowany wzrost ich liczby [296].

Jak widać mononukleozą zakaźną cechuje się głębokimi zmianami w składzie subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej. Prawdopodobnie dlatego też jest jedną z jednostek chorobowych najdokładniej przeanalizowanych pod względem obserwowanych w jej przebiegu zjawisk immunologicznych. Wszystkie zmiany wykazane w niniejszej pracy były całkowicie zgodne z doniesieniami innych badaczy [24, 34, 260].

Dlaczego zespół mononukleozopodobny występuje tylko u niektórych zakażonych, a także dlaczego tak jak i inne reakcje na zakażenia *Herpes*, nawet znacznie nasilone, nie są skuteczne i nie kończą się ostateczną eliminacją wirusa? Na te pytania nie ma jak dotąd wyczerpującej odpowiedzi. Według jednej z hipotez rozwój zespołu mononukleozopodobnego w przebiegu zakażenia EBV jest następstwem braku ekspresji na powierzchni limfocytów T CD8⁺ antygenów CCR7 i CD62L, warunkujących przechodzenie tych komórek poza światło naczyń krwionośnych, co skutecznie uniemożliwia ukierunkowanym na niszczenie EBV limfocytom efektorowym dotarcie do miejsc intensywnej replikacji wirusa – głównie migdałków pierścienia Waldeyera. Brak skutecznego miejscowego hamowania replikacji EBV ze strony tych komórek nieustannie stymuluje proliferację kolejnych EBV-specyficznych limfocytów T CD8⁺, które nie mogąc dotrzeć do miejsca replikacji wirusa gromadzą się w obwodowych węzłach chłonnych, wątrobie, śledzionie i krwi obwodowej. Otwartym pozostaje pytanie dlaczego zjawisko to występuje tylko u niektórych osób zakażonych EBV [18, 100, 149].

Dodatkowego komentarza wymaga zjawisko aktywacji limfocytów T obserwowane w przebiegu mononukleozy zakaźnej, wyrażone zwiększoną ekspresją antygenów HLA-DR, ale także CD25, CD38 jak również, nieoznaczanych w niniejszym opracowaniu, CD244 i CD150 (SLAM). Aktywacja układu odpornościowego wiąże się z wydzielaniem zwiększonych ilości mediatorów reakcji zapalnej. W przebiegu mononukleozy zakaźnej są to głównie mediatory reakcji typu Th1: przede wszystkim IFN- γ oraz IL-2. Natomiast poszczególne komórki podlegające aktywacji muszą ostatecznie zginąć. Oba te zjawiska, wyrzut mediatorów reakcji zapalnej jak i następujący po nim rozpad znacznych ilości limfocytów, są w dużej mierze odpowiedzialne za występowanie objawów chorobowych towarzyszących reakcji zapalnej, takich jak gorączka, uczucie osłabienia, brak apetytu/nudności, obrzęki czy niewydolność krążenia. Ponadto niektóre fragmenty EBV, podobnie jak np. *Nef* wirusa HIV, prawdopodobnie posiadają właściwości superantygenów, szybko, silnie i w sposób nieswoisty aktywujących znaczną część limfocytów.

Powyższe mechanizmy dają uzasadnienie teoretyczne dla sterydoterapii powszechnie stosowanej w leczeniu mononukleozy zakaźnej o ciężkim przebiegu klinicznym.

Zjawisko aktywacji limfocytów T podlega ograniczaniu i regulacji poprzez wewnątrz-cytoplazmatyczne białko SAP (SLAM-associated protein). Zaobserwowane, że mononukleozą zakaźną może mieć również przebieg piorunujący lub bezpośrednio przechodzić w procesy rozrostowe. U osób z rzadkim defektem genetycznym, znanym również jako zespół limfoproliferacyjny związany z chromosomem X lub choroba Duncana, którego efektem jest wytwarzanie nieprawidłowego białka SAP, w przypadku zakażenia EBV dochodzi do niekontrolowanego i nie podlegającego ograniczaniu przebiegu aktywacji układu immunologicznego i niezmiernie nasilonej reakcji zapalnej. W efekcie przebieg kliniczny mononukleozy zakaźnej u tych osób, głównie chłopców i młodych mężczyzn, jest niezwykle ciężki i w większości przypadków prowadzi do zgonu [88, 149, 195, 212, 262, 274, 276, 295].

Należy dodać, że zakażenie EBV, CMV czy HIV może przebiegać również bez zespołu mononukleozopodobnego, w postaci bezobjawowej klinicznie serokonwersji i najprawdopodobniej tak właśnie dokonuje się większość zakażeń tymi wirusami. Jako skąpo- lub zupełnie bezobjawowe postacie są one znacznie rzadziej obserwowane i opisywane w literaturze. Czym różnią się osoby, u których pierwotna infekcja EBV dokonuje się bezobjawowo od tych, które rozwijają objawy kliniczne mononukleozy – masowością ekspozycji, uwarunkowaniami genetycznymi, rodzajem wirusa, współistnie-

jącymi czynnikami? Nie wiadomo. W obu przypadkach występuje intensywna replikacja wirusa i w obu kończy się ona przejściem w fazę przewlekłą zakażenia EBV w formie latentnej, dlatego różnica najprawdopodobniej tkwi nie w typie wirusa, lecz w rodzaju reakcji na zakażenie. Nie wiadomo, czy obserwowana w klinicznie jawnych przypadkach mononukleozy zakaźnej intensywna odpowiedź limfoproliferacyjna ze strony aktywowanych limfocytów T CD8⁺ jest szczególną odmianą reakcji obronnej, rozwijaną w odpowiedzi na infekcję wirusową, czy też stanowi ona już element patologii będącej następstwem zakażenia i patogennego oddziaływania intensywnie replikującego wirusa. Jako ekspansja klonalna jest ona najprawdopodobniej odpowiedzią na kontakt z wirusowym antygenem, a nie efektem działania superantygeny. *In vitro* EBV cechuje się wszak zdolnością do transformacji limfocytów B i wywołania ich „nieśmiertelności”. Jest również wiązany z rozwojem niektórych rodzajów nowotworów [100, 149, 224, 241, 251, 262].

W przebiegu zakażenia EBV czy CMV nie opisywano limfoproliferacyjnej reakcji ze strony limfocytów T CD4⁺. Odnotowano natomiast wzrost ekspresji CD150 (SLAM) i CD244 na tych komórkach [295].

Analizując przewlekłe zakażenia wirusowe należy ponadto zadać sobie podstawowe pytanie: jakie mechanizmy prowadzą do ustalenia się przewlekłego/latentnego zakażenia? Dlaczego nie jest możliwa skuteczna eliminacja patogenu przy użyciu sił układu odpornościowego i jakie mechanizmy prowadzą do stanu bezobjawowej klinicznie równowagi pomiędzy replikującym wirusem a kontrolującym go układem odpornościowym?

Odpowiedzi na to pytanie nie mogą dać proste badania liczby limfocytów we krwi obwodowej, zarówno w odniesieniu do zakażeń HBV czy HCV, jak i w stosunku do zakażeń *Herpes* czy nawet HIV. Wirusy te stosują różne mechanizmy, wymienione już uprzednio, wśród których na podkreślenie zasługują: zmienność genetyczna, pozwalająca wirusom na „umykanie” układowi odpornościowemu człowieka, czy zdolność do wbudowywania się w genom gospodarza, typowa dla HBV, HIV i EBV. Ponadto niektóre wirusy (CMV, HIV) potrafią zmniejszać ekspresję antygenów zgodności tkankowej na powierzchni zakażonych komórek, jak i hamować produkcję IFN- γ . Potrafią także wytwarzać białka blokujące prezentację wirusowych antygenów na powierzchni zakażonej komórki. W przypadku latentnych zakażeń CMV ciekawym zjawiskiem jest obecność dodatnich przeciwciał anti-CMV w klasie IgM – przewlekłe lub tylko okresowo – co może sugerować przewlekłą lub okresowo nasilającą się replikację wirusa, mimo to podlegającą kontroli u osób immunokompetentnych. W odniesieniu do wirusa HSV również postuluje się jego wpływ na limfocyty regulatorowe CD4⁺CD25⁺ (Treg), umożliwiający ustalenie się latentnego zakażenia [11, 21, 44, 53, 94, 99, 101, 142, 144, 180, 195, 224, 227, 236, 241, 244, 246, 260, 293, 304].

6.6. Zakażenie HIV

6.6.1. Ostra choroba retrowirusowa

Aktualne poglądy na temat przebiegu wczesnej fazy zakażenia HIV wskazują na układ chłonny przewodu pokarmowego jako miejsce dokonywania się zasadniczych procesów patologicznych w ostrej chorobie retrowirusowej, w okresie pierwszych trzech-czterech tygodni po zakażeniu. W tym miejscu i czasie dokonuje się „zagnieżdże-

nie” wirusa w układzie chłonnym, gwałtowna jego replikacja w komórkach prezentujących antygen i komórkach posiadających na powierzchni receptory CD4 (także inne receptory, m.in. CCR5), której następstwem jest zniszczenie w mechanizmie martwicy około 80% wszystkich limfocytów pamięci immunologicznej o fenotypie T CD4 (głównie CD4⁺CCR5⁺). Równolegle dochodzi do wytworzenia całego wachlarza reakcji odpornościowych, zarówno humoralnych jak i komórkowych, skierowanych przeciwko wirusowi i pozwalających ostatecznie na stopniowe ograniczenie replikacji i zmniejszenie poziomu wirerii HIV. Podkreśla się również, że pierwszy miesiąc zakażenia jest decydujący dla rokowania i dalszego przebiegu zakażenia HIV [55, 86, 138, 156, 203].

Bezpośrednie badania układu immunologicznego w obrębie przewodu pokarmowego są niezwykle trudne metodologicznie, choćby tylko ze względu na skomplikowane i nieprzyjemne dla chorego pobieranie materiału do analiz. Gwałtowne procesy patologiczne toczące się w układzie chłonnym jelita w początkowym okresie zakażenia HIV są natomiast dość słabo odzwierciedlone w wynikach badań krwi obwodowej. Zjawiskami jakie można mimo to zaobserwować we krwi są:

1. Przejściowy spadek liczby komórek CD4, osobniczo różnie nasilony, zależnie od intensywności replikacji HIV; w niniejszej pracy na podstawie przedstawionego przypadku opisano nie jeden, a co najmniej dwa następujące po sobie w krótkim czasie spadki liczby bezwzględnej limfocytów T CD4⁺; odzwierciedla to dynamikę zjawiska będącego nakładaniem się na siebie kilku równoległych procesów: martwicy, apoptozy, migracji limfocytów T CD4⁺ pomiędzy pulami i ich regeneracji w grasicy (patrz rycina 23).
2. Rozwój objawów klinicznych zespołu mononukleozopodobnego z towarzyszącym wzrostem liczby limfocytów T CD8⁺ o fenotypie CD45RO⁺ i CD28⁺ (patrz rycina 24); do zespołu mononukleozopodobnego obserwowanego w przebiegu zakażenia HIV odnoszą się wszystkie przedstawione uprzednio uwagi dotyczące zespołów mononukleozopodobnych o innej etiologii, a mianowicie:
 - a. Reakcja zapalna o typie zespołu mononukleozopodobnego jest nieskuteczna w eliminacji wirusa i kończy się przejściem w fazę przewlekłą zakażenia; dodatkowym czynnikiem sprzyjającym ustaleniu się przewlekłego zakażenia może być istotny spadek liczby komórek T CD4⁺ oraz towarzysząca mu anergia, znacząco obniżające sprawność układu odpornościowego w tym okresie. Należy dodać, że w przypadku infekcji HIV faza przewlekła nie jest fazą latentną i cechuje ją bardzo intensywna replikacja wirusa [11, 24, 44, 236, 246, 277, 304].
 - b. U większości osób zakażonych HIV nie występują objawy zespołu mononukleozopodobnego i nie można obecnie powiedzieć z czego wynika przebieg objawowy lub bezobjawowy.
 - c. Trudno ocenić, czy reakcja limfoproliferacyjna o charakterze zespołu mononukleozopodobnego jest fizjologiczną, choć nadmiernie nasiloną, reakcją na ostre zakażenie wirusowe, czy też stanowi już część patologii będącej następstwem intensywnego oddziaływania wirusa na układ odpornościowy.
3. Wzrost ekspresji markerów aktywacji limfocytów:
 - a. CD38, HLA-DR na limfocytach T CD8⁺, przy niewielkiej ekspresji CD69 i CD25 (patrz rycina 25);

- b. Nieznamiennie wzrosty markerów aktywacji na limfocytach T CD4⁺, z istotnym wzrostem ekspresji HLA-DR w momencie rozwoju zespołu mononukleozopodobnego (patrz rycina 23);
- c. Najwcześniejszym zjawiskiem odnotowanym w zakresie markerów aktywacji limfocytów bezpośrednio po zakażeniu, na długo przed odwróceniem się stosunku CD4/CD8 był szybko przemijający wzrost ekspresji CD69 na limfocytach T CD4⁺ i limfocytach B.

W odniesieniu do obecnie dominujących poglądów na patogenезę wczesnej fazy zakażenia HIV można zgłosić jedno istotne zastrzeżenie: jak to możliwe, że masywna martwica ponad 80% wszystkich limfocytów CD4⁺ obecnych w organizmie człowieka, odbywająca się w stosunkowo krótkim czasie w obrębie przede wszystkim układu chłonnego przewodu pokarmowego, dokonuje się u większości zakażonych w sposób bezobjawowy lub skąpo-objawowy, a w szczególności bez takich objawów jak gorączka czy zaburzenia żołądkowo-jelitowe? Dlaczego ten rodzaj martwicy, w odróżnieniu od zawału mięśnia sercowego, martwicy tkanki nerwowej czy innych narządów, nie wiąże się z wystąpieniem objawów ogólnoustrojowych, jak gorączka, czy miejscowych, wtórnych do lokalizacji procesu chorobowego? Zespół objawów mononukleozopodobnych, odnotowywany w przebiegu ostrej choroby retrowirusowej wiąże się przecież prawie wyłącznie z wystąpieniem szczególnej, limfo-proliferacyjnej odpowiedzi zapalnej wywołanej replikacją wirusa i nie jest patognomoniczny dla HIV. Objawy chorobowe mogą być również lokalizacyjnie związane z wnikaniem wirusa do ośrodkowego układu nerwowego, występują wtedy m.in. objawy zespołu oponowego. Dlaczego, pomimo dokonującej się masywnej martwicy limfocytów CD4, nie obserwuje się nawet dyskretnych objawów anatomicznie wiążących się z przewodem pokarmowym, a większość przypadków pozostaje niema klinicznie? Na obecnym etapie rozumienia patogenезy ostrej choroby retrowirusowej trudno wskazać jednoznaczne wyjaśnienie tego zjawiska.

Od dawna toczy się dyskusja na temat wskazań i przeciwwskazań do leczenia ostrej choroby retrowirusowej. W świetle obecnych poglądów na patogenезę pierwszych tygodni zakażenia należy poważnie brać pod uwagę fakt, że włączenie terapii antyretrowirusowej w tym okresie może w znaczący sposób ograniczyć destrukcję limfocytów T CD4⁺. Z drugiej strony – natężenie replikacji wirusa jest w tym okresie tak wielkie, że znane obecnie leki nie są zdolne do całkowitego jej zablokowania. Stwarza to realne ryzyko szybkiego wytworzenia się mutacji opornych na stosowane środki. Należy dodać, że stosowanie leków antyretrowirusowych wiąże się z możliwością wystąpienia istotnych działań ubocznych. Przeciwnicy terapii argumentują ponadto, że rozpoczęcie leczenia w momencie wystąpienia zespołu mononukleozopodobnego nie może już powstrzymać raz zapoczątkowanych procesów patogenetycznych i nie może doprowadzić do wyeliminowania zakażenia [69, 96, 132, 136, 261].

Ponadto rozpoznanie ostrej choroby retrowirusowej i jej różnicowanie z zespołami o innej etiologii jest utrudnione również przez fakt, że w pierwszych tygodniach po zakażeniu przesiewowe testy serologiczne mogą dać wynik fałszywie ujemny. Czym zatem różni się zespół objawów przypominających mononukleozę zakaźną w przebiegu zakażenia HIV od zespołów o innej etiologii – pod względem składu głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej? W niniejszym badaniu zasadniczą różnicą był właśnie spadek liczby bezwzględnej limfocytów T CD4⁺. W zespołach mononukleozopodobnych o innej etiologii obserwowano raczej nieznamiennie wzrosty liczby tych komórek. Podobną obserwację opublikował Biglino i wsp. [24]. W zakresie rzadziej oznaczanych subpopulacji odnotowano znamienne spadek liczby limfocytów T CD8⁺CD45RA⁺,

co odpowiada spadkowi puli komórek naiwnych i efektorowych w obrębie subpopulacji T CD8⁺. Obserwacja ta jest szczególnie znamienna, gdyż ogólnemu wzrostowi całkowitej liczby limfocytów T CD8⁺ towarzyszył znamienny spadek tej szczególnej subpopulacji. Jak dotąd jedynie Chen i wsp. opisał analogiczny spadek liczby komórek CD8⁺CD45RA⁺, jednak dotyczył on wyłącznie komórek specyficznych dla HIV [44]. Pozostałe różnice nie były znamienne statystycznie. Mimo to prezentowane wyniki stanowią obserwację przydatną praktycznie w diagnostyce różnicowej wczesnej fazy zakażenia HIV. Podsumowanie analizy zmian liczby głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej obserwowanych w przebiegu zespołu mononukleozopodobnego w zależności od jego etiologii przedstawiono w tabeli 25.

Tabela 25. Zmiany liczby głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w przebiegu zakażeń *Herpes* i HIV OCR

Table 25. Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in a course of Herpes infections and acute retroviral syndrome

Rozpoznanie / <i>Diagnosis</i>	Subpopulacja limfocytów / <i>Lymphocyte subset</i>					
	B	T CD4 ⁺	T CD8 ⁺	CD4/CD8	CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	NK
Herpes α (reaktywacja HSV)/ <i>HSV reactivation</i>	↔	↔	↔	↔	↑	↓
Herpes β (CMV – ostre zakażenie)/ <i>Acute CMV infection</i>	↔	↔	↑↑	↓↓	↑↑	↔
Herpes γ (EBV – ostre zakażenie)/ <i>Acute EBV infection</i>	↓	↔	↑↑↑	↓↓↓	↑↑↑	↑
Ostre zakażenie HIV/ <i>Acute retroviral syndrome</i>	↓	↓	↑	↓	↑↑	↔

6.6.2. Historia naturalna zakażenia HIV

Faza początkowa zakażenia HIV trwa kilka tygodni, przebiega burzliwie i decyduje o dalszym przebiegu choroby oraz odległym rokowaniu. Po niej następuje zupełnie odmienny patogenetycznie, ustabilizowany, wieloletni okres zakażenia przewlekłego, cechujący się stopniowym ubytkiem limfocytów T CD4⁺, który ostatecznie prowadzi do pojawienia się zakażeń oportunistycznych i innych chorób wskaźnikowych, typowych dla klinicznie ostatniej fazy zakażenia, objawowego zespołu AIDS. Początkowa część tego okresu, mimo iż klinicznie bezobjawowa, nie może być jednak uznana za typową fazę latentną. W tym okresie dokonuje się intensywna replikacja HIV, jego równoległa eliminacja, a także niszczenie i regeneracja komórek układu odpornościowego.

Od wielu lat prowadzone są intensywne prace mające na celu wyjaśnienie mechanizmów patogenetycznych zakażenia HIV, jednak wiele pytań nadal pozostaje bez odpowiedzi. Obecnie badania obserwacyjne nad historią naturalną zakażenia HIV są coraz trudniejsze do przeprowadzenia, gdyż powszechnie dostępne skuteczne leki antyretrowirusowe głęboko zmieniają naturalny przebieg procesów chorobowych. Obserwacje takie

są aktualnie możliwe prawie wyłącznie w ubogich krajach rozwijających się, jednak budzą wątpliwości natury etycznej.

Dane prezentowane w niniejszej pracy częściowo mają charakter historyczny i podsumowują badania wykonane również w okresie, gdy leki antyretrowirusowe nie były dostępne w Polsce. Drugą grupę stanowią wyniki uzyskane u osób, które odmówiły leczenia lub nie chciały poddać się związanym z nim rygorom. Sumaryczna liczba takich wyników jest stosunkowo niewielka.

Proste przekrojowe porównanie wartości średnich, bezwzględnych i procentowych, wszystkich głównych subpopulacji limfocytów u osób zdrowych i nieleczonych pacjentów zakażonych HIV (patrz tab. 8) wykazało statystycznie istotne różnice w każdym z porównywanych parametrów. Oprócz spadku liczby limfocytów T CD4⁺ wykazano istotne zmniejszenie się liczby limfocytów B, stosunku CD4/CD8, komórek NK oraz wzrost liczby limfocytów T CD8⁺ i odsetka aktywowanych limfocytów T. Wyniki te są dość oczywiste i w pełni pokrywają się z danymi od dawna publikowanymi w literaturze [95, 153, 173, 210, 244].

W opisie przebiegu naturalnego zakażenia HIV i analizie zmian liczby CD4 w czasie natrafiamy jednak na poważną trudność. Z powodu bezobjawowego i zazwyczaj niecharakterystycznego początkowego etapu infekcji – większość pacjentów o zakażeniu dowiaduje się stosunkowo późno i nie potrafi wskazać konkretnego momentu w czasie, w którym do niego doszło. Dlatego dokładne określenie czasowego punktu wyjścia zakażenia jest zazwyczaj niezwykle trudne, szczególnie gdy pacjent był poddany wielokrotnym ekspozycjom. Z tego też powodu opisy dotyczące zmian zachodzących w pierwszych miesiącach po zakażeniu są stosunkowo rzadkie. Tego typu analiza nie może ograniczać się wyłącznie do osób, które w pierwszym wykonanym badaniu wykazywały stosunkowo wysoką, np. powyżej 500/mm³, liczbę limfocytów T CD4⁺. Przyjęcie takiego kryterium powoduje nadreprezentację osób z grupy tzw. *long term non-progressors*

i jednocześnie eliminuje pacjentów z gwałtownie postępującym zakażeniem. Dlatego w niniejszym opracowaniu uwzględniono wszystkie dostępne wyniki odnoszące się do osób nie podlegających terapii antyretrowirusowej, również tych z wyjściowo niskimi wartościami liczby CD4.

W celu uzyskania pełnego obrazu początkowego okresu zakażenia HIV w przedstawianej pracy zastosowano matematyczną interpolację obserwowanych wyników na okres sprzed rozpoczęcia obserwacji. W doniesieniach z literatury nie ma prac stosujących podobną metodykę opracowania danych. Przeprowadzona analiza wykazała, że w badanej grupie chorych do zakażenia HIV dochodziło najprawdopodobniej na około 2,13 roku przed wykonaniem pierwszego oznaczenia liczby limfocytów T CD4⁺. Ponadto, po początkowo stosunkowo szybkim spadku liczby limfocytów T CD4⁺ w pierwszych trzech latach zakażenia, liczba tych komórek stabilizowała się na zmiennym osobniczo poziomie na okres dalszych około pięciu lat.

Kolejnym utrudnieniem jest znaczna zmienność osobnicza historii naturalnej zakażenia HIV, przykładowo przedstawiona na rycinach 34 i 35. W skrajnych przypadkach od zakażenia do rozwoju pełnoobjawowego zespołu AIDS może upłynąć od kilkunastu miesięcy do ponad dwudziestu lat. Znane są czynniki genetyczne, np. wykrywalna u kilku procent przedstawicieli rasy kaukaskiej delecja w pozycji 32 genu kodującego receptor CCR5, które zmniejszają ryzyko infekcji i sprzyjają wydłużaniu się okresu bezobjawowego zakażenia. Znacznie utrudnia to ocenę historii naturalnej końcowego etapu choroby, gdyż zarówno osoby z gwałtowną progresją, które zakażyły się zaledwie

przed kilkunastoma miesiącami, jak i tzw. *long term non-progressors* po kilkunastu lub nawet kilkudziesięciu latach zakażenia – wykazują przed zgonem skrajnie niskie wartości liczby CD4. Z tego powodu w opisie końcowej fazy zakażenia użyto odmienną metodologię, dokonując „obliczeń wstecz”, przyjmując za „punkt dojścia” dzień śmierci chorego z powodu zakażenia HIV. Również w przypadku tej metodologii nie znaleziono analogicznych prac w doniesieniach literaturowych [58, 277].

Tak przeprowadzona analiza wykazała, że po okresie kilkuletniej stabilizacji, na około trzy lata przed zgonem, występuje faza ponownego przyspieszenia tempa spadku liczby limfocytów T CD4⁺. Uproszczone wyniki, pozwalające na szybką ocenę rokowania w rutynowej praktyce lekarskiej przedstawiono w tabeli 26. Okresy przeżycia wydają się być nieco krótsze w porównaniu do przyjętych standardów, co może wynikać z niewielkiej liczby badanych osób, jak i z odmienności populacyjnej [19]. Podobnie jak w przypadku zakresu normy – również i w tym względzie ważne jest określenie parametrów odpowiednich dla konkretnej populacji.

Tabela 26. Przybliżone rokowanie co do życia w grupie nieleczonych osób zakażonych HIV w zależności od liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej

Table 26. Estimated life-expectancy in HIV-infected untreated persons based on peripheral blood CD4 count

Liczba limfocytów T CD4 ⁺ (mm ³) <i>CD4 count</i>	Przybliżone rokowanie co do życia (lata)/ <i>Average life expectancy (years)</i>
> 200	≥3
100 – 200	2
50 – 100	1
<50	<1

Aktualnie obowiązujące zalecenia sugerują rozpoczęcie terapii antyretrowirusowej w przypadku stwierdzenia liczby limfocytów T CD4⁺ ≤ 200 komórek/mm³ [19]. Wyniki prezentowane w powyższej tabeli w pełni potwierdzają ten pogląd. Biorąc pod uwagę działania uboczne leków oraz ryzyko wystąpienia lekoopornych szczepów wirusa wartość 200 komórek/mm³ wydaje się być wartością optymalną.

Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że zjawisko przyspieszenia tempa spadku liczby komórek CD4⁺ było niejednorodne. Na rycinie 38 można wyróżnić obecność więcej niż jednego trendu zmian liczby CD4. Szybkie spadki liczby CD4 dotyczyły zarówno osób z wyjściowo stabilnie wysoką jak i stabilnie niską ich liczbą – obserwacja ta została najdokładniej zilustrowana na rycinie 42. Oznacza to, że część pacjentów potrafi przez długi okres czasu utrzymywać niskie (< 200/mm³) wartości liczby CD4 bez jakiegokolwiek leczenia, a mimo to nie stwarza to dla nich ryzyka progresji choroby i wystąpienia AIDS. U osób tych najprawdopodobniej można byłoby rozważyć dalsze odroczenie leczenia, gdyż mimo niskich wartości liczby CD4 terapia nie przyniesie im dodatkowych korzyści.

Z drugiej strony udokumentowano istnienie pacjentów, którzy ze stabilnie wysokich wartości wyjściowych liczby CD4 przechodzą w fazę gwałtownych jej spadków i szybkiej progresji choroby. Te właśnie osoby powinny otrzymać leczenie stosunkowo wcze-

śnie, być może znacznie powyżej wartości 200 komórek $CD4^+$ /mm³, gdyż opóźnianie decyzji o rozpoczęciu terapii może w takim przypadku stanowić istotne zagrożenie.

Podsumowując – nie tylko liczba bezwzględna $CD4$, ale dodatkowo także tempo jej zmian może stanowić niezależny czynnik rokowniczy w zakażeniu HIV, a w szczególności wystąpienie gwałtownych spadków liczby tych komórek w dłuższym okresie obserwacji powinno być brane pod uwagę przy podejmowaniu decyzji o rozpoczęciu terapii antyretrowirusowej. Ze względu na stosunkowo niewielką liczbę pacjentów poddanych analizie w prezentowanym materiale – znamienne statystycznie pogorszenie rokowania co do życia obserwowano dopiero gdy liczba $CD4$ spadała o co najmniej 60% wartości poprzedniej w przeliczeniu na rok obserwacji. Zjawisko to wymaga dalszych analiz, gdyż najprawdopodobniej już znacznie niższe wartości tempa spadku liczby $CD4$ mogą wiązać się ze znaczącym pogorszeniem rokowania [6, 58, 90, 166].

Oba rodzaje przeprowadzonej analizy, dotyczące początkowej i końcowej fazy historii naturalnej zakażenia HIV, wykazują obecność pomiędzy nimi okresu kilkuletniej stabilizacji liczby limfocytów $T\ CD4^+$. To swoiste *plateau* nie jest efektem obliczeń matematycznych, lecz jednoznacznie wynika z obu rodzajów przeprowadzonych obserwacji. Sumarycznie - analiza naturalnej ewolucji i progresji nieleczzonego zakażenia HIV wykazała trójfazowy przebieg choroby w odniesieniu do tempa spadku liczby limfocytów $T\ CD4^+$. W dostępnej literaturze brak doniesień opisujących taki przebieg infekcji. Niektórzy z autorów obserwowali stabilizację liczby $CD4$ w środkowym okresie zakażenia i dwufazowość jego przebiegu, jednak jak dotąd nie analizowano równie szczegółowo wstępnej fazy, występującej bezpośrednio po ostrej chorobie retrowirusowej [161, 166, 240, 249].

6.6.3. Infekcje oportunistyczne

W schyłkowym stadium zakażenia HIV obserwuje się występowanie zakażeń oportunistycznych, a ich obecność jest m.in. podstawą rozpoznania zespołu AIDS. Zakażenia te pojawiają się w miarę obniżania się liczby limfocytów $T\ CD4^+$ i rozwoju wtórnego niedoboru odporności [163]. Ponadto w przedstawionym materiale poddano analizie także wybrane jednostki chorobowe nie będące zakażeniami oportunistycznymi w ścisłym tego słowa znaczeniu. Wystąpienie PML jest najprawdopodobniej wynikiem zakażenia wirusem JC (wirus z grupy Papova) oraz intensywnej replikacji wirusa HIV w tkance mózgowej. Stanowi ona chorobę wskaźnikową dla AIDS i jej występowanie jest ściśle związane z głębokim i długotrwałym niedoborem odporności w przebiegu zakażenia HIV. Małopłytkowość obserwowana w przebiegu zakażenia HIV spowodowana jest m.in. zdolnością tego wirusa do replikacji w komórkach macierzystych szpiku ($CD34^+$). Ponadto niedobory odpornościowe sprzyjają replikacji parwowirusa B19, wyspecjalizowanego w zakażaniu i niszczeniu tych komórek [110]. Natomiast ropnie poinfekcyjne nie są traktowane jako zakażenia oportunistyczne, ich występowanie wiąże się raczej ze stylem życia – są powszechnie obserwowane u osób stosujących dożylnie środki odurzające. W niniejszej pracy zostały użyte wyłącznie do celów porównawczych.

Przedstawiona analiza danych potwierdziła ścisłą zależność przede wszystkim pomiędzy liczbą limfocytów $T\ CD4^+$ a wystąpieniem zakażeń oportunistycznych oraz pozostałych jednostek chorobowych, z wyjątkiem ropni poinfekcyjnych. Występowanie tych jednostek chorobowych w mniejszym stopniu wiązało się ze zmianami liczby pozostałych głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej. Przedstawione wyniki

należy interpretować z dużą ostrożnością, gdyż badania były wykonywane w trakcie trwania infekcji oportunistycznych, które same w sobie mogły również istotnie wpływać na liczbę limfocytów, tak jak wykazano to w odniesieniu do pacjentów niezakażonych HIV. Znacznie wartościowsza byłaby analiza składu subpopulacji limfocytów dokonana bezpośrednio przed wystąpieniem zakażenia oportunistycznego, jednak metodologicznie tego typu ocena prospektywna byłaby niezwykle trudna.

W przedstawionym materiale zakażenia oportunistyczne i inne wybrane jednostki chorobowe występujące w przebiegu zakażenia HIV można podzielić na dwie duże grupy, w zależności od liczby limfocytów T CD4⁺:

1. Występujące poniżej liczby 560 limfocytów T CD4⁺/mm³ (kandydoza przełyku, posocznice, zapalenia płuc, gruźlica, reaktywacja zakażeń *Herpes*, małopłytkowość) [35, 67, 68, 206, 217, 221, 229, 297, 300].
2. Obserwowane poniżej wartości 200 limfocytów T CD4⁺/mm³ (toksoplazmoza mózgu, kryptokokoza mózgu, zakażenia prątkami atypowymi (*Mycobacterium Avium Complex* – MAC), pneumocystozowe zapalenie płuc, cytomegalowirusowe zapalenie siatkówki, PML) [2, 8, 11, 50, 106, 118, 126, 150, 154, 162, 169, 174, 199, 206, 229, 233, 245, 288].

Należy przy tym zaznaczyć, że szczególnie cenna wydaje się tu analiza wartości maksymalnych, a nie średnich, wartości liczby CD4, przy której mogą wystąpić te zakażenia, oraz że przytoczone wartości podsumowują występowanie 90% obserwowanych przypadków. W odniesieniu do niektórych patogenów prawdopodobnie istotniejsze od liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej byłoby badanie ilości tych komórek w konkretnej lokalizacji narządowej lub tkankowej – np. na śluzówce jamy ustnej i przełyku w odniesieniu do ryzyka wystąpienia kandydozy. Jednak ocena tego typu parametrów nie jest na razie możliwa w rutynowej praktyce klinicznej [31, 221, 229].

Uzyskane wyniki średnie i dotyczące 90 percentyla, choć w dużej mierze zgodne, wydają się być wyższe od obecnie przyjętych zaleceń profilaktycznych, np. w odniesieniu do prątków atypowych. Jednak przy opracowaniu obecnych zaleceń w połowie lat dziewięćdziesiątych przyjęto za wartość graniczną 80 percentyl. Ponadto różnice odzwierciedlają prawdopodobnie również niedoskonałość oceny funkcjonowania układu odpornościowego poprzez określenie jedynie liczby limfocytów T CD4⁺. Oprócz spadku liczby tych komórek istnieje też możliwość występowania zaburzeń czynnościowych, czyli tzw. anergii, szczególnie w schyłkowych okresach zakażenia i przy wysokiej wiremii HIV. Dysfunkcja limfocytów T CD4⁺ może sprzyjać wystąpieniu infekcji oportunistycznej przy stosunkowo wysokich wartościach liczby CD4 [0]. i odwrotnie – niewielka liczba sprawnych funkcjonalnie komórek może skutecznie chronić przed zakażeniem. Niestety, również i ten parametr, jakim jest sprawność funkcjonalna limfocytów T CD4⁺, nie należy do rutynowej oceny pacjenta. A dodatkowo – występowanie zakażeń oportunistycznych w przebiegu AIDS może mieć swoje odmienności geograficzne i uwarunkowania genetyczne. Stanowi to dodatkowy asumpt do ponownej analizy epidemiologii zakażeń oportunistycznych na terenie Polski w powiązaniu z parametrami immunologicznymi [19, 35].

O ile wpływ spadku liczby limfocytów T CD4⁺ na występowanie infekcji oportunistycznych w przebiegu zakażenia HIV wydaje się oczywisty i szczegółowo opisany, to ich związek z pozostałymi subpopulacjami nie jest już tak jednoznaczny [45]. Analiza rang występowania poszczególnych zakażeń w różnych subpopulacjach limfocytów krwi obwodowej wykazała m.in. występowanie małopłytkowości oraz reaktywacji zakażeń *Herpes* przy nieproporcjonalnie niskich, a toksoplazmozy przy nieproporcjonalnie wy-

sokich wartościach liczby limfocytów B. Jednak obserwacja ta nie musi oznaczać, że zmiany liczby limfocytów B sprzyjają wystąpieniu ww. jednostek chorobowych, odwrotnie, może być wynikiem oddziaływania tych chorób wskaźnikowych na liczbę limfocytów CD19⁺. Przykładem takiego oddziaływania jest tu obserwowany wzrost odsetka aktywowanych limfocytów T i obniżenie się liczby komórek NK – opisane uprzednio także u osób niezakażonych HIV.

Na podkreślenie zasługują nieproporcjonalnie wysokie odsetki aktywowanych limfocytów T w przebiegu toksoplazmozy i PML, co może sugerować istotną rolę zjawiska aktywacji układu odpornościowego w obu tych chorobach wskaźnikowych, dokonujących się na terenie ośrodkowego układu nerwowego [163].

Podsumowując – zmiany liczby komórek subpopulacji innych niż limfocyty T CD4⁺ wydają się być wtórne i same w sobie nie wpływają jednoznacznie na występowanie zakażeń oportunistycznych w przebiegu zakażenia HIV.

6.6.4. Wpływ terapii antyretrowirusowej na liczbę limfocytów T CD4⁺

Terapia antyretrowirusowa jest zagadnieniem złożonym i dynamicznie ewoluującym. W latach osiemdziesiątych i na początku dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia terapia zakażenia HIV polegała głównie na leczeniu i profilaktyce, pierwotnej oraz wtórnej, infekcji oportunistycznych. Od roku 1986 zaczęto stosować pierwsze leki skutecznie hamujące replikację wirusa poprzez blokowanie aktywności odwrotnej transkryptazy, jednak do połowy lat dziewięćdziesiątych standardem była terapia jedno- lub dwulekowa. Ten rodzaj leczenia antyretrowirusowego jest dziś w zasadzie uważany za błąd w sztuce i powinien być określany jako ART (*antiretroviral therapy*) [190]. W drugiej połowie lat dziewięćdziesiątych wprowadzono do praktyki klinicznej nową grupę silnych inhibitorów proteazy. W tym też okresie badania nad patogenezą zakażenia HIV wykazały, że konieczne jest stosowanie terapii wielolekowej. Od tego momentu terapię antyretrowirusową zwykło określać się mianem HAART (*highly active ART*). Początkowo niektóre z ośrodków zajmujących się leczeniem chorych na AIDS promowały stosowanie nawet siedmiu leków antyretrowirusowych jednocześnie. Promowano również jak najwcześniejsze rozpoczynanie leczenia [25, 205]. Poważne działania uboczne, występowanie mutacji kodujących lekooporność wirusa oraz trudności jakie zgłaszali pacjenci z dostosowaniem się do skomplikowanych wymogów przyjmowania tak wielu leków, spowodowały tendencję do upraszczania terapii, wprowadzania prostych w użyciu preparatów łączonych oraz doprowadziły do rewizji maksymalistycznych poglądów na temat ilości stosowanych leków. Obecnie standardem jest stosowanie trzech preparatów, a lekarze chorób zakaźnych mają do dyspozycji ponad dwadzieścia leków z trzech głównych grup: inhibitory odwrotnej transkryptazy (grupa ta zawiera w sobie trzy duże podgrupy różniące się mechanizmem działania), inhibitory proteazy, inhibitory fuzji, a w przygotowaniu do wprowadzenia do praktyki klinicznej są inhibitory integrazy. Dodatkowo prowadzone są zaawansowane prace nad zastosowaniem szczepionki terapeutycznej, interleukiny 2, a w niedalekiej przyszłości także interleukiny 7. Ilość nowych leków antyretrowirusowych, ze znanych dotychczas grup, przygotowywanych do wprowadzenia na rynek w najbliższych latach znacznie przewyższa sumaryczną ilość wszystkich innych przygotowywanych antybiotyków, leków przeciwwgrzybiczych i przeciwwirusowych. Skuteczność terapii antyretrowirusowej i zasady jej prowadzenia

zmieniały się wraz z postępem badań nad patogenizacją tego wyjątkowego zakażenia [1, 20, 76, 87, 130, 157, 231, 298].

W ośrodku gdańskim terapia antyretrowirusowa była dostępna i stosowana od początku lat dziewięćdziesiątych i prowadzona jest zgodnie ze zmieniającymi się trendami i zaleceniami. Szczegółowa analiza skuteczności HAART jest problemem złożonym, ze względu na mnogość dostępnych preparatów jak i szybko zmieniające się reguły ich stosowania. Analizując dane dotyczące stosunkowo niewielkiej grupy osób zakażonych HIV można było przeprowadzić jedynie ogólne porównanie wyników leczenia w zależności od okresu rozpoczęcia leczenia antyretrowirusowego, odpowiednio do stanu naszej wiedzy na temat zasad prowadzenia terapii. Szczegółowa analiza, biorąca pod uwagę ilość i rodzaj stosowanych leków, czas prowadzonej terapii oraz przerwy występujące w jej trakcie, nie była w tych warunkach możliwa do przeprowadzenia. Stanowi ona jednak przedmiot licznych prospektywnych, wieloośrodkowych i randomizowanych badań klinicznych.

Cele terapii antyretrowirusowej można zdefiniować następująco:

1. Obniżenie wirerii, najlepiej do wartości niewykrywalnych.
2. Wzrost liczby limfocytów T CD4⁺ obrazujący odbudowę funkcji immunologicznych (w badaniach klinicznych oceniane były także inne, nierutynowe parametry immunologiczne, np. spadek ekspresji markerów aktywacji limfocytów T).
3. Spadek zapadalności na choroby wskaźnikowe dla AIDS, a w szczególności na zakażenia oportunistyczne i nowotwory będące podstawą rozpoznania AIDS oraz poprawa komfortu życia wyrażona zmniejszeniem się liczby hospitalizacji pacjentów i przywróceniem im pełnej samodzielności, a także zdolności do pracy.
4. Spadek umieralności z powodu zakażenia HIV w analizowanej populacji.

Spśród tych celów podstawowym obiektem analizy w niniejszej pracy były zmiany w obrębie subpopulacji limfocytów krwi obwodowej, przede wszystkim liczby limfocytów T CD4⁺. Dodatkowo możliwe było porównanie liczby zgonów wśród osób leczonych i nieleczonych.

Przeprowadzona analiza wykazała, że osoby otrzymujące terapię antyretrowirusową miały statystycznie znamienne wyższe wartości liczby CD4 w całym okresie obserwacji, przez co najmniej 12 lat. Przeprowadzenie porównania w dłuższym okresie obserwacji jest praktycznie niemożliwe, gdyż średni czas przeżycia u osoby dorosłej zakażonej HIV i nieleczonej HAART wynosi około 10 lat. Jednak różnica w okresach przeżywalności nie była przedmiotem niniejszej pracy.

U osób leczonych HAART liczba limfocytów T CD4⁺ początkowo wzrastała, a następnie wracała do punktu wyjścia – średnio po upływie 10 lat. W praktyce oznacza to zatrzymanie „zegara patogenetycznego” i wydłużenie okresu przeżycia pacjentów właśnie o około 10 lat, i to pomimo wszystkich, widzianych z perspektywy czasu, błędów popełnianych w początkowych okresach HAART. Można zakładać, że leczenie rozpoczynane i prowadzone zgodnie z obecnie obowiązującymi zasadami istotnie wydłuży ten okres [65, 76, 131, 268, 269, 298].

Wyniki leczenia znacząco zależały od okresu wdrożenia terapii. W niniejszym opracowaniu chorych podzielono w zależności od czasu rozpoczęcia obserwacji i leczenia na następujące podgrupy:

1. Pacjenci rozpoczynający obserwację w latach 1992–1995 (gdy stosowano terapię jedno- lub dwulekową rozpoczynając leczenie stosunkowo późno) i obserwowani do 2006 r., określani mianem 1992–1995 [190].
2. Osoby, u których pierwsze badanie liczby limfocytów T CD4⁺ wykonano w latach 1996–2000 (gdy stosowano terapię wielolekową w pełni odpowiadającą określeniu HAART, często z użyciem więcej niż trzech preparatów, a leczenie rozpoczynano stosunkowo wcześniej, nawet przy wartościach liczby CD4 powyżej 500/mm³) i obserwowanych do 2006 r. opisywani mianem 1996–2000 [25, 130, 131, 205].
3. Chorych obserwowanych od 2001 do 2006 roku (dominuje trójkowy schemat leczenia, włączany najczęściej przy wartościach liczby CD4 poniżej 200/mm³) opisywani jako grupa 2001–2006 [1, 87, 108, 179, 231].

Jak widać na rycinie 46 pacjenci rozpoczynający terapię w najwcześniejszym okresie początkowo nie różnili się znamienne od osób nieleczonych. Znamienna różnica pojawiała się po dziewięciu latach obserwacji, czyli w praktyce dopiero po wprowadzeniu obecnie stosowanych grup leków i zasad terapii. Wyraźnym przełomem było wprowadzenie w drugiej połowie lat dziewięćdziesiątych inhibitorów proteazy i terapii wielolekowej – osoby rozpoczynające obserwację w tym okresie różniły się znamienne statystycznie od poprzedniej grupy. Natomiast wprowadzane w kolejnych latach (2001–2006) ograniczanie liczby stosowanych leków antyretrowirusowych, jak i opóźnianie momentu rozpoczęcia terapii, nie pogorszyło wyników leczenia (różnice średniej liczby CD4 w porównaniu do grupy 1996–2000 były nieznamienne statystycznie). Można jednak założyć, że osiągnięto najprawdopodobniej ograniczenie występowania działań ubocznych terapii, jak i lekooporności wirusa – oba te parametry wymagają odrębnej oceny, nie będącej przedmiotem niniejszej pracy. Jak widać jednoczesne stosowanie więcej niż trzech obecnie znanych leków antyretrowirusowych nie miało racjonalnego uzasadnienia w uzyskiwanych wzrostach liczby limfocytów T CD4⁺, nawet wobec skrajnie niskich wartości wyjściowych liczby tych komórek. Można oczekiwać, że dalsza radykalna poprawa wyników będzie możliwa po wprowadzeniu zupełnie nowych grup leków (inhibitory integrazy) i odmiennych metod leczenia, np. szczepionek terapeutycznych, immunoterapii, a nawet terapii genowej [1, 59, 87, 108, 179, 231, 268, 269, 298].

Innym czynnikiem istotnie wpływającym na wyniki leczenia jest wyjściowa wartość liczby CD4. Analizowaną grupę pacjentów podzielono na podgrupy w zależności od wyjściowej liczby CD4 uzyskanej w pierwszym badaniu:

1. Osoby z wyjściową liczbą CD4 ≥ 500 komórek/mm³.
2. Pacjenci z wyjściową liczbą CD4 pomiędzy 200 i 499 komórek/mm³.
3. Chorzy z wyjściową liczbą CD4 < 200 /mm³.

Nie wykazano korzystnego wpływu terapii antyretrowirusowej na liczbę limfocytów T CD4⁺ u osób z wyjściowo wysoką liczbą tych komórek (≥ 500 /mm³), niezależnie od okresu historycznego, w którym rozpoczynali leczenie. Najprawdopodobniej różnice staną się znamienne po dłuższym okresie obserwacji, gdy naturalny przebieg zakażenia doprowadzi do głębszych spadków liczby CD4 (poniżej 200/mm³) [25, 205].

Natomiast w grupie z wyjściowo pośrednią liczbą CD4 (200–499/mm³) wśród osób leczonych HAART liczba tych komórek utrzymywała się na znacząco wyższym poziomie od 3 do 6 roku obserwacji. Najprawdopodobniej w pierwszych dwóch latach, ze względu na graniczne wartości liczby CD4, decyzja o podjęciu leczenia wymagała dłuższej obserwacji i przygotowania chorego. Natomiast nieleczone osoby z tej grupy żyły znacząco krócej od osób leczonych i dlatego nie mogły być obserwowane przez okres

dłuższy niż 7 lat. Z tego też powodu porównanie obu grup w dłuższym okresie obserwacji nie jest praktycznie możliwe.

W grupie z wyjściowo najniższą liczbą CD4 ($<200/\text{mm}^3$) już w pierwszych latach Obserwacji różnice w średniej liczbie CD4 pomiędzy osobami leczonymi i nieleczonymi były znamienne statystycznie. Skrajnie niskie wartości liczby CD4 wymuszały w tej grupie szybką decyzję o podjęciu leczenia, którego wynikiem były wczesne wzrosty liczby tych komórek. Podobnie jak w poprzedniej grupie, także i tutaj okres obserwacji osób nieleczonych nie przekraczał 6 lat, uniemożliwiając długoterminowe porównania. Natomiast zwraca uwagę dobra skuteczność leczenia, widoczna we wzrostach liczby CD4 nawet o 300 komórek powyżej wartości wyjściowych. Wzrosty te, w mniejszym stopniu, widoczne były również wśród osób rozpoczynających leczenie w najdawniejszym historycznie okresie 1992–1995. Jak widać możliwa jest skuteczna regeneracja układu odpornościowego (mierzona wzrostem liczby limfocytów T CD4⁺) oraz znaczące wydłużenie okresu przeżycia – pomimo skrajnego zaawansowania zakażenia HIV [130, 108, 298].

Wyniki te potwierdzają aktualnie obowiązujące zalecenia, sugerujące rozpoczęcie terapii antyretrowirusowej przy wartościach liczby CD4 około $200/\text{mm}^3$ i poniżej [19].

W doniesieniach literaturowych, oprócz wzrostu liczby limfocytów T CD4⁺, odnotowywano również spadek ekspresji markerów aktywacji na limfocytach T, także miejscowo, np. w obrębie tkanki chłonnej migdałków [62, 190].

Jednak najcenniejszymi dowodami skuteczności działania leków antyretrowirusowych są zmiany parametrów epidemiologicznych, dotyczące zapadalności na zakażenia oportunistyczne czy śmiertelności. Porównanie przebiegu zakażenia HIV u osób nieleczonych i leczonych HAART wykazało znaczny spadek częstości występowania zgonów w grupie osób poddanych leczeniu. Różnica była znaczna (ponad siedmiokrotna) i znamienista statystycznie, co potwierdza aktualną kwalifikację zakażenia HIV jako choroby przewlekłej poddającej się leczeniu, w której rokowanie co do życia można znacząco poprawić stosując odpowiednią terapię [1, 64, 179, 194, 200, 231, 268, 269, 298].

Odrębnym zagadnieniem, nie ujętym w przedstawionych analizach, jest zespół objawów klinicznych określany mianem zespołu rekonstrukcji układu immunologicznego [72, 140].

Jak widać terapia antyretrowirusowa, mimo iż nie prowadzi jak dotąd do eliminacji wirusa, jest jedną z najskuteczniejszych interwencji medycznych. Zarówno okres przeżycia jak i jakość życia uległy znacznej poprawie, natomiast wśród przyczyn zgonów zaczynają dominować te niezwiązane z zakażeniem HIV, np. kardiologiczne, hepatologiczne, onkologiczne itd. Istotnym problemem pozostaje dostępność HAART w ubogich i pozbawionych podstawowej infrastruktury państwach rozwijających się [1, 64, 139, 194, 231, 268, 270].

6.6.5. Wpływ współistniejących zakażeń wirusowych na liczbę limfocytów T CD4⁺

Wpływ zakażenia HIV na przebieg historii naturalnej innych współistniejących infekcji wirusowych został dość dokładnie opisany w literaturze. Przykładowo w zakażeniu HBV, w którym podstawowy mechanizm uszkodzenia hepatocytów jest mediowany poprzez reakcje immunologiczne, immunosupresyjny wpływ zakażenia HIV prowadzi do nasilenia replikacji HBV i serorewersji w układzie HBe, a sporadycznie nawet

w układzie HBs [49, 257, 259]. W zakażeniu HCV udokumentowano szybszy przebieg kliniczny i częstsze występowanie incydentów niewydolności wątroby u osób zakażonych HIV w porównaniu z osobami niezakażonymi. Sugerowano, że wirus HCV zachowuje się analogicznie do infekcji oportunistycznych, wykorzystując stan immunosupresji do nasilenia replikacji i pogłębienia procesów patologicznych w wątrobie i poza nią [16, 50, 53, 117, 151, 155, 213, 255, 257]. Również wirus CMV nasila swą replikację w miarę progresji zakażenia HIV [288].

Wykazano również obecność odwrotnych zależności. Wiadomo, że niektóre ostre infekcje wirusowe (HSV) i bakteryjne (gruźlica, zapalenie płuc) nasilają replikację HIV [80, 169, 178]. Natomiast wirus odry znacząco blokuje replikację i obniża wiremę HIV [181]. Podobny efekt *in vitro* opisano w stosunku do wirusa grypy i HHV6. Można przyjąć, że wirusy te, intensywnie replikując, wykorzystują te same szlaki metaboliczne co HIV lub że oddziałują bezpośrednio (wydzielając specjalne blokery) lub pośrednio (aktywując np. komórki T CD8⁺ lub Treg) hamując na jego replikację.

W analizowanym materiale nie wykazano jakiegokolwiek wpływu zakażeń HBV, HCV i CMV na tempo spadku liczby limfocytów T CD4⁺ u nieleczonych osób zakażonych HIV. Wyniki te były zgodne z doniesieniami literaturowymi [204].

Natomiast wyniki leczenia antyretrowirusowego, mierzone wzrostami liczby limfocytów T CD4⁺, były wyraźnie gorsze wśród osób ze współistnieniem zakażeń HBV, HCV i CMV. Różnice te stawały się istotne statystycznie powyżej trzeciego roku obserwacji; w przypadku CMV były nieznamiennie. Szczególnie ciekawa wydaje się analiza dotycząca wirusa B zapalenia wątroby. Rycina 57 zdaje się sugerować, że wyniki leczenia są tym gorsze, im bardziej nasilona jest replikacja HBV. Jednak obserwacje te są najprawdopodobniej tylko przypadkową koincydencją. Na rycinie 59 wykazano statystycznie znamienne gorsze (począwszy właśnie od 4 roku obserwacji) wyniki leczenia u osób, które zakażyły się HIV w związku ze stosowaniem narkotyków drogą dożylną. Należy podkreślić, że u osób nieleczonych droga zakażenia nie miała żadnego wpływu na tempo spadku liczby limfocytów T CD4⁺ (patrz rycina 60). Można zatem postawić tezę, że najprawdopodobniej to styl życia osób stosujących narkotyki dożylne (IVDA) utrudnia im długotrwałe dostosowywanie się do ścisłych rygorów związanych z terapią antyretrowirusową, co istotnie pogorszyło odległe wyniki leczenia. A jednocześnie były to osoby stosunkowo częściej zakażone wirusami HBV i HCV, wykorzystującymi tę samą co HIV drogę zakażenia.

Szczegółowa ocena wpływu zakażeń HBV i HCV na wyniki leczenia antyretrowirusowego wymagałaby więc przeprowadzenia odrębnych analiz z uwzględnieniem faktu stosowania środków odurzających. W niniejszym badaniu nie było to możliwe ze względu na zbyt małą liczbę grupy osób leczonych HAART i jednocześnie będących narkomanami z jednej strony oraz pacjentów niezależnionych zakażonych HBV i HCV z drugiej.

Gorsze odległe wyniki leczenia antyretrowirusowego u osób uzależnionych od narkotyków jednoznacznie dokumentuje rycina 59. Informacja ta może stanowić pewien argument w toczącej się dyskusji na temat dostępności do leczenia antyretrowirusowego również dla osób uzależnionych. Jak widać obecnie stosowane formy terapii antyretrowirusowej są trudno przyswajalne przez pacjentów przyjmujących środki odurzające [64, 257]. Fakt ten nie może jednak uzasadniać odmowy osobom uzależnionym dostępu do leczenia. Ponadto poprawa i utrzymanie podwyższonych wartości liczby CD4 nawet przez okres jedynie (aż?) trzech lat również stanowi pewien wymiar sukcesu dla tych pacjentów. Być może konieczny jest jakiś szczególny rodzaj przygotowania tych osób

do podjęcia trudu leczenia lub prowadzenie terapii w odmiennych warunkach niż dzieje się to w odniesieniu do osób nieuzależnionych. Wyjście z czynnego uzależnienia oraz terapia substytucyjna stanowią w tym względzie oczywiste i podstawowe kierunki działań. Docelowo, mimo że obecnie jest to niemożliwe, formy terapii powinny być upraszczane w taki sposób, aby były bardziej „wybaczące” dla pacjenta, np. aby leki mogły być podawane raz w tygodniu, a nawet raz w miesiącu. Być może rozwiązaniem tego typu będzie dopiero terapia genowa z użyciem siRNA [48, 186, 211, 243].

Podsumowując – analiza historii naturalnej zakażenia HIV wykazała, że rokowanie co do życia ulega istotnemu pogorszeniu przy wartościach liczby limfocytów T CD4⁺ poniżej 200 komórek/mm³, dlatego uzyskanie powtarzalnych wyników liczby CD4 poniżej tej wartości stanowi uzasadnienie do rozpoczęcia leczenia antyretrowirusowego. Jednak oprócz wartości bezwzględnej liczby limfocytów T CD4⁺ również gwałtowne jej spadki najprawdopodobniej wiążą się z pogorszeniem rokowania co do życia i dlatego mogą stanowić uzasadnienie dla rozpoczęcia HAART, także u osób z wysokimi wartościami liczby CD4, jednak obserwacja ta wymaga bardziej szczegółowej analizy. Potwierdzono podział zakażeń oportunistycznych na dwie podgrupy: występujących w 90% przypadków przy wartości liczby CD4 poniżej 560 komórek/mm³ (kandydoza przetyku, małopłytkowość, posocznice, zapalenia płuc, gruźlica, reaktywacja zakażeń *Herpes*) oraz obserwowanych w 90% przypadków poniżej wartości 200 limfocytów T CD4⁺/mm³ (toksoplazmoza mózgu, kryptokokoza mózgu, MAC, pneumocystozowe zapalenie płuc, PML, cytomegalowirusowe zapalenie siatkówki).

Nie wykazano wpływu współistniejących zakażeń HBV, HCV i CMV na tempo spadku liczby limfocytów T CD4⁺ u osób zakażonych HIV. Udokumentowano natomiast, że stosowana dotychczas terapia antyretrowirusowa pozwalała na utrzymanie liczby limfocytów T CD4⁺ powyżej wartości wyjściowych średnio przez okres co najmniej 10 lat, siedmiokrotnie zmniejszała ryzyko zgonu chorego z powodu zakażenia HIV. Była ona skuteczna nawet u pacjentów w zaawansowanym okresie zakażenia, natomiast nie przynosiła wymiernych korzyści u osób z liczbą CD4 powyżej 500 komórek/mm³. Stosowanie więcej niż trzech leków antyretrowirusowych nie miało uzasadnienia z punktu widzenia uzyskiwanych wzrostów liczby limfocytów T CD4⁺. Obserwowano natomiast gorsze odległe (> 3 lat) wyniki leczenia u osób stosujących dożylnie środki odurzające.

6.7. Choroby zakaźne ośrodkowego układu nerwowego

Szczególna lokalizacja anatomiczna oraz pewna odmienność funkcjonowania układu odpornościowego w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, uzasadniały przeprowadzenie odrębnej analizy pod kątem porównania wyników uzyskanych w przebiegu jednostek chorobowych występujących w tej właśnie lokalizacji. Uzyskane wyniki okazały się w dużym stopniu zaskoczeniem, wykazały bowiem znaczne obniżanie się liczby głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w trakcie różnego rodzaju schorzeń ośrodkowego układu nerwowego, przy czym szczególnie silna i ciekawa zależność dotyczyła spadków liczby limfocytów T CD4⁺ w przebiegu ostrego wirusowego zapalenia mózgu. Zjawisko to nie było dotąd szerzej opisywane w literaturze, natomiast okazało się być na tyle czule i swoiste, że może zostać zastosowane w rutynowej diagnostyce różnicowej zapalenia mózgu.

Zmiany składu subpopulacji limfocytów krwi obwodowej, jak i inne zaburzenia immunologiczne obserwowane w przebiegu stwardnienia rozsianego, w postaci spadku liczby limfocytów T CD8⁺ i wzrostu stosunku CD4/CD8, zostały dość dawno opisane w literaturze medycznej, jednak w odniesieniu do innych jednostek chorobowych dotyczących ośrodkowego układu nerwowego dane literaturowe są bardzo nieliczne [15, 52, 172, 220]. W 2003 r. Wang i wsp. nie zaobserwowali istotnych różnic w zakresie wartości bezwzględnych głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej u 8 dzieci z wirusowym zapaleniem pnia mózgu (enterovirus 71) w porównaniu do 15 osób zdrowych i 9 pacjentów z „dysregulacją układu autonomicznego” w przebiegu zakażenia tym samym wirusem [287]. Anlar i Tekgül w oddzielnych doniesieniach opisali wzrost odsetka limfocytów T CD8⁺ u dzieci z pod-ostym stwardniającym zapaleniem mózgu, a także wyższe liczby limfocytów T CD4⁺ w podgrupie osób z gwałtowną progresją choroby [10, 266, 267]. Niestety, w obu doniesieniach nie analizowano liczb bezwzględnych limfocytów w obrębie poszczególnych subpopulacji, a jedynie wartości procentowe, które mogą podlegać pozornym wahaniom wraz ze zmianami liczby innych subpopulacji limfocytów. Poza tym w literaturze można odnaleźć jedynie pojedyncze opisy przypadków. Są to trzy odrębne doniesienia dotyczące „idiopatycznej limfocytopenii T CD4⁺” w przebiegu PML u pacjentów niezakażonych HIV oraz jeden opis przypadku PML związanego z „nietypowym pierwotnym złożonym zespołem niedoboru odporności charakteryzującym się głęboką limfopenią w zakresie komórek CD4, selektywnym niedoborem immunoglobuliny podklasy IgG2, słabą odpowiedzią humoralną na polisacharydy...” [46, 89, 113, 176].

Rola limfocytów T w przebiegu ostrego wirusowego zapalenia mózgu, jak również zależności pomiędzy zmianami składu limfocytów krwi obwodowej a naciekami zapalnymi w tkance mózgowej, pozostają niejednoznaczne. W badaniach Sampson i wsp. w tkance nerwowej osób zmarłych z powodu zapalenia mózgu w przebiegu zakażenia Wirusem Zachodniego Nilu dominowały nacieki złożone z komórek o fenotypie CD8⁺. Natomiast Nagano i Iwasaki obserwowali dominujące komórki CD4⁺ w mózgach osób z podoстрыm stwardniającym zapaleniem mózgu (SSPE), wścieklizną i japońskim zapaleniem mózgu. W modelu zwierzęcym Finke i wsp. odnotowali kluczową rolę limfocytów Th₁ w patogenezie eksperymentalnego zapalenia mózgu u myszy wywołanego zakażeniem wirusem odry. Obserwacje te mogą być spójne z obserwowanymi w niniejszej pracy spadkami liczby limfocytów T CD4⁺, zakładając, że migrują one do tkanki mózgowej. Jednak hipoteza ta wymaga weryfikacji, a ponadto patomechanizm zapalenia mózgu może być odmienny w zależności od patogenu [71, 112, 184, 234].

W modelu zwierzęcym zapalenia mózgu wykazano kluczową rolę „naturalnych” regulatorowych komórek Treg (CD4⁺CD25⁺) w patogenezie eksperymentalnie wywołanego autoimmunologicznego zapalenia mózgu. Wyłączenie ich hamującego wpływu na komórki efektorowe skierowane przeciwko własnym tkankom i narządom prowadzi do rozwoju zmian zapalnych odpowiadających w patologii człowieka stwardnieniu rozsianemu. Obserwowane m.in. w niniejszej pracy spadki liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej mogą stanowić sugestię, iż tego typu mechanizm ulega uruchomieniu w niektórych przypadkach infekcji wirusowych np. górnych dróg oddechowych, prowadząc do wyzwolenia patogenetycznie autoimmunologicznych procesów zapalnych, klinicznie odpowiadających ostremu zapaleniu mózgu [23].

W materiale analizowanym w niniejszej pracy zwraca uwagę powszechność występowania spadków liczby niemal wszystkich, z wyjątkiem liczby limfocytów B i odsetka aktywowanych limfocytów T, subpopulacji limfocytów krwi obwodowej. Obserwowano

je z różnym nasileniem praktycznie we wszystkich grupach pacjentów. W połączeniu z pojedynczymi doniesieniami z piśmiennictwa opisującymi podobne zmiany w przebiegu martwicy innych narządów, np. w zawale mięśnia sercowego czy udarze termicznym, nasuwa to sugestię, że u podłoża tej obserwacji leży nieswoisty mechanizm aktywujący przechodzenie limfocytów poza łożysko naczyniowe, uruchamiany w odpowiedzi na uszkodzenie/martwicę tkanki, nie tylko mózgowej. Być może nasilenie tego zjawiska zależy od stopnia uszkodzenia tkanki, jak i mechanizmu jej destrukcji, a także np. od rodzaju zaburzeń krążenia w miejscu powstania martwicy/uszkodzenia tkankowego, modyfikujących uwalnianie mediatorów tej reakcji [27, 92, 183].

Związek pomiędzy uszkodzeniem tkanki mózgowej a spadkiem liczby limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej, mimo że najprawdopodobniej w swoim patomechanizmie niespecyficzny, w przypadku pacjentów z ostrym wirusowym zapaleniem mózgu był na tyle silnie wyrażony, że obserwacja ta może znaleźć bezpośrednie zastosowanie w praktyce. Pozwala bowiem odróżnić pacjentów z ostrym wirusowym zapaleniem mózgu od osób zdrowych oraz może być szczególnie cenna w różnicowaniu tej jednostki chorobowej z udarem niedokrwiennym mózgu. W niektórych przypadkach różnicowanie pomiędzy tymi dwoma jednostkami chorobowymi w pierwszym okresie choroby nie zawsze jest proste, a jednoznaczne ich rozróżnienie niejednokrotnie wymaga dłuższego okresu obserwacji. Tym bardziej na podkreślenie zasługuje fakt, że analizowane wyniki zostały uzyskane bezpośrednio po przyjęciu pacjenta, w pierwszej dobie hospitalizacji, przed rozpoczęciem terapii, a w szczególności przed rozpoczęciem leczenia sterydami. Na podstawie przeglądu dostępnych danych literaturowych wydaje się, że jest to pierwsze doniesienie na temat zmian składu subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w dużej grupie pacjentów z ostrym wirusowym zapaleniem mózgu, w porównaniu do osób zdrowych oraz pacjentów z innymi jednostkami chorobowymi ośrodkowego układu nerwowego.

Wyniki uzyskane u pacjentów z zapaleniem rdzenia nie różniły się istotnie od tych, które obserwowano w przebiegu ostrego wirusowego zapalenia mózgu. Jest to o tyle zrozumiałe, że zapalenie rdzenia może być postrzegane jako szczególna odmiana lokalizacyjna zmian zapalnych, pod względem patogenetycznym tożsamy z zapaleniem mózgu.

Znaczne spadki liczby wszystkich subpopulacji limfocytów, także subpopulacji T CD4⁺, obserwowano w przebiegu krwotocznego udaru mózgu. Jednak ta jednostka chorobowa już w pierwszych godzinach po wystąpieniu krwotoku domózgowego różni się od zapalenia mózgu obrazem klinicznym, a przede wszystkim wynikami badań obrazujących ośrodkowego układu nerwowego.

W analizowanym materiale zwracają uwagę skrajnie różne wyniki w dwu odmianach udaru – w przypadku udaru niedokrwiennego wyniki badań subpopulacji limfocytów krwi obwodowej nie różniły się znacząco od wartości uzyskanych u osób zdrowych, podczas gdy u chorych z udarem krwotocznym obserwowano skrajnie niskie wartości. Najprawdopodobniej obrazuje to odmienne mechanizmy patogenetyczne uszkodzenia tkanki nerwowej, znacząco różniące te jednostki chorobowe. W dostępnych danych literaturowych jedynie Nadareishvili opisał nieznaczne spadki liczby limfocytów T CD4⁺ w grupie 27 chorych z nawracającymi incydentami niedokrwiennymi ośrodkowego układu nerwowego, jednak autor skoncentrował się raczej na ocenie równoległego znamiennego wzrostu odsetka limfocytów CD4⁺CD28⁻ [183].

U chorych na stwardnienie rozsiane również obserwowano spadki liczby limfocytów T CD4⁺, jednak były one znacznie bardziej widoczne w odniesieniu do limfocytów

T CD8⁺, co wyraziło się w znamienym wzroście stosunku CD4/CD8 w tej grupie pacjentów w porównaniu zarówno do osób zdrowych, jak i np. chorych na ostre wirusowe zapalenie mózgu. W analizowanym materiale to właśnie wartość stosunku CD4/CD8 wydaje się być parametrem najlepiej różnicującym ostre wirusowe zapalenie mózgu od stwardnienia rozsianego. Diagnostyka różnicowa również w tym przypadku nie zawsze jest prosta do przeprowadzenia i niejednokrotnie wymaga dłuższego okresu obserwacji, dlatego prosta ocena stosunku CD4/CD8 może być przydatna w praktyce klinicznej [15, 52, 220].

Również u chorych z wirusowym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych obserwowano znamienne spadki liczby limfocytów T CD4⁺, jednak tę jednostkę chorobową można stosunkowo łatwo zdiagnozować na podstawie badania płynu mózgowo-rdzeniowego [279]. Szczególną uwagę zwraca zapalenie opon występujące w przebiegu świnki. W tej jednostce chorobowej spadki liczby limfocytów T CD4⁺ były głębsze niż w pozostałych przypadkach wirusowego zapalenia opon, a ponadto towarzyszył im znamieny statystycznie wzrost liczby limfocytów T CD8⁺; w efekcie odnotowano też najniższą wartość stosunku CD4/CD8. Fakt iż wzrost liczby limfocytów T CD8⁺ nie był obserwowany u chorych na świnkę bez towarzyszących objawów zapalenia opon był już wspomniany uprzednio – brak jest jednak doniesień literaturowych, które mogłyby potwierdzać tę obserwację lub wskazywać na przyczyny tego zjawiska.

Spadki liczby poszczególnych subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej w przebiegu różnych procesów chorobowych toczących się w obrębie ośrodkowego układu nerwowego dokumentują pokonywanie bariery krew-mózg przez mediatory reakcji immunologicznej i odzwierciedlają niezdolność układu odpornościowego do ścisłej lokalizacji procesów chorobowych w anatomicznych granicach tkanki nerwowej. Powyższe obserwacje dokumentują więc intrygujący związek pomiędzy układami nerwowym i odpornościowym; mogą mieć zastosowanie w rutynowej praktyce klinicznej, a ponadto wskazują nowe kierunki badań w tym zakresie [23].

6.8. Choroby zakaźne ośrodkowego układu nerwowego – wyniki badań płynu mózgowo-rdzeniowego

Badania subpopulacji limfocytów w płynie mózgowo-rdzeniowym metodologicznie są zbliżone do preparatyki krwi obwodowej. Jednak ze względu na stosunkowo niewielką ilość komórek w większości badań PMR jego barwienie było poprzedzone zagęszczeniem próbki poprzez jej odwirowanie, a następnie zawieszenie osadu w takiej objętości nadsącza, jaka jest minimalnie niezbędna do przeprowadzenia barwienia. Tego typu preparatyka zazwyczaj utrudnia ocenę bezwzględnej ilości komórek w objętości PMR, dlatego w przedstawianych analizach wykorzystano jedynie wartości procentowe [137, 264].

Jak przedstawiono w tabeli 22 – skład głównych subpopulacji w PMR różni się istotnie od wartości uzyskanych dla krwi obwodowej. W szczególności obserwowano niższe wartości procentowe limfocytów B (w mniejszym stopniu komórek NK), dominację limfocytów T oraz wyższy stosunek CD4/CD8. Nieliczne doniesienia literaturowe potwierdzają te obserwacje. Podkreślają one odrębność immunologiczną ośrodkowego układu nerwowego [137, 168, 172, 264, 279, 285]. Odnotowano również wyższe warto-

ści procentowe aktywowanych limfocytów T w porównaniu z krwią obwodową, jednak różnica nie była znamienna statystycznie.

Mimo to kazuistycznie odnotowane w badanym materiale odwrócenie stosunku CD4/CD8 oraz znaczny wzrost odsetka aktywowanych limfocytów T w pojedynczych przypadkach zakażenia HIV, mononukleozy zakaźnej i świnki świadczą o tym, że infekcje wirusowe potrafią skutecznie pokonywać barierę pomiędzy krwią a PMR, a wykazane zmiany w składzie subpopulacji limfocytów w znacznym stopniu odzwierciedlają procesy dokonujące się równolegle we krwi obwodowej. W przypadku zakażenia HIV przedstawione wyniki dotyczące ostrej choroby retrowirusowej potwierdzają fakt, że wirus wnika do ośrodkowego układu nerwowego i uruchamia w jego obrębie kluczowe procesy patogenetyczne już w pierwszych dniach po zakażeniu. Ciekawą, choć trudną do zinterpretowania, obserwacją jest znaczący wzrost odsetka komórek NK w PMR w przebiegu mononukleozy zakaźnej i ostrej choroby retrowirusowej. Komórki te są związane z wczesną odpowiedzią przeciwwirusową, jednak w innych zakażeniach wirusowych, takich jak wirusowe zapalenie opon czy świnka, ich liczba wręcz zmniejszała się [137, 167, 279, 294].

Spośród uzyskanych wyników jedyną obserwacją, która może być wykorzystana w rutynowej praktyce lekarskiej był statystycznie znamienny wzrost odsetka limfocytów B obserwowany wyłącznie w przebiegu neuroboreliozy. Pojedyncze doniesienia literaturowe potwierdzają tę obserwację, jednak ich autorzy skupili się głównie na porównywaniu różnic składu subpopulacji limfocytów w PMR i krwi obwodowej lub składu subpopulacji limfocytów PMR w boreliozie i kleszczowym zapaleniu mózgu. Jak dotąd nie przeprowadzono kompleksowej analizy przydatności tego zjawiska w diagnostyce różnicowej tej jednostki chorobowej [105, 167, 168, 252, 272, 273, 279, 285].

W niniejszej pracy wykazano, że przyjęcie wartości 7% limfocytów B w PMR pozwala z akceptowalną czułością i wysoką swoistością zróżnicować przypadki neuroboreliozy od osób zdrowych oraz pacjentów z innymi jednostkami chorobowymi diagnozowanymi badaniem PMR. Wzrost liczby limfocytów B w PMR jest niemal patognomoniczny dla tej jednostki chorobowej. Tego rodzaju analiza nie była dotąd prezentowana w literaturze.

Poza neuroboreliozą, wbrew oczywistym oczekiwaniom, badania subpopulacji limfocytów w PMR – choć ciekawe poznawczo – nie wykazały zmian przydatnych w diagnostyce chorób zakaźnych ośrodkowego układu nerwowego.

7. Wnioski

1. Uzyskane wyniki badań wykazały istotny wpływ chorób zakaźnych na liczbę i rodzaj limfocytów krwi obwodowej:
 - a. W ostrych chorobach zakaźnych, bakteryjnych i wirusowych, wykazano spadki liczby limfocytów T $CD4^+$ i $CD8^+$ oraz komórek NK, proporcjonalne do ciężkości zakażenia; wyjątkiem był zespół mononukleozopodobny, w którym odnotowano wzrost liczby aktywowanych limfocytów T $CD8^+$.
 - b. U osób z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby HBV i HCV wykazano niewielkiego stopnia obniżenie stosunku $CD4/CD8$ oraz nieznaczny wzrost odsetka aktywowanych limfocytów T.
 - c. Szczegółowa analiza tempa spadku liczby limfocytów T $CD4^+$ w zakażeniu HIV wśród osób nieleczonych wykazała, że:
 - można wyodrębnić trzy fazy historii naturalnej tego zakażenia
 - współistniejące zakażenia HBV, HCV, CMV, a także fakt stosowania dożylnych środków odurzających, nie miały wpływu na szybkość spadku liczby $CD4$.
2. Przeprowadzona analiza wykazała praktyczną przydatność badania składu głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej i płynu mózgowo-rdzeniowego w diagnostyce i monitorowaniu leczenia wybranych chorób zakaźnych, a w szczególności:
 - a. Obniżenie się liczby limfocytów T $CD4^+$ poniżej wartości 500 komórek/mm^3 obserwowane we krwi obwodowej w przebiegu ostrego wirusowego zapalenia mózgu jest czułym i swoistym kryterium różnicującym tę jednostkę chorobową.
 - b. Wzrost odsetka limfocytów B w płynie mózgowo-rdzeniowym powyżej wartości 7% stwierdzony w przebiegu neuroboreliozy może być zastosowany w diagnostyce różnicowej tej jednostki chorobowej.
 - c. Wykazano, że spadek liczby limfocytów T $CD4^+$ oraz $CD8^+CD45RA^+$ we krwi obwodowej w przebiegu ostrej choroby retrowirusowej znamienne odróżniał tę jednostkę chorobową od zespołów mononukleozopodobnych o innej etiologii.
 - d. W zakażeniu HIV niezależnymi czynnikami wpływającymi negatywnie na rokowanie co do życia były:
 - obniżenie się liczby limfocytów T $CD4^+$ poniżej wartości 200 komórek/mm^3 oraz
 - gwałtowny spadek liczby limfocytów T $CD4^+$.
 - e. Stwierdzono, że infekcje oportunistyczne i inne wybrane jednostki chorobowe obserwowane w trakcie zakażenia HIV mogą być podzielone na dwie grupy:
 - Występujące poniżej wartości $560 \text{ limfocytów T } CD4^+/\text{mm}^3$ (bakteryjne zapalenie płuc, gruźlica, posocznice, zakażenia *Herpes*, grzybica przełyku, a także małopłytkowość).

-
- Występujące poniżej 200 limfocytów T CD4⁺/mm³ (PCP, cytomegalowirusowe zapalenie siatkówki, zakażenia prątkami atypowymi, toksoplazmoza, kryptokokoza, a także PML).
 - f. Wykazano, że stosowane leczenie antyretrowirusowe:
 - pozwalało na utrzymanie liczby limfocytów T CD4⁺ powyżej wartości wyjściowych przez okres co najmniej 10 lat,
 - skutecznie zwiększało liczbę limfocytów T CD4⁺ również u chorych w zaawansowanym okresie zakażenia,
 - wiązało się z siedmiokrotnie niższym ryzykiem zgonu w porównaniu do osób nieleczonych;
 - nie wykazano istotnego wpływu terapii na liczbę limfocytów T CD4⁺ u pacjentów z wyjściowo wysoką ich wartością (≥ 500 komórek/mm³);
 - udokumentowano znamienne gorsze odległe wyniki leczenia u osób zakażonych HIV w związku ze stosowaniem dożylnych środków odurzających.

8. Streszczenie

Celem niniejszej pracy była analiza wpływu chorób zakaźnych na liczbę i rodzaj limfocytów krwi obwodowej i płynu mózgowo-rdzeniowego, a także ocena przydatności badań składu głównych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej i płynu mózgowo-rdzeniowego w diagnostyce różnicowej i ocenie klinicznej pacjentów z chorobami zakaźnymi, ze szczególnym uwzględnieniem osób zakażonych HIV.

Praca stanowi retrospektywne podsumowanie 7776 badań krwi obwodowej i 143 badań płynu mózgowo-rdzeniowego wykonanych u 1551 osób dorosłych, pacjentów Kliniki Chorób Zakaźnych AMG, w tym 799 osób zakażonych HIV (268 pacjentów badanych jednorazowo, 304 osoby obserwowane bez leczenia antyretrowirusowego oraz 227 chorych leczonych HAART) oraz 117 osób zdrowych. Badania wykonywano metodą cytometrii przepływowej w latach 1992–2006.

Wykazano, że w przebiegu ostrych chorób zakaźnych – bakteryjnych, wirusowych jak i pasożytniczych – występują znamienne, różnie nasilone, spadki liczby poszczególnych sub-populacji limfocytów krwi obwodowej. W zakażeniach bakteryjnych obserwowane spadki liczby limfocytów T były proporcjonalne do ciężkości przebiegu klinicznego choroby. Znamienne wzrosty liczby komórek niektórych subpopulacji (przede wszystkim limfocytów T CD8⁺) odnotowano w zespole mononukleozopodobnym w przebiegu mononukleozy zakaźnej i ostrych zakażeń CMV i HIV, a także u pacjentów z przewlekłymi zakażeniami wirusowymi (HBV, HCV). Zespół mononukleozopodobny w przebiegu ostrej choroby retrowirusowej różnił się od zespołów o innej etiologii znamienymi spadkami liczby limfocytów T CD4⁺ oraz CD8⁺CD45RA⁺.

Analizując wyniki uzyskane od osób zakażonych HIV opisano trójfazowość zmian liczby limfocytów T CD4⁺ w trakcie historii naturalnej tego zakażenia. Obserwowano istotne pogorszenie rokowania co do życia przy wartościach liczby limfocytów T CD4⁺ $\leq 200/\text{mm}^3$, jednak obserwacje te nie były jednorodne i wymagają dokładniejszej analizy – wykazano m.in., że u niektórych nieleczonych pacjentów liczba CD4 utrzymywała się na stabilnie niskim poziomie bez cech progresji choroby w okresie co najmniej trzech lat. Mimo to uzyskanie powtarzalnych wyników liczby CD4 poniżej $200/\text{mm}^3$ powinno być nadal traktowane jako wskazanie do rozpoczęcia terapii antyretrowirusowej. Również spadek liczby limfocytów T CD4⁺ w tempie większym niż -60%/rok wiązał się z istotnym pogorszeniem rokowania co do życia.

Wykazano, że zakażenia oportunistyczne oraz inne jednostki chorobowe obserwowane u pacjentów zakażonych HIV mogą być podzielone na dwie podgrupy:

- Występujące (w 90% przypadków) poniżej liczby 560 limfocytów T CD4⁺/mm³ (bakteryjne zapalenie płuc, TBC, posocznice, zakażenia *Herpes*, grzybica przełyku, a także małopłytkowość).
- Występujące (w 90% przypadków) poniżej 200 limfocytów T CD4⁺/mm³ (Pneumocystozowe zapalenie płuc, cytomegalowirusowe zapalenie siatkówki, MAC, toksoplazmoza, kryptokokoza, a także PML).

Nie wykazano wpływu współistniejących zakażeń HBV, HCV i CMV na tempo spadku liczby limfocytów T CD4⁺ u osób zakażonych HIV. Udokumentowano natomiast, że stosowana terapia antyretrowirusowa pozwalała na utrzymanie liczby limfocytów T CD4⁺ powyżej wartości wyjściowych przez okres co najmniej 10 lat, siedmiokrotnie zmniejszała ryzyko zgonu i skutecznie zwiększała liczbę limfocytów T CD4⁺ nawet u chorych w zaawansowanym okresie zakażenia. Nie wykazano, aby terapia anty-

retrowirusowa przynosiła korzyści, w zakresie wzrostu liczby CD4, u chorych we wczesnym okresie zakażenia (liczba CD4 powyżej 500 komórek/mm³). Pośrednio zaobserwowano, że stosowanie więcej niż trzech leków antyretrowirusowych nie miało uzasadnienia z punktu widzenia uzyskiwanych wzrostów liczby limfocytów T CD4⁺. Odnotowano znamienne gorsze odległe wyniki HAART u osób stosujących dożylnie środki odurzające.

W grupie chorych z ostrym wirusowym zapaleniem mózgu w badaniu krwi obwodowej wykazano, że spadek liczby bezwzględnej limfocytów CD4 poniżej 500 komórek/mm³ może mieć zastosowanie w diagnostyce różnicowej tej jednostki chorobowej, szczególnie w różnicowaniu początkowego okresu OWZM z udarem niedokrwinnym mózgu i stwardnieniem rozsianym.

Wykazano również, że wzrost odsetka limfocytów B (>7%) w PMR jest patognomiczny dla boreliozy ośrodkowego układu nerwowego i może być zastosowany w diagnostyce różnicowej tej jednostki chorobowej. Nie wykazano innych przydatnych klinicznie zmian w badaniach PMR.

Wnioski:

1. Choroby zakaźne w istotny sposób wpływają na liczbę i rodzaj limfocytów we krwi obwodowej i PMR. Analiza subpopulacji limfocytów ma ważne znaczenie poznawcze dla patogenezы chorób zakaźnych i oceny ich rokowania, dlatego wskazane są dalsze ukierunkowane prace badawcze w tej dziedzinie.
2. Badania głównych subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej powinny być rutynowo wykonywane u pacjentów z następującymi jednostkami chorobowymi:
 - a. Zakażenie HIV – diagnostyka różnicowa, ocena rokowania i monitorowanie wyników leczenia.
 - b. Ostre wirusowe zapalenie mózgu – diagnostyka różnicowa.
3. Badania głównych subpopulacji limfocytów w PMR może być zastosowane w rutynowej diagnostyce różnicowej neuroboreliozy.

9. Summary

Evaluation to what extent infectious diseases influence the number and composition of peripheral blood and cerebrospinal fluid lymphocyte subsets, and the estimation of usefulness of major lymphocyte subsets analysis in differential diagnosis and management of patients with infections, in particular HIV, were the main aims of the study.

This is a retrospective observational study, summing up analyses of 7776 peripheral blood and 143 cerebrospinal fluid samples obtained from 1551 adult patients admitted to Infectious Diseases Department of Gdańsk Medical University, Poland, including 799 HIV-infected individuals (in 268 individuals CD4 count was taken once, 304 had multiple measurements and were observed with no antiretroviral therapy and 227 persons were followed on HAART) as well as 117 healthy adults. Lymphocyte subsets were measured with a use of flow cytometry between 1992 and 2006.

In a course of acute bacterial, viral and parasitic infections various degree of decrease of each main peripheral blood lymphocyte subset were observed; in acute bacterial diseases T cells decreases were in proportion to severity of clinical course. Significant increases of some subpopulations (mainly CD8⁺ T lymphocytes) were noted in cases of mononucleosis-like syndrome in a course of acute EBV, CMV, HIV infections and among patients with chronic HBV and HCV hepatitis. Acute retroviral disease differed from mononucleosis-like syndromes of other etiology in significantly decreased CD4⁺ and CD8⁺CD45RA⁺ T cell counts.

Natural history of HIV infection was analyzed and three-phase rate of CD4 count decline was observed. Life expectancy was significantly worse in patients with CD4 counts less than 200 cells/mm³, however findings here were more multifaceted and need further evaluation, since a subgroup of untreated patients managed to maintain stably low CD4 count with no disease progression for at least 3 years. Still CD4 count less than 200 cells/mm³ must be considered as an indicator for HAART commencement. Also rapid rate of CD4 count decline (greater than -60%/year) was associated with poor life-expectancy.

Opportunistic infections and some other disorders observed in HIV-infected patients were confirmed to be divided into two major categories:

- Observed in more than 90% of cases in persons with CD4⁺ T lymphocyte count less than 560/mm³ (bacterial pneumonia, tuberculosis, sepsis, *Herpes* infections, esophageal candidiasis as well as thrombocytopenia),
- Observed in more than 90% of cases in patients with CD4 count less than 200/mm³ (PCP, CMV retinitis, MAC, toxoplasmosis, cryptococosis and PML)

No influence of concomitant HBV, HCV and CMV infections on rate of CD4 count decline was observed. HAART therapy was potent enough to maintain CD4 count above initial value for as long as 10 years. The mortality among patients receiving HAART was seven times lower when compared to untreated individuals. HAART was effective in elevating CD4⁺ T lymphocyte numbers even when initiated in very advanced phase of the disease. No benefit of HAART was observed in patients with high CD4 count (>500/mm³). The use of more than three antiretroviral drugs was not associated with greater CD4 count increases. Poor long-term HAART effects were observed among i.v. drug users.

In a course of acute viral encephalitis severe drops of CD4 count were observed and cut-off value of 500 cells/mm³ satisfactorily differentiated encephalitis cases from

healthy individuals and ischemic stroke patients – with sensitivity and specificity high enough to be used as a routine in differential diagnosis.

Similarly – increase of lymphocytes B percentage ($>7\%$) in cerebrospinal fluid was highly specific for neuroborreliosis and can be used as a tool of differential diagnosis as well. Analysis of cerebrospinal fluid lymphocyte subsets revealed no further valuable or promising abnormalities.

Conclusions:

1. Infectious diseases have strong and diverse influence on number and composition of peripheral blood and cerebrospinal fluid lymphocyte subsets. Lymphocyte subsets analysis provides substantial portion of information on pathogenesis of infectious diseases, thus further focused studies in this area are required.
2. Peripheral blood lymphocyte subsets analysis is supposed to be applied in a management of patients with:
 - a. HIV disease – in differential diagnosis, for clinical evaluation and HAART results monitoring,
 - b. acute viral encephalitis – as a tool of differential diagnosis.
3. Cerebrospinal fluid lymphocyte subsets analysis should be brought into practice in differential diagnosis of neuroborreliosis.

10. Wykaz cytowanego piśmiennictwa:

1. Aberg J.A.: The changing face of HIV care: common things really are common. *Ann Intern Med* 2006;145(6):463.
2. Adeyemi O.M., Pulvirenti J., Perumal S., Mupiddi U., Kohl B., Jezisek T.: Cryptococcosis in HIV-infected individuals. *AIDS* 2004;18(16):2218.
3. Afonso A.M., Jiang J., Penin F., Tareau C., Samuel D., Petit M.A., Bismuth H., Dussaix E., Feray C.: Nonrandom distribution of Hepatitis C Virus quasiespecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *J Virol* 1999;73(11):9213.
4. Ahr B., Robert-Hebmann V., Devaux C., Biard-Piechaczyk M.: Apoptosis of uninfected cells induced by HIV envelope glycoproteins. *Retrovirology* 2004;1(1):12.
5. Al Qouzi A., Al Salamah A., Al Rasheed R., Al Musalam A., Al Kairy K., Kheir O., Al Ajaji S., Hajeer A.H.: Immunophenotyping of Peripheral Blood Lymphocytes in Saudi Men. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(2):279.
6. Alcabes P., Schoenbaum E.E., Klein R.S.: CD4⁺ lymphocyte level and rate of decline as predictors of AIDS in intravenous drug users with HIV infection. *AIDS* 1993;7(4):513.
7. Amatya R., Vajpayee M., Kaushik S., Kansal S., Pandey R.M., Seth P.: Lymphocyte immunophenotype reference ranges in healthy Indian adults: implications for management of HIV/AIDS in India. *Clin Immunol* 2004;112(3):290.
8. Ammassari A., Cingolani A., Pezzotti P., De Luca A., Murri R., Giancola M.L., Larocca L.M., Antinori A.: AIDS-related focal brain lesions in the era of highly active antiretroviral therapy. *Neurology* 2000;55(8):1194.
9. Anfossi N., Pascal V., Vivier E., Ugolini S.: Biology of T memory type 1 cells. *Immunol Rev* 2001;181(1):269.
10. Anlar B., Guven A., Köse G., Okur H., Kose O., Aydin O.F., Kabakus N., Altunbasak S., Herguner O., Sonmez M., Serdaroglu A.: Lymphocyte subsets, TNF α and interleukin-4 levels in treated and untreated subacute sclerosing panencephalitis patients. *J Neuroimmunol* 2005;163(1-2):195.
11. Appay V., Nixon D.F., Donahoe S.M. i wsp.: HIV-specific CD8⁺T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000;192(1):63. *J. Exp. Med. J. Exp. Med. J. Exp. Med. J. Exp. Med.* 2000;192:63-75.
12. Appay V., Papagno L., Spina C.A., Hansasuta P., King A., Jones L., Ogg G.S., Little S., McMichael A.J., Richman D.D., L. Rowland-Jones S.L.: Dynamics of T cell responses in HIV infection. *J Immunol* 2002;168(7):3660.
13. Askonas B.A.: Immunoglobulin formation in B lymphoid cells. *J Clin Path* 1975;28 Suppl. 6:8.
14. Autran B., Plata F., Debre P.: MHC-restricted cytotoxicity against HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991;4(4):361.
15. Bach M.A., Phan-Dinh-Tuy F., Tournier E., Chatenoud L., Bach J.F., Martin C., Degos J.D.: Deficit of suppressor T cells in active multiple sclerosis. *Lancet* 1980;2(8206):1221.
16. Bagaglio S., Cinque P., Racca S., Pedale R., Grasso M.A., Lazzarin A., Morsica G.: Hepatitis C virus populations in the plasma, peripheral blood mononuclear cells and cerebrospinal fluid of HIV/hepatitis C virus-co-infected patients. *AIDS* 2005;19, Suppl 3:S151.

17. Bailey J., Blankson J.N., Wind-Rotolo M., Siliciano R.F.: Mechanisms of HIV-1 escape from immune responses and antiretroviral drugs. *Curr Opin Immunol* 2004;16(4):470.
18. Balfour H.H. Jr., Holman C.J., Hokanson K.M., Lelonek M.M., Giesbrecht J.E., White D.R., Schmeling D.O., Webb C.H., Cavert W., Wang D.H., C. Brundage R.C.: A prospective clinical study of Epstein-Barr Virus and host interactions during acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 2005;192(9):1505.
19. Bartlett J.G., Gallant J.E.: 2005-2006 medical management of HIV infection. Johns Hopkins Medicine Health Publishing Business Group, Baltimore, Maryland, USA, 2005.
20. Beck J.M.: The immunocompromised host. HIV infection. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2(5):423.
21. Bekkera V., Bronkeb C., Scherpbier H.J., Weel J.F., Jurriaans S., Wertheim-van Dillen P.M.E., van Leth F., Lange J.M.A., Tesselaar K., van Baarle D. Kuijpers T.W.: Cytomegalovirus rather than HIV triggers the outgrowth of effector CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cells in HIV-1-infected children. *AIDS* 2005;19(10):1025.
22. Bernard A., Coitot S., Bremont A., Bernard G.: T and B cell cooperation: a dance of life and death. *Transplantation* 2005;79(3) suppl.:S8.
23. Beyersdorf N., Gaupp S., Balbach K., Schmidt J., Toyka K.V., Lin C.H., Hanke T., Hünig T., Kerkau T., Gold R.: Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2005;202(3):445.
24. Biglino A., Sinicco A., Forno B., Pollono A.M., Sciandra M., Martini C., Pich P., Giovannini P.: Serum cytokine profiles in acute primary HIV-1 infection and in infectious mononucleosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;78(1):61.
25. Bisset L.R., Cone R.W., Huber W., Battegay M., Vernazza P.L., Weber R., Grob P.J., Opravil M.: Highly active antiretroviral therapy during early HIV infection reverses T-cell activation and maturation abnormalities. *AIDS* 1998;12(16):2115.
26. Bisset L.R., Lung T.L., Kaelin M., Ludwig E., Dubs R.W.: Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol* 2004;72(3):203.
27. Blum A., Sclarovsky S., Rehavia E., Shohat B.: Levels of T-lymphocyte subpopulations, interleukin-1 beta, and soluble interleukin-2 receptor in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1994;127(7):1226.
28. Boettler T., Spangenberg H.C., Neumann-Haefelin C., Panther E., Urbani S., Ferrari C., Blum H.E., von Weizsacker F., Thimme R.: T cells with a CD4⁺CD25⁺ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8⁺ T cells during chronic Hepatitis C Virus infection. *J Virol* 2005;79(12):7860.
29. Boisvert J., Kunkel E.J., Campbell J.J., Keeffe E.B., Butcher E.C., Greenberg H.B.: Liver-infiltrating lymphocytes in end-stage hepatitis C virus: Subsets, activation status, and chemokine receptor phenotypes. *J Hepatol* 2003;38(1):67.
30. Bowen D.G., Walker C.M.: Mutational escape from CD8⁺ T cell immunity: HCV evolution, from chimpanzees to man. *J Exp Med* 2005;201(11):1709.
31. Brandtzaeg P., Baekkenvold E.S., Farstad I.N., Jahnsen F.L., Johansen F.E., Nilse E.M., Yamanaka T.: Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol Today* 1999;20(3):141.
32. C. Clute S.C., Watkin L.B., Cornberg M., Naumov Y.N., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Welsh R.M., Selin L.K.: Cross-reactive influenza virus-specific CD8⁺ T cells

- contribute to lymphoproliferation in Epstein-Barr virus-associated infectious mononucleosis. *J Clin Invest* 2005;115(12):3602.
33. Cacoub P., Musset L., Hausfater P., Ghillani P., Fabiani F.L., Charlotte F., Angevin E., Opolon P., Poynard T., Piette J.C., Autran B.: No evidence for abnormal immune activation in peripheral blood T cells in patients with hepatitis C virus (HCV) infection with or without cryoglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* 1998;113(1):48.
 34. Callan M.F.C., Tan L., Annels N., Ogg G.S., Wilson J.D.K., O'Callaghan C.A., Steven N., McMichael A.J., Rickinson A.B.: Direct visualization of antigen-specific CD8⁺ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr Virus in vivo. *J Exp Med* 1998;187(9):1395.
 35. Campo J., Del Romero J., Castilla J., Garcia S., Rodriguez C., Bascones A.: Oral candidiasis as a clinical marker related to viral load, CD4 lymphocyte count and CD4 lymphocyte percentage in HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med* 2002;31(1):5.
 36. Centers for Disease Control and Prevention: 1997 Revised guidelines for performing CD4⁺ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV). *MMWR* 1997;46(No. RR-2):1.
 37. Centers for Disease Control and Prevention: 1994 Revised guidelines for the performance of CD4⁺ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus (HIV) infections. *MMWR* 1994;43(No. RR-3):1.
 38. Centers for Disease Control and Prevention: 2003. Guidelines for performing single-platform absolute CD4⁺ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. *MMWR* 2003; 52(No. RR-2):1.
 39. Chambers C.A.: The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol* 2001;22(4):217.
 40. Chang K.M., Thimme R., Melpolder J.J., David Oldach D., Pemberton J., Moorhead-Loudis J., McHutchison J.G., Alter H.J., Chisari F.V.: Differential CD41 and CD81 T-cell responsiveness in Hepatitis C Virus infection. *Hepatology* 2001;33(1):267.
 41. Chatila T.A.: Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116(5):949.
 42. Chemin I., Vermot-Desroches C., Baginski I., Saurin J.C., Laurent F., Zoulim F., Bernaud J., Lamelin J.P., Hantz O., Rigal D. i wsp.: Selective detection of human hepatitis B virus surface and core antigens in peripheral blood mononuclear cell subsets by flow cytometry. *J Viral Hepat* 1994;1(1):39.
 43. Chemin I., Vermot-Desroches C., Baginski I., Saurin J.C., Laurent F., Zoulim F., Bernaud J., Lamelin J.P., Hantz O., Rigal D. i wsp.: Selective detection of human hepatitis B virus surface and core antigens in some peripheral blood mononuclear cell subsets by flow cytometry. *J Clin Lab Immunol* 1992;38(2):63.
 44. Chen G., Shankar P., Lange C., Valdez H., Skolnik P.R., Wu L., Manjunath N., Lieberman J.: CD8 T cells specific for human immunodeficiency virus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus lack molecules for homing to lymphoid sites of infection. *Blood* 2001;98(1):156.
 45. Cheung M.C., Rachlis A.R., Shumak S.L.: A cryptic cause of cryptococcal meningitis. *CMAJ* 2003;168(4):451.
 46. Chikezie P.U., Grennberg A.L.: Idiopathic CD4⁺ T lymphocytopenia presenting as progressive multifocal leukoencephalopathy: case report. *Clin Infect Dis* 1997;24(3):526.

47. Chng W.J., Tan G.B., Kuperan P.: Establishment of Adult Peripheral Blood Lymphocyte Subset Reference Range for an Asian Population by Single-Platform Flow Cytometry: Influence of Age, Sex, and Race and Comparison with Other Published Studies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11(1):168.
48. Coburn G.A., Cullen B.R.: Potent and specific inhibition of Human Immunodeficiency Virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol* 2002;76(18):9225.
49. Colin J.F., Cazals-Hatem D., Lioriot M.A., Martinot-Peignoux M., Pham B.N., Auperin A., Degott C., Benhamou J.P., Erlinger S., Valla D., Marcellin P.: Influence of Human Immunodeficiency Virus infection on chronic hepatitis B in homosexual men. *Hepatology* 1999;29:1306.
50. Cribier B., Rey D., Schmitt C., Lang J-M., Kirn A., Stoll-Keller F.: High hepatitis C viraemia and impaired antibody response in patients coinfectd with HIV. *AIDS* 1995;9(10):1131.
51. Currier J.S., Williams P.L., Koletar S.L., Cohn S.E., Murphy R.L., Heald A.E., Richard Hafner R., Bassily E.L., Lederman H.M., Knirsch C., Benson C.A., Valdez H.V., Aberg J.A., McCutchan J.A.: Discontinuation of Mycobacterium avium Complex prophylaxis in patients with antiretroviral therapy-induced increases in CD41 cell count. *Ann Intern Med* 2000;133(7):493.
52. Członkowska A., Korlak J., Iwińska B.: Subacute sclerosing panencephalitis and progressive multiple sclerosis: T cell subsets in blood and CSF. *Neurology* 1986;36(6):992.
53. Daar E.S., Lynn H., Donfield S., Gomperts E., Hilgartner M.W., Hoots W.K., Chernoff D., Arkin S., Wong W.Y., Winkler C.A.: Relation between HIV-1 and hepatitis C viral load in patients with hemophilia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001;26(5):466.
54. Deignan T., Curry M.P., Doherty D.G., Golden-Mason L., Volkov Y., Norris S., Nolan N., Traynor O., McEntee G., Hegarty J.E., Cliona O'Farrelly C.: Decrease in hepatic CD56⁺ T cells and Vα24⁺ natural killer T cells in chronic hepatitis C viral infection. *J Hepatol* 2002;37(1):101.
55. Derdeyn C.A., Silvestri G.: Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection. *Curr Opin Immunol* 2005;17(4):366.
56. Dinarello C.A.: Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis* 1999;179 suppl. 2:S294.
57. Dix R.D., Cousins S.W.: Interleukin-2 immunotherapy and AIDS-related cytomegalovirus retinitis. *Cur HIV Res* 2004;2(4):333.
58. Douek D.C., Picker L.J., Koup R.A.: T-cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 2003;21(1):265.
59. Dropulic B., June C.H.: Gene-based immunotherapy for human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Hum Gene Ther* 2006;17(6):577.
60. Drosten C., Günther S., Preiser W., van der Werf S., Brodt H.R., Becker S., Rabenau H., Panning M., Kolesnikova L., Fouchier R.A.M., Berger A., Burguière A.M., Cinatl J., Eickmann M., Escriu N. Grywna K., Kramme S., Manuguerra J.C., Müller S. i wsp.: Identification of a novel Coronavirus in patients with Severe Acute Respiratory Syndrom". *New Eng J Med* 2003;348(20):1967.
61. Dutton R.W., Bradley L.M., Swain S.L.: T cell memory. *Annu Rev Immunol* 1998;16(1):201.

62. Dyrhol-Riise A.M., Voltersvik P., Olofsson J., Åsjö B.: Activation of CD8 T cells normalizes and correlates with the level of infectious provirus in tonsils during highly active antiretroviral therapy in early HIV-1 infection. *AIDS* 1999;13(17):2365.
63. Eckels D.D., Wang H., Bian T.H., Tabatabai N., Gill J.C.: Immunobiology of hepatitis C virus (HCV) infection: the role of CD4 T cells in HCV infection. *Immunol Rev* 2000;174(1):90.
64. Egger M., May M., Chene G., Phillips A.N., Ledergerber B., Dabis F., Costagliola D., D'Arminio Monforte A., de Wolf F., Reiss P., Lundgren J.D., Justice A.C., Staszewski S., Leport C., Hogg R.S., Sabin C.A., Gill M.J., Salzberger B., Sterne J.A.C.: Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet* 2002;360(9327):119.
65. Fauci A.S., Schnittman S.M., Poli G., Koenig S., Pantaleo G.: Immunopathogenic mechanisms in Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection. *Ann Int Med* 1991;114(8):678.
66. Fauci A.S.: The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 1988;239(4840):617.
67. Feikin D.R., Feldman C., Schuchat A., Janoff E.N.: Global strategies to prevent bacterial pneumonia in adults with HIV disease. *Lancet Infect Dis* 2004;4(7):445.
68. Feldman C.: Pneumonia associated with HIV infection. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18(2):165.
69. Fidler S., Oxenius A., Brady M., Clarke J., Cropley I., Babiker A., Zhang H-T., Price D., Phillips R., Weber J.: Virological and immunological effects of short-course antiretroviral therapy in primary HIV infection. *AIDS* 2002;16(15):2049.
70. Field E.H., Matesic D., Rigby S., Fehr T., Rouse T., Gao Q.: CD4⁺CD25⁺ regulatory cells inactivated MHC tolerance. *Immunol Rev* 2001;182(1):99.
71. Finke D., Brinckmann U.G., Meulen V.T., Liebert U.G.: Gamma interferon is a major mediator of antiviral defense in experimental measles virus-induced encephalitis. *J Virol* 1995;69(9):5469.
72. Foundraïne N.A., Hovenkamp E., Notermans D.W., Meenhorst P.L., Klein M.R., Lange J.M.A., Miedema F., Reiss P.: Immunopathology as a result of highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients. *AIDS* 1999;13:177.
73. Freeman A.J., Pan Y., Harvey C.E., Post J.J., Law M.G., A. White P.A., Rawlinson W.D., Lloyd A.R., Marinos G., French R.A.: The presence of an intrahepatic cytotoxic T lymphocyte response is associated with low viral load in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2003;38(3):349.
74. Frost S.D.W., Michie C.A.: Lymphocyte dynamics, apoptosis and HIV infection. *Trends Microbiol* 1996;4(2):77.
75. Funaro A., Spagnoli G.C., Ausello C.M., Alessio M., Roggero S., Delia D., Zaccolo M., Malavasi F.: Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation. *J Immunol* 1990;145(8):2390.
76. Gandhi R.T., Walker B.D.: Immunologic control of HIV-1. *Annu Rev Med* 2002;53(1):149.
77. Garcia M., Yu X.F., Griffin D.E., Moss W.J.: In vitro suppression of Human Immunodeficiency Virus type 1 replication by measles virus. *J Virol* 2005;79(14):9197.
78. Gładysz A., Szymczak A., Simon K.: Natural history of the HIV infection and changes in the central nervous system. *Przegl Epidemiol* 2002;56 Suppl 1:6.

79. Goebel M.U., Mills P.J.: Acute Psychological Stress and Exercise and Changes in Peripheral Leukocyte Adhesion Molecule Expression and Density. *Psychosom Med* 2000;5):62:664.
80. Goletti D., Weissman D., Jackson R.W., Graham N.M., Vlahov D., Klein R.S., Munsiff S.S., Ortona L., Cauda R., Fauci A.S.: Effect of *Mycobacterium tuberculosis* on HIV replication. Role of immune activation. *J Immunol* 1996;157(3):1271.
81. Gorry P.R., Churchill M., Crowe S.M., Cunningham A.L., Gabuzda D.: Pathogenesis of macrophage tropic HIV-1. *Curr HIV Res* 2005;3(1):53.
82. Grakoui A., Shoukry N.H., David J. Woollard J., Man J.H., Hanson H.L., Ghayeb J., Murthy K.K., Rice C.M., Walker C.M.: HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 2003;302(5645):659.
83. Greenwald R.J., Freeman G.J., Sharpe A.H.: The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005;23(1):515.
84. Griffiths P.D., Grundy J.E.: Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. *Biochem J* 1987;241(2):313.
85. Groux H., Torpie G., Monte D., Mouton Y., Capron A., Ameisen J.C.: Activation-induced Death by Apoptosis in CD4⁺ T Cells from Human Immunodeficiency Virus-Infected Asymptomatic Individuals. *J Exp Med* 1992;175(2):331.
86. Guadalupe M., Elizabeth Reay E., Sankaran S., Prindiville T., Flamm J., McNeil A., Dandekar S.: Severe CD4⁺ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2003;77(21):11708.
87. Gulick R.M., Ribaud H.J., Shikuma C.M., Lalama C., Schackman B.R., Meyer III W.A., Acosta E.P., Schouten J., Squires K.E., Pilcher C.D., Murphy R.L., Koletar S.L., Carlson M., Reichman R.C., Bastow B., Klingman K.L., Kuritzkes D.R.: Three- vs four-drug antiretroviral regimens for the initial treatment of HIV-1 infection. *JAMA* 2006;296(7):769.
88. Ha S.Y., Chung C.W., Ko Y.H.: Severe chronic active EBV infection in an adult patient: case report. *J Korean Med Sci* 2004;19(3):453.
89. Haider S., Nafziger D., Gutierrez J.A., Brar I., Mateo N., Fogle J.: Progressive multifocal leukoencephalopathy and idiopathic CD4⁺ lymphocytopenia: a case report and review of reported cases. *Clin Infect Dis* 2000;31(4):e20.
90. Halota W., Jaruga B., Pawłowska M.: Steżenia neopteryny i beta2-mikroglobuliny w surowicy jako „markery prognostyczne” historii naturalnej AIDS. *Pol Merkur Lekarski* 2002;13(74):126.
91. Hamann D., Roos M.T.L., van Lier A.W.: Faces and phases of human CD8⁺ T-cell development. *Immunol Today* 1999;20(5):177.
92. Hammami M.M., Bouchama A., Shail E., Aboul-Enein H.Y., S. Al-Sedairy S.: Lymphocyte subsets, and adhesion molecules expression in heatstroke and heat stress. *J Appl Physiol* 1998;84(5):1615.
93. Hanson D.L., Chu S.Y., Farizo K.M., Ward J.W.: Distribution of CD4⁺ T lymphocytes at diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome-defining and other human immunodeficiency virus-related illnesses. The Adult and Adolescent Spectrum of HIV Disease Project Group". *Arch Intern Med* 1995;155(14):1537.
94. Harari A., Zimmerli S.C., Pantaleo G.: Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses. *Hum Immunol* 2004;65(5):500.

95. Hazenberg M.D., Otto S.A., van Benthem B.H.B., Roos M.T.L., Coutinho R.A., Lange J.M.A., Hamann D., Prins M., Miedema F.: Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS* 2003;17(13):1881.
96. Hecht F.M., Wang L., Collier A., Little S., Markowitz M., Margolick J., Kilby J.M., Daar E., Conway B., Holte S.: A multicenter observational study of the potential benefits of initiating combination antiretroviral therapy during acute HIV infection. *J Infect Dis* 2006;194(6):725.
97. Hermiston M.L., Xu Z., Majeti R., Weiss A.: Reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases. *J Clin Invest* 2002;109(1):9.
98. Hilleman M.R.: Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *PNAS* 2004;101 suppl. 2:14560.
99. Hirsch M.S.: Herpes simplex virus. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R.: "Principles and practice of infectious diseases". Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Melbourne, Tokyo 1995, wydanie IV, 1336-1344.
100. Hislop A.D., Kuo M., Drake-Lee A.B., Akbar A.N., Bergler W., Hammerschmitt N., Khan N., Palendira U., Leese A.M., Timms J.M., Bell A.I., Buckley C.D., Rickinson A.: Tonsillar homing of Epstein-Barr virus-specific CD8⁺ T cells and the virus-host balance. *J Clin Invest* 2005;115(9):2546.
101. Ho M.: Cytomegalovirus. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R.: "Principles and practice of infectious diseases". Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Melbourne, Tokyo 1995, wyd. IV, 1351-1363.
102. Hodge G., Hodge S., Han P., Haslam R.: Multiple leucocyte activation markers to detect neonatal infection. *Clin Exp Immunol* 2004;135(1):125.
103. Holm G., Zhang C., Gorry P.R., Peden K., Schols D., De Clercq E., Gabuzda D.: "Apoptosis of bystander T cells induced by Human Immunodeficiency Virus type 1 with increased envelope/receptor affinity and coreceptor binding site exposure. *J Virol* 2004;78(9):4541.
104. Holm G.H., Gabuzda D.: Distinct mechanisms of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell activation and bystander apoptosis induced by Human Immunodeficiency Virus type 1 virions. *J Virol* 2005;79(10):6299.
105. Holub M., Kluckova Z., Beran O., Aster V., Lobovska A.: Lymphocyte subset numbers in cerebrospinal fluid: comparison of tick-borne encephalitis and neuroborreliosis. *Acta Neurol Scand* 2002;106(5): 302.
106. Horsburg C.R.: The pathophysiology of disseminated Mycobacterium avium complex disease in AIDS. *J Infect Dis* 1999;179 suppl. 3:S461.
107. Hunig T., Dennehy K.: CD28 superagonists: mode of action and therapeutic potential. *Immunol Letters* 2005;100(1):21.
108. Hunt P.W., Deeks S.G., Rodriguez B., Valdez H., Shade S.B., Abrams D.I., Kitahata M.M., Kronef M., Neilands T.B., Brand R.J., Lederman M.M., Martin J.N.: Continued CD4 cell count increases in HIV-infected adults experiencing 4 years of viral suppression on antiretroviral therapy. *AIDS* 2003;17(13):1907.
109. Ichikawa Y., Aoki C.A., Bowlus C.L., Shimodaira S., Ishibashi H., Gershwin M.E.: T cell immunity in autoimmune hepatitis. *Autoimm Rev* 2005;4(5):315.
110. Isa A., Victoria Kasprówicz V., Norbeck O., Loughry A., Jeffery K., Broliden K., Kleiner P., Thomas Tolfvenstam T., Paul Bowness P.: Prolonged activation of virus-specific CD8⁺ T cells after acute B19 infection. *PLoS Medicine* 2005;2(12):1280.

111. Islam D., Bardhan P.K., Lindberg A.A., Christensson B.: Shigella infection induces cellular activation of T and B cells and distinct species-related changes in peripheral blood lymphocyte subsets during the course of the disease. *Infect Immun* 1995;63(8):2941.
112. Iwasaki Y., Sako K., Tsunoda I., Ohara Y.: Phenotypes of mononuclear cell infiltrates in human central nervous system. *Acta Neuropathol (Berl.)* 1993;85(6):653.
113. Iwase T., Ojika K., Katada E., Mitake S., Nakazawa H., Matsukawa N., Otsuka Y., Tsugu Y., Kanai H., Nakajima K.: An unusual course of progressive multifocal leucoencephalopathy in a patient with idiopathic CD4⁺ T lymphocytopenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64(6):788.
114. Izuel M., Fainboim H., Morelli A., Fainboim L., Roisman F.R.: Analysis of hepatitis B surface antigen expression on leucocyte subpopulations by two-color fluorescence with flow cytometry. *Medicina (B Aires)* 1994;54(6):635.
115. Jabłoński L.: Podstawy mikrobiologii lekarskiej. PZWŁ, Warszawa 1979, 162.
116. Jabłoński L.: Podstawy mikrobiologii lekarskiej. PZWŁ, Warszawa 1979, 11.
117. Jankowska M., Lemańska M., Sikorska K., Gesing M., Smiatacz T., Trocha H.: Assessment of HCV replication in HIV-infected patients observed in Department of Infectious Diseases. *Exp Clin Hepatol* 2005;1:47.
118. Jankowska M., Lemańska M., Trocha H., Gesing M., Smiatacz T.: Infekcje oportunistyczne występujące u pacjentów zakażonych HIV hospitalizowanych w Klinice Chorob Zakaźnych AMG. *Przegl Epidemiol* 2001;55, Suppl. 3:125.
119. Jentsch-Ullrich K., Koenigsmann M., Mohren M., Franke A.: Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults — a monocentric German study. *Clin Immunol* 2005;116(2):192.
120. Jiang H., Chess L.: An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 2004;114(9):1198.
121. Jiang W., Kang L., Lu H.Z., Pan X., Lin Q., Pan Q., Xue Y., Weng X., Tang Y.W.: Normal Values for CD4 and CD8 Lymphocyte Subsets in Healthy Chinese Adults from Shanghai. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11(4):811.
122. Johnson W.E., Desrosiers R.C.: Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion. *Annu Rev Med* 2002;53(1):499.
123. Juszczak J., Gładysz A.: AIDS: epidemiologia, patogeneza, klinika, leczenie, zapobieganie, poradnictwo. Wydanie I, Volumes, Wrocław 1992:35-84.
124. Juszczak J.: Hepatitis C - vademecum diagnostyki i leczenia przeciwwirusowego. Termedia Wydawnictwa Medyczne, Poznań 2003
125. Kano Y., Shiohara T.: Current understanding of cytomegalovirus infection in immunocompetent individuals. *J Dermatol Sci* 2000;22(3):196.
126. Karakousis P.C., Moore R.D., Chaisson R.E.: Mycobacterium avium complex in patients with HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Lancet Infect Dis* 2004;4(9):557.
127. Kassu A., Tsegaye A., Petros B., Wolday D., Hailu E., Tilahun T., Hailu B., Roos M.T.L., Fontanet L., Hamann D., Rinke De Wit T.F.: Distribution of Lymphocyte Subsets in Healthy Human Immunodeficiency Virus-Negative Adult Ethiopians from Two Geographic Locales. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8(6):1171.
128. Kassur B., Januszkiewicz J.: Choroby zakaźne inwazyjne. PZWŁ, Warszawa 1985:11.
129. Katlama C., Carcelain G., Duvivier C., Chouquet C., Tubiana R., DeSa M., Zagury L., Calvez V., Autran B., Costagliola D.: Interleukin-2 accelerates CD4 cell reconsti-

- tution in HIV-infected patients with severe immunosuppression despite highly active antiretroviral therapy: the ILSTIM study - ANRS 082. *AIDS* 2002;16(15):2027.
130. Kaufmann G.R., Bloch M., Zaunders J.J., Smith D., Cooper D.A.: Long-term immunological response in HIV-1-infected subjects receiving potent antiretroviral therapy. *AIDS* 2000;14(8):959.
131. Kaufmann G.R., Zaunders J., Cooper D.A.: Immune reconstitution in HIV-1 infected subjects treated with potent antiretroviral therapy. *Sex Transm Inf* 1999;75(4):218.
132. Kaufmann G.R., Zaunders J.J., Cunningham P., Kelleher A.D., Grey P., Smith D., Carr A., Cooper D.A.: Rapid restoration of CD4 T cell subsets in subjects receiving antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection. *AIDS* 2000;14(17):2643.
133. Kemeny M., Peakman M.: Recent advances: Immunology. *BMJ* 1998;316(7131):600.
134. Khanna K.M., Lepisto A.J., Decman V., Hendricks R.L.: Immune control of herpes simplex virus during latency. *Curr Opin Immunol* 2004;16(4):463.
135. Kim S.K., Welsh R.M.: Comprehensive early and lasting loss of memory CD8⁺T cells and functional memory during acute and persistent viral infections. *J Immunol* 2004;172(5): 3139.
136. Kinloch-de Loes S.: Treatment of Acute HIV-1 Infection: Is It Coming of Age? *J Infect Dis* 2006;194(6):721.
137. Kleine T.O., Albrecht J., Zofel P.: Flow cytometry of cerebrospinal fluid (CSF) lymphocytes: alterations of blood/CSF ratios of lymphocyte subsets in inflammation disorders of human central nervous system (CNS). *Clin Chem Lab Med* 1999;37(3):231.
138. Knysz B., Gąsiorowski J., Czarnecki M., Gładysz A.: Contemporary opinions on the clinical symptoms, diagnosis and treatment of primary HIV infection. *Wiad Lek* 2004;57(5-6):267.
139. Knysz B., Gąsiorowski J., Inglot M., Rymer W., Szymczak A., Gładysz A.: The role of therapeutic use of interleukin-2 in HIV infection. *Przegl Epidemiol* 2002;56(4):587.
140. Knysz B., Rogowska-Szadkowska D., Gąsiorowski J., Gładysz A.: Immune reconstitution syndromes secondary to effective antiretroviral therapy. *Postępy Hig Med Dośw (Online)* 2005;59:180.
141. Koretzky G.A.: Role of the CD45 tyrosine phosphatase in signal transduction in the immune system. *FASEB J* 1993;7(5):420.
142. Kotwal G.J.: Microorganisms and their interaction with the immune system. *J Leukoc Biol* 1997;62(4):415.
143. Ksiazek T.G., Erdman D., Goldsmith C., Zaki S.R., Peret T., Emery S., Tong S., Urbani C., Comer J.A., Lim W., Rollin P.E., Dowell S., Ling A.E., Humphrey C., Shieh W.J., Guarner J., D. Paddock C.D., Rota P., Fields B., DeRisi J., Yang J.Y. i wsp.: A novel Coronavirus associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *New Eng J Med* 2003;348(20):1953.
144. Kuijpers T.W., Vossen M.T., Gent M.R., Davin J.C., Roos M.T., Wertheim-van Dillen P.M., Weel J.F., Basra P.A., van Lier R.A.: Frequencies of circulating cytolytic, CD45RA⁺CD27⁻, CD8⁺ T lymphocytes depend on infection with CMV. *J Immunol* 2003;170(8):4342.
145. Kumar V.: Homeostatic control of immunity by TCR peptide-specific Tregs. *J Clin Invest* 2004;114(9):1222.

-
146. Kupfer B., Kaiser R., Brackmann H.H., Effenberger W., Rockstroh J.K., Matz B., Schneweis K.E.: Protection against parenteral HIV-1 infection by homozygous deletion in the C-C chemokine receptor 5 gene. *AIDS* 1999;13(9):1025.
147. Lana R.Y., Ansarib A.A., Liana Z.X., Gershwin M.E.: Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2005;4(6):351.
148. Lancaster T., Sanders E., Christie J.M.L., Brooks C., Green S., Rosenberg W.M.C.: Quantitative and functional differences in CD8⁺ lymphocyte responses in resolved acute and chronic hepatitis C virus infection. *J Vir Hepatitis* 2002;9(1):18.
149. Landais E., Saulquin X., Houssaint E.: The human T cell immune response to Epstein-Barr virus. *Int J Dev Biol* 2005;49(2-3):285.
150. Lange C.G., Woolley I.J., Brodt R.H.: Disseminated Mycobacterium Avium-intracellulare Complex (MAC) infection in the era of effective antiretroviral therapy. Is prophylaxis still indicated? *Drugs* 2004;64(7):679.
151. Laskus T., Radkowski M., Piasek A., Nowicki M., Horban A., Cianciara J., Rakela J.: Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfectd with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes. *J Infect Dis* 2000;181(2):442.
152. Laurence J.: T-cell subsets in health, infectious diseases, and idiopathic CD4⁺ T lymphocytopenia. *Ann Intern Med* 1993;119(1):55.
153. Lawn S.D., Butera S.T., Folks T.M.: Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of Human Immunodeficiency Virus type 1 infection. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(4):753.
154. Lemańska M., Jankowska M., Trocha H., Gesing M., Smiatacz T.: Posocznice u HIV -dodatnich pacjentów w materiale własnym. *Przegl Epidemiol* 2001;55, Suppl. 3:38.
155. Lesens O., Deschenes M., Steben M., Belanger G., Tsoukas M.: "Hepatitis C virus is related to progressive liver disease in human immunodeficiency virus-positive hemophiliacs and should be treated as an opportunistic infection. *J Infect Dis* 1998;179(5):1254.
156. Levy J.A.: Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Microbiol Rev* 1993;57(1):183.
157. Levy Y., Durier C., Krzysiek R., Rabian C., Capitant C., Lascaux A.S., Michon C., Oksenhendler E., Weiss L., Gastaut J.A., Goujard C., Rouzioux C., Maral J., Delfraissy J.F., Emilie D., Aboulker J.P.: Effects of interleukin-2 therapy combined with highly active antiretroviral therapy on immune restoration in HIV-1 infection: a randomized controlled trial. *AIDS* 2003;17(3):343.
158. Lisse I., Samb B., Whittle H., Jensen H., Soumare M., Simondon F., Aaby P.: Acute and long-term changes in T-lymphocyte subsets in response to clinical and subclinical measles. A community study from rural Senegal. *Scand J Infect Dis* 1998;30(1):17.
159. Longhi M.S., Ma Y., Bogdanos D.P., Cheeseman P., Mieli-Vergani G., Vergani D.: Impairment of CD41CD251 regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol* 2004;41(1):31.
160. Longhi M.S., Ma Y., Mitry R.R., Bogdanos D.P., Heneghan M., Cheeseman P., Mieli-Vergani G., Vergani D.: Effect of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells on CD8 T-cell function in patients with autoimmune hepatitis. *J Autoimm* 2005;25(1):63.

161. Longini I.M., Clark W.S., Gardner L.I., Brundage J.F.: The dynamics of CD4⁺ T-lymphocyte decline in HIV-infected individuals: a Markov modelling approach. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991;4(11):1141.
162. Looney W.J., Winsor J.J.: Pneumocystis carinii infection in human immunodeficiency virus-infected patients. *Brit J Biomed Sci* 1999;56(1):39.
163. Losina E., Anglaret X., Yazdanpanah Y., Wang B., Toure S., Seage III G.R., N'Dri-Yoman T., Walensky R.P., Dakoury-Dogbo N., Goldie S.J., Messou E., Weinstein M.C., Deuffic-Burban S., Salamon R., Freedberg K.A.: Impact of opportunistic diseases on chronic mortality in HIV-infected adults in Côte d'Ivoire. *S Afr Med J* 2006;96(6):526.
164. Maggi E., Cosmi L., Liotta F., Romagnani P., Romagnani S., Annunziato F.: Thymic regulatory T cells. *Autoim Rev* 2005;4(8):579.
165. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R.: Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Melbourne, Tokyo 1995, wyd. IV, 2.
166. Margolick J.B., Donnenberg A.D.: T-cell homeostasis in HIV-1 infection. *Semin Immunol* 1997;9(6):381.
167. Matsubara T., Matsuoka T., Katayama K., Yoshitomi T., Nishikawa M., Ichiyama T., Furukawa S.: Mononuclear cells and cytokines in the cerebrospinal fluid of echovirus 30 meningitis patients. *Scand J Infect Dis* 2000;32(5):471.
168. Matsui M., Nagumo F., Tadano J., Kuroda Y.: Characterization of humoral and cellular immunity in the central nervous system of HAM/TSP. *J Neurol Sci* 1995;130(2):183.
169. Mbopi-Keou F.X., Mbu R.E., Gonsu Kamga H., Kalla G.C.M., Monny Lobe M., Teo C.G., Leke R.J., Ndumbe P.M., Belec L.: Interactions between human immunodeficiency virus and herpes viruses within the oral mucosa. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(2):83.
170. McCune J.M., Hanley M.B., Cesar D., Halvorsen R., Hoh R., Schmidt D., Wieder E., Deeks S., Siler S., Neese R., Hellerstein M.: Factors influencing T-cell turnover in HIV-1-seropositive patients. *J Clin Invest* 2000;105(5):R1.
171. Mehta K., Shahid U., Malvasi F.: Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J* 1996;10(12):1408.
172. Merelli E., Sola P., Faglioni P., Giordani S., Mussini D., Montagnani G.: Natural killer cells and lymphocyte subsets in active MS and acute inflammation of the CNS. *Acta Neurol Scand* 1991;84(2):127.
173. Miedema F., Petit A.J.C., Terpstra F.G., Eeftink Schattenkerk J.K.M., de Wolf F., Al B.J.M., Roos M., Lange J.M.A., Danner S.A., Goudsmit J., Schellekens P.T.A.: Immunological abnormalities in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. *J Clin Invest* 1988;82(6):1908.
174. Miller R.: Clinical aspects of Pneumocystis carinii pneumonia in HIV infected patients: 1997. *FEMS Immunol Med Microb* 1998;22(1-2):103.
175. Milner E.C.B., Anolik J., Cappione A., Sanz I.: Human innate B cells: a link between host defense and autoimmunity? *Springer Semin Immunopathol* 2005;26(4):433.
176. Misbah S.A., Spickett G.P., Zeman A., Esiri M.M., Wallington T.B., Kurtz J.B., Chapel H.M.: Progressive multifocal leucoencephalopathy, sclerosing cholangitis, bronchiectasis and disseminated warts in a patient with primary combined immune deficiency. *J Clin Pathol* 1992;45(7):624.

177. Mohri H., Perelson A.S., Tung K., Ribeiro R.M., Ramratnam B., Markowitz M., Kost R., Hurley A., Weinberger L., Cesar D., Hellerstein M.K., Ho D.D.: Increased turnover of T lymphocytes in HIV-1 infection and its reduction by antiretroviral therapy. *J Exp Med* 2001;194(9):1277.
178. Mole L., Ripich S., Margolis D., Holodniy M.: The impact of active herpes simplex virus infection on human immunodeficiency virus load. *J Infect Dis* 1997;176(4):766.
179. Moore D.M., Hogg R.S., Chan K., Tyndall M., Yip B., Montaner J.S.G.: Disease progression in patients with virological suppression in response to HAART is associated with the degree of immunological response. *AIDS* 2006;20(3):371.
180. Moss P., Khan N.: CD8⁺ T-cell immunity to cytomegalovirus. *Hum Immunol* 2004;65(5):456.
181. Moss W.J., Ryon J.J., Monze M., Cutts F., Quinn T.C., Griffin D.E.: Suppression of Human Immunodeficiency Virus replication during acute measles. *J Infect Dis* 2002;185(8):1035.
182. Mustelin T., Taske K.: Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem J* 2003;371(1):15.
183. Nadareishvili Z.G., Li H., Wright V., Maric D., Warach S., Hallenbeck J.M., Dambrosia J., Barker J.L., Baird A.E.: Elevated pro-inflammatory CD4⁺CD28⁻ lymphocytes and stroke recurrence and death. *Neurology* 2004;63(8):1446.
184. Nagano I., Nakamura S., Yoshioka M., Kogure K.: Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in brain lesions in subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology* 1991;41(10):1639.
185. Napolitano L.A., Grant R.M., Deeks S.G., Schmidt D., DeRosa S.C., Herzenberg L.A., Herndier B.G., Andersson J., McCune J.M.: Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nature Med.* 2001;7(1):73.
186. Navarro F., Landau N.R.: Recent insights into HIV-1 Vif. *Curr Opin Immunol* 2004;16(4):477.
187. Nixon D.F., Aandahl E.M., Michaëlsson J.: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in HIV infection. *Microbes Infect* 2005;7(7-8):1063.
188. Norris P.J., Rosenberg E.S.: Cellular immune response to human immunodeficiency virus. *AIDS* 2001;15 Suppl. 1:S16.
189. Northrop J.K., Shen H.: CD8R T-cell memory: only the good ones last. *Curr Opin Immunol*, 2004;16(4):451.
190. O'Brien W.A., Hartigan P.M., Martin D., Esinhart J., Hill A., Benoit S., Rubin M., Simberkoff M.S., Hamilton J.D.: Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4⁺ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. *N Engl J Med* 1996;334(7):426.
191. Okada H., Kobune F., Sato T.A., Kohama T., Takeuchi Y., Abe T., Takayama N., Tsuchiya T., Tashiro M.: Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch Virol* 2000;145(5):905.
192. Oliva A., Kinter A.L., Vaccarezza M., Rubbert A., Catanzaro A., Moir S., Monaco J., Ehler L., Mizell S., Jackson R., Li Y., Romano J.W., Fauci A.S.: Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppresses HIV-1 entry and replication in vitro. *J Clin Invest* 1998;102(1):223.

193. Orwin P.M., Leung D.Y.M., Donahue H.L., Novick R.P., Schlievert P.M.: Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect Immun* 2001;69(1):360.
194. Palella F.J. Jr, Baker R.K., Moorman A.C., Chmiel J.S., Wood K.C., Brooks J.T., Holmberg S.D.: Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;43(1):27.
195. Paludan C., Münz C.: CD4⁺ T cell responses in the immune control against latent infection by Epstein-Barr Virus. *Curr Mol Med* 2003;3(4):341.
196. Panasiuk A., Prokopowicz D., Żak J.: Immunological response in chronic hepatitis C virus infection during interferon alpha therapy. *Hepato-gastroenterol* 2004;51(58):1088.
197. Pantaleo G., Graziosi C., Fauci A.S.: The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *New Eng J Med* 1993;328(5):327.
198. Pasqualetti D., Ghirardini A., Cafolla A., Biffoni M., Coluzzi S., Vaglio S., Girelli G.: Lymphocyte T subsets and natural killer cells in Italian and Philippino blood donors. *Vox Sang* 2003;84(1): 68.
199. Pasqualotto A.C., Severo C.B., de Mattos Oliveira F., Severo L.C.: Cryptococemia. An analysis of 28 cases with emphasis on the clinical outcome and its etiologic agent. *Rev Iberoam Micol* 2004;21(1):143.
200. Paul S., Gilbert H.M., Ziecheck W., Jacobs J., Sepkowitz K.A.: The impact of potent antiretroviral therapy on the characteristics of hospitalized patients with HIV infection. *AIDS* 1999;13(3):415.
201. Pawlikowski T., Karasek M., Pawlikowski M.: *Podręcznik histologii*. PZWL, Warszawa 1981:144.
202. Penna A., Missale G., Lamonaca V., Pilli M., Mori C., Zanelli P., Cavalli A., Elia G., Ferrari C.: Intrahepatic and circulating HLA class II-restricted, Hepatitis C Virus-specific T cells: functional characterization in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;35(5):1225.
203. Picker L.J.: Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Curr Opin Immunol* 2006;18(4):399.
204. Piroth L., Duong M., Quantin C., Abrahamowicz M., Michardiere R., Aho L-S., Grappin M., Buisson M., Waldner A., Portier H., Chavanet P.: Does hepatitis C virus co-infection accelerate clinical and immunological evolution of HIV-infected patients? *AIDS* 1998;12(4):381.
205. Plana M., Garcia F., Gallart T., Tortajada C., Soriano A., Palou E., Maleno M.J., Barcelo J.J., Vidal C., Cruceta A., Miro J.M., Gatell J.M.: Immunological benefits of antiretroviral therapy in very early stages of asymptomatic chronic HIV-1 infection. *AIDS* 2000;14(13):1921.
206. Podlasin R.B., Wiercińska-Drapało A., Olczak A., Beniowski M., Smiatacz T., Małolepsza E., Juszczak J., Leszczyszyn-Pynka M., Mach T., Mian M., B., Horban A.: Opportunistic infections and other AIDS-defining illnesses in Poland in 2000–2002. *Infection* 2006;34(4):196.
207. Pope M.: Mucosal dendritic cells and immunodeficiency viruses. *J Infect Dis* 1999;179 (suppl.3):S427.
208. Posavad C.M., Wald A., Hosken N., Huang M.L., Koelle D.M., Ashley R.L., Corey L.: T Cell Immunity to Herpes Simplex Viruses in Seronegative Subjects: Silent Infection or Acquired Immunity? *J Immunol* 2003;170(8):4380.

-
- 209.Price D.A., Kleenerman P., Booth B.L., Philips R.E., Sewell A.K.: Cytotoxic T lymphocytes, chemokines and antiviral immunity. *Immunol Today* 1999;20(5):212.
- 210.Prince H.E., Jensen E.R.: Three-color cytofluorometric analysis of CD8 cell subsets in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991;4(12):1227.
- 211.Qin X.F., An D.S., Chen I.S.Y., Baltimore D.: Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *PNAS* 2003;100(1):183.
- 212.Quintanilla-Martinez L., Kumar S., Fend F., Reyes E., Teruya-Feldstein J., Kingma D.W., Sorbara L., Raffeld M., Straus S.E., Jaffe E.S.: Fulminant EBV1 T-cell lymphoproliferative disorder following acute/chronic EBV infection: a distinct clinicopathologic syndrome. *Blood* 2000;96(2):443.
- 213.Radkowski M., Laskus T., Kopicz-Kamińska E.W., Mian M., Szymańska B., Babiuch L., Ślusarczyk J.: Evaluation of humoral immune response in patients with asymptomatic and symptomatic HIV infection. Analysis of titers of anti-HBs, antibodies against cytomegalovirus, herpes simplex virus type I, rubella virus and toxoplasma gondii. *Pol Arch Med Wewn.* 1993;90(2):112.
- 214.Radkowski M., Sadowska M., Kopicz-Kamińska E., Horban A., Ślusarczyk J.: Co-expression of CD4 and CD8 antigens and the appearance of HLA-DR and CD25 receptors on lymphocytes as markers of immune activation in patients with HIV infection. *Pol Merkur Lekarski* 1996;5(1):325.
- 215.Radkowski M., Ślusarczyk J.: Long-term asymptomatic HIV infection-pathogenetic aspects. *Pol Arch Med Wewn* 1995;94(3):275.
- 216.Radkowski M., Wilkinson J., Nowicki M., Adair D., Vargas H., Ingui C., Rakela J., Laskus T.: Search for hepatitis C virus negative-strand RNA sequences and analysis of viral sequences in the central nervous system: evidence of replication. *J Virol* 2002;76(2):600.
- 217.Raja A.: Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004;120(4):213.
- 218.Ramzaoui S., Jouen-Beades F., Le Gilbert D., Borsa-Lebas F., Michel Y., Humbert G., Francois Tron F.: During HIV infection, CD4⁺ CD38⁺ T-cells are the predominant circulating CD4⁺ subset whose HLA-DR positivity increases with disease progression and whose V/3 repertoire is similar to that of CD4⁺ CD38⁻ T-cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;77(1):33.
- 219.Reichert T., DeBruyere M., Deneys V. i wsp.: Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;60(2):190.
- 220.Reinherz E.L., Weiner H.L., Hauser S.L., Cohen J.A., Distaso J.A., Schlossman S.F.: Loss of suppressor T cells in active multiple sclerosis. Analysis with monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 1980;303(3):125.
- 221.Repentigny L., Lewandowski D., Jolicoeur P.: Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in Human Immunodeficiency Virus infection. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(4):729.
- 222.Rescigno M., Granucci F., Citterio S., Foti M., Ricciardi-Castagnoli P.: Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol Today* 1999;20(5):200.
- 223.Rico M.A., Quiroga J.A., Subira D., Garcia E., Castanon S., Sallberg M., Leroux-Roels G., Weiland O., Pardo M., Carreno V.: Features of the CD4⁺ T-cell response in liver and peripheral blood of hepatitis C virus-infected patients with persistently normal and abnormal alanine aminotransferase levels. *J Hepatol* 2002;36(3):408.
- 224.Roenhorst H.W., Kallenberg C.G.M.: The cellular immune response to cell-associated and cell-free cytomegalovirus (CMV) antigens after primary CMV-

- infection in non-immunocompromised hosts: development and maintenance of CMV-latency and its influence on immunocompetence. *Clin Exp Immunol* 1988;74(3):326.
225. Rosenberg W.: Mechanisms of immune escape in viral hepatitis. *Gut* 1999;44:759.
226. Rouse B.T., Gieryńska M.: Immunity to Herpes Simplex Virus: a hypothesis. *Herpes* 2001;8, Suppl.1:2A.
227. Rouse B.T., Suvas S.: Regulatory cells and infectious agents: de'tentes cordiale and contraire. *J Immunol* 2004;173(4):2211.
228. Rudy B.J., Wilson C.M., Durako S., Mościcki A.B., Muenz L., Douglas S.D. Peripheral blood lymphocyte subsets in adolescents: a longitudinal analysis from the REACH project. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(5):959.
229. Ruhnke M.: Mucosal and systemic fungal infections in patients with AIDS. *Drugs* 2004;64(11):1163.
230. Ryon J.J., Moss W.J., Monze M., Diane E., Griffin D.E.: Functional and phenotypic changes in circulating lymphocytes from hospitalized Zambian children with measles. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(5):994.
231. Sackoff J.E., Hanna D.B., Pfeiffer M.R., Torian L.V.: Causes of death among persons with AIDS in the era of highly active antiretroviral therapy: New York City. *Ann Intern Med* 2006;145(6):397.
232. Sakaguchi S., Sakaguchi N.: Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *Int Rev Immunol* 2005;24(3/4):211.
233. Salmon-Ceron D.: Cytomegalovirus infection: the point in 2001. *HIV Medicine* 2001;2(4):255.
234. Sampson B.A., Ambrosi C., Charlot A., Reiber K., Veress J.F., Armbrustmacher V.: The pathology of Human West Nile Virus infection. *Hum Pathol* 2000;31(5):527.
235. Sancho D., Gomez M., Sanchez-Madrid F.: CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* 2005;26(3):136.
236. Sandberg J.K., Fast N.M., Nixon D.F.: Functional heterogeneity of cytokines and cytolytic effector molecules in human CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 2001;167(1):181.
237. Santagostino A., Garbaccio G., Pistorio A., Bolis V., Camisasca G., Pagliaro P., Girotto M.: An Italian national multicenter study for the definition of a reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica* 1999;84(6):499.
238. Savino W.: The Thymus Is a Common Target Organ. in *Infectious Diseases PLoS Pathog* 2006;2(6):472.
239. Scaradavou A.: HIV-related thrombocytopenia. *Blood Rev* 2002;16(1):73.
240. Schellekens P.Th.A., Tersmette M., Roos M.Th.L., Keet R.P., de Wolf F., Coutinho R.A., Miedema F.: Biphasic rate of CD4⁺ cell decline during progression to AIDS correlates with HIV-1 phenotype. *AIDS* 1992;6(7):665.
241. Schooley R.T.: Epstein-Barr virus (infectious mononucleosis). Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R.: "Principles and practice of infectious diseases". Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Melbourne, Tokyo 1995, wyd. IV, 1364-1376.
242. Schrier R.D., McCutchan J.A., Wiley C.A.: Mechanisms of immune activation of Human Immunodeficiency Virus in monocytes/macrophages. *J Virol* 1993;67(10):5713.
243. Schröfelbauer B., Yu Q., Landau N.R.: New insights into the role of Vif in HIV-1 replication. *AIDS Rev* 2004;6(1):34.

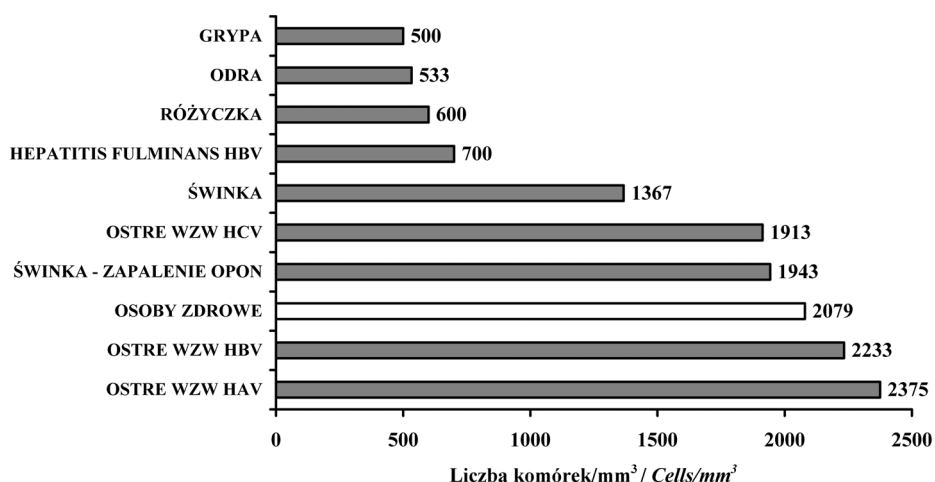
-
244. Seligmann M., Pinching A.J., Rosen F.S., Fahey J.L., Khaitov R.M., Klatzman D., Koenig S., Luo N., Ngu J., Riethmueller G., Spira T.J.: Immunology of human immunodeficiency virus and the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1987;107(2):234.
245. Shafran S.D., Mashinter L.D., Phillips P., Lalonde R.G., Gill M.J., Walmsley S.L., Toma E., Conway B., Fong I.W., Rachlis A.R., Williams K.E., Garber G.E., Schlech III W.F., Smaill F.: Successful discontinuation of therapy for disseminated *Mycobacterium avium* Complex infection after effective antiretroviral therapy. *Ann Intern Med* 2002;137(9):734.
246. Shankar P., Russo M., Harnisch B., Patterson M., Skolnik P., Lieberman J.: Impaired function of circulating HIV-specific CD81 T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood* 2000;96(9):3094.
247. Sharpe A.H., Abbas A.K.: T-Cell costimulation — biology, therapeutic potential, and challenges. *N Engl J Med* 2006;355(10):973.
248. Sheppard H.W., Ascher M.S.: The relationship between AIDS and immunologic tolerance. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992;5(2):143.
249. Sheppard H.W., Lang W., Ascher M.S., Vittinghoff E., Winkelstein W.: The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4⁺ T-cell levels. *AIDS* 1993;7(9):1159.
250. Shevach E.M., McHugh R.S., Piccirillo C.A., Thornton A.M.: Control of T-cell activation by CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells. *Immunol Rev* 2001;182(1):58.
251. Silins S.L., Sherritt M.A., Silleri J.M., Cross S.M., Elliott S.L., Bharadwaj M., Le T.T.T., Morrison L.E., Khanna R., Moss D.J., Suhrbier A., Misko I.S.: Asymptomatic primary Epstein-Barr virus infection occurs in the absence of blood T-cell repertoire perturbations despite high levels of systemic viral load. *Blood* 2001;98(13):3739.
252. Sindern E., Malin J.P.: Phenotypic analysis of cerebrospinal fluid cells over the course of Lyme meningoradiculitis. *Acta Cytol* 1995;39(1):73.
253. Singh H., Medina K.L., Pongubala J.M.R.: Contingent gene regulatory networks and B cell fate specification. *PNAS* 2005;102(14):4949.
254. Slifka M.K., Homann D., Tishon A., Pagarigan R., Oldstone M.B.A.: Measles virus infection results in suppression of both innate and adaptive immune responses to secondary bacterial infection. *J Clin Invest* 2003;111(6):805.
255. Smiatacz T., Zielińska W.: Does hepatitis B virus or hepatitis C virus infection influence CD4 count in HIV-positive individuals? *Arch Immunol Ther Exp* 1996;44(5-6):335.
256. Smiatacz T.: Mechanizmy odpornościowe w zakażeniu HIV i ich znaczenie w leczeniu antyretrowirusowym. *Przegl Epidemiol* 2003;57(2):309.
257. Smiatacz T.: Zakażenie HCV w populacji osób stosujących dożylnie środki odurzające z terenu województwa gdańskiego. Rozprawa doktorska, Akademia Medyczna w Gdańsku, 1996.
258. Smith B.A., Gartner S., Liu Y., Perelson A.S., Stilianakis N.I., Keele B.F., Kerker T.M., Ferreira-Gonzales A., Szakal A.K., Tew J.G., Burton G.F.: Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells. *J Immunol* 2001;166(1):690.
259. Sobao Y., Tomiyama H., Sugi K., Tokunaga M., Ueno T., Saito S., Fujiyama S., Morimoto M., Tanaka K., Takiguchi M.: The role of hepatitis B virus-specific memory CD8 T cells in the control of viral replication. *J Hepatol* 2002;36(1):105.

260. Stevenson P.G., Belz G.T., Castrucci M.R., Altman J.D., Doherty P.C.: A gamma-herpesvirus sneaks through a CD8⁺ T cell response primed to a lytic-phase epitope. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(16):9281.
261. Streeck H., Jessen H., Alter G., Teigen N., Waring M.T., Jessen A., Stahmer I., van Lunzen J., Lichterfeld M., Gao X., Allen T.M., Carrington M., Walker B.D., Rockstroh J.K., Marcus Altfeld M.: Immunological and virological impact of highly active antiretroviral therapy initiated during acute HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2006;194(6):734.
262. Sugaya N., Kimura H., Hara S., Hoshino Y., Kojima S., Morishima T., Tsurumi T., Kuzushima K.: Quantitative analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-specific CD8⁺ T cells in patients with chronic active EBV infection. *J Infect Dis* 2004;190(5):985.
263. Sułowska Z., Dworniak D., Tchórzewski H.: The use of flow cytometry for the determination of the hepatitis B virus pre-S1 envelop protein binding by human peripheral blood lymphocytes in vitro in the course of recovery. *Pol Merkuriusz Lek* 2001;11(61):32.
264. Svenningsson A., Andresen O., Edsbacke M., Stemme S.: Lymphocyte phenotype and subset distribution in normal cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* 1995;63(1):39.
265. Ślusarczyk J.: Związki między gospodarzem a patogenem. W: "Choroby zakaźne i pasożytnicze" pod red. Z. Dziubka, PZWŁ, Warszawa 1996:31-34.
266. Tekgöl H., Polat M., Kitis O., Serdaroglu G., Tosun A., Terlemez S., Kutukculer N., Ersahin Y., Gökben S.: T-cell subsets and interleukin-6 response in Rasmussen's encephalitis. *Pediatr Neurol* 2005;33(1):39.
267. Tekgöl H., Tutuncuoglu S., Kutukculer N., Dizdärer G., A. Huseyinov A.: Lymphocyte subsets and inflammatory mediators in patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J Child Neurol* 1999;14(7):418.
268. The Antiretroviral Therapy (ART) Cohort Collaboration: Prognostic importance of initial response in HIV-1 infected patients starting potent antiretroviral therapy: analysis of prospective studies. *Lancet* 2003;362(9384):679.
269. The Antiretroviral Therapy (ART) Cohort Collaboration: HIV treatment response and prognosis in Europe and North America in the first decade of highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis. *Lancet* 2006;368(9534):451.
270. The Antiretroviral Therapy in Lower Income Countries (ART-LINC) Collaboration and ART Cohort Collaboration (ART-CC) groups: mortality of HIV-1-infected patients in the first year of antiretroviral therapy: comparison between low-income and high-income countries. *Lancet* 2006;367(9513):817.
271. Tishon A., Lewicki H., Andaya A., McGavern D., Martin L., Oldstone M.B.A.: CD4 T cell control primary measles virus infection of the CNS: Regulation is dependent on combined activity with either CD8 T cells or with B cells: CD4, CD8 or B cells alone are ineffective. *Virology* 2006;347(1):234.
272. Tomazic J., Ihan A., Strle F., Cimperman J., Stare J., Maticic M., Zakotnik B.: Immunological differentiation between tickborne encephalitis with and without concomitant neuroborreliosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16(12):920.
273. Tomazic J., Ihan A.: Flow cytometric analysis of lymphocytes in cerebrospinal fluid in patients with tick-borne encephalitis. *Acta Neurol Scand* 1997;95(1):29.
274. Torres B.A., Scott Kominsky S., Perrin G.Q., Hobeika A.C., Johnson H.M.: Superantigens: The Good, the Bad, and the Ugly. *Exp Biol Med* Vol 2001;226(3):164.

-
275. Townsend S.E., Weintraub B.C., Goodnow C.C.: Growing up on the streets: why B-cell development differs from T-cell development. *Immunol Today* 1999;20(5):217.
276. Tripp R.A., Hamilton-Easton A.M., Cardin R.D., Nguyen P., Behm F.G., Woodland D.L., Doherty P.C., Blackman M.A.: Pathogenesis of an infectious mononucleosis-like disease induced by a murine gamma-Herpesvirus: role for a viral superantigen? *J Exp Med* 1997;185(9):1641.
277. Tuckwell H.C., Le Corfec E.: A stochastic model for early HIV-1 population dynamics. *J Theor Biol* 1998;195(4):451.
278. Tumpey T.M., Xiuhua L., Morken T., Zaki S.R., Katz J.M.: Depletion of Lymphocytes and Diminished Cytokine Production in Mice Infected with a Highly Virulent Influenza A (H5N1) Virus Isolated from Humans. *J Virol* 2000;74(13):6105.
279. Uchihara T., Ikeda M., Takahashi H., Yoshida S., Tsukagoshi H.: CSF lymphocyte subsets in aseptic meningitis: dual-labelling analysis with flow cytometry. *Acta Neurol Scand* 1990;81(5):468.
280. Van Rood Y., Goulmy E., Blokland E., Pool J., van Rood J., van Houwelingen H.: Month-related variability in immunological test results; implications for immunological follow-up studies. *Clin Exp Immunol* 1991;86(2):349.
281. Vanham G., Penne L., Allemeersch H., Kestens L., Willems B., van der Groen G., Jeang K-T., Toossi Z., Rich E.: Modeling HIV transfer between dendritic cells and T cells: importance of HIV phenotype, dendritic cell-T cell contact and T-cell activation. *AIDS* 2000;14(15):2299.
282. Vesely R., Barths J., VanLangendonck F., Hannet I., Strauss K.: Initial results of Central European Immunophenotyping Quality Control Program (CEQUAL). *Cytometry* 1996;26(2):108.
283. Vinante F., Krampera M., Morosato L., Rigo A., Romagnani S., Pizzolo G.: Peripheral T lymphocyte cytokine profile (IFN γ , IL-2, IL-4) and CD30 expression/release during measles infection. *Haematologica* 1999;84(8):683.
284. Vlad G., Cortesini R., Suci-Foca N.: License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC. *J Immunol*, 2005;174(10):5907.
285. Vrethem M., Dahle C., Ekerfelt C., Forsberg P., Danielsson O., Ernerudh J.: CD4 and CD8 lymphocyte subsets in cerebrospinal fluid and peripheral blood from patients with multiple sclerosis, meningitis and normal controls. *Acta Neurol Scand* 1998;97(4):215.
286. Wang S., Chen L.: T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cel Mol Immunol* 2004;1(1):37.
287. Wang S.M., Lei H.Y., Huang K., Wu J.M., Wang J.R., Yu C.K., Su I.J., Liu C.C.: Pathogenesis of enterovirus 71 brainstem encephalitis in pediatric patients: roles of cytokines and cellular immune activation in patients with pulmonary edema. *J Infect Dis* 2003;188(4):564.
288. Webster A.: Cytomegalovirus as a possible cofactor in HIV disease progression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991;4 suppl.1:S47.
289. Wedemeyer H., He X.S., Nascimbeni M., Davis A.R., Greenberg H.B., Hoofnagle J.H., Liang T.J., Alter H., Rehermann B.: Impaired effector function of Hepatitis C Virus-specific CD8⁺ T cells in chronic Hepatitis C Virus infection. *J Immunol* 2002;169(6):3447.
290. Weidinger G., Henning G., Meulen V.T., Niewiesk S.: Inhibition of Major Histocompatibility Complex class II-dependent antigen presentation by neutralization of

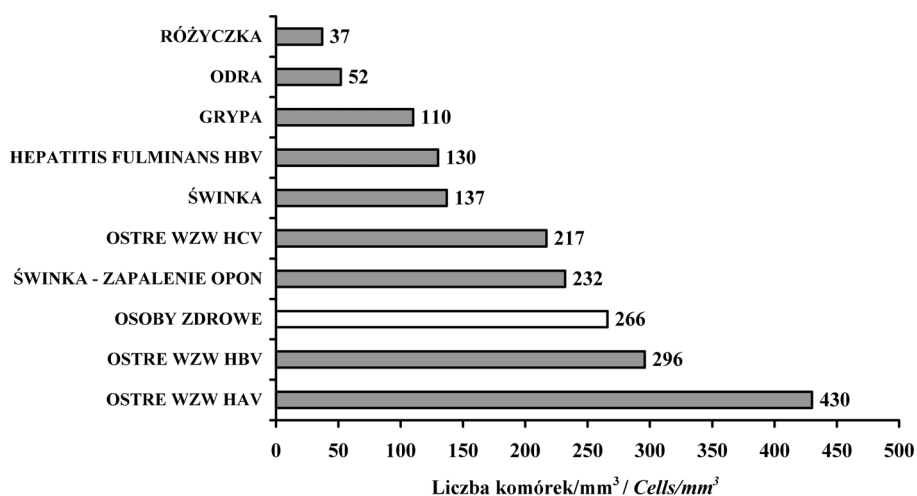
- gamma interferon leads to breakdown of resistance against measles virus-induced encephalitis. *J Virol* 2001;75(7):3059.
291. Wherry E.J., Ahmed R.: Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol* 2004;78(11):5535.
292. Whitley R.J., Roizman B.: Herpes simplex virus infections. *Lancet* 2001;357(9292):1513.
293. Whitley R.J.: Varicella-zoster virus. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R.: "Principles and practice of infectious diseases". Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Melbourne, Tokyo 1995, wyd. IV, 1345-1350.
294. Wiley C.A., Achim C.L., Christopherson C., Kidane Y., Kwok S., Masliah E., Melors J., Radhakrishnan L., Wang G., Soontornniyomkij V.: HIV mediates a productive infection of the brain. *AIDS* 1999;13(15):2055.
295. Williams H., Karen Macsween K., McAulay K., Higgins C., Harrison N., Swerdlow A., Britton K., Crawford D.: Analysis of immune activation and clinical events in acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 2004;189(1):63.
296. Williams H., McAulay K., Macsween K.F., Gallacher N.J., Higgins C.D., Harrison N., Swerdlow A.J., Crawford D.H.: The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *Brit J Haematol* 2005;129(2):266.
297. Wnuk A., Leszczyszyn-Pynka M., Bander D., Boroń-Kaczmarska A.: Pneumonia in HIV-infected patients: clinical observations. *Pol Merkur Lekarski* 2000;8(47):322.
298. Wood E., Hogg R.S., Harrigan P.R., Montaner J.S.G.: When to initiate antiretroviral therapy in HIV-1-infected adults: a review for clinicians and patients. *Lancet Infect Dis* 2005;5(7):407.
299. Yanagi Y., Takeda M., Ohno S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* 2006;87(10):2767.
300. Zalewska-Schoenthaler N., Schoenthaler-Humiecka J., Podlasin R., Cholewińska G., Rzeszkowicz T., Mikula T., Horban A.: Tuberculosis and mycobacteriosis important opportunistic disease in AIDS patient". *Przegl Epidemiol* 2001;55 Suppl 3:117.
301. Zaunders J., Carr A., McNally L., Penny R., Cooper D.A.: Effects of primary HIV-1 infection on subsets of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *AIDS* 1995;9(6):561.
302. Zawistowski S.: Zarys histologii. Podręcznik dla studentów. PZWL, Warszawa 1976: 118.
303. Zehender G., Meroni L., De Maddalena C., Varchetta S., Monti G., Galli M.: Detection of Hepatitis C Virus RNA in CD19 Peripheral Blood Mononuclear Cells of Chronically Infected Patients. *J Infect Dis* 1997;176(5):1209.
304. Zhang D., Shankar P., Xu Z., Harnisch B., Chen G., Lange C., Lee S.J., Valdez H., Lederman M.M., Lieberman J.: Most antiviral CD8 T cells during chronic viral infection do not express high levels of perforin and are not directly cytotoxic. *Blood* 2003;101(1):226.
305. Zinkernagel R.M.: Immunity, immunopathology and vaccines against HIV? *Vaccine* 2002;20(15):1913.

11. Aneks 1 – pozostałe wyniki badań



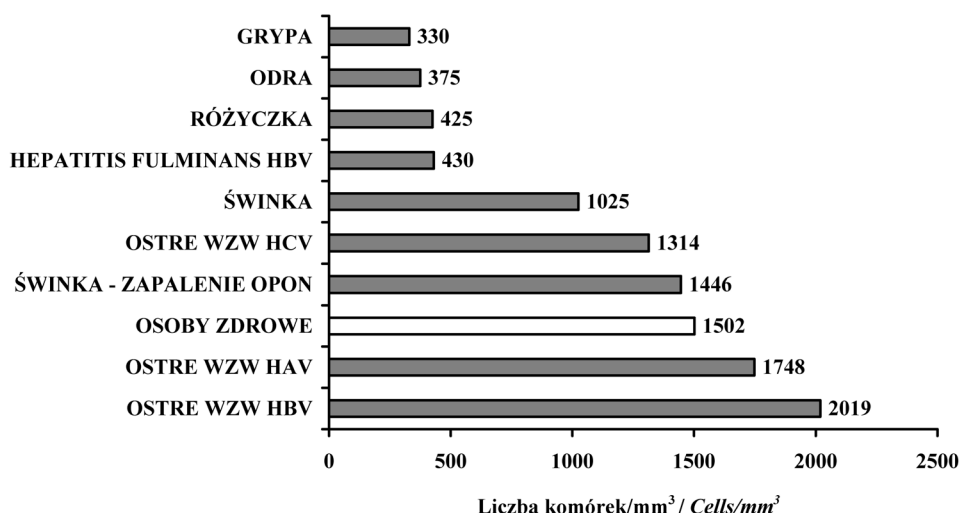
Ryc A1. Średnia limfocytoza we krwi obwodowej u pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii wirusowej; różnice nie były znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych

Fig. A1. Mean peripheral blood lymphocytosis in patients with acute viral infections; the differences were statistically insignificant compared to healthy individuals; see annex 2



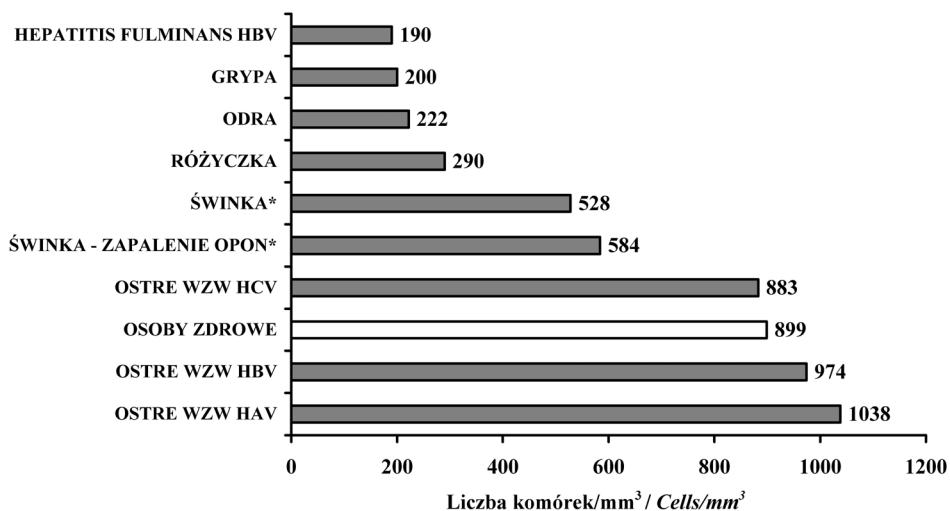
Ryc. A2. Średnia liczba limfocytów B we krwi obwodowej u pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii wirusowej; różnice nie były znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych

Fig. A2 . Mean peripheral blood lymphocyte B count in patients with acute viral infections; the differences were statistically insignificant compared to healthy individuals; see annex 2



Ryc. A3. Średnia liczba limfocytów T we krwi obwodowej u pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii wirusowej; różnice nie były znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych

Fig. A3. Mean peripheral blood lymphocyte T count in patients with acute viral infections; the differences were statistically insignificant compared to healthy individuals; see annex 2

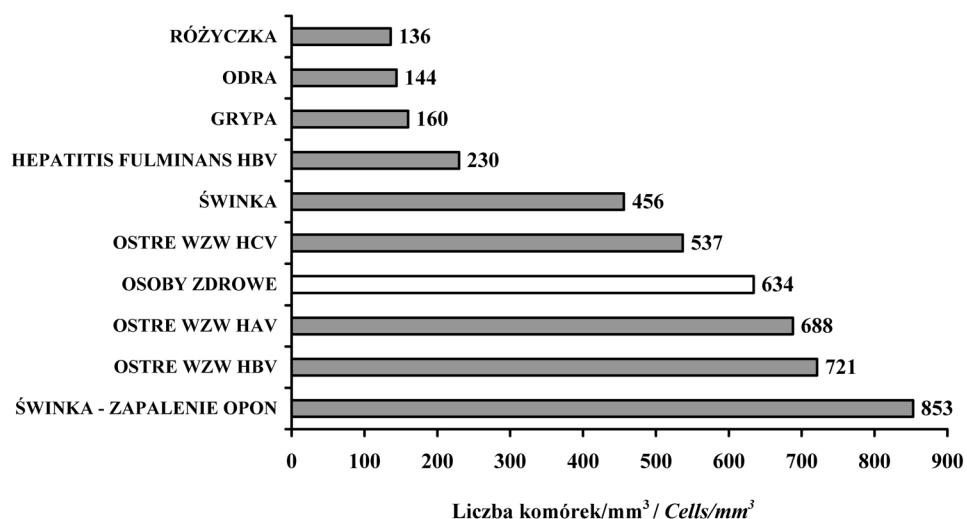


Ryc. A4. Średnia liczba limfocytów T CD4⁺ we krwi obwodowej u pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii wirusowej

* różnica znamienista statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

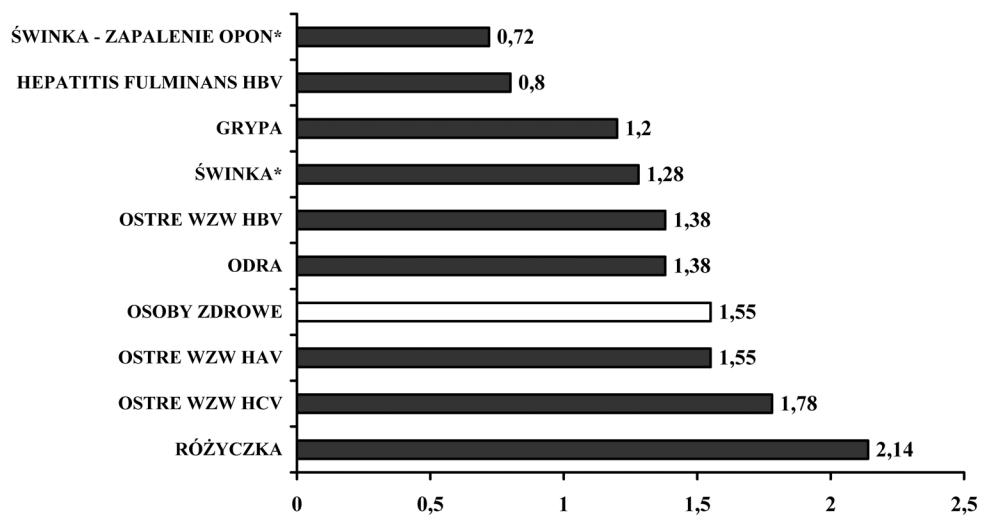
Fig. A4. Mean peripheral blood lymphocyte T CD4⁺ count in patients with acute viral infections; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)



Ryc. A5. Średnia liczba limfocytów T CD8⁺ we krwi obwodowej u pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii wirusowej; różnice nie były znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych

Fig. A5. Mean peripheral blood lymphocyte T CD8⁺ count in patients with acute viral infections; the differences were statistically insignificant compared to healthy individuals; see annex 2

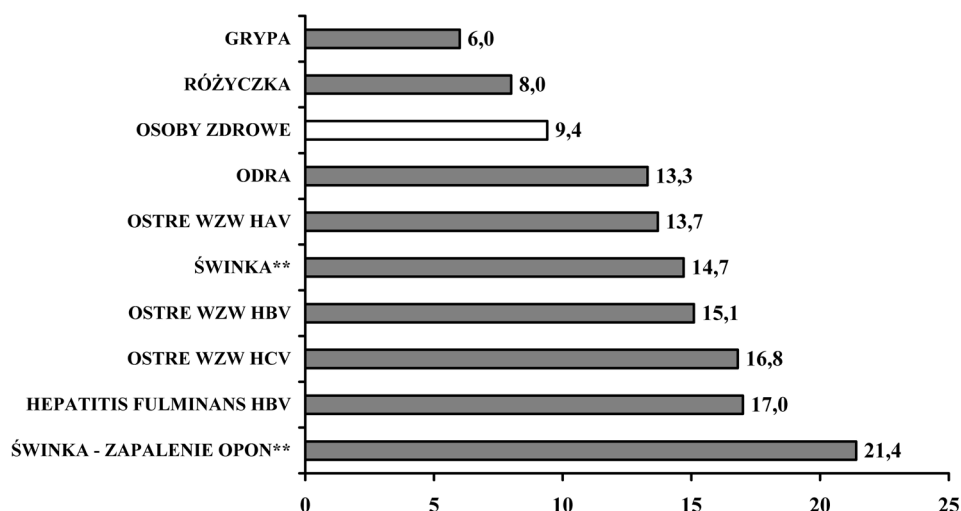


Ryc. A6. Średnia wartość stosunku CD4/CD8 we krwi obwodowej u pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii wirusowej

* łącznie - różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

Fig. A6. Mean peripheral blood CD4/CD8 ratio values in patients with acute viral infections; see annex 2

* taken together - statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

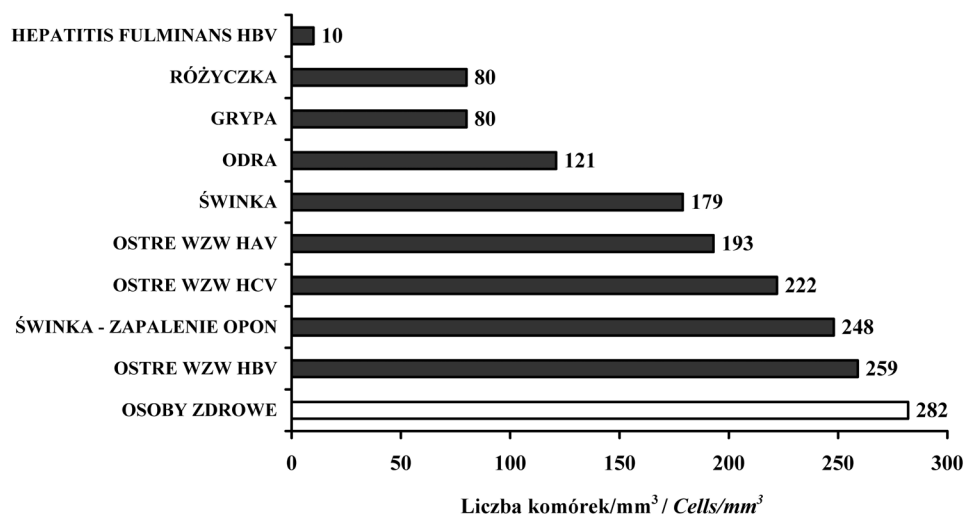


Ryc. A7. Średni odsetek aktywowanych limfocytów T ($CD3^+HLA-DR^+$) we krwi obwodowej u pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii wirusowej

* łącznie - różnica znamionna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

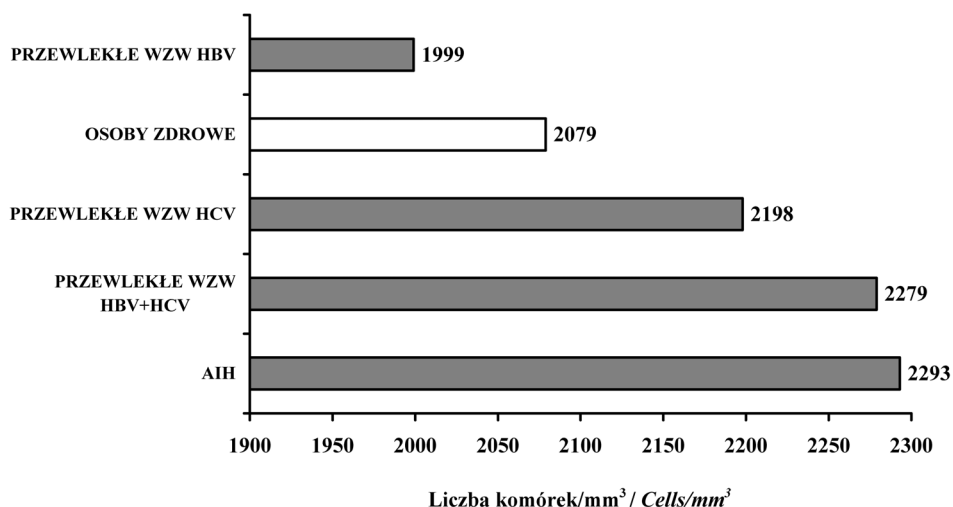
Fig. A7. Mean percentage of peripheral blood activated lymphocytes T ($CD3^+HLA-DR^+$) in patients with acute viral infections; see annex 2

* taken together - statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0,05$)



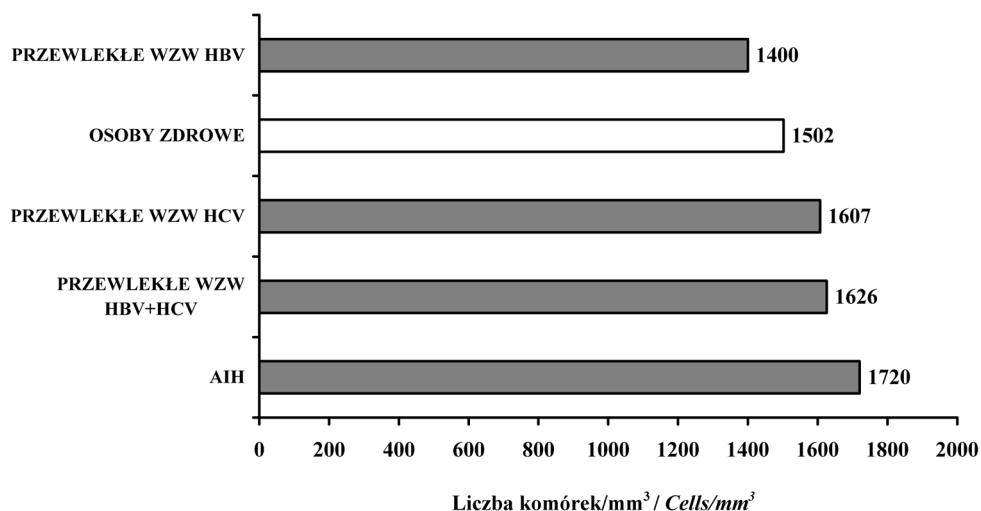
Ryc. A8. Średnia liczba komórek NK we krwi obwodowej u pacjentów z ostrymi chorobami zakaźnymi o etiologii wirusowej; różnice nie były znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych

Fig. A8. Mean peripheral blood NK cells count in patients with acute viral infections; the differences were statistically insignificant compared to healthy individuals; see annex 2



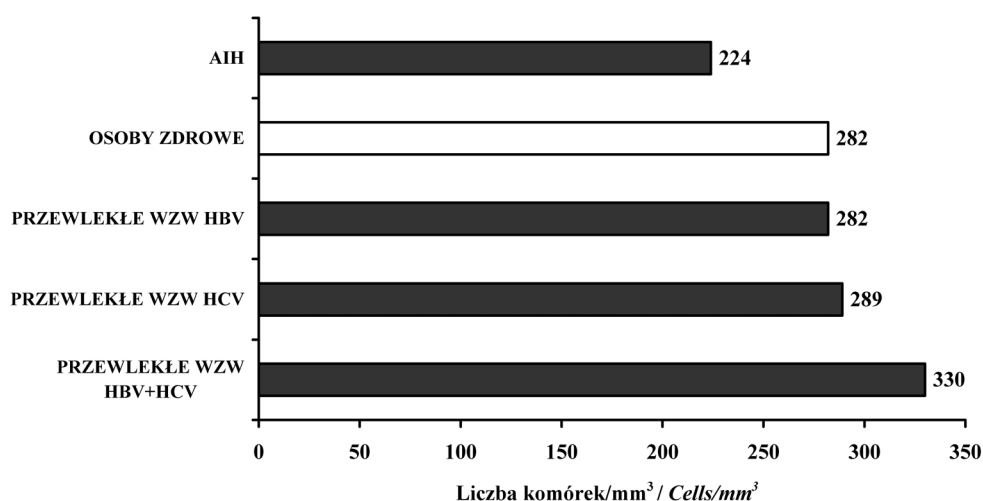
Ryc. A9. Średnia limfocytoza we krwi obwodowej u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby; różnice nie były znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych

Fig. A9. Mean peripheral blood lymphocytosis in patients with chronic hepatitis; the differences were statistically insignificant compared to healthy individuals; see annex 2



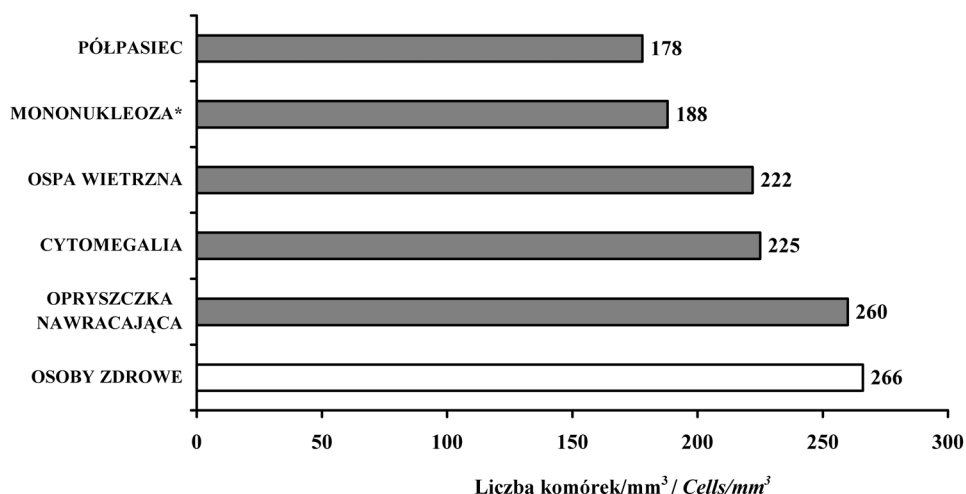
Ryc. A10. Średnia liczba limfocytów T we krwi obwodowej u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby; różnice nie były znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych

Fig. A10. Mean peripheral blood lymphocyte T count in patients with chronic hepatitis; the differences were statistically insignificant compared to healthy individuals; see annex 2



Ryc. A11. Średnia liczba komórek NK we krwi obwodowej u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby; różnice nie były znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych

Fig. A11. Mean peripheral blood NK cells count in patients with chronic hepatitis; the differences were statistically insignificant compared to healthy individuals; see annex 2

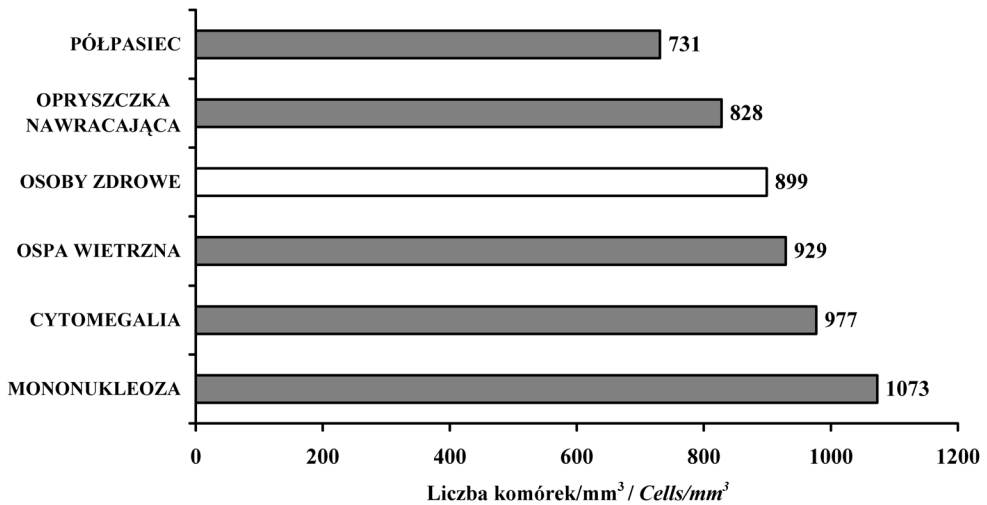


Ryc. A12. Średnia liczba limfocytów B we krwi obwodowej u pacjentów z zakażeniami *Herpes*

* różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

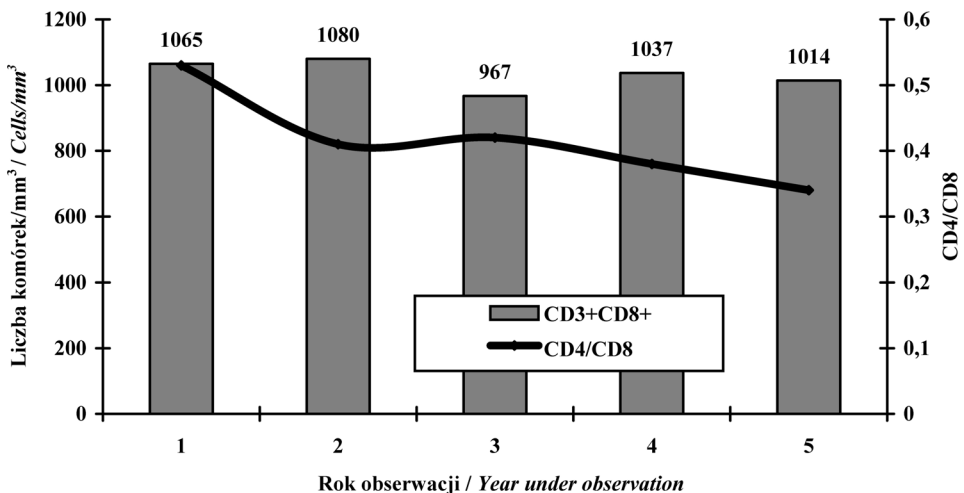
Fig. A12. Mean peripheral blood lymphocyte B count in patients with *Herpes* infections; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)



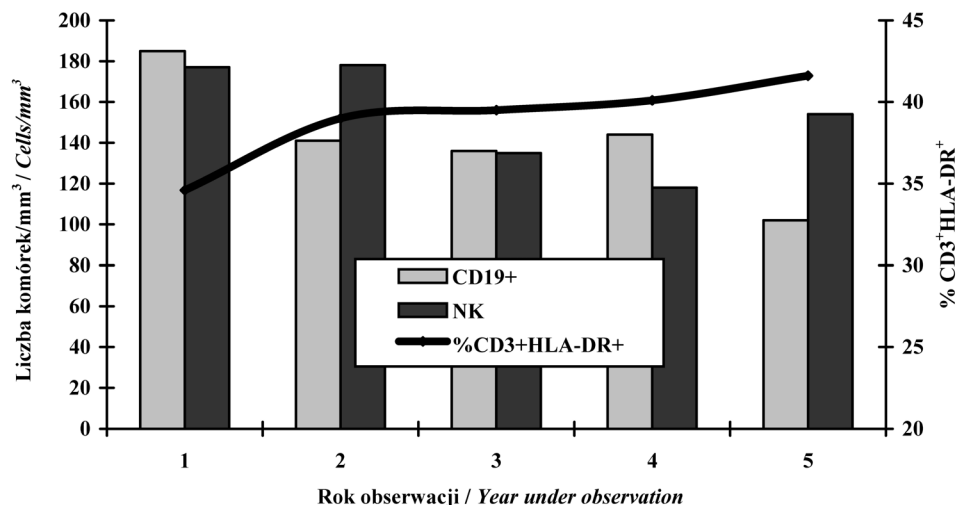
Ryc. A13. Średnia liczba limfocytów T $CD4^+$ we krwi obwodowej u pacjentów z zakażeniami *Herpes*; różnice nie były znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych

Fig. A13. Mean peripheral blood lymphocyte T $CD4^+$ count in patients with *Herpes* infections; the differences were statistically insignificant compared to healthy individuals; see annex 2



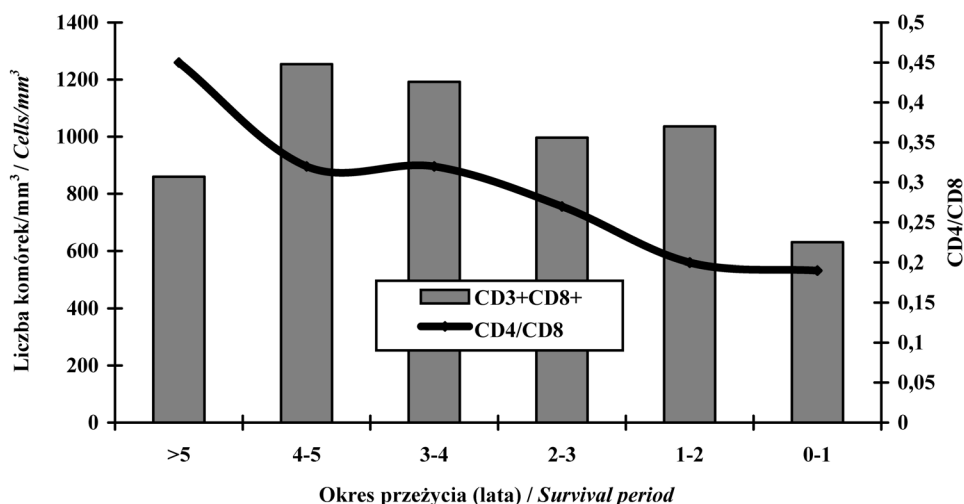
Ryc. A14. Zmiany średniej liczby limfocytów T $CD8^+$ i stosunku $CD4/CD8$ we krwi obwodowej u nieleczonych pacjentów zakażonych HIV w początkowym okresie zakażenia

Fig. A14. Changes of mean peripheral blood lymphocytes T $CD8^+$ and $CD4/CD8$ ratios in untreated HIV-infected patients during initial period of infection



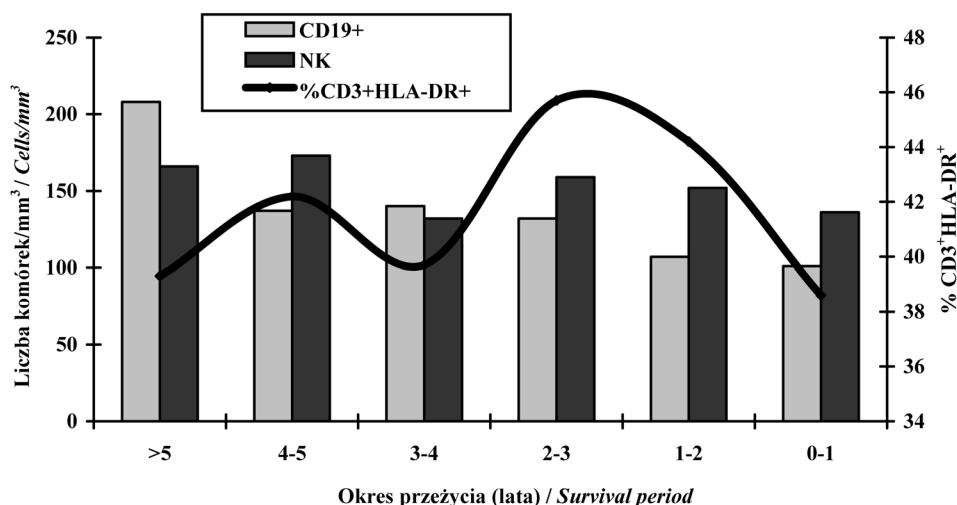
Ryc. A 15. Zmiany średniej liczby limfocytów B, komórek NK i odsetka aktywowanych limfocytów T ($CD3^+HLA-DR^+$) we krwi obwodowej nieleczonych pacjentów zakażonych HIV w początkowym okresie zakażenia

Fig. A15. Changes of mean peripheral blood lymphocytes B, NK cells counts and percentages of activated T cells ($CD3^+HLA-DR^+$) in untreated HIV-infected patients in initial period of infection



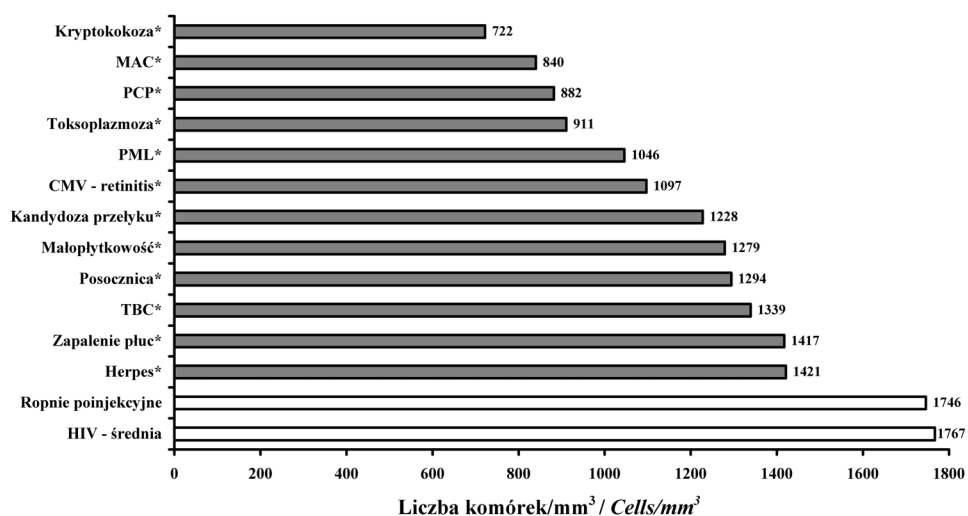
Ryc. A16. Zmiany średniej liczby limfocytów T $CD8^+$ i stosunku $CD4/CD8$ we krwi obwodowej u nieleczonych pacjentów zakażonych HIV w końcowym okresie zakażenia

Fig. A16. Changes of mean peripheral blood lymphocytes T $CD8^+$ and $CD4/CD8$ ratios in untreated HIV-infected patients during final period of infection



Ryc A17. Zmiany średniej liczby limfocytów B, komórek NK i odsetka aktywowanych limfocytów T ($CD3^+HLA-DR^+$) we krwi obwodowej nieleczonych pacjentów zakażonych HIV w końcowym okresie zakażenia

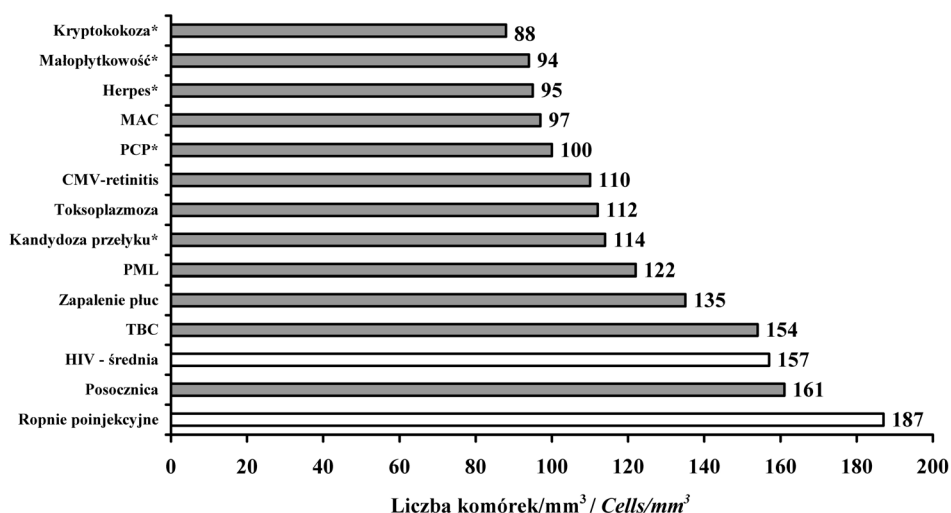
Fig. A17. Changes of mean peripheral blood lymphocytes B, NK cells counts and percentages of activated T cells ($CD3^+HLA-DR^+$) in untreated HIV-infected patients in final period of infection



Ryc. A18. Średnia całkowita limfocytoza u pacjentów z infekcjami oportunistycznymi i innymi wybranymi jednostkami chorobowymi występującymi w przebiegu zakażenia HIV

* różnica znamionna statystycznie w porównaniu do osób zakażonych HIV bez danej infekcji oportunistycznej
Fig. A18. Mean total peripheral blood lymphocytosis in HIV-infected patients with opportunistic infections and other selected disorders; see annex 2

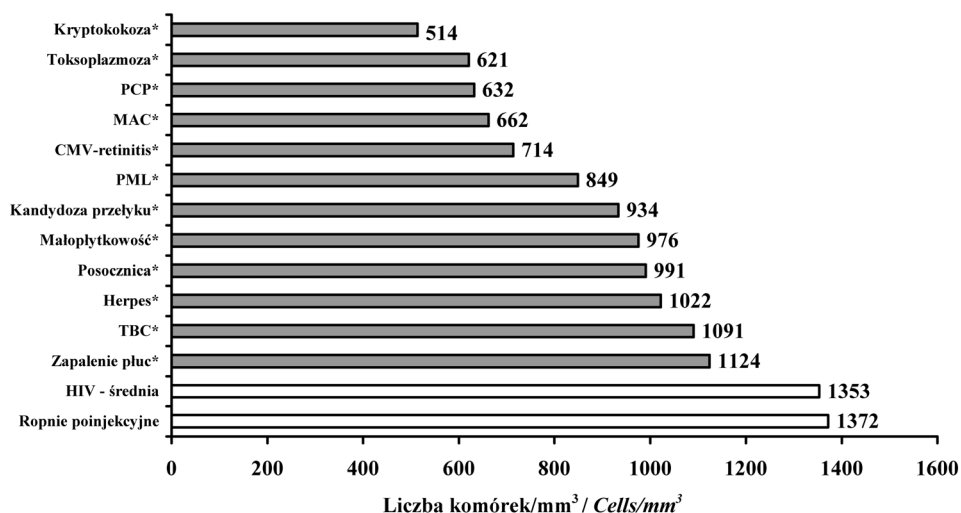
* statistically significant difference compared to HIV-infected individuals with no given opportunistic infection



Ryc. A19. Średnia liczba limfocytów B we krwi obwodowej u pacjentów z infekcjami oportunistycznymi i innymi wybranymi jednostkami chorobowymi występującymi w przebiegu zakażenia HIV

* różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zakażonych HIV bez danej infekcji oportunistycznej
Fig. A19. Mean peripheral blood lymphocyte B count in HIV-infected patients with opportunistic infections and other selected disorders; see annex 2

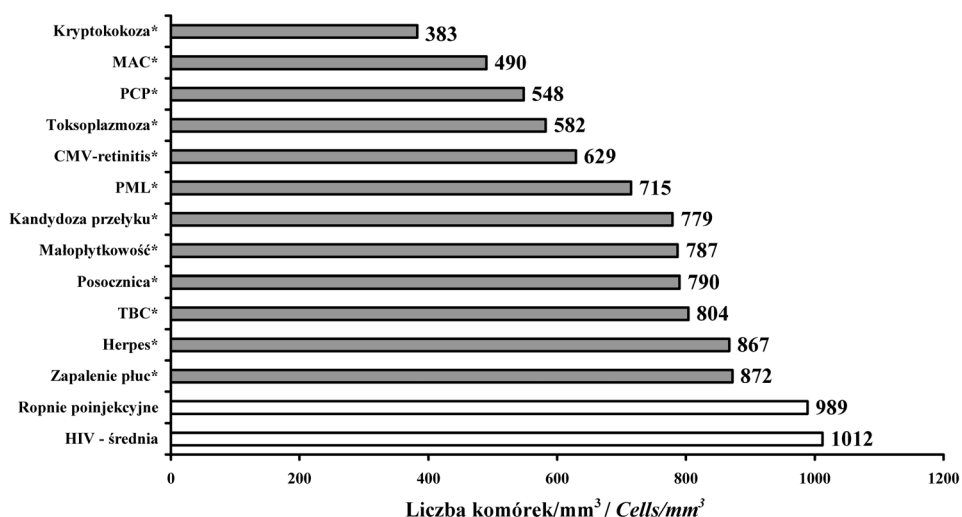
* statistically significant difference compared to HIV-infected individuals with no given opportunistic infection



Ryc. A20. Średnia liczba limfocytów T we krwi obwodowej u pacjentów z infekcjami oportunistycznymi i innymi wybranymi jednostkami chorobowymi występującymi w przebiegu zakażenia HIV

* różnica znamienna statystycznie w porównaniu do osób zakażonych HIV bez danej infekcji oportunistycznej
Fig. A20. Mean peripheral blood lymphocyte T count in HIV-infected patients with opportunistic infections and other selected disorders; see annex 2

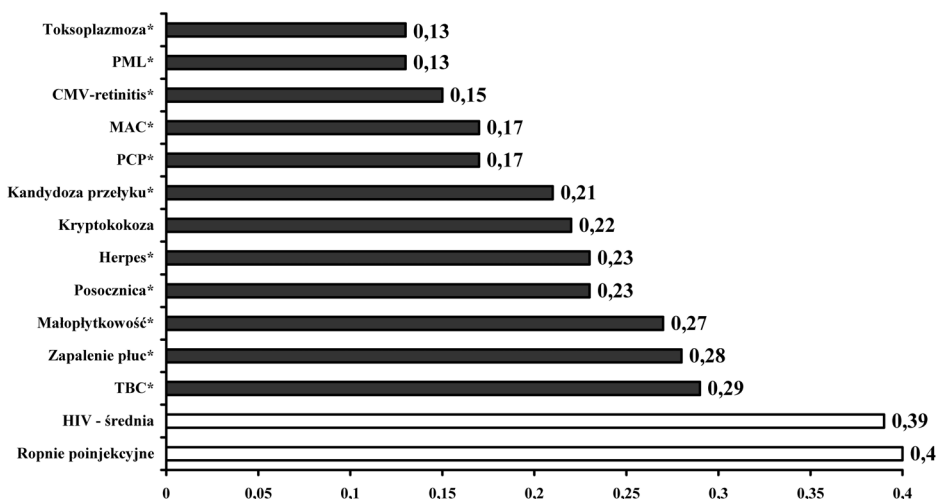
* statistically significant difference compared to HIV-infected individuals with no given opportunistic infection



Ryc. A21. Średnia liczba limfocytów T CD8⁺ we krwi obwodowej u pacjentów z infekcjami oportunistycznymi i innymi wybranymi jednostkami chorobowymi występującymi w przebiegu zakażenia HIV

* różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zakażonych HIV bez danej infekcji oportunistycznej
Fig. A21. Mean peripheral blood lymphocyte T CD8⁺ count in HIV-infected patients with opportunistic infections and other selected disorders; see annex 2

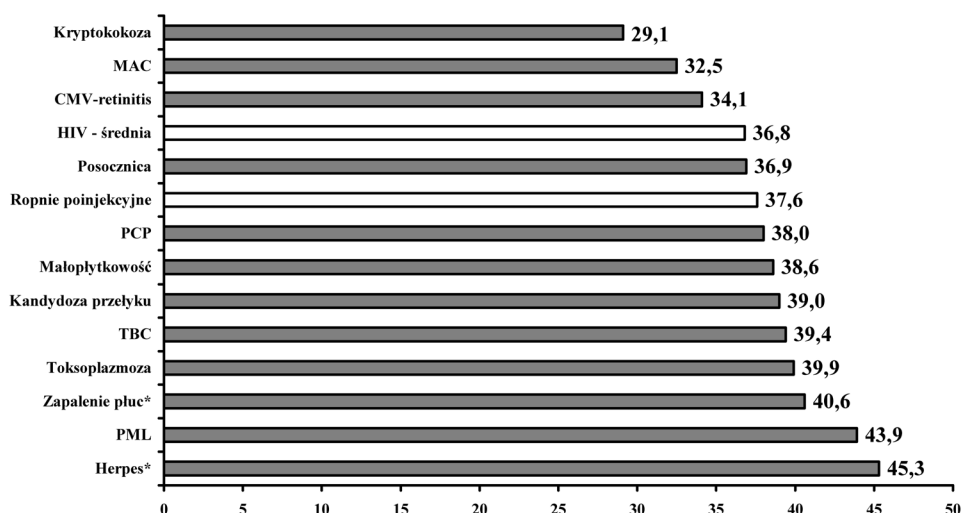
* statistically significant difference compared to HIV-infected individuals with no given opportunistic infection



Ryc. A22. Średnia wartość stosunku CD4/CD8 we krwi obwodowej u pacjentów z infekcjami oportunistycznymi i innymi wybranymi jednostkami chorobowymi występującymi w przebiegu zakażenia HIV

* różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zakażonych HIV bez danej infekcji oportunistycznej
Fig. A22. Mean peripheral blood CD4/CD8 ratio in HIV-infected patients with opportunistic infections and other selected disorders; see annex 2

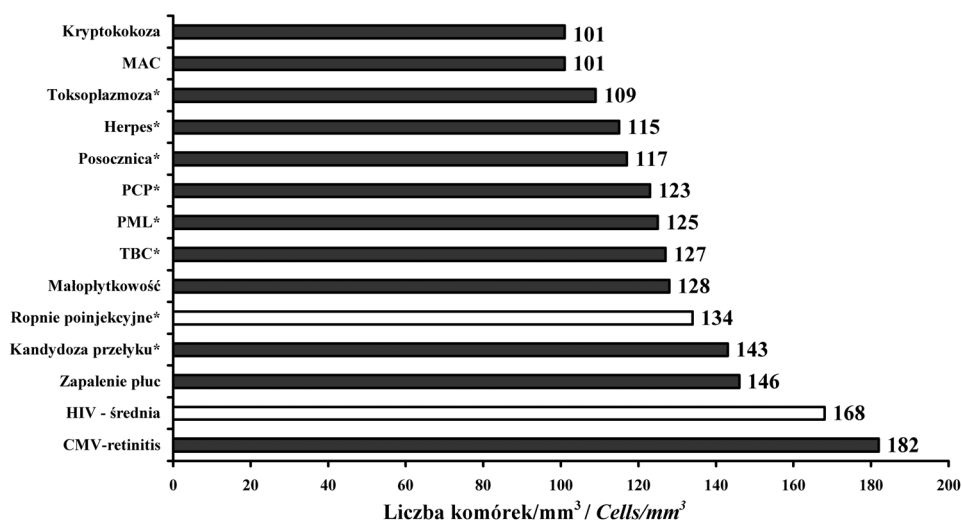
* statistically significant difference compared to HIV-infected individuals with no given opportunistic infection



Ryc. A23. Średni odsetek aktywowanych limfocytów T ($CD3^+HLA-DR^+$) we krwi obwodowej u pacjentów z infekcjami oportunistycznymi i innymi wybranymi jednostkami chorobowymi występującymi w przebiegu zakażenia HIV

* różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zakażonych HIV bez danej infekcji oportunistycznej
Fig. A23. Mean percentage of peripheral blood activated T lymphocytes ($CD3^+HLA-DR^+$) in HIV-infected patients with opportunistic infections and other selected disorders; see annex 2

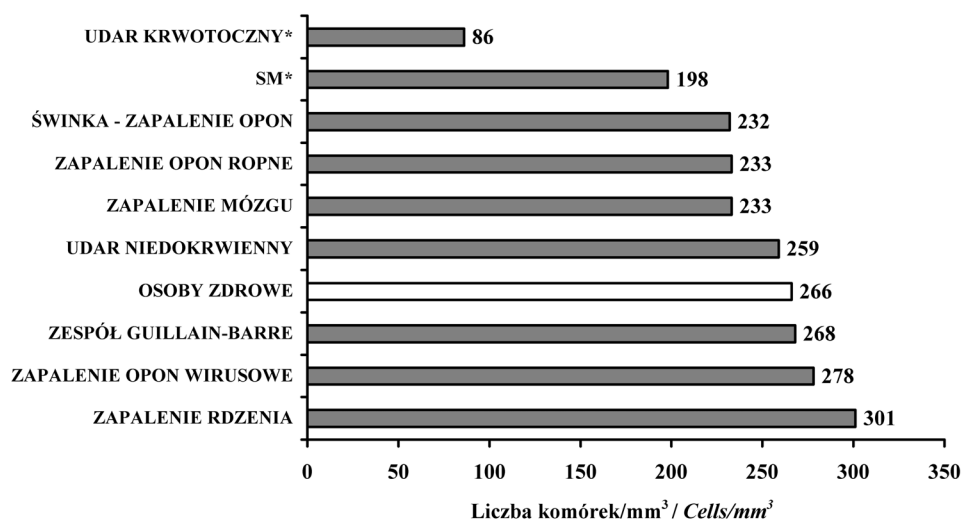
* statistically significant difference compared to HIV-infected individuals with no given opportunistic infection



Ryc. A24. Średnia liczba komórek NK we krwi obwodowej u pacjentów z infekcjami oportunistycznymi i innymi wybranymi jednostkami chorobowymi występującymi w przebiegu zakażenia HIV

* różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zakażonych HIV bez danej infekcji oportunistycznej
Fig. A24. Mean peripheral blood NK-cells count in HIV-infected patients with opportunistic infections and other selected disorders; see annex 2

* statistically significant difference compared to HIV-infected individuals with no given opportunistic infection

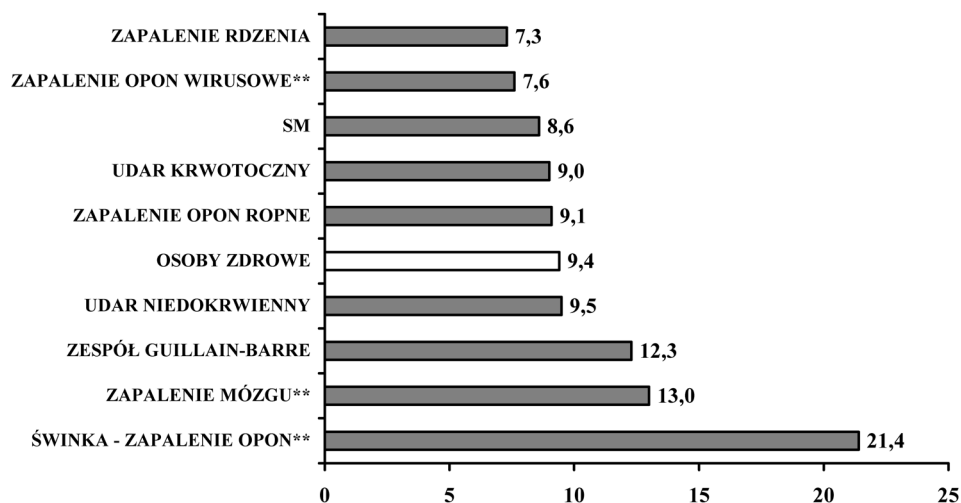


Ryc. A25. Średnia liczba limfocytów B we krwi obwodowej u pacjentów z chorobami układu nerwowego

* różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (test t-Studenta $p < 0,05$)

Fig. A25. Mean peripheral blood lymphocyte B count in patients with nervous system disorders; see annex 2

* statistically significant difference compared to healthy individuals (Student's t-test $p < 0.05$)

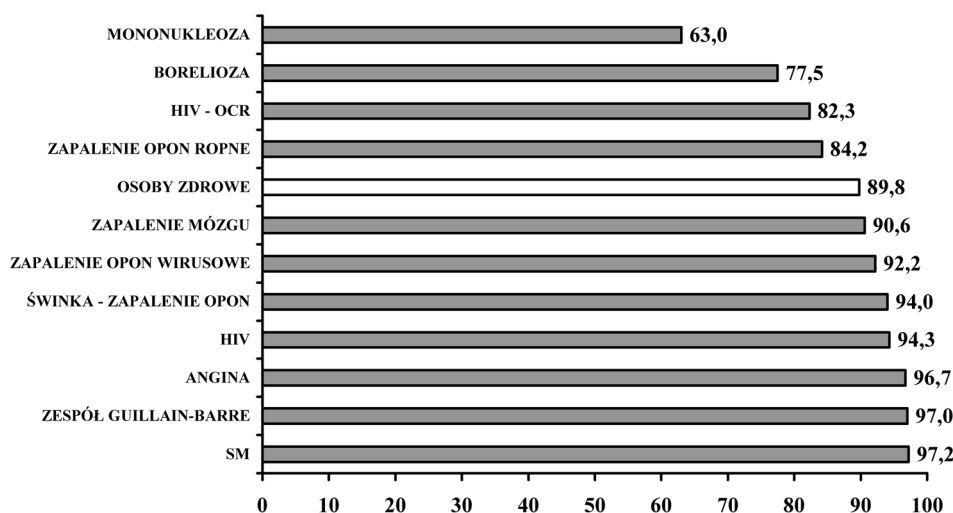


Ryc A26. Średni odsetek aktywowanych limfocytów T ($CD3^+HLA-DR^+$) we krwi obwodowej u pacjentów z chorobami układu nerwowego

** różnica znamienne statystycznie w porównaniu do osób zdrowych (ANOVA $p < 0,05$)

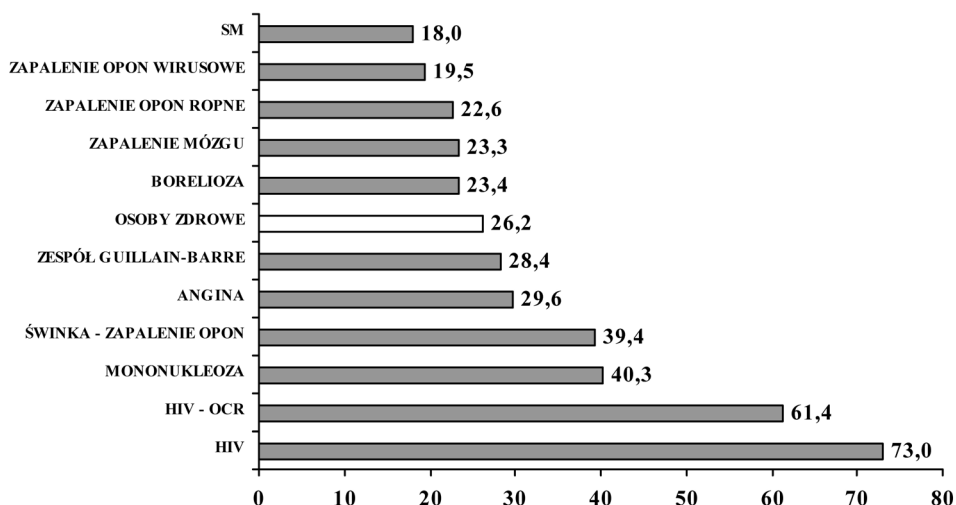
Fig. A26. Mean percentage of peripheral blood activated T cells ($CD3^+HLA-DR^+$) in patients with nervous system disorders; see annex 2

** statistically significant difference compared to healthy individuals (ANOVA $p < 0.05$)



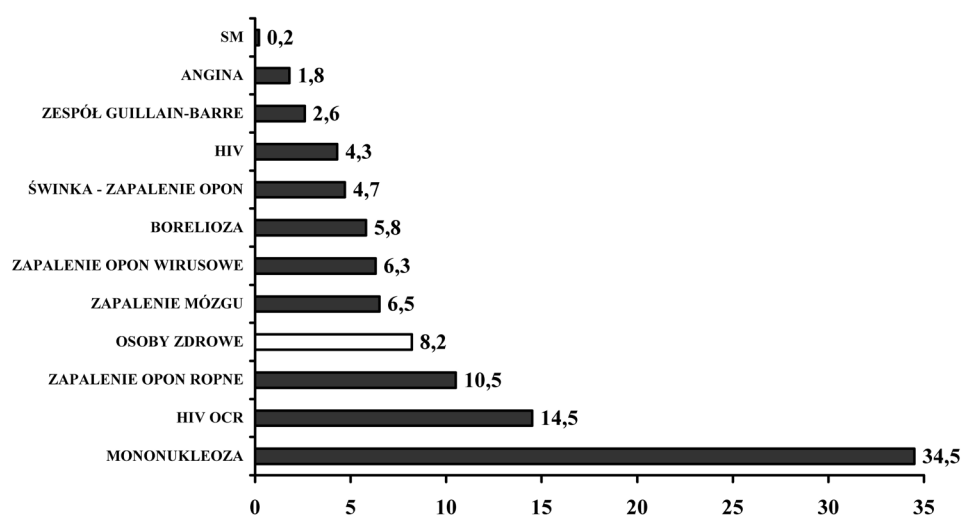
Ryc. A27. Średni odsetek limfocytów T w PMR u pacjentów z chorobami układu nerwowego; różnice nie były znamienne statystycznie

Fig. A27. Mean percentage values of lymphocytes T in cerebrospinal fluid of patients with nervous system disorders; the differences were statistically insignificant; see annex 2



Ryc. A28. Średni odsetek limfocytów T CD8⁺ w PMR u pacjentów z chorobami układu nerwowego; różnice nie były znamienne statystycznie

Fig. A28. Mean percentage values of lymphocytes T CD8⁺ in cerebrospinal fluid of patients with nervous system disorders; the differences were statistically insignificant; see annex 2



Ryc. A29. Średnie odsetki komórek NK w PMR u pacjentów z chorobami układu nerwowego; różnice nie były znamienne statystycznie

Fig. A29. Mean percentages of NK cells in cerebrospinal fluid of patients with nervous system disorders; the differences were statistically insignificant; see annex 2

12. Aneks 2 – tłumaczenie wyrażzeń i skrótów używanych na rycinach

AIH	<i>Autoimmune hepatitis</i>
Angina	<i>Tonsillitis</i>
Borelioza	<i>Borreliosis</i>
Cytomegalia	<i>Cytomegaly</i>
Grypa	<i>Influenza</i>
Ostre WZW HAV	<i>Acute viral hepatitis A</i>
Ostre WZW HBV	<i>Acute viral hepatitis B</i>
Przewlekłe WZW HBV	<i>Chronic viral hepatitis B</i>
Przewlekłe WZW HBV+HCV	<i>Chronic viral hepatitis B and C</i>
Ostre WZW HCV	<i>Acute viral hepatitis C</i>
Przewlekłe WZW HCV	<i>Chronic viral hepatitis C</i>
HIV OCR	<i>Acute retroviral syndrome</i>
HIV – średnia	<i>Mean value for HIV-infected patients</i>
Kandydoza przełyku	<i>Esophageal candidiasis</i>
Kryptokokoza	<i>Cryptococcosis</i>
MAC	<i>Mycobacterium avium complex infection</i>
Malaria	<i>Malaria</i>
Małopłytkowość	<i>Thrombocytopenia</i>
Mononukleoz	<i>Infectious mononucleosis</i>
NK	<i>NK-cells</i>
Odra	<i>Measles</i>
Opryszczka nawracająca	<i>Recurrent Herpes Simplex 1 or 2</i>
Osoby zdrowe	<i>Healthy individuals</i>
Ospa wietrzna	<i>Varicella</i>
PCP	<i>Pneumocystis carinii pneumonia</i>
PML	<i>Progressive multifocal leucoencephalopathy</i>
Posocznica	<i>Sepsis</i>
Półpasiec	<i>Shingles</i>
Ropnie poiniekcyjne	<i>Post-injection abscess</i>
Róża	<i>Erysipelas</i>
Różyczka	<i>Rubella</i>
SM	<i>Multiple sclerosis</i>
Świnka	<i>Mumps</i>
Świnka - zapalenie opon	<i>Mumps meningitis</i>
TBC	<i>Tuberculosis</i>
Toksoplazmoza	<i>Toxoplasmosis</i>
Udar krwotoczny	<i>Hemorrhagic stroke</i>
Udar niedokrwieny	<i>Ischemic stroke</i>
Włośnica	<i>Trichinosis</i>
Zapalenie mózgu	<i>Acute viral encephalitis</i>
Zapalenie opon ropne	<i>Purulent meningitis</i>
Zapalenie opon wirusowe	<i>Viral meningitis</i>
Zapalenie płuc	<i>Bacterial pneumonia</i>
Zatrucie pokarmowe	<i>Food poisoning</i>
Zapalenie rdzenia	<i>Myelitis</i>
Zespół Guillaine-Barré	<i>Guillaine-Barré syndrome</i>

