

# Dodatek Cepiva in imunost

Alojz Ihan



## **Celične vrste in podvrste, ki so pomembne za imunski odziv**

### *Fagocitne celice*

Evolucijsko najpreprostejše obrambne celice so fagociti. Fagocitna celica tujek najprej z ustreznimi receptorji prepozna, nato pa ga 'požre' (fagocitira). Ko prepozna tujek, začne okoli njega izvihovati citoplazemske podaljške. Ko z njimi obda delec v celoti, ostane ta ujet v membranskem mehurčku (fagosomu) znotraj celice. V naslednji stopnji se v fagosom zlivajo z encimi bogati mehurčki (lizosomi). Nastane prebavni mehurček (fagolizosom), v katerem kisikovi radikali (ROS) oksidirajo molekule tujka. Oksidacija mikrobnih encimov okvari njihovo delovanje in povzroči smrt mikroorganizma. Nato hidrolitični encimi razgradijo mikrob na osnovne gradnike (sladkorje, aminokisliline, maščobne kisliline). Slaba stran uničevanja mikrobov s fagocitozo je, da fagocitne celice (zlasti nevtrofilci) kmalu po požrtju 'izbljuvajo' uničene mikrobove v okolico. S tem encimi in kisikovi radikali fagocitnih celic okvarjajo lastna tkiva, da nastane nekroza (gnojno vnetje), ki lahko nepovratno okvari strukturo ~ ustroj in delovanje tkiva ali organa, zlasti če traja dlje časa.

Fagocitne celice molekule tujkov prepoznavajo s površinskimi receptorji, imenovanimi receptorji PRR (receptorji za prepoznavo molekularnih vzorcev; pattern recognition receptors – PRR). Mednje sodijo receptorji TLR (Toll-like receptors – TLR), lektini tipa C in znotrajcelični receptorji ((NOD like receptors – NLR). PRR se vežejo z mikrobnimi molekulami, ki se evolucijsko niso bistveno spreminjale in so skupne večjim skupinam patogenih mikrobov – imenujemo jih molekule PAMP (patogenom pridruženi molekularni vzorci; pathogen associated molecular patters – PAMP). Molekule PAMP (na primer lipopolisaharid, peptidoglikan, dvojnovijačna RNK) so navadno v notranjosti mikrobov in se sprostitjo v okolico šele ob njihovem razpadu. Navzočnost PAMP je pogoj za napad prvega vala imunskega odziva, to je aktivacijo fagocitnih celic, kateri sledi vnetje in aktivacija drugega, specifičnega vala imunskega odziva, katerega nosilci so limfociti. Pri naravni okužbi so vir PAMP razpadli mikrobi, pri cepljenju pa funkcijo PAMP opravljajo adjuvansi. Brez delovanja PAMP na receptorje PRR namreč ne pride do aktivacije fagocitnih celic, pospešene fagocitoze, makrofagnega predstavljanja antigenov limfocitom T niti do migracije makrofagov v področne bezgavke. V cepivih so kot adjuvansi lahko uporabljene kar naravne mikrobne molekule PAMP (na primer Freundov adjuvans, ki vsebuje mrtve mikobakterije), sintetični analogi naravnih PAMP (na primer ASO<sub>4</sub>, ki je analog polisaharida šigel) ali pa snovi, ki aktivirajo makrofage na druge načine (kovinski oksidi) in ne z vezavo na receptorje PRR. Receptorska prepoznavna značilnih mikrobnih molekul PAMP je torej signal, da fagocitne celice (nevtrofilci, monociti, makrofagi) začnejo požirati delce in hkrati izločati prve vnetne mediatorje, na primer interleukin I (IL-1) in tumorje nekrotizirajoči faktor (TNF). Fagocitoza mikrobov in vnetni odziv tkiva navadno zadoščata za zamejitev okužbe, vendar za ceno precejšnjih tkivnih in funkcionalnih okvar ter bolezenskih težav. Mnogih okužb pa fagocitne celice ne zmorejo dokončno odstraniti iz organizma.

Najučinkovitejše fagocitne celice – glede na količinsko zmožnost požiranja in uničevanja tujkov – so nevtrofilni granulociti, ki tudi prevladujejo (okoli 70 % jih je) med krvnimi levkociti in se lahko ob vnetju masovno preselijo v okuženo tkivo. Nevtrofilni granulociti nastajajo v kostnem mozgu, od koder prehajajo v kri (okoli 4000/mm<sup>3</sup> krvi), v kateri preživijo 1 do 2 dni in nato odmrejo. Vnetni mediatorji (aktivirani proteini komplekta, kinini, izločki limfocitov in aktiviranih makrofagov) jih mobilizirajo, da skozi kapilare vstopijo v vnetna tkiva. Tam požirajo tujke. Lizosomi nevtrofilcev vsebujejo hidrolaze, mieloperoksidazo in muramidazo (lizocim). Aktivirani nevtrofilci citotoksično vsebino lizosomov izločajo tudi navzven, s čimer okvarijo tkiva. To se dogaja zlasti ob navzočnosti imunskih kompleksov ~ skupkov antigenov in protiteles, ki se vežejo na receptorje Fc $\gamma$  (receptor za IgG) na površini nevtrofilcev. Tako aktivirani nevtrofilci so pomemben patogenetični dejavnik preobčutljivostne reakcije tipa III (Arthusova reakcija), ki lahko na primer nastane tudi na mestu vnosa cepiva, če ima cepljena oseba že izdelana protitelesa proti sestavinam cepiva. Ker so nevtrofilci najpomembnejše obrambne celice za odstranjevanje tujkov, pomeni njihovo pomanjkanje v krvi (nevtropenija) veliko nevarnost okužb, pri cepljenju z živimi cepivi pa nevarnost, da živo cepivo namesto zaščite povzroči nastanek kužne bolezni, proti kateri cepimo.

#### *Monociti in makrofagi - aktivacija antigensko specifičnih imunskih odzivov*

Monociti nastajajo v kostnem mozgu iz matičnih krvnih celic. Iz kostnega mozga prehajajo v kri kot razmeroma velike (od 12 do 20  $\mu$ m), okrogle celice, ki se v krvi zadržijo zelo kratek čas (1 dan), nato iz kapilar prestopijo v različna tkiva (navadno zaradi lokalnih tkivnih vnetnih signalov) in se lokalno preoblikujejo v nepravilno oblikovane celice (tkivne makrofage ali histiocyte). Tkivni makrofagi so glede na tkivno lokacijo dobili različna histološka imena (npr. Kupferjeve celice v jetrih, mikroglijske celice v možganih, Langerhansove celice v koži). Makrofagi prepoznajo in fagocitirajo tujke, obenem pa izločajo vnetne mediatorje, ki sprožijo vnetno reakcijo. Poleg tujkov požirajo tudi tkivne celice, ki so v fazi programiranega celičnega odmiranja (apoptoze). Pomen makrofagnega požiranja tujkov je zlasti, da požrte in ustrezno razgrajene tuje molekule predstavljajo celicam T pomagalkam in s tem sprožajo specifični imunski odziv, ki se kaže z nastankom protiteles ali citotoksičnih limfocitov T ali obojih, usmerjenih proti tujim molekulam – antigenom. Specifični imunski odziv potrebuje za nastanek določen čas (nekaj tednov), ki je potreben za požiranje tujkov na mestu njihovega vdora, migracijo makrofagov s požrtimi tujki v področne bezgavke, predelavo požrtih tujih molekul v obliko, primerno za antigensko predstavitev limfocitov T – celicam pomagalkam. Temu sledi še razmnoževanje celic T pomagalk, nato pa razmnoževanje limfocitov B in citotoksičnih limfocitov T ter njihova diferenciacija v spominske limfocite. Slednji se ob vztrajanju tujka v organizmu in s tem tudi v bezgavki hitro preoblikujejo v efektorske celice, ki odstranjujejo tujke (limfociti B z izločanjem protiteles, citotoksični limfociti pa s citotoksično reakcijo). Ko so tujki odstranjeni, ostanejo spominski limfociti še leta dolgo v organizmu, vendar jih ponovno soočenje z enako okužbo zelo hitro prikljče in aktivira (imunski spomin).

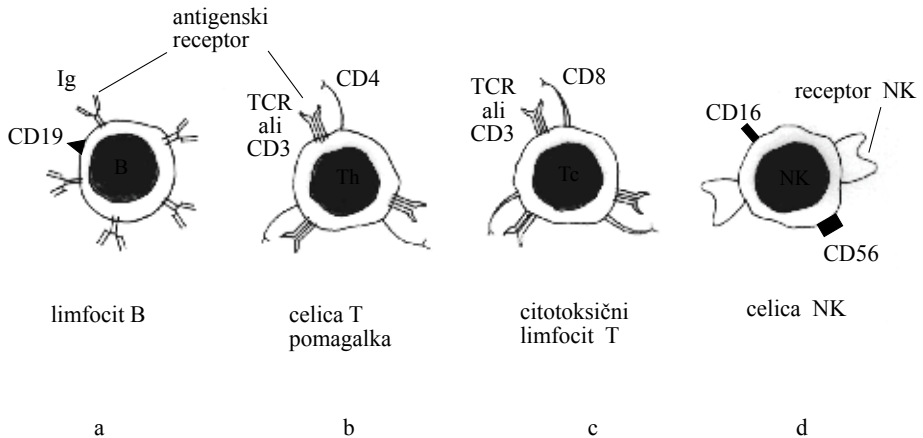
Makrofagne celice, ki so zmožne predstavljati antigene, imenujemo antigen predstavljajoče

celice (APC), ki v nekaterih tkivih (bezgavkah, vranici, timusu) opravljajo zelo specializirane naloge. V foliklih bezgavk in vranice se APC imenujejo folikularne dendritične celice. Pomembne so, ker predstavljajo antigene limfocitom B in tako omogočijo nastajanje ustreznih protiteles. Poznavanje njihove fiziologije je zato zlasti pomembno pri načrtovanju cepiv. APC v timusu predstavljajo antigene dozorevajočim limfocitom T. To omogoči odstranitev (selekcijo) tistih nezrelih limfocitov T, ki so z antigenskimi receptorji usmerjeni proti antigenom lastnega organizma in bi lahko povzročili nastanek avtoimunosti, če bi dozoreli in prišli v kri.

### *Limfociti – celice antigensko specifičnih imunskih odzivov*

Limfociti so celice s posebnimi, bolj dolgoročno usmerjenimi nalogami v zvezi z imunskim odzivom. Njihova dejavnost je evolucijsko mlajša od fagocitoze, njihova naloga pa 'dopolniti' prvo linijo obrambe (prirojene fizične pregrade in nespecifični imunski odziv – fagocitozo in aktivacijo vnetja) s specifičnim (pridobljenim, spominskim) imunskim odzivom. Namen specifičnega, imunskega odziva je predvsem nastanek spominskega imunskega odziva, specifično usmerjenega proti molekulam (antigenom) povzročitelja bolezni. Za specifično prepoznavanje in posledično odstranjevanje tujih molekul imajo limfociti posebne receptorje za antigene. Antigeni so molekule, ki jih limfocitni receptorji za antigene (imunoglobulinske molekule, T-celični receptorji) prepoznajo za tuje. Vsak limfocit ima na svoji površini eno samo vrsto povsem značilnih in unikatnih receptorjev za antigen, ki se zelo specifično vežejo samo z eno obliko tuje antigenske molekule. V naravi obstaja zelo veliko različnih molekul in za njihovo specifično prepoznavanje mora biti v telesu na voljo veliko limfocitov z raznolikimi vezišči za antigen, vsak od limfocitov pa se receptorsko poveže le s 'svojo' vrsto antigenskih molekul. Ocenjujemo, da ima človek nekaj stotin milijonov medsebojno različnih limfocitov. Njihovi receptorji za antigene se razlikujejo od limfocita do limfocita, zato v telo skoraj ne more priti večja tuja molekula, na katero se ne bi z receptorjem za antigen vezalo vsaj nekaj limfocitov. Prednost obstoja tako ogromnega števila različnih limfocitov je, da praktično ni tujka, ki bi ob vdoru v organizem ne izzval nastanka specifičnega imunskega odziva proti njemu. Slabost obstoja ogromnega števila različnih limfocitov pa je, da se na posamezen vdor tujka v telo odzove zelo malo limfocitov. Ker maloštevilne celice ne morejo zamejiti okužbe, se vrste limfocitov, ki prepoznajo določeno vrsto tujkov, začnejo naglo razmnoževati. V tednu ali dveh navadno nastane nekaj tisoč istovrstnih limfocitov, kar običajno zadošča za nastanek spominskega imunskega odziva (protitelesnega, citotoksičnega), ki učinkovito zameji in odstrani okužbo.

Slika 1: Osnovne vrste limfocitov



Osnovne vrste limfocitov: **a** - limfocit B, katerega antigenski receptor je imunoglobulinska molekula (Ig); **b** - celica T pomagalka (Th), katere antigenski receptor je T-celični receptor (TCR), izraža pa še antigen CD4; **c** - citotoksični limfocit T (Tc), katerega antigenski receptor je T-celični receptor (TCR), izraža pa še antigen CD8; **d** - celica naravna ubijalka (NK), ki ima molekuli CD56 in CD16.

### **Pridobljena imunost: antigenska specifičnost in imunski spomin**

Po prvem stiku z antigenom nastane specifični imunski odziv v nekaj tednih. Imenuje se primarni imunski odziv, njegova učinkovitost temelji na razmnoženih spominskih limfocitih, ki so specifično usmerjeni proti tuji antigenski molekuli. Ponoven stik z enakim antigenom vzbudi specifičen imunski odziv, ki je hitrejši in močnejši od primarnega. To je sekundarni (anamnestični) imunski odziv. Primarni in sekundarni imunski odziv sta edinstveni lastnosti imunskega sistema.

Specifični imunski odziv omogočajo limfociti s svojimi antigenskimi receptorji. Med limfociti ločimo limfocite B, katerih antigenski receptorji so protitelesne molekule – imunoglobulini (Ig). T-celični receptorji (TCR) pa so antigenski receptorji limfocitov T. Vsak posamični limfocit ima na površini antigenske receptorje, ki so medsebojno vsi enaki in specifični samo za eno vrsto antigena. Tujek (antigen), ki pride v telo, se veže samo na limfocite, ki imajo antigenske receptorje ustrezne specifičnosti. Po vezavi antigena se limfocit začne hitro razmnoževati (proliferacija) in zoreti (diferenciacija). Iz posameznega limfocita po vezavi antigena v nekaj dneh nastanejo številni limfociti, ki imajo enake antigenske receptorje. Tako nastane specifični limfocitni klon. Posledica klonske ekspanzije specifičnih limfocitov je poleg odstranitve antigena tudi imunski spomin. Primarni imunski odziv se začne z zakasnitvijo, ki je

potrebna za ekspanzijo specifičnega klona. Sekundarni imunski odziv je hitrejši in močnejši, ker se proti antigenu odzovejo specifični kloni spominskih limfocitov, ki so že nastali med primarnim imunskim odzivom. Limfociti, ki še nikoli niso prišli v stik s specifičnim antigenom, so naivni limfociti. Spominski limfociti ob navzočnosti antigena diferencirajo v efektorske limfocite: limfociti B v plazmatke, ki tvorijo protitelesa, citotoksični limfociti T pa v aktivirane citotoksične celice.

### ***Imunoglobulini – receptorji za antigen limfocitov B***

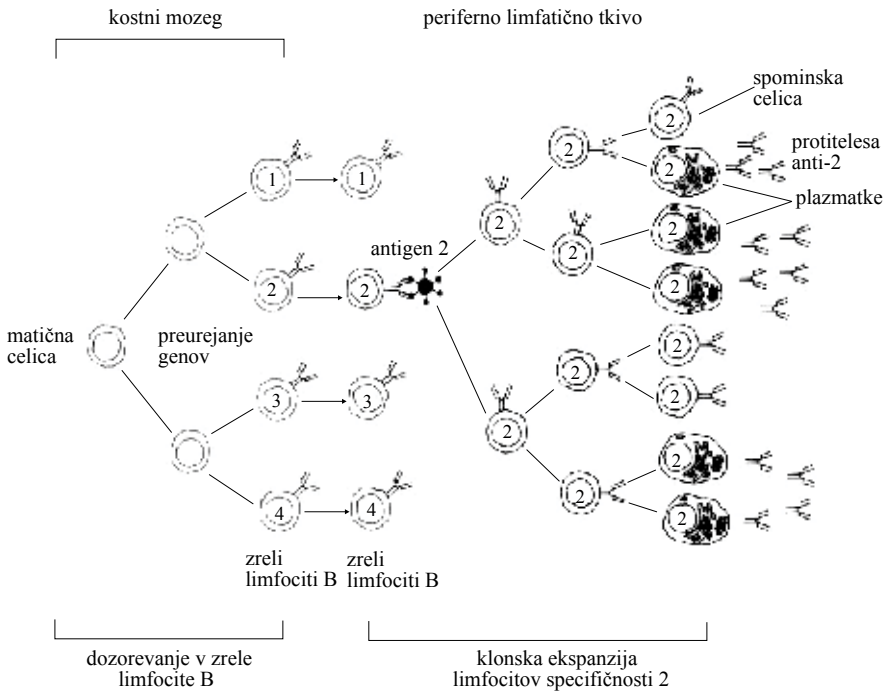
Antigenski receptorji limfocitov B so imunoglobulinske molekule, ki jih limfociti B izražajo na svoji površini. Imenujemo jih membranski imunoglobulini (mIg). Te molekule imajo vezišče za antigen, ki se z nekovalentnimi vezmi poveže z delom antigenske molekule, ki ga imenujemo antigenska determinanta ali epitop. Posamezna antigenska molekula, ki pride v telo, ima navadno več različnih epitopov, ki izzovejo nastanek več različnih vrst specifičnih protiteles. Še v večji meri to velja za mikroorganizem, ki je sestavljen iz številnih različnih molekul. Po okužbi torej praviloma nastanejo raznovrstna protitelesa, usmerjena proti številnim mikrobnim antigenom. Običajno pa le nekatere vrste takih protiteles pomembno prispevajo k zamejevanju (nevtralizaciji) okužbe. Taka protitelesa imenujemo nevtralizacijska protitelesa, in ena glavnih nalog pri razvoju cepiv je izbira tistih mikrobnih antigenov, ki bodo v cepilnem pripravku izzvala predvsem nastanek nevtralizacijskih protiteles.

### ***Zgradba in razredi imunoglobulinov***

Po vezavi antigena se limfocit B aktivira in diferencira v spominski limfocit B. Ob persistenci antigenov se spominski limfociti B diferencirajo v plazmatke prek vmesnih celic – plazmablastov. Ti imajo Ig-receptorje za antigene (podobno kot limfociti B), hkrati pa proizvajajo manjše količine protiteles IgM. Plazmablasti se razmnožujejo in preklaplajo sintezo protiteles IgM na druge razrede protiteles (G1, G2, G3, G4, A1, A2, E). Po nekaj dneh plazmablasti bodisi propadejo (če v okolici ni antigenov, ki bi se specifično vezali na njihove membranske Ig), bodisi diferencirajo v plazmatke, ki ne morejo več preklapljati med protitelesnimi razredi. Plazmatke začnejo izločati velike količine imunoglobulinov (nekaj tisoč molekul na sekundo), ki imajo enako vezišče za antigen kot limfociti B, iz katerih so plazmatke nastale. Plazmatke imajo zelo malo membranskih Ig, ki pa so pomembni za uravnavanje sinteze protiteles; namreč, dokler receptorji zaznavajo navzočnost antigenov, plazmatka podaljšuje sintezo protiteles. Za uspešno odstranitev okužbe morajo plazmatke izdelati dovolj protiteles, da se v telesnih tekočinah ustvari ustrezna koncentracija (zaščitna raven protiteles). Zaščitna koncentracija protiteles je različna pri različnih okužbah. Po eni strani gre lahko za drugačno občutljivost mikroorganizmov in lokalizacijo okužbe, del izmerjene raznolikosti zaščitnih ravnih protiteles pa gre tudi na račun specifičnosti metod, ki merijo serumsko koncentracijo

specifičnih protiteles, ker je od vseh nastalih protimikrobnih protiteles navadno le majhen delež zaščitnih, ki mikrobu dejansko škodujejo. Ocenjujejo, da mora pri večini okužb nastati nekaj tisoč plazmatk istega klona, da bi lahko nastala primerna raven zaščitnih protiteles.

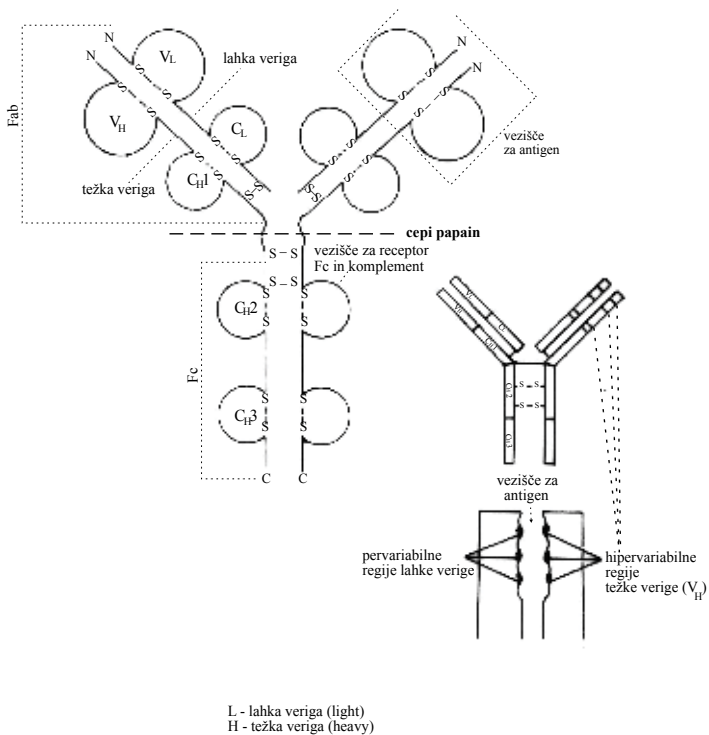
Slika 2: Dozorevanje limfocitov B v kostnem mozgu in njihovo razmnoževanje (klonska ekspanzija) po stiku s tujkom – antigenom



Protitelesa so imunoglobulini. To so glikoproteinske molekule, ki z vezavo na antigene onesposobijo tujke (zlasti mikrobo) ter hkrati sprožijo različne mehanizme (npr. aktivacijo komplementa, opsonizacijo), ki odstranijo tujke iz organizma. IgG so najpogostnejša protitelesa, saj jih je v normalnem človeškem serumu okoli 70 % vseh imunoglobulinov. Lahko prehajajo skozi placento, zato materina protitelesa IgG ščitijo tudi plod pred okužbami. Osnovno enoto imunoglobulinske molekule razreda G (IgG) sestavljata 2 proteinski verigi: večja (težka veriga, MM približno 150.000) in manjša (lahka veriga, MM približno 50.000). Protitelesa razreda IgG imajo dve povsem enaki veziščki za antigen. Konstantne regije težkih verig določajo fiziološke učinke, ki jih imunoglobulini po vezavi na antigen povzročijo v organizmu. Ločimo 5 razredov težkih verig (M, G, A, D, E) in glede na njih tudi 5 razredov imunoglobulinskih molekul (IgM, IgG, IgA, IgD in IgE), ki se med seboj razlikujejo po molekulski zgradbi, antigenskih lastnostih in fizioloških učinkih, ki sledijo vezavi antigena s protitelesom. Protitelesa razreda IgM so makroglobulini (M), ki imajo veliko molekulsko maso, približno 900.000. Sestavljena so iz 5 enakih enot, posamezna enota je zgrajena

podobno kot molekula IgG. Protitelesa razreda IgM imajo po 10 enakih vezišč za antigen, pri primarnem imunskem odzivu pa nastanejo prej kot IgG. Zaradi multivalentnosti so zlasti učinkovita za pritrjevanje na površino celic, ki imajo veliko število podobnih antigenskih mest (taki so npr. antigeni O /lipopolisaharid/ na po Gramu negativnih bakterijah). Protitelesa IgM se začnejo tvoriti že pri plodu. Ker ne prehajajo skozi placento, je njihovo ugotavljanje uporabno za diagnostiko prenatalnih okužb in okužb v prvih 6 mesecih življenja.

Slika 3: Protitelesa IgG in IgM



Protitelesa razredov IgG in IgM se po nastanku razporedijo v zunajceličnih tekočinah. S svojimi specifičnimi vezišči se povežejo s tujki (antigeni). Nastanek kompleksa antigen-protitelo (imunski kompleks ~ skupek) ima različne fiziološke učinke, ki prispevajo k odstranitvi tujka iz telesa in izničenju njegovega patološkega učinkovanja na organizem.

Fiziološki učinki vezave protiteles na antigene so: a) Nevtralizacija – včasih protitelo že samo z vezavo na antigen izniči njegove patološke učinke. Vezava na molekule toksinov (npr. difterijski toksin) prepreči vezavo toksina na celice in s tem toksično delovanje. Vezava IgG na virusne delce prepreči njihovo širjenje na neokužene celice. b) Oponizacija – protitelo ob vezavi na tujek spremeni konformacijo tako, da se na njegov del Fc vežejo fagocitne celice s svojimi receptorji Fc (zlasti nevtrofilci). Fagocitne celice po tej vezavi fagocitirajo



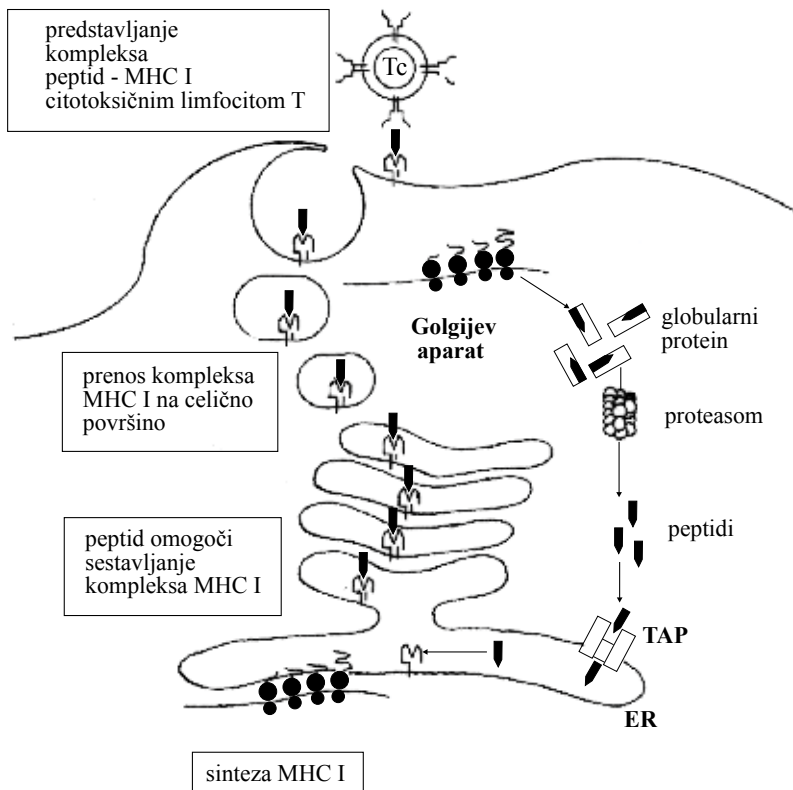
celoten imunski kompleks ~ skupek in tako odstranijo tujek. c) Aktivacija komplementa – protiteleso ob vezavi na antigen spremeni konformacijo tako, da z delom Fc sproži kaskadno aktivacijo proteinov komplementnega sistema (klasična pot). Posledica je nastanek litičnega kompleksa (membrane attack complex – MAC), ki poškoduje mikrobo celico. Aktivirani proteini komplementa in njihovi odlomki tudi okrepijo vnetno reakcijo in pospešijo prihod celic vnetnic v vnetišče (kemotaksa).

Protitelesa razreda IgA se nahajajo pretežno v serumu, IgA2 pa prevladujejo v izločkih sluznic (kot sta črevesna in dihalna sluz). Poglavitna funkcijska razlika med IgA in preostalimi protitelesi, ki prevladujejo v krvi: IgG in IgM, je, da oba aktivirata vnetne dejavnike (proteine komplementa, fagocitne celice), IgA pa veže tuje molekule na površini sluznic in oteži njihov vdor v sluznice. IgA v krvi veže tuje molekule in omogoča njihov prenos skozi jetrne celice v žolč. S tem je poskrbljeno, da se imunski sistem ne odzove z vnetno reakcijo na antigene, ki pridejo v telo s hrano in z vdihanim zrakom. V nasprotnem primeru bi prišlo do vnetja sluznic in okvare njihovega delovanja. Protitelesa razreda IgE prav tako ne aktivirajo komplementa. Krvna plazma vsebuje izredno majhen delež IgE, skoraj v celoti je namreč vezan na bazofilce in mastocite. IgE izločajo predvsem plazmatke v sluznicah črevesa in dihal. Bistvena za aktivnost IgE pri alergijah in parazitskih boleznih je njegova zmožnost, da se veže na receptor Fc za IgE (na bazofilcih v krvi in mastocitih v sluznicah in koži ter na eozinofilcih). Ko se na celično površino vezane molekule IgE vežejo še ustrezni antigeni, se celice aktivirajo in sproščajo vnetne mediatorje (z IgE posredovana alergijska reakcija oz. preobčutljivost tipa I po stari nomenklaturi). Protiteles razreda IgD je zelo malo v plazmi, veliko pa jih je na limfocitih B, na katerih se pojavijo v obdobju zorenja in so sestavni del receptorja za antigen (mIgD).

### ***Nastanek specifičnega imunskega odziva po okužbi ali po cepljenju***

Po vdoru tujka v tkivo (zaradi okužbe ali cepljenje) makrofagne celice v tkivu s svojimi receptorji PRR najprej prepoznajo 'nevarne' signalne mikrobo molekule (PAMP), ki pomenijo navzočnost mikroorganizmov v tkivu. V cepivu molekule PAMP nadomestimo z adjuvansom. Sledi aktivacija požiranja tujkov (oz. cepilnih antigenov) in sproščanje vnetnih citokinov, ki kemotaktično privabijo v vneto tkivo levkocite iz krvi. Če je molekul, ki aktivirajo receptorje PRR dovolj, je to signal za makrofage in/ali dendritične celice, ki so fagocitirale tujke, da se premaknejo po limfnih žilah do področnih bezgavk. Tam začnejo v svoji notranjosti razgrajene delce tujkov (peptide) povezovati z molekulami MHC 2. Molekule MHC 2 so proteini, ki se povežejo s peptidnimi delci tujkov v obliko, ki jo lahko limfociti T prepoznajo s svojimi receptorji za antigene in se pri aktivirajo. Aktivacija limfocitov T pa je prva stopnja nastanka antigeno specifičnega imunskega odziva.

Slika 4: Delovanje molekul MHC I

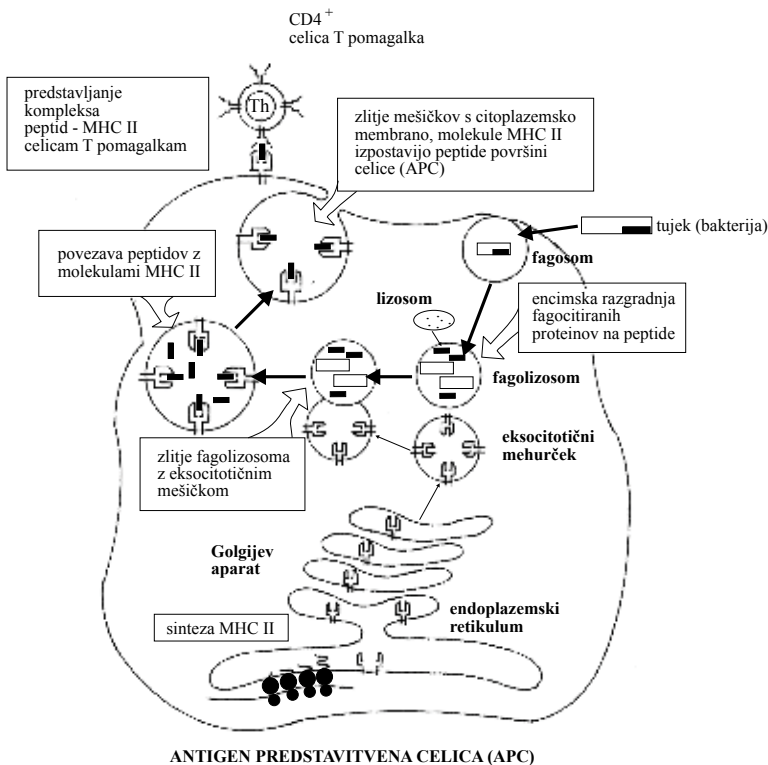


Molekule MHC po njihovi funkciji ločimo v dva razreda: MHC I in MHC II. Molekule MHC I (pri človeku so humani levkocitni antigeni – HLA A, B in C) imajo na površini vse zdrave telesne celice, ki imajo jedro. Vsaka celica encimsko razseka majhen del proteinov v citoplazmi na (naključne) peptidne fragmente (8 ali 9 aminokislin), ki preidejo v cisterne endoplazemskega retikuluma. Tam se peptidi povežejo z novonastajajočimi molekulami MHC I v proteinske komplekse, ki se vgradijo v citoplazemsko membrano. Molekule MHC I so torej prenašalni proteini, ki iz citoplazemskih proteinov nastale peptide prenašajo na celično površino. Na tako predstavljene peptide naletijo citotoksični limfociti T. Pri normalni, neokuženi celici molekule MHC I predstavljajo zgolj svoje peptide, nastale z razsekanjem svojih molekul (npr. kolagena, encimov). V organizmu normalno ni citotoksičnih limfocitov T, ki bi prepoznali lastne peptide v kompleksih MHC I. Kadar je proteinska sinteza celice virusno spremenjena (celica sintetizira telesu tuje, virusne proteine), del molekul MHC I predstavlja tudi virusne peptide. Zato se najdejo citotoksični limfociti T (limfociti T CD8), ki prepoznajo virusne peptide v kompleksih MHC I in povzročijo smrt okuženih celic. Molekula m-RNK s celično

ali virusno gensko informacijo omogoči citoplazemsko proteinsko sintezo na ribosomih. Del citoplazemskih proteinov pa proteolitični encimski kompleksi – proteosomi – stalno cepijo na peptidne odseke. Manjše peptide (dolžine 8 do 9 aminokislin) transportni proteinski kompleks (transporter in antigen processing – TAP) prenese v cisterno endoplazemskega retikuluma (ER). Posamezni peptid se lahko veže z verigo alfa MHC I v stabilen molekulin kompleks MHC I, ki je zasidran v membrani endoplazemskega retikuluma. Z membranskim prenosom prek Golgijevih cistern in eksocitotnih mehurčkov postanejo kompleksi MHC I sestavni del plazmaleme, kjer kot zunanji membranski proteini predstavljajo peptide citotoksičnim limfocitom T.

Molekule MHC II imajo samo celice, ki predstavljajo antigene celicam T pomagalkam. Antigen predstavljajoče celice (APC) so predvsem monociti, makrofagi in dendritične celice. APC tujeke požirajo in jih v prebavnih mehurčkih encimsko razgradijo na peptidne fragmente. Molekule MHC II so transportni ~ prenašalni proteini, ki take peptidne fragmente (dolžine 12 do 15 aminokislin) prenesejo na površino APC in jih predstavljajo limfocitom T – celicam T pomagalkam (CD4). Če celice T pomagalka na fagocitnih celicah prepoznajo tujo peptidno sekvenco, se aktivirajo in s svojimi izločki (citokini) vzbudijo in usmerjajo imunski odziv.

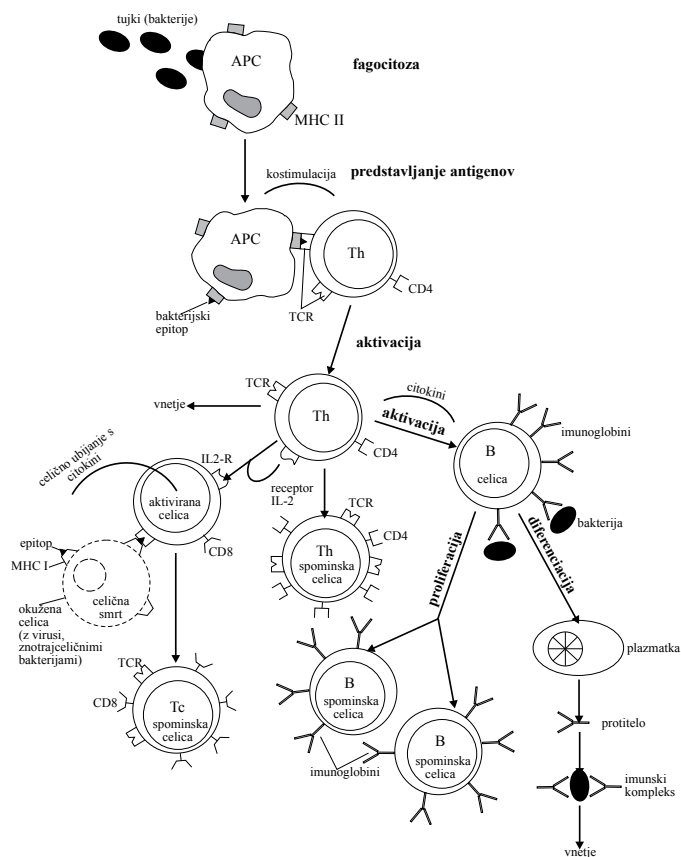
Slika 5: Delovanje molekul MHC 2



## Aktivacija limfocitov T – celic pomagalik (CD4)

Celice T pomagalke z antigenimskim receptorjem (TCR) prepoznajo peptid, ki ga z molekulami MHC II ponujajo v prepoznavo makrofagne celice. Celica T pomagalka s svojim proteinom CD4 (ki je receptor za molekule MHC II) najprej na makrofagu prepozna molekulo MHC II. Nato celica T pomagalka s svojim TCR lahko prepozna tuj peptid, ki se nahaja v kompleksu MHC II. Če se prepoznava tujega peptida (antigena) zgodi, se v celici T pomagaliki aktivirajo geni za sintezo mediatorjev – citokinov. Med njimi je zlasti pomemben interleukin 2 (IL-2), ki deluje na limfocite B, citotoksične limfocite T, pa tudi povratno na celice T pomagalke. IL-2 povzroči razmnoževanje celic, ki na membrani izrazijo visokoafinitetne receptorje za IL-2. Ker IL-2 zelo hitro razpada (razgrajujejo ga proteazni encimi v tkivni tekočini in plazmi), je njegova učinkovita koncentracija samo v neposredni soseščini aktivirane celice T pomagalke. To je pomembno zato, da se aktivirajo samo celice, ki so neposredno vpletene v imunski odziv, ne pa tudi tiste, ki se odzivajo na druge antigene.

Slika 6: Organizacija imunskega odziva



## **Aktivacija citotoksičnih limfocitov T (CD8)**

Citotoksični limfociti T (CD8+) prepoznajo tuj peptid z antigenim receptorjem (TCR). Telesne celice, ki so okužene z znotrajceličnimi bakterijami, paraziti ali virusi, ponujajo tuje (antigenske) peptide v prepoznavo citotoksičnim limfocitom T. Citotoksični limfocit T na vsaki celici najprej prepozna molekulo MHC I in se prek nje poveže s celico. Šele po tej vezavi citotoksični limfocit T s svojim antigenim receptorjem (TCR) lahko prepozna tuj peptid, ki se nahaja v molekulskem kompleksu MHC I. Če se prepozna tujega peptida (antigena) zgodi, se v citotoksičnem limfocitu T aktivirajo geni za sintezo receptorjev za IL-2. Če je v okolici dovolj velika koncentracija IL-2 (aktivirane celice T pomagalk v neposredni bližini), se IL-2 veže na receptorje na citotoksičnih limfocitih T in spodbudi izločanje vsebine citotoksičnih zrn proti tarčni celici, ki vsebuje tuje peptide. Citotoksična zrna vsebujejo encime in toksične snovi, ki uničijo napadene celice. Med toksičnimi proteini je znan perforin, ki se veže na membrano napadene celice, kjer nato polimerizira in s tem ustvari transmembranske kanale, ki porušijo ionsko ravnovesje napadene celice. Citotoksični mehanizem ubijanja uporabljajo poleg limfocitov T tudi celice NK, čeprav slednje tujkov ne prepoznavajo z antigenimi receptorji.

### *Aktivacija limfocitov B*

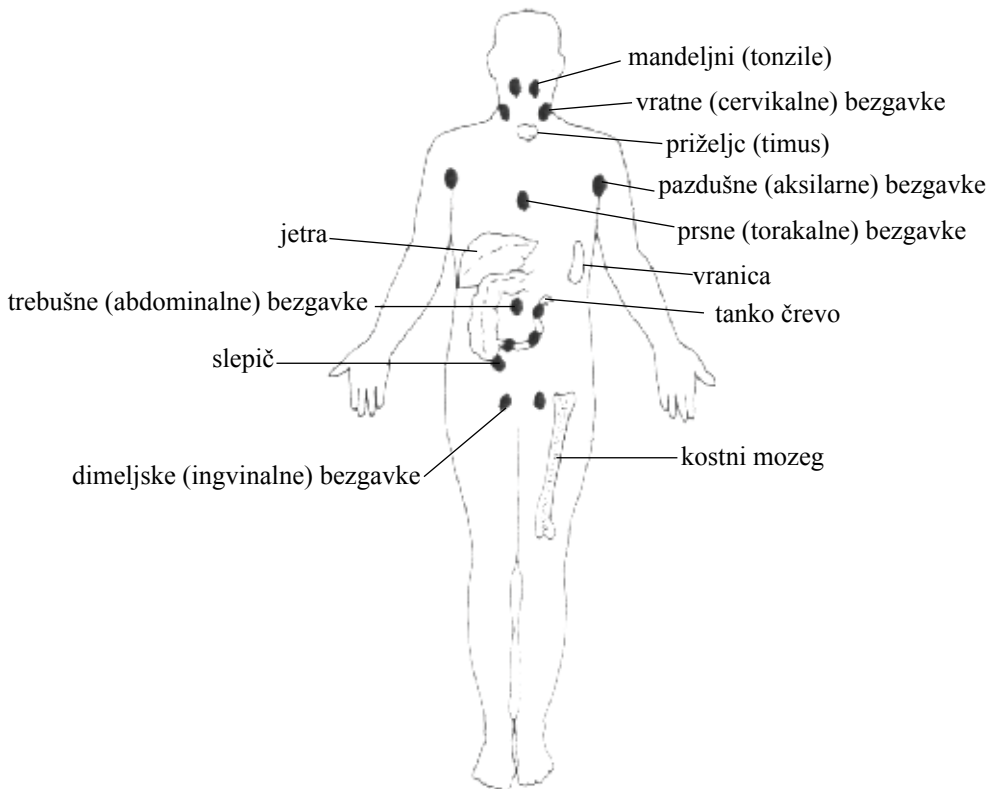
Limfociti B prepoznajo antigene v zunajcelični tekočini (topne molekule v nativni konformaciji, delci) z antigenimi receptorji. Pri naivnih limfocitih B so antigeni receptorji mIgD in mIgM. Antigeni, ki se vežejo na antigenske receptorje, izzovejo endocitozo. To je signal, da limfocit B sproži sintezo receptorjev za IL-2. Če je v okolici dovolj velika koncentracija IL-2, ki ga izločajo aktivirane celice T pomagalk v neposredni bližini, se ta veže na receptorje na limfocitih B in povzroči njihovo razmnoževanje (klonska ekspanzija) ter diferenciacijo v spominske limfocite B. Brez IL-2 aktivacija limfocita B ni uspešna in taka celica navadno propade. Po aktivaciji z antigenom se limfocit začne naglo podvojevati (ekspanzija klona).

## **Predstavljanje antigenov pri cepljenju**

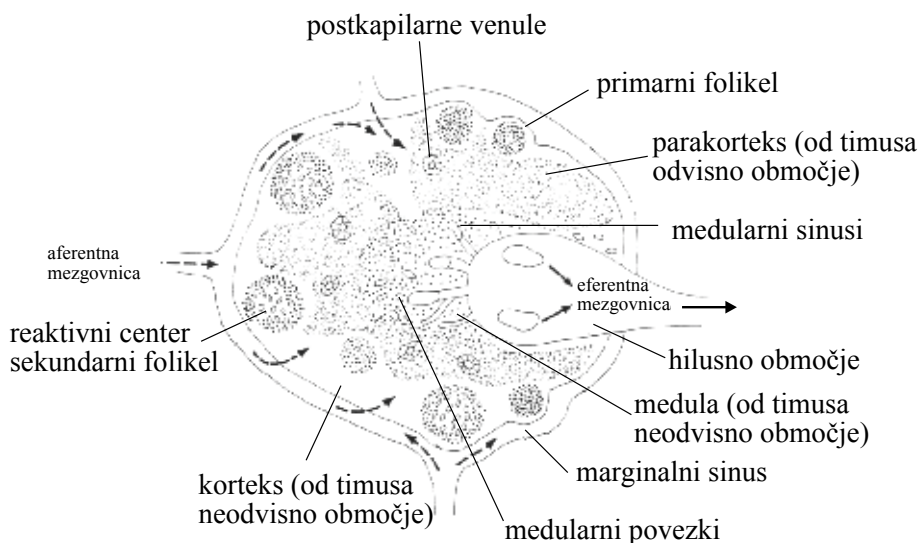
### *Intersticijske dendritične celice in predstavitev antigena limfocitom T*

Dendritične celice (DC) kot najbolj učinkovite APC imajo nekatere posebne lastnosti, ki bistveno vplivajo na učinkovitost cepiv. Delce in mikrobe lahko DC zajamejo s fagocitozo, z makropinocitozo lahko v obsežne pinocitozne vezikle zajamejo večjo količino zunajcelične tekočine, izražajo pa tudi receptorje za posredovanje adsorptivne endocitoze (manozni receptorji makrofagov, DEC-205 ter receptorje Fc $\gamma$  in Fc $\epsilon$ ). Z makropinocitozo in receptorsko uravnavanim zajemanjem antigene učinkovito zasledijo že v piko- in nanomolarnih koncentracijah (druge APC zasledijo antigene v mikromolarnih koncentracijah).

Slika 7: Imunske celice in tkiva



Slika 8: Shema bezgavke



Da bi se organizem lahko primerno odzval na antigene iz okolice, mora biti omogočen prenos antigena v lokalne bezgavke, kjer se začne imunski odziv, vezan na limfocite T. Prenos antigena v bezgavko lahko poteka po dveh poteh. Če je koncentracija antigena na periferiji velika, lahko antigen prek limfatičnega žilnega sistema dospe v bezgavke ali vranico. Koncentrira se v subkapsularnih sinusih in po aferentnih mezgovnicah prehaja v T-celična območja.

Alternativna pot antigena poteka tako, da nezrele DC na periferiji (Langerhansove celice v koži ter DC v drugih tkivih) zajamejo antigen in potujejo po dovodnih mezgovnicah v krajevne bezgavke. Človek ima približno  $10^9$  epidermalnih Langerhansovih celic, ki so povezane s keratinociti prek kadherina E. Ko zajamejo antigen, se odlepijo od keratinocitov in s stvarjenjem kolagenaz preidejo skozi bazalno membrano v mezgovnice ter po njih v bezgavke. Med zorenjem se zmanjša njihova sposobnost zajemanja antigenov, nastajati pa začne velika količina kompleksa peptidov MHC razreda II. V T-celičnem območju (parakorteks) bezgavke se nezrele DC s svojimi številnimi in dolgimi izrastki vrinejo med druge celice. Na tem mestu jih označujemo kot celice vrinjenke (interdigitating cells – IDC). Tu se njihova preobrazba konča. IDC stopijo v stik z limfociti T in jim predstavijo antigen. Zorenje DC je nadvse pomembno za začetek imunskega odziva in je odvisno od mikrobnih in vnetnih snovi. Zorenje stimulirajo signali za nevarnost PAMP<sup>1</sup> /angl. Pathogen associated molecular pattern/ (cele bakterije, LPS, virusna RNK in druge mikrobnne molekule) ter citokini IL-1, GM-CSF, medtem ko TNF- $\alpha$ , IL-10 zorenje preprečuje.

## **Folikularne dendritične celice - predstavitev antigena limfocitom B**

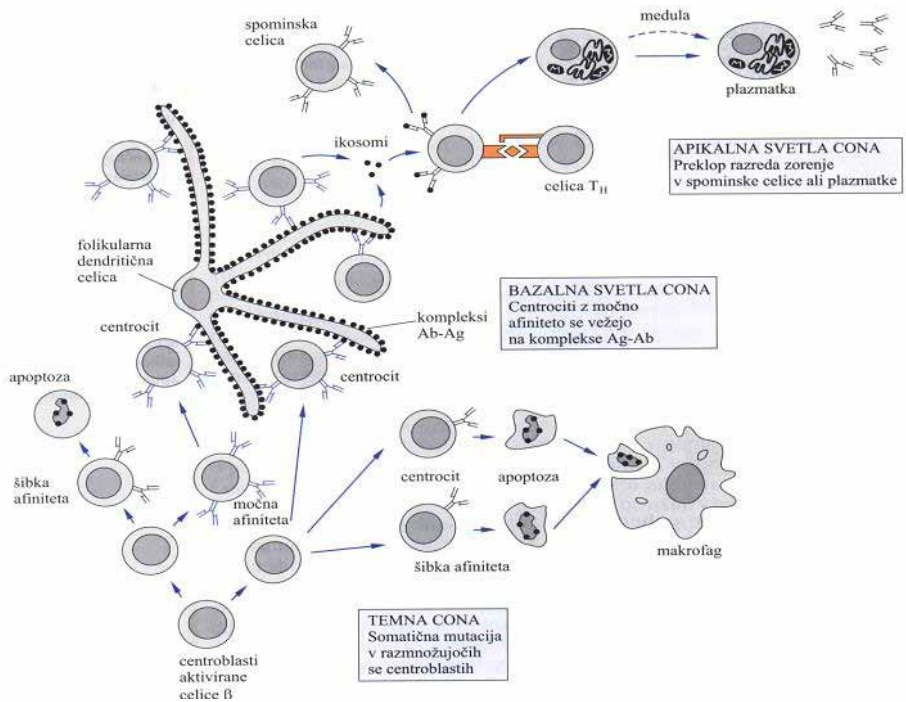
V germinativnem središču je približno 1 % celic folikularnih dendritičnih celic (FDC), ki izpolnjujejo stromo germinativnega središča. FDC so nefagocitne celice, ki so brez lizosomov. Celično jedro je iz dveh režnjev, z lepo izraženim jedrcem, citoplazma je malo. Imajo številne podaljšane citoplazemske izrastke, ki so pogosto prepleteni z izrastki drugih FDC. Dendritični izrastki so lahko nitaste oblike, zrelejši pa imajo bolj zrnato strukturo in so v stiku s številnimi limfociti v germinativnem središču sekundarnih foliklov. Na površini imajo izražene FcγRII (CD32), FcεRII (CD23) ter receptorje za komplement CR2 (CD21) in CRI (CD35). Ti receptorji jim omogočajo uspešno lovljenje imunskih kompleksov ter njihovo podaljšano zadrževanje na receptorskem mestu (mesece ali celo leta). Na ta način se imunski kompleksi antigen-protitelo predstavljajo na površini FDC. Poudariti velja, da FDC na tak način skladiščijo tudi patološko pomembne organizme in njihove razgrajene delce (retroviruse, streptokokne polisaharide skupine B, bakterijske toksine), ki služijo kot vir specifičnega antigenskega in poliklonalnega TLR-odvisnega dražljaja za vzdrževanje humoralne imunosti.

Po vezavi imunskih kompleksov v 1 do 3 dneh zrnata struktura z imunskimi kompleksi obloženega celičnega podaljška zgradba razpade. Nastanejo delci, prekriti z imunskimi kompleksi – ikosomi. V germinativnih središčih ikosome specifično (s membranskimi Ig) vežejo limfociti B. Če limfocitu B uspe vezati antigen, ki ga ponuja FDC (antigeni so vezani na Ig, ki so predhodno nastali v fazi ektrafolikularnega odziva), lahko limfocit B internalizira antigen v svojo notrajnost in ga nato predstavi v molekulah MHC 2 folikularnim limfocitom Th.

Številni limfociti B germinativnih središč, če nimajo primerne medsebojne reakcije z antigenom, po procesu mitoze aktivirajo apoptozo, ki ji sledi propad celice. Kadar celica B primerno reagira z antigenom, se na njeni površini izrazi nov Ig in postane odvisna od interakcij s omrežjem FDC. Interakcija ji omogoča prekinitvev obstoječega endonukleaznega programa, ki v nasprotnem primeru vodi v apoptozo.



Slika 9: Shema folikularnega predstavljanja antigenov



### Klonska ekspanzija limfocitov B in tvorjenje protiteles

Del limfocitov se takoj diferencira v plazmablaste, ki izločajo protitelesa IgM. Običajno se sinteza od IgM preklopi na sintezo IgG, IgA ali IgE, kar je odvisno od kombinacije citokinov, ki oblivajo celico. Proces imenujemo izotipski preklop, ki se kaže tako, da v začetku okužbe prevladuje sinteza specifičnih protiteles IgM, pozneje pa specifičnih protiteles IgG (v serumu) ali IgA (na sluznicah). S trajanjem okužbe opazujemo tudi povečevanje povprečne afinitete specifičnih protiteles za antigen (avidnost). Vzrok za to je somatična hipermutacija imunoglobulinskih vezišč, ki se dogaja v foliklih bezgavk. Tam aktivirani limfociti B intenzivno mutirajo gene svojih antigenskih vezišč, zato nastajajo nove veziščne različice. Mutirane limfocite B (prepoznamo jih kot limfocite B, ki imajo antigen CD5) nadzorujejo folikularne dendritične celice, ki imajo adherirane antigene na svojih površinah in z njimi preverjajo afiniteto novonastalih antigenskih vezišč limfocitov B. Za tipični sekundarni (anamnestični) imunski odziv, ki sledi ponovnemu stiku z antigenom po daljšem času, je zaradi opisanih mehanizmov značilen hiter (v nekaj dneh) in močan protitelesni odziv. V serumu prevladuje tvorba protiteles IgG, medtem ko je avidnost protiteles za antigen mnogo večja kot pri prvem (primarnem) protitelesnem odzivu.

## ***Kako narava antigena ali priprava cepiva določa imunski odziv***

Za pripravo uspešnega cepiva je treba izbrati antigenske molekule, proti katerim med okužbo nastajajo najbolj učinkovita nevtralizacijska protitelesa. Poleg antigenske molekule je nujen del cepilnega pripravka tudi snov – adjuvans, ki na mestu cepljenja sproži vnetje. Gre za signal za nevarnost, ki sproži aktivacijo makrofagov ali dendritičnih celic ali obojih. Zgodovinsko je najbolj znan Freundov adjuvans, ki je vseboval kar prekuhan pripravek mikobakterij. Bil je zelo učinkovit za imunizacijo poskusnih živali, vendar je povzročal močne lokalne vnetne reakcije (s celicami T posredovana alergijska reakcija oz. – po stari nomenklaturi - preobčutljivost tipa 4) in predvsem aktivacijo imunskega odziva tipa Th1, to je nastanek celičnega imunskega odziva. Ker so humana cepiva namenjena predvsem vzpostavitvi protitelesnega odziva, so se kot adjuvansi močno uveljavili kovinski oksidi, zlasti aluminijev oksid (alum). Alum aktivira makrofage tako, da organizirajo predvsem imunski odziv tipa Th2, kar sproži nastanek protiteles. Poleg tega delci alumina omogočijo tudi adherenco in zadrževanje antigenov na mestu cepljenja, zato lahko lokalni makrofagi fagocitirajo dovolj antigena tudi ob njegovi manjši količini. Adjuvans z vplivanjem na aktivacijo makrofagov določa tudi količino (titer) protitelesnega odziva, njegovo dinamiko (hitrost pojavljanja in trajanje zaščitnega titra) in razred nastalih protiteles (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA).

## ***Imunski odziv pri živih in mrtvih cepivih***

Živa cepiva, pretežno virusna, vsebujejo mikrobo, ki se lahko razmnožujejo, vendar imajo inaktivirane ali odstranjene patogene gene. Ker gre za žive mikrobo, vsebujejo poleg antigenskih molekul tudi take molekule, ki se vežejo na makrofagne receptorje PRR (na primer virusna RNK). Zlasti cepljenje z živimi virusi izredno učinkovito aktivira imunski odziv. Injiciranju namreč sledi razsoj virusa po krvi, ki je podoben drugi fazi naravne virusne okužbe, ko virus po razmnoževanju na mestu okužbe (v sluznici) vdre v kri. Z raznosom cepljenega živega virusa po telesu pride ta v stik z makrofagi in dendritičnimi celicami, ki prepoznajo virusne delce z receptorji PRR. Ker se to zgodi hkrati v številnih predelih organizma, je imunski odziv na živo virusno cepivo zelo močan, zato so tudi koncentracije zaščitnih protiteles IgG navadno dovolj velike, da transudirajo iz krvi tudi v sluz (prebavil, dihal) in preprečujejo naselitev patogena (sterilizacijska imunost). Zaradi razsoja živega virusnega cepiva po organizmu tudi mesto vbizganja cepiva ni zelo pomembno – intramuskularno cepljenje je enako učinkovito kot podkožno.

Mrtva cepiva v nasprotju z živimi ostanejo na mestu vbizganja, a razmeroma kratek čas. Zato je mesto vnosa cepiva važno za njegove učinke. Ker je v koži zelo veliko dendritičnih celic, je pri intradermalnem cepljenju za aktivacijo imunskega odziva potrebno manj antigena (tudi do 10-krat manj) kot pri podkožnem. Slabost intradermalnega cepljenja je, da kožne dendritične celice vzbudijo predvsem celični (Th1) imunski odziv, manj pa nastanek protiteles (Th2 odziv). Dendritičnih celic je razmeroma veliko tudi v mišicah, pri čemer

njihovo usmerjanje imunskega odziva ni vnaprej določeno v smeri citotoksične (Th1) imunosti. Ker je z ustreznim adjuvansom (alumom) imunski odziv pri intramuskularnem cepljenju mogoče zanesljivo usmeriti v nastajanje protiteles, uporabljamo pri večini mrtvih cepiv cepljenje v mišico. V maščevju je dendritičnih celic malo, zato pri slabo imunogenih cepivih ni priporočljiva podkožno dajanje, oziroma je pri manj odzivnih ljudeh priporočljivo s podkožnega vnosa preiti na mišično (kar velja na primer za cepljenje proti hepatitisu B pri dializnih bolnikih ali neodzivnih na cepljenje).

Mrtva cepiva izzovejo nastanek dovolj velikih koncentracij protiteles v krvi in medceličnih prostorih, ki preprečijo širitev mikrobov po organizmu in da klinična bolezen praviloma ne nastane. Pač pa mrtvim cepivom v nasprotju z živimi navadno ne uspe izzvati tako velike koncentracije protiteles, da bi nastale tudi zaščitne koncentracije IgG v sluzi in preprečile kolonizacijo sluznice s patogeni. V tem primeru je cepljenec lahko prenašalec okužbe (vektor), čeprav sam ne zbolí. Seveda je kljub temu mnogo šibkejši prenašalec, kot bi bil v primeru sistemske okužbe in bolezní.

Današnja cepiva omogočajo zaščito zaradi nastanka dovolj velike koncentracije zaščitnih protiteles IgG v krvi. Protitelesa v krvi je namreč mogoče razmeroma enostavno izmeriti, zato so te meritve poglaviti parameter pri razvoju cepiv in dokazovanju učinkovitosti cepiv. Učinke celične imunosti je zaradi heterogenosti molekul MHC v populaciji zelo težko standardizirano meriti, zato proizvajalci cepiv praviloma ne navajajo testov celične imunosti v dokumentaciji za pridobitev registracije. Celic, ki omogočajo celično (citotoksično) imunost, tudi ni mogoče prenašati s človeka na drugega človeka (transplantacijska reakcija!). Mogoče pa je prenašati zaščitna protitelesa, ki po cepljenju nastanejo v enem organizmu, tako da jih enostavno pridobimo z odvzemom krvi in uporabimo za zaščito drugega organizma (pasivno cepljenje). Pri skoraj vseh današnjih cepivih je na tak način mogoče zaščititi pred boleznijo organizem, ki prej še ni bil cepljen. To je hkrati tudi dokaz, da cepivo deluje zaradi spodbuditve nastanka zaščitnih protiteles v krvi. Med današnjimi cepivi je edina izjema cepivo proti tuberkulozi (TBC), ker prenos protiteles v drug, necepljen organizem, ne zaščiti pred boleznijo v podobni meri kot aktivna imunizacija. To je dokaz, da pri zaščiti proti tuberkulozi nimajo glavne vloge protitelesa, pač pa citotoksični imunski odziv (limfociti T). Res pa je, da je tudi pri večini drugih cepiv zaščita pred okužbo večja in zlasti dolgotrajnejša ob aktivni imunizaciji (ko se razvije tudi odziv limfocitov T) kot pa ob zgolj pasivnem vnosu protiteles. To tudi pojasnjuje nekatere primere dolgotrajne zaščite po cepljenju, ki traja kljub izginotju protiteles, na primer proti oslovskemu kašlju, ki jo verjetno omogočajo limfociti T. Tudi cepljenje pol leta starih dojenčkov proti ošpicam pogosto ne vzbudi nastanka protiteles – razlog je lahko nezrelost imunskega sistema ali inaktivacija cepilnih antigenov z materinimi protiteles, ki jih pred rojstvom dobi prek placente. Vendar kljub temu cepljeni dojenčki ne obolijo za hujšimi oblikami ošpic – verjetno zaradi nastanka spominskih limfocitov T.

Med zanimivimi mesti za vnos mrtvih cepiv, ki bi močno olajšala logistiko cepljenja, je zlasti možnost dajanja mrtvih cepiv prek sluznic. Na žalost imajo sluznice veliko mehanizmov, ki preprečujejo imunogenost – od intenzivnega razgrajevanja in čiščenja antigenov, do

usmerjanja imunskega odziva v tolerančni odziv. Zato je sluzničnim cepivom potrebno dodajati veliko adjuvansov, kar pa lahko pomeni tudi več stranskih učinkov cepljenja (kot je na primer paraliza facialisa po sluzničnem cepljenju proti gripi).

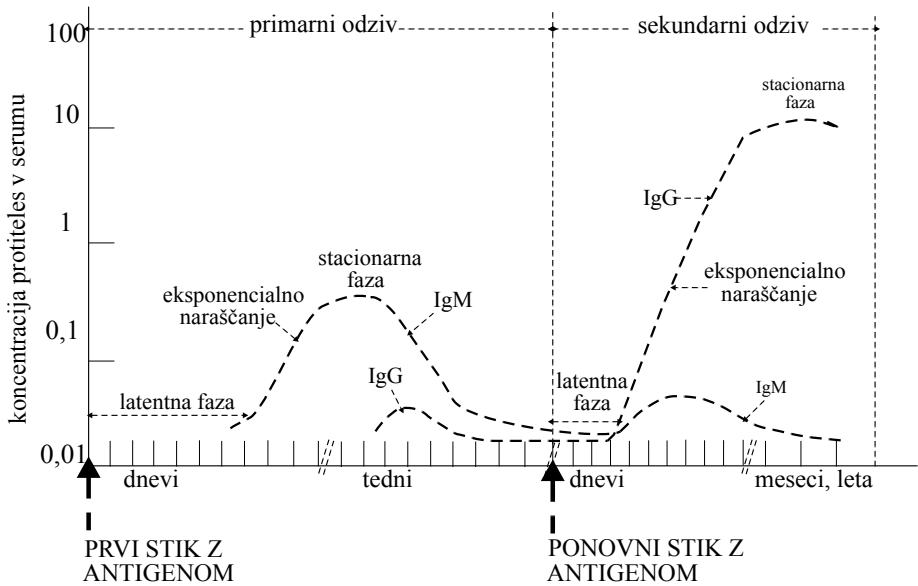
Za lažjo logistiko cepljenja in manj stranskih učinkov (zlasti alergijskih reakcij, ki se pogosteje pojavljajo po večkratnih uporabah enake snovi v cepilnem pripravku (na primer enakega adjuvansa), je zanimiva možnost tudi hkratna aplikacija več cepiv. Zlasti pri mrtvih cepivih se pojavlja interferenca med cepivi in problem, ker mrtva cepiva z mesta cepljenja 'odnesejo' makrofagi in dendritične celice v lokalne bezgavke. Posledica je, da se odziv ne prenese v istovrstne bezgavke druge polovice telesa, zato hkratno dajanje več mrtvih cepiv na različna mesta (na primer v levo in desno ramo) zanesljivo ne interferira. Vsako mrtvo cepiva navadno potrebuje svojo formulacijo adjuvansov, katerih namen je lokalno zadrževanje antigenov cepiva (adsorpcija) in aktivacija makrofagov in dendritičnih celic (prek receptorjev PRR) ter njihova ustrezno usmeritev v zaželeno vrsto imunskega odziva.

### ***Nastanek protitelesnega odziva po cepljenju***

Dendritične celice v tkivu po aktivaciji svojih receptorjev PRR z adjuvansom fagocitirajo delce cepiva, ki jih znotrajcelično razgrajujejo, nato pa kot peptidne antigene vgrajujejo v molekule MHC 2. Hkrati dendritične celice prenehajo tvoriti kemokinske in adhezijske receptorje za tkivo, v katerem se nahajajo; ter se preusmerijo v izgradnjo ustreznih receptorjev za limfatična tkiva. Zato se premaknejo iz tkiva v limfne žile in nato v lokalne bezgavke (na primer pod pazdušo pri cepljenju v deltoidno mišico in ingvinalne bezgavke po cepljenju v kvadriiceps).

Potek odzivanja na antigen v bezgavki je nato odvisen od narave antigena. Proteinski antigeni aktivirajo limfocite Th (v kompleksu z molekulami MHC 2 dendritičnih celic) in limfocite B. Posledica je nastanek zelo organiziranega imunskega odziva, ki se oblikuje v posebnih strukturah bezgavke – v germinalnih centrih. Pri tem nastanejo dolgoživeči spominski limfociti T in B, posledica je dolgotrajen protitelesni odziv, ki sčasoma tudi dozoreva v smislu povečevanja povprečne afinitete protiteles (to je avidnosti) za antigen. Polisaharidni antigeni lahko sicer aktivirajo limfocite B (zaradi ponavljajočih se epitopov na antigeni molekuli), ne morejo pa aktivirati limfocitov T, ki se odzivajo samo na peptidne antigene, predstavljenje v MHC 2. Zato polisaharidni antigeni izzovejo šibkejši protitelesni odziv, ki je razmeroma kratkotrajen. To slabost je mogoče popraviti s polisaharidnim antigenom, na katerega se veže še peptidni antigen (glikokonjugirana cepiva). V tem primeru nastane tudi aktivacija imfocitov T in spominski imunski odziv.

Slika 10: Primarni in sekundarni protitelesni odziv



### Protitelesni odziv na proteinske antigene

Naivni limfociti B imajo antigeni receptor IgM. Ko se med kroženjem po telesu na njihov IgM veže ustrezen antigen, izpostavijo naivni limfociti B kemokinski receptor CCR7, ki jih privede v območje limfocitov T sekundarnih limfatičnih organov. Tam se limfociti B srečajo z nedavno aktiviranimi (v manj kot 24 urah) dendritičnimi celicami in celicami T pomagalkami. Ob nadaljnji navzočnosti antigena se ob pomoči limfocitov T hitro zgodi diferenciacija limfocitov B v plazmatke, ki tvorijo nizkoafinitetna protitelesa. Ta proces imenujemo zunajfolikularni protitelesni odziv, katerega poglavitna protitelesa so IgM, spremlja jih tudi nekaj protiteles IgG1. Protitelesa se pojavijo že v nekaj dneh od imunizacije (1-3), vendar zaradi apoptoze plazmatk, ki tudi živijo le nekaj dni, se raven protiteles hitro zniža. Zato protitelesa zunajfolikularnega odziva verjetno nimajo velikega pomena pri učinkovanju cepiva na potek okužbe.

Vendar dovolj velika aktivacija limfocitov Th pri zunajfolikularnem odzivu proizvede dovolj citokinov, da nekateri z antigenom aktivirani limfociti B razvijejo kemokinski receptor CXCD5 in migrirajo v folikle, kamor jih s kemokini privabijo folikularne dendritične celice (FDC). FDC so zmožne dolgotrajno zadržati antigenske molekule in so bistvene za nastanek spominskega protitelesnega odziva, za preklapljanje protiteles v razrede IgG, IgA in IgE ter za afinitetno dozorevanje protiteles. Limfociti B, ki se aktivirajo na FDC, postanejo germinalne celice in preidejo v masivno klonsko razmnoževanje. Hkrati z razmnoževanjem poteka tudi preklap

med imunoglobulinskimi razredi in afinitetno zorenje limfocitov B. To omogoči razmnoževanje tistih klonov limfocitov B, ki imajo večjo afiniteto za antigen (pozitivna selekcija), medtem ko kloni z manjšo afiniteto za antigen propadejo.

Afinitetno zorenje v foliklih je še pospešeno zaradi pojava somatske hipermutacije. Med klonskim razmnoževanjem namreč limfociti B intenzivno mutirajo gene za variabilno regijo antigeneskega vezišča. Zato nastanejo limfociti B, ki se razlikujejo po obliki vezišča za antigen. Večina nastalih mutiranih limfocitov B ima po mutaciji manjšo afiniteto za antigen, zato v kompeticiji za vezavo na antigen (ki je vezan na membrano FDC) niso uspešni in propadejo. Nekaterim limfocitom B pa mutacija omogoči povečanje afinitete za antigen, zato se uspešneje vežejo na membrano FDC in se še naprej razmnožujejo. Na ta način nastajajo kloni limfocitov B, ki imajo v povprečju vedno večjo afiniteto svojih receptorjev (Ig) za antigen.

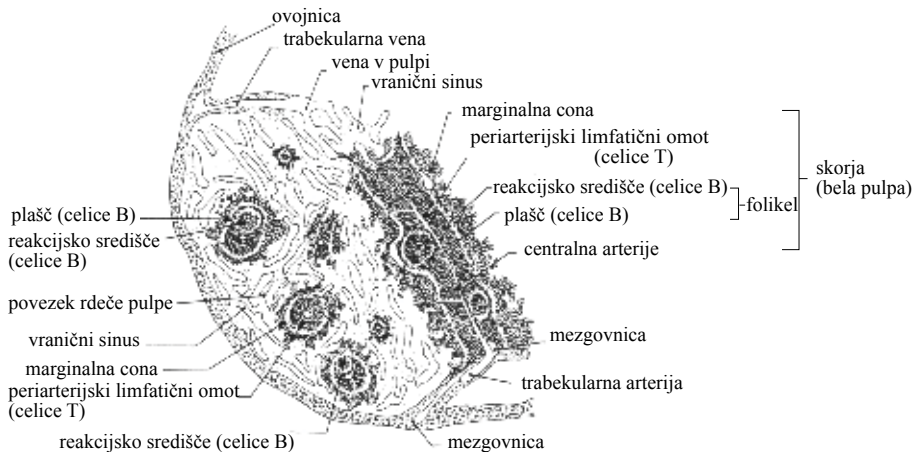
Če limfocitu B uspe vezati se na antigen, ki ga ponuja FDC (antigeni so vezani na Ig, ki so predhodno nastali v fazi ekstrafolikularnega odziva in so se kot imunski kompleksi vezali na receptorje Fc folikularnih dendritičnih celic), lahko antigen limfocit B internalizira v svojo notrajnost in ga nato predstavi v molekulah MHC 2 folikularnim limfocitom Th. Folikularni limfociti Th, ki so tudi migrirali v folikel po zunajfolikularni aktivaciji, omogočajo limfocitom B razmnoževanje, preživetje in imunoglobulinsko preklapljanje z molekulami CD40L, ICOS, IL-10 in IL-21. Razvoj folikularnega odziva traja nekaj tednov, prvi IgG se po uspešno prestani hipermutaciji, selekciji in dozorevanju pojavijo 10 do 14 dni po stiku z antigenom. Folikularni odziv se konča v 3 do 6 tednih, nato folikel propade; v tem času po prvi imunizaciji nastane tudi največja koncentracija specifičnih protiteles IgG.

### ***Protitelesni odziv na polisaharidne antigene***

Bakterijski polisaharidni antigeni (*S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *S. typhi*) po cepljenju difundirajo v kri in se vežejo na makrofagne receptorje čistilce (scavenger) v marginalni coni vranice ali bezgavk. Aktivacija makrofagov omogoči tudi aktivacijo specifičnih limfocitov B v marginalni coni, ki se v tednu dni diferencirajo v plazmatke in tvorijo nizkoafinitetna protitelesa IgM in IgG. Protitelesa IgG čez čas povečajo afiniteto, vendar mnogo manj kot protitelesa proti proteinskim antigenom, kjer protitelesni odziv dozoreva v germinalnih centrih foliklov. Pridobivanje afinitete po cepljenju s polisaharidnimi antigeni verjetno nastane zaradi recirkulacije spominskih limfocitov B (IgM+, IgD+, CD27+) v kri in v marginalno cono vranice, kjer poteka določena stopnja hipermutacije in selekcije spominskih limfocitov B. Verjetno je to tudi vzrok, da so polisaharidna cepiva slabo imunogena pri otrocih, ki imajo še nerazvito vranično marginalno cono (in tudi pri splenektomiziranih ljudeh). Po svojem nastanku se plazmatke preselijo iz marginalne cone v rdečo pulpo vranice in v nekaj tednih odmrejo. Temu ustrezno po nekaj mesecih ugasne protitelesni odziv. Ker odziv ne poteka v germinalnih centrih, ne nastane spominski odziv, zato ponovno cepljenje z enakim

polisaharidnim antigenom povzroči ponoven primarni odziv – z enako kinetiko pojavljanja protiteles. V nekaterih primerih (na primer pri N. meningitidis) pa ponovno cepljenje z enakim polisaharidom povzroči celo manjši odziv kot prvič, mehanizem tega fenomena pa ni jasen.

Slika 11: Shema vranice



### Dejavniki imunogenosti primarnega protitelesnega odziva

Najpomembnejši dejavnik je narava antigena, pri čemer vseh mehanizmov razlik ne poznamo. Tetanusni antigen je na primer mnogo bolj imunogen kot davični, kar postane praktično pomembno zlasti pri ljudeh s slabšo imunostjo, na primer pri nedonošcih. Oba antigena sta proteina, zato razlike mogoče nastanejo zaradi različne odzivnosti folikularnih dendritičnih celic ali limfocitov T ali obeh. Razlike med proteinskimi in polisaharidnimi antigeni pa so razumljivejše. Polisaharidi lahko zaradi multivalentnih epitopov neposredno aktivirajo limfocite B, kar omogoča odzivnost brez sodelovanja limfocitov T, na primer tudi pri imunskih primanjkljajih. Zaradi zunajfolikularne aktivacije pa nastane šibak afinitetni in kratkotrajni protitelesni odziv, brez oblikovanja spominskega odziva. Proteinski antigeni povzročijo folikularno dozorevanje protitelesnega odziva, zato nastanejo večje koncentracije visokoafinitetnih protiteles, spominske celice pa omogočajo močan spominski odziv ob ponovni imunizaciji ali okužbi. Priprava polisaharidnih antigenov, vezanih na proteinske antigene (konjugirana polisaharidna cepiva) omogoča folikularni nastanek celic T pomagalk proti antigenu in s tem tudi nastanek spominskega imunskega odziva.

Izbira optimalnega odmerka antigena je pomembna zlasti pri mrtvih cepivih. Večji odmerek praviloma izzove večji odziv, kar je zlasti pomembno pri cepljenju imunokompromitiranih

ljudi, na primer dializnih bolnikov pri cepljenju proti hepatitisu B. Po drugi strani manjši odmerek proteinskega cepiva poveča tekmovalnost in selekcijo med kloni pri folikularnem dozorevanju protiteles, posledica je nastanek bolj afinitetnih in odzivnih klonov (to je bolj imunogenih) pri manjših odmerkih cepiva. Tudi posamezni adjuvansi različno vplivajo na dozorevanje protiteles, zaenkrat pa o tem še ni dovolj sistematiziranega znanja, da bi to omogočilo jasna napotila pri načrtovanju cepiv. Med adjuvansi še vedno ohranjajo trdno pozicijo aluminijeve soli, ker spodbujajo nastanek protitelesnega odziva; po eni strani zaradi absorpcije antigena in njegove koncentracije na mestu cepljenja, po drugi strani pa aluminij vpliva na makrofage v smislu spodbujanja Th2-immunskega odziva.

Mrtva cepiva je treba praviloma dajati večkrat, da bi dosegla zaščitne ravni protiteles. Folikularno dozorevanje protiteles traja 3 do 6 tednov, zato mora biti med ponovitvami primarnega cepljenja vsaj 4 tedne premora, da propadejo folikli, nastali po prejšnjem odmerku cepiva. Le tako je mogoče doseči popolne naslednje folikularne cikle protitelesnega odziva in s tem maksimalno razmnoževanje limfocitov B in maksimalne koncentracije zaščitnih protiteles. Nato afinitetno dozorevanje protitelesnega odziva traja nekaj mesecev, zato je potrebno izvajati revakcinacijo (booster) vsaj po preteku 4 mesecev od primarnega cepljenja, če želimo s cepivom spodbuditi nastanek dolgotrajnega, učinkovitega afinitetnega in zaščitnega protitelesnega odziva. V vsakem primeru pa imajo mrtva cepiva omejen čas učinkovanja.

### **Spominski protitelesni odziv**

Spominski protitelesni odziv se oblikuje v germinalnih centrih pod vplivom limfocitov Th. Po treh tednih odziv germinalnega centra ugasne, spominski limfociti B pa migrirajo v kri in se nato zadržujejo v zunajfolikularnih območjih vranice in bezgavk. V nekaj mesecih se tudi koncentracija protiteles v krvi običajno zmanjša pod zaščitno. Spominski limfociti B imajo zaradi afinitetnega dozorevanja in selekcije visokoafinitetna protitelesa, zato se ob ponovni navzočnosti antigena aktivirajo hitreje kot naivni limfociti B, za aktivacijo pa ne potrebujejo limfocitov T. V 4 do 7 dneh po stiku z antigenom se spominski limfociti B že diferencirajo v plazmatke in ustvarijo visoko zaščitno raven visokoafinitetnih protiteles. Velikost ravni protiteles pri spominskem odzivu je navadno sorazmerna ravni primarnega odziva. To pomeni, da soljudje, ki so se na cepivo nadpovprečno odzvali pri primarnem cepljenju, ustvarili nadpovprečno število spominskih celic, zato ob ponovnem stiku z antigenom sledi nadpovprečen sekundarni odziv. Po drugi strani ponovno cepljenje (booster) po preteku manj kot 4 mesecev od primarnega cepljenja lahko zmoti proces afinitetnega dozorevanja, posledica pa je manj specifičen, manj afiniteten in manj učinkovit odziv v primeru okužbe.

Spominske celice B se po cepljenju ohranijo desetletja in ustvarijo hiter protitelesni odziv tudi, kadar v krvi ne moremo več izmeriti specifičnih protiteles. Zato so redne revakcinacije v okoliščinah, ko človek ni izrazito ogrožen, največkrat nepotrebne (na primer proti tetanusu). Po okužbi so spominske celice B zmožne v 4 do 7 dneh ustvariti veliko količino zaščitnih



protiteles, čeprav jih v serumu ob okužbi ni več. Od narave okužbe ali bolezni pa je odvisno, ali je spominski odziv dovolj hiter za njuno preprečitev. Spominski odziv pri cepljenem človeku brez davičnih serumskih protiteles, na primer, ni dovolj hiter, da bi lahko preprečil simptome davice, ki se razvijejo v 1 do 4 dneh po okužbi. Zato je za preventivo davice treba imeti zaščitno raven protiteles. Če protiteles pri cepljenam človeku ni, jih je mogoče z enim samim odmerkom cepiva izzvati v enem tednu. Podobno velja tudi za cepljenje otrok proti hemofilusu influence – obstoj spominskih limfocitov B brez zaščitnega titra protiteles ne zaščiti pred boleznijo. Tudi spominski limfociti brez zaščitne ravni protiteles ne zaščitijo proti akutni okužbi s hepatitisom B. Kljub temu pri polno cepljenih ljudeh ne nastane kronična jetrna bolezen ne glede na raven protiteles. Tudi tu so verjetno odločilni spominski limfociti B, mogoče tudi T. Po drugi strani pa ustrezno cepljeni ljudje ne zbolijo za tetanusom ne glede na raven protiteles, ki jo imajo v krvi.

Pri glikokonjugiranih cepivih se zaradi slabše zmožnosti sprožanja spominskega odziva posebej kaže pomen ustreznega časa cepljenja in revakcinacije. Prezgodnje cepljenje (na primer otrok pred enim letom) lahko zaradi nezrelosti imunskega sistema znatno zmanjša proces folikularnega zorenja in tvorjenja spominskih limfocitov. Po drugi strani je bolje revakcinirati že v enem letu po osnovnem cepljenju kot pozneje, ker imunski spomin pri teh cepivih ni tako trdno vzpostavljen, zato lahko pozna revakcinacija (na primer po 3 letih) ne deluje več kot pozitivno ampak kot ponovno primarno cepljenje.

Cepljenje z živimi cepivi (proti rdečkam, ošpicam, noricam, mumpsu) ustvari zelo dolgotrajno spominsko imunost, vseeno pa koncentracija protiteles z leti upade. Kaj to pomeni za morebitno zaščito pred ponovno okužbo, je treba pri vsaki posamični okužbi ali bolezni opredeliti s pomočjo eksperimentalnih podatkov.

### *Cepljenje in oblikovanje celičnega imunskega odziva*

Današnja cepiva, z izjemo cepiva proti TBC, so razvita in registrirana kot učinkovine, ki povzročijo nastanek zaščitne koncentracije protiteles. Nastanek specifičnih protiteles je mogoče enostavno meriti v vzorcih krvi, zato velje te meritve kot temeljna dokazila o učinkovitosti cepilnih pripravkov. Drugi temeljni dokaz je epidemiološki – v prospektivni študiji mora cepljena skupina ljudi v primerjavi s primerljivo izpostavljeno necepljeno skupino pokazati pomembno manjšo zboleznost za boleznijo, proti kateri cepimo.

Odziv na cepilni pripravek iz proteinskih antigenov v vsakem primeru pomeni tudi aktivacijo makrofagov, dendritičnih celic in celic T pomagalik (CD4) v ekstrasfolikularni fazi imunskega odziva. Celice T pomagalke se ob aktivaciji na dendritičnih celicah razmnožijo v spominske celice Th, ki jih prepoznavamo s protitelesi CD45RO. Migracija spominskih Th v folikel (folikularne Th) omogoči tudi razmnoževanje folikularnih spominskih limfocitov B (prepoznamo jih s CD27) in s tem nastanek spominskega protitelesnega imunskega odziva.

Vendar dendritične celice, ki so v zunajfolikularna področja bezgavk prinesle cepilne antigene iz perifernih tkiv, ne predstavljajo peptidnih antigenov le celicam Th (prek molekul MHC II), pač pa prek molekul MHC I predstavljajo peptidne antigene tudi naivnim citotoksičnim limfocitom (Tc). Citotoksični limfociti, ki prepoznajo peptidni antigen v kompleksu z MHC I na dendritičnih celicah, se aktivirajo (izrazijo CD25 – receptor za interlevkin 2) in se v primeru dovolj velike koncentracije interlevkina 2 v zunajfolikularnem prostoru bezgavke začnejo deliti in razmnoževati v spominske Tc (CD8+ CD45RO+). Razmnoženi spominski Tc se nato sprostijo iz bezgavke in krožijo po organizmu. Če na celicah, ki jih pregledujejo, naletijo na MHC I z antigenskim peptidom, ki ustreza njihovi specifičnosti, tako celico nato s svojim citotoksičnim mehanizmom ubijejo.

Čeprav vsa proteinska cepiva brez dvoma vzbudijo nastanek spominskih celic T pomagalk (CD4), številna pa tudi aktivacijo spominskih citotoksičnih limfocitov T (CD8), je merjenje nastanka spominskih limfocitov T tehnično mnogo bolj zahtevno kot je merjenje specifičnih protiteles v krvi. Za meritev je potrebno iz krvi izolirati limfocite, nato »in vitro« v inkubatorju stimulirati limfocite z ustreznimi antigeni (s specifičnimi peptidi ali z mikrobnimi pripravki), na koncu pa izmeriti produkcijo posameznih citokinov (za dokaz spominskih celic T pomagalk) ali citotoksično reakcijo na okužene celice (za dokaz spominskih celic CD8). Tovrstno dokazovanje spominskih celic T se danes uporablja predvsem v kliničnih primerih hujših kroničnih virusnih okužb (npr. okužbe z EBV, CMV ali HBV pri imunodeficitnih bolnikih), ker je ustavitev takih okužb neposredno odvisna od koncentracije spominskih limfocitov T v krvi. Razvijanje cepiv, ki bi optimizirala nastajanje spominskih limfocitov T v krvi, pa zaenkrat še ni dalo končne rezultata – ustrezno registrirano »celično« cepivo.

Med spominskimi limfociti T sicer ločimo »centralne spominske limfocite T« (Tcm - CD28+CD27+), ki krožijo med bezgavkami in vranico, kjer se ob stiku z antigenom lahko zelo hitro namnožijo. Citotoksična zmožnost Tcm pa je majhna. Po drugi strani pa imajo zelo veliko citotoksično zmožnost celice Tem (efektorske spominske celice T - CD28-CD27-, ki se pomikajo skozi različna tkiva in preiskujejo navzočnost tujih peptidov v molekulah MHC I. Kadar antigen hitro izgine iz telesa, ostanejo specifični Tcm v limfatičnih tkivih. Ob persistenci antigena pa se zelo razmnožijo Tem, od katerih je nato odvisna zmožnost obvladovanja okužbe. Zato je »in vitro« razmnoževanje specifičnih Tem ena od obetavnih strategij za pripravo celičnih cepiv proti kroničnim okužbam, ki se pojavljajo pri imunodeficitnih bolnikih (npr. kronične okužbe s CMV, EBV).

## **Učinki imunskega odziva na okužbe**

Med bakterijsko okužbo se zbudijo vse vrste obrambnega odziva: fagocitni, protitelesni in citotoksični. Posamezne vrste patogenih bakterij se medsebojno razlikujejo po načinu povzročanja bolezni. Zato so tudi posamezne vrste imunskega odziva različno učinkovite proti različnim bakterijskim okužbam. Proti bakterijskim boleznim, ki jih povzročajo predvsem bakterijski toksini

(na primer davico, oslovski kašelj, tetanus), so zlasti učinkovita protitelesa, ki nevtralizirajo toksine. Proti bakterijam, ki parazitirajo zunaj gostiteljevih celic, so učinkovita protitelesa in fagocitne celice. Proti znotrajceličnim bakterijam pa so učinkovitejši citotoksični limfociti T in celice NK.

Bolezni pojavi pri nekaterih bakterijskih okužbah so pretežno posledica delovanja bakterijskih toksinov. Čeprav je pri tetanusu (povzročitelj: *Clostridium tetani*) komaj opazna neposredna lokalna okvara tkiva zaradi bakterijske okužbe rane, kljub temu sproščeni tetanusni toksin povzroči bolnikovo smrt. Pri botulizmu (povzročitelj: *Clostridium botulinum*) ustvarijo bakterije toksin zunaj človeškega telesa (na primer v pokvarjenih konzervah), zato bolezen ne nastane zaradi okužbe, ampak zaradi uživanja hrane, ki vsebuje toksin (intoksikacija). Bolezenski znaki škrlatinke nastanejo zaradi okužbe tonzil (angina) s sevi streptokokov, ki izdelujejo eritrogeni toksin. Tudi bolezenske težave pri davici (povzročitelj: *Corynebacterium diphtheriae*) in pri oslovskem kašlju (povzročiteljica: *Bordetella pertussis*) nastanejo bolj zaradi delovanja toksinov kot zaradi lokalnih učinkov bakterijske kolonizacije tkiv. Protitelesa se specifično vežejo na toksine, inaktivirajo njihovo toksično delovanje in tako preprečijo bolezenske pojave, ki so posledica delovanja toksinov. Ker protitelesa nastanejo razmeroma pozno po prvi okužbi, do takrat toksini zastrupljajo organizem. Nastanek ustreznih varstvenih protiteles lahko tudi izzovemo s preventivnim cepljenjem (aktivna imunizacija), s katerim preprečimo bolezen. Necepljene bolnike lahko zdravimo tudi s pripravki ustreznih protiteles (pasivna imunizacija). Prednost pasivne imunizacije je takojšnje učinkovanje, medtem ko po aktivni imunizaciji nastane zaščita šele v nekaj tednih.

Zunajcelične bakterije se razmnožujejo in parazitirajo zunaj celic: v krvi, limfi, medceličnini ter na epiteliju telesnih poti (dihalne, sečne, prebavne) in votlin (plevra, osrčnik, peritonej, sklepi). To so po Gramu pozitivni piogeni koki (stafilokoki, pnevmokoki), po Gramu negativni koki (meningokoki, gonokoki), mnogi po Gramu negativni bacili (zlasti enterobakterije) in nekateri po Gramu pozitivni bacili (klostridiji). Zaradi zunajceličnega življenja so mikrobi močno izpostavljeni nespecifični naravni odpornosti (fagocitoza) in specifičnim (protitelesa, citotoksični limfociti) imunskim mehanizmom. Pri tem je zlasti pomembna fagocitoza, ki jo opravljajo nevtrofilci, monociti in makrofagi. Specifična protibakterijska protitelesa in aktivirani proteini komplemента se vežejo na bakterije in jih opsonizirajo – fagocitne celice jih lažje prepoznavajo in fagocitirajo. Zunajcelične bakterije so razvile številne načine, s katerimi se izognejo imunskemu odzivu. Nekatere bakterije se obdajo s človeško sialično kislino, ki prekrije (zamaskira) bakterijske antigene in zavira aktivacijo komplemента. Bakterijske kapsule varujejo pred fagocitozo. Zunajcelične bakterije imajo tudi druge protifagocitne mehanizme; ta ko na primer streptokokni protein M preprečuje opsonizacijo bakterij s komplementnimi proteini. S spreminjanjem površinskih antigenov se bakterije izognejo protitelesnemu odzivu. Gonokoki lahko iz svojega genskega zapisa za protein pilin sestavijo milijon antigensko različnih kombinacij. S tem se med bakterijami iz generacije v generacijo selekcionirajo tiste, proti katerim še ni učinkovite imunosti.

Številne bakterije parazitirajo znotraj celic, pogosto celo znotraj fagocitnih celic. Znotrajcelične bakterije so nedostopne za protitelesa. Tudi fagocitoza ni zelo učinkovita. Mnoge znotrajcelične

bakterije celo pospešujejo fagocitozo in jo izrabljajo za vstop v celice. Nato z različnimi prilagoditvami preprečijo, da bi jih fagocitne celice uničile. Listerije na primer po fagocitozi ne ostanejo v fagosomih, ampak s pomočjo encima hemolizina prodrejo v citoplazmo. Tam so zavarovane pred mikrobicidnimi snovmi v lizosomih makrofagov. Mikobakterije in legionele po fagocitozi zavrejo zlivanje fagosomov in lizosomov v fagolizosome in nemoteno bivajo v fagosomih. Bakterije, ki povzročajo gobavost (*Mycobacterium leprae*), z glikolipidi zavrejo nastajanje kisikovih radikalov in zmanjšajo mikrobicidno aktivnost fagocitnih celic. Fagocitne celice praviloma slabo ovirajo znotrajcelične bakterije pri razširjanju in kolonizaciji tkiv. Pomembne so celice NK, ki se aktivirajo zgodaj med okužbo in izločajo velike količine interferona gama (IFN- $\gamma$ ). Ta interferon aktivira makrofage in okrepi njihovo fagocitno zmožnost, ki navadno zavre okužbo in omogoči razvoj specifične celične imunske reakcije, sicer najpomembnejša za obrambo. Specifično obrambo proti znotrajceličnim bakterijam omogočajo predvsem citotoksični limfociti T, ki uničujejo okužene celice lastnega telesa, s čimer zamejujejo širjenje okužbe.

### **Preobčutljivostne reakcije**

Imunska reakcija v končni fazi vedno sproži vnetni proces, katerega cilj je odstranitev tujka (na primer bakterije) iz telesa. Vnetje poleg nekaterih koristi obenem tudi zmoti delovanje vnetega tkiva, okvara pa je navadno odvisna od obsežnosti in trajanja vnetja. Tkivne okvare med bakterijskimi okužbami niso samo posledica bakterijskih virulentnih učinkov, ampak tudi imunopatoloških dogajanj v vnetem tkivu. Pri razvrščanju imunskih pojavov s kliničnega vidika navadno opisujemo škodo, ki jo imunska vnetja povzročijo v telesu. Vendar je treba v vsakič posamezno presoditi tudi korist, ki jo imunski odziv prinese organizmu. Vnetje med okužbo z respiratornimi virusi je zaradi kihanja in kašljanja sicer nadležno, vendar hkrati koristno, ker pomaga ozdraviti bolezen. Če človek kiha in kašlja zaradi imunske reakcije proti cvetnemu prahu, pa tak imunski odziv šteje za škodljivega (je preobčutljivostna reakcija), ker sodimo, da bi bilo bolje, če ga sploh ne bi bilo. O preobčutljivosti govorimo, kadar imunska reakcija ni smiselna in organizmu bolj škoduje, kot koristi. Pri izraziti preobčutljivosti navadno sploh ne gre za imunski odziv proti mikrobnim povzročiteljem bolezni, marveč proti neškodljivim tujkom (npr. cvetnemu prahu, zdravilom) ali celo molekulam lastnega telesa (avtoimunost). V takih primerih je škoda, ki jo vnetje povzroči tkivu, skoraj izključno posledica imunske reakcije. Zato je proučevanje izrazitih preobčutljivostnih odzivov privedlo do opredelitve, kakšno vrsto vnetja in kolikšno škodo povzroči tkivu določena imunska reakcija.

Na ta način je nastala tradicionalna razvrstitev preobčutljivostnih reakcij (po Coombsu), ki povezuje klinično sliko vnetja z imunskim mehanizmom nastanka vnetne reakcije. Razvrstitev preobčutljivostnih reakcij (1 do 4) je danes še vedno zelo uporabna kot didaktično sredstvo. Po drugi strani pa velja v klinični praksi osrednja pozornost alergijski preobčutljivosti, posredovani z IgE, ker je klinično najpomembnejša in omogoča tudi učinkovito diagnostično in terapevtsko ukrepanje. Zato novejša razvrstitve (napr. Razčlenitev preobčutljivosti kot jo

predlaga Evropska akademija za alergijo in klinično imunologijo) namesto o preobčutljivosti govorijo kar o alergijski preobčutljivosti, pri kateri osrednje mesto zavzema od IgE-odvisna alergija.

Tabela 1: Razširjena klasifikacija preobčutljivostnih reakcij po Coombsu in Gellu

| Tip reakcije | Odziv         | Patologija                   | Simptomi po cepljenju      |
|--------------|---------------|------------------------------|----------------------------|
| Tip I        | IgE           | degranulacija mastocitov     | urtikarija, anafilaksija   |
| Tip II       | IgG in FcR    | FcR odvisna celična liza     | lokalno vnetje, nekroza    |
| Tip III      | IgG-Ag        | depoziti imunskih kompleksov | lokalno vnetje, vaskulitis |
| Tip IVa      | Th1, citokini | aktivacija makrofagov        | pozna preobčutljivost      |
| Tip IVb      | Th2           | eozinofilno vnetje           | makulopapularni eksantem   |
| Tip IVc      | Tc            | Th, Tc                       | bulozni eksantem           |
| Tip IVd      | nevtrofilci   | aktivacija nevtrofilcev      | pustularni eksantem        |

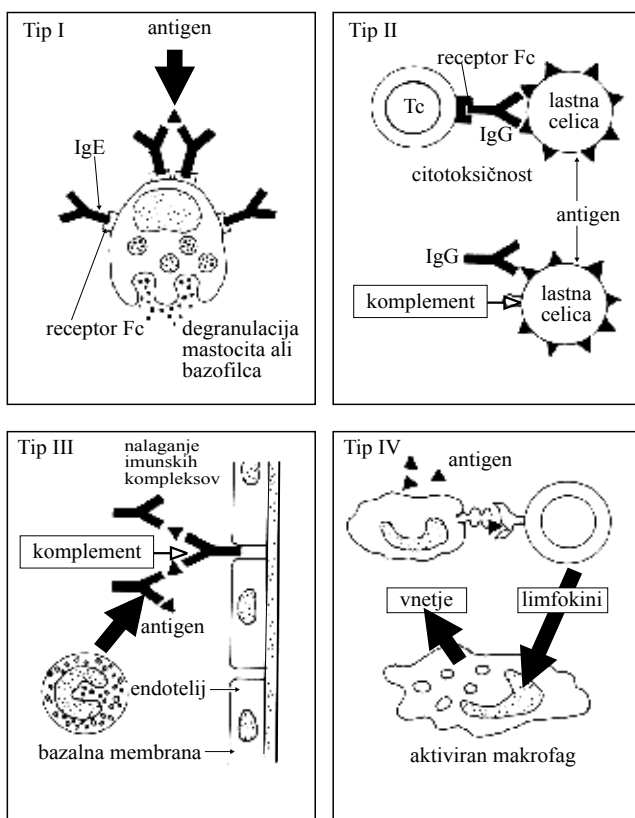
### **Reakcije tipa I (alergije, povzročene z IgE)**

Bazofilci so poglavne efektorske celice pri razvoju vnetja tipa I. V citoplazmi imajo številna zrna (vakuole), ki vsebujejo biološko aktivne snovi. Ob nekaterih dražljajih se bazofilci degranulirajo in med eksocitozo izločajo vsebino zrn v okolico. Snovi, ki se med tem sprostijo iz zrn v okolico, imenujemo primarne mediatorje. Po stiku z alergenom traja njihov klinični učinek 5 do 30 minut, po 60 minutah pa pojema. Obenem sproži degranulacija v bazofilcih tudi sintezo in sproščanje mediatorjev. Ker zaradi časa, potrebnega za njihovo sintezo, začnejo učinkovati pozneje, jih imenujemo sekundarni mediatorji; njihov učinek postane opazen v 2 urah po stiku z alergenom in lahko traja 2 do 3 dni. Primarni mediatorji so v zrnih bazofilcev. Mednje štejemo histamin, ki povzroča krčenje gladkih mišic v dihalnih poteh, poveča prepustnost žilja ter sekrecijo nosnih, bronhialnih in želodčnih žlez. Eozinofilni kemotaktični faktor koncentrira eozinofilce, nevtrofilni kemotaktični faktor pa nevtrofilce na mestu degranulacije bazofilcev. Zrna vsebujejo še heparin, proteaze in nekatere manj definirane proteinske mediatorje. Sekundarni mediatorji se ob degranulaciji bazofilcev sintetizirajo zaradi aktivacije lipolitičnih encimov (fosfolipaza A2, fosfolipaza C, diacilglicerolna lipaza), ki cepijo membranske fosfolipide bazofilcev. Produkti cepljenja lipidov so biološko močno učinkovite snovi: levkotrieni močno povečajo prepustnost žilja, krčijo gladko mišičje v dihalnih poteh, spodbujajo bronhialno sekrecijo, delujejo kemotaktično na nevtrofilce,

eozinofilce in monocite. Podoben učinek na žilje in dihalne poti imata tudi prostaglandin D2 in PAF (platelet activating factor). Degranulacija (eksocitoza) bazofilcev je aktiven proces, pri katerem kontraktilni deli celičnega skeleta (aktin, miozin) prenašajo zrna do celične površine, kjer se potem zlijejo s celično membrano in izločijo vsebino v okolico. Pri tem je za aktivacijo miozina potrebna njegova fosforilacija, ki jo katalizira proteinkinaza C. Med aktivatorji proteinkinaze C je najbolj znan diacilglicerol, ki nastaja ob receptorski aktivaciji fosfolipaze C. Ob degranulaciji bazofilcev se prehodno tudi močno poveča znotrajcelična koncentracija c-AMP, ki aktivira proteinsko kinazo A, ta pa zavira degranulacijo. Prehoden dvig koncentracije c-AMP ob aktivaciji bazofilcev je negativna povratna zanka, ki zaustavi sproženo degranulacijo. Zato snovi, ki povečajo koncentracijo c-AMP v bazofilcih (adrenalin), preprečujejo njihovo degranulacijo in tudi po tej poti zavirajo razvoj preobčutljivostne reakcije tipa I.

Klinični učinki reakcije tipa I so odvisni od lokacije in obsežnosti degranulacije bazofilcev. Pri obsežni degranulaciji so ne glede na mesto antigenovega vnosa prizadeti številni organski sistemi – torej gre za sistemsko reakcijo. Manj obsežna degranulacija ima navadno lokalne učinke, ki so omejeni na mesto vdora antigena v telo. Sistemska anafilaksija se pojavi po vnosu alergenov (proteinov, zdravil – antibiotikov v cepilnem pripravku, polisaharidov) v telo, pri čemer je resnost bolezni odvisna zlasti od obsega senzibilizacije z alergenom, se pravi od količine specifičnih protiteles razreda IgE na mastocitih. Tudi količina vnesenega alergena vpliva na resnost bolezni, vendar je treba upoštevati, da včasih (pri močni senzibilizaciji) že izredno majhna količina alergena (celo tako majhna, kot jo uporabljamo za kožno testiranje na alergijo) zadošča za nastanek najhujših oblik anafilaksije. V nekaj minutah po stiku z alergenom izbruhnejo srbenje in kožni izpuščaji, kmalu zatem se zaradi krčenja bronhiolov začne silovit kašelj in dušenje, zaradi oteklih glasilk tudi hripavost. Sledijo bruhanje, trebušni krči in driska. Zaradi padca krvnega tlaka lahko bolnik pade v šok in celo umre. Atopija pomeni dedno nagnjenost k razvoju lokalne anafilaktične reakcije po vdoru alergenov v telo. Okoli 10 % populacije prizadevajo lokalne alergijske reakcije, ki nastanejo zaradi različnih vdihanih (pelodov, živalskih dlak, hišnega prahu itd.) ali zaužitih (rib, jagod, jajc itd.) alergenov. Glede na lokalizacijo atopične reakcije se po vdoru alergena razvijejo nekatere bolezni: urtikarija in angioedem (na koži), alergijski rinitis (na nosni sluznici), astma (v bronhiolih), enterokolitis (na črevesni sluznici) itd.

Slika 12: Mehanizmi preobčutljivostnih reakcij



### Reakcije tipa 2 (citotoksičnost, povzročena z IgG in IgM)

Reakcije tipa 2 povzročajo protitelesa (avtoprotitelesa), ki se vežejo na normalne ali spremenjene molekule (adsorbirana zdravila, cepiva, virusni delci) na površinah lastnih celic. Specifična vezava protiteles na lastne celice povzroči njihovo uničenje. Glede na obseg uničenja, pomembnost in lokalizacijo uničenih celic se razvijejo posamezni bolezenski znaki. Če so uničeni eritrociti, se razvije anemija; okvare ledvičnih glomerulov vodijo v ledvično odpoved; uničenje kožnih keratinocitov povzroči nastanek pemfigusa. Mehanizmi uničevanja celic so si po vezavi protiteles nanje večinoma podobni: vezava protiteles (IgG in IgM) na celice aktivira komplementni sistem. Aktivirani proteini komplementa naredijo na celični membrani proteinski kompleks, ki okvari membrano in povzroči celični propad. Obenem napadene celice postanejo občutljive za fagocitozo (so opsonizirane), kar dodatno prispeva

k njihovemu uničenju. Poleg tega so številne vrste obrambnih celic (monociti, nevtrofilci, eozinofilci, celice NK) zmožne ne glede na aktivacijo komplemента ubijati celice, na katere so specifično vezana protitelesa – gre za reakcijo ADCC - celično posredovano citotoksičnost, ki je odvisna od protiteles (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity – ADCC). Osnovno dogajanje, ki povzroči nastanek preobčutljivostne reakcije tipa 2, je nastajanje protiteles, ki se specifično vežejo na organizmu lastne celice ali necelične strukture (npr. bazalne membrane v koži, glomerulih itd.). V nekaterih primerih taka protitelesa nastajajo v sklopu avtoimunskih bolezni. Pogosteje pa protitelesa, ki povzročijo preobčutljivost tipa 2, niso 'prava' samoprotitelesa, tak primer je transfuzijska reakcija, ki nastane po prejemu neskladne krvi. Še pogosteje pa gre za vnos tujih snovi (zdravil, cepiv, mikrobnih delcev), ki se vežejo na površino celic, hkrati pa izzovejo nastanek protiteles. Zato se nastala protitelesa vežejo na antigene, ki so vezani na površino lastnih celic (na primer na mestu cepljenja), kar povzroči uničenje tkivnih celic in posledično tkivno in vnetno poškodbo.

### **Reakcije tipa 3 (ki jih povzročajo imunski kompleksi)**

V tip 3 uvrščamo preobčutljivostne reakcije, ki nastanejo zaradi kopičenja imunskih kompleksov (kompleksov antigen-protitelo). Ti so različno veliki in v njih so antigeni in protitelesa v različnih molekularnih razmerjih. Najprej nastajajo kompleksi v prebitku antigena, po nekaj dneh pa v prebitku protiteles. Ob relativnem prebitku protiteles (pogosto po revakcinacijah) nastanejo veliki kompleksi, ki precipitirajo in se lokalizirajo tam, kjer vstopa antigen (na mestu cepljenja). Taki kompleksi lahko povzročijo akutno vnetje, ki ga imenujemo Arthusov pojav. Ob prebitku antigena (na primer ob primarnem cepljenju, če pride cepivo pre/hitro v kri) pa lahko nastanejo topni kompleksi, ki krožijo po krvi. Nekateri krožeči kompleksi se odlagajo v različnih tkivih, npr. v sklepih in ledvicah, kjer povzročajo vnetje. Taka bolezenska znamenja se pojavijo pri sindromu serumske bolezni.

Klinične posledice vnetja zaradi imunskih kompleksov so odvisne od mesta njihovega kopičenja. Če nastajajo v krvi, povzročijo vnetne okvare krvnih žil (vaskulitis) in tkiv, ki filtrirajo kri, pri čemer so zlasti ogroženi ledvični glomeruli. Pri cepljenju je najpogostejši Arthusov pojav, poimenovan po francoskem fiziologu Arthusu, ki je kuncem subkutano vsak teden vbrizgaval konjski serum. Sprva ni bilo nobene reakcije, po več tednih, ko so nastale velike količine protiteles, pa je vsaka injekcija povzročila lokalizirano vnetno reakcijo na mestu vbrizganja antigena. Arthusov pojav so opisali tudi pri človeku. Nastane zaradi imunskih kompleksov, ki vežejo komplement in pritegnejo granulocite. Njihovi lizosomski encimi, ki se sproščajo ob požiranju in prebavljanju imunskih kompleksov, povzročajo okvaro tkiva. Dodatna okvara nastane tudi zaradi aktivacije komplemента. Značilno Arthusovo reakcijo lahko prikažemo tako, da najprej intravensko vbrizgamo antiserum in nato v kožo ustreznega antigena. Na mestu vbrizganja antigena nastane vnetje. V praksi lahko Arthusovo reakcijo opazujemo pri ljudeh z velikimi količinami protiteles proti različnim mikroorganizmom (kot sta *Thermoactinomyces vulgaris* in *Aspergillus* spp.), ki uspevajo v razpadajočem rastlinju (v



silosih pri temperaturi 45 do 60 °C). Kadar taki ljudje vdihavajo spore ali delce teh mikrobov, se lahko razvijejo hude lokalizirane okvare pljuč (farmarska pljuča).

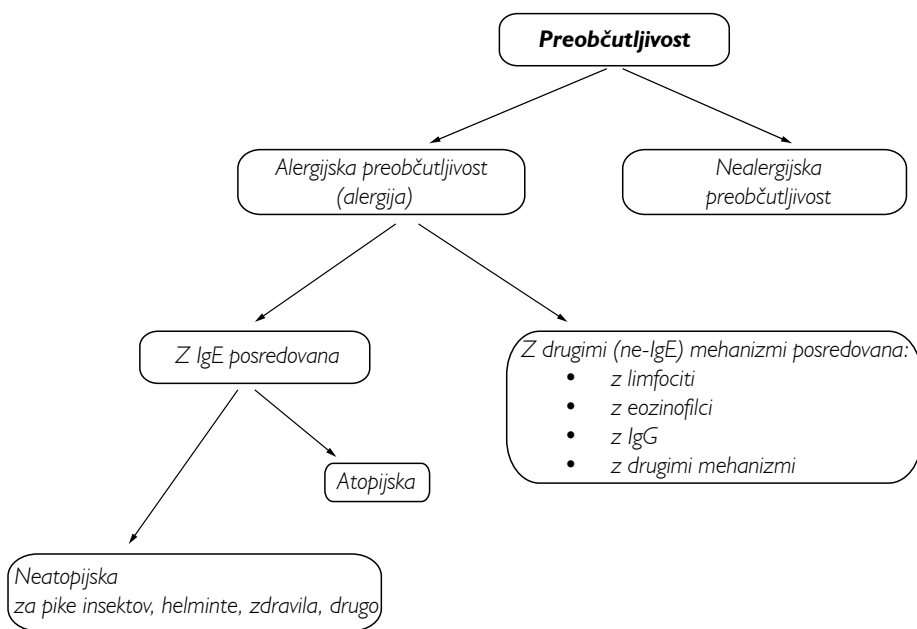
Zelo izjemen pojav po cepljenju je serumska bolezen. Poznamo akutno in kronično serumsko bolezen. Mehanizem akutne serumske bolezni so analizirali pri kuncih in ljudeh, ki so jim vbrizgali velike količine tuje beljakovine (na primer govejega albumina) v enkratnem odmerku. Bolezen postane vidna od 7. do 14. dne po prvem vbrizganju antigena. V tem času se raven antigena zniža, vendar ostane še zadosti visoka, da po pojavu protiteles nastanejo majhni topni kompleksi (pri prebitku antigena), ki povzročajo žariščne žilne okvare v koronarnih arterijah, glomerulih (akutni glomerulonefritis) in drugih tkivih. V že senzibiliziranem prejemniku se reakcija pojavi hitreje, in sicer po 3 do 4 dneh (sekundarni protitelesni odziv), ki pa za svoj nastanek potrebuje tudi manj antigena. Če vbrizgavamo antigen vsak dan dalj časa, postane lahko serumska bolezen kronična. Nastajajo vedno novi kompleksi, ki se največkrat odlagajo v glomerulih. Znamenja akutnega vnetja so manj izražena, vendar zaradi njegove kroničnosti lahko pride do nepopravljivih okvar, zlasti ledvic. Kronična serumska bolezen značilno spremlja nekatere bolezni avtoimunskega izvora (kot so sistemski eritematozni lupus, membranski glomerulonefritis, revmatoidni artritis), pri katerih je imunski sistem kronično izpostavljen določeni količini avtoantigenskih molekul. Poudariti je treba, da je nastajanje imunskih kompleksov sicer vsakodnevni pojav v zdravem organizmu, katerega imunski sistem se normalno odziva na tuje molekule, ki vdirajo v telo iz okolja. Takšne imunске komplekse sproti fagocitirajo fagocitne mononuklearne celice (zlasti nevtrofilci in monociti) in tako odstranjujejo iz krvnega obtoka. Zapleti navadno nastanejo pri preobilnem nastajanju imunskih kompleksov, ki jih fagociti ne zmorejo odstraniti. To se dogaja, kadar se v telesu pojavi velika količina tujih molekul – antigenov, ki so največkrat bakterijski, virusni, parazitski ali glivični. Vdoru mikrobov sledi protitelesni odziv, nastali imunski kompleksi pa se nalagajo in povzročajo vnetje na mestih kopičenja. Včasih velike količine antigenskih molekul pridejo v telo hoteno z vbrizgavanjem, zlasti zdravila (kinidina, penicilina, zaščitnih serumov), včasih tudi drugih snovi (heroina).

#### **Reakcije tipa 4 (ki jih povzročajo limfociti T in makrofagi)**

Tovrstna preobčutljivost je znana tudi kot tuberkulinski tip preobčutljivosti. Opazovali so jo pri ugotavljanju imunskega odziva proti antigenom *M. tuberculosis*. Reakcije tipa 4 začenejo senzibilizirani limfociti T. Gre pravzaprav za osnovno reakcijo kakršnegakoli specifičnega imunskega odziva, ki se začne, ko celica T pomagalka z antigenskim receptorjem prepozna antigen, nato pa s svojimi izločki – limfokini – usmeri druge imunске celice (limfocite B, citotoksične limfocite T) v specifično imunsko reakcijo. Ob prvem stiku z antigenom prepoznavajo limfociti T antigene le, če jih prej fagocitirajo antigen predstavljajoče celice APC (tkivni makrofagi). Pri poznejšem stiku z antigenom lahko limfocitom T predstavljajo antigene tudi druge celice (limfociti B, endotelijske celice), zato je aktivacija limfocitov, ki so že bili v stiku z antigenom, lažja kot pri limfocitih T ob prvem stiku z antigenom. Aktivirane celice

T pomagalke z limfokini omogočajo aktivacijo citotoksičnih limfocitov T. Slednji vsebujejo citotoksične granule, katerih vsebino izločajo proti celicam, ki na površinah izražajo antigenske molekule. V citotoksičnih granulah so različni toksini (perforin, TNF, encimi), ki uničijo napadeno celico. Citotoksične celice tako uničujejo zlasti z virusi in drugimi znotrajceličnimi paraziti okužene celice, verjetno tudi tumorske. Sočasno s citotoksično reakcijo povzroči izločanje limfokinov (IL-2, IFN, TNF) tudi privabljanje vnetnih celic (nevtrofilcev, monocitov) in njihovo aktivacijo. Izločki limfocitov in preostalih celic povečajo prepustnost žilja, povzročijo nabiranje fibrina ob žilju in v tkivu, aktivacija koagulacijskih mehanizmov pa povzroči induracijo tkiva. Vnetna poškodba tkiva je odvisna od obsega reakcije; močna reakcija lahko povzroči tudi odmrtnje (nekrozo) vnetega tkiva. Ker je tip 4 pravzaprav temeljni celični imunski odziv, govorimo o preobčutljivosti tipa 4 le, če presodimo, da reakcija organizmu bolj škoduje zaradi vnetne okvare tkiva, kot pa mu koristi zaradi imunske obrambe proti antigenu.

Slika 13: Razčlenitev preobčutljivosti kot jo predlaga Evropska akademija za alergijo in klinično imunologijo (EAACI)



## **Laboratorijske preiskave za ugotavljanje odzivnosti na cepljenje**

Za ustrezen odziv na cepivo je potreben ustrezno razvit in delujoč imunski sistem. Če imunski sistem še ni razvit (na primer pri mlajših otrocih od 1 leta), lahko pričakujemo večjo pogostnost manj uspešnih odzivov na cepljenje, zlasti proti slabše imunogenim cepivom. Pri otrocih povzroča težave tudi dejstvo, da v času prvih cepljenj njihove morebitne prirojene imunске pomanjkljivosti še niso opredeljene. Razreševanje vprašanj v zvezi z učinkovitostjo cepljenja in njegovimi stranskimi učinki pa neredko sovпада z diagnosticiranjem morebitnih imunskih pomankljivosti, ki so lahko vzrok tako za neodzivnost po cepljenju kot za hude oblike stranskih učinkov po njem.

Ob rojstvu otrok sicer že ima osnovne imunске celice in osnovne anatomske strukture (bezgavke, limfne žile), da se lahko odziva na tujke, nima pa diferenciranih imunskih tkiv in celic, ki za svoj razvoj potrebujejo mikrobo stimulacijo. Novorojenček je praktično brez limfnega tkiva v sluznicah, saj se črevesni limfni folikli (GALT) pojavijo po dveh tednih mikrobo stimulacije, enako velja za limfatična tkiva v dihalih (BALT). Še pozneje (čez mesec do dva) se oblikujejo limfatična tkiva v slepiču, slinavkah in tonzilah. Zato normalni novorojenec ne tvori IgA, ki začno nastajati po mikrobo stimulaciji najprej v slinavkah (čez teden ali dva) in za tem še v črevesju (čez mesec ali dva).

Celice T so pri novorojencih zmanjšano aktivne, slabo tvorijo citokine, njihov 'naravni' imunski odziv je Th2, razen če ni ob aktivaciji izrazitih stimulatorjev Th1 (na primer IFN- $\gamma$ , LPS). Zaradi zmanjšane ekspresije CD40L na limfocitih T, ki omogoča diferenciacijo Th1, je diferenciacija na odziv Th1 še otežena. Limfociti B imajo slabo zmožnost izotipskega preklopa (iz IgM v druge razrede protiteles) in afinitetnega dozorevanja v bezgavkah ter šibko zmožnost tvorbe protiteles.

Osnovni kriterij, ki je vsaj v grobem merilo za pričakovano normalno odzivnost na cepljenje, je primerna koncentracija posameznih vrst levkocitov v krvi (nevtrofilcev, monocitov in limfocitov). Še prepričljivejši znak 'normalnosti' imunске odzivnosti na cepivo je normalna serumska koncentracija imunoglobulinov, vendar je treba pri mlajših dojenčkih od pol leta upoštevati, da je lahko del imunoglobulinov še materinega izvora. Sicer pa je treba pri odstopanjih od normal ali ob kliničnih sumih na pomankljiv imunski odziv podrobneje preveriti učinkovitost protitelesnega imunskega odziva (kar omogoči presojo o učinkovitosti cepljenja) in po potrebi tudi celičnega imunskega odziva (kar omogoči zlasti presojo o verjetnosti neželenih učinkov cepljenja).

### *Analiza učinkovitosti protitelesnega imunskega odziva po cepljenju*

Merjenje porasta koncentracije (titra) cepilnih protiteles po cepljenju je preiskava, ki zelo občutljivo pokaže zmožnost protitelesnega odziva proti proteinskim antigenom (Di, Te) in proti polisaharidnim antigenom (Pneumo, HiB). Preiskava je izjemno koristna za ugotavljanje

odzivnosti imunskega sistema preiskovanca na cepivo in tudi za diagnostiko primarnih imunskih deficitov nastajanja protiteles, ob tem pa je tudi razmeroma preprosto izvedljiva. Za preiskavo odvzamemo serum bolnika pred cepljenjem (ugotovitev osnovne koncentracije specifičnih protiteles) in 4 tedne po cepljenju (ugotovitev porasta koncentracije specifičnih protiteles). Štirikraten porast koncentracije protiteles po 4 tednih je znak primerne protitelesnega imunskega odziva na cepivo.

Preverjanje zaščitnega nivoja protiteles je preiskava, ki omogoča z enkratnim odvzemom krvi preveriti, če ima preiskovanec zaščitno koncentracijo serumskih protiteles. Za večino cepiv so znani zaščitni nivoji protiteles, ki preprečujejo bolezen. Zato je v primeru cepljenja imunsko oslabljenih posameznikov smiselno preveriti, če je nastal zaščitni nivo protiteles.

*Tabela: Zaščitni nivoji protiteles*

| Cepivo                   | Zaščitni nivo IgG          |
|--------------------------|----------------------------|
| Difterija                | 0.1 IU/mL I I              |
| Haemophilus influenzae B | 0.15g/mL29                 |
| Hepatitis A              | 10 mIU/mL30                |
| Hepatitis B s –Ab        | 10 mIU/mL31                |
| Ošpice (rubeola)         | 120 mIU/mL                 |
| Polio (inaktiviran)      | nevtralizacijski titer 1:8 |
| Steklina                 | 0.5 IU/mL                  |
| Rubella                  | 10 IU/mL                   |
| Tetanus                  | 0.1 IU/mL                  |
| Rumena mrzlica           | 0.7 IU/mL                  |

IU – mednarodna enota; mIU – mili-mednarodna enota

### **Diagnostika imunskih pomankljivosti pri ugotovljeni neodzivnosti na cepljenje ali pri ugotovljenih neželenih reakcijah na cepivo**

Imunske pomankljivosti delimo na primarne in sekundarne. Primarne so posledica okvare genov, ki sodelujejo pri razvoju in delovanju komponent imunskega sistema (imunskih celic, citokinov, vnetnih in protivnetnih kaskad). Genske okvare povzročijo različne motnje: okvarjeno encimsko ali receptorsko funkcijo, okvarjen razvoj ali diferenciacijo posameznih vrst imunskih celic, okvarjeno citokinsko funkcijo, okvarjeno komunikacijo med celicami, okvarjeno popraviljanje DNA, okvarjeno apoptozo imunskih celic. V nekaterih primerih so primarne imunske pomankljivosti lahko tudi posledica razvojnih škodljivosti med razvojem ploda (napr. hipoplazija timusa). Sekundarne imunske pomankljivosti nastanejo po rojstvu zaradi bolezenskega vzroka (poškodbe, tumorja, okužbe..), fiziološkega stanja (dojenčki, starostniki) ali medicinskega posega (citostatka terapija, transplantacija kostnega mozga...).

Primarne imunske pomankljivosti se kažejo kot motnje v tvorbi protiteles (60% primerov), motnje celične imunosti (30%), motnje fagocitnih celic (10%) in motnje komplementa (1%). Pogostnost variira od 1:500-700 (deficit IgA) do 1:100 000 (SCID). Ob diagnozi je 80% bolnikov mlajših od 20 let, 70% je moških (5:1 otroci, 1:1 odrasli). Število različnih opisanih primarnih imunskih deficitov je nad 120, vendar z diagnostiko 20 najpogostnejših zajamemo 90% primarnih imunskih deficitov v populaciji. Pri sumu na primarno imunsko pomankljivost je potrebno bolnika napotiti na specializiran oddelek Pediatrične klinike v Ljubljani zaradi specifične diagnostike (imunološka in genetska opredelitev deficitov) in terapije (podporna, nadomestna s protitelesi, transplantacija kostnega mozga, genska terapija).

### **Testiranje protitelesne imunosti**

Zmanjšane koncentracije serumskih protiteles so najpogostnejši znak prirojene imunske pomankljivosti. V prvi fazi pri diagnostiki določamo koncentracije posameznih razredov protiteles (IgG, IgM, IgA, IgE) v serumu. Uspešna tvorba protiteles zajema številne stopnje imunskega odziva (makrofage, celice T pomagalk, limfocite B). Zato koncentracija protiteles v serumu lahko pokaže pomankljivosti na številnih stopnjah imunskega odziva. Preiskava je diagnostična za dedne motnje: agamaglobulinemijo, splošno variabilno hipogamaglobulinemijo (Common Variable Immunodeficiency – CVID), sindrom hiper IgM, pomanjkanje IgA.

Podrazredi IgG so zaradi strukturne različnosti učinkoviti proti različnim vrstam antigenov: IgG1 in IgG3 se učinkovito vežejo na proteinske antigene in se tvorijo v odvisnosti od limfocitov T(CD4). Med njimi IgG3 najučinkoviteje aktivira komplement in omogoča opsonizacijo. IgG2 se vežejo na polisaharidne antigene (na primer bakterijske kapsule) in se tvorijo neodvisno od limfocitov T (CD4). Pomanjkanje IgG1 ali IgG3 ali obeh se kaže s kroničnimi in ponavljajočimi se okužbami spodnjih dihal, pomanjkanje IgG2 ali IgG4 pa s ponavljajočimi se okužbami sinusov in srednjega ušesa s kapsuliranimi bakterijami (pnevmokoki, hemofilusi).

IgA v slini so najpomembnejša protitelesa za zaščito sluznic pred okužbami. Pri novorojencu se začnejo ob mikrobnih stimulacijah tvoriti najprej v slinavkah (čez teden ali dva), pozneje pa v črevesju (čez mesec ali dva). Pojav IgA je dobro merilo razvoja sluznične imunosti, njihovo pomanjkanje pa najpogostnejši prirojeni imunski deficit (1/600 ljudi). Hkrati je zmanjšana sinteza IgA med prvimi znaki sekundarnih imunskih deficitov (zaradi imunosupresije, pomanjkanja hranil, stresa), ker jih protitelesa s sluzjo stalno odstranjujejo in je njihova koncentracija odvisna od stalne tvorbe. Koncentracija IgA v slini je neposredno povezana z občutljivostjo za nastanek okužb dihal in prebavil. Indikacije za preiskavo IgA v slini so, kadar sumimo na prirojeni deficit IgA, nedozorelost črevesne sluznice (skupaj z merjenjem IgG v slini) in sekundarni imunski deficit.

## **Pogostne motnje protitelesnega odzivanja**

V zvezi z limfocitnimi funkcijami je najlažje najprej preveriti koncentracije posameznih razredov protiteles (IgG, IgM, IgA) v serumu. Človek je nenehno v stiku s številnimi antigeni, na katere se odziva in tvori protitelesa. Uspešna tvorba protiteles zajema številne stopnje imunskega odziva (makrofage, celice T pomagalke, limfocite B). Zato analiza protiteles v serumu lahko pokaže pomanjkljivosti na številnih stopnjah imunskega odziva.

**Agamaglobulinemija** je pomanjkanje vseh razredov protiteles. Običajno gre za posledico genetske (vezane na X-kromosom) okvare citoplazemskega encima Brutonove tirozin kinaze (mutacija gena za Btk, ki omogočajo preurejanje (rearrangement) genov za variabilni del težke verige imunoglobulinske molekule. Ker je to napaka v dozorevanju limfocitov B, je tudi limfocitov B v krvi zelo malo (manj kot 1 %), v serumu pa je pomanjkanje vseh razredov Ig. Krvne koncentracije limfocitov T so normalne. Bolniki imajo od 6. meseca starosti (ko izgubijo materina protitelesa) ponavljajoče se bakterijske pljučnice in seapse, pomaga pa jim nadomestno zdravljenje z gamaglobulini. Diagnostično se s pretočno citometrijo ugotavlja koncentracija limfocitov B (pod 1 %), lahko tudi odsotnost proteina Btk v citoplazmi monocitov.

**Splošna variabilna hipogamaglobulinemija** (angl. Common Variable Immunodeficiency, CVI) je delno pomanjkanje vseh razredov protiteles. To je razmeroma pogosta dedna imunska pomanjkljivost, ki se kaže s pogostimi pljučnicami, prebavnimi motnjami in povečano nagnjenostjo za razvoj avtoimunskih bolezni. Gre za skupino različnih dednih okvar na ravni aktivacije celic T pomagalke (zmanjšano izločanje citokinov) in limfocitov B. Ker ne gre za eno samo vrsto genske okvare, so tudi pojavne oblike bolezni (točneje: skupine različnih bolezni) različne. Bolniki imajo zmanjšane krvne koncentracije protiteles, limfocitov B in včasih tudi celic T pomagalke, obenem pa pogosto povečane krvne koncentracije citotoksičnih limfocitov T (CD8). Pogosto je tudi zmanjšano razmerje celic CD4/CD8 in zmanjšana koncentracija naivnih (CD45RA) celic T pomagalke. Defekt pri CVI je največkrat vezan na defekt MHC, IgA, IgD, TNFRSF13B · ICOS (inducibilni kostimulator limfocitov T). Zaradi naštetih motenj je pri CVI praviloma okvarjena pomoč limfocitov T pri pozni diferenciaciji limfocitov B (vloga ICOS), zato je moteno nastajanje spominskih limfocitov B in izotipski preklap. To se kaže kot zmanjšani deleži izotipsko preklopljenih IgM(-)IgD(-) spominskih (CD27+) limfocitov B CD27(+)IgM(-)IgD(-) (več kot 5% med PBL pri zdravih ljudeh). Povečani so deleži nediferenciranih limfocitov B v krvi (CD27(-)IgD(+)) in defektno preklopljenih limfocitov B (IgD-CD27+).

**Hiper IgM-sindromi** se kažejo kot pomanjkanje IgG, IgA in IgE v serumu. Bolezen najpogosteje nastane pri dedni okvari proteina CD40 na limfocitih B ali CD40L (CD154) na limfocitih T, manj pogoste so okvare drugih genov (UNG, NEMO, AID) na limfocitih T ali B, ki omogočajo preklap. Protein CD40 sicer omogoča preklap (switching) protitelesne sinteze z IgM na ostale razrede (IgG, IgA, IgE). Zato so v serumu samo protitelesa IgM, protiteles

ostalnih razredov pa ni. Koncentracije posameznih limfocitnih populacij v krvi so normalne, le pri otrocih je razmerje celic CD4/CD8 navadno precej povečano. Na aktiviranih celicah T je zmanjšana ali odsotna ekspresija CD154, kar se dokazuje v stimulacijskem testu "in vitro". Bolniki so nagnjeni k oportunističnim okužbam, pomaga pa jim nadomestna terapija z gamaglobulini.

**Pomanjkanje IgA** Selektivno pomanjkanje IgA je najpogostejša dedna imunska pomanjkljivost (1 na 700 ljudi). Prizadeti bolj obolevajo za pljučnimi in črevesnimi okužbami in imajo kasneje v življenju bolj pogosto kronične okvare dihal in prebavil. Povečana je tudi nagnjenost za razvoj avtoimunskih bolezni. Serumsko koncentracija IgA je znižana (manj kot 0,05 g/l), na bolnikovih limfocitih B pa je mogoče odkriti hkratno ekspresijo membranskih IgA, IgM in IgD (limfociti B z okvarjenim dozorevanjem). Koncentracije posameznih limfocitnih populacij v krvi so normalne. Na nadomestno terapijo z IgA ali gamaglobulini bolniki pogosto razvijejo preobčutljivostno (anafilaški) reakcijo. Med ukrepi je najpomembnejša skrbno preprečevanje dihalnih in črevesnih okužb ter ustrezno antibiotsko zdravljenje v primeru bolezni.

### **Prirojene imunske pomanjkljivosti, ki se kažejo predvsem kot motnje v koncentraciji protiteles in posameznih limfocitnih populacij v krvi**

*Pomanjkanje krvnih limfocitov B in T (SCID, angl. Severe Combined Immunodeficiency)* je skupina najtežjih oblik prirojene imunske pomanjkljivosti. Med SCIDi ločimo bolezni, pri katerih gre za odsotnost limfocitov T, limfociti B pa se pojavljajo; druga skupina so SCIDi, pri katerih so odsotni limfociti B in limfociti T.

1. SCID brez limfocitov T, limfociti B so v krvi Vzrok so različne genske okvare: mutacija gena za IL-2 receptor (najpogostejša oblika, vezana na kromosom X); mutacija gena JAK3 (gen, potreben za diferenciacijo hematopoetskih celic); mutacija gena za IL-7 receptor (IL-7 je pomemben signal za diferenciacijo limfocitov T v kostnem mozgu; mutacija gena za tirozin fosfatni receptor C (posledica je odsotnost ekspresije CD45). V vseh primerih se pojavljajo maloštevilni limfociti T, limfociti B so nezreli, koncentracija imunoglobulinov je zelo majhna.

2. SCID brez limfocitov T in B: Vzrok so različne genske okvare: mutacija rekombinaznega gena RAG 1 (nastanek antigenskega receptorja ni mogoč); mutacija rekombinaznega gena RAG 2 (nastanek antigenskega receptorja ni mogoč); mutacija gena Artemis (onemogočena je rekombinacija DNA); mutacija gena za encim adozin deaminazo (ADA) (posledica je kopičenje toksičnih presnovkov v limfocitih T in B).

## **Analiza dozorevanja in diferenciacije limfocitov B pri ugotovljeni neodzivnosti na cepivo**

Limfociti B nastanejo v kostnem mozgu. Kot funkcijsko nedozorele celice (CD21<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) pridejo v kri. Z izražanjem CD21 postanejo funkcijsko zreli naivni limfociti B (CD27<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>), ki jih imenujemo tudi nepreklapljeni (non-switched) spominski limfociti B. Po prvem prepoznanju antigena izrazijo CD27, ki je označevalec za spominske limfocite B. Ob tem izgubijo IgD in postanejo 'zgolj IgM pozitivni spominski limfociti B' (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>). Ob navzočnosti antigena se diferencirajo v tranzicijske limfocite B (CD38<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) in nato v plazmablaste (CD38<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>), ki že tvorijo protitelesa IgM.

Ob ponovni aktivaciji spominskih limfocitov B (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) se ob pomoči limfocitov Th sinteza imunoglobulinov razreda IgM preklopi v sintezo razreda IgG, IgA ali IgE. Nastanejo 'polno preklapljeni (class-switched) spominski limfociti B' (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>), ki se ob persistenci antigena diferencirajo v tranzicijske celice B in plazmablaste (CD38<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>), nato pa v bezgavkah in tkivih v plazmatke (CD38<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>).

Izvid analize dozorevanja in diferenciacije limfocitov B (opredelitev CVID)  
(primer za starost 1 leto)

### *Nedozoreli limfociti B (CD21<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>)*

|                                            |      |                         |
|--------------------------------------------|------|-------------------------|
| V odstotkih od limfocitov B:               | 13 % | (normalno 0,2 do 5,5 %) |
| Koncentracija (x 10 <sup>6</sup> celic/l): | 88,7 | (normalno 0,9 do 25,5)  |

### *Dozoreli limfociti B (CD21<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>)*

|                                            |       |                           |
|--------------------------------------------|-------|---------------------------|
| V odstotkih od limfocitov B:               | 87 %  | (normalno 94,5 do 99,8 %) |
| Koncentracija (x 10 <sup>6</sup> celic/l): | 593,8 | (normalno 89,4 do 780,1)  |

### *Spominski limfociti B (CD27<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>)*

|                                            |      |                          |
|--------------------------------------------|------|--------------------------|
| V odstotkih od limfocitov B:               | 11 % | (normalno 4,6 do 49,1 %) |
| Koncentracija (x 10 <sup>6</sup> celic/l): | 75,1 | (normalno 9,4 do 136,0)  |

### *Nepreklapljeni spominski limfociti B (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>)*

|                                            |      |                          |
|--------------------------------------------|------|--------------------------|
| V odstotkih od limfocitov B:               | 11 % | (normalno 0,2 do 12,0 %) |
| Koncentracija (x 10 <sup>6</sup> celic/l): | 75,1 | (normalno 0,8 do 42,7)   |

### *Zgolj IgM pozitivni spominski limfociti B (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>)*

|                                            |     |                          |
|--------------------------------------------|-----|--------------------------|
| V odstotkih od limfocitov B:               | 0 % | (normalno 0,3 do 13,1 %) |
| Koncentracija (x 10 <sup>6</sup> celic/l): | 0   | (normalno 0,8 do 37,8)   |

### *Polno preklapljeni spominski limfociti B (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>)*

|                                            |       |                          |
|--------------------------------------------|-------|--------------------------|
| V odstotkih od limfocitov B:               | 0,5 % | (normalno 1,9 do 30,4 %) |
| Koncentracija (x 10 <sup>6</sup> celic/l): | 3,4   | (normalno 5,2 do 74,2)   |

### *IgM+ celice med limfociti B (IgM<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>)*

|                              |      |                           |
|------------------------------|------|---------------------------|
| V odstotkih od limfocitov B: | 99 % | (normalno 32,8 do 82,6 %) |
|------------------------------|------|---------------------------|



|                                                                                                                |       |                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|--------------------------|
| Koncentracija ( $\times 10^6$ celic/l):                                                                        | 675,7 | (norm. 46,0 do 596,0)    |
| <i>Tranzijski (proti plazmatkam) limfociti B (CD38<math>\pm</math> IgM<math>\pm</math>CD19<math>^+</math>)</i> |       |                          |
| V odstotkih od limfocitov B:                                                                                   | 24 %  | (normalno 7,6 do 48,6 %) |
| Koncentracija ( $\times 10^6$ celic/l):                                                                        | 163,8 | (normalno 14,2 do 229,6) |
| <i>Plazmablasti (CD38<math>^+</math> IgM<math>\cdot</math>CD19<math>^+</math>)</i>                             |       |                          |
| V odstotkih od limfocitov B:                                                                                   | 5 %   | (normalno 2,9 do 51,8 %) |
| Koncentracija ( $\times 10^6$ celic/l):                                                                        | 34,1  | (normalno 8,2 do 275,1)  |

Komentar analize dozorevanja limfocitov B

Odstopanja:

- *Povečan delež in koncentracija nedozorelih limfocitov B*
- *Zmanjšán delež in koncentracija polno preklapljenih limfocitov B*
- *Povečan delež limfocitov B z IgM*

Mnenje: Nakazana sta zastoja pri dozorevanju naivnih limfocitov B in tudi pri imunoglobulinskem preklopu (class-switch).

Analiza dozorevanja in diferenciacije limfocitov T pri ugotovljeni neodzivnosti na cepivo

Zaradi ključne vloge limfocitov T pomagalk pri aktivaciji in zorenju limfocitov B se večje motnje nastajanja ali zorenja limfocitov T odražajo tudi kot motnje protitelesnega odzivanja.

Pri analizi morebitnih razvojnih motenj določimo značilne populacije limfocitov T, ki pripadajo določeni razvojni in/ali diferencijski stopnji. Glede na znane podatke o normalni zastopanosti posameznih razvojnih/diferencijskih stopenj za določeno starost lahko opredelimo morebitne zastoje in iz tega sklepamo na verjetne genske okvare, ki jih je nato potrebno potrditi z ustrežno gensko preiskavo.

Limfociti T, nosilci celične imunosti, nastajajo v kostnem mozgu kot nezrele, nefunkcionalne celice T, v zrele imunokompetentne limfocite T (celice T pomagalk – CD4 $^+$  CD3 $^+$  in citotoksične celice T - CD8 $^+$  CD3 $^+$ ) pa dozori v priželjcu. Njihovo dozorevanje spremljata aktivacija in preurejanje genov za T-celični receptor (CD3). Limfociti T, ki dozori v timusu, se kot naivni limfociti T (CD45RA) izplavijo v kri. Naivni limfociti T se nato v bezgavkah razmnožujejo brez stimulacije z antigeni. Ob teh delitvah izgubljajo delčke genoma, ki jim je med dozorevanjem v timusu služil za oblikovanje antigenskega receptorja (TREC T-cell receptor excision circles). Naivni limfociti T, ki TREC še imajo, se imenujejo celice RTE (Recent Tymphic Emigrants). Celice RTE, ki jih prepoznamo tudi s protitelesi CD3 I, so nedavno zapustile timus. Njihova koncentracija je dobro merilo za timusno proizvodnjo limfocitov T. RTE so zato dobro merilo obnavljanja limfocitov T po transplantaciji kostnega mozga.

Naivni (CD45RA) limfociti T so ob poliklonski in vitro stimulaciji nezmožne produkcije INF $\gamma$ , vendar so največji producenti IL-2 ; imajo CD62L za ustavljanje v bezgavkah, nimajo CCR7 za prehod v plaščno cono bezgavk. Ob vnetni aktivaciji bezgavke adherirani naivni limfociti T (CD62L+) pridobijo CCR7+, preidejo v plaščno cono bezgavke. V primeru aktivacije z antigenom postanejo spominski (CD45 RO) limfociti T.

Med spominskimi limfociti ločimo različno diferencirane limfocite CD4 (Th), ki vsak na svoj način izdelujejo citokine in usmerjajo imunski sistem v različne oblike imunskih odzivov. Limfociti Th1 usmerjajo odziv v citotoksični imunski odziv, limfociti Th2 pa v protitelesni imunski odziv. Limfociti Th17 močno spodbudijo protibakterijski in protiglivični imunski odziv v sluznicah in koži s tem, da spodbujajo protimikrobno dejavnost nevtrofilcev in epitelijskih celic. Pomanjkanje Th17 vodi v kronične bakterijske in glivične okužbe kože in sluznic, njihov povečan delež pa v nastanek avtoimunosti. Četrta možna diferenciacija spominskih celic T pomagalk so regulatorni limfociti T, ki specifično zavirajo imunski odziv proti določenim antigenom in so osnova imunske tolerance. Delež regulatornih limfocitov v krvi je pogosto značilno zmanjšan pri avtoimunosti. Med njimi ločimo Treg1 (Tr1 cells), ki nastanejo v timusu na avtoantigene, po aktivaciji z antigenom močno izrazijo CD25 (CD25++ limfociti T), ki je tudi njihov marker za določanje v krvi. Celice Th3 so regulatorne celice, ki nastanejo na periferiji po aktivaciji na APC, njihov marker je citoplazemski marker TGF beta (celice T - TGF beta+).

Poleg razvojnih/diferencijskih stopenj limfocitov T lahko v krvi ugotavljamo tudi nekatere involutivne/starostne oblike limfocitov T. Celice DNT (dvojno negativni CD4- CD8- limfociti T) nastanejo po številnih, z vnetnimi citokini spodbujenih delitvah, in pri tem izgubijo možnost aktivacije s peptidnimi antigeni (prek MHC) in izločajo pretežno regulatorne citokine (npr. pri ALPSu). Ohranijo pa zmožnost aktivacije, posredovane z neproteinskimi antigeni (sladkorji, lipidi), vezanimi na imunoglobuline CD1+ podskupine limfocitov B. V tem primeru lahko stimulirajo limfocite B k nastajanju anti-lipidnih in anti-glikozidnih protiteles in s tem prispevajo k patogenezi avtoimunskih bolezni (npr. SLE). Limfociti T s TCR $\gamma/\delta$  in brez CD4 ali CD8 ( $\gamma/\delta$ DNT) so limfociti T, ki imajo namesto običajnega tipa T celičnega receptorja (TCR $\alpha/\beta$ + ) drug tip receptorja (TCR $\gamma/\delta$ ). Ta receptor ima manjšo raznolikost za prepoznavanje tujkov (antigenov), vendar pa lahko antigene prepozna neposredno (podobno kot protitelesa) in ne potrebuje predstavljanja prek APC.  $\gamma/\delta$ DNT se pojavijo zlasti pri starostnikih in verjetno pomenijo nadomeščanje upadlega delovanja običajnih limfocitov T in s tem posredno kažejo na staranje imunskega sistema. Limfociti T s TCR  $\alpha/\beta$  in brez CD4 ali CD8 ( $\alpha/\beta$ DNT) so tudi pogosti pri starostnikih in so involutivni, zaradi številnih delitev izčrpani običajni  $\alpha/\beta$  limfociti T, ki se niso zmožni več odzivati na tujke, pač pa delajo veliko količino citokinov za zaviranje imunskega odziva (IL-10).  $\alpha/\beta$ DNT nastajajo v večjih količinah v primeru kroničnih aktivacij imunskega sistema – na primer pri avtoimunskih boleznih ali avtovnetnih boleznih (tipično pri ALPS-u, avtoimunskem limfoproliferativnem sindromu). Povečana količina  $\alpha/\beta$  DNT je torej znak kroničnega imunskega pogojenega vnetja, ki tudi močno pospešuje procese staranja. Poleg celic DNT so pri starostnikih pogosti tudi CD4/CD8 dvojno pozitivni limfociti T (CD4/CD8 limfociti T). Ti limfociti izločajo predvsem citokin interferon  $\gamma$  in se občasno pojavijo

tudi pri zdravih ljudeh, bolj pogosto pa pri kroničnih vnetnih boleznih, kroničnih virusnih okužbah in tumorjih. Med involutivne celice, ki niso več zmožne replikacije, štejemo tudi limfocite T, ki nimajo molekule CD28 (CD3+CD28-

Izvid analize dozorevanja in diferenciacije limfocitov T  
(primer za starost 1 leto)

|                                                   |       |                         |
|---------------------------------------------------|-------|-------------------------|
| celice RTE (Recent Tymphic Emigrants)(CD3+ CD31+) |       |                         |
| V odstotkih od limfocitov Th:                     | 13    | (normalno 19 do 60 %)   |
| <i>Naivni (CD45RA) limfociti T</i>                |       |                         |
| Koncentracija (x 10 <sup>9</sup> celic/l):        | 2,4   | (normalno 1,1 do 3,7)   |
| <i>Spominski (CD45 RO) limfociti T</i>            |       |                         |
| Koncentracija (x 10 <sup>9</sup> celic/l):        | 0,3   | (normalno 0,16 do 0,80) |
| <i>Aktivirani (HLA DR) limfociti T</i>            |       |                         |
| V odstotkih od limfocitov T:                      | 23    | (normalno 5 do 15)      |
| <i>Limfociti Th1</i>                              |       |                         |
| V odstotkih od limfocitov Th:                     | 26 %  | (normalno 15 do 21 %)   |
| <i>Limociti Th2</i>                               |       |                         |
| V odstotkih od limfocitov Th:                     | 3 %   | (normalno 2 do 5 %)     |
| <i>Limfociti Th17</i>                             |       |                         |
| V odstotkih od limfocitov Th:                     | 0,5 % | (normalno 2,5 do 12 %)  |
| <i>Limfociti Treg (CD25++ med CD4)</i>            |       |                         |
| V odstotkih od limfocitov Th:                     | 14 %  | (normalno 4,5 do 9,1 %) |
| <i>Celice α/βDNT (CD4- CD8-)</i>                  |       |                         |
| V odstotkih od limfocitov T:                      | 9 %   | (normalno do 4 %)       |
| <i>Celice γ/δDNT</i>                              |       |                         |
| V odstotkih od limfocitov T:                      | 3 %   | (normalno do 5 %)       |

Komentar analize dozorevanja limfocitov T

Odstopanja:

- Povečan delež aktiviranih limfocitov T
- Povečan delež limfocitov Th1
- Zmanjšani delež limfocitov Th17

- Povečan delež Treg
- Povečan delež  $\alpha/\beta$ DNT

Mnenje: Normalna timična produkcija limfocitov T, zelo povečana kronična aktivacija citotoksičnega imunskega odziva, motnja uravnavanja aktivacije limfocitov T

### **Viri:**

1. Vozelj M. Temelji imunologije. 2000. 1. izdaja. Ljubljana, DZS.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS : Cellular and Molecular Immunology , Third/ Fourth Edition , W B Saunders Company , Philadelphia , London, Toronto , Montreal , Sydney , Tokyo , 2010
3. Romagnani S. 1991. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. Immunology Today; 12: 256–7
4. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. Cell, 124, 4: 783–801
5. Gubina M, Ihan A, eds. Medicinska bakteriologija z imunologijo. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2002.
6. Tosi MF. Innate immune responses to infection. J Allergy Clin Immunol. 2005; 116: 241-9.
7. Powell T.J. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. Vaccine 2007;25: 763–775
8. Akira S., Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. Nature Reviews: Immunology, 4: 499–511
9. Fiore AE, Bridges CB, Cox NJ (2009). »Seasonal influenza vaccines«. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 333: 43–82.
10. Chang Y, Brewer NT, Rinas AC, Schmitt K, Smith JS . Evaluating the impact of human papillomavirus vaccines. Vaccine 2009; 27: 4355–62.
11. Charles A Janeway, Jr, Paul Travers, Mark Walport, and Mark J Shlomchik I. Immunobiology, 5th edition. New York: Garland Science; 2001.

