

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Imunologie



Bc. Bohumil Ptáček

Role B lymfocytů v dysregulaci imunitního systému
v imunopatologických stavech

The role of B lymphocytes in dysregulation of the immune system
in immunopathological conditions

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. MUDr. Tomáš Milota, Ph.D.

Praha, 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 03.08.2025

Bohumil Ptáček

Poděkování

Rád bych vyjádřil své poděkování RNDr. Jitce Smetanové, Ph.D., doc. MUDr. Tomáši Milotovi, Ph.D. i celému kolektivu Ústavu imunologie FN Motol za jejich pomoc, vedení a trpělivou podporu při realizaci tohoto projektu i zpracování diplomové práce.

Abstrakt

Běžná variabilní imunodeficiencie patří mezi nejčastější a klinicky nejvýznamnější primární imunodeficiencie. Je charakterizována především porušenou tvorbou protilátek a komplexní dysregulací imunitního systému, která u části pacientů vede k rozvoji neinfekčních komplikací autoimunitní, lymfoproliferativní či jiné povahy. V této práci jsme se zaměřili na imunofenotypizaci a funkční charakteristiku B lymfocytů u pacientů s tímto onemocněním. Zvláštní pozornost jsme věnovali subpopulaci tzv. CD21low B lymfocytů, která je spojována s patogenezí neinfekčních komplikací a prozánětlivým funkčním profilem. Na základě exprese povrchových znaků IgD a CD27 jsme definovali čtyři subpopulace CD21low B buněk: naive-like, marginal zone-like, double negative-like a class-switched-like CD21low lymfocyty – a analyzovali jejich zastoupení a funkční odlišnosti.

Na úrovni B lymfocytů jsme u pacientů pozorovali pokles celkových paměťových a paměťových B lymfocytů po izotypovém přesmyku spolu s expanzí naivních B lymfocytů; současně jsme na úrovni CD21low B lymfocytů pozorovali expanzi naive-like a marginal zone-like populací. Dále jsme analyzovali odpověď B lymfocytů na *in vitro* stimulaci prostřednictvím BCR, CD40 a TLR receptorů. V rámci celkové populace B lymfocytů nebyly mezi pacienty a zdravými kontrolami pozorovány významné rozdíly v expresi aktivačních molekul, avšak B buňky pacientů vykazovaly zvýšenou expresi integrinu CD11c, chemokinového receptoru CXCR3 a transkripčního faktoru T-bet. Při analýze CD21low B lymfocytů byly po stimulaci zaznamenány rozdíly v expresi aktivačních molekul (CD40, HLA-DR, CD80/86) mezi jednotlivými subpopulacemi. Analýza nestimulovaných buněk pak odhalila odlišnosti i v expresi dalších znaků (CD11c, T-bet, CXCR3 a CCR7). Tyto nálezy poukazují na výraznou funkční heterogenitu mezi subpopulacemi CD21low B buněk.

V závěrečné části projektu jsme se zaměřili na produkci cytokinů B lymfocyty a na vybrané sérové zánětlivé markery. Dosavadní poznatky o cytokinovém prostředí běžné variabilní imunodeficiencie jsou nejednotné, avšak potenciálně důležité pro porozumění patogeneze tohoto onemocnění. V naší analýze jsme zjistili zvýšenou produkci IL-4 a naopak sníženou produkci IL-12 (p40) u *in vitro* stimulovaných B lymfocytů pacientů oproti kontrolám. V séru u pacientů jsme pak nezávisle na klinické manifestaci onemocnění identifikovali zvýšené hladiny prozánětlivých markerů YKL-40 a sérového amyloidu A.

Klíčová slova: B lymfocyty, běžná variabilní imunodeficiencie, průtoková cytometrie

Abstract

Common variable immunodeficiency is one of the most frequent and clinically significant primary immunodeficiencies. It is characterized by impaired antibody production and complex immune dysregulation, which in a subset of patients leads to the development of non-infectious complications, including autoimmune diseases, lymphoproliferative disorders, or other manifestations. In this study, we focused on the immunophenotyping and functional characterization of B lymphocytes in patients with common variable immunodeficiency. Particular attention was given to the CD21^{low} B cell subset, which is associated with the pathogenesis of non-infectious complications and a pro-inflammatory profile. We defined four CD21^{low} subpopulations based on the expression of surface markers IgD and CD27 – naïve-like, marginal zone-like, double negative-like, and class-switched-like – and we analyzed their distribution and functional differences.

We observed a reduction in total memory and class-switched memory B cells in our patient group, along with an expansion of naïve B cells. There was also an expansion of naïve-like and marginal zone-like subpopulations within the CD21^{low} B cell compartment in patients. We further examined the response of B lymphocytes to *in vitro* stimulation via BCR, CD40, and TLR receptors. While no significant differences were found in the expression of activation markers in total B cells between patients and healthy controls, patient B cells displayed an increased expression of the integrin CD11c, the chemokine receptor CXCR3, and the transcription factor T-bet. Analysis of the CD21^{low} compartment revealed stimulation-dependent differences in the expression of activation molecules (CD40, HLA-DR, CD80/86) across the defined subpopulations; moreover, unstimulated cells showed differences in the expression of CD11c, T-bet, CXCR3, and CCR7. These findings underscore a significant functional heterogeneity among CD21^{low} B cell subpopulations.

In the final part of the study, we investigated cytokine production by B lymphocytes and selected serum inflammatory markers. Current knowledge regarding the cytokine environment in common variable immunodeficiency remains inconsistent, yet it is potentially important for understanding disease pathogenesis. Our analysis revealed increased IL-4 and decreased IL-12 (p40) production by *in vitro* stimulated B cells from patients compared to controls. We identified elevated levels of pro-inflammatory markers YKL-40 and serum amyloid A in patients' serum independently of clinical manifestations of the disease.

Keywords: B lymphocytes, common variable immunodeficiency, flow cytometry

Seznam použitých zkratek

ABC	s věkem asociovaný B lymfocyt
BCR	B buněčný receptor
BTK	Brutonova tyrosin-kináza
CpG ODN	cytosin-guanin oligodeoxynukleotid
CRP	C-reaktivní protein
CS-like	class-switched-like
CVID	běžná variabilní imunodeficience
DN-like	double negative-like
ESID	Evropská společnost pro imunodeficience
HSC	hematopoetická kmenová buňka
ICON	Dokument mezinárodního konsenzu
IUIS	Mezinárodní unie imunologických společností
LPS	lipopolysacharid
MFI	průměrná intenzita fluorescence
MZB	B lymfocyt marginální zóny
MZ-like	marginal zone-like
PAD	primární protilátková imunodeficience
PBMC	mononukleární buňky periferní krve
PID	primární imunodeficience
PIK	pouze infekční komplikace
SAA	sérový amyloid A
SCID	těžká kombinovaná imunodeficience
VNK	významné neinfekční komplikace
XLA	X-vázaná agamaglobulinémie

Obsah

Úvod.....	4
1. Literární přehled.....	5
1.1. Primární imunodeficiencie	5
1.2. Primární protilátkové deficiencie	7
1.3. Vývoj a diferenciacie B lymfocytů.....	10
1.4. Běžná variabilní imunodeficiencie	13
1.4.1. Základní charakteristika onemocnění	13
1.4.2. Diagnostika	15
1.4.3. Klinická manifestace.....	17
1.4.4. Léčba.....	19
1.4.5. Dysregulace imunitního systému spojená s COVID	20
1.5. CD21low B lymfocyty	22
2. Cíle práce.....	24
3. Materiály a metody.....	25
3.1. Vzorky periferní krve	25
3.2. Činidla, roztoky a média.....	28
3.3. Protokoly	30
3.3.1. Protokol zpracování periferní krve	30
3.3.2. Protokol rozmrazení buněk	30
3.3.3. Protokol izolace a stimulace buněk pro Luminex esej.....	31
3.3.4. Protokol pro Luminex esej.....	32
3.3.5. Protokol pro ELISA stanovení hladiny YKL-40	32
3.3.6. Stanovení dalších zánětlivých markerů.....	33
3.4. Příprava panelů pro průtokovou cytometrii.....	34
3.5. Příprava a analýza vzorků pro průtokovou cytometrii	39
3.5.1. Příprava vzorků pro základní B lymfocytární panel	39
3.5.2. Příprava vzorků pro další panely	39
3.5.3. Gatovací strategie.....	40
3.6. Statistické zpracování dat.....	42

4.	Výsledky.....	43
4.1.	Charakterizace B lymfocytárních subpopulací.....	43
4.2.	Expres aktivčních markerů na stimulovaných B lymfocytech.....	46
4.3.	Expres funkčních znaků na nestimulovaných B lymfocytech	51
4.4.	Analýza cytokinového prostředí	56
4.5.	Analýza sérové hladiny vybraných zánětlivých markerů.....	57
5.	Diskuze.....	59
6.	Závěr.....	68
	Seznam použité literatury	70
	Přílohy	83

Úvod

Primární imunodeficiencie představují heterogenní skupinu vrozených poruch imunity, které se liší svým genetickým základem, klinickými projevy i mírou postižení jednotlivých složek imunitního systému. Jedním z nejčastějších primárních imunodeficitů u dospělých je běžná variabilní imunodeficiencie (common variable immunodeficiency, CVID), charakterizovaná poruchou diferenciací B lymfocytů, hypogamaglobulinémií a zvýšenou náchylností k infekcím, ovšem spojená i s vysokou četností výskytu neinfekčních komplikací.

CVID vykazuje výraznou klinickou i imunologickou variabilitu. Zatímco u některých pacientů se onemocnění projevuje převážně závažnými či recidivujícími infekcemi, u jiných dominují autoimunitní, granulomatózní nebo lymfoproliferativní projevy. Tyto rozdíly pravděpodobně odrážejí různou míru a povahu poruch regulace imunitní odpovědi, a to zejména v rámci B lymfocytární linie. V posledních letech se proto intenzivně studují jak fenotypové charakteristiky jednotlivých B buněčných subpopulací u CVID pacientů, tak jejich funkční odpověď na stimulační podněty.

Tato diplomová práce se zaměřuje na analýzu vybraných B buněčných subpopulací a jejich imunitní odpovědi u pacientů s CVID v porovnání se zdravými kontrolami. Pozornost je pak rovněž věnována analýze rozdílů mezi pacienty s převážně infekčními komplikacemi a těmi, u nichž převažují projevy neinfekční povahy.

1. Literární přehled

1.1. Primární imunodeficience

Primární imunodeficience (PID) představují heterogenní skupinu vrozených poruch imunitního systému. Jedná se o geneticky podmíněná onemocnění, která mohou ovlivnit jak vrozenou, tak adaptivní složku imunity. Genetické příčiny těchto onemocnění vykazují značnou variabilitu – některé PID jsou způsobeny mutací jednoho genu, jedná se tedy o monogenní formy onemocnění, jiné vznikají na podkladě komplexní dědičnosti s multifaktoriálními vlivy a pestrými klinickými manifestacemi. Jako příklad typické monogenní PID lze uvést X-vázanou agamaglobulinémii (X-linked agammaglobulinemia, XLA), u které dochází k mutaci v Brutonově tyrosin-kináze (BTK). Multifaktoriálním podkladem se naopak vyznačuje CVID, které je věnována hlavní část této práce (Bousfiha et al., 2020).

Absolutní počet známých genetických příčin PID i počet diagnostikovaných pacientů v posledních letech dramaticky narůstá. V současnosti je popsáno okolo pěti set genetických defektů, které lze na základě fenotypových a molekulárně-genetických charakteristik podle Mezinárodní unie imunologických společností (International Union of Immunological Societies, IUIS) klasifikovat do deseti hlavních kategorií PID – viz Tabulka 1 (Quinn et al., 2022; Tangye et al., 2022). K variabilitě některých PID navíc kromě dědičné složky významně přispívají i environmentální faktory, které mohou ovlivnit jak rozvoj, tak fenotypový projev a v důsledku také diagnostiku těchto onemocnění (Bousfiha et al., 2020).

Přes velkou rozdílnost PID je možno jejich klinickou manifestaci zjednodušeně rozdělit do dvou hlavních skupin. První typ komplikací představují oportunní, chronické nebo recidivující infekce. Druhý typ komplikací pak tvoří neinfekční onemocnění spojená s dysregulací imunitního systému. Patří sem zejména autoimunitní onemocnění, malignity, chronické zánětlivé procesy, lymfoproliferativní poruchy či alergie (Amaya-Urbe et al., 2019).

Kategorie		Příklad nemocnění	Genetická porucha
1	Kombinované ID	SCID; hyper-IgM syndrom	CD132, RAG-1/2; CD40/CD40L
2	Kombinované ID se syndromickými znaky	Hyper-IgE syndrom	STAT3
3	Primární protilátkové ID	X-vázaná agamaglobulinémie; CVID	Brutonova tyrosin-kináza; spíše multifaktoriální
4	Poruchy regulace imunitního systému	Syndrom IPEX	FoxP3, CD25
5	Vrozené poruchy fagocytózy	Chronická granulomatózní choroba	NADPH-oxidáza
6	Poruchy vrozené imunity	Chronická mukokutánní kandidóza	IL-17R-A/C, IL-17F, STAT1
7	Autoinflamatorní poruchy	STING-asociovaná vaskulitida	STING
8	Vrozené poruchy komplementu	Deficit C1 inhibitoru	C1q/r/s
9	Vrozená selhání kostní dřeně	Fanconiho anemie	různé geny a varianty
10	Fenokopie vrozených poruch imunity	Autoimunitní lymfoproliferativní syndrom	Somatická mutace <i>TNFRSF6</i>

Tabulka 1: Kategorie primárních imunodeficiencí podle IUIS

Přepřacováno podle Tangye et al., 2022.

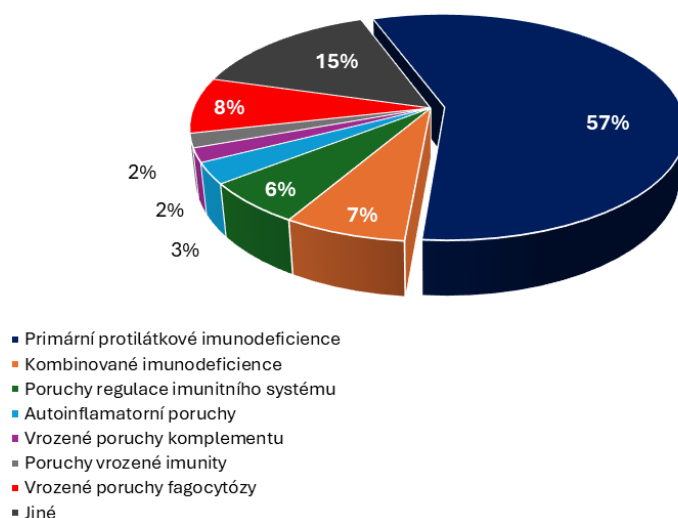
(ID – imunodeficiency, IPEX – imunitní dysregulace, polyendokrinopatie, enteropatie, X-vázaný syndrom, RAG – recombination-activating gene, SCID – těžká kombinovaná imunodeficiency, STAT – signal transducer and activator of transcription, STING – stimulator interferonových genů)

Klinicky nejzávažnější formou PID jsou těžké kombinované imunodeficiency (severe combined immunodeficiencies, SCID). Ty se klinicky manifestují již v prvních měsících života závažnými, život ohrožujícími infekcemi. Bez včasné diagnózy a léčby proto bývají důsledky těchto imunodeficitů fatální. Zásadním nástrojem v časnou detekci SCID je nedávno zavedený novorozenecký screening založený na principu detekce TREC/KREC řetězců (vznikajících při přeskupování genetických segmentů pro lymfocytární receptory), jenž umožňuje zahájit léčbu ještě před propuknutím závažných komplikací. Potenciálním řešením PID může být transplantace hematopoetických kmenových buněk, vedle ní je v současnosti experimentálně zkoumána také léčba pomocí genové terapie (Marinova et al., 2022, Sobrino et al., 2023; Tangye et al., 2022).

Z kombinovaných imunodeficiencí se syndromatickými rysy lze uvést hyper-IgE syndrom, který se vyznačuje zvýšenými hladinami protilátek ve třídě IgE a predispozicí k těžkým bakteriálním infekcím, ekzémům nebo poruchám pojivové tkáně (Minegishi, 2021). Mezi onemocnění postihující proces fagocytózy patří například chronická granulomatózní choroba, jejíž příčinou je defekt NADPH-oxidázy, tedy enzymu nezbytného pro tzv. oxidativní vzplanutí fagocytů a tvorbu reaktivních kyslíkových forem. Jeho dysfunkce vede ke zvýšené náchylnosti k infekcím, tvorbě granulomů a chronickým zánětům (Justiz-Vaillant et al., 2023; Sobrino et al., 2023). Velmi zajímavě se klinicky manifestuje chronická mukokutánní kandidóza, která je příkladem onemocnění spadající do vrozených poruch imunity. U pacientů s tímto onemocněním dochází k narušení Th17 imunitní odpovědi na podkladě defektní funkce signálních STAT molekul, manifestující se recidivujícími kvasinkovými infekcemi, ale rovněž se rozvíjí autoimunitní onemocnění, což podtrhuje komplexitu projevů PID (Borgström et al., 2023; Shamriz et al., 2020).

1.2. Primární protilátkové deficience

Zásadní význam v rámci PID zaujímají vzhledem ke své vysoké prevalenci (Obrázek 1) primární protilátkové deficience (primary antibody deficiencies, PAD), které tvoří přibližně polovinu všech diagnostikovaných PID (El-Helou et al., 2019; Quinn et al., 2022).



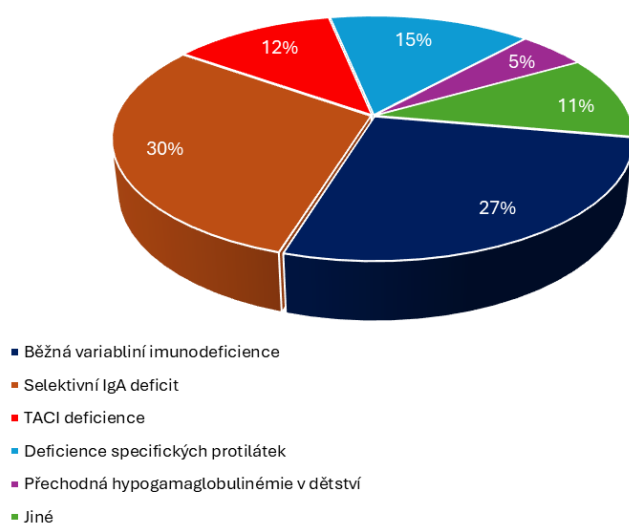
Obrázek 1: Relativní četnosti kategorií PID

Přepřeváno podle El-Helou et al., 2019.

Etiopatogeneze PAD je velmi rozmanitá a zahrnuje poruchy jak na úrovni vývoje B lymfocytů, tak v jejich funkci či interakcích s ostatními složkami imunitního systému. Tyto defekty mohou vést k úplné absenci B buněk v periférii – jako v případě XLA, kdy díky defektu genu pro BTK nedochází k tvorbě a dozrání B lymfocytů. U dalších PAD jsou přítomny cirkulujícími B lymfocyty v periferní krvi, ty se ale vyznačují abnormální funkcí. Poruchy funkce B lymfocytů se projevují několika způsoby – sníženou produkcí imunoglobulinů jedné nebo více tříd, případně neschopností tvorby specifických protilátek vůči některým antigenům. Významnou roli v rozvoji PAD hraje také narušená souhra mezi B lymfocyty a dalšími buňkami imunitního systému – zejména pomocnými T lymfocyty, které jsou nezbytné pro aktivaci B lymfocytů, funkci germinálních center a vývoj plazmatických buněk. Poruchy v těchto oblastech vedou k selhání humorální odpovědi i v přítomnosti jinak funkčních B lymfocytů (Chakraborty et al., 2023; Cousin et al., 2023; Fried & Bonilla, 2009).

Klinický obraz PAD lze obecně rozdělit na obdobné skupiny infekčních a neinfekčních komplikací jako u PID. Jednotlivé PAD se ovšem zásadně liší svou prevalencí i klinickou závažností. Závažným, ale velmi vzácným (prevalence cca 1:100 000-200 000) onemocněním je výše zmíněná XLA. Typicky se projevuje již v prvních měsících života, po poklesu mateřských IgG, a to opakovanými infekcemi respiračního a trávicího traktu, často způsobenými *S. pneumoniae*, *H. influenzae* či enteroviry (Cardenas-Morales & Hernandez-Trujillo, 2022).

Na pomyslném druhém konci klinického spektra se nachází selektivní deficit IgA, nejčastější primární imunodeficience vůbec (Obrázek 2) s prevalencí okolo 1:600-1000 (Vosughimotlagh et al., 2023; Yel, 2010). Část pacientů se selektivním IgA deficitem je asymptomatická, u zbytku dochází typicky k opakovaným mukózním infekcím (zejména dýchacích cest), gastrointestinálním potížím (např. průjmy, infekce *Giardia lamblia*) a vyššímu výskytu autoimunitních onemocnění či alergií (Bagheri et al., 2023; Vosughimotlagh et al., 2023; Yazdani et al., 2017).



Obrázek 2: Relativní četnosti PAD

Přepřacováno podle Gerber, 2019.

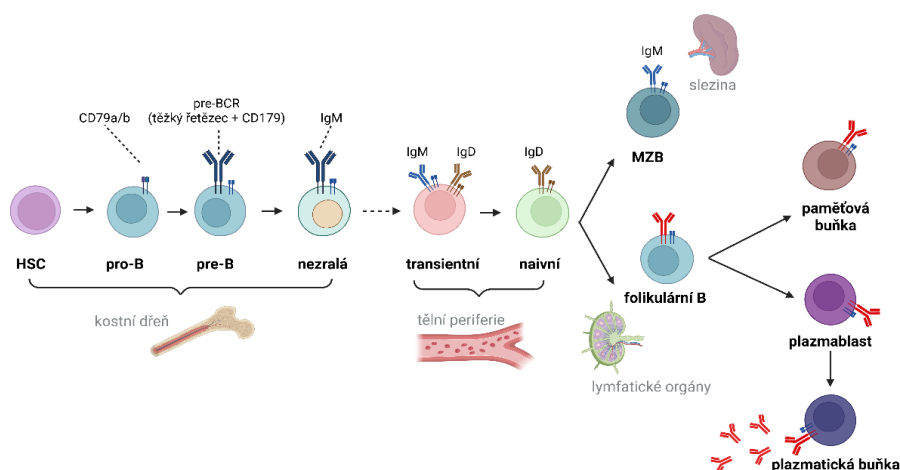
K dalším PAD s vyšší prevalencí (Obrázek 2) patří deficit specifických protilátek, u něhož jsou hladiny imunoglobulinů normální, ale selhává odpověď na polysacharidové antigeny (např. u pneumokokové vakcíny). Klinicky se manifestuje zejména u dětí rekurentními infekcemi dýchacích cest (Kashani et al., 2015). U kojenců a batolat se může rovněž projevit přechodná hypogamaglobulinémie charakterizovaná opožděnou normalizací hladin IgG s klinickým obrazem lehkých infekcí horních cest dýchacích. Ve většině případů dochází k spontánní úpravě do třetího roku života (Ameratunga et al., 2019). V posledních letech je také stále více diagnostikována mutace v *TNFRSF13B* genu, kódujícím TACI receptor (Tabulka 3). Tyto pacienty často charakterizují klinické a imunologické rysy částečně se překrývající s CVID, avšak jejich fenotyp může být i asymptomatický (Ho & Cunningham-Rundles, 2020).

1.3. Vývoj a diferenciacie B lymfocytů

Vzhledem k výše zmíněné důležitosti vývojových a diferenciacních mechanismů B buněk v rozvoji PAD budou tyto procesy stručně popsány v následujících pasážích.

Vývoj B lymfocytů začíná v kostní dřeni z multipotentní hematopoetické kmenové buňky (hematopoietic stem cell, HSC). Z té dále vzniká společná lymfoidní progenitorová buňka, která představuje výchozí bod pro vývoj B, T, NK buněk a přirozených lymfoidních populací. Vývoj B buněk dále prochází přes stádia pro-B a pre-B až k nezralé B buňce. Jednotlivá stádia se liší především rekombinačními procesy a expresí B buněčného receptoru (B cell receptor, BCR) různého stupně vývoje, jak je ilustrováno na Obrázku 3 (Pieper et al., 2013).

Klíčovým milníkem ve vývoji je exprese funkčního BCR. Struktura BCR sestává z membránově vázaného imunoglobulinu, dimeru signalizačních molekul CD79A a CD79B (Ig α /Ig β) a dalších pomocných proteinů. Variabilitu výsledného receptorového repertoáru (mimo jiné) zajišťuje somatická rekombinace genových segmentů V, D a J, která probíhá především za účasti enzymatického komplexu RAG-1/RAG-2 (Schatz & Swanson, 2011). Přeskupování segmentů těžkého řetězce začíná ve fázi pro-B buněk a po jeho úspěšném dokončení se buňka přesouvá do stádia pre-B lymfocytu. Zde dochází k expresi tzv. pre-BCR, který tvoří těžký řetězec ve spojení s náhradním lehkým řetězcem (VpreB/ λ 5, CD179) a signalizačním komplexem CD79A/B. Signalizace přes pre-BCR je nezbytná pro další proliferaci, přežití a vstup do fáze přeskupování lehkého řetězce. Po jeho dokončení buňka exprimuje kompletní BCR ve třídě IgM/D a stává se nezralým B lymfocytom schopným opustit kostní dřeň (Eibel et al., 2014; Tangye et al., 2023).



Obrázek 3: **Zjednodušený přehled vývoje a periferních subpopulací B lymfocytů**

Vytvořeno v programu BioRender.

(HSC – hematopoetická kmenová buňka, MZB – B lymfocyt marginální zóny)

Nejranějšími B buňkami v periférii jsou tzv. transientní B lymfocyty (Obrázek 3), představující přechodné stádium mezi nezralou a plně maturovanou naivní B buňkou. U člověka se tyto buňky nacházejí převážně v kostní dřeni, krvi, slezině a lymfatických uzlinách. Největší podíl periferních B buněk však tvoří právě naivní B lymfocyty – funkčně zralé buňky, které dosud nebyly stimulovány antigenem. Naivní B lymfocyty se dále dělí na folikulární B buňky, lokalizované v B buněčných folikulech sekundárních lymfatických orgánů, a na B lymfocyty marginální zóny (marginal zone B cells, MZB), které se vyskytují převážně v oblasti marginální zóny – tedy na rozhraní mezi bílou a červenou pulpou sleziny. V menším zastoupení se však MZB lymfocyty vyskytují také v krvi a dalších lymfatických tkáních. Jejich hlavní úlohou je rychlá produkce protilátek ve třídě IgM během T-nezávislých imunitních odpovědí, zejména proti polysacharidovým antigenům (Palm & Kleinau, 2021; Sanz et al., 2019; Velounias & Tull, 2022).

Po antigenní stimulaci se naivní B buňky mohou diferencovat několika směry. Část z nich prolifерuje a diferencuje se na krátce žijící plazmatické buňky produkují převážně protilátky ve třídě IgM. Další část buněk vstupuje do germinálních center, kde podstupuje intenzivní proliferaci a následně procesy somatické hypermutace a izotypového přesmyku. Somatická hypermutace vede ke vzniku variant BCR s vyšší afinitou k danému antigenu, zatímco izotypový přesmyk umožňuje změnu třídy protilátky na IgG, IgA nebo IgE podle kontextu imunitní odpovědi. Výsledkem těchto procesů je vznik dvou hlavních efektorových populací – paměťových B buněk, které přetrvávají v klidovém stavu a umožňují rychlou odpověď při opakovaném setkání s antigenem, a dlouho žijících plazmatických buněk v kostní dřeni, schopných kontinuální produkce vysokoafinních protilátek (Chi et al., 2020; Sanz et al., 2019; Velounias & Tull, 2022).

Subpopulace B lymfocytů se liší fenotypově i funkčně a rozlišují se především podle exprese povrchových markerů (Tabulka 2). Mezi nejčastěji používané markery patří zejména CD19, CD20, CD24, CD27, CD38 a IgD. K bližší charakterizaci B lymfocytů slouží například další izotypy BCR (IgM, IgG), kostimulační molekuly (CD80/86, CD40), adhezivní molekuly, chemokinové receptory (CXCR5, CXCR3), transkripční faktory, proliferační markery a řada dalších (Pieper et al., 2013).

Subpopulace	Fenotyp	Přibližný relativní počet
Transientní	CD19 ⁺ IgD ^{low/+} CD27 ⁻ CD24 ⁺⁺ CD38 ⁺⁺	~3 %
Naivní	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁻ CD38 ^{+/-} CD24 ^{+/-}	50-70 %
Paměťové	CD19 ⁺ IgD ⁻ CD27 ⁺ CD38 ^{+/-} CD24 ^{+/-}	30-40 %
Plazmablasty	CD19 ⁺ IgD ⁺ IgM ⁻ CD38 ⁺	~ 5 %
Plazmatické buňky	CD19 ^{+/-} IgD ⁻ CD27 ⁺⁺ CD38 ⁺⁺ CD24 ⁻	~ 3 %
MZB	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	15-25 %
CD21 ^{low} buňky	CD19 ⁺ CD21 ^{low} CD38 ^{low/-}	1-8 %

Tabulka 2: Přehled B lymfocytárních subpopulací v periferní krvi
Upraveno podle: Carsetti et al., 2022; Sanz et al., 2019; Warnatz & Schlesier, 2008.
(MZB – B lymfocyty marginální zóny)

1.4. Běžná variabilní imunodeficience

1.4.1. Základní charakteristika onemocnění

CVID představuje heterogenní skupinu protilátkových imunodeficiencí, charakterizovanou sníženou produkcí protilátek ve třídě IgG, IgA a/nebo IgM. V důsledku toho se u pacientů projevuje zvýšená náchylnost k infekcím či rozvoj komplikací neinfekční povahy (Ameratunga et al., 2020).

CVID je druhou nejčastější primární protilátkovou deficiencí po selektivním deficitu IgA. Prevalence se odhaduje na 1:25 000 až 1:50 000, přičemž údaje se liší mezi regiony a korelují s vyspělostí zdravotního systému a zavedením národních registrů pacientů (Weifenbach et al., 2020). Nejvyšší prevalence byla zaznamenána v USA, nejnižší v Africe či na Blízkém východě. V Evropě byla popsána vyšší prevalence v severských zemích (např. Dánsko a Island) a nižší v jižních státech (jako jsou Francie a Španělsko) (Selenius et al., 2017).

CVID představuje onemocnění s komplexní multifaktoriální etiopatogenezí. Monogenní příčina rozvoje je identifikována pouze u menšiny pacientů, přibližně v 10–15 % případů. Mezi tyto příčiny patří mutace v genech kódujících proteiny asociované s BCR, molekuly zajišťující kostimulaci nebo regulaci funkce lymfocytů, případně komponenty buněčné signalizace a regulace genové exprese (Peng et al., 2023; Thaventhiran et al., 2020; Yazdani et al., 2020). Přehled vybraných monogenních příčin CVID je uveden v Tabulce 3.

Výzkumy z poslední doby naznačují význam environmentálních a epigenetických změn v patogenezi CVID. Nejvýznamnější epigenetické změny se zřejmě odehrávají na úrovni metylace DNA. Ta je enzymaticky zajišťována DNA-metyltransferázami, které svou činností zásadně ovlivňují genovou expresi daného úseku DNA. Analýzy B lymfocytů z jednovaječných dvojčat, z nichž pouze jedno trpělo CVID, odhalily zvýšenou míru metylace DNA v genech klíčových pro aktivaci, proliferaci a diferenciaci B buněk (Rodríguez-Cortez et al., 2015; Rodríguez-Ubreva et al., 2022). Další práce ukázaly, že během přechodu z naivních na paměťové B buňky dochází u zdravých jedinců k demetylace specifických CpG oblastí v genech spojených s funkcí B buněk. U pacientů s CVID je však proces demetylace narušen, což ukazuje na možné vysvětlení dysregulovaného vývoje a funkce B lymfocytů (DelPino-Molina et al., 2019). Z environmentálních faktorů je možné zmínit práce zabývající se vlivem dysbiózy střevního mikrobiomu na rozvoji neinfekčních komplikací viz dále.

Molekula	Název	Charakteristika	Funkce
CD19		kostimulační molekuly BCR	aktivace B lymfocytů, afinitní maturace
CR2 (CD21)	complement receptor type 2		
CD81			
CD20			
BAFF	B cell activating factor	molekuly, receptory a ligandy TNF rodiny	role v maturaci, přežívání a funkci B lymfocytů
BAFF-R	B cell activating factor receptor		
APRIL	a proliferation-inducing ligand		
TWEAK	TNF-related weak inducer of apoptosis		
TACI	transmembrane activator and CAML interactor		
CD27			
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte associated protein 4	regulační molekuly T lymfocytů	regulace funkce a proliferace B lymfocytů
LRBA	lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein		
ICOS	inducible T cell costimulator	kostimulační molekula	B buněčná proliferace a diferenciaci
NFKB-2	nuclear factor kappa B subunit 2	transkripční faktor	vývoj B lymfocytů, produkce protilátek, regulace imunitní odpovědi
PI3-KCD	phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit delta	signalizační molekula	vývoj, proliferace, migrace a funkce B lymfocytů

Tabulka 3: Přehled vybraných monogenních příčin CVID

Přepřacováno podle Ho & Cunningham-Rundles, 2020 a Peng et al., 2023.

1.4.2. Diagnostika

Heterogenita příčin a klinických projevů CVID významně ztěžuje diagnostiku, existuje proto více postupů k jejímu stanovení. V Tabulce 4 jsou uvedeny dva nejčastější diagnostické přístupy – diagnostická kritéria Evropské společnosti pro imunodeficiencie (European Society for Immunodeficiencies, ESID) a Dokument mezinárodního konsenzu (International Consensus Document, ICON).

Oba diagnostické systémy se shodují na základních laboratorních kritériích – tedy přetrvávající hypogamaglobulinémii a poruše specifické protilátkové odpovědi. Hypogamaglobulinémie je definována jako významné snížení sérové koncentrace IgG a současně IgA a/nebo IgM vzhledem k věkovým referenčním hodnotám, potvrzené opakovaným měřením. Porucha specifické protilátkové odpovědi se stanovuje na základě nedostatečné odpovědi na očkování T-dependentními (např. tetanický a difterický toxoid) i T-independentními antigeny (např. polysacharidy meningokoků a pneumokoků) (Ameratunga et al., 2014, 2021).

Diagnostická kritéria ESID se liší od systému ICON tím, že kromě laboratorních nálezů vyžadují i přítomnost alespoň jedné klinické komplikace infekčního nebo neinfekčního charakteru. Podpůrné informace může dále poskytnout rodinná anamnéza primárních imunodeficiencí (Ameratunga et al., 2020; Bonilla et al., 2016; Yazdani et al., 2020).

Při diagnostice je taktéž nezbytné vyloučit sekundární příčiny hypogamaglobulinémie a poruch protilátkové odpovědi, které mohou být způsobeny například užíváním imunosupresiv (zejména glukokortikoidů), infekcí HIV, hematologickou malignitou nebo ztrátami imunoglobulinů při nefrotickém syndromu (Bonilla et al., 2016).

Kritérium	ESID	ICON
Věk v době diagnózy	– diagnóza stanovená po čtvrtém roce života	– diagnóza stanovená po čtvrtém roce života
Sérové hladiny imunoglobulinů	– výrazné snížení IgG a IgA s/bez snížení IgM – měřeno min.2x, pod 2 SD normálních hodnot pro daný věk	– opakovaně prokázané snížené koncentrace IgG pod dolní referenční mez – snížení alespoň jednoho dalšího izotypu (IgA nebo IgM)
Protilátková odpověď	– snížená odpověď na vakcíny – absence ochranných hladin protilátek navzdory vakcinaci – snížený počet paměťových B lymfocytů po izotypovém přesmyku	– snížená protilátková odpověď po vakcinaci alespoň jedním typem antigenu (T-dependentním nebo T-independentním)
Klinické projevy	– alespoň jeden z následujících: zvýšená náchylnost k infekcím autoimunitní projevy granulomatózní onemocnění lymfoproliferace výskyt PAD v rodinné anamnéze	– přítomnost klinické manifestace imunodeficitu není nutná (pokud jsou splněna ostatní kritéria)
Vyloučení sekundárních příčin	– vyloučeny sekundární příčiny hypogamaglobulinémie	– vyloučeny jiné příčiny hypogamaglobulinémie
T-buněčná funkce	– žádný důkaz o deficitu T-lymfocytů	– není specifikováno

Tabulka 4: Porovnání diagnostických kritérií CVID podle Evropské společnosti pro imunodeficienci (ESID) a Dokument mezinárodního konsenzu (ICON)

Přepřacováno podle Ameratunga et al., 2014, 2021.

(PAD – primární protilátková deficiencie, SD – směrodatná odchylka)

1.4.3. Klinická manifestace

Klinická prezentace CVID je mimořádně pestrá a zahrnuje jak časté infekční komplikace, tak závažné projevy neinfekčního charakteru.

Infekční komplikace

Náchylnost k opakovaným a perzistujícím infekcím představuje nejtypičtější manifestaci CVID. Infekce nejčastěji postihují respirační trakt, kde se rozvíjejí akutní či chronické bronchitidy, sinusitidy a pneumonie. Infekce však mohou zasahovat i trávicí trakt, močové cesty nebo nervový systém. K typickým bakteriálním původcům infekcí dýchací soustavy patří *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a *Staphylococcus aureus*. V zažívacím traktu pak dominují infekce způsobené *Giardia lamblia*, *Campylobacter jejuni* či *Salmonella* spp. V některých případech se u pacientů projevuje zvýšená vnímavost k virovým agens, jako jsou *Rhinovirus* nebo *Herpes zoster virus* (Janssen et al., 2021; Oksenhendler et al., 2008; Quinti et al., 2007).

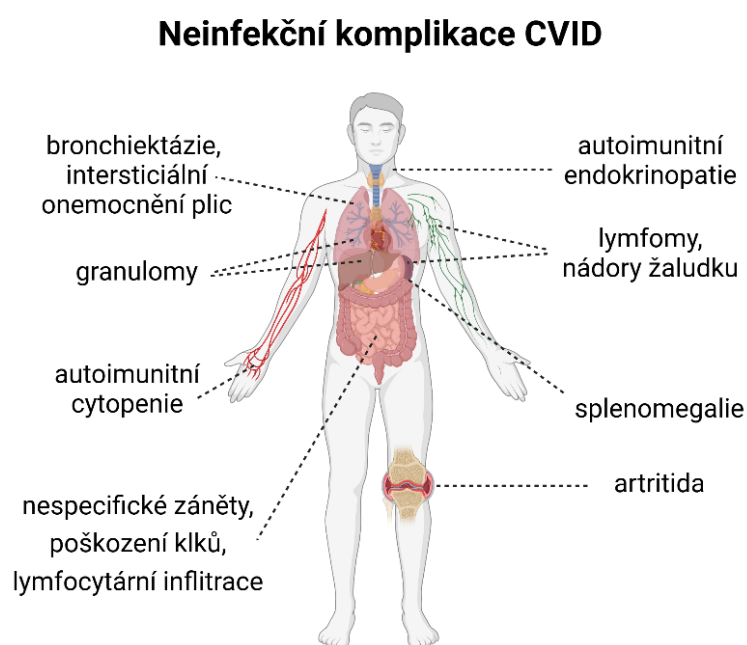
Neinfekční komplikace

U přibližně dvou třetin pacientů se v průběhu života rozvíjejí komplikace neinfekční povahy (ilustrovány na Obrázku 4). Mezi nejčastější patří autoimunitní poruchy, zejména cytopenie – idiopatická trombocytopenická purpura, autoimunitní hemolytická anémie či neutropenie. Méně časté, avšak klinicky významné jsou i revmatoidní artritida, autoimunitní tyreoiditida nebo další orgánově specifická autoimunitní onemocnění (Ho & Cunningham-Rundles, 2020; Janssen et al., 2021; Resnick et al., 2012).

Závažné bývají i chronické neinfekční procesy postihující respirační a gastrointestinální trakt. V oblasti plic se často rozvíjejí bronchiektázie nebo intersticiální plicní onemocnění, jejichž progresi může vyústit až v respirační insuficienci – jednu z hlavních příčin mortality CVID pacientů. V zažívacím traktu bývá pozorována chronická enteropatie s atrofickými změnami střevní sliznice, malabsorpčním syndromem a perzistujícím průjmem, což může vést ke ztrátě tělesné hmotnosti a nutričnímu deficitu (Fevang, 2023; Ho & Cunningham-Rundles, 2020; Macpherson et al., 2020; Pikkarainen et al., 2019).

Nedávné výzkumy také poukazují na souvislost mezi dysbiózou střevního mikrobiomu, deficitem sekretorního IgA a rozvojem zánětlivých komplikací GIT u pacientů s CVID (Fiedorová et al., 2019; Jørgensen et al., 2016; Macpherson et al., 2020; Shulzhenko et al., 2018).

K dalším klinickým manifestacím patří hepatobiliární postižení (např. autoimunitní hepatitida, jaterní granulomy), lymfoproliferativní syndromy včetně splenomegalie a výskyt granulomatózních lézí. V neposlední řadě je třeba zmínit zvýšené riziko malignit – nejčastěji se jedná o karcinom žaludku, rakovinu prsou a non-Hodgkinovy lymfomy různého typu (Ho & Cunningham-Rundles, 2020; Kiaee et al., 2019; Pulvirenti et al., 2018; Resnick et al., 2012).



Obrázek 4: **Nejčastější neinfekční komplikace spojené s CVID**
Vytvořeno v programu BioRender.

1.4.4. Léčba

Léčebný přístup u pacientů s CVID odráží klinickou heterogenitu onemocnění a rozděluje se na léčbu infekčních a neinfekčních komplikací.

Léčba infekčních komplikací

Základem terapie infekčních projevů je substituční podávání imunoglobulinů získaných od zdravých dárců. K aplikaci protilátek dochází buď intravenózně (1× měsíčně), nebo subkutánně (obvykle 2× měsíčně), v dávkách 300–600 mg/kg tělesné hmotnosti. U pacientů s opakovanými infekcemi bývá indikováno udržení sérové koncentrace IgG nad 7 g/l. V případě zvýšeného rizika těžkých infekcí může být zvážena profylaktická antibiotická léčba (Szaflarska et al., 2024; Tam & Routes, 2013).

Léčba neinfekčních komplikací

Neinfekční projevy CVID, zejména autoimunitní a zánětlivé komplikace, vyžadují individualizovaný terapeutický přístup. Autoimunitní onemocnění jsou terapeuticky řešena obdobně jako u imunokompetentních pacientů – nejčastěji systémovými kortikosteroidy. Dále se využívají rituximab, monoklonální protilátka cílená proti CD20, případně mohou také být nasazeny inhibitory BAFF (Tabulka 3) např. abatacept a abelimumab, alternativně i jiná imunosupresiva (Fevang, 2023; Szaflarska et al., 2024).

K léčbě chronických zánětlivých onemocnění postihujících gastrointestinální trakt se využívá především kombinace kortikosteroidů a imunosupresiv jako jsou azathioprin nebo 6-merkaptopurin. U pacientů s granulomatózním zánětem se nasazují anti-TNF- α protilátky (zejména infliximab) (Fevang, 2023).

Možnost transplantace kostní dřeně u pacientů s malignitami nebo závažnými autoimunitami zůstává kontroverzní. Limitujícími faktory jsou zejména problémy s rekonstitucí imunitního systému po zákroku a asociované infekční komplikace (Szaflarska et al., 2024).

1.4.5. Dysregulace imunitního systému spojená s CVID

Imunitní systém pacientů s CVID vykazuje stav komplexní dysregulace, která se zásadně podílí na rozvoji neinfekčních komplikací tohoto onemocnění. Klíčové změny se odehrávají zejména na úrovni T a B lymfocytů, jejichž funkce je úzce provázaná. Naproti tomu úloha buněk vrozené imunity v patogenezi CVID zůstává dosud nedostatečně objasněná. Některé práce však naznačují možný podíl invariantních NK buněk, vrozených lymfoidních buněk 3. typu a vybraných subpopulací dendritických buněk na modulaci B lymfocytárního fenotypu a rozvoji zmíněných komplikací (Cols et al., 2016; Neirinck et al., 2024).

Dysregulace T lymfocytů

U pacientů s CVID byla popsána zvýšená míra aktivace, funkčního vyčerpání a senescence T buněk. Navíc může být snížen počet naivních CD4⁺ i CD8⁺ T lymfocytů, což odráží stav chronické stimulace imunitního systému (Berbers, van der Wal, et al., 2021; Jørgensen et al., 2016; Kiaee et al., 2019; Milardi et al., 2022). Dysregulace se projevuje i zvýšenou produkcí prozánětlivých cytokinů. U některých pacientů jsou detekovány zvýšené hladiny solubilního CD25 – markeru T buněčné aktivace – a zároveň cytokinů jako TNF- α , IL-6, IL-8 a IL-12, které podporují perzistující zánět. CVID pacienti s neinfekčními komplikacemi pak mají vyšší hladinu prozánětlivých cytokinů, než pacienti trpící pouze infekčními onemocněními (Berbers, van der Wal, et al., 2021; Macpherson et al., 2020; Poto et al., 2023; Więsik-Szewczyk et al., 2021).

U části pacientů dochází k narušení rovnováhy mezi subpopulacemi pomocných T lymfocytů. Častým nálezem bývá zvýšená Th1 polarizace spojená s nadprodukcí IFN- γ , která může podporovat rozvoj granulomatózního zánětu (Berbers, van der Wal, et al., 2021; Cols et al., 2016; Shulzhenko et al., 2018; Unger et al., 2018). Naopak u pacientů s autoimunitními projevy a enteropatií bylo zaznamenáno posílení Th2 a Th17 odpovědi nebo pokles počtu regulačních T buněk (Berbers, Drylewicz, et al., 2021; Fevang et al., 2007; TofighiZavareh et al., 2021). Tyto změny naznačují, že přestože je CVID primárně poruchou B buněčné imunity, na jeho patogenezi se mohou významně podílet i dysregulované T lymfocyty.

Dysregulace B lymfocytů

CVID se vyznačuje rozsáhlými kvantitativními i kvalitativními poruchami vývoje, diferenciací a efektorové funkce B lymfocytů. Změny v rámci této populace dosahují takového rozsahu, že slouží jako základ pro klasifikační systémy tohoto onemocnění.

U významné části pacientů dochází ke snížení absolutního počtu cirkulujících B buněk, v krajních případech lze dokonce pozorovat téměř úplnou depleci CD19⁺ lymfocytů z periferní krve. Tento stav odráží buď selhání v procesu vývoje B buněčné linie v kostní dřeni, nebo dramaticky zvýšenou apoptotickou ztrátu v periferních tkáních (López-Gómez et al., 2018; Richardson et al., 2019; Rodríguez-Ubreva et al., 2022).

Charakteristickým rysem bývá výrazný úbytek paměťových B buněk po izotypovém přesmyku (CD27⁺ IgD⁻ IgM⁻), což úzce souvisí s poruchami organizace germinálních center v sekundárních lymfoidních folikulech. Pravděpodobnou příčinou je narušená kooperace s T folikulárními pomocnými buňkami, spojená se sníženou expresí kostimulačních molekul (CD40, CD27, ICOS), limitovanou produkcí IL-21 a dysfunkcí procesu somatické hypermutace (Friman et al., 2023; López-Gómez et al., 2018; Rodríguez-Ubreva et al., 2022; Romberg et al., 2019; van Schouwenburg et al., 2018).

Současně typicky dochází k expanzi populace naivních B buněk a zvyšuje se četnost autoreaktivních klonů – typicky v subpopulaci CD21^{low} B lymfocytů (viz níže). Tato skutečnost může signalizovat selhání mechanismů jak centrální, tak především periferní tolerance, a rovněž napomáhat vzniku autoimunitních komplikací spojených s CVID (Friman et al., 2023; Richardson et al., 2019; Romberg et al., 2013).

1.5. CD21low B lymfocyty

Fenotypicky i funkčně specifickou subpopulaci B buněk, spojenou s dysregulací imunitního systému, představují CD21low B lymfocyty. Jejich název ani definice nejsou zcela jednotné, avšak základním charakteristický znak těchto buněk tvoří nízká exprese komplementového receptoru CD21 a kostimulační molekuly CD38, zatímco exprese základního B buněčného znaku CD19 zůstává zachována. Na základě fenotypu lze CD21low lymfocyty rozdělit do několika podskupin: naivní CD21low buňky (CD27⁻ IgM⁺), IgM⁺ paměťové CD21low buňky (CD27⁺ IgM⁺), dvojité negativní paměťové (CD27⁻ IgM⁻) a paměťové CD21low lymfocyty po izotypovém přesmyku (class-switched-like, CD27⁺ IgM⁻) (rozdělení podle Reincke et al., 2020). U většiny jedinců lze detekovat přítomnost všech těchto podskupin, avšak jejich vzájemné poměry se individuálně liší. Pro jejich detailnější charakterizaci se využívají další markery, například transkripční faktor T-bet, integrinová molekula CD11c, aktivační markery CD80/86, HLA-DR a další molekuly jako FcRL4/5, PD-1 nebo FAS (Freudenhammer et al., 2020; Reincke et al., 2020).

Vývoj CD21low B lymfocytů zůstává předmětem výzkumu, přičemž stále není jasné, zda se jedná o populaci vznikající primárně z naivních B buněk, nebo diferenciací z dalších B lymfocytárních populací. Některé studie naznačují, že klíčovým faktorem jejich vzniku je opakovaná stimulace přes BCR a aktivace buněk přes IFN- γ , IL-21, CD40 a TLR – zejména TLR-7 a TLR-9. Podstata vzniku CD21low B buněk ovšem zůstává sporná (Jenks et al., 2018; Keller et al., 2021; Zumaquero et al., 2019).

CD21low B buňky jsou obecně považovány za funkčně vyčerpané B lymfocyty. U pacientů s CVID byla jejich přítomnost korelována se zvýšenými hladinami prozánětlivých cytokinů, jako jsou TNF- α , IFN- γ a IL-6, které mohou dále podporovat jejich přežívání a patologickou aktivaci (Rincón-Arévalo et al., 2021; Unger et al., 2018; Zumaquero et al., 2019). U zdravých jedinců se CD21low B lymfocyty vyskytují v minimální míře, jejich zvýšená četnost ale popsána u několika onemocnění, kde mohou přispívat k imunitní dysregulaci. U pacientů s CVID jsou tyto buňky spojeny se sníženou produkcí protilátek (Friman et al., 2023; Romberg et al., 2019; Weißenberg et al., 2019). U systémového lupus erythematoses se naopak podílejí na produkci autoreaktivních protilátek a narušení imunitní tolerance (Friman et al., 2023; Jenks et al., 2018; Wang et al., 2018). V případě revmatoidní artritidy přispívají k perzistenci zánětu v synoviální tkáni a aktivaci autoreaktivních T buněk. Zvýšené zastoupení CD21low B lymfocytů bylo rovněž popsáno u chronické hepatitidy C a HIV infekce,

kde mohou přispívat k celkové dysregulaci imunitní odpovědi. U chronických virových infekcí vykazují tyto buňky známky funkčního vyčerpání a snížené odpovědi na antigenní stimulaci (Gjertsson et al., 2022; Unger et al., 2018; Zumaquero et al., 2019).

V myších modelech byla popsána specifická subpopulace B lymfocytů označovaná jako s věkem asociované B buňky (age-associated B cells, ABC), charakterizovaná fenotypem CD21⁻ T-bet⁺ CD11c⁺. Tyto buňky se hromadí zejména ve vyšším věku a v kontextu chronické stimulace imunitního systému, např. při virových infekcích nebo autoimunitních onemocněních. U lidí byla následně identifikována fenotypově a funkčně podobná populace CD11c⁺ B lymfocytů, která sdílí znaky s ABC a je považována za jejich lidský ekvivalent. Lidské CD11c⁺ B buňky se rovněž objevují při chronickém zánětu, infekcích a autoimunitních onemocněních, jejich aktivace probíhá především prostřednictvím TLR-7 a TLR-9, zatímco odpověď na BCR signalizaci je u nich omezená. Po aktivaci mohou CD11c⁺ B buňky proliferovat a diferencovat v plazmatické buňky, a bývají proto spojovány jak s produkcí autoprotilátek, tak s udržením prozánětlivého prostředí (Dai et al., 2024; Golinski et al., 2020; Maul et al., 2021; Nickerson et al., 2023). Populace CD11c⁺ a CD21^{low} B lymfocytů se tedy funkčně překrývají, ovšem terminologická nejednoznačnost používání ABC, CD11c⁺ T-bet⁺ a CD21^{low} buněk komplikuje jejich jednoznačné porovnávání a interpretaci výsledků.

Funkční role CD21^{low} B lymfocytů se v souhrnu jeví jako paradoxní – na jedné straně jsou považovány za vyčerpané buňky se sníženou schopností proliferace a produkce protilátek, která naznačuje jejich omezenou efektorovou funkci. Na druhé straně se však podílejí na udržování chronického zánětu, mohou podporovat patologickou aktivaci T buněk a přispívat k rozvoji autoimunitních a imunopatologických stavů. Potenciální vysvětlení tohoto funkčního rozpětí může spočívat ve vnitřní heterogenitě těchto buněk, tedy rozdílnou úlohou jednotlivých subpopulací CD21^{low} B lymfocytů.

2. Cíle práce

Následující body shrnují hlavní cíle, na které se práce zaměřuje:

Imunofenotypizace B lymfocytárních subpopulací u pacientů s CVID

Cílem této části práce je pomocí průtokové cytometrie analyzovat zastoupení a fenotypové vlastnosti B lymfocytů u pacientů s CVID a provést jejich porovnání s kontrolní skupinou. Zvláštní důraz je kladen na subpopulaci CD21low B buněk.

Hodnocení funkční odpovědi B lymfocytů

Cílem je provést funkční charakterizaci B lymfocytů po *in vitro* stimulaci se zaměřením na vybrané parametry aktivace, proliferace a funkčního profilu. Důraz je kladen na analýzu odpovědi fenotypově odlišných CD21low B buněčných subpopulací.

Analýza cytokinového profilu metodou Luminex u pacientů s CVID

Tato část práce je zaměřena na stanovení sérových hladin vybraných cytokinů u pacientů s CVID pomocí technologie Luminex.

Stanovení zánětlivých markerů u pacientů s CVID

Tato část se zaměřuje na kvantifikaci koncentrace zánětlivého markeru YKL-40 metodou ELISA v séru pacientů s CVID a zdravých kontrol. Pro komplexnější pohled na zánětlivé prostředí pacientů bude výsledek porovnán s hladinami dalších vybraných markerů.

Integrace imunologických a klinických dat u pacientů s CVID

Na základě analýzy fenotypových, funkčních a sérologických údajů je cílem práce vytvořit přehled o souvislostech mezi distribucí specifických B buněčných subpopulací (zejména CD21low B lymfocytů), přítomností systémových zánětlivých markerů a klinickou manifestací onemocnění.

3. Materiály a metody

3.1. Vzorky periferní krve

V rámci této diplomové práce byly analyzovány vzorky periferní krve 35 pacientů s CVID (splňující ESID/ICON diagnostická kritéria) a 17 zdravých kontrol odpovídajících věkem a pohlavím. Před odběrem biologického materiálu byl od všech účastníků získán informovaný souhlas se zpracováním a využitím vzorků pro vědecké a výzkumné účely. Účastníci byli informováni o povaze výzkumu, dobrovolnosti účasti, možnosti kdykoli účast odmítnout bez dopadu na jejich léčbu a o způsobu ochrany osobních údajů. Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Motol.

Skupinu pacientů tvořilo 23 žen a 12 mužů s celkovým průměrným věkem 45,9 let. Pacienti byli rozděleni podle klinické manifestace na dvě podskupiny: 12 pacientů bylo zahrnuto do skupiny pouze infekčních komplikací (dále označeni jako PIK), zbylých 23 pacientů mělo klinicky významné neinfekční komplikace (dále označeni jako VNK). Přehled diagnostikovaných neinfekčních komplikací je uveden v Tabulce 5, klinická charakteristika pacientů pak v Tabulce 6. Všichni pacienti zařazení do studie jsou léčeni substituční imunoglobulinovou terapií, podávanou buď intravenózně nebo subkutánně v dávkách odpovídajících 300–500 mg na kilogram tělesné hmotnosti. Kontrolní skupinu tvořilo 17 zdravých jedinců (11 žen a 6 mužů) s průměrným věkem 41,6 let.

Onemocnění	Použitá zkratka
Atrofická gastritida	AG
Autoimunitní hemolytická anémie	AIHA
Autoimunitní tyreoiditida	AIT
Bronchiální astma	BA
Bronchiektázie	BE
Enteropatie	ENT
Hepatopatie	HEP
Hodgkinův lymfom	HL
Chronická sialoadenitida	CSA
Imunitní trombocytopenická purpura	ITP
Intersticiální plicní onemocnění	IPO
Latentní autoimunitní diabetes dospělých	LAID
Lichen sclerosus	LS
Lymfadenopatie	LYMPH
Splenomegalie	SPLE
Vitiligo	VIT

Tabulka 5: Přehled významných neinfekčních komplikací diagnostikovaných u zahrnutých pacientů s COVID

Označení	Věk	Pohlaví	Významné NIK	Komplikace
1	47	Ž	ano	ENT, BE
2	52	Ž	ano	IPO, SPLE, LAID, AG
3	40	M	ne	SPLE
4	34	Ž	ne	VIT
5	23	Ž	ne	pouze infekční
6	43	M	ne	BE, AIT
7	80	Ž	ano	IPO, HEP, CSA
8	38	Ž	ne	pouze infekční
9	61	Ž	ano	IPO, HEP, SPLE, AIT, VIT
10	51	Ž	ano	ENT, CSA
11	37	M	ne	SPLE
12	58	Ž	ne	AIT
13	42	Ž	ano	AIT, HEP, VIT
14	40	M	ano	ENT, LYMPH
15	57	Ž	ano	BA, IPO, VIT, AIT
16	42	M	ano	ENT
17	44	Ž	ano	ENT, AG
18	62	Ž	ne	pouze infekční
19	34	Ž	ano	ENT, LS
20	54	Ž	ano	LYMPH
21	62	M	ano	ILD, SPLE, LYMPH
22	38	M	ne	pouze infekční
23	32	M	ano	ILD, LYMPH
24	50	M	ano	SPLE, LYMPH, HEP, CSA
25	67	Ž	ano	AIT, HL, CSA
26	39	Ž	ne	pouze infekční
27	48	M	ano	IPO
28	21	Ž	ano	IPO, ITP
29	35	M	ano	SPLE, LYMPH, ITP, IPO
30	37	Ž	ne	SPLE
31	46	Ž	ne	pouze infekční
32	45	Ž	ano	ENT, HEP, SPLE
33	40	M	ano	BA, ITP, SPLE
34	51	Ž	ano	ENT, AIT
35	58	Ž	ano	AIT

Tabulka 6: Klinická charakteristika pacientů s CVID zahrnutých do studie
(NIK – neinfekční komplikace)

3.2. Činidla, roztoky a média

V této kapitole jsou uvedena všechna použitá činidla, média a roztoky, včetně jejich složení a dodavatelů.

Název	Kat. číslo	Dodavatel	Stát
PBS	S001	FN Motol*	ČR
PBS + 2 mmol/l EDTA	S008	FN Motol*	ČR
Ficoll-Paque PLUS	17144003	Cytiva	USA
Fixační a permeabilizační set	88-8824-00	Thermo Fisher Scientific	USA
Human YKL-40 ELISA kit	BMS2322	InvitroGen	USA
MILLIPLEX Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A - Immunology Multiplex Assay	HCYTA-60K	Merck Millipore	Německo
Roztok ISOTON II Diluent	C96980	Beckman Coulter	USA
Bovinní sérový albumin	A7030	Sigma-Aldrich	USA
Dimethylsulfoxid	D2650	Sigma-Aldrich	USA
RPMI 1640 médium + GlutaMAX	618070010	Thermo Fisher Scientific	USA
RPMI 1640 médium	11875093	Thermo Fisher Scientific	USA
Fetální bovinní sérum	A5670801	Thermo Fisher Scientific	USA
Penicilin-Streptomycin	151140122	Thermo Fisher Scientific	USA
GlutaMAX	35050061	Thermo Fisher Scientific	USA
Lipopolysacharid	tlrl-ebmps	InvivoGen	USA
EasySep Human B Cell Isolation Kit	17954	STEMCELL Technologies	Kanada
BD CompBeads Anti-Rat Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set	552844	BD Biosciences	USA
BD CompBeads Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set	552843	BD Biosciences	USA
Resiquimod	tlrl-r848-10	InvivoGen	USA
CpG oligodeoxynukleotidy 2216	tlrl-2216	InvivoGen	USA
Anti-IgM/G protilátka (1 mg/ml)	397302	BioLegend	USA
Anti-CD40 protilátka (2,8 mg/ml)	313020	BioLegend	USA

Tabulka 7: Seznam použitých činidel, médií a roztoků

*PBS a PBS + 2 mmol/l EDTA byly připraveny v laboratořích FN Motol dle interních protokolů.

Kompletní médium

Kompletní médium bylo připraveno smícháním 500 ml RPMI 1640 média, 50 ml fetálního bovinního séra, 5 ml roztoku penicilinu-streptomycinu a 5 ml roztoku GlutaMAX.

Zamrazovací roztok

Zamrazovací roztok byl připraven v poměru: 70 ml RPMI média, 20 ml fetálního bovinního séra a 10 ml dimethylsulfoxidu na celkový objem 100 ml.

Fixační/permeabilizační roztok a pufr

Fixační a permeabilizační roztok byl připraven smícháním „Fixation/Permeabilization concentrate“ a „Perm diluent“ v poměru 1:3. Permeabilizační pufr byl připraven zředěním „Permeabilization buffer 10X“ destilovanou vodou v poměru 1:9. Obě činidla jsou součástí komerčního fixačního a permeabilizačního setu uvedeného v Tabulce 7.

Přístrojové vybavení

Centrifuga Megafuge 16R (Thermo Fisher Scientific, USA)

Centrifuga Megafuge ST Plus Series (Thermo Fisher Scientific, USA)

Minicentrifuga NG0028 (Nippon Genetic Europe, Čína)

Vortex mixer PV-1 (Grant-bio, Velká Británie)

Laboratorní lázeň Memmert WNB 7 (Memmert, Německo)

Počítačka Z2 Cell and Particle Counter (Beckman Coulter, USA)

Forma Direct Heat CO2 inkubátor (Thermo Fisher Scientific, USA)

Laminární box CYT-4A1 (Esco Lifesciences, Německo)

Microplate reader Synergy H1 (BioTek Instruments, USA)

Luminex 200 System analyzátor (Merck Millipore, Německo)

EasySep 18000 separační magnet (STEMCELL Technologies, Kanada)

Průtokový cytometr BD LSR Fortessa Cell Analyser (BD Biosciences, USA)
3 lasery (405 nm, 488 nm, 647 nm)

Software a programy

FlowJo 10.9.0 (FlowJo, USA)

BioRender (BioRender, Kanada)

GraphPadPrism 8.0.1 (GraphPad Software, USA)

Microsoft Excel (Microsoft, USA)

3.3. Protokoly

3.3.1. Protokol zpracování periferní krve

Periferní krev pacientů i zdravých kontrol byla odebírána do dvou typů odběrových zkumavek: s EDTA jako antikoagulačním činidlem pro získání nesrážlivé krve a s aktivátorem koagulace pro získání srážlivé krve pro separaci séra.

1. Izolace mononukleárních buněk z periferní krve

- a) Nesrážlivá periferní krev byla naředěna v poměru 1:1 vytemperovaným roztokem PBS s 2 mmol/l EDTA a nanesena na 15 ml Ficollu tak, aby nedošlo k promísení obou vrstev.
- b) Pro izolaci mononukleárních buněk (periphery blood mononuclear cell, PBMC) byly vzorky stočeny (500 g, 30 minut) se sníženou akcelerací. Pipetou byl následně odebrán prstenec PBMC buněk.
- c) Získané buňky byly třikrát promyty pomocí PBS a stočeny (300/160/100 g, 4 °C, 10 min).
- d) Pro stanovení počtu získaných buněk bylo odebráno 10 µl buněčné suspenze, která byla přidána do květy obsahující 1 ml roztoku „ISOTON II Diluent“. Buněčná koncentrace byla změřena pomocí automatického počítáče buněk.
- e) 700 000 PBMC buněk bylo využito pro analýzu základních B lymfocytárních populací (viz dále), zbytek buněk byl přenesen do zamrazovacího roztoku a dlouhodobě uchován v Dewarově nádobě s tekutým dusíkem.

2. Získání krevního séra

- f) Srážlivá krev byla centrifugována (1900 g, 5 minut, 23 °C), po centrifugaci bylo odebráno sérum, které bylo následně dlouhodobě uloženo při -80 °C.

3.3.2. Protokol rozmrazení buněk

- a) Vzorky byly vyjmuty z Dewarovy nádoby a okamžitě doplněny 1 ml předem vytemperovaného kompletního média. Po rozmrazení byly vzorky doplněny kompletním médiem do objemu 10 ml.
- b) Vzorky byly centrifugovány (350 g, 4 °C, 5 minut), resuspendovány v kompletním médiu a inkubovány (24 hodin, 37 °C a 5 % CO₂).
- c) Po inkubaci byla stanovena koncentrace buněk, získané buňky byly dále využity pro cytometrické měření nebo *in vitro* stimulační esej.

3.3.3. Protokol izolace a stimulace buněk pro Luminex esej

Pro Luminex analýzu byly izolovány B lymfocyty pomocí negativní imunomagnetické separace, využívající izolační set pro lidské B buňky EasySep Human B Cell Isolation Kit (Tabulka 7). Kvalita separace B lymfocytů byla cytometricky ověřena v klinické laboratoři Ústavu imunologie FN Motol.

- a) Po rozmrazení bylo do reakční zkuševky přeneseno 13×10^6 PBMC buněk (nebo jejich maximální dostupné množství).
- b) Izolace buněk byla provedena podle standardizovaného protokolu výrobce.
- c) Do mikrotitrační destičky bylo nasazeno 50 000 získaných B lymfocytů/jamka. Do jednotlivých jamek byly přidány stimulanty dle Tabulky 8 a doplněno kompletní médium do konečného objemu 200 μ l.
- d) Destička byla inkubována (48 hodin, 37 °C a 5 % CO₂), po inkubaci byly vzorky centrifugovány (350 g, 4 °C, 5 minut) a supernatanty byly odebrány a uloženy při -20 °C pro následnou analýzu.

Označení	Stimulanty (finální koncentrace)	Stimulovaný receptor
Stimulace 1	nestimulované	-
Stimulace 2	anti-IgM/G (10 μ g/ml), anti-CD40 (10 μ g/ml)	BCR, CD40
Stimulace 3	LPS (10 μ g/ml)	TLR-4
Stimulace 4	CpG ODN (5,6 μ g/ml)	TLR-9
Stimulace 5	anti-IgM/G, anti-CD40, LPS	BCR, CD40 + TLR-4
Stimulace 6	anti-IgM/G, anti-CD40, CpG ODN	BCR, CD40 + TLR-9
Stimulace 7	Resiquimod (10 μ g/ml)	TLR-7/8

Tabulka 8: Experimentální podmínky pro stimulaci B buněk

(LPS – lipopolysacharid, CpG ODN – cytosin-guanin oligodeoxynukleotid)

3.3.4. Protokol pro Luminex esej

Pro kvantifikaci koncentrací sedmi vybraných cytokinů (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 p40, IL-17A, a IFN- γ) v supernatantech byla využita technologie Luminex xMAP. Supernatanty získané dle postupu popsaného v předchozí kapitole byly analyzovány pomocí eseje MILLIPLEX Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A (Tabulka 7). Analýza byla provedena v souladu s protokolem dodaným výrobcem.

Vzorky byly inkubovány s barevně kódovanými magnetickými mikročásticemi navázanými specifickými protilátkami, následně promyty a detekovány pomocí sekundárních protilátek konjugovaných s biotinem. Po přidání detekčního činidla – streptavidin-PE konjugátu – byly vzorky měřeny na analyzačním přístroji a výsledky byly zpracovány pomocí kalibrační křivky generované na základě měření standardů dodaných se soupravou.

3.3.5. Protokol pro ELISA stanovení hladiny YKL-40

Kvantifikace koncentrace proteinu YKL-40 v sérových vzorcích byla provedena pomocí komerčně dostupné soupravy Human YKL-40 ELISA kit (Tabulka 7). Analýza byla provedena v souladu s protokolem dodaným výrobcem. Vzorky, standardy a kontrolní roztoky byly inkubovány v jamkách mikrotitrační destičky předem pokryté protilátkou specifickou pro YKL-40.

Po odstranění nenavázaných složek následovalo promytí a inkubace se sekundární biotinylovanou protilátkou. Poté byl přidán streptavidin konjugovaný s peroxidázou, a nakonec substrátový roztok TMB, který po reakci s enzymem vytvořil barevný produkt. Reakce byla zastavena pomocí „stop solution“ a absorbance byla změřena spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm. Výsledné koncentrace YKL-40 byly určeny na základě kalibrační křivky získané ze standardů obsažených v soupravě.

3.3.6. Stanovení dalších zánětlivých markerů

Pro detailnější posouzení zánětlivého prostředí u pacientů s CVID byly klinickými laboratořemi Ústavu imunologie a Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie FN Motol analyzovány sérové koncentrace dalších vybraných zánětlivých markerů, konkrétně C-reaktivního proteinu (CRP), sérového amyloidu A (SAA), ferritinu a kalprotektinu. Zdrojem uvedených indikací a referenčních hodnot jsou Laboratorní příručky zmíněných ústavů.

CRP je běžně stanovovaným reaktantem akutní fáze, jedná se o protein syntetizovaný hepatocyty v odpovědi na prozánětlivé cytokiny. Za fyziologických podmínek se jeho koncentrace udává pod 6 mg/l, při infekcích, septických stavech, traumatu či zánětlivých procesech jeho sérová hladina řádově narůstá. Hladina CRP byla stanovena nefelometricky.

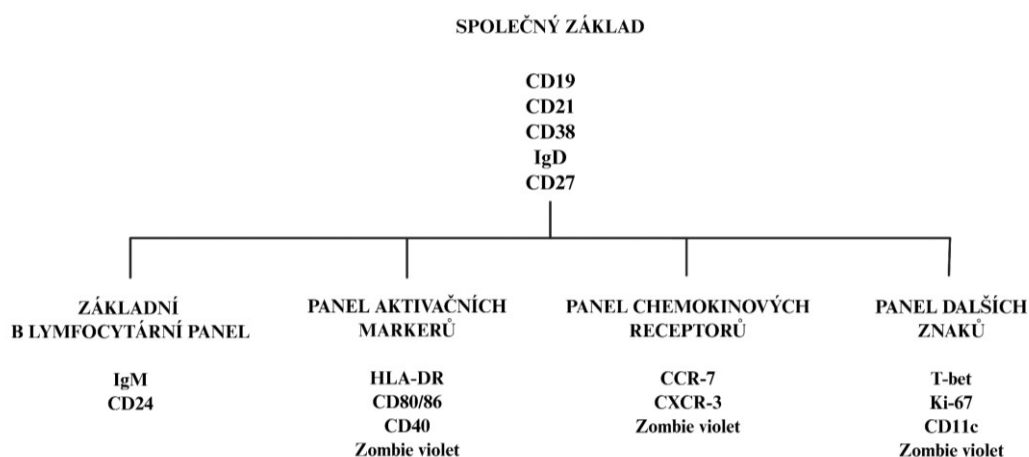
SAA je dalším významným proteinem akutní fáze, funkčně spojeným s metabolismem tzv. HDL lipoproteinů. Jeho syntéza v játrech je rovněž regulována prozánětlivými cytokiny. Vzestup koncentrace SAA nad fyziologickou hranici 10 mg/l v séru nastává při akutních infekcích, ovšem využívá se i jako marker aktivity revmatických a chronických zánětlivých onemocnění. Hladina SAA byla stanovena imunoturbidimetricky.

Ferritin je protein vázající železo, jehož koncentrace v séru se zvyšuje při poruchách metabolismu železa, akutních i chronických zánětech či malignitách; referenční hodnoty se pohybují mezi 22–322 $\mu\text{g/l}$ u mužů a 10–291 $\mu\text{g/l}$ u žen. Hladina ferritinu byla stanovena chemiluminiscenční analýzou.

Kalprotektin je komplex vápník vázajících proteinů S100A8/A9, exprimovaný především v neutrofilech a monocytech. Kalprotektin je proto považován za marker aktivace vrozené imunity a bývá zvýšen např. u idiopatických střevních zánětů, autoinflamatorních onemocnění či bakteriálních infekcí. Fyziologická hladina kalprotektinu je udávána do 2 $\mu\text{g/ml}$ a byla stanovena chemiluminiscenční analýzou.

3.4. Příprava panelů pro průtokovou cytometrii

Před analýzou vzorků metodou průtokové cytometrie byly sestaveny a optimalizovány celkem čtyři panely pro průtokovou cytometrii (schematicky zobrazeny na Obrázku 5). Příprava zahrnovala volbu vhodných klonů a fluorochromů, optimalizaci koncentrací jednotlivých protilátek a zavedení kontrol pro zajištění kompenzace signálů.



Obrázek 5: Schéma použitých panelů pro průtokovou cytometrii

Vytvořeno v programu BioRender.

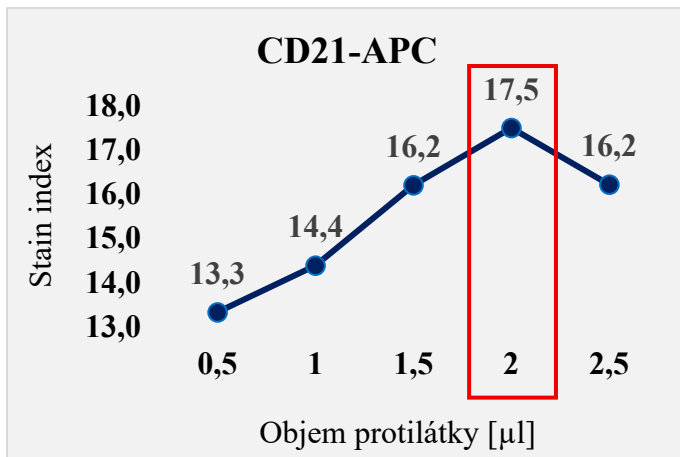
Výběr a titrace protilátek

K optimalizaci značení byly použity komerčně dostupné monoklonální protilátky konjugované s různými fluorochromy. U každé protilátky byla provedena titrace za účelem stanovení objemu vedoucího k nejlepšímu rozlišení mezi pozitivní a negativní populací. Titrace byla prováděna v pěti objemech: 0,5 μ l, 1 μ l, 1,5 μ l, 2 μ l a 2,5 μ l na 1×10^6 PBMC buněk zdravého dárce nezahrnutého do kontrolní skupiny. Výsledky byly hodnoceny na základě tzv. stain indexu a celkové kvality separace pozitivních a negativních populací. Stain index byl vypočítán podle vzorce:

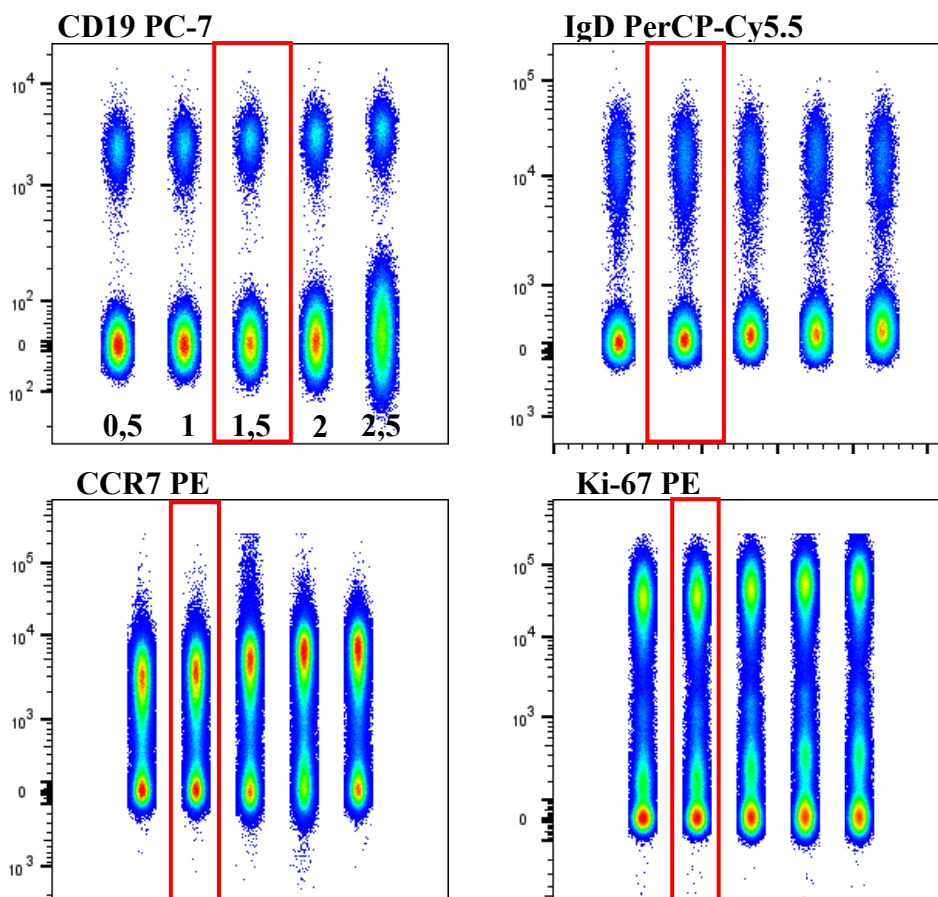
$$\text{stain index} = \frac{MFI_{POS} - MFI_{NEG}}{SD_{NEG}},$$

kde MFI je medián intenzity fluorescence pozitivní, respektive negativní populace
a SD směrodatná odchylka negativní populace.

Příklady využití titrace protilátek a výpočtu stain indexu jsou ilustrovány na Obrázcích 6 a 7.



Obrázek 6: Příklad určení vhodného objemu protilátky pomocí výpočtu stain indexu



Obrázek 7: Příklad titrací protilátek pro cytometrické panely

Uvedeny jsou titrované objemy protilátek [µl], titrační řada je shodná pro všechny protilátky.

Použité protilátky

Seznam použitých protilátek včetně klonů, fluorochromů, dodavatelů a optimalizovaných objemů je uveden v Tabulce 9.

Jednobarevné kontroly

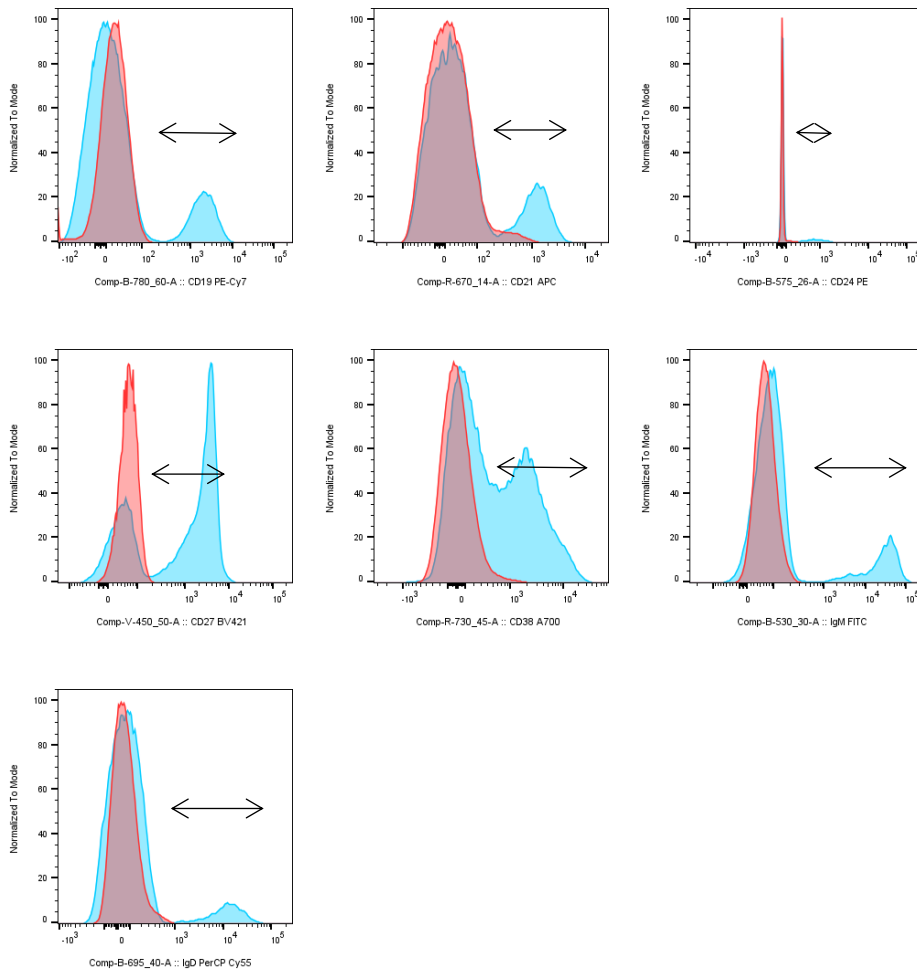
Pro nastavení kompenzace fluorescence byly použity jednobarevné kontroly. Pro většinu fluorochromů byly využity kompenzační mikročástice BD CompBeads (Tabulka 7), které byly inkubovány s příslušnými značenými protilátkami dle standardního protokolu výrobce. Pro rozlišení životnosti buněk barvivem Zombie violet byla jednobarevná kontrola připravena ze směsi 350 000 živých a 350 000 mrtvých PBMC buněk získaných od zdravé kontroly.

Znak	Fluorochrom	Výrobce	Kat. číslo	Klon	Objem [μl]	Typ značení
Základní B lymfocytární panel						
CD19	PC-7	ExBio	T7-305-T100	LT19	1,5	povrchové
CD21	APC	ExBio	1A-306-T100	LT21	2	povrchové
IgM	FITC	BioLegend	314506	MHM-88	1	povrchové
IgD	PerCP-Cy5.5	BioLegend	348208	IA6-2	1	povrchové
CD27	BV-421	BioLegend	302824	0323	1	povrchové
CD24	PE	Beckman Coulter	B92425	ALB9	1,5	povrchové
CD38	AF-700	ExBio	A7-366-T100	HIT2	1	povrchové
Ostatní panely						
CD19	shodné					
CD21	shodné					
CD38	shodné					
CD27	PE-DY594	BioLegend	356422	M-T271	1	povrchové
IgD	BV-605	BioLegend	400269	MOPC-173	1	povrchové
Zombie violet	-	BioLegend	423114	-	1	povrchové
HLA-DR	FITC	ExBio	1F-690-T025	L243	1	povrchové
CD80	PerCP-Cy5.5	BioLegend	375412	W17149D	1	povrchové
CD86	PerCP-Cy5.5	BioLegend	305420	IT2.2	1	povrchové
CD40	PE	ExBio	1P-416-T100	HI40a	1	povrchové
CXCR3	FITC	BioLegend	353704	G025H7	1	povrchové
CCR7	PE	BioLegend	353204	G043H7	1	povrchové
T-bet	FITC	BioLegend	644812	4B10	1	intracelulární
Ki-67	PE	ExBio	1P-155-T025	Ki-67	1	intracelulární
CD11c	PerCP-Cy5.5	ExBio	T9-529-T025	BU15	2	povrchové

Tabulka 9: Přehled použitých fluorescenčně značených protilátek

FMO kontroly

Pro každý cytometrický panel byly rovněž připraveny FMO kontroly, které slouží ke stanovení hraniční fluorescence jednotlivých znaků a zpřesnění interpretace pozitivních a negativních populací (příklady FMO kontrol jsou ilustrovány na Obrázku 8).



Obrázek 6: Vybrané ukázky FMO kontrol

Červeně jsou znázorněny intenzity fluorescence FMO kontrol, modře pak plně barvených vzorků. Šipky vyznačují hranice pozitivní populace pro daný marker určené na základě FMO kontroly.

3.5. Příprava a analýza vzorků pro průtokovou cytometrii

3.5.1. Příprava vzorků pro základní B lymfocytární panel

K přípravě vzorků pro základní B lymfocytární panel byly použity PBMC buňky čerstvě izolované z periferní krve dle postupu popsáno v podkapitole 4.3.1. Buněčná suspenze byla přenesena do mikrotitrační destičky v množství 700 000 buněk/jamka a doplněna PBS do objemu 200 μ l.

Vzorky byly centrifugovány (350 g, 4 °C, 5 minut). Po odstranění supernatantu byl přidán premix povrchových protilátek naředěný v PBS na konečný objem 50 μ l. Buňky byly následně inkubovány s fluorochrom-konjugovanými protilátkami (25 minut ve tmě, 4 °C). Po inkubaci bylo přidáno 150 μ l PBS a vzorky byly centrifugovány (350 g, 4 °C, 5 minut). Po resuspendování v PBS byly vzorky analyzovány.

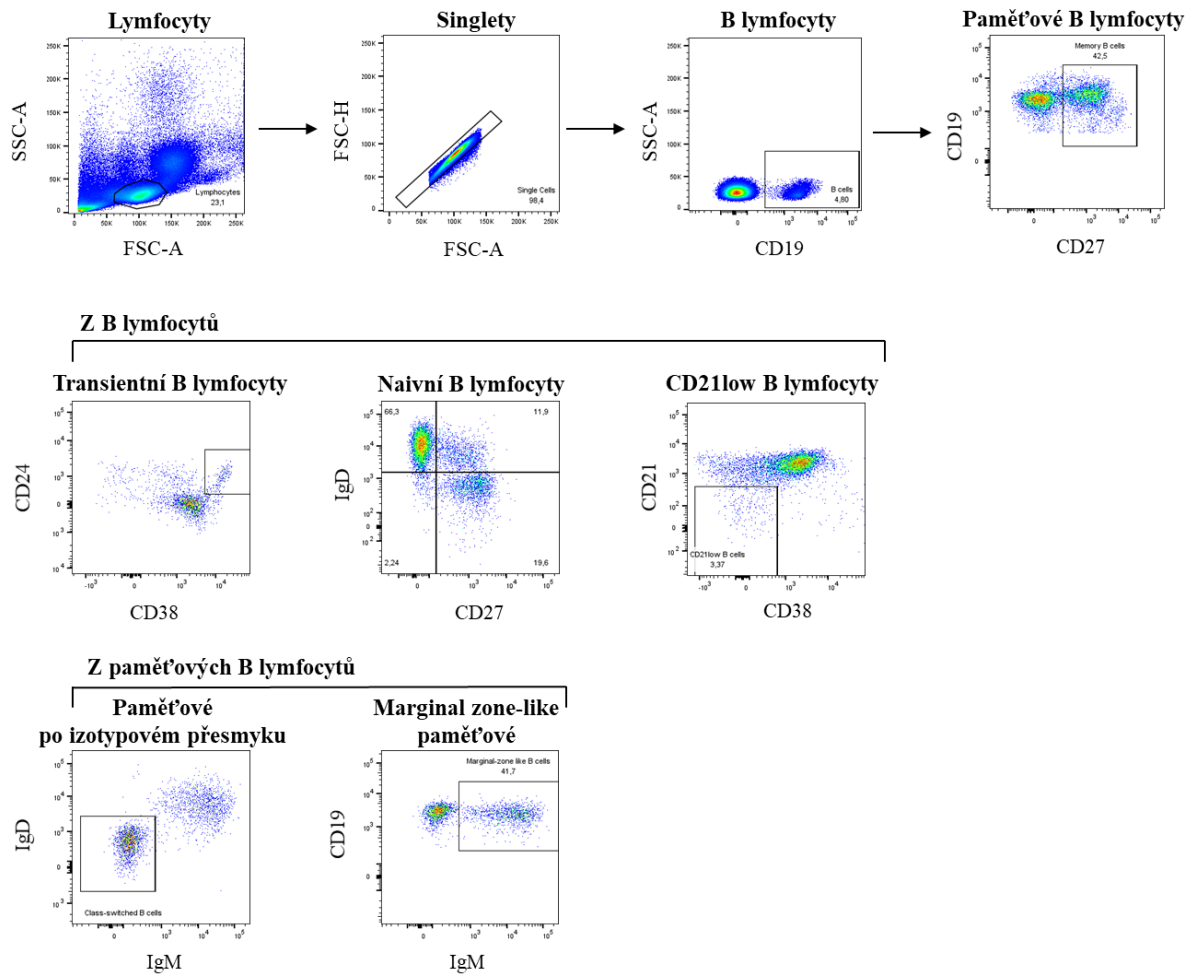
3.5.2. Příprava vzorků pro další panely

K přípravě vzorků pro další cytometrické panely byly použity zmrazené PBMC. Postup přípravy těchto buněk proto navazuje na protokol rozmrazení buněk uvedený v podkapitole 4.3.2. Z každého vzorku bylo do mikrotitrační destičky přeneseno 700 000 PBMC buněk do sedmi samostatných jamek, z nichž každá odpovídala specifickým stimulačním podmínkám. Do každé jamky byly přidány příslušné stimulanty dle Tabulka 8. Následně bylo doplněno kompletní médium do finálního objemu 200 μ l a destička byla inkubována (24 hodin, 37 °C a 5 % CO₂).

Po ukončení inkubace, promytí v PBS a centrifugaci (350 g, 4 °C, 5 minut), byly značeny povrchové markery, při dodržení stejného postupu jako v předchozí podkapitole. Pro intracelulární značení byly vzorky po odlití supernatantu resuspendovány ve 100 μ l fixačního/permeabilizačního roztoku a inkubovány ve tmě (30 minut, 4 °C). Následně byly dvakrát promyty permeabilizačním pufrem a stočeny (350 g, 4 °C, 5 minut). Poté byl přidán premix intracelulárních protilátek, naředěný v permeabilizačním pufru do objemu 50 μ l, a vzorky dále inkubovány (25 minut ve tmě, 4 °C). Po inkubaci byly vzorky promyty permeabilizačním pufrem a stočeny (350 g, 4 °C, 5 minut). Nakonec byly vzorky resuspendovány v PBS a analyzován na průtokovém cytometru.

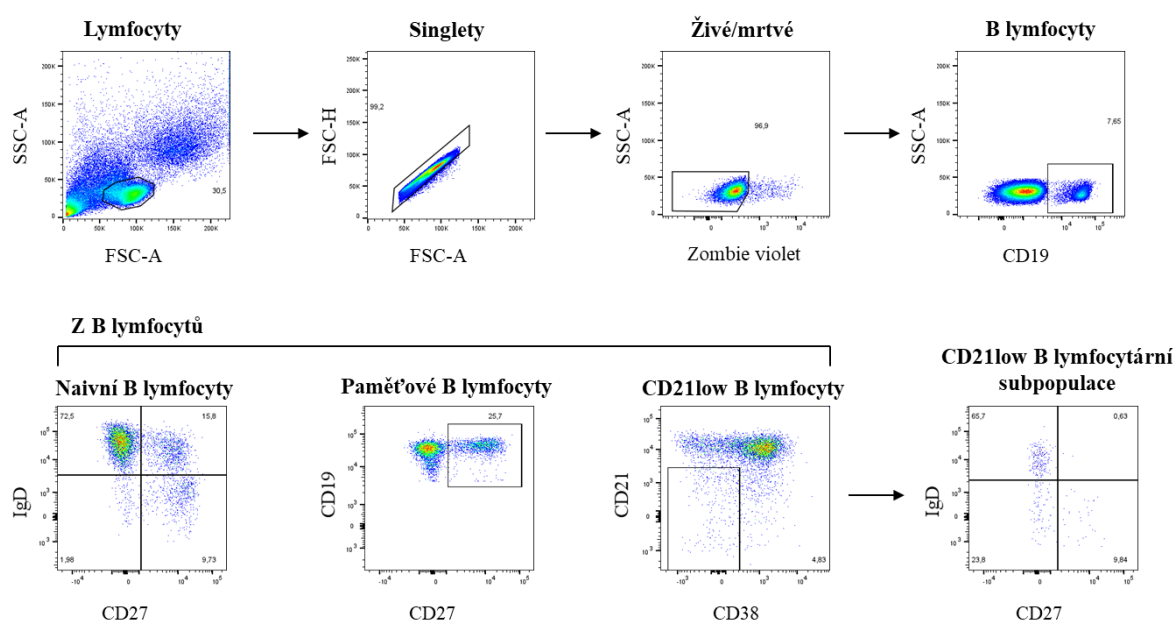
3.5.3. Gatovací strategie

Pro analýzu základního B lymfocytárního panelu byla použita vícekroková gatovací strategie umožňující identifikaci hlavních subpopulací B buněk v periferní krvi.

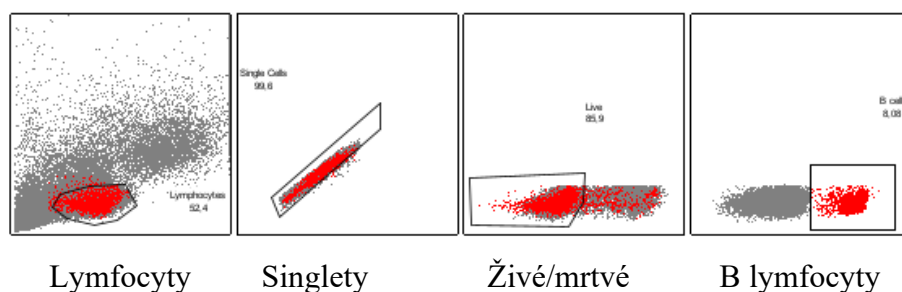


Obrázek 7: Přehled reprezentativní gatovací strategie základního B lymfocytárního panelu

U dalších panelů, zaměřených na detailnější charakterizaci CD21low B lymfocytárních subpopulací, byla použita zjednodušená gatovací strategie. CD21lymfocyty byly podle fenotypu rozděleny do čtyř subpopulací – naive-like CD21low (IgD⁺ CD27⁻), marginal zone-like CD21low (MZ-like, IgD⁺ CD27⁺), double negative-like CD21low (DN-like, IgD⁻ CD27⁻) a class-switched-like (CS-like, IgD⁻ CD27⁺) viz Obrázek 10. Vzhledem k použití rozmrazených PBMC buněk byla součástí protokolu také exkluze mrtvých buněk pomocí barvení zombie violet. Správnost gatovací strategie byla ověřena metodou tzv. back-gating kontroly (ilustrováno na Obrázku 11).



Obrázek 8: Přehled reprezentativní gatovací strategie využité u ostatních cytometrických panelů



Obrázek 9: Back-gating kontrola gatovací strategie u CD21low B lymfocytů

3.6. Statistické zpracování dat

Analýza dat byla provedena s využitím běžně používaných statistických testů v programu GraphPad Prism. Normalita rozdělení jednotlivých souborů byla ověřena pomocí Shapiro-Wilkova testu. Na základě výsledků testu normality byl pro porovnání dvou skupin zvolen buď nepárový Studentův t-test (v případě normálního rozdělení), nebo neparametrický Mann-Whitneyův test. Při porovnávání více skupin byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA), případně její neparametrická alternativa – Kruskal-Wallisův test, následovaný Dunnovým post-hoc testem.

Ve vizualizaci výsledků byly porovnávány čtyři skupiny: pacienti s COVID ($n = 35$), zdravé kontroly ($n = 17$), pacienti s VNK ($n = 23$) a pacienti s PIK ($n = 12$). V jednotlivých grafech je znázorněn buďto úplný počet osob v dané skupině, nebo maximální počet dostupných dat pro konkrétní analyzovaný parametr. V grafech je dále zobrazena průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

Za statisticky signifikantní byl považován výsledek s hodnotou $p < 0,05$. Statistická významnost byla v grafech označena následujícím způsobem: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

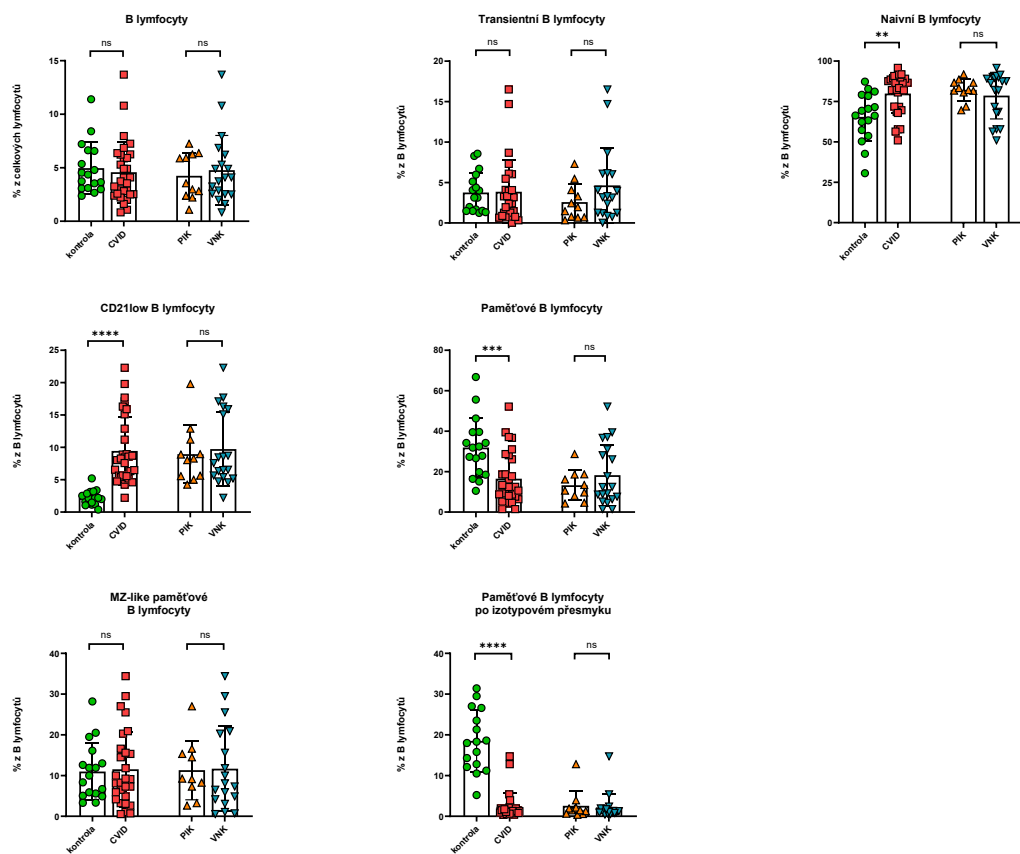
4. Výsledky

Tato kapitola si klade za cíl představit výsledky získané v experimentální části práce.

4.1. Charakterizace B lymfocytárních subpopulací

V úvodní části projektu bylo provedeno porovnání relativního zastoupení subpopulací B lymfocytů mezi zdravými kontrolami a pacienty s CVID, respektive mezi pacienty s pouze infekčními komplikacemi a pacienty s významnými neinfekčními projevy navzájem.

Celková frekvence B lymfocytů se mezi skupinami nelišila, ovšem mezi jednotlivými subpopulacemi byly pozorovány významné rozdíly (Obrázek 12). U pacientů s CVID bylo v porovnání se zdravými kontrolami signifikantně zvýšeno zastoupení naivních B lymfocytů, avšak mezi patientskými skupinami rozdíl zaznamenán nebyl. Podobně CD21low B lymfocyty vykazovaly výrazně vyšší zastoupení u pacientů s CVID oproti zdravým kontrolám, nicméně jejich frekvence se mezi patientskými skupinami nelišila. U celkových paměťových B lymfocytů a paměťových B lymfocytů po izotypovém přesmyku byl pozorován opačný trend – jejich podíl byl signifikantně vyšší u zdravých kontrol než u pacientů. Mezi patientskými skupinami nebyl pozorován statisticky významný rozdíl.



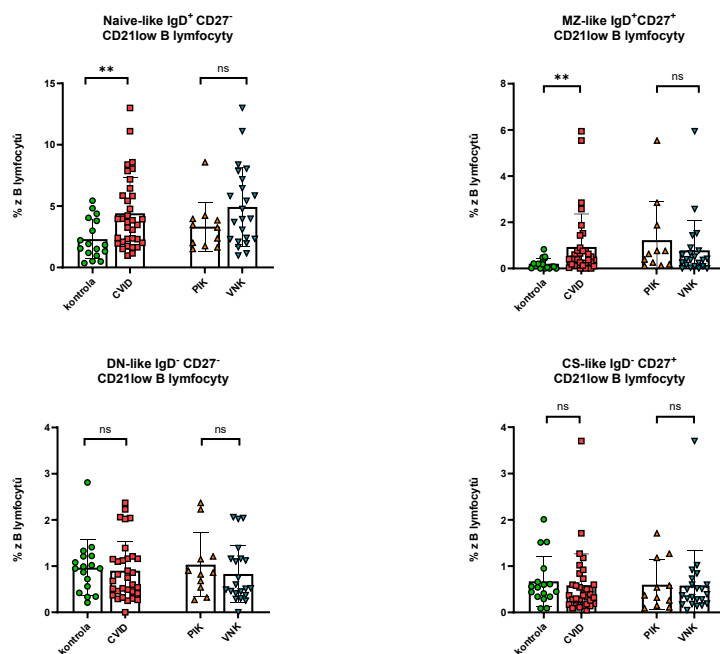
Obrázek 10: Porovnání relativního zastoupení B lymfocytárních subpopulací u pacientů s CVID a zdravími kontrolami

Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena pomocí Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****)).

(*MZ-like* – marginal zone-like, *PIK* – pouze infekční komplikace, *VNK* – významné neinfekční komplikace)

V rámci detailnější charakterizace CD21low B lymfocytů byly analyzovány čtyři buněčné subpopulace, v této práci definované na základě exprese znaků IgD a CD27 (viz výše).

Výsledky ukázaly, že u pacientů s CVID bylo přítomno vyšší relativní zastoupení naive-like CD21low B buněk ve srovnání se zdravými kontrolami, zvýšena byla i frekvence MZ-like CD21low buněk. Naopak u DN-like a CS-like CD21low B buněk nebyly mezi žádnou ze sledovaných skupin zjištěny statisticky významné rozdíly. Stejně tak nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v zastoupení žádné z analyzovaných subpopulací při porovnání pacientů s infekčními komplikacemi a pacientů s přítomností významných neinfekčních manifestací.



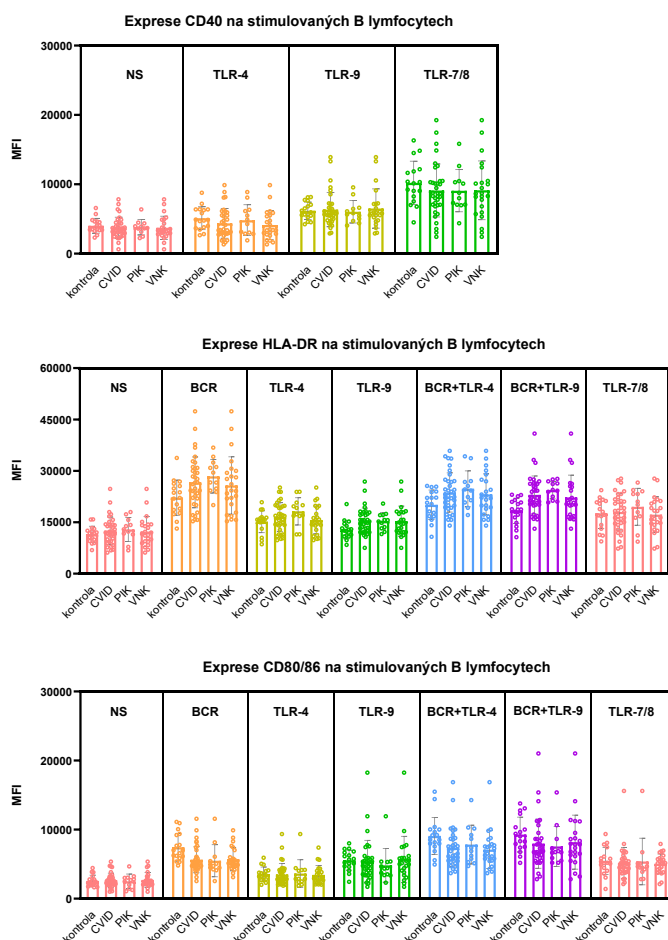
Obrázek 11: Relativní zastoupení CD21low B lymfocytárních subpopulací u pacientů s CVID a zdravými kontrolami

Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena pomocí Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$ (**)). (PIK – pouze infekční komplikace, VNK – významné neinfekční komplikace)

4.2. Exprese aktivačních markerů na stimulovaných B lymfocytech

V další části projektu byl zkoumán vliv *in vitro* stimulace B lymfocytů pomocí kombinace signálů (Tabulka 8) na expresi vybraných kostimulačních a aktivačních znaků (HLA-DR, CD80/86 a CD40) u pacientů s COVID a zdravých kontrol. Exprese znaků je v této práci vyjádřena pomocí průměrné hodnoty fluorescenční intenzity (mean fluorescence intensity, MFI).

V rámci jednotlivých stimulačních podmínek nebyly mezi kontrolami/pacienty a patientskými skupinami navzájem pozorovány signifikantní rozdíly v reakci na stimulaci vyjádřené rozdílnou expresí aktivačních znaků (Obrázek 14). Odpovídající profil exprese aktivačních markerů byl pozorován nejen u populace celkových B lymfocytů, ale rovněž při samostatné analýze subpopulací naivních a paměťových B buněk (Příloha 1A a 1B).



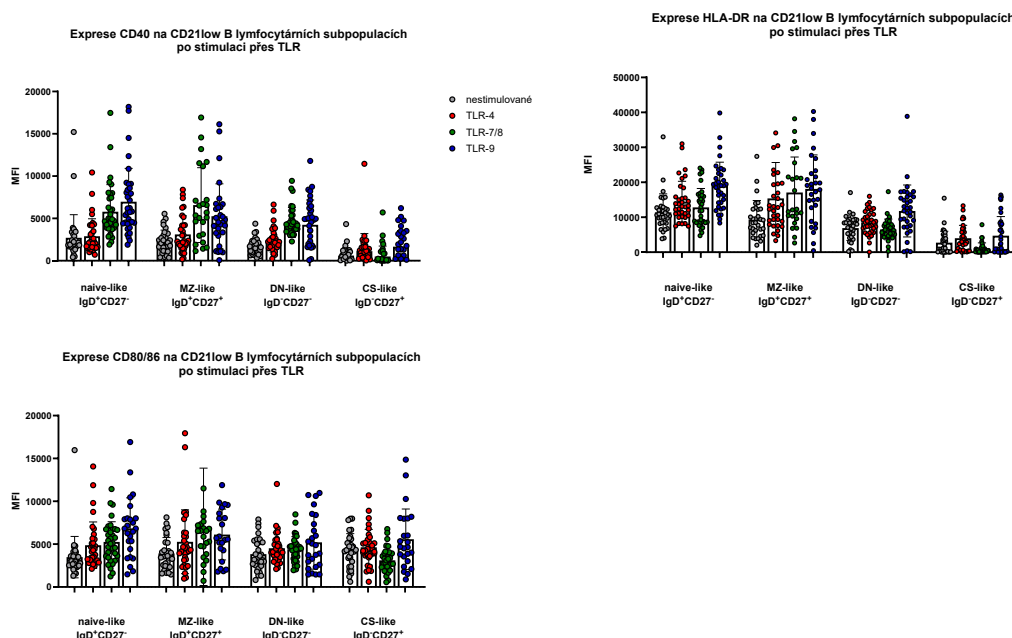
Obrázek 12: Exprese aktivačních znaků CD40, HLA-DR, CD80/86 na stimulovaných B lymfocytech

Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena pomocí Kruskal-Wallisova testu. Nesignifikantní výsledky nejsou vyznačeny. (PIK – pouze infekční komplikace, VNK – významné neinfekční komplikace)

Při analýze *in vitro* stimulace u subpopulací patientských CD21low B lymfocytů bylo patrné výrazné zvýšení exprese aktivačních znaků především u naive-like a MZ-like subpopulací, v menší míře i u DN-like CD21low lymfocytů, CS-like CD21low lymfocyty reagovaly na stimulaci přes TLR v porovnání s ostatními subpopulacemi významně nižší expresí aktivačních markerů.

Zvýšení exprese CD40 bylo pozorováno u naive-like, MZ-like a DN-like CD21low buněk, zatímco u stimulovaných CS-like CD21low lymfocytů byla exprese zvýšena pouze těsně nad hladinu exprese znaku u nestimulovaných buněk. Podobný trend byl zřejmý i u exprese HLA-DR, kdy naive-like a MZ-like CD21low vykazovaly signifikantně vyšší expresi ve srovnání s DN-like CD21low a tyto pak signifikantně převyšovaly expresi pozorovanou u CS-like CD21low buněk. V případě exprese molekul CD80/86 nebyly mezi jednotlivými subpopulacemi pozorovány významné rozdíly, s výjimkou stimulace prostřednictvím TLR-7/8, kde naive-like a MZ-like CD21low buňky vykazovaly signifikantně vyšší expresi oproti CS-like CD21low.

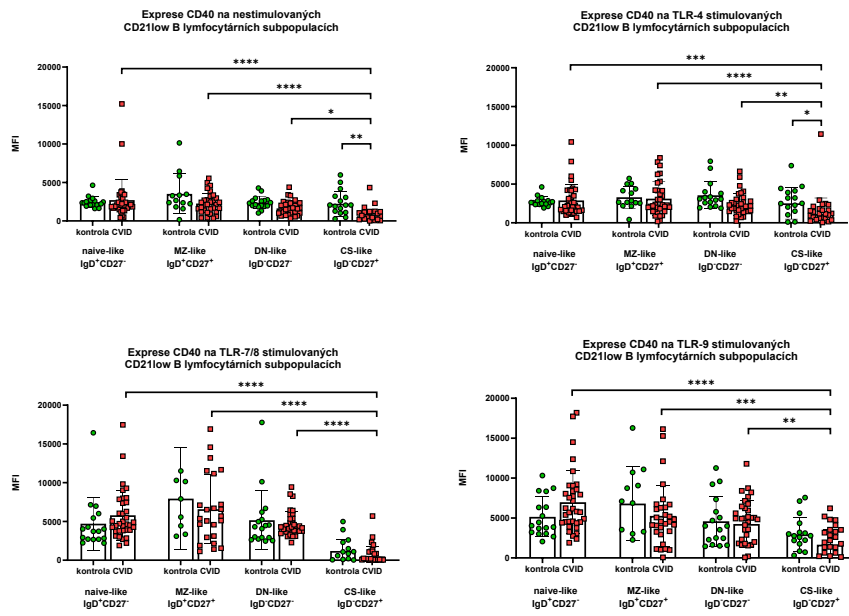
Výsledky analýzy jsou schematicky znázorněny na Obrázku 15, kompletní porovnání včetně signifikancí je znázorněno na Obrázku 16 A-C.



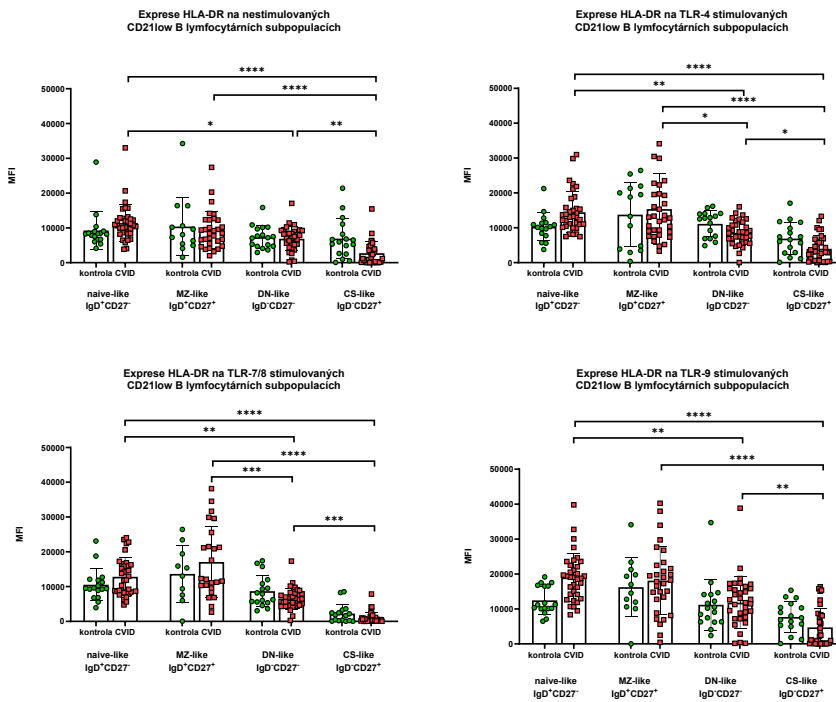
Obrázek 13: Schéma exprese aktivačních znaků CD40, HLA-DR a CD80/86 na stimulovaných CD21low B lymfocytárních subpopulacích u pacientů s COVID

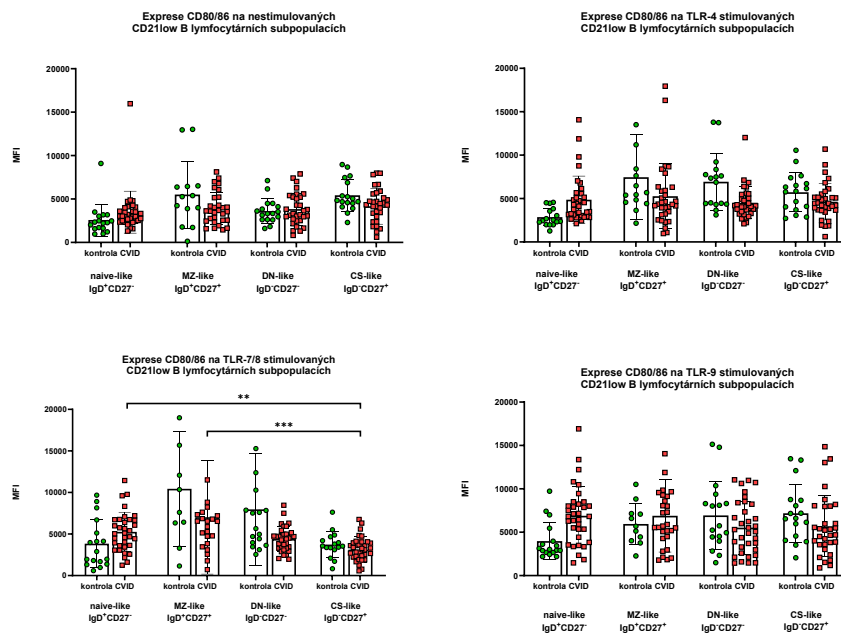
(*CS-like* – class-switched-like, *DN-like* – double negative-like, *MZ-like* – marginal zone-like)

16 A



16 B



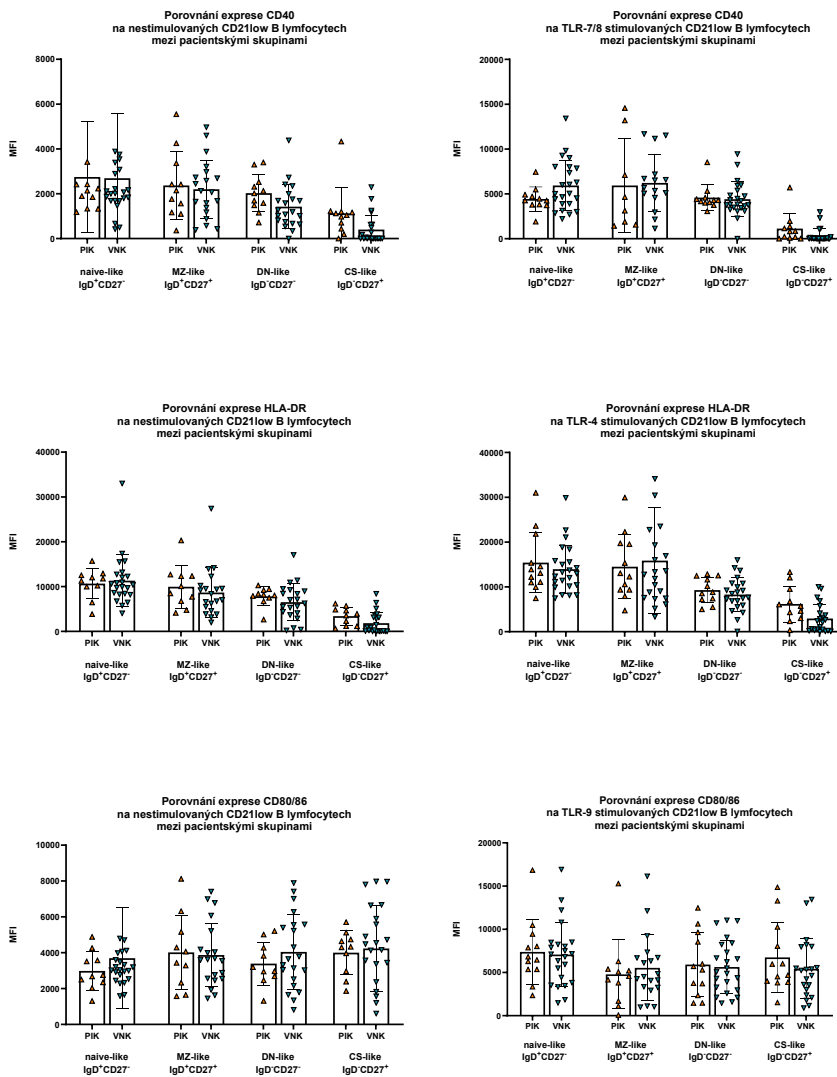


Obrázek 14: Expresse aktivačních znaků CD40, HLA-DR a CD80/86 na stimulovaných CD21low B lymfocytech

- (A) Expresse CD40 na TLR-stimulovaných CD21low B lymfocytech
 (B) Expresse HLA-DR na TLR-stimulovaných CD21low B lymfocytech
 (C) Expresse CD80/86 na TLR-stimulovaných CD21low B lymfocytech

Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena pomocí Kruskal-Wallisova testu. Nesignifikantní výsledky nejsou vyznačeny, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).
 (CS-like – class-switched-like, DN-like – double negative-like, MZ-like – marginal zone-like)

Vzájemné porovnání patientských podskupin ukázalo srovnatelný profil exprese aktivačních markerů na CD21low subpopulacích B lymfocytů (ilustrováno příklady na Obrázku 17). Po stimulaci nebyly u žádné ze sledovaných subpopulací CD21low B buněk zaznamenány statisticky významné rozdíly v míře exprese aktivačních znaků mezi skupinami. Tyto výsledky naznačují nezávislost jednotlivých CD21low subpopulací z hlediska aktivačního profilu po *in vitro* stimulaci na klinickém fenotypu CVID.



Obrázek 15: Vybraná porovnání exprese aktivačních znaků CD40, HLA-DR a CD80/86 na stimulovaných CD21low B lymfocytech mezi patientskými podskupinami

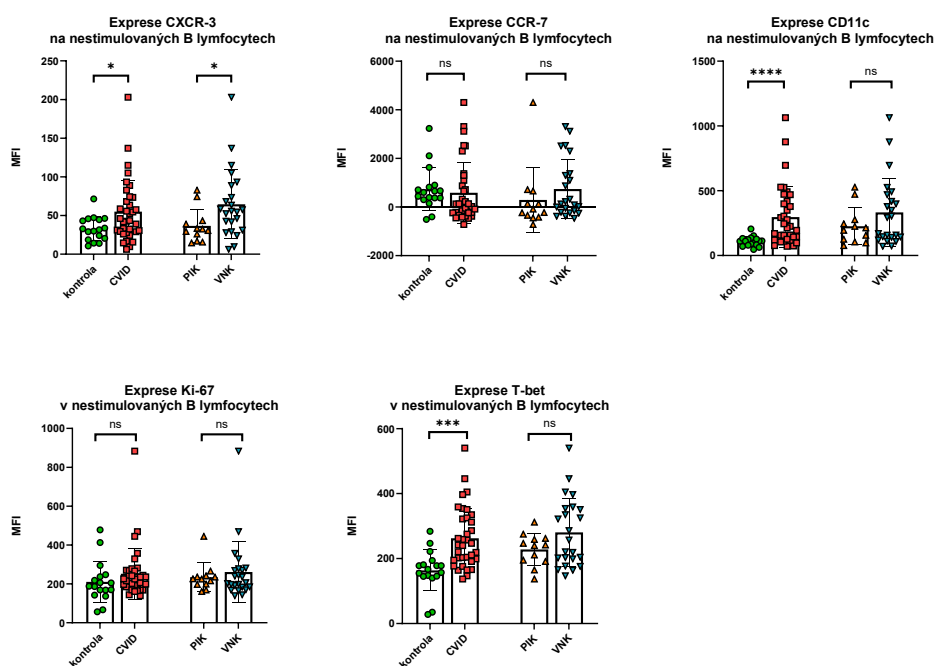
Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena pomocí Kruskal-Wallisova testu. Nesignifikantní výsledky nejsou vyznačeny. (*CS-like* – class-switched-like, *DN-like* – double negative-like, *MZ-like* – marginal zone-like)

4.3. Expresa funkčních znaků na nestimulovaných B lymfocytech

U nestimulovaných B lymfocytů byla analyzována exprese vybraných funkčních znaků – CXCR3, CCR7, CD11c, T-bet a Ki-67.

Expresa chemokinového receptoru CXCR3 byla signifikantně zvýšena u pacientů s CVID ve srovnání se zdravými kontrolami a zároveň byla vyšší u pacientů s VNK, než u pacientů s PIK. Naproti tomu exprese dalšího chemokinového receptoru CCR7 nevykazovala mezi sledovanými skupinami statisticky významné rozdíly.

Expresa integrinové molekuly CD11c byla výrazně vyšší u pacientů s CVID než u zdravých jedinců. I u transkripčního faktoru T-bet byla pozorována zvýšená exprese u pacientů ve srovnání se zdravými kontrolami, avšak mezi podskupinami pacientů rozdíly zaznamenány nebyly. Marker proliferace Ki-67 nevykazoval u nestimulovaných B lymfocytů mezi jednotlivými skupinami rozdíly v expresi.



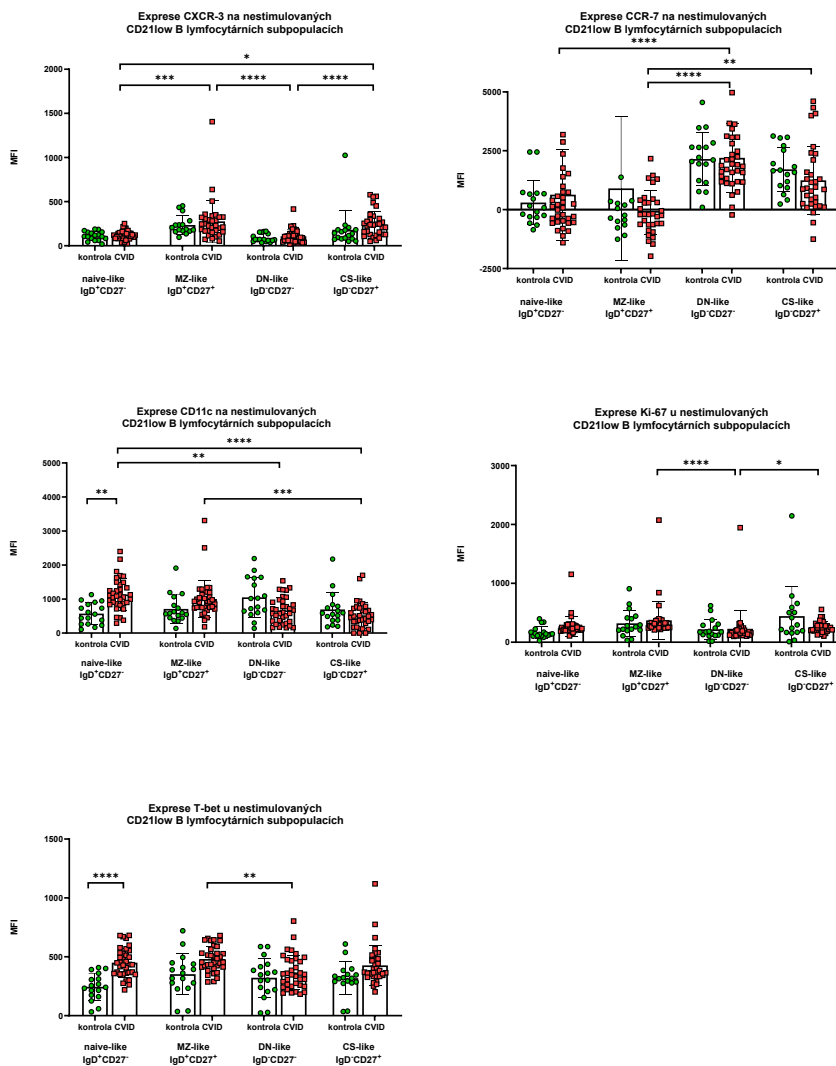
Obrázek 16: Expresa vybraných funkčních znaků na nestimulovaných B lymfocytech

Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena pomocí Mann-Whitneyova testu ($p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****)).

(PIK – pouze infekční komplikace, VNK – významné neinfekční komplikace)

Analýza zmíněných funkčních znaků zaměřená na CD21low B lymfocyty ukázala specifické rozdíly v expresi napříč jednotlivými subpopulacemi. Receptor CXCR3 byl výrazněji exprimován na MZ-like a CS-like buňkách, zatímco nižší exprese byla zaznamenána u naive-like a DN-like CD21low. Receptor CCR7 vykazoval vyšší expresi u DN-like a CS-like buněk ve srovnání s naive-like a MZ-like subpopulacemi.

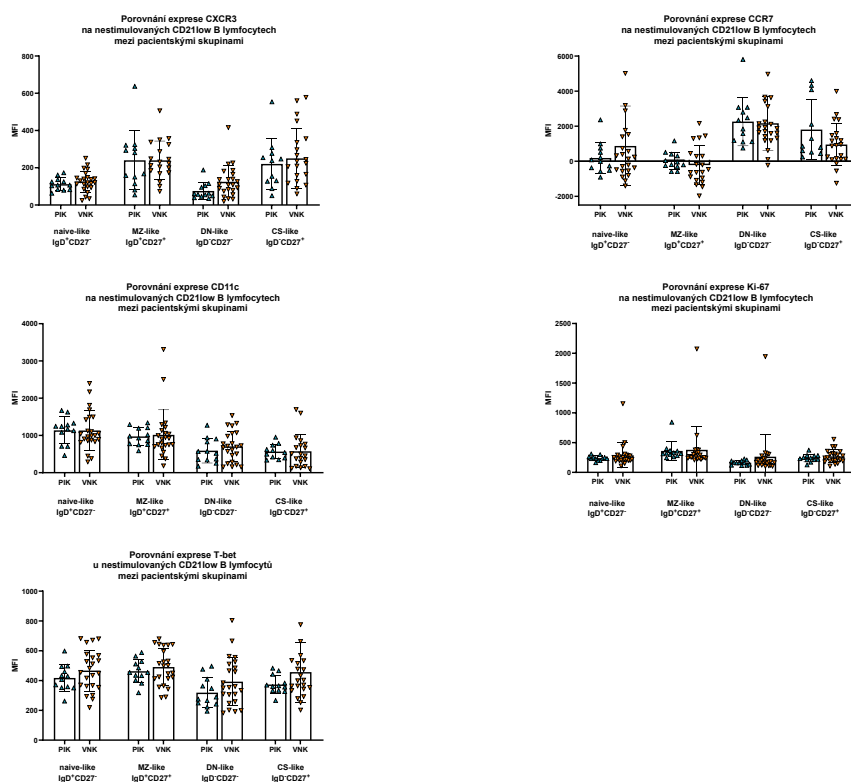
Molekula CD11c byla nejvýrazněji zastoupena u naive-like a MZ-like CD21low lymfocytech, zároveň byla pozorovaná exprese CD11c a T-bet na naive-like CD21low buňkách byla vyšší u pacientů s CVID než u kontrol, obdobně jako u celkových B lymfocytů.



Obrázek 17: Expres vybraných funkčních znaků na CD21low B lymfocytárních subpopulacích

Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena pomocí Kruskal-Wallisova testu. Nesignifikantní výsledky nejsou vyznačeny, ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****)). (CS-like – class-switched-like, DN-like – double negative-like, MZ-like – marginal zone-like)

Další porovnání zaměřené na patientské podskupiny nepřineslo žádné statisticky významné rozdíly v expresi funkčních znaků u CD21low B lymfocytárních subpopulací.

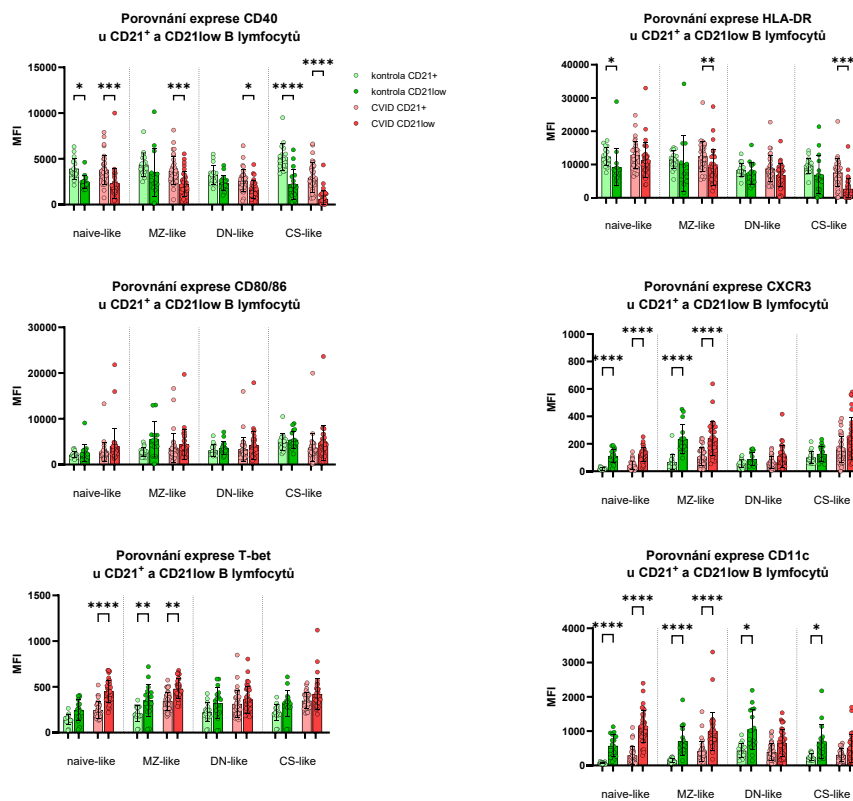


Obrázek 18: Porovnání exprese vybraných funkčních znaků u nestimulovaných CD21low B lymfocytů mezi patientskými podskupinami

Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena pomocí Kruskal-Wallisova testu. Nesignifikantní výsledky nejsou vyznačeny.

(**CS-like** – class-switched-like, **DN-like** – double negative-like, **MZ-like** – marginal zone-like, **PIK** – pouze infekční komplikace, **VNK** – významné neinfekční komplikace)

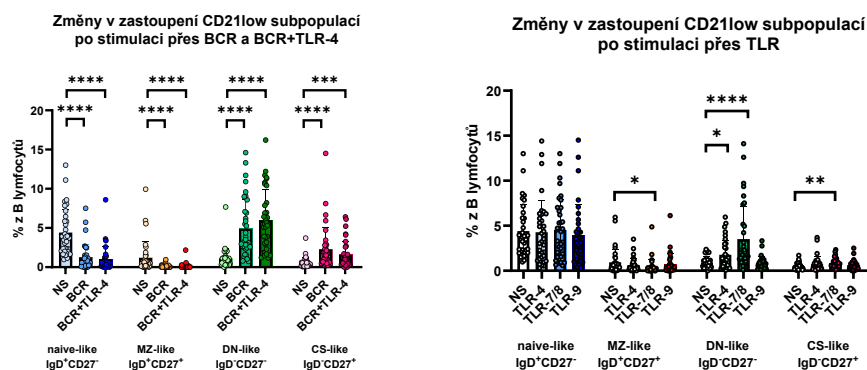
V rámci analýzy aktivačních a funkčních znaků jsme rovněž porovnali exprese vybraných markerů mezi nestimulovanými CD21^{low} a fenotypově odpovídajícími CD21⁺ B lymfocyty u pacientů s CVID a zdravých kontrol. U CD21⁺ subpopulací kontrol i pacientů byla zaznamenána vyšší exprese aktivačních molekul CD40 především u naive-like a CS-like subpopulací, ale podobný trend byl pozorován i u zbylých subpopulací. Exprese HLA-DR u CD21⁺ MZ-like a CS-like patientských populací byla zvýšena ve srovnání s odpovídajícími CD21^{low} buňkami. Exprese kostimulačních molekul CD80/86 pak nevykazovala mezi CD21^{low} a CD21⁺ populacemi významné rozdíly. Naproti tomu exprese CXCR3, T-bet a CD11c byla zvýšená u CD21^{low} buněk, zejména u jejich naive-like a MZ-like subpopulací.



Obrázek 19: Porovnání exprese vybraných znaků na nestimulovaných CD21^{low} a fenotypově odpovídajících CD21⁺ B lymfocytech

Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena pomocí Kruskal-Wallisova testu. Nesignifikantní výsledky nejsou vyznačeny, ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****)). (CS-like – class-switched-like, DN-like – double negative-like, MZ-like – marginal zone-like)

Při *in vitro* stimulaci B lymfocytů prostřednictvím BCR a kombinované stimulaci přes BCR a TLR byly pozorovány výrazné změny v relativní četnosti jednotlivých subpopulací CD21low B lymfocytů. Nejvýrazněji se snížilo zastoupení naive-like CD21low B buněk, u kterých v reakci na polyklonální stimulaci prostřednictvím BCR pravděpodobně dochází k diferenciaci. Rovněž došlo ke snížení četnosti MZ-like subpopulace, zatímco četnost DN-like a CS-like CD21low B lymfocytů se naopak významně zvýšila.



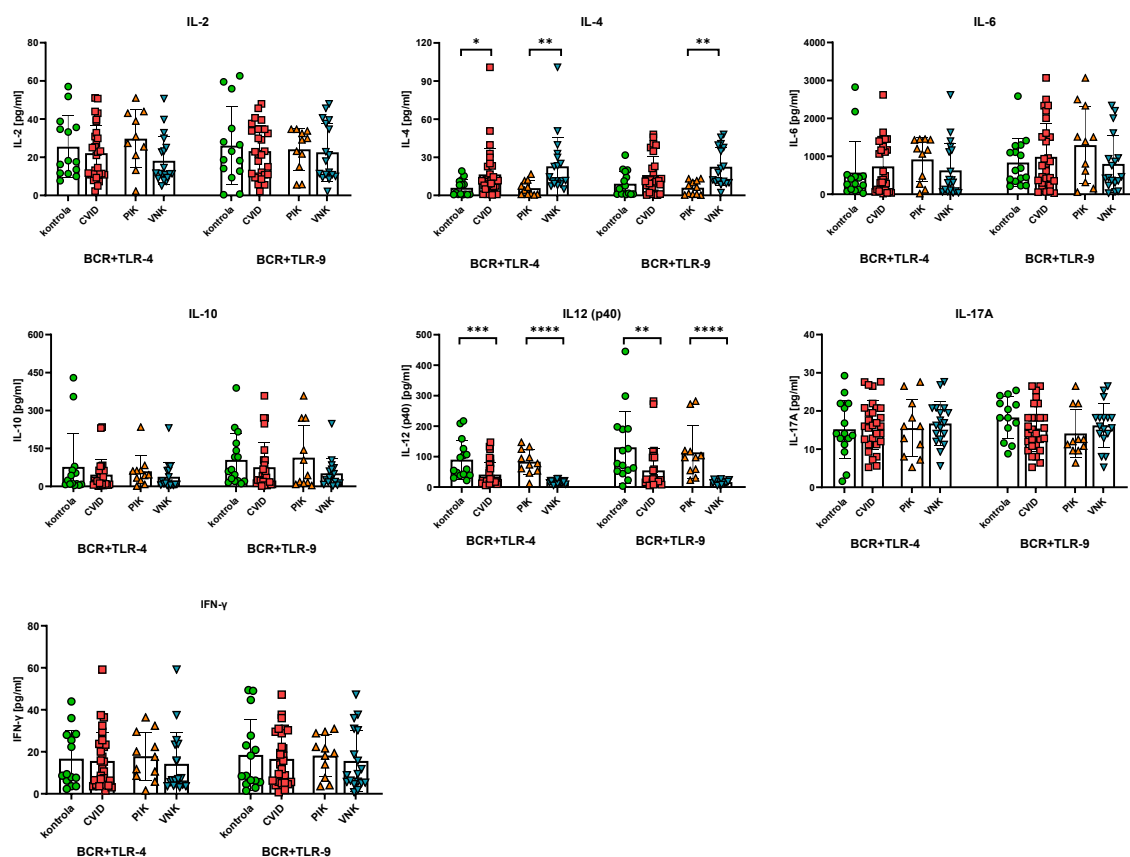
Obrázek 20: Změny v relativním zastoupení CD21low B lymfocytárních subpopulací po stimulaci přes BCR a TLR

Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena pomocí Kruskal-Wallisova testu. Nesignifikantní výsledky nejsou vyznačeny, ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****)). (CS-like – class-switched-like, DN-like – double negative-like, MZ-like – marginal zone-like)

4.4. Analýza cytokinového prostředí

Pomocí Luminex analýzy byly stanoveny koncentrace vybraných cytokinů v supernatantech získaných po *in vitro* stimulaci izolovaných B lymfocytů kombinací BCR s TLR-4 nebo TLR-9. Standardní křivky pro výpočet koncentrací cytokinů jsou zobrazeny v Příloze 2.

Hladiny cytokinů IL-2, IL-6, IL-10, IL-17A a IFN- γ se po stimulaci nelišily mezi zdravými kontrolami a pacienty ani mezi jednotlivými patientskými podskupinami. V případě IL-12 (p40) byla u obou typů stimulace pozorována zvýšená koncentrace tohoto cytokinu u zdravých kontrol ve srovnání s pacienty, a zároveň vyšší hladina u pacientů s PIK ve srovnání s pacienty s VNK. Opačný trend byl zaznamenán u IL-4, jehož hladina byla po stimulaci BCR+TLR-4 zvýšená u pacientů obecně a u pacientů s VNK oproti PIK pacientům u obou stimulačních podmínek.



Obrázek 21: Stanovení hladiny vybraných cytokinů v supernatantu po *in vitro* stimulaci B lymfocytů

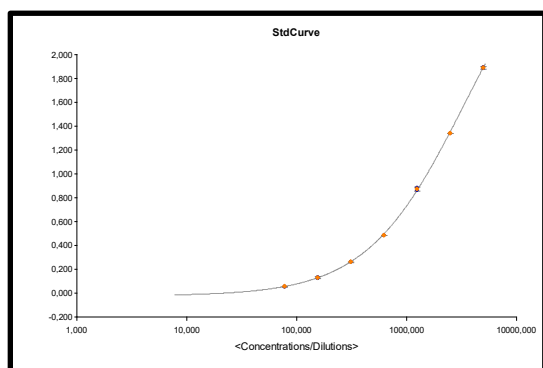
Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena pomocí Mann-Whitneyova testu. Nesignifikantní výsledky nejsou vyznačeny, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****). (PIK – pouze infekční komplikace, VNK – významné neinfekční komplikace)

4.5. Analýza sérové hladiny vybraných zánětlivých markerů

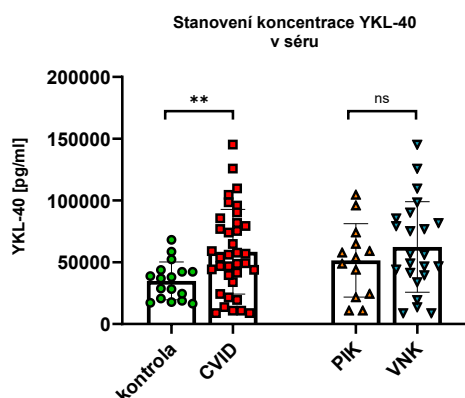
YKL-40

Pomocí ELISA eseje byla analyzována koncentrace markeru YKL-40 v sérových vzorcích pacientů a zdravých kontrol. YKL-40 je glykoprotein produkovaný aktivovanými makrofágy, neutrofilami, endoteliálními a dalšími buňkami. V posledních letech je intenzivně zkoumán jako biomarker chronického zánětu, remodelace tkání a angiogeneze. Zvýšené hladiny YKL-40 byly popsány rovněž u různých autoimunitních onemocnění (Blazevic et al., 2024; Tizaoui et al., 2022). Koncentrace YKL-40 byla určena na základě standardní křivky získané z měření sériově ředěných standardů (Obrázek 24).

Bylo zjištěno, že pacienti vykazovali signifikantně vyšší hladiny YKL-40 v porovnání s kontrolní skupinou. Mezi jednotlivými patientskými podskupinami však rozdíly v koncentracích tohoto markeru pozorovány nebyly.



Obrázek 22: Standardní křivka pro určení sérové koncentrace YKL-40

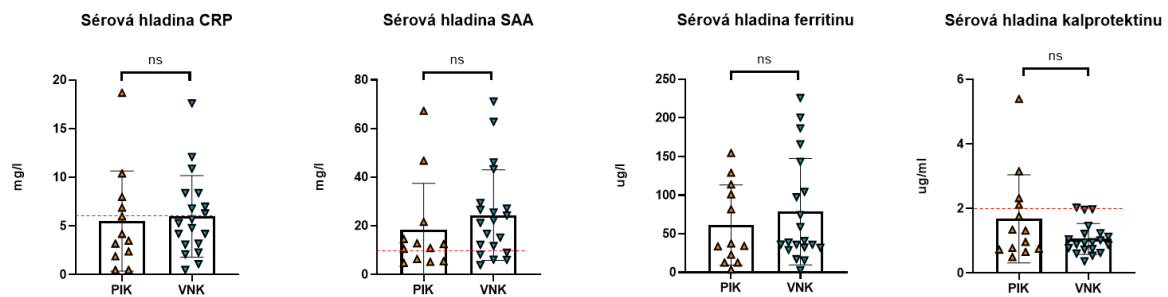


Obrázek 23: Sérologické stanovení koncentrace YKL-40 pomocí ELISA eseje

Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena pomocí nepárového *t*-testu ($p < 0,01$ (**)). (PIK – pouze infekční komplikace, VNK – významné neinfekční komplikace)

Další zánětlivé markery

Hodnoty CRP přesahující fyziologickou hranici (6 mg/l) byly zaznamenány u 5 pacientů ve skupině PIK a u 8 pacientů ze skupiny VNK, přičemž šlo pouze o mírné zvýšení do 20 mg/l. Koncentrace SAA byly výrazně zvýšené u obou skupin pacientů – v rámci skupiny PIK u 8 z 12 pacientů, ve skupině VNK u 15 z 20 stanovených pacientů. Horní referenční hranice koncentrace ferritinu nebyla překročena u žádného z pacientů, u kalprotektinu byla přesažena u tří pacientů s PIK a jednoho pacienta s VNK. Při souhrnném porovnání skupin pacientů ovšem nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly v koncentracích žádného z analyzovaných zánětlivých markerů.



Obrázek 24: Porovnání sérové koncentrace vybraných zánětlivých markerů u pacientů s PIK a VNK

Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena pomocí Mann-Whitneyova testu. Červenou čarou jsou vyznačeny udávané horní fyziologické hranice markeru. (PIK – pouze infekční komplikace, VNK – významné neinfekční komplikace)

5. Diskuze

PAD představují nejčastější skupinu primárních poruch imunity. Jejich závažnost spočívá nejen v opakovaných a chronických infekcích, ale také ve zvýšeném riziku autoimunitních, lymfoproliferativních, granulomatózních, chronických zánětlivých či maligních komplikací, které zásadně ovlivňují kvalitu života pacientů. Vzhledem k často nespecifickým klinickým projevům zůstávají některé případy PAD dlouhodobě nediodagnostikovány, což zdůrazňuje nutnost zlepšení diagnostických přístupů a hlubšího porozumění jejich patofyziologii. Klíčovou roli v rozvoji těchto poruch sehrávají B lymfocyty, jejichž správný vývoj, diferenciacce a funkce jsou nezbytné pro zachování účinné antigenně-specifické humorální imunity. Naopak poruchy v různých aspektech biologie B buněk se podílejí na vzniku širokého spektra dysregulací imunitního systému. V této práci jsme se proto zaměřili na význam B lymfocytů v patogenezi a klinických fenotypech jednoho z nejvýznamnějších zástupců PAD – běžné variabilní imunodeficiencie.

V této práci jsme pracovali se skupinou pacientů s diagnostikovanou CVID, sledovaných v rámci péče ve Fakultní nemocnici Motol. Pacienti byli rozděleni do dvou podskupin podle přítomnosti či nepřítomnosti významných neinfekčních komplikací. Opodstatnění pro rozdělení pacientů do dvou skupin vycházelo z předpokladu, že u části nemocných s CVID se kromě infekcí rozvíjejí i další komplikace neinfekční povahy, které pravděpodobně odrážejí odlišné poruchy v regulaci imunitního systému, respektive B lymfocytů.

V první části projektu jsme se zaměřili na analýzu základních parametrů B lymfocytů a jejich subpopulací. Cílem bylo ověřit dříve popsané imunofenotypické charakteristiky CVID u naší skupiny pacientů a porovnat je se zdravými kontrolami. Ve druhé části projektu jsme provedli na *in vitro* stimulaci B lymfocytů pomocí stimulů reprezentujících klíčové aktivační signály – BCR, CD40 a TLR receptory. Cílem bylo zhodnotit funkční kapacitu B lymfocytů pacientů s CVID na základě exprese aktivačních markerů CD40, CD80/86 a HLA-DR. Ve třetí části projektu jsme navázali analýzou funkčních znaků na nestimulovaných B lymfocytech. V poslední části projektu jsme se zaměřili na analýzu cytokinového a zánětlivého prostředí u pacientů s CVID. Tato kapitola si klade za cíl shrnout získané výsledky a zasadit je do kontextu současného vědeckého poznání.

Výsledky první části studie potvrdily dřívější pozorování – zaznamenali jsme snížené relativní zastoupení celkových paměťových B buněk a paměťových B lymfocytů po izotypovém přesmyku, provázené relativním nárůstem časných vývojových stadií, zejména naivních B lymfocytů (Wehr et al., 2008). Zároveň jsme potvrdili náš výchozí předpoklad o zvýšeném zastoupení CD21low B buněk u pacientů s CVID ve srovnání se zdravými jedinci, ovšem nikoliv mezi patientskými skupinami. Této subpopulaci je v diskuzi věnován samostatný oddíl, neboť její úloha v patogenezi a imunitní dysregulaci u CVID i dalších onemocnění byla opakovaně popsána (například Gjertsson et al., 2022), ale zůstává stále ne zcela objasněná, a je proto hlavním předmětem tohoto projektu.

V návaznosti na základní imunofenotypovou analýzu jsme se dále zaměřili na funkční vlastnosti celkových B lymfocytů po *in vitro* stimulaci. Výsledky stimulace celkových B lymfocytů neukázaly signifikantní rozdíly v expresi aktivačních markerů mezi pacienty a zdravými kontrolami ani mezi jednotlivými patientskými skupinami napříč jednotlivými stimulačními podmínkami. Rozdíly nebyly patrné rovněž při detailnější analýze zaměřené specifitěji na naivní a paměťové B buněčné subpopulace, ani při vzájemném porovnání patientských skupin. Tyto výsledky naznačují, že základní schopnost B buněk reagovat na silnou antigenně-nespecifickou na stimulaci je u pacientů s CVID zachována na srovnatelné úrovni se zdravými kontrolami, a to nezávisle na klinickém fenotypu onemocnění.

V rámci analýzy exprese funkčních znaků na celkových B lymfocytech byla pozorována zvýšená exprese chemokinového receptoru CXCR3 u pacientů s CVID a VNK ve srovnání se zdravými kontrolami, respektive pacienty s PIK. To může odrážet posun B buněk směrem k prozánětlivému migračnímu fenotypu – CXCR3 je typicky spojován s reakcemi na zánětlivé chemokiny (např. CXCL9, CXCL10) produkované při aktivaci Th1 imunitní odpovědi, což může naznačovat přítomnost chronické zánětlivé stimulace. Tomu odpovídá i zvýšená B lymfocytární exprese transkripčního faktoru T-bet u pacientů s CVID oproti zdravým kontrolám, která je v souladu s dříve popsaným fenotypem CD21low B buněk závislých na IFN- γ a IL-21 signálech (Keller et al., 2021; Yang et al., 2022). Mezi patientskými skupinami jsme však v expresi T-bet nezaznamenali signifikantní rozdíl, to může svědčit o společných aktivačních drahách u převážně neinfekčního i infekčního fenotypu CVID.

U proliferačního markeru Ki-67 ani chemokinového receptoru CCR7, důležitého pro migraci lymfocytů do sekundárních lymfatických orgánů, nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi žádnou ze skupin. To ukazuje na nízkou míru proliferační aktivity při absenci stimulace v našich kultivačních podmínkách, respektive zachovanou schopnost cirkulace B lymfocytů mezi tělní periferií a lymfatickou tkání nezávisle na přítomnosti deficiencie a jejího klinického fenotypu.

Zvýšená exprese integrinu CD11c u pacientů s CVID může být známkou expanze populace ekvivalentní ABC buňkám. Tyto lymfocyty se vyznačují zvýšenou expresí transkripčního faktoru T-bet, schopností produkovat autoprotilátky a jsou spojovány s Th1 závislou aktivací a poruchami B buněčné tolerance (Rincon-Arevalo et al., 2021; Wang et al., 2018). ABC buňky částečně sdílejí fenotypické a funkční znaky s CD21low B lymfocyty a jejich zvýšený výskyt odráží stav chronické aktivace a imunitní dysregulace. Přestože jsme mezi pacienty s infekčními a neinfekčními komplikacemi nezaznamenali signifikantní rozdíl v expresi CD11c, lze pozorovat určitý trend k vyšší expresi u části pacientů s neinfekčními manifestacemi. Tento nález naznačuje, že expanze těchto dysregulovaných B buněk může být obecnou charakteristikou CVID, i když jejich zastoupení může být vyšší u pacientů s komplikovanějším klinickým průběhem.

V následujících pasážích budou odděleně diskutovány výsledky týkající se CD21low B lymfocytů. Základní hypotéza našeho projektu spočívá v pohledu na CD21low B lymfocyty ne jako na homogenní populaci, jak bývá často uváděno ve starších publikacích, ale z hlediska toho, že je možné tuto populaci dále rozdělit podle exprese povrchových markerů IgD a CD27 do čtyř fenotypově odlišných subpopulací či vývojových stádií (podobně rozlišeno také u Freudenhammer et al., 2020 či Reincke et al., 2020). Tyto subpopulace se mohou lišit nejen svou funkční kapacitou, ale i potenciálním vztahem k rozvoji neinfekčních komplikací. Takový přístup může přispět k objasnění dříve popsánoho paradoxu, kdy jsou CD21low B buňky v některých kontextech považovány za funkčně vyčerpané, zatímco v jiných vystupují jako aktivní účastníci imunitní dysregulace (Friman et al., 2023; Gjertsson et al., 2022).

Při porovnání relativního zastoupení jednotlivých subpopulací CD21low B lymfocytů jsme u pacientů s COVID zaznamenali zvýšenou frekvenci naive-like a MZ-like buněk ve srovnání se zdravými kontrolami. Tento nálezn odpovídá celkovému posunu B buněčného kompartmentu směrem k časnějším vývojovým stádiím i dříve publikovaným datům, ovšem nereflektuje klinickou manifestaci onemocnění (Freudenhammer et al., 2020; Liechti et al., 2019; Reincke et al., 2020).

Naive-like CD21low B buňky vykazují fenotypovou naivitu, ale současně i známky aberantní aktivace. Ve srovnání s MZ-like a CS-like CD21low buňkami u nich byla popsána nižší exprese kostimulačních molekul CD80/86 a HLA-DR (Reincke et al., 2020). V našem projektu jsme zaznamenali odlišné výsledky. Exprese CD40 byla u naive-like CD21low buněk vyšší než u CS-like subpopulace, a to jak v nestimulovaných podmínkách, tak po stimulaci TLR ligandy. Exprese HLA-DR u těchto buněk rovněž signifikantně převyšovala úroveň zaznamenanou u DN-like i CS-like subpopulace. Exprese CD80/86 byla napříč subpopulacemi vesměs srovnatelná, s výjimkou TLR-7/8 stimulace, kde byly tyto molekuly zvýšeně exprimovány u naive-like a MZ-like buněk. Naive-like CD21low buňky současně exprimovaly nižší hladiny chemokinových receptorů CXCR3 a CCR7, což může poukazovat na jejich omezený migrační potenciál. Zajímavým nálezem však byla zvýšená exprese transkripčního faktoru T-bet a integrinu CD11c u pacientů s COVID, naznačující prozánětlivý charakter těchto buněk.

MZ-like CD21low B buňky zůstávají málo prozkoumanou subpopulací. Jejich expanze byla popsána především u pacientů s chronickou HCV infekcí a smíšenou kryoglobulinémií, kde vykazují známky funkčního vyčerpání, včetně zvýšené exprese pro-apoptického transkripčního faktoru Stra13 (Charles et al., 2011; Terrier et al., 2011; Visentini et al., 2011). Z funkčního hlediska tyto buňky odpovídají na stimulaci přes TLR-9 zvýšenou expresí CD25, CD69 a CD40, zatímco na BCR a CD40 stimulaci nereagují, což může odrážet stav anergie nebo vyšší citlivost ke spuštění apoptotické smrti (Terrier et al., 2011). Naše data tento profil potvrzují a dále rozšiřují – MZ-like CD21low buňky výrazně reagovaly na stimulaci přes TLR-4, TLR-7/8 a TLR-9 zvýšenou expresí CD40 a HLA-DR, zatímco BCR stimulace vedla k poklesu jejich zastoupení. Tento jev může být vysvětlen právě zvýšenou mírou apoptózy po BCR stimulaci, nebo alternativně jejich diferenciací do jiných CD21low subpopulací. MZ-like (a CS-like) CD21low buňky vykazovaly v nestimulovaných podmínkách vysokou expresi receptoru CXCR3, a naopak nízkou expresi CCR7, která ukazuje na jejich omezenou schopnost migrace do sekundárních lymfatických orgánů. Souhrnně naše výsledky naznačují prozánětlivý a TLR-senzitivní profil MZ-like buněk a naznačují jejich možnou úlohu v imunitní dysregulaci.

DN-like CD21low B buňky jsou součástí širší populace DN B lymfocytů, která zahrnuje jak CD21⁺ tak CD21low buňky. Jejich expanze byla popsána u celé řady imunopatologických stavů – včetně chronických infekcí, autoimunitních onemocnění i při stárnutí imunity (tzv. inflammaging) (Claes et al., 2016; Frasca et al., 2017; Golinski et al., 2020). DN B buňky bývají označovány za funkčně vyčerpané, ale vykazují i některé známky aktivace – zvýšenou expresi T-bet, TLR-7 a sníženou expresi negativních regulátorů zánětlivých drah (Fraussen et al., 2019; Jenks et al., 2018). V našem souboru však DN-like CD21low buňky exprimovaly nízké hladiny CXCR3 i transkripčního faktoru T-bet, a rovněž vykazovaly nižší expresi Ki-67. Naopak jsme zaznamenaly zvýšenou expresi CCR7, obdobně jako u CS-like CD21low buněk. Mezi skupinami pacientů s různými klinickými fenotypy COVID přitom nebyly pozorovány signifikantní rozdíly v tomto znaku.

Po stimulaci přes TLR-7/8 jsme pozorovali zvýšení relativního zastoupení DN-like CD21low subpopulace a současně snížení naive-like CD21low subpopulace, potenciálně vysvětlitelné diferenciací naivních buněk do DN stádia, jak popisují i jiné studie v kontextu systémového lupusu erythematoses (Jenks et al., 2018). DN-like CD21low buňky zároveň vykazovaly srovnatelnou expresi CD40 a CD80/86 jako naive-like a MZ-like CD21low buňky, ale sníženou hladinu HLA-DR i po TLR-7/8 stimulaci, což může naznačovat omezenou schopnost antigenní prezentace. Z hlediska dalších kostimulačních molekul je zajímavý poznatek z publikace Reinckeho, který uvádí zvýšenou expresi ICOS-L na DN-like CD21low buňkách ve srovnání s ostatními CD21low i CD21⁺ B buňkami. To naznačuje, že DN-like CD21low buňky si navzdory nízké expresi HLA-DR mohou udržovat určitý potenciál interakce s T lymfocyty, pravděpodobně prostřednictvím alternativních kostimulačních drah (Reincke et al., 2020).

CS-like CD21low B buňky představují paměťové buňky s fenotypem funkčního vyčerpání. Po stimulaci TLR ligandy vykazovaly nejnižší hladiny CD40, HLA-DR i CD80/86 ze všech subpopulací, ukazující zásadně omezený aktivační potenciál a sníženou schopnost interakce s T buňkami (na rozdíl od fenotypově analogické CD21⁺ populace). Výrazná exprese chemokinových receptorů CXCR3 i CCR7 může svědčit o zachovalé migrační schopnosti těchto buněk do různých mikroprostředí – jak zánětlivých, tak lymfatických. Zajímavým rysem této populace byl nárůst jejich relativního zastoupení po BCR stimulaci, což může poukazovat na jejich vznik jako terminálního diferenciačního stádia ostatních CD21low subpopulací. Tento vývojový posun může být *in vivo* výsledkem chronické BCR stimulace, která vede ke vzniku fenotypově vyzrálých, ale funkčně omezených paměťových B buněk.

V analýze rozdílů exprese aktivačních a funkčních znaků u CD21low a fenotypově odpovídajících CD21⁺ B lymfocytů jsme pozorovali konzistentní zvýšení exprese CD40 a HLA-DR u CD21⁺ B buněk napříč hodnocenými subpopulacemi, a to jak u pacientů s CVID, tak u zdravých kontrol, zatímco u CD21low buněk byla exprese těchto molekul nižší. Tento nález je v souladu s dříve publikovanými výsledky, které rovněž uvádějí sníženou expresi CD40 u CD21low B buněk (Reincke et al., 2020). Naproti tomu exprese kostimulačních molekul CD80/86 byla v našem souboru srovnatelná mezi CD21low a CD21⁺ populacemi i mezi jednotlivými fenotypy, což je v rozporu s publikovaným pozorováním, kde byla popisována zvýšená exprese CD80/86 u CD27⁺ CD21low buněk.

Z funkčního hlediska pak dostupná data ukazují, že navzdory odlišnostem v expresi některých povrchových znaků vykazují CD21low B buňky srovnatelnou schopnost indukovat časné aktivační markery (CD69, CD25, ICOS) na CD4⁺ T buňkách jako jejich CD21⁺ protějšky. Určité funkční rozdíly však byly zaznamenány při ko-kultivaci s paměťovými T lymfocyty, kde byla exprese markeru CD25 nižší po stimulaci pomocí naivních a MZ-like CD21low buněk. Zároveň bylo pozorováno, že všechny CD21low subpopulace indukovaly zvýšenou expresi inhibičního receptoru PD-1 na CD4⁺ T lymfocytech (statisticky významného rozdílu bylo ovšem dosaženo pouze u naivních CD21low buněk) (Reincke et al., 2020).

V souhrnu k CD21low B lymfocytům lze na základě získaných dat konstatovat, že naive-like CD21low B buňky jsou navzdory své fenotypové nezralosti aktivované a nesou známky prozánětlivého ladění (T-bet⁺, CD11c⁺), které mohou indikovat jejich potenciální úlohu při přetrvávající dysregulované imunitní odpovědi. MZ-like CD21low buňky reagují na TLR stimulaci; to spolu se zvýšenou expresí zánětlivých markerů ukazuje na jejich senzitivitu k „innate-like“ podnětům a možnou účast v udržování chronického zánětlivého prostředí. DN-like CD21low buňky působí jako populace s omezenou aktivační schopností, sníženou expresí HLA-DR i T-bet, ale se zachovanou schopností diferenciací z jiných subtypů a s možným zapojením do T buněčné stimulace alternativními cestami. CS-like CD21low buňky se jeví jako senescentní terminální diferenciací stádium CD21low lymfocytů s nízkou schopností aktivace, ale zachovanou schopností migrace.

V poslední části této kapitoly bude diskutován význam cytokinového a prozánětlivého prostředí u pacientů s CVID.

Rostoucí množství literárních údajů poukazuje na významnou roli cytokinové dysregulace u pacientů s CVID, zejména v souvislosti s rozvojem neinfekčních komplikací. Získané výsledky se však mezi jednotlivými studiemi často výrazně liší (Varzaneh et al., 2014). Některé práce uvádějí, že pacienti s VNK vykazují zvýšenou expresi prozánětlivých cytokinů, jako jsou TNF- α , IL-1 β , IL-6, nebo regulačního cytokinu IL-10, ve srovnání s pacienty s převážně infekčními komplikacemi a zdravými kontrolami (Lollo et al., 2016; Poto et al., 2023). Další námi stanovované cytokiny IL-2 a IFN- γ , byly v předchozích studiích popsány s rozpornými výsledky, přičemž některé práce uvádějí jejich zvýšenou, jiné naopak sníženou produkci u pacientů s CVID (Varzaneh et al., 2014). V kontextu námi pozorované zvýšené exprese chemokinového receptoru CXCR3 u pacientů s CVID je zvláště relevantní i zvýšení sérových koncentrací jeho ligandů – prozánětlivých chemokinů CXCL8, CXCL9 a CXCL10 u pacientů s CVID, které mohou (spolu s dalšími aberantně produkovanými chemokiny) přispívat k vytváření zánětlivého migračního prostředí (Abyazi et al., 2022; Lollo et al., 2016).

Naše výsledky po stimulaci purifikovaných B lymfocytů pomocí BCR + TLR-4/9 částečně navázaly na předchozí studie. Nebyly prokázány signifikantní rozdíly v hladinách IL-2, IL-6, IL-10, IL-17A a IFN- γ mezi pacienty a zdravými kontrolami ani mezi skupinami pacientů. Naproti tomu koncentrace IL-12 (p40) byla překvapivě signifikantně vyšší u zdravých kontrol ve srovnání s pacienty a rovněž vyšší u pacientů s PIK oproti VNK, toto pozorování odporuje některým dříve publikovaným výsledkům (Abyazi et al., 2022) a může odrážet sníženou schopnost monocytů a makrofágů u části pacientů s CVID produkovat IL-12, což by mohlo mít dopad na diferenciaci Th1-polarizované imunitní odpovědi. Naopak IL-4 byl po stimulaci zvýšen u pacientů, zejména ve skupině VNK, naznačující trend posunu k Th2 imunitní odpovědi. Vzhledem k tomu, že signifikantní rozdíly byly zaznamenány pouze u dvou stanovovaných cytokinů a analýza byla provedena za specifických stimulačních podmínek *in vitro*, je třeba interpretovat tyto výsledky s jistou opatrností a chápat je spíše jako podnět pro další rozsáhlejší analýzy.

Dále jsme se zaměřili na sérologické stanovení hladin vybraných prozánětlivých markerů u pacientů s CVID. Zaznamenali jsme signifikantně zvýšené sérové koncentrace YKL-40 ve srovnání se zdravými kontrolami. Mezi jednotlivými patientskými skupinami však rozdíly pozorovány nebyly, což naznačuje, že zvýšená hladina YKL-40 může odrážet obecnou aktivaci zánětlivých drah u CVID, nezávisle na typu neinfekčních komplikací.

Obdobný trend byl patrný i u dalších zánětlivých markerů, zejména SAA, který je v některých případech považován za citlivější ukazatel zánětlivé aktivity než rutinně stanovovaný CRP. Výrazně zvýšené hladiny SAA byly detekovány u přibližně tří čtvrtin pacientů v obou sledovaných skupinách. Zvýšené koncentrace CRP pak byly zaznamenány u pěti pacientů ve skupině PIK a osmi pacientů ve skupině VNK, přičemž ve všech případech se jednalo o mírnou elevaci do 20 mg/l. Tato zjištění odpovídají výsledkům předchozích studií, které prokázaly zvýšené hladiny SAA a CRP u pacientů s autoinflamatorními poruchami či zánětlivými onemocněními GIT, častými i u pacientů s CVID (Legger et al., 2022; Stute et al., 2024). Rovněž zvýšené hladiny fekálního kalprotektinu byly dříve popsány především u pacientů s CVID trpících neinfekčními průjmy nebo chronickými zánětlivými onemocněními GIT (Pikkarainen et al., 2019; van Schewick et al., 2020). V našem souboru však byla zvýšená hladina sérového kalprotektinu zaznamenána pouze u tří pacientů ve skupině PIK a jediného pacienta s VNK. Sérové koncentrace ferritinu pak zůstaly u všech pacientů pod horní hranicí referenčního rozmezí.

Při souhrnném porovnání obou patientských skupin nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v hladinách žádného z analyzovaných markerů. Tyto rozporuplné nálezy proto mohou odrážet přítomnost chronického subklinického zánětu jako obecného imunopatologického rysu CVID, který není nutně spojen s manifestací onemocnění.

6. Závěr

- Pomocí průtokové cytometrie jsme analyzovali zastoupení B lymfocytárních populací. U pacientů s CVID jsme zaznamenali snížené zastoupení celkových paměťových i paměťových B buněk po izotypovém přesmyku, spolu s expanzí naivních a CD21low B lymfocytů. CD21low populace byla dále rozdělena podle exprese markerů IgD a CD27 do čtyř funkčně odlišných subtypů. Zastoupení těchto subpopulací se u pacientů odlišovalo od zdravých kontrol – signifikantní byla expanze naive-like a MZ-like CD21low B buněk. Mezi patientskými skupinami nebyl zaznamenán rozdíl.
- V rámci celkové B lymfocytární populace nebyly mezi pacienty a zdravými kontrolami pozorovány signifikantní rozdíly v expresi aktivačních molekul (CD40, HLA-DR, CD80/86) po *in vitro* stimulaci. Naopak u nestimulovaných buněk byla u pacientů zjištěna zvýšená exprese funkčních znaků – CD11c (integrin spojený s ABC buňkami a aktivací), chemokinového receptoru CXCR3 (s vazbou k zánětlivému mikroprostředí) a transkripčního faktoru T-bet, který je spojen s diferenciací B buněk směrem k prozánětlivému fenotypu. Exprese CXCR3 byla navíc zvýšena u pacientů s VNK.
- Analýza CD21low B buněk prokázala významnou funkční diverzitu mezi jednotlivými subpopulacemi. Po stimulaci se subtypy lišily v míře exprese aktivačních molekul CD40, HLA-DR a CD80/86, ovšem nikoliv mezi pacienty s PIK a VNK; exprese dalších funkčních znaků CD11c, T-bet, CXCR3 a CCR7 byla hodnocena v nestimulovaném stavu a rovněž vykazovala výrazné rozdíly napříč subpopulacemi, ale ne mezi pacienty a kontrolami ani mezi patientskými skupinami navzájem. Tyto výsledky poukazují na vnitřní heterogenitu CD21low B buněk a podporují hypotézu, že různé subtypy této populace mohou hrát odlišnou roli v patogenezi CVID.
- Relativní zastoupení CD21low subpopulací se zásadně měnilo po BCR stimulaci a v menší míře i po TLR-7/8 stimulaci směrem k více diferencovaným populacím DN-like a CS-like CD21low B lymfocytů.

- Součástí analýzy byla také produkce vybraných cytokinů B lymfocyty po *in vitro* stimulaci a stanovení vybraných sérových zánětlivých markerů. U pacientů obecně a pacientů s VNK jsme pozorovali zvýšenou produkci interleukinu IL-4 a naopak sníženou produkci IL-12 (p40), svědčící o určité tendenci těchto pacientů směřovat spíše k Th2 polarizované imunitní odpovědi. Sérové hladiny YKL-40 a sérového amyloidu A byly u pacientů zvýšené nezávisle na přítomnosti neinfekčních komplikací. To naznačuje, že tyto biomarkery mohou odrážet subklinický zánět nebo chronickou imunitní aktivaci obecně přítomnou u COVID.

Seznam použité literatury

V seznamu literatury jsou přehledové články označeny *

- Abyazi, M. L., Bell, K. A., Gyimesi, G., Baker, T. S., Byun, M., Ko, H. M., Cunningham-Rundles, C., Feng, F., & Maglione, P. J. (2022). Convergence of cytokine dysregulation and antibody deficiency in common variable immunodeficiency with inflammatory complications. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 149(1), 315-326.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.06.008>
- *Amaya-Uribe, L., Rojas, M., Azizi, G., Anaya, J.-M., & Gershwin, M. E. (2019). Primary immunodeficiency and autoimmunity: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*, 99, 52–72. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.01.011>
- Ameratunga, R., Ahn, Y., Steele, R., & Woon, S.-T. (2019). Transient hypogammaglobulinaemia of infancy: many patients recover in adolescence and adulthood. *Clinical and Experimental Immunology*, 198(2), 224–232. <https://doi.org/10.1111/cei.13345>
- *Ameratunga, R., Allan, C., & Woon, S.-T. (2020). Defining Common Variable Immunodeficiency Disorders in 2020. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 40(3), 403–420. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2020.03.001>
- Ameratunga, R., Brewerton, M., Slade, C., Jordan, A., Gillis, D., Steele, R., Koopmans, W., & Woon, S.-T. (2014). Comparison of diagnostic criteria for common variable immunodeficiency disorder. *Frontiers in Immunology*, 5, 415. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00415>
- *Ameratunga, R., Longhurst, H., Steele, R., & Woon, S.-T. (2021). Comparison of Diagnostic Criteria for Common Variable Immunodeficiency Disorders (CVID) in the New Zealand CVID Cohort Study. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 61(2), 236–244. <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08860-7>
- Bagheri, Y., Moeini Shad, T., Namazi, S., Tofighi Zavareh, F., Azizi, G., Salami, F., Sadani, S., Hosseini, A., Saeidi, M., Pashangzadeh, S., Delavari, S., Mirminachi, B., Rezaei, N., Abolhassani, H., Aghamohammadi, A., & Yazdani, R. (2023). B cells and T cells abnormalities in patients with selective IgA deficiency. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 19(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s13223-023-00775-6>
- Berbers, R.-M., Drylewicz, J., Ellerbroek, P. M., van Montfrans, J. M., Dalm, V. A. S. H., van Hagen, P. M., Keller, B., Warnatz, K., van de Ven, A., van Laar, J. M., Nierkens, S., & Leavis, H. L. (2021). Targeted Proteomics Reveals Inflammatory Pathways that Classify Immune Dysregulation in Common Variable Immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology*, 41(2), 362–373. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00908-1>

- Berbers, R.-M., van der Wal, M. M., van Montfrans, J. M., Ellerbroek, P. M., Dalm, V. A. S. H., van Hagen, P. M., Leavis, H. L., & van Wijk, F. (2021). Chronically Activated T-cells Retain Their Inflammatory Properties in Common Variable Immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology*, 41(7), 1621–1632. <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01084-6>
- *Blazevic, N., Rogic, D., Pelajic, S., Miler, M., Glavic, G., Ratkajec, V., Vrkljan, N., Bakula, D., Hrabar, D., & Pavic, T. (2024). YKL-40 as a biomarker in various inflammatory diseases: A review. *Biochemia Medica*, 34(1), 010502. <https://doi.org/10.11613/BM.2024.010502>
- Borgström, E. W., Edvinsson, M., Pérez, L. P., Norlin, A. C., Enoksson, S. L., Hansen, S., Fasth, A., Friman, V., Kämpe, O., Månsson, R., Estupiñán, H. Y., Wang, Q., Ziyang, T., Lakshmikanth, T., Smith, C. I. E., Brodin, P., & Bergman, P. (2023). Three Adult Cases of STAT1 Gain-of-Function with Chronic Mucocutaneous Candidiasis Treated with JAK Inhibitors. *Journal of Clinical Immunology*, 43(1), 136–150. <https://doi.org/10.1007/s10875-022-01351-0>
- Bousfiha, A., Jeddane, L., Picard, C., Al-Herz, W., Ailal, F., Chatila, T., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Franco, J. L., Holland, S. M., Klein, C., Morio, T., Ochs, H. D., Oksenhendler, E., Puck, J., Torgerson, T. R., Casanova, J.-L., Sullivan, K. E., & Tangye, S. G. (2020). Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification. *Journal of Clinical Immunology*, 40(1), 66–81. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00758-x>
- *Cardenas-Morales, M., & Hernandez-Trujillo, V. P. (2022). Agammaglobulinemia: from X-linked to Autosomal Forms of Disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 63(1), 22–35. <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08870-5>
- *Carsetti, R., Terreri, S., Conti, M. G., Fernandez Salinas, A., Corrente, F., Capponi, C., Albano, C., & Piano Mortari, E. (2022). Comprehensive phenotyping of human peripheral blood B lymphocytes in healthy conditions. *Cytometry. Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 101(2), 131–139. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24507>
- Chakraborty, S., Kumari, R., Gupta, D., Makharia, G. K., Ahuja, V., Kumar, P., & Mitra, D. K. (2023). Interleukin-9 rescues class switching of Memory B cells derived from Common variable immunodeficiency patients. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 254, 109697. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2023.109697>
- Charles, E. D., Brunetti, C., Marukian, S., Ritola, K. D., Talal, A. H., Marks, K., Jacobson, I. M., Rice, C. M., & Dustin, L. B. (2011). Clonal B cells in patients with hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia contain an expanded anergic CD21low B-cell subset. *Blood*, 117(20), 5425–5437. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-312942>

- *Chi, X., Li, Y., & Qiu, X. (2020). V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. *Immunology*, 160(3), 233–247. <https://doi.org/10.1111/imm.13176>
- Claes, N., Fraussen, J., Vanheusden, M., Hellings, N., Stinissen, P., Van Wijmeersch, B., Hupperts, R., & Somers, V. (2016). Age-Associated B Cells with Proinflammatory Characteristics Are Expanded in a Proportion of Multiple Sclerosis Patients. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 197(12), 4576–4583. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502448>
- Cols, M., Rahman, A., Maglione, P. J., Garcia-Carmona, Y., Simchoni, N., Ko, H.-B. M., Radigan, L., Cerutti, A., Blankenship, D., Pascual, V., & Cunningham-Rundles, C. (2016). Expansion of inflammatory innate lymphoid cells in patients with common variable immune deficiency. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(4), 1206-1215.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.09.013>
- Cousin, V. N., Perez, G. F., Payne, K. J., Voll, R. E., Rizzi, M., Mueller, C. G., & Warnatz, K. (2023). Lymphoid stromal cells - potential implications for the pathogenesis of CVID. *Frontiers in Immunology*, 14, 1122905. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1122905>
- Dai, D., Gu, S., Han, X., Ding, H., Jiang, Y., Zhang, X., Yao, C., Hong, S., Zhang, J., Shen, Y., Hou, G., Qu, B., Zhou, H., Qin, Y., He, Y., Ma, J., Yin, Z., Ye, Z., Qian, J., ... Shen, N. (2024). The transcription factor ZEB2 drives the formation of age-associated B cells. *Science (New York, N.Y.)*, 383(6681), 413–421. <https://doi.org/10.1126/science.adf8531>
- Del Pino-Molina, L., Rodríguez-Ubreva, J., Torres Canizales, J., Coronel-Díaz, M., Kulis, M., Martín-Subero, J. I., van der Burg, M., Ballestar, E., & López-Granados, E. (2019). Impaired CpG Demethylation in Common Variable Immunodeficiency Associates With B Cell Phenotype and Proliferation Rate. *Frontiers in Immunology*, 10, 878. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00878>
- *Eibel, H., Kraus, H., Sic, H., Kienzler, A.-K., & Rizzi, M. (2014). B cell Biology: An Overview. *Current Allergy and Asthma Reports*, 14(5), 434. <https://doi.org/10.1007/s11882-014-0434-8>
- El-Helou, S. M., Biegner, A.-K., Bode, S., Ehl, S. R., Heeg, M., Maccari, M. E., Ritterbusch, H., Speckmann, C., Rusch, S., Scheible, R., Warnatz, K., Atschekzei, F., Beider, R., Ernst, D., Gerschmann, S., Jablonka, A., Mielke, G., Schmidt, R. E., Schürmann, G., ... Grimbacher, B. (2019). The German National Registry of Primary Immunodeficiencies (2012-2017). *Frontiers in Immunology*, 10, 1272. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01272>

- *Fevang, B. (2023). Treatment of inflammatory complications in common variable immunodeficiency (CVID): current concepts and future perspectives. *Expert Review of Clinical Immunology*, 19(6), 627–638. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2023.2198208>
- Fevang, B., Yndestad, A., Sandberg, W. J., Holm, A. M., Müller, F., Aukrust, P., & Frøland, S. S. (2007). Low numbers of regulatory T cells in common variable immunodeficiency: association with chronic inflammation in vivo. *Clinical and Experimental Immunology*, 147(3), 521–525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03314.x>
- Fiedorová, K., Radvanský, M., Bosák, J., Grombiříková, H., Němcová, E., Králíčková, P., Černochová, M., Kotásková, I., Lexa, M., Litzman, J., Šmajš, D., & Freiburger, T. (2019). Bacterial but Not Fungal Gut Microbiota Alterations Are Associated With Common Variable Immunodeficiency (CVID) Phenotype. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01914>
- Frasca, D., Diaz, A., Romero, M., & Blomberg, B. B. (2017). Human peripheral late/exhausted memory B cells express a senescent-associated secretory phenotype and preferentially utilize metabolic signaling pathways. *Experimental Gerontology*, 87(Pt A), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.12.001>
- Fraussen, J., Marquez, S., Takata, K., Beckers, L., Montes Diaz, G., Zografou, C., Van Wijmeersch, B., Villar, L. M., O'Connor, K. C., Kleinstein, S. H., & Somers, V. (2019). Phenotypic and Ig Repertoire Analyses Indicate a Common Origin of IgD-CD27- Double Negative B Cells in Healthy Individuals and Multiple Sclerosis Patients. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 203(6), 1650–1664. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801236>
- Freudenhammer, M., Voll, R. E., Binder, S. C., Keller, B., & Warnatz, K. (2020). Naive- and Memory-like CD21^{low} B Cell Subsets Share Core Phenotypic and Signaling Characteristics in Systemic Autoimmune Disorders. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 205(8), 2016–2025. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000343>
- *Fried, A. J., & Bonilla, F. A. (2009). Pathogenesis, diagnosis, and management of primary antibody deficiencies and infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(3), 396–414. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-09>
- Friman, V., Quinti, I., Davydov, A. N., Shugay, M., Farroni, C., Engström, E., Pour Akaber, S., Barresi, S., Mohamed, A., Pulvirenti, F., Milito, C., Granata, G., Giorda, E., Ahlström, S., Karlsson, J., Marasco, E., Marcellini, V., Bocci, C., Cascioli, S., ... Grimsholm, O. (2023). Defective peripheral B cell selection in common variable immune deficiency patients with autoimmune manifestations. *Cell Reports*, 42(5), 112446. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112446>

- *Gjertsson, I., McGrath, S., Grimstad, K., Jonsson, C. A., Camponeschi, A., Thorarinsdottir, K., & Mårtensson, I.-L. (2022). A close-up on the expanding landscape of CD21-/low B cells in humans. *Clinical and Experimental Immunology*, 210(3), 217–229. <https://doi.org/10.1093/cei/uxac103>
- Golinski, M.-L., Demeules, M., Derambure, C., Riou, G., Maho-Vaillant, M., Boyer, O., Joly, P., & Calbo, S. (2020). CD11c+ B Cells Are Mainly Memory Cells, Precursors of Antibody Secreting Cells in Healthy Donors. *Frontiers in Immunology*, 11, 32. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00032>
- *Ho, H.-E., & Cunningham-Rundles, C. (2020). Non-infectious Complications of Common Variable Immunodeficiency: Updated Clinical Spectrum, Sequelae, and Insights to Pathogenesis. *Frontiers in Immunology*, 11, 149. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00149>
- *Janssen, L. M. A., van der Flier, M., & de Vries, E. (2021). Lessons Learned From the Clinical Presentation of Common Variable Immunodeficiency Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Immunology*, 12, 620709. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.620709>
- Jenks, S. A., Cashman, K. S., Zumaquero, E., Marigorta, U. M., Patel, A. V., Wang, X., Tomar, D., Woodruff, M. C., Simon, Z., Bugrovsky, R., Blalock, E. L., Scharer, C. D., Tipton, C. M., Wei, C., Lim, S. S., Petri, M., Niewold, T. B., Anolik, J. H., Gibson, G., ... Sanz, I. (2018). Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*, 49(4), 725-739.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.015>
- Jørgensen, S. F., Trøseid, M., Kummen, M., Anmarkrud, J. A., Michelsen, A. E., Osnes, L. T., Holm, K., Høivik, M. L., Rashidi, A., Dahl, C. P., Vesterhus, M., Halvorsen, B., Mollnes, T. E., Berge, R. K., Moum, B., Lundin, K. E. A., Fevang, B., Ueland, T., Karlsen, T. H., ... Hov, J. R. (2016). Altered gut microbiota profile in common variable immunodeficiency associates with levels of lipopolysaccharide and markers of systemic immune activation. *Mucosal Immunology*, 9(6), 1455–1465. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.18>
- *Justiz-Vaillant, A. A., Williams-Persad, A. F.-A., Arozarena-Fundora, R., Gopaul, D., Soodeen, S., Asin-Milan, O., Thompson, R., Unakal, C., & Akpaka, P. E. (2023). Chronic Granulomatous Disease (CGD): Commonly Associated Pathogens, Diagnosis and Treatment. *Microorganisms*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092233>
- Kashani, S., Carr, T. F., Grammer, L. C., Schleimer, R. P., Hulse, K. E., Kato, A., Kern, R. C., Conley, D. B., Chandra, R. K., Tan, B. K., & Peters, A. T. (2015). Clinical characteristics of adults with chronic rhinosinusitis and specific antibody deficiency. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice*, 3(2), 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2014.09.022>

- Keller, B., Strohmeier, V., Harder, I., Unger, S., Payne, K. J., Andrieux, G., Boerries, M., Felixberger, P. T., Landry, J. J. M., Nieters, A., Rensing-Ehl, A., Salzer, U., Frede, N., Usadel, S., Elling, R., Speckmann, C., Hainmann, I., Ralph, E., Gilmour, K., ... Warnatz, K. (2021). The expansion of human T-bethighCD21low B cells is T cell dependent. *Science Immunology*, 6(64), eabh0891. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abh0891>
- *Kiaee, F., Azizi, G., Rafiemanesh, H., Zainaldain, H., Sadaat Rizvi, F., Alizadeh, M., Jamee, M., Mohammadi, S., Habibi, S., Sharifi, L., Jadidi-Niaragh, F., Haghi, S., Yazdani, R., Abolhassani, H., & Aghamohammadi, A. (2019). Malignancy in common variable immunodeficiency: a systematic review and meta-analysis. *Expert Review of Clinical Immunology*, 15(10), 1105–1113. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2019.1658523>
- Legger, G.E., Dermer, C.W.E., Brunger, A.F., van Daele, P.L.A., Nienhuis, H.L.A. (2022). The relation between C-reactive protein and serum amyloid A in patients with autoinflammatory diseases. *Pediatr Rheumatol Online J*. doi: 10.1186/s12969-022-00757-9
- Liechti, T., Kadelka, C., Braun, D. L., Kuster, H., Böni, J., Robbiani, M., Günthard, H. F., & Trkola, A. (2019). Widespread B cell perturbations in HIV-1 infection afflict naive and marginal zone B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 216(9), 2071–2090. <https://doi.org/10.1084/jem.20181124>
- Lollo, C. de, de Moraes Vasconcelos, D., Oliveira, L. M. da S., Domingues, R., Carvalho, G. C. de, Duarte, A. J. da S., & Sato, M. N. (2016). Chemokine, cytokine and type I interferon production induced by Toll-like receptor activation in common variable immune deficiency. *Clinical Immunology*, 169, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.07.001>
- López-Gómez, A., Clemente, A., Cunill, V., Pons, J., & Ferrer, J. M. (2018). IL-21 and anti-CD40 restore Bcl-2 family protein imbalance in vitro in low-survival CD27+ B cells from CVID patients. *Cell Death & Disease*, 9(12), 1156. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1191-8>
- Macpherson, M. E., Hov, J. R., Ueland, T., Dahl, T. B., Kummen, M., Otterdal, K., Holm, K., Berge, R. K., Mollnes, T. E., Trøseid, M., Halvorsen, B., Aukrust, P., Fevang, B., & Jørgensen, S. F. (2020). Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide Associates With Inflammation in Common Variable Immunodeficiency. *Frontiers in Immunology*, 11, 574500. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.574500>
- Maul, R. W., Catalina, M. D., Kumar, V., Bachali, P., Grammer, A. C., Wang, S., Yang, W., Hasni, S., Ettinger, R., Lipsky, P. E., & Gearhart, P. J. (2021). Transcriptome and IgH Repertoire Analyses Show That CD11chi B Cells Are a Distinct Population With Similarity to B Cells Arising in Autoimmunity and Infection. *Frontiers in Immunology*, 12, 649458. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.649458>

- Marinova M, Georgyeva A, Yordanova V, Ivanov N, Atanasova V, Naumova E, Kandilarova SM. Implementation of TREC/KREC detection protocol for newborn SCID screening in Bulgaria: a pilot study. *Cent Eur J Immunol.* 2022;47(4):339-349. doi: 10.5114/ceji.2022.124396.
- Milardi, G., Di Lorenzo, B., Gerosa, J., Barzaghi, F., Di Matteo, G., Omrani, M., Jofra, T., Merelli, I., Barcella, M., Filippini, M., Conti, A., Ferrua, F., Pozzo Giuffrida, F., Dionisio, F., Rovere-Querini, P., Markt, S., Assanelli, A., Piemontese, S., Brigida, I., ... Foustero, G. (2022). Follicular helper T cell signature of replicative exhaustion, apoptosis, and senescence in common variable immunodeficiency. *European Journal of Immunology*, 52(7), 1171–1189. <https://doi.org/10.1002/eji.202149480>
- *Minegishi, Y. (2021). Hyper-IgE syndrome, 2021 update. *Allergology International : Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, 70(4), 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2021.07.007>
- *Neirinck, J., Buysse, M., De Vriendt, C., Hofmans, M., & Bonroy, C. (2024). The role of immunophenotyping in common variable immunodeficiency: a narrative review. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 1–20. <https://doi.org/10.1080/10408363.2024.2404842>
- Nickerson, K. M., Smita, S., Hoehn, K. B., Marinov, A. D., Thomas, K. B., Kos, J. T., Yang, Y., Bastacky, S. I., Watson, C. T., Kleinstein, S. H., & Shlomchik, M. J. (2023). Age-associated B cells are heterogeneous and dynamic drivers of autoimmunity in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 220(5). <https://doi.org/10.1084/jem.20221346>
- Oksenhendler, E., Gérard, L., Fieschi, C., Malphettes, M., Mouillot, G., Jaussaud, R., Viillard, J., Gardembas, M., Galicier, L., Schleinitz, N., Suarez, F., Soulas-Sprauel, P., Hachulla, E., Jaccard, A., Gardeur, A., Théodorou, I., Rabian, C., & Debré, P. (2008). Infections in 252 Patients with Common Variable Immunodeficiency. *Clinical Infectious Diseases*, 46(10), 1547–1554. <https://doi.org/10.1086/587669>
- *Palm, A.-K. E., & Kleinau, S. (2021). Marginal zone B cells: From housekeeping function to autoimmunity? *Journal of Autoimmunity*, 119, 102627. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2021.102627>
- *Peng, X. P., Caballero-Oteyza, A., & Grimbacher, B. (2023). Common Variable Immunodeficiency: More Pathways than Roads to Rome. *Annual Review of Pathology*, 18, 283–310. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-031521-024229>
- *Pieper, K., Grimbacher, B., & Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(4), 959–971. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>

- Pikkarainen S, Martelius T, Ristimäki A, Siitonen S, Seppänen MRJ, Färkkilä M. A High Prevalence of Gastrointestinal Manifestations in Common Variable Immunodeficiency. *Am J Gastroenterol*. 2019 Apr;114(4):648-655. doi: 10.14309/ajg.000000000000140.
- Poto, R., Pecoraro, A., Ferrara, A. L., Punziano, A., Lagnese, G., Messuri, C., Loffredo, S., Spadaro, G., & Varricchi, G. (2023). Cytokine dysregulation despite immunoglobulin replacement therapy in common variable immunodeficiency (CVID). *Frontiers in Immunology*, 14, 1257398. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1257398>
- Pulvirenti, F., Pecoraro, A., Cinetto, F., Milito, C., Valente, M., Santangeli, E., Crescenzi, L., Rizzo, F., Tabolli, S., Spadaro, G., Agostini, C., & Quinti, I. (2018). Gastric Cancer Is the Leading Cause of Death in Italian Adult Patients With Common Variable Immunodeficiency. *Frontiers in Immunology*, 9, 2546. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02546>
- Quinn, J., Modell, V., Orange, J. S., & Modell, F. (2022). Growth in diagnosis and treatment of primary immunodeficiency within the global Jeffrey Modell Centers Network. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology : Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 18(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13223-022-00662-6>
- Quinti, I., Soresina, A., Spadaro, G., Martino, S., Donnanno, S., Agostini, C., Claudio, P., Franco, D., Maria Pesce, A., Borghese, F., Guerra, A., Rondelli, R., & Plebani, A. (2007). Long-Term Follow-Up and Outcome of a Large Cohort of Patients with Common Variable Immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology*, 27(3), 308–316. <https://doi.org/10.1007/s10875-007-9075-1>
- Reincke, M. E., Payne, K. J., Harder, I., Strohmeier, V., Voll, R. E., Warnatz, K., & Keller, B. (2020). The Antigen Presenting Potential of CD21^{low} B Cells. *Frontiers in Immunology*, 11, 535784. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.535784>
- Resnick, E. S., Moshier, E. L., Godbold, J. H., & Cunningham-Rundles, C. (2012). Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*, 119(7), 1650–1657. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-377945>
- Richardson, C. T., Slack, M. A., Dhillon, G., Marcus, C. Z., Barnard, J., Palanichamy, A., Sanz, I., Looney, R. J., & Anolik, J. H. (2019). Failure of B Cell Tolerance in CVID. *Frontiers in Immunology*, 10, 2881. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02881>
- Rincon-Arevalo, H., Wiedemann, A., Stefanski, A.-L., Lettau, M., Szelinski, F., Fuchs, S., Frei, A. P., Steinberg, M., Kam-Thong, T., Hatje, K., Keller, B., Warnatz, K., Radbruch, A., Lino, A. C., Schrezenmeier, E., & Dörner, T. (2021). Deep Phenotyping of CD11c⁺ B Cells in Systemic Autoimmunity and Controls. *Frontiers in Immunology*, 12, 635615. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.635615>

- Rodríguez-Cortez, V. C., Del Pino-Molina, L., Rodríguez-Ubreva, J., Ciudad, L., Gómez-Cabrero, D., Company, C., Urquiza, J. M., Tegnér, J., Rodríguez-Gallego, C., López-Granados, E., & Ballestar, E. (2015). Monozygotic twins discordant for common variable immunodeficiency reveal impaired DNA demethylation during naïve-to-memory B-cell transition. *Nature Communications*, 6, 7335. <https://doi.org/10.1038/ncomms8335>
- Rodríguez-Ubreva, J., Arutyunyan, A., Bonder, M. J., Del Pino-Molina, L., Clark, S. J., de la Calle-Fabregat, C., Garcia-Alonso, L., Handfield, L.-F., Ciudad, L., Andrés-León, E., Krueger, F., Català-Moll, F., Rodríguez-Cortez, V. C., Polanski, K., Mamanova, L., van Dongen, S., Kiselev, V. Y., Martínez-Saavedra, M. T., Heyn, H., ... Ballestar, E. (2022). Single-cell Atlas of common variable immunodeficiency shows germinal center-associated epigenetic dysregulation in B-cell responses. *Nature Communications*, 13(1), 1779. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29450-x>
- Romberg, N., Chamberlain, N., Saadoun, D., Gentile, M., Kinnunen, T., Ng, Y. S., Virdee, M., Menard, L., Cantaert, T., Morbach, H., Rachid, R., Martinez-Pomar, N., Matamoros, N., Geha, R., Grimbacher, B., Cerutti, A., Cunningham-Rundles, C., & Meffre, E. (2013). CVID-associated TACI mutations affect autoreactive B cell selection and activation. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(10), 4283–4293. <https://doi.org/10.1172/JCI69854>
- Romberg, N., Le Coz, C., Glauzy, S., Schickel, J.-N., Trofa, M., Nolan, B. E., Paessler, M., Xu, M. L., Lambert, M. P., Lakhani, S. A., Khokha, M. K., Jyonouchi, S., Heimall, J., Takach, P., Maglione, P. J., Catanzaro, J., Hsu, F. I., Sullivan, K. E., Cunningham-Rundles, C., & Meffre, E. (2019). Patients with common variable immunodeficiency with autoimmune cytopenias exhibit hyperplastic yet inefficient germinal center responses. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(1), 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.06.012>
- *Sanz, I., Wei, C., Jenks, S. A., Cashman, K. S., Tipton, C., Woodruff, M. C., Hom, J., & Lee, F. E.-H. (2019). Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02458>
- *Schatz, D. G., & Swanson, P. C. (2011). V(D)J recombination: mechanisms of initiation. *Annual Review of Genetics*, 45, 167–202. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132552>
- Selenius, J. S., Martelius, T., Pikkarainen, S., Siitonen, S., Mattila, E., Pietikäinen, R., Suomalainen, P., Aalto, A. H., Saarela, J., Einarsdottir, E., Järvinen, A., Färkkilä, M., Kere, J., & Seppänen, M. (2017). Unexpectedly High Prevalence of Common Variable Immunodeficiency in Finland. *Frontiers in Immunology*, 8, 1190. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01190>

- *Shamriz, O., Tal, Y., Talmon, A., & Nahum, A. (2020). Chronic Mucocutaneous Candidiasis in Early Life: Insights Into Immune Mechanisms and Novel Targeted Therapies. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.593289>
- Shulzhenko, N., Dong, X., Vyshenska, D., Greer, R. L., Gurung, M., Vasquez-Perez, S., Peremyslova, E., Sosnovtsev, S., Quezado, M., Yao, M., Montgomery-Recht, K., Strober, W., Fuss, I. J., & Morgun, A. (2018). CVID enteropathy is characterized by exceeding low mucosal IgA levels and interferon-driven inflammation possibly related to the presence of a pathobiont. *Clinical Immunology*, 197, 139–153. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.09.008>
- Sobrinho, S., Magnani, A., Semeraro, M., Martignetti, L., Cortal, A., Denis, A., Couzin, C., Picard, C., Bustamante, J., Magrin, E., Joseph, L., Roudaut, C., Gabrion, A., Soheili, T., Cordier, C., Lortholary, O., Lefrere, F., Rieux-Laucat, F., Casanova, J.-L., ... Six, E. (2023). Severe hematopoietic stem cell inflammation compromises chronic granulomatous disease gene therapy. *Cell Reports. Medicine*, 4(2), 100919. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.100919>
- Stute M, Kreysing M, Zorn M, Michl P, Gauss A. (2024). Serum Amyloid A as a Potential Biomarker in Inflammatory Bowel Diseases, Especially in Patients with Low C-Reactive Protein. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms25021177.
- *Szaflarska, A., Lenart, M., Rutkowska-Zapała, M., & Siedlar, M. (2024). Clinical and experimental treatment of primary humoral immunodeficiencies. *Clinical and Experimental Immunology*, 216(2), 120–131. <https://doi.org/10.1093/cei/uxae008>
- Tam, J. S., & Routes, J. M. (2013). Common variable immunodeficiency. *American Journal of Rhinology & Allergy*, 27(4), 260–265. <https://doi.org/10.2500/ajra.2013.27.3899>
- Tangye, S. G., Al-Herz, W., Bousfiha, A., Cunningham-Rundles, C., Franco, J. L., Holland, S. M., Klein, C., Morio, T., Oksenhendler, E., Picard, C., Puel, A., Puck, J., Seppänen, M. R. J., Somech, R., Su, H. C., Sullivan, K. E., Torgerson, T. R., & Meyts, I. (2022). Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *Journal of Clinical Immunology*, 42(7), 1473–1507. <https://doi.org/10.1007/s10875-022-01289-3>
- *Tangye, S. G., Nguyen, T., Deenick, E. K., Bryant, V. L., & Ma, C. S. (2023). Inborn errors of human B cell development, differentiation, and function. *The Journal of Experimental Medicine*, 220(7). <https://doi.org/10.1084/jem.20221105>
- Terrier, B., Joly, F., Vazquez, T., Benech, P., Rosenzweig, M., Carpentier, W., Garrido, M., Ghillani-Dalbin, P., Klatzmann, D., Cacoub, P., & Saadoun, D. (2011). Expansion of functionally anergic CD21-/low marginal zone-like B cell clones in hepatitis C virus infection-related autoimmunity. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 187(12), 6550–6563. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102022>

- Thaventhiran, J. E. D., Lango Allen, H., Burren, O. S., Rae, W., Greene, D., Staples, E., Zhang, Z., Farmery, J. H. R., Simeoni, I., Rivers, E., Maimaris, J., Penkett, C. J., Stephens, J., Deevi, S. V. V., Sanchis-Juan, A., Gleadall, N. S., Thomas, M. J., Sargur, R. B., Gordins, P., ... Smith, K. G. C. (2020). Whole-genome sequencing of a sporadic primary immunodeficiency cohort. *Nature*, 583(7814), 90–95. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2265-1>
- *Tizaoui, K., Yang, J. W., Lee, K. H., Kim, J. H., Kim, M., Yoon, S., Jung, Y., Park, J. B., An, K., Choi, H., Song, D., Jung, H., Ahn, S., Yuh, T., Choi, H. M., Ahn, J. H., Kim, Y., Jee, S., Lee, H., ... Smith, L. (2022). The role of YKL-40 in the pathogenesis of autoimmune diseases: a comprehensive review. *International Journal of Biological Sciences*, 18(9), 3731–3746. <https://doi.org/10.7150/ijbs.67587>
- Tofighi Zavareh, F., Mirshafiey, A., Yazdani, R., Keshtkar, A. A., Abolhassani, H., Bagheri, Y., Rezaei, A., Delavari, S., Rezaei, N., & Aghamohammadi, A. (2021). Lymphocytes subsets in correlation with clinical profile in CVID patients without monogenic defects. *Expert Review of Clinical Immunology*, 17(9), 1041–1051. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2021.1954908>
- Unger, S., Seidl, M., van Schouwenburg, P., Rakhmanov, M., Bulashevska, A., Frede, N., Grimbacher, B., Pfeiffer, J., Schrenk, K., Munoz, L., Hanitsch, L., Stumpf, I., Kaiser, F., Hausmann, O., Kollert, F., Goldacker, S., van der Burg, M., Keller, B., & Warnatz, K. (2018). The TH1 phenotype of follicular helper T cells indicates an IFN- γ -associated immune dysregulation in patients with CD21low common variable immunodeficiency. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(2), 730–740. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.041>
- van Schewick CM, Nöltner C, Abel S, Burns SO, Workman S, Symes A, Guzman D, Proietti M, Bulashevska A, Moreira F, Soetedjo V, Lowe DM, Grimbacher B. Altered Microbiota, Impaired Quality of Life, Malabsorption, Infection, and Inflammation in CVID Patients With Diarrhoea. *Front Immunol*. 2020 Jul 31;11:1654. doi: 10.3389/fimmu.2020.01654
- van Schouwenburg, P. A., IJspeert, H., Pico-Knijnenburg, I., Dalm, V. A. S. H., van Hagen, P. M., van Zessen, D., Stubbs, A. P., Patel, S. Y., & van der Burg, M. (2018). Identification of CVID Patients With Defects in Immune Repertoire Formation or Specification. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02545>
- *Varzaneh, F. N., Keller, B., Unger, S., Aghamohammadi, A., Warnatz, K., & Rezaei, N. (2014). Cytokines in Common Variable Immunodeficiency as Signs of Immune Dysregulation and Potential Therapeutic Targets – A Review of the Current Knowledge. *Journal of Clinical Immunology*, 34(5), 524–543. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0053-0>
- *Velounias, R. L., & Tull, T. J. (2022). Human B-cell subset identification and changes in inflammatory diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, 210(3), 201–216. <https://doi.org/10.1093/cei/uxac104>

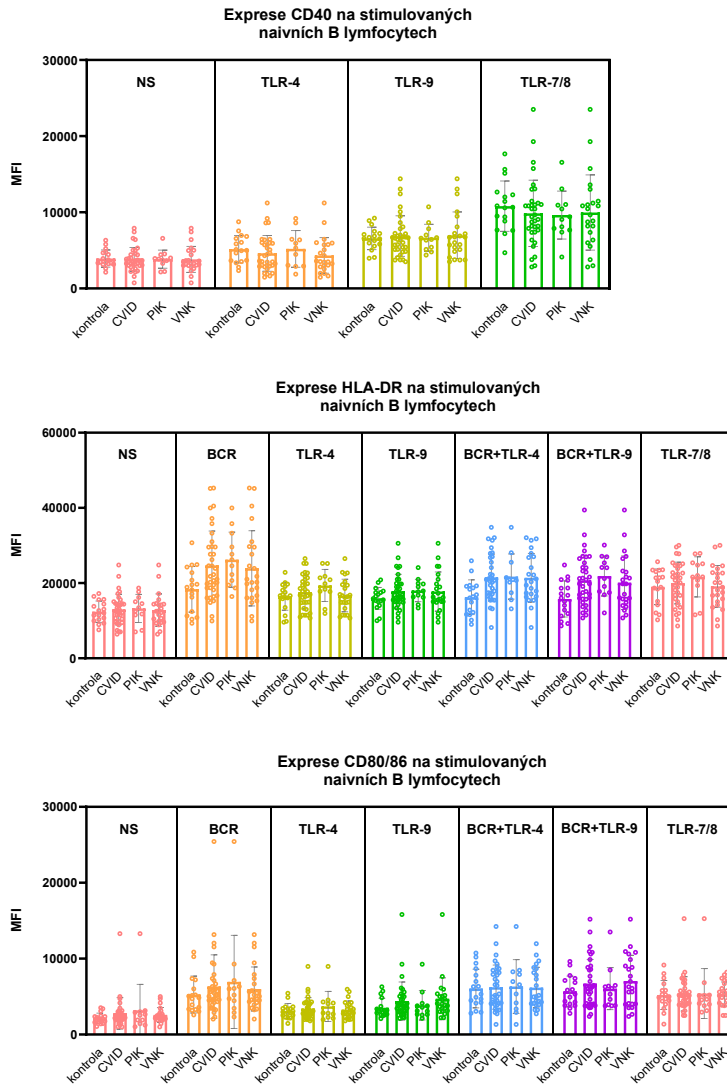
- Visentini, M., Cagliuso, M., Conti, V., Carbonari, M., Casato, M., & Fiorilli, M. (2011). The VH1-69-expressing marginal zone B cells expanded in HCV-associated mixed cryoglobulinemia display proliferative anergy irrespective of CD21low phenotype. *Blood*, 118(12), 3440–3441. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-353821>
- *Vosughimotlagh, A., Rasouli, S. E., Rafiemanesh, H., Safarirad, M., Sharifinejad, N., Madanipour, A., Dos Santos Vilela, M. M., Heropolitańska-Pliszka, E., & Azizi, G. (2023). Clinical manifestation for immunoglobulin A deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology : Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 19(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s13223-023-00826-y>
- Wang, S., Wang, J., Kumar, V., Karnell, J. L., Naiman, B., Gross, P. S., Rahman, S., Zerrouki, K., Hanna, R., Morehouse, C., Holoweckyj, N., Liu, H., Autoimmunity Molecular Medicine Team, Manna, Z., Goldbach-Mansky, R., Hasni, S., Siegel, R., Sanjuan, M., Streicher, K., ... Ettinger, R. (2018). IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c^{hi}T-bet⁺ B cells in SLE. *Nature Communications*, 9(1), 1758. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03750-7>
- Warnatz, K., & Schlesier, M. (2008). Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 74(5), 261–271. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20432>
- Wehr, C., Kivioja, T., Schmitt, C., Ferry, B., Witte, T., Eren, E., Vlkova, M., Hernandez, M., Detkova, D., Bos, P. R., Poerksen, G., von Bernuth, H., Baumann, U., Goldacker, S., Gutenberger, S., Schlesier, M., Bergeron-van der Cruyssen, F., Le Garff, M., Debré, P., ... Warnatz, K. (2008). The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*, 111(1), 77–85. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-091744>
- Weifenbach, N., Schneckenburger, A. A. C., & Lötters, S. (2020). Global Distribution of Common Variable Immunodeficiency (CVID) in the Light of the UNDP Human Development Index (HDI): A Preliminary Perspective of a Rare Disease. *Journal of Immunology Research*, 2020, 8416124. <https://doi.org/10.1155/2020/8416124>
- Weißenberg, S. Y., Szelinski, F., Schrezenmeier, E., Stefanski, A.-L., Wiedemann, A., Rincon-Arevalo, H., Welle, A., Jungmann, A., Nordström, K., Walter, J., Imgenberg-Kreuz, J., Nordmark, G., Rönnblom, L., Bachali, P., Catalina, M. D., Grammer, A. C., Lipsky, P. E., Lino, A. C., & Dörner, T. (2019). Identification and Characterization of Post-activated B Cells in Systemic Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, 10, 2136. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02136>
- Więsik-Szewczyk, E., Rutkowska, E., Kwiecień, I., Korzeniowska, M., Sołdacki, D., & Jahnz-Różyk, K. (2021). Patients with Common Variable Immunodeficiency Complicated by Autoimmune Phenomena Have Lymphopenia and Reduced Treg, Th17, and NK Cells. *Journal of Clinical Medicine*, 10(15), 3356. <https://doi.org/10.3390/jcm10153356>

- Yang, R., Avery, D. T., Jackson, K. J. L., Ogishi, M., Benhsaien, I., Du, L., Ye, X., Han, J., Rosain, J., Peel, J. N., Alyanakian, M.-A., Neven, B., Winter, S., Puel, A., Boisson, B., Payne, K. J., Wong, M., Russell, A. J., Mizoguchi, Y., ... Tangye, S. G. (2022). Human T-bet governs the generation of a distinct subset of CD11chighCD21low B cells. *Science Immunology*, 7(73), eabq3277. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abq3277>
- *Yazdani, R., Azizi, G., Abolhassani, H., & Aghamohammadi, A. (2017). Selective IgA Deficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Phenotype, Diagnosis, Prognosis and Management. *Scandinavian Journal of Immunology*, 85(1), 3–12. <https://doi.org/10.1111/sji.12499>
- *Yazdani, R., Habibi, S., Sharifi, L., Azizi, G., Abolhassani, H., Olbrich, P., & Aghamohammadi, A. (2020). Common Variable Immunodeficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Classification, and Management. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 30(1), 14–34. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0388>
- *Yel, L. (2010). Selective IgA deficiency. *Journal of Clinical Immunology*, 30(1), 10–16. <https://doi.org/10.1007/s10875-009-9357-x>
- Zumaquero, E., Stone, S. L., Scharer, C. D., Jenks, S. A., Nellore, A., Mousseau, B., Rosal-Vela, A., Botta, D., Bradley, J. E., Wojciechowski, W., Ptacek, T., Danila, M. I., Edberg, J. C., Bridges, S. L., Kimberly, R. P., Chatham, W. W., Schoeb, T. R., Rosenberg, A. F., Boss, J. M., ... Lund, F. E. (2019). IFN γ induces epigenetic programming of human T-bethi B cells and promotes TLR7/8 and IL-21 induced differentiation. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.41641>

Přílohy

Příloha 1: Expres aktivčních znaků na stimulovaných naivních a paměťových B lymfocytech

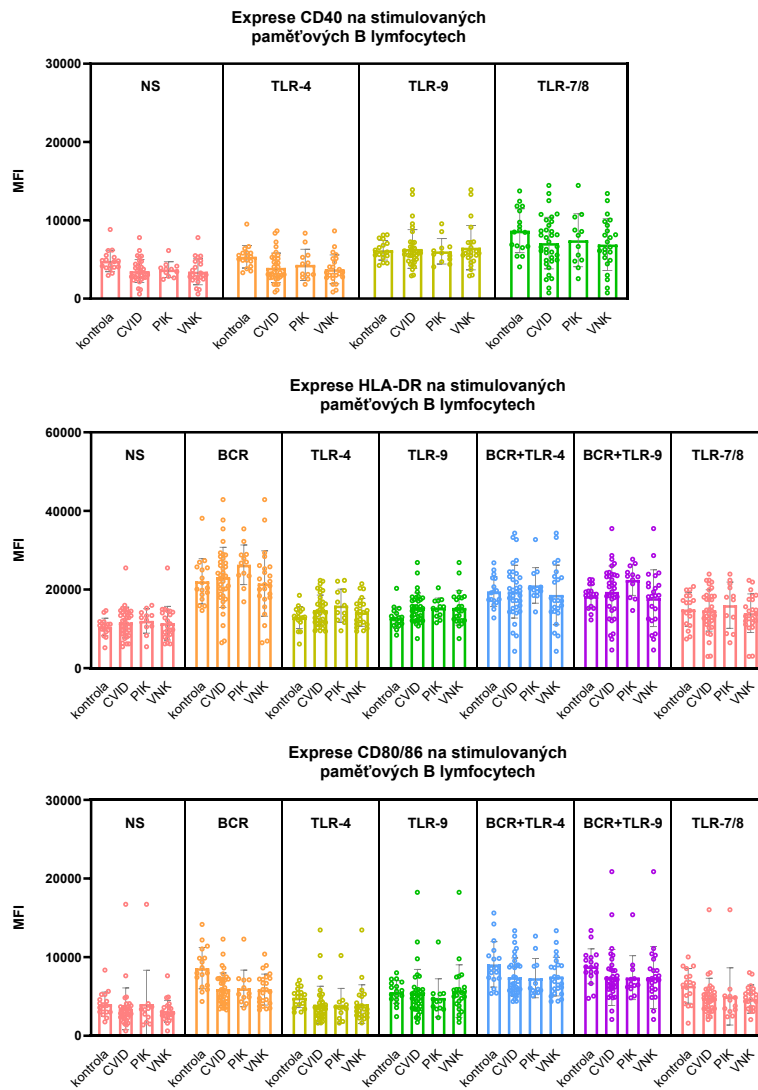
1A



Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena pomocí Kruskal-Wallisova testu. Nesignifikantní výsledky nejsou vyznačeny.

(PIK – pouze infekční komplikace, VNK – významné neinfekční komplikace)

1B



Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena pomocí Kruskal-Wallisova testu. Nesignifikantní výsledky nejsou vyznačeny.

(**PIK** – pouze infekční komplikace, **VNK** – významné neinfekční komplikace)

Příloha 2: Standardní křivky Luminex eseje pro určení koncentrace cytokinů

