I. Streszczenie w języku polskim

Ciężki złożony niedobór odporności (severe combined immunodeficiency - SCID) jest wrodzonym błędem odporności, wynikającym z zaburzeń dojrzewania i różnicowania limfocytów T z macierzystych komórek krwiotwórczych szpiku. W niektórych genotypach zaburzenie dojrzewania dotyczy również limfocytów B i/lub komórek NK. Częstość występowania choroby określana na podstawie badań przesiewowych noworodków, różni się w poszczególnych krajach i wynosi: w Niemczech 1:54 000, w USA 1:58 000 - 1:66 000, w Izraelu 1:29 000. W krajach z dużym odsetkiem małżeństw spokrewnionych częstość jest wyższa, np.: w Arabii Saudyjskiej 1:2 906, a w Omanie 1:22 000 [1-6].

Diagnoza SCID stawiana jest na podstawie badań immunologicznych (ilościowa ocena subpopulacji limfocytów T, B, NK metodą cytometrii przepływowej, ocena czynnościowa limfocytów w teście transformacji blastycznej, stężenia immunoglobulin) oraz molekularnych z oceną wariantów genetycznych. W zależności od objawów klinicznych i wyników badań wyróżnia się postać typową, atypową (zwykle o łagodniejszym przebiegu) oraz zespół Omenna [7]. Za najczęstszą przyczynę SCID uważa się warianty patogenne w genach *IL2RG*, *RAG1/2*, *ADA*, *IL7R*, *DCLRE1C*, *JAK3*; stanowią one ponad 80% genotypów SCID w USA [7] i ponad 70% w Niemczech [2].

Choroba nieleczona prowadzi do zgonu w pierwszych latach życia, głównie z powodu zakażeń, w tym oportunistycznych. Leczeniem docelowym jest przede wszystkim przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych (hematopoietic stem cells transplantation, HSCT). Terapie genowe są możliwe w Europie dla wariantów patogennych dotyczących niektórych genów - *ADA*, *IL2RG*, *RAG1*, *DCLRE1C*. Pozytywną opinię i rejestrację Europejskiej Agencji Leków (EMA – European Medical Agency) uzyskał jedynie preparat Strimvelis stosowany w leczeniu ADA-SCID. Terapia genowa w innych postaciach SCID prowadzona jest w chwili obecnej w ramach badań klinicznych. W niektórych wariantach SCID możliwa jest enzymatyczna terapia zastępcza (ETZ) jako leczenie pomostowe do czasu HSCT. W zespole Omenna przed leczeniem docelowym stosuje się terapię immunosupresyjną.

Szczególną grupę stanowią pacjenci z ADA-SCID. Choroba jest wrodzonym zaburzeniem metabolizmu puryn, a objawy wynikają z gromadzenia w komórkach toksycznej dezoksyadenozyny, substratu brakującego enzymu ADA i dotyczą nie tylko szpiku, prowadząc do ciężkiego złożonego niedoboru odporności, ale również innych narządów: mózgu, płuc, wątroby, układu kostnego. W leczeniu stosuje się przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych, jak również enzymatyczną terapię zastępczą oraz terapię genową [8].

Wczesne rozpoznanie SCID zwiększa szanse na skuteczne leczenie. Przeżycie niemowląt poddanych procedurze HSCT przed ukończeniem 3,5 miesięcy życia oraz przed wystąpieniem powikłań infekcyjnych wynosi 94%, a u starszych niemowląt z towarzyszącymi zakażeniami obniża się do 17-82% [9-10]. W niektórych krajach prowadzone są przesiewowe badania noworodków w celu wykrycia pacjentów ze SCID przed pojawieniem się zakażeń. Pozwala to na wcześniejszą i skuteczniejszą diagnostykę i leczenie. W Polsce powszechnego przesiewowe badania noworodków w kierunku SCID są prowadzone od września 2025 r. Wcześniej szybka diagnoza mogła być

postawiona jedynie u rodzeństwa dzieci z rozpoznanym SCID. Ważne jest rozpowszechnianie wiedzy na temat objawów SCID oraz wczesna identyfikacja chorych.

Zasadniczym celem pracy jest charakterystyka kliniczna i laboratoryjna, w tym immunogenetyczna pacjentów z różnymi postaciami SCID, zdiagnozowanych w Oddziale Immunologii Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka" (IPCZD). Rozprawę stanowi cykl sześciu publikacji: czterech o charakterze artykułów oryginalnych oraz dwóch opisów przypadków, w których uwzględniono cele szczegółowe jak poniżej.

W publikacji pt. "What pediatrician should know about different types of severe combined immunodeficiency – a single center experience. Co pediatra powinien wiedzieć o różnych postaciach ciężkiego złożonego niedoboru odporności – doświadczenia jednego ośrodka" celem była charakterystyka kliniczna i laboratoryjna, w tym immunogenetyczna pacjentów z rozpoznaniem typowego, atypowego SCID i zespołu Omenna zdiagnozowanych w Oddziale Immunologii IPCZD.

W publikacji pt. „National experience with adenosine deaminase deficiency related SCID in Polish children" celem była charakterystyka kliniczna, laboratoryjna i immunogenetyczna pacjentów z rozpoznaniem ADA-SCID oraz ocena efektów enzymatycznej terapii zastępczej (ETZ) rekombinowaną pegylowaną deaminazą adenozyny w tej grupie dzieci.

W trzeciej publikacji pt. "BCG Moreau vaccine safety profile and NK cells-double protection against disseminated BCG infection in retrospective study of BCG vaccination in 52 Polish children with severe combined immunodeficiency" celem była ocena częstości występowania niepożądanego odczynu poszczepiennego po podaniu żywej szczepionki BCG Moreau u pacjentów ze SCID w Polsce.

W czwartej publikacji pt. "The clinical and genetic spectrum of 82 patients with RAG deficiency including a c.256_257delAA founder variant in Slavic countries" celem pracy było oszacowanie częstości występowania, opisanie obrazu klinicznego, zmienności genetycznej z uwzględnieniem rozmieszczenia geograficznego pacjentów z rozpoznaniem SCID wywołanym wariantami w genach *RAG* w populacjach zamieszkujących kraje słowiańskie.

Celem publikacji piątej pt. "Case report: severe combined immunodeficiency with ligase 1 deficiency and Omenn-like manifestation" oraz publikacji szóstej pt. "Atypical Hemolytic Uremic Syndrome (aHUS) and Adenosine Deaminase (ADA)-Deficient Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-Two Diseases That Exacerbate Each Other: Case Report" było przedstawienie unikatowych przebiegów choroby dwóch pacjentów z rozpoznaniem SCID.

Wyniki

W publikacji pt. "What pediatrician should know about different types of severe combined immunodeficiency – a single center experience. Co pediatra powinien wiedzieć o różnych postaciach ciężkiego złożonego niedoboru odporności – doświadczenia jednego ośrodka" wykazano, że mediana wieku w chwili diagnozy SCID wyniosła 4,4 miesiąca i była wyższa w

przypadku AS (8 miesięcy, p<0,05). Mediana opóźnienia diagnozy (diagnostic delay - DD) wyniosła 2,5 miesiąca (4,7 miesiąca u dzieci z AS). Podejrzenie choroby wysuwali najczęściej pediatrzy (u 44,4% wszystkich dzieci), a w następnej kolejności hematolodzy (19,4% wszystkich dzieci, 26,3% dzieci z AS, z DD 20 miesięcy) lub dermatolodzy. Pierwszymi objawami były infekcje (64%), wysypka (22,2%), przewlekła biegunka (5,6%), anemia (5,6%) i limfopenia (2,8%). W momencie rozpoznania u 79,5% pacjentów występowała limfopenia. Mediana odsetka limfocytów T wczesnych emigrantów grasicy (recent thymic emigrants - RTE) wynosiła odpowiednio 0,2%, 2,1%, 0,3% w TS, AS i OS. Najczęstsze warianty patogenne znaleziono w następujących genach: *IL2RG* (23,8%), *RAG1/2* (16,6%), *JAK3* (14,3%), *ADA* (11,9%) i *IL7RA* (4,8%). Przeżycie wyniosło 69% u wszystkich dzieci.

W publikacji pt. „National experience with adenosine deaminase deficiency related SCID in Polish children" rozpoznanie ADA-SCID było postawione pomiędzy 7 tygodni a do 27 miesięcy życia. W momencie podejrzenia rozpoznania SCID wszyscy pacjenci prezentowali leukopenię z neutropenią i limfopenią. Wśród objawów pozaszpikowych obserwowano: wzmożoną aktywność transaminaz (5 pacjentów), dysplazje szkieletowe (2 pacjentów), zmiany zanikowe ośrodkowego układu nerwowego (1 pacjent), atypowy zespół hemolityczno-mocznicowy (1 pacjent), U wszystkich pacjentów liczba limfocytów T, limfocytów B i komórek NK była poniżej wartości referencyjnych dla wieku. Stężenie immunoglobulin klasy G było obniżone u 2 pacjentów, a klasy IgM u 3 pacjentów. Diagnoza ADA-SCID była stwierdzona na podstawie aktywności ADA w erytrocytach (4 pacjentów) i/lub badania genetycznego (warianty patogenne stwierdzono u 6 pacjentów). Procedurze HSCT było poddanych 6 pacjentów, wszyscy ci pacjenci żyją, 1 pacjent zmarł przed kwalifikacją do HSCT. U 4 pacjentów Oddziału Immunologii IPCZD przed HSCT stosowano ETZ obserwując pozytywny efekt: normalizację liczby limfocytów oraz aktywności transaminaz. Żaden z pacjentów nie był poddany terapii genowej.

W publikacji pt. "BCG Moreau vaccine safety profile and NK cells-double protection against disseminated BCG infection in retrospective study of BCG vaccination in 52 Polish children with severe combined immunodeficiency" wykazano, że w latach 1980-2015 rozsiane zakażenie BCG obserwowano u 19% dzieci z SCID szczepionych szczepionką BCG Moreau. Odsetek rozsianych powikłań w grupie polskich dzieci był niższy w porównaniu z innymi krajami na świecie i według Marciano wynosił 34% (p=0,0028) [11]. Rozsiane zakażenie BCG obserwowano jedynie u pacjentów z niską liczbą komórek NK (p=0,0161). Liczba komórek NK nie wpływała na wystąpienie miejscowego niepożądanego odczynu szczepionkowego.

W publikacji pt. "The clinical and genetic spectrum of 82 patients with RAG deficiency including a c.256_257delAA founder variant in Slavic countries" wśród 82 pacjentów z defektem RAG stwierdzono następujące fenotypy SCID: typowe (n = 20), atypowe (n = 21), zespół Omenna (n = 37) oraz CID (n=4). Sześćdziesięciu siedmiu (81,7%) pacjentów było nosicielami *RAG1*, a 15 pacjentów (18,3%) miało bialleliczne warianty *RAG2*. Oszacowano, że minimalna roczna częstość występowania niedoboru RAG w krajach słowiańskich waha się od 1 na 180 000 do 1 na 300 000 żywych urodzeń. W kohorcie pacjentów z wariantami *RAG1* 70% (n = 47) było nosicielami allelu c.256_257delAA w układzie homozygotycznym (n = 18, 27%) lub heterozygoty złożonej (n = 29, 43%). Większość (77%) pacjentów z homozygotycznym wariantem *RAG1* c.256_257delAA

pochodziła z dorzecza Wisły w środkowo-wschodniej Polsce, a przypadki złożonej heterozygoty występowały we wszystkich krajach słowiańskich z wyjątkiem Bułgarii. Obraz kliniczny i immunologiczny pacjentów z wariantem homozygotycznym c.256_257delAA genu *RAG1* był bardzo zróżnicowany (SCID typowy, atypowy, zespół Omenna).

W publikacji pt. „Case report: severe combined immunodeficiency with ligase DNA I deficiency and Omenn-like manifestation" przedstawiono dziecko ze SCID o typie zespołu Omenna oraz z niedokrwistością makrocytarną, u którego rozpoznano deficyt ligazy DNA I. Ciężka niedokrwistość makrocytarna oraz limfopenia krwi obwodowej i szpiku skłoniła do szybkiej diagnostyki w kierunku wrodzonych błędów odporności. W wieku 8 tygodni rozpoznano SCID o typie zespołu Omenna. Diagnostyka genetyczna wykazała obecność dwóch nowych, dotychczas nieopisanych wariantów w genie *LIG1* (NM_000234.1): wariantu missense (c.2312 G>A, p.Arg771Gly) oraz wariantu splicingowego (c.776+5G>T, p.Pro260*), a ekspozycja fibroblastów na promieniowanie gamma wykazała zwiększoną radiowrażliwość. W wieku 4 miesięcy przeprowadzono HSCT od zgodnego dawcy niespokrewnionego według protokołu dla pacjentów z radiowrażliwością.

W publikacji "Atypical Hemolytic Uremic Syndrome (aHUS) and Adenosine Deaminase (ADA)-Deficient Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-Two Diseases That Exacerbate Each Other: Case Report" opisano pacjenta z nietypowym przebiegiem ADA-SCID pod postacią dominujących objawów nefrologicznych. W pierwszych miesiącach rozpoznano atypowy zespół hemolityczno-mocznicowy, niewydolność nerek. Podejrzenie ADA-SCID zostało postawione dopiero w okresie schyłkowej niewydolności wielonarządowej, a potwierdzone *post mortem*. Przebieg choroby tego pacjenta jest potwierdzeniem, że niezdiagnozowany i nieleczony ADA-SCID prowadzi do ogólnoustrojowej manifestacji i zgonu.

Podsumowanie

Tematem pracy doktorskiej jest diagnostyka i leczenie pacjentów z ciężkim złożonym niedoborem odporności zdiagnozowanych w Klinice Immunologii IP CZD. Zagadnienia te zostały przedstawione we wszystkich pracach. W publikacji nr 2 uwzględniono dodatkowo dwóch polskich pacjentów spoza IPCZD, a w publikacji nr 4 także pacjentów z innych krajów słowiańskich.

Objawami skłaniającymi do wysunięcia podejrzenia SCID i skierowania do diagnostyki immunologicznej były u większości pacjentów zakażenia – ciężkie, zagrażające życiu, nawracające, oportunistyczne lub powikłania po szczepieniu żywymi atenuowanymi szczepionkami (rozsiane zakażenie prątkiem BCG). Większość pacjentów (80%) prezentowała limfopenię, która powinna być już wcześniej przyczyną prowadzenia diagnostyki w kierunku SCID. Rozpoznanie SCID postawiono znacznie później w przypadku AS niż TS i OS. Rodzaj pierwszych objawów nie różnił się między poszczególnymi typami SCID. W publikacji nr 1 i nr 2 stwierdzono, że rozpoznanie SCID i ADA-SCID jest stawiane u coraz młodszych pacjentów. W ADA-SCID może to wynikać z toksycznego działania metabolitów na komórki limfoidalne i mieloidalne prowadzącego do leukopenii, neutropenii i limfopenii, co zwraca uwagę pediatrów i pozwala wysunąć podejrzenie niedoboru odporności. Izolowana limfopenia bez leukopenii i neutropenii u pacjentów z innymi postaciami SCID bywa przeoczana.

Najdłuższe opóźnienie diagnozy mieli pacjenci z atypową postacią SCID, pomimo stwierdzanej wcześniej limfopenii. Dlatego u niemowląt z limfopenią zaleca się poszerzenie diagnostyki w kierunku SCID. Dodatkowym argumentem są nieprawidłowości w badaniu radiologicznym klatki piersiowej aplazja/hipoplazja grasicy lub zmiany dysplastyczne kości, mogące wskazywać na ADA-SCID.

Ciężkim powikłaniem SCID może być rozsiane zakażenie prątkiem szczepionkowym BCG, które dotyczy blisko 20% pacjentów ze SCID szczepionych w Polsce, co przedstawiono w publikacji nr 3. Podszczep Moreau BCG produkowany w Polsce przez firmę Biomed pochodzi od macierzystego podszczepu *Mycobacterium bovis BCG Moreau Rio de Janeiro*, jednak jest bezpieczniejszy niż w populacji brazylijskiej (48% pacjentów SCID szczepionych BCG miało zakażenie rozsiane) lub w innych populacjach światowych (34%).

Diagnostyka genetyczna wykazała, że najczęstszymi genotypami SCID pacjentów diagnozowanych przez Oddział Immunologii IPCZD w latach 2010-2023 były *IL2RG*, *RAG 1/2*, *JAK3* i *ADA*.

W genie *RAG1* u naszych pacjentów dominuje wariant c.256_257delAA w układzie homozygotycznym. Wysoki odsetek tego wariantu wśród dzieci pochodzących ze wschodniej Polski oraz obecność u wszystkich Słowian może wskazywać, że jest to wariant założycielski, który pochodzi z dorzecza Wisły w Polsce co przedstawiono w publikacji nr 4.

Leczeniem przyczynowym pacjentów ze SCID jest HSCT, ale część pacjentów z ciężkimi zakażeniami lub niewydolnością wielonarządową umiera w trakcie diagnozy, lub w okresie okołoprzeszczepowym.

Przeżycie pacjentów ze SCID diagnozowanych przez Oddział Immunologii IPCZD w latach 2010-2023 u pacjentów z obciążonym wywiadem rodzinnym, zdiagnozowanych w pierwszych dniach i leczonych HSCT w pierwszych miesiącach życia wynosiło powyżej 80%. U pacjentów, u których rozpoznanie postawiono po pojawieniu się objawów przeżycie wynosiło 68% (26/38), w tym 78% (26/34) u poddanych HSCT (4 pacjentów zmarło przed HSCT) – publikacja nr 1.

ETZ była efektywna u wszystkich czterech leczonych pacjentów z ADA-SCID. Żaden z pacjentów nie był poddany terapii genowej, na co wpłynął ograniczony dostęp do procedury (w kilku ośrodkach w Europie), brak zgody rodziców, oraz zgodnie z piśmiennictwem, dłuższy czas leczenia i rekonstytucji układu immunologicznego w ramach terapii genowej w porównaniu do procedury HSCT.

SCID jest w populacji europejskiej chorobą ultrarzadką, ponadto niektórzy pacjenci mają wyjątkową manifestację objawów, co przedstawiono w dwóch opisach przypadków. W publikacji nr 5 przedstawiono dziecko ze SCID o typie zespołu Omenna, z towarzyszącą ciężką wrodzoną niedokrwistością makrocytarną. Diagnostyka molekularna wykazała, że przyczyną objawów jest deficyt ligazy 1. Jest to niezwykle rzadka choroba, dotychczas opisano na świecie 7 pacjentów z deficytem ligazy 1, o zróżnicowanym spektrum objawów immunologicznych. U trojga (w tym u naszej pacjentki) przeprowadzono HSCT. Wczesna diagnoza u tej pacjentki wynikała z obecności ciężkiej niedokrwistości makrocytarnej wymagającej licznych transfuzji uzupełniających

koncentratu krwinek czerwonych i skierowania pacjentki do hematologa, który zwrócił uwagę na towarzyszącą limfopenię. W publikacji nr 6 opisano pacjenta z nietypowym przebiegiem ADA-SCID pod postacią dominujących objawów nefrologicznych: w pierwszych miesiącach rozpoznano atypowy zespół hemolityczno-mocznicowy, niewydolność nerek, podejrzenie ADA-SCID zostało postawione dopiero w okresie schyłkowej niewydolności wielonarządowej.

Przedstawiona w powyższych pracach charakterystyka objawów klinicznych i wyników badań pacjentów może pozwolić na poprawę diagnostyki SCID, zanim dojdzie do powikłań narządowych i dzięki temu na zwiększenie przeżywalności tych pacjentów.