



Instytut Biologii Medycznej PAN

Anna Sokołowska

Wybrane czynniki odporności wrodzonej
u osób chorych na gruźlicę płuc

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Dr hab. Macieja Cedzyńskiego, prof. IBM PAN,
w Pracowni Immunobiologii Zakażeń IBM PAN

Łódź 2020

Podziękowania

***Panu dr hab. Maciejowi Cedzyńskiemu,
prof. IBM PAN*** za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie przygotowywania rozprawy, cierpliwość i wyrozumiałość oraz motywację do krytycznego spojrzenia na problematykę badawczą

Pani dr hab. Annie Świerzko, prof. IBM PAN za życzliwość, inspirację do zgłębiania zagadnień naukowych, niezastąpioną pomoc w planowaniu doświadczeń i merytoryczne wsparcie w rozwiązywaniu wielu problemów naukowych

Panu Prof. dr hab. Jarosławowi Dziadkowi
Za wsparcie merytoryczne i pomoc w zbieraniu materiału klinicznego

Koleżankom i kolegom z Pracowni Immunobiologii Zakazeń
za wspólnie spędzony czas i miłą atmosferę w pracy, owocne dyskusje i pomoc w opracowywaniu metod badawczych

Rodzinie
za nieustanną wiarę we mnie, cierpliwość,
wyrozumiałość i motywację

Dla Rodziców

Badania, których wyniki zostały przedstawione w rozprawie finansowane były w ramach projektu „Badania mechanizmów molekularnych na styku organizm ludzki-patogen-czynniki środowiska” (InterMolMed), nr POIG.01.01.02-10-107/09, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, 2007-2013) (kierownik: Prof. dr hab. Jarosław Dziadek).

Spis treści

Streszczenie	11
Summary	14
1. Wykaz najczęściej używanych skrótów	17
2. Wstęp	19
2.1. Gruźlica - sytuacja epidemiologiczna na świecie i w Polsce.....	19
2.2. Czynniki etiologiczne	21
2.3. Przebieg zakażenia	24
2.4. Interakcje układu odpornościowego z komórkami bakteryjnymi w zakażeniach <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	27
2.4.1. Kolektyny	27
2.4.1.1. Lektyna wiążąca mannozę – MBL.....	29
2.4.1.1.1. Struktura i swoistość MBL.....	29
2.4.1.1.2. Gen <i>MBL2</i> i ekspresja lektyny wiążącej mannozę.....	30
2.4.1.1.3. Znaczenie kliniczne MBL i polimorfizmów genu <i>MBL2</i>	32
2.4.1.2. Kolektyny surfaktantu płucnego	33
2.4.1.2.1. Białko surfaktantu płucnego A (SP-A) - struktura i swoistość	34
2.4.1.2.2. Geny kodujące SP-A (<i>SFTPA1</i> oraz <i>SFTPA2</i>) i ekspresja białek SP- A1 oraz SP-A2	35
2.4.1.2.3. Znaczenie kliniczne polimorfizmów genów <i>SFTPA1</i> i <i>SFTPA2</i>	37
2.4.1.2.4. Białko surfaktantu płucnego D – SP-D - struktura i swoistość.....	37
2.4.1.2.5. Gen <i>SFTPD</i> i ekspresja białka SP-D.....	38
2.4.1.2.6. Znaczenie kliniczne SP-D i polimorfizmów genu <i>SFTPD</i>	39
2.4.2. Fikoliny.....	40
2.4.2.1. Fikolina-1	42
2.4.2.1.1. Fikolina-1 – struktura i swoistość	42
2.4.2.1.2. Gen <i>FCNI</i> i ekspresja fikoliny-1	43
2.4.2.1.3. Znaczenie kliniczne fikoliny-1 i polimorfizmów genu <i>FCNI</i>	45
2.4.2.2. Fikolina-2.....	46
2.4.2.2.1. Fikolina-2 - struktura i swoistość.....	46
2.4.2.2.2. Gen <i>FCN2</i> i ekspresja fikoliny-2	47
2.4.2.2.3. Znaczenie kliniczne fikoliny-2 i polimorfizmów genu <i>FCN2</i>	49

2.4.2.3. Fikolina-3	50
2.4.2.3.1. Fikolina-3 – struktura i swoistość	50
2.4.2.3.2. Gen <i>FCN3</i> i ekspresja fikoliny-3	51
2.4.2.3.3. Znaczenie kliniczne fikoliny-3 i polimorfizmów genu <i>FCN3</i>	52
2.4.3. Interakcje kolektyn i fikolin ze strukturami powierzchniowymi <i>Mycobacterium</i> sp.	53
2.4.4. Układ dopełniacza	55
2.4.4.1. Droga klasyczna.....	56
2.4.4.2. Droga alternatywna.....	57
2.4.4.3. Droga lektynowa.....	58
2.4.5. Proteazy serynowe związane z MBL i fikolinami (MASP) oraz białka pokrewne	58
2.4.5.1. Proteazy serynowe MASP-1 i MASP-3 oraz białko nieenzymatyczne MAp44 jako produkty genu <i>MASPI/3</i>	59
2.4.5.1.1. Gen <i>MASPI/3</i> i ekspresja kodowanych przez niego białek	60
2.4.5.1.2. Polimorfizmy genu <i>MASPI/3</i> i ich wpływ na stężenie jego produktów w surowicy	61
2.4.5.2. Proteaza serynowa MASP-2 oraz białko nieenzymatyczne MAp19 jako produkty genu <i>MASP2</i>	61
2.4.5.2.1. Gen <i>MASP2</i> i ekspresja kodowanych przez niego białek	62
2.4.5.2.2. Polimorfizmy genu <i>MASP2</i> i ich wpływ na stężenie MASP-2 w surowicy oraz jej aktywność	63
2.4.6. Receptory Toll-podobne.....	63
2.4.6.1. Ogólna charakterystyka receptorów TLR.....	63
2.4.6.2. Receptory TLR zaangażowane w odpowiedź przeciwprątkową	66
2.4.6.3. Szlaki aktywacji receptorów TLR	69
2.4.6.3.1. Szlak zależny od białka MyD88	69
2.4.6.3.2. Szlak niezależny od białka MyD88.....	70
2.4.6.4. Polimorfizmy wybranych genów kodujących receptory TLR oraz genu kodującego białko adaptorowe TIRAP i ich znaczenie kliniczne	70
3. Cel pracy	73
4. Materiały i metody.....	74
4.1. Materiały	74
4.1.1. Grupy: badana i kontrolna	74
4.1.2. Materiał kliniczny.....	74

4.1.3. Przeciwciała.....	74
4.1.4. Surowice	75
4.1.5. Odczynniki do sporządzania roztworów i buforów.....	76
4.1.6. Enzymy.....	77
4.1.7. Bufory i roztwory	78
4.1.7.1. Bufory stosowane w badaniach genetycznych	78
4.1.7.2. Bufory i roztwory stosowane w testach immunoenzymatycznych.....	79
4.1.8. Zestawy i testy komercyjne:	81
4.1.9. Sprzęt laboratoryjny	82
4.1.10. Materiały i sprzęt jednorazowy	82
4.2. Metody	83
4.2.1. Ekstrakcja DNA z krwi pełnej.....	83
4.2.2. Badania polimorfizmów oraz mutacji wybranych genów.....	83
4.2.2.1. Badanie polimorfizmów genu <i>MBL2</i> , zlokalizowanych w regionie promotorowym (rs11003125; rs7096206) oraz eksonie 1 (rs5030737; rs1800450 i rs1800451).....	84
4.2.2.2. Badanie występowania mutacji +359 (A>G; rs72550870) genu <i>MASP2</i>	86
4.2.2.3. Badanie polimorfizmów genów kodujących białka surfaktantu płucnego SP-A (<i>SFTPA1</i> oraz <i>SFTPA2</i>)	87
4.2.2.3.1. Badanie polimorfizmów genu <i>SFTPA1</i> , zlokalizowanych w pozycjach +56 (T>C; Val19Ala; rs1059047) oraz +148 (G>C; Val50Leu; rs17883551).....	87
4.2.2.3.2. Badanie polimorfizmu genu <i>SFTPA1</i> , zlokalizowanego w pozycji +655 (C>T; Arg219Trp; rs4253527)	88
4.2.2.3.3. Badanie polimorfizmu genu <i>SFTPA2</i> , zlokalizowanego w pozycji +26 (C>A; Thr9Asn; rs1059046).....	89
4.2.2.3.4. Badanie polimorfizmu genu <i>SFTPA2</i> , zlokalizowanego w pozycji +271 (G>C; Ala91Pro; rs17886395).....	89
4.2.2.3.5. Badanie polimorfizmu genu <i>SFTPA2</i> , zlokalizowanego w pozycji +667 (C>A; Glu223Lys; rs17881479).....	90
4.2.2.4. Badanie wybranych polimorfizmów genu <i>SFTPD</i>	90
4.2.2.4.1. Badanie polimorfizmu genu <i>SFTPD</i> , zlokalizowanego w pozycji +32 (T>C; Met11Thr; rs721917)	90
4.2.2.4.2. Badanie polimorfizmu genu <i>SFTPD</i> , zlokalizowanego w pozycji +478 (G>A; Ala160Thr; rs17885900)	91

4.2.2.4.3. Badanie polimorfizmu genu <i>SFTPD</i> , zlokalizowanego w pozycji +868 (T>A; Ser270Thr; rs3088308)	92
4.2.2.5. Badanie wybranych polimorfizmów genu <i>FCN1</i>	92
4.2.2.5.1. Badanie polimorfizmu zlokalizowanego w regionie promotorowym, w pozycji -542 (G>A; rs10120023)	92
4.2.2.5.2. Badanie polimorfizmu zlokalizowanego w regionie promotorowym w pozycji -144 (C>A; rs10117466).	93
4.2.2.6. Badanie wybranych polimorfizmów genu <i>FCN2</i>	94
4.2.2.6.1. Badanie polimorfizmu zlokalizowanego w regionie promotorowym, w pozycji -64 (A>C; rs78654553)	94
4.2.2.6.2. Badanie polimorfizmu zlokalizowanego w regionie promotorowym, w pozycji -4 (A>G; rs17514136)	95
4.2.2.7. Badanie występowania mutacji +1637delC genu <i>FCN3</i> (rs28357092)..	95
4.2.2.8. Badanie polimorfizmów genów kodujących wybrane receptory Toll podobne oraz białko adaptorowe TIRAP/Mal	96
4.2.2.8.1. Badanie polimorfizmu genu <i>TLR2</i> , zlokalizowanego w pozycji +2258 (G>A; Arg753Gln; rs5743708)	96
4.2.2.8.2. Badanie polimorfizmu genu <i>TLR1</i> , zlokalizowanego w pozycji +1805 (T>G; Ile602Ser; rs5743618)	97
4.2.2.8.3. Badanie polimorfizmu genu <i>TLR6</i> , zlokalizowanego w pozycji +745 (C>T; Ser249Pro; rs5743810).....	97
4.2.2.8.4. Badanie polimorfizmu genu <i>TLR4</i> , zlokalizowanego w pozycji +896 (A>G; Asp299Gly; rs4986790).....	98
4.2.2.8.5. Badanie polimorfizmu genu <i>TIRAP</i> , zlokalizowanego w pozycji +975 (C>T; Ser180Leu; rs8177374)	99
4.2.3. Metody immunologiczne	99
4.2.3.1. Oznaczanie stężenia lektyny wiążącej mannozę (MBL) w surowicy.....	99
4.2.3.2. Oznaczanie aktywności kompleksów lektyny wiążącej mannozę z proteazą serynową MASP-1 (MBL-MASP-1) w surowicy.....	100
4.2.3.3. Oznaczanie aktywności kompleksów lektyny wiążącej mannozę z proteazą serynową MASP-2 (MBL-MASP-2) w surowicy.....	101
4.2.3.4. Badanie stężenia białka surfaktantu płucnego SP-D w surowicy.....	101
4.2.3.5. Oznaczanie stężenia fikoliny-1 w surowicy	102
4.2.3.6. Oznaczanie stężenia fikoliny-2 w surowicy	103
4.2.3.7. Oznaczanie stężenia fikoliny-3 w surowicy	103
4.2.4. Analiza statystyczna wyników	104

5. Wyniki	105
5.1. Charakterystyka grup badanych.....	105
5.2. Badanie stężenia lektyny wiążącej mannozę (MBL) w surowicy oraz polimorfizmów genu <i>MBL2</i>	105
5.2.1. Badanie stężenia aktywnej lektyny wiążącej mannozę (MBL) w surowicy.....	105
5.2.2. Badanie polimorfizmów genu <i>MBL2</i> , zlokalizowanych w eksonie 1 i regionie promotorowym oraz ich wpływu na stężenie MBL w surowicy.....	111
5.2.3. Zmiany stężenia MBL w przebiegu leczenia	112
5.3. Badanie aktywności kompleksów MBL z proteazą serynową MASP-2 w surowicy oraz ocena wpływu polimorfizmów genu <i>MBL2</i> na aktywność tych kompleksów. Badanie występowania mutacji genu <i>MASP2</i> i ocena jej wpływu na aktywność kompleksów MBL-MASP-2.....	113
5.3.1. Badanie aktywności kompleksów MBL-MASP-2 w surowicy.....	113
5.3.2. Wpływ polimorfizmów genu <i>MBL2</i> na aktywność kompleksów MBL-MASP-2.....	121
5.3.3. Badanie występowania mutacji +359 A>G (rs72550870) genu <i>MASP2</i>	122
5.3.4. Wpływ występowania mutacji +359 A>G genu <i>MASP2</i> na aktywność kompleksów MBL-MASP-2	123
5.4. Badanie aktywności kompleksów MBL z proteazą serynową MASP-1 w surowicy oraz ocena wpływu polimorfizmów genu <i>MBL2</i> na aktywność tych kompleksów	124
5.4.1. Badanie aktywności kompleksów MBL-MASP-1 w surowicy.....	124
5.4.2. Wpływ polimorfizmów genu <i>MBL2</i> na aktywność kompleksów MBL-MASP-1 w surowicy	133
5.5. Badanie stężenia kolektyny surfaktantu płucnego D (SP-D) w surowicy, polimorfizmów genu <i>SFTPD</i> oraz ich wpływu na poziom białka.....	134
5.5.1. Badanie stężenia białka surfaktantu płucnego D (SP-D) w surowicy.....	134
5.5.2. Badanie wybranych polimorfizmów genu <i>SFTPD</i>	140
5.5.3. Wpływ polimorfizmów genu <i>SFTPD</i> na stężenie SP-D w surowicy.....	142
5.5.4. Zmiany stężenia SP-D w przebiegu leczenia	144
5.6. Badanie wybranych polimorfizmów genów <i>SFTPA1</i> oraz <i>SFTPA2</i>	145
5.6.1. Badanie wybranych polimorfizmów genu <i>SFTPA1</i>	145
5.6.2. Badanie wybranych polimorfizmów genu <i>SFTPA2</i>	147
5.7. Badanie stężenia fikoliny-1 w surowicy i polimorfizmów genu <i>FCNI</i>	149
5.7.1. Badanie stężenia fikoliny-1 w surowicy.....	149
5.7.2. Badanie wybranych polimorfizmów genu <i>FCNI</i>	155

5.7.3. Wpływ polimorfizmów genu <i>FCN1</i> na stężenie fikoliny-1 w surowicy.....	158
5.7.4. Zmiany stężenia fikoliny-1 w surowicy pacjentów w przebiegu leczenia ..	159
5.8. Badanie stężenia fikoliny-2 w surowicy i polimorfizmów genu <i>FCN2</i>	160
5.8.1. Badanie stężenia fikoliny-2 w surowicy.....	160
5.8.2. Badanie wybranych polimorfizmów genu <i>FCN2</i>	166
5.8.3. Wpływ badanych polimorfizmów genu <i>FCN2</i> na stężenie fikoliny-2 w surowicy	168
5.8.4. Zmiany stężenia fikoliny-2 w przebiegu leczenia	169
5.9. Badanie stężenia fikoliny-3 w surowicy i mutacji genu <i>FCN3</i>	170
5.9.1. Badanie stężenia fikoliny-3 w surowicy.....	170
5.9.2. Badanie występowania mutacji +1637delC (rs28357092) genu <i>FCN3</i>	176
5.9.3. Wpływ występowania mutacji +1637delC na stężenie fikoliny-3 w surowicy	177
5.9.4. Zmiany stężenia fikoliny-3 w przebiegu leczenia	178
5.10. Ocena potencjalnego znaczenia diagnostycznego badanych białek	178
5.11. Badanie polimorfizmów genów kodujących wybrane receptory Toll-podobne oraz białko adaptorowe TIRAP.....	180
5.11.1. Badanie polimorfizmu genu <i>TLR2</i> , zlokalizowanego w pozycji +2258 (G>A; Arg753Gln; rs5743708).....	180
5.11.2. Badanie polimorfizmu genu <i>TLR1</i> , zlokalizowanego w pozycji +1805 (T>G, Ile602Ser; rs5723618)	181
5.11.3. Badanie polimorfizmu genu <i>TLR6</i> , zlokalizowanego w pozycji +745 (C>T; Ser249Pro; rs5743810).....	181
5.11.4. Badanie polimorfizmu genu <i>TLR4</i> , zlokalizowanego w pozycji +896 (A>G; Asp299Gly; rs4986790)	182
5.11.5. Badanie polimorfizmu genu <i>TIRAP</i> , zlokalizowanego w pozycji +975 (C>T; Ser180Leu; rs8177374)	183
6. Dyskusja.....	184
7. Podsumowanie	201
8. Wnioski.....	203
9. Wykaz publikacji i komunikatów konferencyjnych związanych z rozprawą.....	205
10. Wykaz pozostałych publikacji i komunikatów konferencyjnych.....	206
11. Literatura.....	213

Streszczenie

Mimo znaczącego postępu w zapobieganiu i leczeniu gruźlicy, choroba ta ciągle pozostaje globalnym problemem zdrowotnym, a corocznie z jej powodu notuje się ponad milion zgonów. Do czynników przyczyniających się do wciąż ograniczonej skuteczności walki z gruźlicą należą, między innymi, niepełny efekt ochronny stosowanej powszechnie szczepionki BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) oraz często przedwczesne przerywanie długotrwałej farmakoterapii przeciwprątkowej. W wielu krajach, w wyniku niewłaściwego nadzoru nad leczeniem, wzrasta odsetek zakażeń prątkami opornymi na liczne antybiotyki. Migracje ludności prowadzą do rozprzestrzeniania się szczepów wielolekoopornych. Diagnostyka gruźlicy opiera się głównie na badaniach mikrobiologicznych oraz radiologicznych. Brakuje swoistych markerów zakażenia, które pozwoliłyby skutecznie rozpoznać chorobę w jej wczesnym etapie i ograniczyć jej rozprzestrzenianie. Nieleczony, prątkujący chory może w ciągu roku zarazić nawet kilkanaście osób, natomiast po włączeniu antybiotykoterapii, niebezpieczeństwo transmisji zakażenia mija już po kilku tygodniach.

Reakcja ochronna organizmu na wnikające patogeny jest natychmiastowa, gdyż już w pierwszym etapie infekcji zostają uruchomione mechanizmy odporności wrodzonej. Jej czynnikami są m.in. receptory PRR (ang. pattern recognition receptors) rozpoznające wzorce strukturalne drobnoustrojów PAMP (ang. pathogen-associated molecular patterns). Występują one w organizmie zarówno w formie związanej z komórkami odpornościowymi, jak i w formie rozpuszczalnej. Przebieg początkowej fazy zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) jest niezwykle istotny. Przy sprawnie działających mechanizmach odporności, w 90-95% przypadków nie dochodzi do rozwoju aktywnej postaci gruźlicy. Oddziaływanie komórek *M. tuberculosis* z różnorodnymi receptorami i uruchomienie procesu fagocytozy pełnią kluczową rolę w przebiegu zakażenia. Efekt oddziaływań patogen-gospodarz często zależy od rodzaju receptora biorącego udział w rozpoznaniu antygenów bakteryjnych.

Celem pracy była ocena znaczenia wybranych czynników odporności wrodzonej w podatności na gruźlicę płuc, której czynnikiem etiologicznym jest *Mycobacterium tuberculosis*.

Do grupy badanej zakwalifikowano pacjentów Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, Wojewódzkiego Szpitala Chorób Płuc w Jaroszewcu, Mazowieckiego Centrum Leczenia Chorób Płuc i Gruźlicy w Otwocku, Podkarpackiego Centrum

Chorób Płuc w Rzeszowie oraz Kujawsko-Pomorskiego Centrum Pulmonologii w Bydgoszczy, u których rozpoznano aktywną gruźlicę płuc wywołaną zakażeniem *M. tuberculosis*. Diagnoza potwierdzana była metodami bakteriologicznymi (hodowla czynnika etiologicznego) oraz za pomocą prześwietlenia klatki piersiowej. Próby krwi (przeznaczone do otrzymania DNA wykorzystywanego w badaniach genetycznych oraz surowicy używanej do oznaczeń stężenia/aktywności białek) pobierano niezwłocznie po stwierdzeniu choroby. Od niewielkiej liczby pacjentów, próby surowicy otrzymano dodatkowo po kilkutygodniowym leczeniu, w celu oceny ewentualnych zmian stężenia badanych czynników. Grupę kontrolną stanowiły osoby zdrowe niezgłaszające w wywiadzie przebycia ciężkich/nawracających zakażeń, a także chorób o podłożu autoimmunizacyjnym i nowotworowym.

Aby zrealizować cel pracy, określano stężenia kolektyn [lektyny wiążącej mannozę (MBL) i białka surfaktantu płucnego typu D (SP-D)], aktywność kompleksów MBL z proteazami serynowymi MASP-1 i MASP-2 oraz stężenia fikolin (fikolina-1, -2 i -3) w surowicy. Badano również wybrane polimorfizmy genów kodujących wspomniane wyżej czynniki oraz białko surfaktantu płucnego A (SP-A), a także genów dla wybranych receptorów Toll-podobnych (TLR-1, -2, -4, -6) i białka adaptorowego TIRAP, uczestniczącego w przekazywaniu sygnału z aktywowanych TLR. Oceniano różnice stężeń i aktywności wspomnianych czynników pomiędzy grupami, częstość występowania niskich i wysokich stężeń, wśród osób chorych i niechorujących oraz częstość występowania wariantów polimorficznych wspomnianych genów i ich wpływ na poziom badanych białek w surowicy.

Mediany stężeń MBL i aktywności kompleksów tej lektyny z proteazami serynowymi MASP (MBL-MASP-1 i MBL-MASP-2), jak również stężenia kolektyny surfaktantu płucnego (SP-D) i fikoliny-1 były statystycznie istotnie wyższe w grupie pacjentów, w porównaniu z osobami zakwalifikowanymi do grupy kontrolnej. Różnice te obserwowano niezależnie od płci i wieku. Dodatkowo wykazano, że wśród mężczyzn chorych na gruźlicę, stężenia wymienionych białek i aktywności kompleksów MBL z proteazami MASP były znacząco wyższe niż u chorujących kobiet.

Z drugiej strony, badając polimorfizmy genów *MBL2* oraz *FCN1*, w grupie chorych na gruźlicę, zanotowano odpowiednio: niższą (choć statystycznie nieistotnie) niż w grupie odniesienia częstość występowania genotypów związanych z wysokim stężeniem MBL (YA/YA) i znacząco wyższą częstość występowania genotypów związanych z niskim stężeniem fikoliny-1 (G/G w pozycji -542; C/C w pozycji -144). Może to świadczyć o

wpływie innych, niebadanych w pracy polimorfizmów wspomnianych genów na stężenie ich produktów w surowicy lub czynników pozagenetycznych na wzrost ich ekspresji. Poziom MBL czy fikoliny-1 może także wzrastać w odpowiedzi na aktywne zakażenie. W odróżnieniu od opisanych powyżej białek, wykazano, że mediana stężeń fikoliny-2 w grupie pacjentów, niezależnie od wieku i płci, była istotnie niższa niż w grupie osób zdrowych, natomiast mediany stężeń fikoliny-3 nie różniły się znacząco pomiędzy grupami. Potwierdzono ponadto wcześniejsze doniesienia, że przeciętne stężenie drugiego z wymienionych czynników jest wyższe u mężczyzn niż u kobiet. W przypadku fikoliny-2, badając wybrane polimorfizmy genu kodującego to białko, zaobserwowano, że genotyp A/G w pozycji -4 genu *FCN2*, występował znacząco częściej u osób zdrowych w porównaniu z grupą pacjentów.

Podczas leczenia przeciwgruźliczego, stężenie MBL w surowicy znacznie wzrastało, podczas gdy nie zaobserwowano istotnych różnic w przypadku pozostałych białek (SP-D i fikolin). Analiza krzywych ROC umożliwiła stwierdzenie, że fikolina-1 oraz fikolina-2 charakteryzują się wysokim potencjałem różnicującym osoby chore na gruźlicę płuc od osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej, w związku z czym możliwe jest rozpatrywanie ich jako potencjalnych biomarkerów pomocniczych we wczesnej diagnostyce tej choroby. Wykazano także, że przeprowadzenie analizy dwuczynnikowej z wykorzystaniem stężeń tych białek skutkuje wyższą czułością i swoistością różnicowania.

Zaobserwowane różnice częstości występowania wariantów polimorficznych genu *SFTPA2* w pozycjach +26 (C>A) oraz +667 (C>A) (genotypy A/A występowały znacząco rzadziej w grupie TB niż w grupie C), wydają się potwierdzać znaczenie SP-A w odporności przeciwko *Mtb* i sugerują wpływ wspomnianych polimorfizmów na podatność gospodarza na gruźlicę. Z kolei brak różnic wykazany w analizie polimorfizmów pozostałych genów: *MASP-2*, *SFTPA1*, *SFTPD*, *FCN3*, *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6* oraz *TIRAP* sugerują brak ich wpływu na ryzyko rozwoju aktywnego zakażenia.

Przedstawiona praca pozwala na rozszerzenie wiedzy dotyczącej udziału mechanizmów odporności wrodzonej w podatności na zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* i rozwój aktywnej postaci gruźlicy. Uzyskane wyniki wskazują celowość prowadzenia dalszych prac, obejmujących inne polimorfizmy badanych genów, inne czynniki odporności wrodzonej i przeprowadzenie, w uzasadnionych przypadkach, analiz wieloczynnikowych.

Summary

Despite significant progress in the prevention and treatment of tuberculosis (TB), this disease still remains a global public health problem, leading to nearly million of deaths annually. Among the main reasons for that, the incomplete protective effect of commonly used BCG (Bacillus Calmette-Guérin) vaccine and the often not strict conforming to treatment regimen are mentioned. In many countries, the percentage of infections caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) resistant to numerous antibiotics is increasing, in result of insufficient treatment control. Migrations facilitate the spread of multi-resistant strains. Diagnosis of tuberculosis is based mainly on microbiological and radiological methods. There are no specific markers of infection that would enable effective and prompt diagnosis at the early disease stage and limiting its spread. One untreated person with active TB may give the disease to a dozen people within a year, while during pharmacotherapy, the risk of transmission decreases markedly after a few weeks.

Various mechanisms of innate immunity are crucial in the first-line antimicrobial defence. The pattern recognition receptors (PRRs) group consists of numerous transmembrane and soluble factors, which recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). In the initial phase of infection, effective immune mechanisms commonly (in 90-95% of cases) prevent host from development of active disease. The interaction of *Mycobacterium tuberculosis* cells with various receptors and triggering the process of phagocytosis play a key role during infection. The effect of pathogen-host interactions often depends on the type of receptor involved in the recognition of bacterial antigens. The aim of this study was to investigate the significance of selected innate immunity factors in pulmonary tuberculosis, caused by *M. tuberculosis* infection. Adults patients diagnosed with active disease were recruited from the Institute of Tuberculosis and Lung Diseases in Warsaw, The Voivodeship Hospital of Lung Diseases in Jaroszwiec, Masovian Center of Lung Diseases and Tuberculosis Treatment in Otwock, Subcarpathian Center of Lung Diseases in Rzeszów and the Kuyavian-Pomeranian Pulmonology Center in Bydgoszcz. The diagnosis was confirmed by positive Mtb culture and chest radiography. Blood samples (for DNA and serum isolation) were collected immediately after the diagnosis. In minority of cases, serum samples were collected twice, before and after few weeks of anti-tuberculosis treatment, to estimate possible changes in the serum concentration of selected immune

factors. Healthy adults, who did not report a history of severe/recurrent infections, autoimmune or malignant diseases were qualified to the control group.

To achieve the aim of the study, serum concentrations of collectins [mannose binding lectin (MBL) and pulmonary surfactant protein D (SP-D)], activity of MBL complexes with associated serine proteases (MASP-1 and MASP-2) as well as levels of ficolins (ficolin-1, -2 and -3) were determined. Selected polymorphisms of genes encoding for the above-mentioned factors, surfactant protein A (SP-A) as well as genes for selected Toll-like receptors (TLR-1, -2, -4, -6) and the adaptor protein TIRAP, involved in signal transduction from activated TLRs, were also studied. The differences in median concentrations/activities of the afore-mentioned factors between the groups, the incidence of low and high values among patients and controls as well frequencies of polymorphic variants of corresponding genes and their impact on the serum levels of tested proteins were investigated.

It was shown, that the median serum concentration of MBL and the activity of its complexes with MASP-1 and MASP-2 as well as the median concentrations of SP-D and ficolin-1 were significantly higher in the group of patients than in the reference one (those differences were gender- and age-independent) In addition, within TB group, serum levels of the mentioned factors (and activities of MBL-MASP complexes) were found significantly higher in males than in females.

However, the frequency of the *MBL2* genotypes associated with the highest serum levels of fully active MBL (YA/YA) was lower (though insignificantly) among tuberculosis patients in comparison with healthy controls. Within TB group, the *FCN1* genotypes related to low serum concentrations of ficolin-1 (G/G at position -542; C/C at position -144) were in turn significantly more common than in reference one. This may indicate significance of other (not studied here) polymorphisms of these genes, or an impact of epigenetic regulation on their expression. MBL or ficolin-1 levels may also increase in response to active infection.

The median serum concentration of ficolin-2 in the TB group was significantly lower than in the C group (again, independently age and sex), while median ficolin-3 level did not differ between the groups. Furthermore, investigation of selected polymorphisms of the *FCN2* (ficolin-2) gene revealed significantly lower frequency of heterozygosity for -4 A>G polymorphism among patients compared with controls.

Interestingly, during anti-tuberculosis treatment, median serum MBL level increased significantly, while no difference was observed when concentrations of SP-D or ficolins in samples taken before and several weeks after starting therapy were compared.

The ROC analysis showed that ficolin-1 and ficolin-2 have a high potential to differentiate between individuals with active pulmonary tuberculosis and those qualified to the control group, therefore it is worth considering them as potential biomarkers in the early diagnosis of this disease. It was also demonstrated that two-factor analysis, using concentrations of both proteins offers a higher sensitivity and specificity of differentiation.

The differences in frequency of polymorphic variants of the *SFTPA2* gene at positions +26 (C>A) and +667 (C>A) (A/A genotypes were noted significantly less commonly in TB than in C group) seem to confirm the involvement of SP-A in defence against Mtb and may indicate an impact of the mentioned polymorphisms on the host's susceptibility to tuberculosis. In contrast, investigated SNPs of the following genes: *MASP-2*, *SFTPA1*, *SFTPD*, *FCN2*, *FCN3*, *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6* and *TIRAP* have rather no significant influence on the risk of developing active infection.

The presented work expanded knowledge concerning the associations of selected innate immunity factors with susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infections and the development of active pulmonary tuberculosis. The demonstrated and discussed data suggest continuation and extension of the study (including other polymorphisms of investigated genes, other factors and carrying out multifactorial analyzes) to be advisable.

1. Wykaz najczęściej używanych skrótów

Skrót	Rozwinięcie w języku angielskim	Rozwinięcie w języku polskim
APC	Antigen-presenting cell	Komórka prezentująca antygen
APS	Ammonium persulfate	Nadsiarczan amonu
BAL	Bronchoalveolar lavage	Popłuczyny oskrzelowo-płucne
BSA	Bovine serum albumin	Albumina surowicy bydłej
CRD	Carbohydrate recognition domain	Domena rozpoznająca węglowodany
DNA	Deoxyribonucleic acid	Kwas deoksyrybonukleinowy
DC	Dendritic cell	Komórka dendrytyczna
dNTP	Deoxynucleotide triphosphates	Trifosforany deoksynukleotydów
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Etylenodiaminotetraoctan
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Test immunoenzymatyczny
FBG	Fibrinogen-like domain	Domena fibrynogenopodobna
HIV	Human immunodeficiency virus	Ludzki wirus nabytego niedoboru odporności
IAV	Influenza A virus	Wirus grypy typu A
IFNγ	Interferon gamma	Interferon gamma
Ig	Immunoglobulin	Immunoglobulina
LAM	Lipoarabinomannan	Lipoarabinomannan
LM	Lipomannan	Lipomannan
LP	Lectin pathway	Droga lektynowa
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolisacharyd (endotoksyna)
MAC	Membrane attack complex	Kompleks ataku błonowego
MASP	MBL-associated serine protease	Proteaza serynowa związana z lektyną wiążącą mannozę
MBL	Mannose-binding lectin	Lektyna wiążąca mannozę
MDR-TB	Multidrug-resistant tuberculosis	Gruźlica wielolekooporna
mRNA	Messenger RNA	Matrycowy kwas rybonukleinowy
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , prątki gruźlicy
PAMP	Pathogen-associated molecular	Wzorzec molekularny związany z

	pattern	patogenami
PBS	Phosphate-buffered saline	Fizjologiczny roztwór NaCl buforowany fosforanem
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
PCR	Polymerase chain reaction	Reakcja łańcuchowa polimerazy
PIM	Phosphatidylinositol mannoside	Mannozyd fosfatydyloinozytolu
PPR	Pattern recognition receptor	Receptor rozpoznający wzorzec
RFLP	Restriction fragments length polymorphism	Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych
RSV	Respiratory syncytial virus	Syncytialny wirus oddechowy
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome	Zespół ogólnoustrojowej reakcji zapalnej
SNP	Single nucleotide polymorphism	Polimorfizm pojedynczego nukleotydu
TBS	Tris-buffered saline	Fizjologiczny roztwór soli NaCl buforowany Tris
TEMED	Tetramethylethylenediamine	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TGF β	Transforming growth factor	Transformujący czynnik wzrostu
TRIFMA	Time-resolved immunofluorometric assay	Test immunofluorometryczny
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Tris-(hydroksymetyl)aminometan
WHO	World Health Organization	Światowa Organizacja Zdrowia
WZW	Viral hepatitis	Wirusowe zapalenie wątroby
VPR-AMC	Boc-Val-Pro-Arg-aminomethylcoumarin	Val-Pro-Arg-aminometylokumaryna zawierająca grupę tert-butyloksykarbonylową (Boc)
XDR-TB	Extensively drug-resistant tuberculosis	Gruźlica wielolekooporna z rozszerzoną opornością prątków na leki

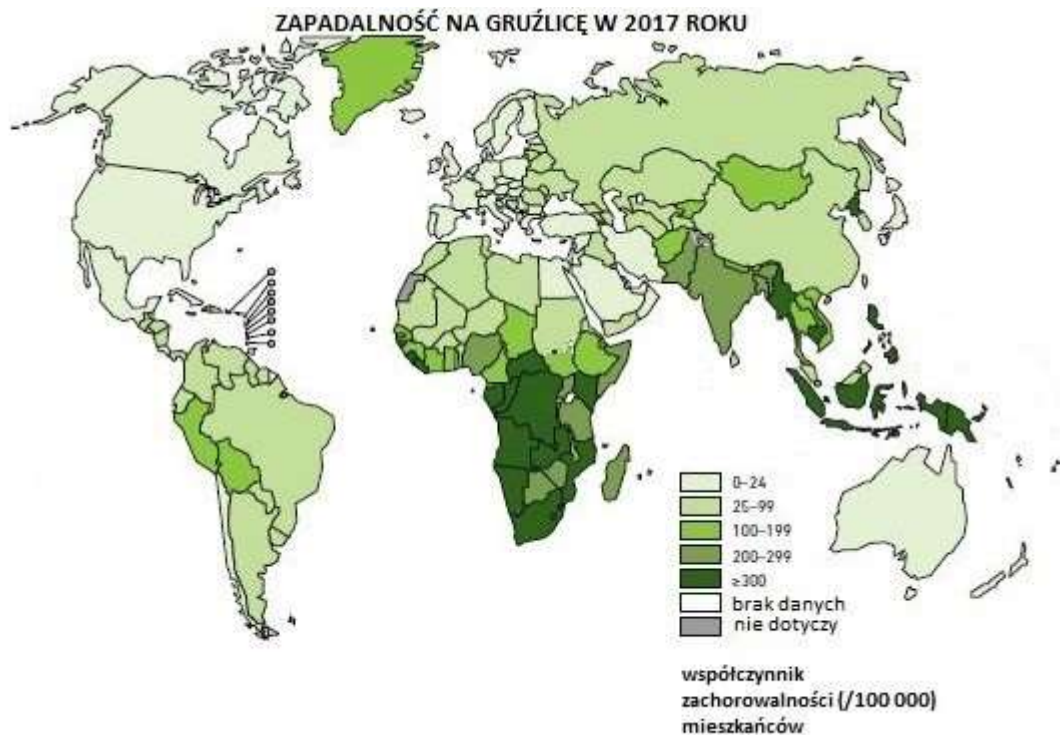
2. Wstęp

2.1. Gruźlica - sytuacja epidemiologiczna na świecie i w Polsce

Gruźlica, wg Światowej Organizacji Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO), obok malarii i infekcji ludzkim wirusem nabytego niedoboru odporności (ang. human immunodeficiency virus, HIV), należy do najgroźniejszych chorób zakaźnych, głównie ze względu na wysoką zachorowalność i śmiertelność [1]. Najczęstszą przyczyną gruźlicy płuc u ludzi są prątki *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), jednak opisane są również przypadki zakażeń ludzi przez gatunki *M. africanum* czy *M. bovis*. Mimo iż pierwsza antybiotykowa terapia przeciwgruźlicza została zastosowana kilkadziesiąt lat temu, nadal corocznie notuje się około dziesięciu milionów zachorowań oraz ponad milion zgonów. Na przykład, według raportu WHO (2018) [2], w roku 2017 rozpoznano 10 mln nowych przypadków (około 10% dotyczyło osób zakażonych HIV) a 1,6 mln osób zmarło (w tym 0,3 mln nosicieli wspomnianego wirusa). Mimo, że w latach 2000-2016 śmiertelność uległa obniżeniu o ponad 35%, choroba ta nadal znajduje się wśród dziesięciu najczęstszych przyczyn zgonów na świecie. Ryzyko zachorowania wzrasta z wiekiem, przy czym częściej chorują mężczyźni niż kobiety. Wyższą zachorowalność obserwuje się w regionach zurbanizowanych, z uwagi na większe zagęszczenie mieszkańców, co sprzyja rozprzestrzenianiu infekcji. Bardzo duże znaczenie w podatności na zakażenie mają warunki mieszkaniowe oraz tryb życia. Z powodu złych warunków socjalnych, przede wszystkim niedożywienia, gruźlica jest szczególnie groźna w regionach ubogich i o gęstym zaludnieniu, głównie Afryki i Azji (ryc. 1). W roku 2017, ponad 2/3 nowych zachorowań odnotowano w ośmiu krajach: Indiach, Indonezji, Chinach, Filipinach, Pakistanie, Bangladeszu, Nigerii i Republice Południowej Afryki [2]. Dla porównania, w Europie i obu Amerykach zanotowano łącznie 6% nowych przypadków (ryc. 1).

Rozprzestrzenianiu choroby sprzyjają również migracje ludności (np. z przyczyn politycznych czy ekonomicznych) oraz masowa turystyka. Poważnym problemem w leczeniu jest lekooporność prątków, przede wszystkim rozprzestrzenianie szczepów opornych na leki, tzw. „I rzutu”: pirazynamid, izoniazyd, ryfampicynę oraz etambutol (gruźlica wielolekooporna, ang. multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB). Za powstanie tego zjawiska, w dużym stopniu odpowiedzialni są chorzy, przyjmujący leki niezgodnie z zaleceniami lekarzy, jak również brak skutecznej i ogólnodostępnej diagnostyki szczepów lekoopornych. Badania w kierunku oznaczania lekooporności

prątków, bazujące na wykrywaniu mutacji związanych z opornością na leki są kosztowne. Dlatego, zwłaszcza w krajach słabo rozwiniętych, często przyjmuje się niewłaściwe schematy terapeutyczne, co przyczynia się do transmisji szczepów wielolekoopornych [3]. W 2017 r. zanotowano prawie 0,5 mln przypadków MDR-TB (przede wszystkim w Chinach, Indiach i Rosji).



Ryc. 1. Zapadalność na gruźlicę na świecie, w roku 2017 (wg raportu WHO [2], zmodyfikowano).

Coraz częściej notowane są przypadki gruźlicy wielolekoopornej o rozszerzonej oporności (ang. extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB), w których nieskutecznym okazuje się leczenie preparatami tzw. „II rzutu”, znacznie droższymi i powodującymi więcej skutków ubocznych (cykloseryna, etionamid, kanamycyna, amikacyna, kapreomycyna, kwas p-aminosalicylowy, fluorochinolony, ryfabutyna, ryfapentyna, kłofazymina, klarytromycyna). W roku 2017 stanowiły one 8,5% przypadków lekoopornych, a obserwowano je w ponad 80 krajach [2].

W Europie, sytuacja epidemiologiczna jest zróżnicowana. W niektórych krajach, jak San Marino czy Księstwo Monako, praktycznie nie notuje się nowych zachorowań (współczynnik zapadalności w 2017 r.: 0). W innych państwach, współczynnik ten przekroczył 50/100 000 mieszkańców (Rumunia – 62,7/100 000, Mołdawia – 82,9/100 000). W 2017 roku zanotowano 275 000 nowych przypadków, z czego około 83%

stanowiły zachorowania na terenach 18 krajów wschodniej i centralnej części kontynentu (współczynnik zapadalności 56,3/100 000). Z powodu omawianej choroby, w 2017 r. w Europie zmarło 24 000 osób (2,6/100 000), najwyższy współczynnik zgonów (8,7/100 000) zanotowano na Ukrainie [4].

W państwach należących do Europejskiego obszaru Gospodarczego (EOG) [kraje Unii Europejskiej (UE) i kraje członkowskie Europejskiego Stowarzyszenia Wolnego Handlu (EFTA – ang. European Free Trade Association, z wyłączeniem Szwajcarii)] w 2017 roku odnotowano 55 337 przypadków zachorowań na gruźlicę (średni współczynnik zapadalności: 10,7/100 000), z czego niemal połowę stanowili chorzy z Polski, Rumunii i Wielkiej Brytanii [2]. W 24 krajach tego obszaru współczynnik zapadalności był niższy niż 10, natomiast w trzech - wyższy niż 20 (najwyższy we wspomnianej wyżej Rumunii).

Mimo iż od kilkudziesięciu lat obserwuje się powolne obniżanie zachorowalności na gruźlicę w Polsce, współczynnik zapadalności jest nadal wyższy niż średni w krajach UE/EOG (15,2/100 000 w 2017 roku, co odpowiadało 5787 zarejestrowanym przypadkom). Wynikać to może między innymi z faktu, że Polska graniczy z krajami o najwyższych współczynnikach zachorowalności [2]. Należy wspomnieć obserwowane od lat znaczne różnice pomiędzy poszczególnymi regionami kraju. Według danych z roku 2018, najwyższą zachorowalność rejestrowano w województwie lubelskim (23,4/100 000) i śląskim (18,6/100 000), najniższą zaś - w województwie wielkopolskim (8,0/100 000) i podlaskim (7,3/100 000). Podobnie jak w innych krajach, częściej chorują mężczyźni (około dwukrotnie częściej niż kobiety), głównie z uzależnieniami (nikotynizm, choroba alkoholowa). Ryzyko zachorowania wzrasta z wiekiem, około 50% nowych przypadków rozpoznaje się u osób w wieku od 45 do 64 lat, natomiast wśród dzieci (do 14 lat) - około 1%. Zgodnie z danymi Krajowego Rejestru Zachorowań na Gruźlicę, których źródłem były rejestry laboratoryjne, w 2018 roku MDR-TB rozpoznano u 48 chorych. Umieralność systematycznie się obniża: w 2009 roku współczynnik wynosił 2,0/100 000, natomiast w roku 2017: 1,3/100 000 [5].

2.2. Czynniki etiologiczne

Jak wspomniano, najczęstszą przyczyną gruźlicy płuc u ludzi są prątki *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Bakterie te zostały opisane po raz pierwszy przez Roberta Kocha w roku 1882 (dlatego potocznie nazywane są prątkami Kocha). Należą one do najstarszych patogenów znanych ludzkości, ich ślady wykryto w liczących kilka tysięcy

lat szczątkach ludzkich [6, 7]. Rodzaj *Mycobacterium* obejmuje ponad 190 gatunków [8, 9]. Zostały one zaklasyfikowane do trzech grup [10]:

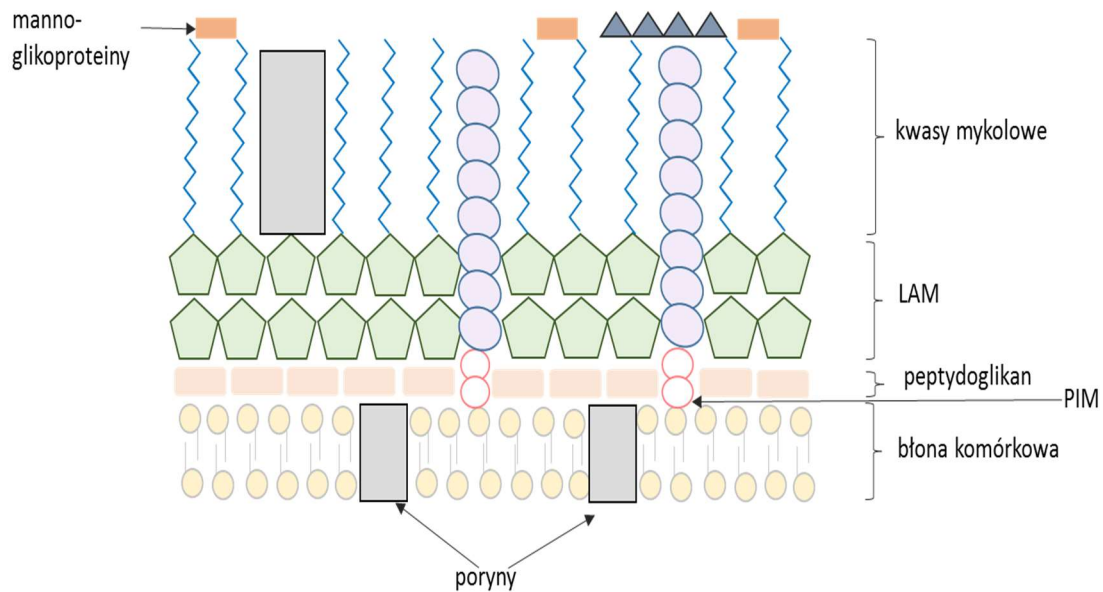
- 1) prątki wywołujące gruźlicę u ludzi i zwierząt (MTC - *Mycobacterium tuberculosis* complex), w skład, której wchodzi: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. orygis*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. mungi*,
- 2) prątki wywołujące trąd: *Mycobacterium leprae*,
- 3) prątki niegruźlicze (ang. non-tuberculous mycobacteria NTM): m.in. *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. goodii*, *M. avium-intracellulare*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*

Prątki Mtb odpowiedzialne są najczęściej za rozwój gruźlicy w postaci płucnej, jednak w konsekwencji rozprzestrzeniania się bakterii drogą krwionośną, choroba może przybrać postać pozapłucną (gruźlica ośrodkowego układu nerwowego, układu limfatycznego, kostno-stawowego) [11]. Postać uogólniona (rozsiana) zwana jest gruźlicą prosówkową, prosowatą lub prosówką. Do zakażeń innymi drobnoustrojami MTC stosunkowo rzadko dochodzi u osób z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym, częściej zaś u osób z zaburzeniami odporności [12, 13].

Mycobacterium tuberculosis jest aerobowym, wewnątrzkomórkowym patogenem. Dzięki specyficznej trójwarstwowej budowie ściany komórkowej (ryc. 2), wykazuje kwasooporność. Rdzeń tej struktury stanowią: peptydoglikan związany kowalencyjnie z arabinogalaktanem oraz kwasy mykolowe. Związki te tworzą kompleks zwany mAGP (ang. mycolyl arabinogalactan-peptidoglycan complex). Zewnętrzną warstwę stanowią łatwe do ekstrakcji związki lipidowe o różnej długości łańcucha: glikolipidy, sulfolipidy, glikopeptydolipidy, lipooligosacharydy, lipoarabinomannan, fosfolipidy, triglicerydy i inne [14].

W skład ściany komórkowej prątków wchodzi blisko 60% związków lipidowych, których skład chemiczny zależy od gatunku. Związki o właściwościach antygenowych, jak np. mannozylowany lipoarabinomannan (ManLAM), lipomannan (LM) czy fosfatydyloinozytolomannany (PIM) (ryc. 2), indukują wytwarzanie cytokin prozapalnych i wykazują działanie chemotaktyczne [15]. U prątków wolnorosnących (m.in. *M. tuberculosis*, *M. avium* oraz *M. bovis*), ManLAM złożony jest z głównie z rdzenia węglowodanowego w skład którego wchodzi D-mannoza i D-arabinoza oraz mannosylofosfatydyloinozytol (MPI). Prątki szybko rosnące (np. *M. smegmatis*)

syntezują LAM z przyłączonymi resztami fosfatydyloinozytolu (PILAM), jak również pozbawiony podstawników (AraLAM) [16].



Ryc. 2. Schemat budowy ściany komórkowej prątków (wg Kleinnijenhuis i wsp. [17], zmodyfikowano).

Do czynników wirulencji, które umożliwiają bakteriom wniknięcie, przetrwanie i namnażanie się wewnątrz komórek gospodarza, należą zarówno struktury związane z komórką, jak i wydzielane na zewnątrz. Główne czynniki zjadliwości prątków gruźlicy oraz mechanizmy ich działania przedstawiono w tabeli 1.

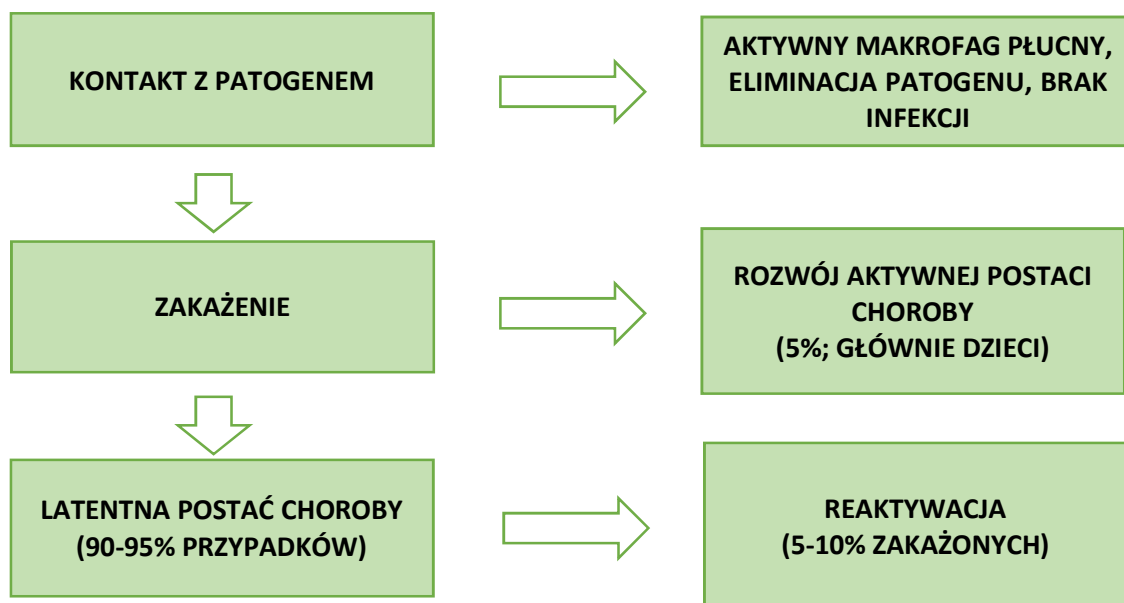
Tabela 1. Czynniki wirulencji i immunomodulacji *Mycobacterium tuberculosis* wg Sakamoto i wsp. [18], Sanchez i wsp. [19].

	Czynnik wirulencji	Mechanizm działania
Białka rozpuszczalne	katalaza-peroksydaza-peroksynitryaza (KatG)	ochrona przed działaniem reaktywnych form tlenu i azotu
	reduktaza tlenu azotu (noxR3)	ochrona przed działaniem reaktywnych form azotu
	antygen 85 (kompleks białek 85A, 85B oraz 85C), związane również z powierzchnią komórki	ułatwianie związania się z powierzchnią makrofaga
	lipoproteina o masie 19 kDa	hamowanie ekspresji cząsteczek MHC klasy II, indukcja apoptozy makrofagów we wczesnym etapie infekcji
	białko Erp (ang. exported repetitive protein)	ułatwienie wewnątrzkomórkowego namnażania się prątków

	kompleks białek ESAT-6/CFP-10 (ang. 6 kDa early secretory antigenic target/10 kDa culture filtrate antigen)	stymulacja limfocytów T, hamowanie przekaźnictwa sygnału z udziałem TLR-2, formowanie porów w błonie komórkowej, hamowanie wydzielania reaktywnych form tlenu przez makrofagi
Komponenty ściany komórkowej	peptydoglikan	stymulacja wydzielania cytokin takich jak TNF α , IL-1 czy IL-6
	fosfatydyloinozytolomannozydy (PIM)	indukcja wytwarzania cytokin prozapalnych przez interakcje z receptorem TLR-2
	lipoarabinomannan (LAM)	hamowanie dojrzewania komórek dendrytycznych, hamowanie fuzji fagosomu z lizosomem, nasilenie ekspresji TNF α oraz IL-10
	mannozyłowany lipoarabinomannan (ManLAM)	hamowanie dojrzewania komórek dendrytycznych, hamowanie fuzji fagosomu z lizosomem
	kwasy mykolowe	niezbędne w celu przeżycia w ziarniniakach (granuloma), formowanie biofilmu
	Dimikolinian trehalozy (TDM, czynnik wiążkowy)	hamowanie migracji wielojądrzastych leukocytów i inicjacja tworzenia ziarniniaków, uszkodzenie błon mitochondrium komórek zakażonych, indukcja apoptozy
	białka szoku cieplnego (ang. heat shock protein, HSP)	aktywacja limfocytów, indukcja syntezy czynników prozapalnych, ochrona prątków przed aktywnymi formami tlenu

2.3. Przebieg zakażenia

Szacuje się, że około 1/3 populacji ludzkiej miała kontakt z *Mycobacterium tuberculosis*. Aktywna postać choroby rozwija się jednak tylko u około 10% osób zakażonych [20], na co wpływ mają przede wszystkim uwarunkowania genetyczne, a w mniejszym stopniu warunki środowiskowe [21]. Potwierdzać to może przypadek z 1926 roku, kiedy to 251 niemowląt zostało przypadkowo zakażonych Mtb. Czterdzieści siedmiu z nich nie zachorowało, a wśród 204, u których doszło do rozwoju gruźlicy, 77 zmarło [22]. Również badania bliźniąt zdają się potwierdzać kluczową rolę czynników dziedzicznych. Comstock, analizując dane opublikowane przez Simonds, wykazał, iż infekcja Mtb występuje dwukrotnie częściej u obojga bliźniąt jednojajowych w porównaniu z dwujajowymi [23, 24]. Z drugiej jednak strony, Van der Eijk i wsp., na podstawie analizy tych samych danych, sugerują, że uwarunkowania środowiskowe znacząco wpływają na ryzyko zachorowania [25].



Ryc. 3. Możliwe warianty przebiegu zakażenia prątkami Mtb (wg Rudnickiej [26], zmodyfikowano).

Do zakażenia, którego źródłem są najczęściej chorzy, dochodzi głównie drogą wziewną [27]. Niekiedy następuje całkowita eliminacja bakterii (ryc. 3), a test tuberkulinowy pozostaje ujemny, jednak u około 10% zakażonych osób (najczęściej o obniżonej odporności), aktywna postać choroby może rozwinąć się wkrótce po infekcji [26]. W 90-95% przypadków, zakażenie jest kontrolowane przez układ odpornościowy i przechodzi w fazę latentną, jednak niekiedy, w niesprzyjających warunkach, może nastąpić jego reaktywacja (ryc. 3). W pierwszym etapie infekcji, bakterie przedostające się do płuc, zostają pochłonięte w procesie fagocytozy przez makrofagi pęcherzykowe bądź komórki dendrytyczne (ang. dendritic cells, DC). W procesie tym uczestniczą receptory PRR (ang. pattern recognition receptors) rozpoznające wzorce cząsteczkowe związane z patogenami (ang. pathogen-associated molecular patterns, PAMP), m.in. receptory Toll-podobne (ang. Toll-like receptors, TLR), czy receptor mannozowy (ang. mannose receptor, MR), odpowiedzialne za rozpoznanie komponentów ściany komórkowej prątków. Głównymi antygenami *M. tuberculosis* rozpoznawanymi przez komórki immunokompetentne są białka szoku cieplnego HSP (m.in. białko o masie 65 kDa, HSP-65), lipoproteiny, kompleks antygenów p85, enzymy (dehydrogenaza L-alaniny o masie cząsteczkowej 40 kDa, dysmutaza ponadtlenkowa o masie 23 kDa) oraz mannozylowany lipoarabinomannan (ManLAM). Makrofagi przyczyniają się do eliminacji bakterii poprzez wytwarzanie reaktywnych form tlenu, azotu

i wewnątrzkomórkowe zabijanie. Fuzja fagosomu z lizosomem prowadzi do zakwaszenia środowiska wewnątrz powstającego fagolizosomu, co umożliwia działanie enzymom proteolitycznym i eliminację bakterii u osób, których makrofagi płucne są wystarczająco aktywne. Genetycznie uwarunkowana zdolność syntezy i uwalniania znacznych ilości interferonu γ (IFN γ), zaangażowanego w aktywację makrofagów ma kluczowe znaczenie na początku infekcji [28, 29]. Zazwyczaj jednak, prątki namnażają się wewnątrz tych komórek, doprowadzając do rozwoju lokalnej reakcji zapalnej i uwalniania cytokin, takich jak czynnik martwicy guza TNF α (ang. tumor necrosis factor α) czy interleukiny 8 (IL-8) [30]. Powoduje to napływ do miejsca zakażenia makrofagów powstałych z monocytów krwi obwodowej oraz komórek dendrytycznych. DC jako komórki prezentujące antygen (ang. antigen presenting cells, APC) pochłaniają prątki, migrują do lokalnych węzłów chłonnych i aktywują limfocyty T. Rozpoczyna to rozwój nabytej odporności komórkowej. Uczulone limfocyty T proliferują i migrują do miejsca infekcji. Ich obecność i synteza INF γ działa na makrofagi, aktywując ich bójcze właściwości [31]. Napływ komórek układu odpornościowego: makrofagów, limfocytów T i B oraz DC powoduje utworzenie charakterystycznej w przebiegu choroby struktury zwanej ziarniniakiem (inaczej granuloma) [32], na zewnątrz otoczonej przez fibroblasty [30]. Wewnątrz ziarniniaka, głównie z powodu ograniczenia dostępu tlenu, niskiego pH oraz obecności inhibitorów syntezy kwasów tłuszczowych, komórki prątków nie mogą się namnażać, jednak pozostają w stanie uśpienia [33]. W tym czasie, zakażenie jest kontrolowane przez organizm i przechodzi w fazę latencji. Jak wspomniano, szacuje się, że postać latentna gruźlicy występuje u około 1/3 populacji [34]. Do reaktywacji zakażenia (infekcja wtórna) może dojść nawet po wielu latach od zakażenia pierwotnego. W przypadku obniżenia odporności (np. zakażenie HIV), gdzie obserwuje się niedobór limfocytów T i niski poziom INF γ , makrofagi nie są wystarczająco aktywne, aby wyeliminować bakterie. Zauważono również, że leczenie inhibitorami TNF α sprzyja uaktywnieniu choroby [30]. Wynikiem hamowania aktywności tej cytokiny jest między innymi rozluźnienie struktury granuloma. Następuje jej upłynnienie, co umożliwia intensywne namnażanie się prątków.

Objawy aktywnej gruźlicy często nie są swoiste, dlatego choroba może być mylona z innymi: występują zmęczenie, gorączka, osłabienie, utrata wagi. Sygnałem do podjęcia jak najszybszej diagnostyki w kierunku zakażenia Mtb, powinny być: utrzymujący się

dłużej niż 3 tygodnie kaszel (możliwe też krwiopłucie), chudnięcie, brak apetytu, nocna potliwość, ból w klatce piersiowej, gorączka i dreszcze [35].

2.4. Interakcje układu odpornościowego z komórkami bakteryjnymi w zakażeniach *Mycobacterium tuberculosis*

W odpowiedzi na zakażenie prątkami uczestniczą różnorodne czynniki, zarówno związane z komórkami (powierzchniowe oraz wewnątrzkomórkowe), jak i rozpuszczalne. Pierwszy kontakt z Mtb następuje najczęściej w układzie oddechowym, tak więc komórki odpowiedzialne za rozpoznanie prątków gruźlicy to głównie makrofagi płucne oraz komórki dendrytyczne. Właściwości aglutynacyjne i opsonizacyjne ułatwiające fagocytozę mają rozpuszczalne czynniki odporności wrodzonej syntezowane przez komórki układu oddechowego (kolektyny surfaktantu płucnego A i D, fikolina-3), przez hepatocyty (lektyna wiążąca mannozę MBL, fikolina-2 i fikolina-3) oraz neutrofile (fikolina-1) [36, 37]. Część z nich występuje w surowicy, a niektóre z nich posiadają zdolność aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej (MBL i fikoliny). Zidentyfikowano stosunkowo liczne struktury na powierzchni komórek *Mycobacterium* rozpoznawane przez wymienione czynniki odporności [38-40].

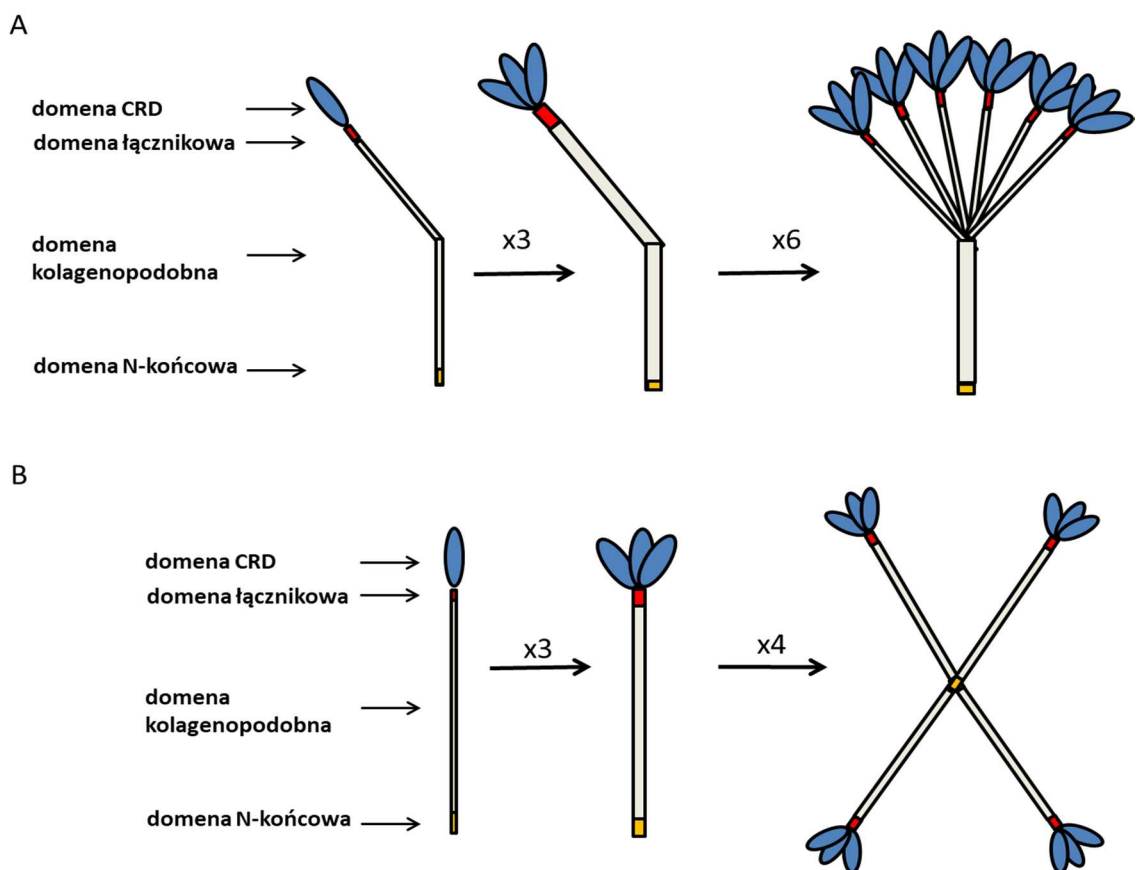
2.4.1. Kolektyny

Kolektyny to rodzina białek, należących do lektyn typu C (ang. calcium-requiring), których aktywność zależna jest od kationów wapniowych. Jej przedstawicielami są: lektyna wiążąca mannozę (ang. mannose-binding lectin, MBL), białka surfaktantu płucnego A i D (ang. surfactant protein-A, -D; SP-A, SP-D), kolektyna wątrobowa 1 (ang. collectin liver 1, CL-L1) zwana także kolektyną 10 (CL-10), kolektyna nerkowa 1 (ang. collectin kidney 1, CL-K1) (inaczej: kolektyna 11, CL-11), kolektyna łożyskowa (ang. collectin placenta 1, CL-P1), określana także jako kolektyna 12 (CL-12), konglutynina, kolektyna o masie 43 kDa (CL-43) oraz kolektyna o masie 46 kDa (CL-46). Lektyna wiążąca mannozę u człowieka i szympansa występuje w jednej natomiast u większości ssaków - w dwóch formach (A i C), za syntezę których odpowiadają odrębne geny [41]. Konglutynina, CL-43 oraz CL-46 są charakterystyczne dla *Bovidae* [41, 42].

Kolektyny mają postać oligomerów podjednostek, z których każda zbudowana jest z trzech, zazwyczaj identycznych łańcuchów polipeptydowych [43]. W skład cząsteczki

wchodzi od 2 do 8 podjednostek. W łańcuchu polipeptydowym wyróżnia się cztery regiony/domeny (ryc. 4):

- 1) region N-końcowy bogaty w reszty cysteiny, nazwany regionem cysteinowym
- 2) region o strukturze podobnej do kolagenu, zwany kolagenopodobnym, w skład którego wchodzi powtórzenia Gly-X-Y (ich liczba jest różna dla różnych kolektywnych), charakterystyczne dla kolagenu, gdzie X i Y oznaczają dowolne aminokwasy, przy czym zazwyczaj są to prolina i hydroksyprolina
- 3) region łącznikowy „neck” o strukturze α -helisy, łączący region kolagenowy z domeną lektynową oraz stabilizujący wiązania pojedynczych łańcuchów w podjednostce
- 4) region lektynowy, znajdujący się na końcu C, określany, jako domena rozpoznająca węglowodany (ang. carbohydrate-recognition domain, CRD), odpowiedzialny za rozpoznawanie i wiązanie ligandów, w obecności jonów Ca^{2+} ; fragment ten ma strukturę globularną



Ryc. 4. Schemat budowy kolektywnych białek na przykładzie lektyny wiążącej mannozę (MBL) i białka surfaktantu płucnego SP-A (A) oraz białka surfaktantu płucnego SP-D (B), według Gupty i wsp. oraz Wright i wsp. [43, 44], zmodyfikowano.

Reszty cysteiny wchodzące w skład regionu N-końcowego, dzięki tworzeniu mostków disiarczkowych stabilizują trimery w oligomerze podjednostek. Splecione fragmenty łańcuchów o strukturze podobnej do kolagenu tworzą stabilną domenę, stosunkowo oporną na działanie proteaz [45]. W przypadku białek posiadających zdolność aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej, jest ona odpowiedzialna za tworzenie kompleksów z proteazami MASP (ang. MBL-associated serine proteases). Ciągłość powtórzeń Gly-X-Y w przypadku białek MBL oraz SP-A jest zaburzona, co powoduje ugięcie regionu kolagenowego (ryc. 4) [43, 44]. Powoduje to rozsuniecie domen CRD w oligomerze, a co za tym idzie, powiększenie rozmiarów fragmentu cząsteczki odpowiedzialnego za wiązanie ligandów. Kształt takiej molekuly przypomina „bukiet tulipanów” [46]. Kolektyny jako czynniki odporności wrodzonej biorą udział we wczesnej fazie odpowiedzi na zakażenie, dzięki rozpoznawaniu szerokiego spektrum wirusów, bakterii, grzybów oraz pierwotniaków [47-50].

Wykazują one zdolność aglutynowania i/lub opsonizowania, czynników zakaźnych, co nasila proces fagocytozy. Niektóre z nich, tworząc jak wspomniano wyżej, kompleksy z MASP, mogą inicjować aktywację dopełniacza na drodze lektynowej. Kolektyny mogą również wykazywać właściwości immunomodulujące, wpływając hamująco bądź stymulująco na produkcję czynników prozapalnych oraz przeciwzapalnych przez komórki układu odpornościowego [41, 43].

2.4.1.1. Lektyna wiążąca mannozę – MBL

2.4.1.1.1. Struktura i swoistość MBL

Lektyna wiążąca mannozę (MBL), określana jest także jako lektyna wiążąca mannan, białko wiążące mannozę lub białko wiążące mannan [51]. Cząsteczki ludzkiej MBL składają się najczęściej z 6 podjednostek (18 łańcuchów polipeptydowych), jednakże spotykane są również formy o niższym stopniu oligomeryzacji, tak więc ich masa cząsteczkowa może wynosić od ok. 200 kDa do ok. 600 kDa [52].

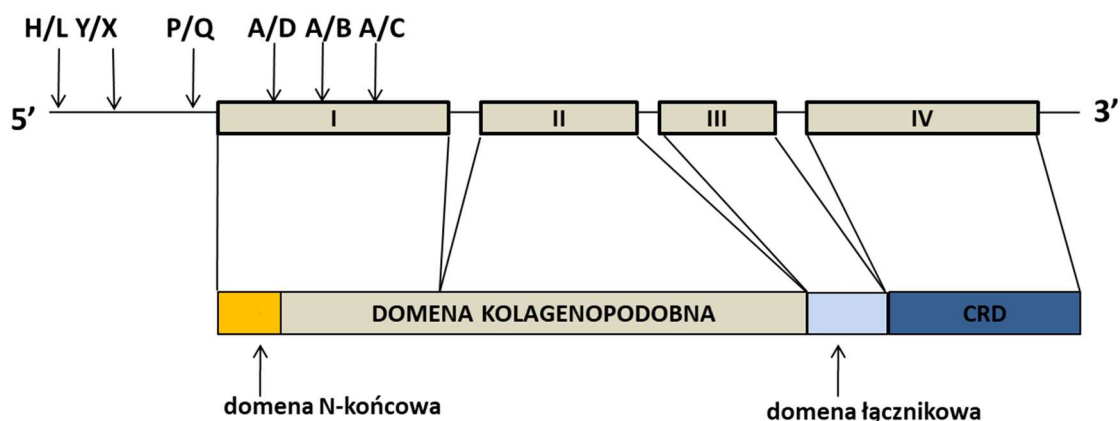
MBL wykazuje powinowactwo do reszt cukrów takich jak D-mannoza (D-Man), N-acetylo-D-glukozamina (D-GlcNAc), N-acetylo-D-mannozamina (D-ManNAc) i L-fukoza (L-Fuc), stanowiących składniki struktur powierzchniowych wielu patogenów [53-56]. Rozpoznaje komórki bakterii Gram-dodatnich (ligandem jest np. peptydoglikan), Gram-ujemnych (np. lipopolisacharyd, LPS), grzybów (mannany) i pierwotniaków (glikoproteiny eksponowane w błonie komórkowej), jak również osłonki wirusów [48, 49, 57]. Oddziaływanie omawianego białka z antygenami

Mycobacterium opisane zostało w podrozdziale 2.4.3. Poza strukturami PAMP, MBL rozpoznaje ligandy endogenne, jak na przykład antygeny komórek ulegających apoptozie lub nekrozie, dzięki czemu uczestniczy w ich eliminacji [58, 59].

Lektyna wiążąca mannozę wykazuje właściwości immunomodulujące. Zaobserwowano, że białko to, zależnie od dawki, wpływa na profil cytokinowy monocytów i przebieg procesów zapalnych w trakcie zakażenia [60]. Opisano również działanie MBL jako koreceptora dla kompleksu TLR-2/TLR-6, dzięki któremu następuje nasilenie aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (ang. nuclear factor kappa B), skutkujące nasileniem ekspresji cytokin prozapalnych w odpowiedzi na zakażenie *Staphylococcus aureus* [61].

2.4.1.1.2. Gen *MBL2* i ekspresja lektyny wiążącej mannozę

Za syntezę lektyny wiążącej mannozę odpowiedzialny jest gen *MBL2*, zlokalizowany na chromosomie 10, w regionie 10q21.1 [62]. Obejmuje on cztery eksony, z których pierwszy koduje region nieulegający translacji końca 5' (ang. 5'-untranslated region, 5'-UTR), region N-końcowy oraz część regionu kolagenopodobnego, drugi - pozostały fragment regionu kolagenopodobnego, trzeci - region „neck”, natomiast czwarty - domenę wiążącą węglowodany (CRD) i fragment 3'-UTR (ryc. 5). Synteza MBL zachodzi głównie w hepatocytach, jednak obecność swoistego mRNA stwierdzono również w szpiku kostnym, jelicie cienkim, żołądku, jądrze oraz jajniku [63-66]. Białko to występuje przede wszystkim w surowicy, ale wykryto je również w płynie mózgowordzeniowym [67], mleku [68] i popłuczynach oskrzelowo-płucnych [69].



Ryc. 5. Schemat organizacji genu *MBL2* oraz dojrzałej cząsteczki MBL. Zaznaczono miejsca występowania wybranych polimorfizmów zlokalizowanych w regionie promotorowym oraz eksonie 1 (opisano niżej) (według Garred i wsp. [70], zmodyfikowano).

Niektóre z opisanych polimorfizmów genu *MBL2* mają udokumentowany wpływ na stężenie białka w surowicy i jego aktywność, a w konsekwencji także znaczenie kliniczne. Trzy z nich, zlokalizowane w kodonach 52, 54 oraz 57 eksonu 1, wpływają na strukturę domeny kolagenowej (tabela 2).

Tabela 2. Wybrane polimorfizmy genu *MBL2* mające wpływ na stężenie MBL w surowicy [71].

Lokalizacja	Pozycja i zamiana nukleotydu	Numer referencyjny	Zamiana aminokwasu w cząsteczce białka
Region promotorowy	-550 (G>C)	rs11003125	-
	-221 (C>G)	rs7096206	-
Ekson 1 (5'-UTR)	+4 (C>T)	rs7095891	-
Ekson 1 (część kodująca)	+223 (C>T)	rs5030737	Arg52Cys
	+230 (G>A)	rs1800450	Gly54Asp
	+239 (G>A)	rs1800451	Gly57Glu

Zmienione allele najczęściej określa się odpowiednio, jako D, B oraz C lub wspólnie, jako O, natomiast formy niezmienione - jako A. Obecność alleli O powoduje, że syntezowane jest białko o obniżonej aktywności. Zaburzenie struktury łańcucha peptydowego prowadzi do upośledzenia procesu oligomeryzacji, co skutkuje mniejszą liczbą miejsc wiązania ligandów w cząsteczce i utrudnieniem tworzenia kompleksów z MASP [59]. Defektywne molekuly są również bardziej wrażliwe na działanie endogennych proteaz. Skutkuje to szybszą ich eliminacją i w związku z powyższym – niższym stężeniem MBL w surowicy. Znaczący wpływ na ekspresję genu *MBL2* (a w konsekwencji także na poziom jego produktu w krwiobiegu), mają polimorfizmy regionu promotorowego, w pozycjach -550, -221, zwyczajowo nazywane odpowiednio: H/L, Y/X oraz regionu nieulegającego translacji końca 5' eksonu 1 (5'-UTR) w pozycji +4 (P/Q) (tabela 2). Ze względu na nierównowagę sprzężeń, najczęściej opisuje się występowanie siedmiu haplotypów *MBL2* (tzw. „common haplotypes”): HYPA, LYQA, LYPA, LXPA, LYPB, HYPD, LYQC [72]. Obserwowano jednak również, w nielicznych przypadkach, inne warianty, takie jak: LYPD, LYQB, HXPA, czy HYPB [73]. Najwyższe stężenia MBL występują zazwyczaj u osób o genotypach określanych zbiorczo jako YA/YA (HYA/HYA, HYA/LYA, LYA/LYA) oraz YA/XA (HYA/LXA, LYA/LXA). Wartości pośrednie najczęściej związane są z genotypami XA/XA i YA/O

(gdzie O oznacza allel D, B lub C), natomiast niedobór MBL – z genotypami XA/O i O/O [52].

Częstość występowania wariantów D/B/C jest różna w różnych populacjach czy grupach etnicznych. W krajach azjatyckich (Chiny, Japonia) czy wśród rdzennych mieszkańców Ameryki Południowej i Australii, opisywany jest jedynie allel B (SNP zlokalizowany w kodonie 54). Skrajnym przykładem są Indianie Quechua, gdzie wariant ten występuje z częstością 0,8. W populacjach afrykańskich, najczęściej obserwowany jest wariant polimorficzny C (SNP zlokalizowany w kodonie 57) [najwyższą częstość (0,32) zanotowano w Ghanie], natomiast warianty B oraz D (SNP w kodonie 52) występują stosunkowo rzadko lub nie są wykrywane [73]. Wśród przedstawicieli odmiany kaukaskiej (np. u Europejczyków) najczęściej występuje allel B (częstość >0,1, np. w Polsce: 0,14), dwu-trzykrotnie rzadziej obserwuje się obecność allelu D (w populacji polskiej: 0,06), natomiast z najniższą częstością (odpowiednio: 0,015) – wariantu C [74, 75]. Ostatnio opisano sześć innych polimorfizmów +396 A>C (rs1013124), +474 A>G, (rs7084554), +487 A>G (rs36014597), +753 C>T (rs11003123), +5411 C>T (rs2165813) i +5537 G>T (rs2099903), które wpływają na ekspresję i funkcjonalność omawianej lektyny [76].

Stężenie MBL w surowicy zdrowych osób dorosłych wynosi od <10 ng/ml do >10000 ng/ml (średnio około 1000 ng/ml), niezależnie od płci. Zmienia się ono w trakcie rozwoju osobniczego, osiągając maksymalny poziom około 1 miesiąca po urodzeniu, następnie powoli obniża się, aby osiągnąć stały poziom w wieku około 12 lat [77, 78].

Jak wspomniano, niektóre polimorfizmy genu *MBL2* mają istotny wpływ na stężenie MBL w surowicy. Z drugiej strony obserwuje się znaczne (nawet kilkudziesięciokrotne) różnice pomiędzy osobami o identycznych genotypach [79]. Wynikać to może z faktu, że na ekspresję MBL wpływają niektóre hormony np. hormony tarczycy T3 i T4, hormon wzrostu [80], czy insulina. Ponadto, w jej regulacji uczestniczyć może interleukina 6 (IL-6) [81]. Dowiedziono również, że na zwiększoną ekspresję tej lektyny mogą mieć wpływ niektóre leki oraz szok termiczny, natomiast efekt przeciwny spowodowany jest działaniem interleukiny 1 (IL-1) [82]. Prawdopodobnie, wymienione czynniki nie powodują jednak tak znaczących różnic osobniczych stężenia lektyny wiążącej mannozę w surowicy.

2.4.1.1.3. Znaczenie kliniczne MBL i polimorfizmów genu *MBL2*

Lektyna wiążąca mannozę (także polimorfizmy genu kodującego to białko) jest najszerzej analizowanym pod względem znaczenia klinicznego czynnikiem aktywacji

dopełniacza na drodze lektynowej. W licznych publikacjach wykazano związek niedoboru MBL z podatnością na zakażenia czy niektóre choroby o podłożu nieinfekcyjnym, jak również niekorzystny wpływ jej wysokiej aktywności w niekontrolowanym rozwoju reakcji zapalnej. Należy jednak podkreślić, że dostępne w literaturze dane są niekiedy sprzeczne, co wynikać może między innymi z różnego definiowania niedoboru, różnych liczebności grup badanych i porównawczych czy różnic etnicznych. Niedobór lektyny wiążącej mannozę jest związany z nawracaniem niektórych zakażeń, szczególnie u dzieci i osób z innymi zaburzeniami odporności. Wyższą częstość występowania alleli „O” obserwowano na przykład u dzieci z nawracającymi infekcjami układu oddechowego [83]. Znacząco wyższe ryzyko infekcji pneumokokami zanotowano u dzieci będących nosicielami genotypów determinujących niski poziom MBL w surowicy (LXA/O lub O/O) [84]. Zakażenia *Streptococcus pneumoniae* mogą charakteryzować się ciężkim przebiegiem również u dorosłych [84] także pod postacią zapalenia opon mózgowych [85]. Niskie stężenie MBL sprzyja rozwojowi zakażeń szpitalnych u dzieci po zabiegach korekcji wad serca, z drugiej jednak strony, wydaje się chronić pacjentów przed rozwojem systemowej reakcji zapalnej (ang. systemic inflammatory response syndrome, SIRS) po operacji [86]. U dorosłych, u których rozpoznano zapalenie płuc o różnej etiologii, niskie stężenia MBL i/lub genotyp O/O częściej związane są z cięższym przebiegiem choroby i fatalnymi rokowaniami [87, 88]. Jak wspomniano, niedobór MBL może odgrywać szczególnie ważną rolę u osób z innymi zaburzeniami odporności. U chorych na białaczkę, poddawanych chemioterapii, u których oznaczono niski poziom tej lektyny w surowicy (<500 ng/ml), częściej dochodziło do rozwoju bakteriemii i zapalenia płuc [89]. Genotypy A/O oraz O/O u biorców przeszczepów allogenicznego szpiku kostnego związane były z wysoką częstością infekcji bakteryjnych, wirusowych i grzybiczych [90]. Ostatnie badania prowadzone w Pracowni Immunobiologii Zakażeń IBM PAN, obejmujące pacjentów, u których rozpoznano szpiczaka plazmatycznego (mnogiego) lub chłoniaki, leczonych za pomocą chemioterapii i przeszczepów autologicznych komórek krwiotwórczych wykazały, że pierwotny niedobór lektyny wiążącej mannozę nasila ryzyko rozwoju ciężkich, zagrażających życiu zakażeń, jedynie po odtworzeniu czynności fagocytów [91].

2.4.1.2. Kolektyny surfaktantu płucnego

Surfaktant płucny jest mieszaniną związków składającą się z około 90% lipidów i około 10% białek, syntezowanych w pneumocytach typu II [92]. Jego rola polega na kontroli

napięcia powierzchniowego pęcherzyków płucnych, co umożliwia utrzymanie ich objętości. Stanowi także barierę ograniczającą transfer cząstek przez błonę pęcherzykowo-włośniczkową oraz przyczynia się do neutralizacji drobnoustrojów wnikających drogą oddechową. Do białek surfaktantu (ang. surfactant proteins, SP) zalicza się hydrofobowe SP-B i SP-C, które pełnią kluczową rolę w utrzymaniu stabilności filmu fosfolipidowego surfaktantu [93] oraz hydrofilowe kolektyny SP-A i SP-D, będące czynnikami odporności wrodzonej [94]. Podobnie jak w przypadku MBL, cząsteczki kolektyń płucnych są oligomerami podjednostek, z których każda stanowi trimer łańcuchów polipeptydowych. Białka te ułatwiają eliminację drobnoustrojów dzięki ich opsonizacji, aglutynacji oraz oddziaływaniu z receptorami powierzchniowymi komórek odpornościowych, co wpływa na procesy fagocytozy, wydzielania reaktywnych form tlenu oraz cytokin [92, 95]. Na przykład, SP-A hamuje wydzielanie tlenu azotu przez makrofagi stymulowane LPS, natomiast nasila ten proces, gdy komórki stymulowane są za pomocą interferonu- γ (IFN- γ) [96]. SP-A i SP-D uczestniczą także w usuwaniu komórek ulegających apoptozie i nekrozie [97, 98].

2.4.1.2.1. Białko surfaktantu płucnego A (SP-A) - struktura i swoistość

Masa cząsteczkowa pojedynczego łańcucha SP-A, zbudowanego z 248 reszt aminokwasowych (AA) wynosi 35 kDa [94]. Trimery łańcuchów stabilizowane są za pomocą wiązań disiarczkowych, zlokalizowanych w N-końcowej części podjednostki. Dojrzałe białko SP-A występuje najczęściej jako heksamer podjednostek (18 łańcuchów), o łącznej masie ok. 630 kDa (ryc. 4). Występuje ono w dwóch formach o wysokiej homologii (ich sekwencje różnią się zaledwie 10 aminokwasami) SP-A1 oraz SP-A2, kodowanych przez odrębne geny (odpowiednio, *SFTPA1* i *SFPTA2*). Podjednostki białka mogą mieć charakter homo- lub heterotrimerów, najczęściej składają się na nie dwa łańcuchy SP-A1 oraz jeden SP-A2 [99]. Mimo podobieństwa strukturalnego, formy te wykazują pewne różnice właściwości. SP-A1 może tworzyć struktury o większym stopniu oligomeryzacji, dzięki obecności dodatkowej reszty cysteiny w pozycji 85.

Białka surfaktantu płucnego typu A rozpoznają reszty cukrów, takie jak: N-acetylo-D-mannozamina (D-ManNAc), L-fukoza (L-Fuc), D-maltoza (D-Mal), D-glukoza (D-Glc), N-acetylo-D-glukozamina (D-GlcNAc), D-mannoza (D-Man) oraz N-acetylo-D-galaktozamina (D-GalNAc) [100], jednak powinowactwo obu form do

różnych ligandów nieco się różni. SP-A2 wykazuje wyższe niż SP-A1 powinowactwo do N-acetylowanych pochodnych glukozy i galaktozy, a także silniej stymuluje makrofagi do wydzielania TNF- α i fagocytozy [101, 102]. Omawiana kolektyna rozpoznaje struktury powierzchniowe takich drobnoustrojów jak *Streptococcus pneumoniae*, paciorkowce należące do grup A i B czy *Hemophilus influenzae*. Wiąże również niektóre lipopolisacharydy „szorstkich” form bakterii Gram-ujemnych, np. *Escherichia coli* J5. Białko to wykazuje powinowactwo do wielocukrów otoczkowych *Klebsiella pneumoniae* (szczep K21a), co umożliwia aglutynację komórek i ułatwia ich fagocytozę przez makrofagi [103].

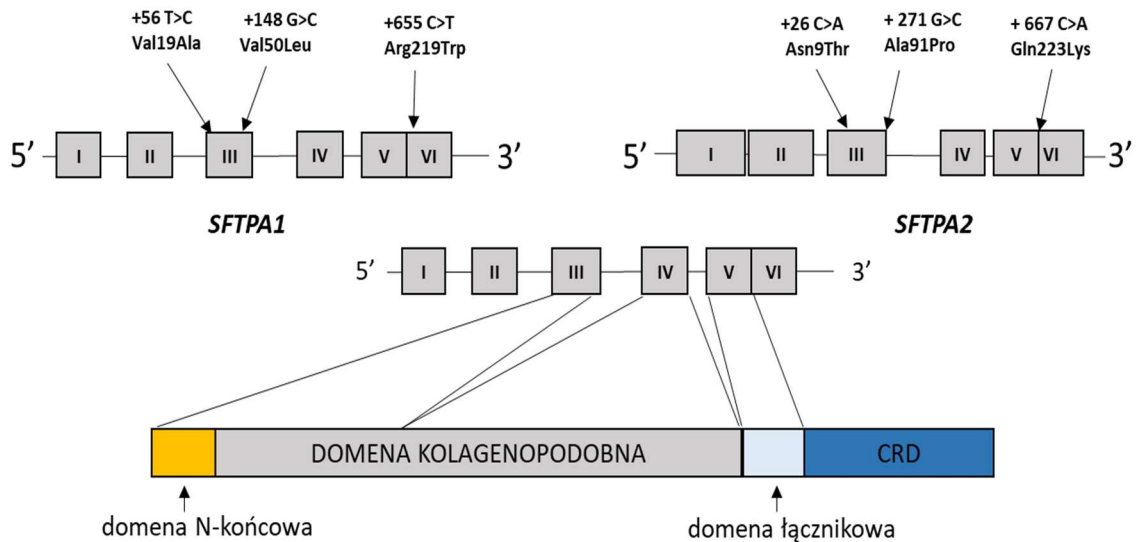
SP-A rozpoznaje ponadto glikoproteiny *Pneumocystis carinii* [104], a także konidia *Aspergillus fumigatus*, co także skutkuje aglutynacją i nasileniem pochłaniania komórek/zarodników tych drobnoustrojów przez fagocyty [37]. Białko to w regionie CRD zawiera reszty sialowe, które dzięki interakcji z wirusem grypy A H1N1, powodują zahamowanie ich rozprzestrzeniania, a w konsekwencji skuteczne usuwanie ich przez makrofagi pęcherzykowe i neutrofile [105]. Ma ponadto zdolność wiązania glikoprotein na powierzchni wirionów wirusa RS (ang. respiratory syncytial virus, RSV) [106]. Za wymienione oddziaływania odpowiedzialny jest region CRD (domena lektynowa) [107], jednak wiązanie SP-A do powierzchni wirusa Herpes simplex (HSV) odbywa się przez region N-końcowy kolektyny [108]. Oddziaływanie omawianego białka z antygenami *Mycobacterium* opisane zostało w podrozdziale 2.4.3.

2.4.1.2.2. Geny kodujące SP-A (*SFTPA1* oraz *SFTPA2*) i ekspresja białek SP-A1 oraz SP-A2

Geny kodujące SP-A1 oraz SP-A2 zlokalizowane są na długim ramieniu chromosomu 10, w regionie 10q22.3, w sąsiedztwie opisanego wyżej genu *MBL2*. Wysoka homologia (98%) (ryc. 6), sugeruje, że powstały one w wyniku duplikacji jednego genu [109]. Dodatkowo, pomiędzy nimi znajduje się pseudogen [110]. Każdy z genów dla SP-A obejmuje 6 eksonów. Dwa pierwsze, kodują region regulatorowy, nieulegający translacji (5'-UTR), ekson 3 - domenę N-końcową oraz fragment domeny kolagenopodobnej, ekson 4 - pozostałą część tego regionu, ekson 5 - region „neck”, natomiast ekson 6 - domenę wiążącą węglowodany oraz sekwencję 3'-UTR.

Geny *SFTPA1* i *SFTPA2* są wysoce polimorficzne. Częstość występowania różnych ich wariantów jest odmienna w różnych grupach etnicznych [111]. Polimorfizmy genów *SFTPA1* (zlokalizowane w kodonach 19, 50, 62, 133 i 219) oraz *SFTPA2*

(zlokalizowane w kodonach 9, 91, 140 i 223) zostały użyte do wyróżnienia kilku haplotypów (oznaczonych odpowiednio jako 6A, 6Aⁿ, gdzie n=2-8 oraz 1A, 1Aⁿ, gdzie n=0-5) [112]. Nosicielstwo niektórych z nich może wpływać na ryzyko rozwoju i przebieg chorób o różnym podłożu. Wybrane polimorfizmy genów kodujących kolektyny surfaktantu płucnego A przedstawiono w tabeli 3.



Ryc. 6. Schemat organizacji genów *SFTPA1* i *SFTPA2* (kodujących odpowiednio białka SP-A1 oraz SP-A2) oraz dojrzałego białka SP-A. Zaznaczono wybrane polimorfizmy zlokalizowane w eksonach (wg Hallman i wsp. [113], zmodyfikowano).

Białko SP-A występuje w płucach, gdzie jego stężenie w warunkach fizjologicznych wynosi od 0,5 do 123,6 µg/ml. Jego obecność, w niewielkiej ilości (25 ng/ml) stwierdzono także w surowicy [114, 115].

Ekspresja omawianych genów zachodzi, jak wspomniano, przede wszystkim w pneumocytach typu II, lecz obecność swoistego mRNA obserwuje się również w gruczołach podśluzówkowych dróg oddechowych, mózgu, uchu środkowym, zatokach przynosowych, tchawicy, grasicy, sercu, błonach śluzowych układu pokarmowego oraz układu moczowo-płciowego, śledzionie i prostaty [116-118].

Tabela 3. Wybrane polimorfizmy genów kodujących białka SP-A1 oraz SP-A2 [119, 120].

Lokalizacja	Pozycja i zamiana nukleotydu	Numer referencyjny	Zamiana aminokwasu w cząsteczce białka
<i>SFTPA1</i>			
Ekson 3	+56 (T>C)	rs1059047	Val19Ala
Ekson 3	+148 (G>C)	rs17883551	Val50Leu
Ekson 6	+655 (C>T)	rs4253527	Arg219Trp
<i>SFTPA2</i>			
Ekson 3	+26 (C>A)	rs1059046	Thr9Asn
Ekson 3	+271 (G>C)	rs17886395	Ala91Pro
Ekson 6	+667 (C>A)	rs17881479	Gln223Lys

2.4.1.2.3. Znaczenie kliniczne polimorfizmów genów *SFTPA1* i *SFTPA2*

Niektóre z opisanych polimorfizmów genów kodujących SP-A mogą wpływać na podatność na zakażenia. Lofgren i wsp. zaobserwowali, że występowanie asparaginy w pozycji 9 oraz lizyny w pozycji 223 SP-A2 (adeniny zarówno w pozycji +26 jak i w pozycji +667 genu) związane jest z wyższym ryzykiem zakażenia wirusem RS. Protekcyjny efekt obserwowano natomiast, kiedy w pozycji 19 SP-A1 występowała alanina (allel C; SNP w pozycji +56 genu *SFTPA1*) a w pozycji 91 SP-A2 - prolina (C w pozycji +271 genu *SFTPA2*) [121]. Związek wariantów polimorficznych w kodonie 219 genu *SFTPA1* (wariant T), kodonach 91 i 223 (warianty C) genu *SFTPA2* z zachorowalnością na gruźlicę w populacji afrykańskiej został opisany przez Malik i wsp. [122]. Obecność allelu A w pozycji +667, skutkująca zamianą reszty glutaminy na lizynę w domenie CRD, zwiększa ryzyko rozwoju zakażeń meningokokami o ciężkim przebiegu [123].

2.4.1.2.4. Białko surfaktantu płucnego D – SP-D - struktura i swoistość

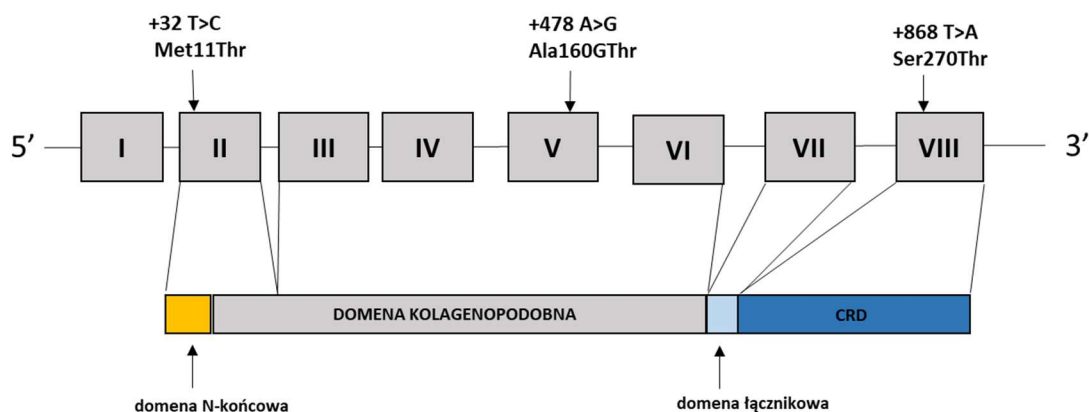
Masa cząsteczkowa łańcucha polipeptydowego kolektyny surfaktantu płucnego SP-D, zbudowanego z 453 aminokwasów, wynosi około 43 kDa. Białko to najczęściej występuje jako tetramer podjednostek (12 łańcuchów) o łącznej masie około 520 kDa [113], jednak obserwowane są również formy o mniejszym lub większym stopniu oligomeryzacji. Opisano struktury zawierające do 96 łańcuchów, zwane „fuzzy ball”,

co zwiększa możliwości rozpoznawania ligandów i siłę wiązania do nich, dzięki zwielenokrotnieniu domen CRD [124, 125].

Białko surfaktantu płucnego D rozpoznaje takie reszty cukrowe jak: D-maltoza, D-glukoza, N-acetylo-D-glukozamina, D-mannoza, L-fukoza i D-galaktoza [100]. Dzięki temu może przyłączać się do struktur powierzchniowych komórek różnych bakterii Gram-dodatnich, np. *Bacillus subtilis* czy *Staph. aureus* i Gram-ujemnych, np. *K. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa* oraz *E. coli* [37, 92, 126]. SP-D może też być czynnikiem odporności przeciwgrzybiczej, gdyż aglutynuje komórki *Candida albicans* [127] oraz przeciwwirusowej (zaobserwowano jej interakcję z glikoproteiną gp-120 HIV) [128]. Oddziaływanie omawianego białka z antygenami *Mycobacterium* opisane zostało w podrozdziale 2.4.3.

2.4.1.2.5. Gen *SFTPD* i ekspresja białka SP-D

Gen odpowiedzialny za syntezę SP-D (*SFTPD*, *SFTP4*), tak jak omówione wyżej geny dla innych kolektyn, znajduje się na długim ramieniu chromosomu 10, w regionie 10q22.3. Obejmuje on osiem eksonów. Pierwszy z nich koduje część sekwencji 5'-UTR, drugi – pozostały fragment 5'-UTR, domenę N-końcową białka oraz fragment regionu kolagenopodobnego. Dalsza część tego regionu kodowana jest przez eksony 3-6, natomiast eksony 7 i 8 kodują odpowiednio domenę „neck” oraz CRD, jak również fragment 3'-UTR [37, 113, 129] (ryc. 7).



Ryc. 7. Schemat organizacji genu *SFTPD* oraz dojrzałego białka SP-D. Zaznaczono wybrane polimorfizmy, badane w przedstawionej pracy (wg Kishore i wsp. [37], zmodyfikowano).

Niektóre z opisanych polimorfizmów genu *SFTPD* (tabela 4), wpływają na strukturę, aktywność i stężenie jego produktu w surowicy.

Tabela 4. Wybrane polimorfizmy genu *SFTPD* (wg Silveyra i wsp. [119]).

Lokalizacja	Pozycja i zamiana nukleotydu	Numer referencyjny	Zamiana aminokwasu w cząsteczce białka
Ekson 2	+32 (T>C)	rs721917	Met11Thr
Ekson 5	+478 (G>A)	rs17885900	Ala160Thr
Ekson 8	+868 (T>A)	rs3088308	Ser270Thr

Białko to syntezowane jest głównie w płucach, przez pneumocyty typu II, ale obecność swoistego mRNA stwierdzono również w tchawicy, mózgu, śliniankach, sercu, nerkach, trzustce, jądrach i prostaty [130]. SP-D wchodzi w skład surfaktantu płucnego, jednak jego stężenie jest znacznie niższe niż omawianego wcześniej białka SP-A (od 36 do 216 ng/ml) [115]. Z drugiej strony, stężenie SP-D w surowicy jest znacznie wyższe (średnia u osób dorosłych: 1 µg/ml, zakres 0,2-5,2 µg/ml) niż SP-A [114, 131]. Drastyczne obniżenie poziomu obu kolektyn w surfaktancie płucnym obserwuje się w przebiegu infekcji u osób chorych na mukowiscydozę [107, 132].

2.4.1.2.6. Znaczenie kliniczne SP-D i polimorfizmów genu *SFTPD*

Jak wspomniano wyżej, niektóre SNP omawianego genu znacząco wpływają na strukturę i funkcję SP-D. Zastąpienie reszty metioniny treoniną w pozycji 11 dojrzałego białka, związane z polimorfizmem +32 T>C, skutkuje zaburzeniem oligomeryzacji podjednostek. U homozygot C/C obserwuje się nie tylko przewagę pojedynczych trimerów nad cząsteczkami o wyższym stopniu oligomeryzacji, lecz także niskie stężenia kolektyny w surowicy [125, 133]. U dzieci chorych na zapalenie oskrzeli spowodowane wirusem RS, obserwowano wyższą częstość występowania genotypu T/T w porównaniu z grupą kontrolną [134]. Z drugiej jednak strony, Ampuero i wsp. wykazali zależność między występowaniem allelu C i rozwojem ciężkiej postaci tej choroby u dzieci chińskich [135]. Wyższą częstość występowania allelu C opisano również u osób chorych na gruźlicę [112]. Zaobserwowano także, że naturalnie występujące trimery SP-D wykazują stosunkowo niewielkie (w porównaniu do multimerów) powinowactwo do osłonki wirusa grypy typu A, co może sugerować wyższą podatność na zakażenia tym czynnikiem u homozygot C/C [125].

U dzieci chorujących na astmę zanotowano znacząco wyższą niż w grupie odniesienia częstość występowania wariantu T [136]. Przeciwnie, badając osoby dorosłe, zasugerowano, że nosicielstwo allelu C nasila ryzyko rozwoju alergicznego nieżytu

nosa [137]. Thomas i wsp. wykazali, że obecność allelu A (polimorfizm w pozycji +478 genu *SFTPD*, co odpowiada reszcie alaniny w pozycji 160 SP-D) może działać protekcyjnie przed rozwojem zespołu niewydolności oddechowej u dzieci urodzonych przedwcześnie [138]. Autorzy ci, w kolejnych badaniach, zauważyli jednak, że w przypadkach zakażeń wirusem RS, wariant ten wywiera efekt przeciwny [139]. Zamiana reszty seryny na treoninę w pozycji 270 (domena lektynowa) SP-D, może powodować zaburzenia w rozpoznawaniu ligandów przez omawiane białko. Odpowiednio, obecność allelu A (polimorfizm w pozycji +868 genu *SFTPD*) związana jest z niskim stężeniem jego produktu w surowicy. Może to skutkować wyższym ryzykiem rozwoju przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP, ang. chronic obstructive pulmonary disease, COPD) u palaczy tytoniu [140]. Stężenie SP-D wzrasta w przebiegu takich chorób płuc jak POChP, zapalenie płuc czy gruźlica [141, 142].

2.4.2. Fikoliny

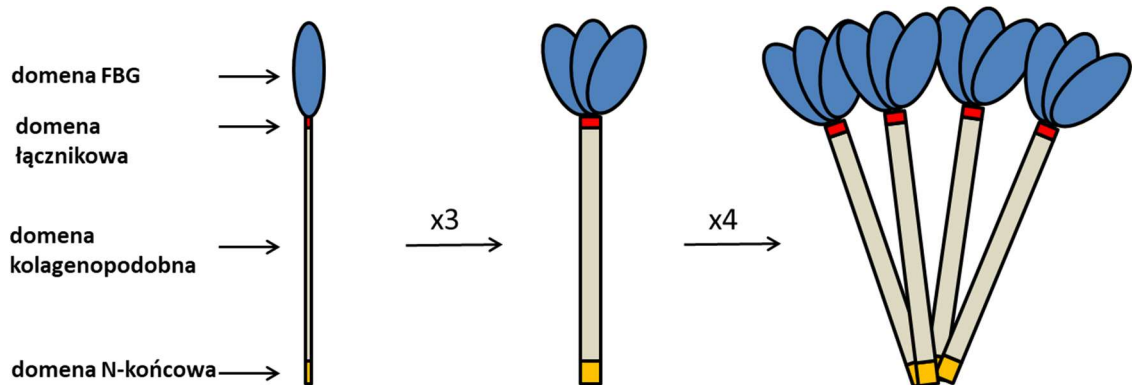
Fikoliny, podobnie jak większość kolektyn, to białka mające postać oligomerów podjednostek będących trimerami identycznych łańcuchów polipeptydowych. Tak jak w przypadku kolektyn, na końcu N każdego z łańcuchów znajduje się domena bogata w reszty cysteiny, która następnie przechodzi w domenę kolagenopodobną, a ta z kolei – w krótki region łącznikowy („neck”). Unikalną cechą fikolin jest C-końcowa, globularna domena fibrynogenopodobna (ang. fibrinogen-like domain, FBG), odpowiedzialna za wiązanie ligandów (ryc. 8). Rozpoznaje ona między innymi grupy acetylowe, wchodzące w skład reszt cukrowych (D-GlcNAc, D-GalNAc), ale też związków niecukrowych [N-acetylowana L-cysteina (L-CysNAc), czy otrzymywane na drodze modyfikacji chemicznych, N-acetylowane pochodne albuminy surowicy bydlęcej i ludzkiej]. Białka należące do rodziny fikolin nie są więc typowymi lektynami, zarówno pod względem strukturalnym, jak i funkcjonalnym [143].

Tabela 5. Fikoliny: miejsca ekspresji oraz swoistość wiązania (wg Ren i wsp. oraz Endo i wsp. [144, 145], zmodyfikowano).

	Ekspresja genu	Występowanie	Powinowactwo	Lokalizacja genu
fikolina-1	monocyty, neutrofile, śledziona, płuca	krew, powierzchnia monocytów, neutrofilów,	N-acetylo-D-glukozamina, N-acetylo-D-galaktozamina, N-acetylo-D-mannozamina N-acetylo-L-cysteina, Kwas sjałowy	9q34
fikolina-2	hepatocyty	krew, wątroba	N-acetylo-D-glukozamina, N-acetylo-D-galaktozamina, N-acetylo-D-mannozamina N-acetylo-L-cysteina acetylocholina, elastyna, kortykosteroidy, 1,3-β-D-glukan,	9q34
fikolina-3	hepatocyty, komórki pęcherzykowe płuc	krew, surfaktant płucny, żółć,	N-acetylo-D-glukozamina, N-acetylo-D-galaktozamina, L-fukoza	1p36.11

Po raz pierwszy, czynniki zaklasyfikowane później do tej rodziny zostały opisane jako białka wiążące transformujący czynnik wzrostu β1 (ang. transforming-growth factor β1, TGF β1), występujące w macicy świni (obecnie określane jako fikoliny α i β) [146]. Później, obecność fikolin stwierdzono u innych ssaków, jak również u zachwy *Halocynthia roretzi* [145, 147]. U człowieka występują trzy fikoliny, których krótką charakterystykę przedstawiono w tabeli 5. Jako pierwsza opisana została fikolina-3, zidentyfikowana w roku 1978 r., jako termolabilne białko rozpoznawane i precipitowane przez autoprzeciwciała występujące u osób chorych na toczeń rumieniowaty układowy. Początkowo została nazwana antygenem Hakata, a następnie fikoliną H lub fikoliną-3. Kolejne badania wykazały, że jest to białko występujące w surowicy, w warunkach fizjologicznych [85]. W ostatniej dekadzie XX wieku, z ludzkiego osocza otrzymano oligomeryczne białko składające się z podjednostek o masie 35 kDa. Zostało ono nazwane P35 lub hukoliną, później zaś fikoliną L lub

fikoliną-2 [148]. Fikolina M (fikolina-1) ze względu na wysoką homologię z fikoliną-2 została początkowo opisana jako białko podobne do P35 (P35-related protein) [149]. U gryzoni występują dwa białka zaliczane do fikolin: fikolina A i B. Mysia fikolina B jest homologiem fikoliny-1, natomiast fikolina A - fikoliny-2. U zwierząt tych występuje także pseudogen, odpowiadający genowi dla fikoliny-3 [150]. Fikoliny podobnie jak niektóre kolektyny, dzięki zdolności do tworzenia kompleksów z proteazami MASP, należą do aktywatorów układu dopełniacza na drodze lektynowej.



Ryc. 8. Schemat organizacji cząsteczek fikolin (wg Endo i wsp. [145], zmodyfikowano).

2.4.2.1. Fikolina-1

2.4.2.1.1. Fikolina-1 – struktura i swoistość

Fikolina-1 występuje w szpiku kostnym i na powierzchni komórek układu odpornościowego, takich jak monocyty i neutrofile. Stosowane wcześniej powszechne określenie „fikolina M” pochodzi od słowa „monocyte”. Obecność jej obserwuje się również wewnątrz granuli sekrecyjnych wspomnianych komórek [151]. Białko to związane jest z błoną plazmatyczną za pośrednictwem domeny FBG, poprzez interakcje z resztami kwasu sialowego receptora GPCR43 (ang. G-protein-coupled receptor GPCR43) [152] bądź CD43 [153]. Pod wpływem stymulacji leukocytów następuje uwolnienie zgromadzonej w wewnątrzkomórkowych granulach fikoliny-1, zwiększenie jej ekspresji na powierzchni komórek [154], a następnie uwolnienie do otoczenia (np. krwiobiegu). Początkowo sądzono, że białko to występuje wyłącznie na powierzchni (lub wewnątrz) komórek i pełni rolę receptora „zmiatacza”, jednak brak domeny przezbłonowej uniemożliwia przekazywanie sygnału. Z drugiej strony, połączenie z GPCR43 może rozpocząć ten proces, na drodze zależnej od NF-κB. Późniejsze badania wykazały, że występuje ona w surowicy i dzięki tworzeniu kompleksów z MASP, może

aktywować dopełniacz [155]. Jej interakcja z pentraksyną 3 (ang. pentraxin 3, PTX3) związaną do struktur powierzchniowych bakterii, może powodować aktywację dopełniacza na drodze lektynowej [156].

Fikolina-1 wykazuje około 77% podobieństwa sekwencji aminokwasów z fikoliną-2 i około 50% z fikoliną-3 (białka omówione niżej) [150].

Pojedynczy łańcuch polipeptydowy dojrzałego białka składa się z 299 aminokwasów, a w regionie kolagenopodobnym występuje 19 powtórzeń Gly-X-Y. Masa cząsteczkowa podjednostki wynosi 34 kDa, a oligomeru - do około 600 kDa.

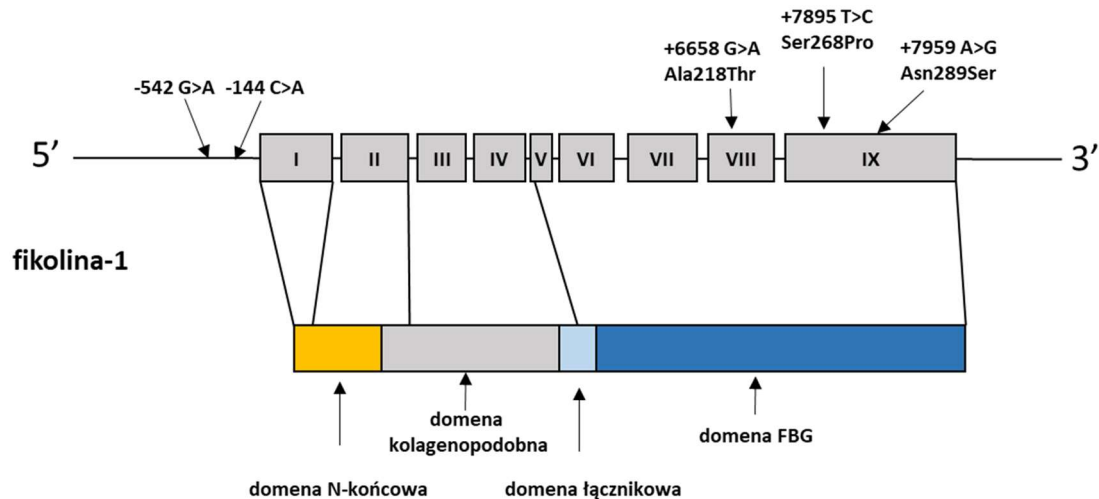
Fikolina-1 rozpoznaje acetylowane pochodne cukrowe, takie jak N-acetylo-D-glukozamina, N-acetylo-D-galaktozamina, N-acetylo-D-mannozamina, czy (co jest wyjątkiem wśród białek tej rodziny) kwas sjałowy oraz związki niecukrowe (N-acetylo-L-cysteina, L-CysNAc) (tabela 5) [155, 157]. Wspomniany kwas sjałowy obecny jest na powierzchni wielu mikroorganizmów, które dzięki „mimikrze antygenowej”, mogą unikać mechanizmów odporności gospodarza [158]. Wykazano, iż fikolina-1 wiąże się do zawierających ten związek wielocukrów otoczkowych szczepów *Streptococcus agalactiae* (serotypy Ia, Ib, II-IX), *Str. pneumoniae* (serotypy 19B i 19C) oraz *Str. mitis*, podczas gdy nie obserwowano jej interakcji z komórkami szczepów bezotoczkowych. Wiąże się ona również do struktur powierzchniowych *Staphylococcus aureus* [159, 160] oraz *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* LT2 [155, 161]. Opisano także interakcję fikoliny-1 z glikoproteiną GP wirusa Ebola [162]. Oddziaływanie omawianego białka z antygenami *Mycobacterium* opisane zostało w podrozdziale 2.4.3.

Kwas sjałowy obecny jest na powierzchni komórek, a także wchodzi w skład rozpuszczalnych glikoprotein kręgowców i niektórych bezkręgowców, biorąc udział w regulowaniu wielu procesów fizjologicznych [163]. Zdolność fikoliny-1 do interakcji z resztami tego kwasu może sugerować jej udział w utrzymaniu homeostazy. Nie wiąże się ona do nieaktywnych komórek układu odpornościowego, takich jak spoczynkowe limfocyty T CD3⁺ CD25⁻, natomiast po ich aktywacji i wzroście ekspresji kwasu sjałowego na powierzchni, obserwuje się przyłączanie fikoliny-1 [164, 165].

2.4.2.1.2. Gen *FCNI* i ekspresja fikoliny-1

Gen *FCNI*, kodujący fikolinę-1 zlokalizowany jest na chromosomie 9 w regionie q34, w sąsiedztwie genu kodującego fikolinę-2 (*FCN2*). Obejmuje on dziewięć eksonów (ryc. 9). Ekson 1 koduje fragment 5'-UTR, krótki peptyd sygnałowy oraz fragment

regionu cysteinowego, ekson 2 - pozostałą jego część oraz początkową sekwencję regionu kolagenopodobnego. Za syntezę dalszego fragmentu tej domeny odpowiadają eksony 3-5, domeny łącznikowej - 5 i 6, natomiast regionu FBG – 6-9. Ostatni z wymienionych eksonów koduje także fragment 3'-UTR (ryc. 9) [166].



Ryc. 9. Schemat organizacji genu *FCNI* i dojrzałego białka - fikoliny-1. Zaznaczono polimorfizmy badane w przedstawionej pracy (wg Ammitzbolla i wsp. [166], zmodyfikowano).

Jak wspomniano, początkowo sądzono, że omawiane białko występuje wyłącznie na powierzchni lub wewnątrz komórek, jednak w 2008 r., Honore i wsp. udowodnili obecność fikoliny-1 w surowicy i jako pierwsi oznaczyli jej stężenie (45-100 ng/ml) [167]. Późniejsze badania wykazały, że poziom tego białka jest znacznie wyższy (0,3 – 4 µg/ml; średnia 1,2 µg/ml u osób dorosłych) [168]. Wspomniana przeciętna wartość jest jednak kilkakrotnie niższa niż w przypadku fikoliny-2 i nawet kilkunastokrotnie niższa w porównaniu z fikoliną-3 (szczegółowe dane dotyczące tych białek przedstawiono niżej) [167]. Wittenborn i wsp. zaobserwowali, że stężenie fikoliny-1 pozostaje na stałym poziomie niezależnie od wieku [168], natomiast Sallenbach i wsp. wykazali, że poziom tego białka jest najniższy u noworodków, u dzieci do ósmego roku życia utrzymuje się na poziomie około 1,9 µg/ml, a następnie obniża się [78]. Trolborg i wsp. zaobserwowali, iż stężenie fikoliny-1 jest wyższe u kobiet niż u mężczyzn a jej stężenie w ciągu doby jest najwyższe o godz. 14 i 22 [169].

Gen *FCNI* jest wysoce polimorficzny [36]. Niektóre z opisanych SNP znacząco wpływają na stężenie fikoliny-1 w surowicy i/lub zdolność wiązania ligandów i mają potencjalne znaczenie kliniczne. Na przykład, warianty A polimorfizmów

zlokalizowanych w regionie promotorowym, w pozycjach -542 (G>A, rs10120023) oraz -144 (C>A, rs10117466) związane są z wyższym poziomem ekspresji swoistego mRNA w monocytach i granulocytach oraz wyższym stężeniem białka w surowicy [166, 170]. Z drugiej strony, obecność alleli: A, C, G [SNP w regionie kodującym domenę FBG, odpowiednio: +6658 G>A (Ala218Thr, rs148649884), +7895 T>C (Ser268Pro, rs150625869 oraz +7959 A>G (Asn289Ser, rs138055828) skutkuje niższym stężeniem fikoliny-1. Ponadto, obecność treoniny i seryny, odpowiednio w pozycjach 218 i 289 białka, wpływa na upośledzenie jego zdolności do rozpoznawania ligandów (np. struktur powierzchniowych paciorkowców grupy B) [166]. Do tej pory nie został opisany przypadek pierwotnego niedoboru fikoliny-1. W tabeli 6 przedstawiono polimorfizmy wpływające na stężenie białka w surowicy, dwa z nich (te zlokalizowane w regionie promotorowym) były przedmiotem badań prezentowanej pracy.

Tabela 6. Wybrane polimorfizmy genu *FCNI* [166].

Lokalizacja	Pozycja i zamiana nukleotydu	Numer referencyjny	Zamiana aminokwasu w cząsteczce białka
Region promotorowy	-542 (G>A)	rs10120023	-
Region promotorowy	-144 (C>A)	rs10117466	-
Ekson 8	+6658 (G>A)	rs148649884	Ala218Thr
Ekson 9	+7895 (T>C)	rs150625869	Ser268Pro
Ekson 9	+7959 (A>G)	rs138055828	Asn289Ser

2.4.2.1.3. Znaczenie kliniczne fikoliny-1 i polimorfizmów genu *FCNI*

Polimorfizmy genu *FCNI* zlokalizowane w regionie promotorowym w pozycjach -542 oraz -144 mogą wpływać na ryzyko rozwoju ciężkich, ogólnoustrojowych zakażeń. Nosicielstwo alleli A może nasilać podatność na takie infekcje i sprzyjać niekorzystnym rokowaniom u osób, u których doszło do rozwoju sepsy [170]. Z drugiej strony, wykazano, że haplotyp -542A/-144C wywiera efekt protekcyjny przed zachorowaniem na trąd [171]. Wyższą częstość występowania alleli A i G, związanych z dwoma innymi polimorfizmami genu *FCNI* [-1981 G>A (rs2989727), zlokalizowany w regionie promotorowym oraz +7919 A>G (rs1071583), zlokalizowany w eksonie 9]

obserwowano u osób chorych na reumatoidalne zapalenie stawów [172]. Polimorfizm +7919 A>G związany jest również z cukrzycą typu I (u nosicieli genotypu A/A, choroba ta może rozwinąć się o dwa lata wcześniej, w porównaniu z heterozygotami i homozygotami G/G) [173].

Ekspresja reszt kwasu sjałowego na powierzchni komórek wzrasta w procesie nowotworzenia, zdolność fikoliny-1 do rozpoznawania tego związku może sugerować jej znaczenie w odporności przeciwnowotworowej [174]. Schlapbach i wsp. zaobserwowali bardzo wysokie stężenia fikoliny-1 w próbach surowicy dwojga dzieci chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną (8,3 i 25 $\mu\text{g/ml}$) [175]. W badaniach własnych (Pracownia Immunobiologii Zakażeń IBM PAN) wykazano, że mediany poziomu omawianego białka w surowicy osób dorosłych chorych na inne nowotwory układu krwiotwórczego (ostra białaczka szpikowa, szpiczak mnogi, chłoniaki) są znacząco niższe (odpowiednio: 0,29 $\mu\text{g/ml}$, 0,8 $\mu\text{g/ml}$, 0,54 $\mu\text{g/ml}$) w porównaniu z grupą osób zdrowych (1,28 $\mu\text{g/ml}$), co związane jest prawdopodobnie z zaburzeniami funkcji leukocytów (a często także ich nieprawidłową liczbą), w których syntezowana jest fikolina-1 (dane niepublikowane).

Wysokie stężenia fikoliny-1 obserwowano u osób z histologicznie potwierdzonym układowym toczniem rumieniowatym oraz u osób u których doszło do schyłkowej niewydolności nerek [176]. Wyższy poziom fikoliny-1 obserwowano u niemowląt, u których rozwinęła się sepsa, szczególnie w początkowym stadium choroby [177]. Świerzko i wsp. zanotowali, że stężenia tego białka były wyższe także u noworodków z potwierdzoną sepsą oraz zakażeniami, w czasie których nie doszło do rozwoju sepsy (głównie zapalenia płuc) niż u zdrowych noworodków [178]. Z drugiej strony noworodki, w których surowicy poziom fikoliny-1 był niski, częściej wymagały wspomagania funkcji życiowych, np. przez użycie respiratora. Niskie stężenie tego białka obserwowano również u wcześniaków, które zmarły w wyniku martwiczego zapalenia jelit [179].

2.4.2.2. Fikolina-2

2.4.2.2.1. Fikolina-2 - struktura i swoistość

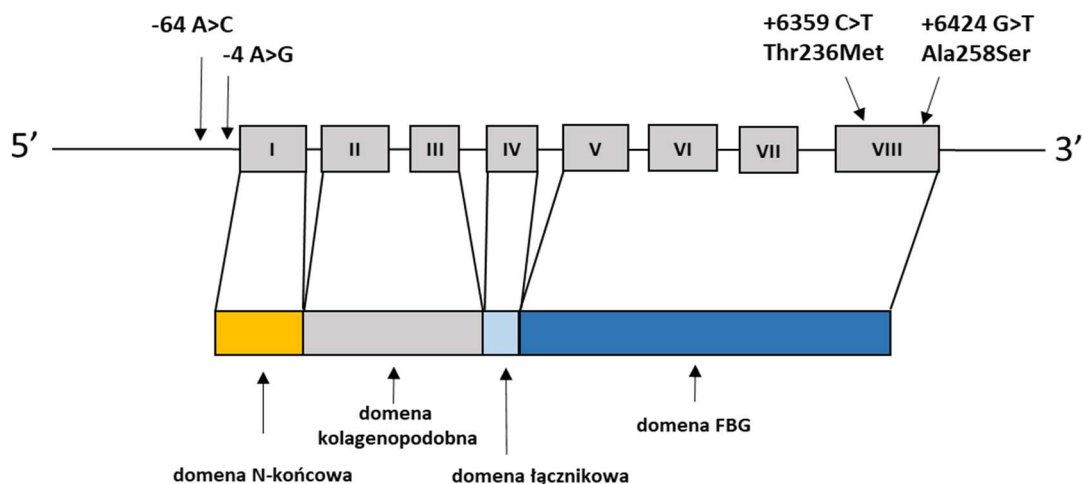
Jak wspomniano, cząsteczka fikoliny-2 jest oligomerem (zazwyczaj tetramerem) podjednostek, w skład których wchodzi trzy identyczne łańcuchy o masie 35 kDa [180]. Syntezowana jest głównie w wątrobie, dlatego nazywana jest także fikoliną L (ang. liver) i wydzielana do krwi [63].

W skład łańcucha polipeptydowego wchodzi 313 reszt AA [80, 155]. Schemat struktury omawianego białka jest identyczny, jak w przypadku pozostałych fikolin (ryc. 8). W skład regionu kolagenopodobnego wchodzi 15 powtórzeń Gly-X-Y [181]. Unikalną cechą fikoliny-2 jest obecność czterech miejsc wiążących w domenie FBG (S1-S4), co pozwala na rozpoznawanie stosunkowo szerokiego wachlarza ligandów (tabela 5) [157]. Dzięki temu może przyłączać się do struktur powierzchniowych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, takich jak wielocukry otoczkowe, kwasy lipotejchajowe, lipopolisacharydy i inne glikokoniugaty. Wśród rozpoznawanych drobnoustrojów wymienia się *Streptococcus pneumoniae* i *Staphylococcus aureus* (szczepy otoczkowe) [182, 183], *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium* (mutant o chemotypie Ra) [80, 180], Fikolina-2 uczestniczy w eliminacji pierwotniaków patogennych, takich jak *Trypanosoma cruzi* i *Giardia intestinalis* [80]. Wykazuje też powinowactwo do 1,3- β -glukanów, wchodzących w skład ściany komórkowej grzybów [184]. Współdziałając z pentraksyną 3 rozpoznaje komórki *Aspergillus fumigatus* [185]. Ponadto, wykazano, iż fikolina-2 wiąże się z hemaglutyniną i neuraminidazą wirusa grypy typu A oraz glikoproteiną wirusa zapalenia wątroby typu C (WZW typ C) [80, 186]. Oddziaływanie omawianego białka z antygenami *Mycobacterium* opisane zostało w podrozdziale 2.4.3.

Białko to wiążąc się do ludzkiego DNA, prawdopodobnie przyczynia się do usuwania komórek ulegających apoptozie i/lub nekrozie [187, 188].

2.4.2.2.2. Gen *FCN2* i ekspresja fikoliny-2

Gen *FCN2*, kodujący fikolinę-2 (ryc. 10), obejmujący 8 eksonów, zlokalizowany jest na chromosomie 9 (9p34), w sąsiedztwie genu dla fikoliny-1. Ekson 1 koduje fragment 5'-UTR, krótki peptyd sygnałowy oraz domenę N-kończącą. Eksony 2 i 3 – sekwencję regionu kolagenopodobnego, 4 – „neck”, natomiast eksony od 5 do 8 kodują FBG oraz fragment 3'-UTR [189].



Ryc. 10. Schemat organizacji genu *FCN2* oraz dojrzałego białka – fikoliny-2. Zaznaczono badane w pracy polimorfizmy, zlokalizowane w regionie promotorowym oraz eksonie 8 (wg Kilpatricka i wsp. [80], zmodyfikowano).

Synteza fikoliny-2 zachodzi, jak wspomniano, przede wszystkim w wątrobie, jednak swoisty mRNA jest obecny także w szpiku kostnym, migdałkach podniebiennych, jelicie oraz jajniku [63, 190]. Według różnych danych źródłowych, jej przeciętne (mediana) stężenie w surowicy ludzkiej (u osób dorosłych) wynosi 4130 ng/ml [191], 3700 ng/ml [192], 5400 ng/ml [193] czy 2100 ng/ml [190]. U większości osób, poziom omawianego białka mieści się w zakresie 1000-6000 ng/ml [80].

Należy wspomnieć, że stężenie omawianej fikoliny zmienia się wraz z wiekiem. U płodu, wzrasta znacząco w trzecim trymestrze ciąży [75]. Według Sallenbach i wsp., najwyższy jej poziom obserwuje się pomiędzy 1 a 4 rokiem życia (mediana: 11300 ng/ml), w wieku około 16 lat, mediana wynosi 8660 ng/ml, a następnie ulega dalszemu obniżeniu osiągając wartość około 4000 ng/ml, po czym stabilizuje się [78]. U dorosłych kobiet, stężenie fikoliny-2 jest niższe niż u mężczyzn [169].

Opisano kilkanaście polimorfizmów genu *FCN2* (niektóre z nich zostały wymienione w tabeli 7). Część z nich wpływa na stężenie fikoliny-2 w surowicy i/lub jej aktywność [194-196]. Do najczęściej badanych należą SNP zlokalizowane w pozycjach -64 (A>C; rs78654553) i +6424 (G>T; Ala258Ser, rs7851696), których allele, odpowiednio C i T związane są ze stosunkowo niskim stężeniem fikoliny-2 w surowicy oraz -4 (A>G; rs17514136) i +6359 (C>T; Thr236Met, rs17549193) (allele G i T związane są z wysokim poziomem ekspresji genu i stężeniem jego produktu w surowicy) [190]. W przypadku występowania allelu T w pozycji +6359 obserwowano obniżenie powinowactwa do D-GlcNAc, natomiast obecność wariantu G w pozycji +6424 wiązała

się z efektem przeciwnym [197]. Opisano także mutację powodującą zmianę ramki odczytu (delecja 6442–6443delCT > A), skutkującą powstaniem polipeptydu krótszego o 39 aminokwasów [197]. Dotychczas nie zanotowano jednak przypadku pierwotnego niedoboru fikoliny-2.

Tabela 7. Wybrane polimorfizmy genu *FCN2* wpływające na stężenie fikoliny-2 w surowicy i/lub jej aktywność wg Hummelshoj i wsp.[197].

Lokalizacja	Pozycja i zamiana nukleotydu	Numer referencyjny	Zamiana aminokwasu w cząsteczce białka
Region promotorowy	-986 (G>A)	rs3124952	-
Region promotorowy	-602 (G>A)	rs3124953	-
Region promotorowy	-557 (A>G)	rs3811140	-
Region promotorowy	-64 (A>C)	rs7865453	-
Region promotorowy	-4 (A>G)	rs17514136	-
Ekson 8	+6359 (C>T)	rs17549193	Thr236Met
Ekson 8	+6424 (G>T)	rs7851696	Ala258Ser
Ekson 8	+6442-43delCT>A	rs28357091	Ala264fs

2.4.2.2.3. Znaczenie kliniczne fikoliny-2 i polimorfizmów genu *FCN2*

Opisanym powyżej polimorfizmom przypisuje się znaczenie kliniczne. Wyższą częstość występowania wariantu T (SNP +6359 C>T) zaobserwowano u osób zakażonych świdrowcami z rodzaju *Leishmania* [198]. W wielu badaniach wykazano niskie, w porównaniu z odpowiednimi grupami odniesienia, stężenia fikoliny-2 w surowicy pacjentów z potwierdzonymi chorobami o różnej etiologii. W niektórych z cytowanych niżej prac, zanotowano znaczący wpływ genotypu *FCN2*, w innych nie notowano takiego związku, niekiedy zaś ograniczono się do oznaczeń poziomu białka. Wykazano, między innymi, iż niskie stężenie fikoliny-2 w surowicy związane jest z zakażeniami okołoporodowymi [75], jak również z nawracającymi infekcjami układu oddechowego u dzieci [199]. Świerzko i wsp. zaobserwowali znacząco niższy poziom tego białka u dzieci, u których doszło do rozwoju sepsy, w porównaniu z grupą kontrolną [178]. U osób chorych na trąd zanotowano wyższą niż w grupie odniesienia częstość alleli związanych z wyższym stężeniem fikoliny-2 [A, G, A w pozycjach,

odpowiednio -986 (G>A), -602 (G>A) oraz -4 (A>G), zlokalizowanych w regionie promotorowym i allelu G w pozycji +6424 (G>T, ekson 8)] [200]. Z kolei Schlapbach i wsp. [201], Kilpatrick i wsp. [202] oraz Ameye i wsp. [203] wykazali, iż stężenie fikoliny-2 w surowicy lub osoczu, nie wpływa na podatność na infekcje pacjentów chorych na nowotwory układu krwiotwórczego, poddawanych chemoterapii [202, 203]. Podobne wyniki otrzymano w Pracowni Immunobiologii Zakażeń IBM PAN, badając osoby chorujące na ostrą białaczkę szpikową (ang. acute myeloid leukemia, AML), szpiczaka mnogiego oraz chłoniaki. Z drugiej strony, zaobserwowano jednak, że przed rozpoczęciem chemioterapii, stężenia omawianego białka w pacjentów z rozpoznaną AML są znacząco wyższe (mediana: 4686 ng/ml), zaś w pozostałych przypadkach - niższe (mediany odpowiednio: 2825 ng/ml i 2339 ng/ml), w porównaniu z grupą osób zdrowych (3381 ng/ml) (dane niepublikowane).

2.4.2.3. Fikolina-3

2.4.2.3.1. Fikolina-3 – struktura i swoistość

Historyczna nazwa fikoliny-3, antygen Hakata, pochodzi od japońskiego miasta, w którym przeprowadzono badania, w wyniku których białko to opisano po raz pierwszy. Nazwa ta stała się źródłem często stosowanego także współcześnie określenia: fikolina H. Cząsteczki fikoliny-3 składają się zazwyczaj z czterech do ośmiu podjednostek. Masa cząsteczkowa pojedynczego łańcucha wynosi 34 kDa. Region kolagenopodobny obejmuje 11 powtórzeń Gly-X-Y [63, 204], jest więc najkrótszy wśród ludzkich fikolin i kolektyn [205]. Białko to wykazuje około 50% homologii sekwencji aminokwasów z pozostałymi ludzkimi fikolinami [155].

Fikolina-3, podobnie jak inne czynniki odporności zaklasyfikowane do tej rodziny wykazuje najsilniejsze powinowactwo do acetylowanych pochodnych cukrowych (D-GalNAc, D-GlcNAc), również do acetylowanej albuminy surowicy ludzkiej i bydłowej [157], lecz rozpoznaje także nieacetylowane reszty cukrowe, takie jak L-Fuc (tabela 5) [145]. Do naturalnych ligandów omawianego białka należą: wielocukier powierzchniowy (egzopolisacharyd, EPS) *Aerococcus viridans* [206], polisacharyd O-swoisty LPS *Hafnia alvei* PCM 1200 [207] i lipopolisacharydy *Salmonella* Minnesota, *S. Typhimurium*, *E. coli* (EPEC O111ab:H2 oraz EAEC O71) [204, 207, 208]. Fikolina-3, wiążąc się do struktur powierzchniowych komórek wspomnianych bakterii *H. alvei* aktywuje dopełniacz i bierze udział w ich eliminacji: nasila aktywność bójczą surowicy, a dzięki aglutynacji drobnoustrojów ułatwia proces fagocytozy [208].

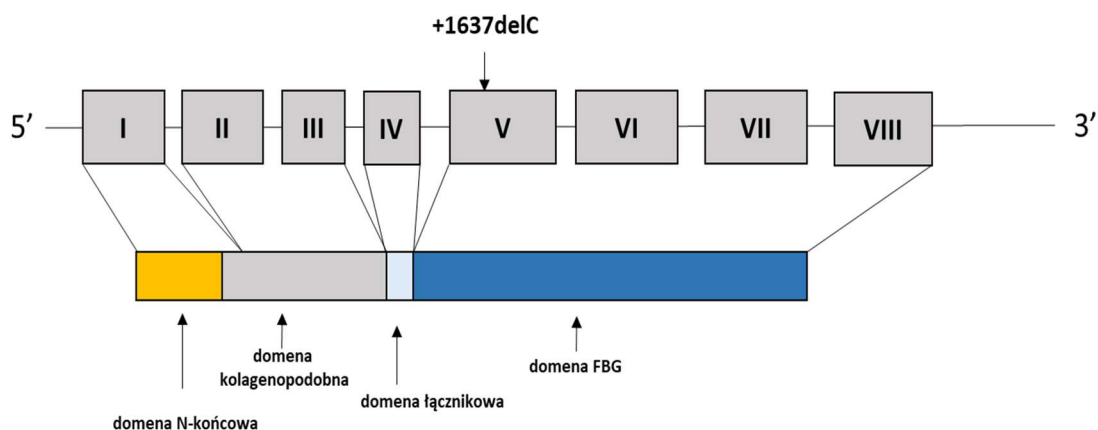
Białko to wiąże się także do powierzchni komórek *Pasteurella pneumotropica* [209] oraz konidiów *Aspergillus fumigatus* [210]. Ponadto, rozpoznaje struktury powierzchniowe pierwotniaków *Trypanosoma cruzi* i *Giardia intestinalis* [211, 212]. Interakcja z cząstkami wirusa grypy typu A hamuje ich zakaźność i aktywność hemaglutynacyjną [213]. Oddziaływanie omawianego białka z antygenami *Mycobacterium* opisane zostało w podrozdziale 2.4.3.

Fikolina-3 może tworzyć kompleksy z kalretikulina [187] i fibronektyną [84], jak również uczestniczyć w eliminacji komórek ulegających apoptozie lub nekrozie [187, 214].

2.4.2.3.2. Gen *FCN3* i ekspresja fikoliny-3

Za syntezę fikoliny-3 odpowiedzialny jest gen *FCN3*, zlokalizowany na chromosomie 1 (1p36.11), obejmujący osiem eksonów (ryc. 11). Ekson pierwszy koduje fragment nieulegający translacji końca 5' (5'-UTR), peptyd sygnałowy, domenę N-końcową i fragment domeny kolagenopodobnej (jej pozostała część kodowana jest przez dwa kolejne eksony), ekson czwarty - region łącznikowy, natomiast eksony 5 - 8 - domenę FBG oraz fragment nieulegający translacji końca 3' (3'-UTR).

Omawiane białko syntezowane jest głównie w płucach, przez komórki pęcherzykowe typu II i urzęsiony nabłonek oskrzeli oraz w wątrobie, przez hepatocyty i komórki nabłonka dróg żółciowych [85]. Obecność swoistego mRNA stwierdzono również w nerkach, sercu, śledzionie, jajniku oraz łożysku [63, 190, 215, 216]. Wysoka ekspresja genu *FCN3* w płucach może świadczyć o lokalnej roli ochronnej tego białka w układzie oddechowym. Poziom mRNA swoistego dla fikoliny-3 w hepatocytach jest trzykrotnie wyższy niż fikoliny-2 i czternastokrotnie niż MBL, podczas gdy swoisty dla fikoliny-1 mRNA jest prawie niewykrywalny [63]. Skutkuje to wyraźnymi różnicami stężenia tych czynników w surowicy. W przypadku fikoliny-3 jest ono najwyższe wśród PRM swoistych dla drogi lektynowej (może wynosić nawet >50 µg/ml; mediana u zdrowych osób dorosłych to 39,9 µg/ml [78]). Wykazano, że jej poziom jest zależny od płci (wyższy u mężczyzn) i podlega zmianom w ciągu doby (najwyższy w godzinach porannych [169, 217]). Obserwuje się też różnice związane z wiekiem: stężenie fikoliny-3 jest najniższe u noworodków (zwłaszcza urodzonych przedwcześnie, przy czym udowodniono jego korelację z wiekiem ciążowym), osiąga maksimum u niemowląt i dzieci starszych, a po 16 roku życia ulega nieznacznemu obniżeniu [75, 78].



Ryc. 11. Schemat organizacji genu *FCN3* oraz dojrzałego białka - fikoliny-3. Zaznaczono miejsce występowania mutacji +1637delC (Leu117fs) związanej z niedoborem fikoliny-3 u homozygot (wg Munthe-Fog i wsp. [218], zmodyfikowano).

Mimo, że opisano wiele polimorfizmów genu *FCN3*, na stężenie fikoliny-3 w surowicy znacząco wpływa jedynie delecja pojedynczego nukleotydu w eksonie 5, w wyniku, której następuje przesunięcie ramki odczytu (+1637delC, rs28357092) [219]. Powoduje to przedwczesne utworzenie kodonu „stop”, co mogłoby sugerować powstanie krótszego łańcucha polipeptydowego. Jednak u homozygot delC/delC białko to nie jest syntezowane, co skutkuje niedoborem fikoliny-3, natomiast u heterozygot, stężenie omawianego czynnika w surowicy jest o około połowę niższe niż u homozygot C/C [217, 219]. Dotychczas opisano dziesięć potwierdzonych badaniem genetycznym przypadków takiego niedoboru [217, 218, 220-223].

2.4.2.3.3. Znaczenie kliniczne fikoliny-3 i polimorfizmów genu *FCN3*

Fikolina-3, podobnie jak opisane wyżej inne czynniki inicjujące aktywację dopełniacza na drodze lektynowej, jest uważana za ważny element odporności wrodzonej, chociaż doniesienia o jej klinicznym znaczeniu są stosunkowo nieliczne. Schlapbach i wsp. zaobserwowali, że jej stężenia u noworodków, u których rozwinęła się sepsa wywołana zakażeniem bakteriami Gram-dodatnimi są niższe, w porównaniu z grupą dzieci zdrowych [201]. Świerzeko i wsp. wykazali, podobną różnicę, niezależną jednak od czynnika etiologicznego, nie tylko u noworodków, lecz także u niemowląt i dzieci starszych. Co ciekawe, mediana stężenia fikoliny-3 u noworodków, u których potwierdzono infekcje, lecz nie doszło do rozwoju sepsy, była wyższa niż w grupie porównawczej i niższa niż w grupie noworodków z zakażeniami ogólnoustrojowymi, jednak obserwowane różnice nie były istotne statystycznie [178]. Niskie stężenie omawianego białka może być również czynnikiem ryzyka wystąpienia gorączki z

neutropenią i sepsy u dzieci chorych na różne rodzaje nowotworów, poddawanych chemoterapii [224]. U dorosłych, u których rozpoznano nowotwory układu krwiotwórczego, nie znaleziono związku między stężeniem fikoliny-3 i przebiegiem choroby [225]. Badania prowadzone w Pracowni Immunobiologii Zakażeń IBM PAN, wykazały znacząco wyższą medianę stężenia fikoliny-3 u pacjentów z rozpoznaną ostrą białaczką szpikową (33,6 µg/ml), w porównaniu z osobami chorymi na szpiczaki mnogie (20,8 µg/ml i chłoniaki (20,3 µg/ml), jak również w porównaniu z grupą kontrolną (19,6 µg/ml) (dane niepublikowane).

Uważa się, że niedobór tego białka jest związany z ciężkimi/nawracającymi infekcjami [218]. Jednak z uwagi na fakt, że opisano stosunkowo niewiele ligandów fikoliny-3 związanych z obligatoryjnymi patogenami, a jednocześnie stężenie tego czynnika w surowicy jest bardzo wysokie, można sugerować, że jego rola polega przede wszystkim na kontrolowaniu fizjologicznej flory bakteryjnej. Białko to może chronić gospodarza przed niekontrolowanym rozprzestrzenianiem się takich drobnoustrojów [221]. Ostatnie doniesienie Trolborg i wsp. wskazują, że niedobór tego białka może zwiększać ryzyko infekcji w dzieciństwie, natomiast u osób dorosłych może mieć związek z rozwojem chorób autoimmunizacyjnych [226].

2.4.3. Interakcje kolektyn i fikolin ze strukturami powierzchniowymi *Mycobacterium* sp.

Omówione w powyższych podrozdziałach białka rozpoznają różne struktury powierzchniowe prątków, co może świadczyć o ich udziale w odpowiedzi na infekcje tymi bakteriami i wpływie na przebieg zakażenia. Wykazano, że antygenami rozpoznawanymi przez MBL są mannozylowany lipoarabinomannan (ManLAM), lipoarabinomannan pozbawiony terminalnych reszt mannozy (AraLAM), lipomannan (LM), fosfatydyloinozytolomannozydy (PIM), dimikolinian trehalozy (TDM, czynnik wiążkowy) *Mycobacterium avium* [38] oraz ManLAM i kompleks p85 prątków *Mycobacterium tuberculosis* [39]. Przyłączenie tej kolektyny do struktur powierzchniowych Mtb aktywuje układ dopełniacza na drodze lektynowej, prowadzi do aglutynacji bakterii i nasila ich fagocytozę *in vitro* [39, 227].

Do ligandów SP-A zalicza się struktury powierzchniowe prątków, takie jak LAM [228, 229], LM, glikoproteinę o masie 60 kDa oraz glikoproteinę Apa [230]. Interakcja SP-A z makrofagami prowadzi do nasilenia fagocytozy komórek *M. tuberculosis* zależnej od receptora mannozowego (MR) [231]. Po zakażeniu Mtb, białko to stymuluje makrofagi do wydzielania czynników zapalnych, i jednocześnie działa przeciwzapalnie na

niezakażone makrofagi, chroniąc w ten sposób niezajęte segmenty płuc [232]. Pasula i wsp. wykazali, że SP-A pośredniczy w wiązaniu prątków do makroflagów alweolarnych myszy ułatwiając ich fagocytozę [233], z drugiej jednak strony białko to przyczynia się do zahamowania wydzielania reaktywnych form azotu (ang. reactive nitrogen species, RNS) przez te komórki, co może pozwalać bakteriom na unikanie mechanizmów obronnych gospodarza [234]. Przeciwnie, Weikert i wsp. wykorzystując prątki *M. bovis*, zaobserwowali, że SP-A nie tylko nasila fagocytozę, lecz także pobudza makrofagi szczurze do syntezy czynników prozapalnych (TNF- α) i RNS [235]. Białko to zwiększa również pochłanianie komórek *Mycobacterium avium* [40] i stymuluje makrofagi do syntezy reaktywnych form azotu [236].

Druga z kolektyn surfaktantu płucnego, SP-D, także rozpoznaje lipoarabinomannan [228, 229], a ponadto glikoproteinę o masie 60 kDa oraz glikoproteinę Apa komórek *M. tuberculosis* [230]. Ferguson i wsp. wykazali, iż w przeciwieństwie do SP-A, hamuje ona proces fagocytozy. Z drugiej strony SP-D wzmacnia zabijanie już pochłoniętych prątków, przez stymulowanie fuzji fagosomu z lizosomem [228, 237]. Odmienne efekty SP-A i SP-D po związaniu z prątkami Mtb, wskazuje na ich różne znaczenie w procesie eliminacji bakterii. Białko SP-D wiąże się, podobnie jak SP-A z powierzchnią *M. avium*, jednak w odróżnieniu od niej, przyczynia się do aglutynacji komórek drobnoustroju [40].

Moliva i wsp. zaobserwowali, że zdolność oddziaływania białek surfaktantu płucnego SP-A i SP-D z prątkami Mtb zmniejsza się wraz z wiekiem. U osób starszych makrofagi nie były w stanie kontrolować wewnątrzkomórkowego namnażania się prątków, dopiero suplementacja funkcjonalnymi białkami przywracała im możliwość kontrolowania zakażenia [238].

Niewiele wiadomo na temat interakcji pomiędzy fikoliną-1 i strukturami powierzchniowymi prątków. Bartłomiejczyk i wsp. zauważyli, że białko to wiąże się do powierzchni *M. tuberculosis* oraz *M. bovis*, prowadząc do aglutynacji i fagocytozy bakterii [39].

Ligandem na powierzchni prątków Mtb, rozpoznawalnym przez fikolinę-2, jest prawdopodobnie mannozylowany LAM (ManLAM), co zaobserwowali Luo i wsp. Fikolina-2 wiążąc się do powierzchni bakterii, ułatwia ich fagocytozę i może przyczyniać się do eliminacji zakażenia przez nasilenie syntezy IFN- γ , IL-17 oraz TNF- α przez makrofagi [239]. W badaniach prowadzonych w Pracowni Immunobiologii Zakażeń IBM PAN wykazano natomiast, że antygenem Mtb

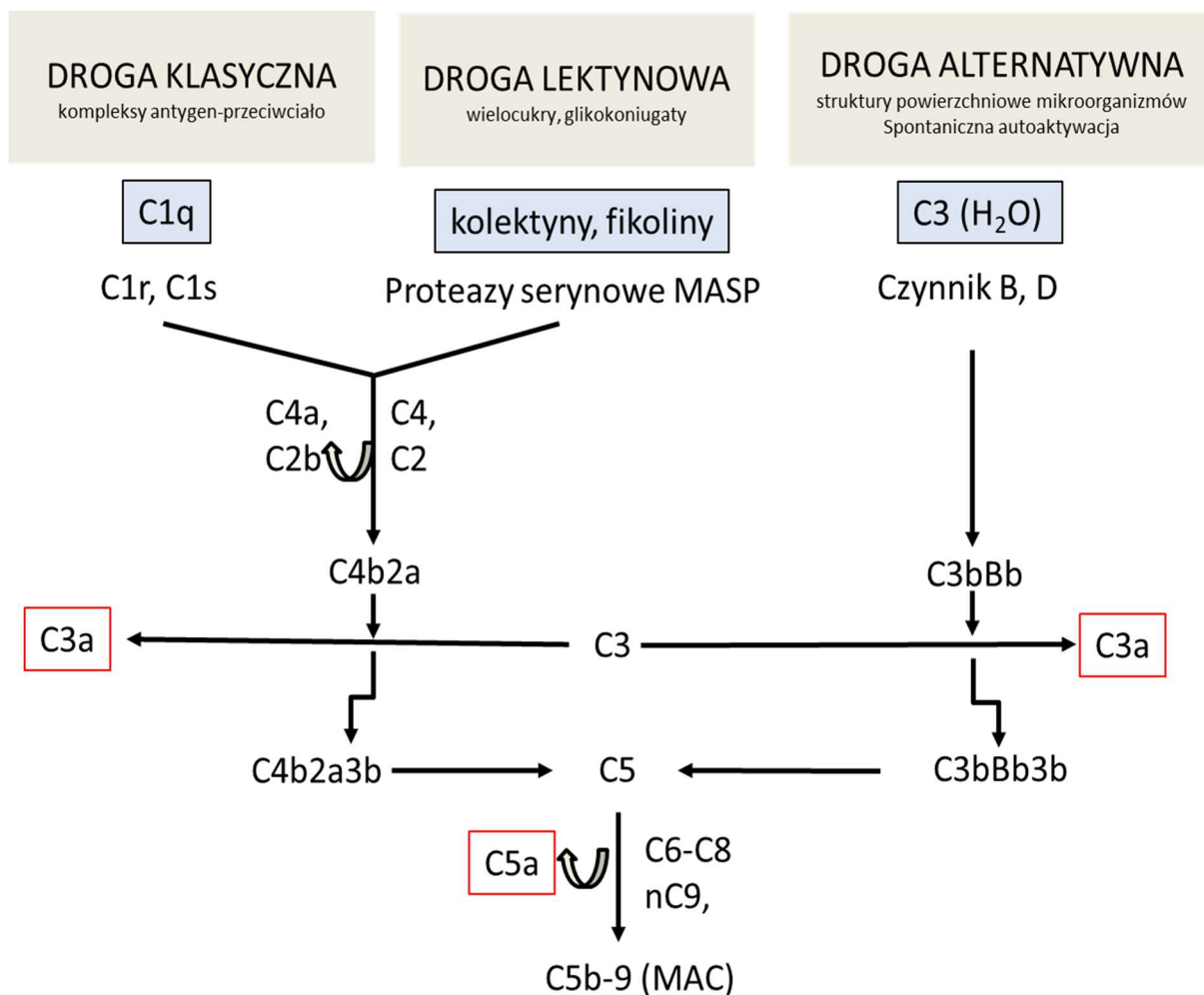
rozpoznawanym przez fikolinę-2 jest kompleks Ag85 [84]. Białko to posiada również zdolność przyłączania się do struktur powierzchniowych innych prątków, *Mycobacterium bovis* [240].

Wśród ligandów fikoliny-3 znajdują się antygeny prątków *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* oraz *M. kansasii* (kompleks Ag85) [84]. Interakcja fikoliny-3 z prątkami prowadzi do ich aglutynacji i ułatwia ich fagocytozę przez makrofagi [39].

2.4.4. Układ dopełniacza

Aktywacja układu dopełniacza została opisana ponad sto lat temu, kiedy zaobserwowano antybakteryjne właściwości termolabilnych składników surowicy [241]. Dopełniacz (komplement) to zespół kilkudziesięciu białek obecnych w osoczu i innych płynach ustrojowych oraz związanych z komórkami. Większość z czynników rozpuszczalnych występuje stale (w warunkach fizjologicznych) w formie nieaktywnej, a ich aktywacja (np. po rozpoznaniu komórki bakteryjnej czy nowotworowej) następuje w sposób kaskadowy, co oznacza, że każdy kolejny składnik aktywuje następny. Układ dopełniacza ułatwia fagocytozę czynników infekcyjnych, dzięki właściwościom opsonizacyjnym niektórych produktów jego aktywacji (np. C3b i C3bi) [242]. Nasila stan zapalny, co wpływa chemotaktycznie na neutrofile i makrofagi [243] oraz ma bezpośrednie właściwości bójcze, poprzez wytworzenie kompleksu ataku błonowego (ang. membrane attack complex, MAC), co skutkuje lizą komórki [244]. Przy zaburzonej regulacji aktywności dopełniacza, nadmierna jego aktywacja może prowadzić do stanów patologicznych, takich jak wstrząs anafilaktyczny czy przewlekłe zapalenie.

Wyróżnia się trzy główne drogi aktywacji omawianego układu: klasyczną (ang. classical pathway, CP), alternatywną (ang. alternative pathway, AP) i lektynową (ang. lectin pathway, LP). Mają one różne mechanizmy inicjacji, jednak ich końcowe etapy są identyczne, w związku z czym określane są mianem drogi wspólnej (ang. common pathway) (ryc. 12).



Ryc. 12. Schemat przebiegu dróg aktywacji układu dopełniacza (według Hallstrom i wsp. [245], zmodyfikowano). Czerwonymi ramkami zaznaczono uwalniane anafilatoksyny.

2.4.4.1. Droga klasyczna

Aktywacja dopełniacza na drodze klasycznej wymaga utworzenia kompleksu antygen-przeciwciała lub związania białka C-reaktywnego do polisacharydów występujących na powierzchni komórki docelowej [246]. Do takich kompleksów przyłącza się składnik C1, który składa się z pojedynczej cząsteczki C1q, dwóch C1s i dwóch C1r. C1q pełni rolę czynnika rozpoznania, natomiast C1r i C1s posiadają właściwości proteaz serynowych. Związanie C1 do kompleksu antygen-przeciwciała prowadzi do zmian konformacyjnych i autoaktywacji C1r, która następnie trawi cząsteczkę C1s, powodując jej aktywację. Pod wpływem C1s, proteolizie ulega składnik C4. Wynikiem tego procesu jest powstawanie fragmentów C4a i C4b. C4b zostaje związany kowalencyjnie do grup aminowych bądź hydroksylowych cząsteczek obecnych na powierzchni komórki docelowej, natomiast C4a jest uwalniany do środowiska. Do C4b przyłącza się

kolejny składnik - C2, który zostaje substratem dla proteazy C1s. W wyniku trawienia, powstają fragmenty C2a (który pozostaje związany z C4b) oraz C2b (który zostaje uwolniony). Utworzony kompleks C4b2a, określany mianem konwertazy dla C3, posiada właściwości aktywujące względem tego składnika. W wyniku proteolizy C3 uwalniana jest silna anafilatoksyna C3a, natomiast fragment C3b pozostaje w kompleksie z C4b2a, tworząc konwertazę dla kolejnego składnika - C5 (C4b2a3b).

Uwolniony pod jej wpływem fragment C5a działa również, jako silna anafilatoksyna, natomiast fragment C5b zostaje wbudowany w osłony komórkowe.

Dalszy przebieg aktywacji przebiega wspomnianą wyżej drogą wspólną, identyczną dla CP, AP i LP. Do C5b przyłączają się składniki C6 i C7, tworząc kompleks C5bC6C7 o właściwościach hydrofobowych, który następnie wnika w dwuwarstwą lipidową osłon komórkowych. Następnie dołącza się składnik C8 oraz 14 cząsteczek C9, co prowadzi do utworzenia kompleksu ataku błonowego C5b-9 (MAC). Przerwanie ciągłości struktur powierzchniowych prowadzi do wypływu jonów, ATP, substancji odżywczych i napływu wody, co skutkuje lizą komórki [247-249].

2.4.4.2. Droga alternatywna

Aktywacja dopełniacza na drodze alternatywnej odbywa się bez udziału przeciwciał. Jest ona inicjowana spontanicznie, w sposób ciągły, kontrolowany dzięki odpowiednim mechanizmom regulacyjnym. Jej aktywatorami są struktury powierzchniowe mikroorganizmów i wirusów jak również kompleksy immunologiczne. Występujący konstytutywnie w osoczu składnik C3 ulega hydrolizie, przekształcając się w aktywną formę C3i, która wiąże czynnik B, czyniąc go wrażliwym na enzymatyczne działanie składnika D. W wyniku trawienia cząsteczki B powstają dwa fragmenty: Ba, który jest uwalniany oraz Bb, pozostający w kompleksie z C3i. Kompleks C3iBb ma charakter rozpuszczalnej konwertazy dla C3. Pod wpływem jego działania powstają fragmenty C3a (jak wspomniano, silna anafilatoksyna) i C3b, który w formie wolnej jest bardzo nietrwały i zazwyczaj natychmiast ulega hydrolizie. Jednak, w przypadku związania z powierzchnią komórki docelowej, może przyłączyć cząsteczkę czynnika B. Po jej strawieniu przez składnik D, powstaje powierzchniowa forma konwertazy C3 drogi alternatywnej (C3bBb), która stabilizowana jest przez properdynę czyli czynnik P. Umożliwia to aktywację kolejnej cząsteczki C3, co prowadzi do powstania konwertazy dla C5 (C3bBb3b). W wyniku jej działania powstaje anafilatoksyna C5a oraz fragment C5b, po wbudowaniu którego w błonę komórkową, rozpoczyna się tworzenie MAC [247, 248].

W aktywacji układu dopełniacza omawianą drogą biorą udział również proteazy serynowe drogi lektynowej - MASP. Takahashi i wsp. zaobserwowali, że u myszy z niedoborem MASP-1 oraz MASP-3 nie dochodzi do aktywacji drogi alternatywnej. Zdolność aktywnej MASP-3, której aktywatorem jest MASP-1 do trawienia czynnika D może być kluczowa w przebiegu tej drogi aktywacji układu dopełniacza [250, 251].

2.4.4.3. Droga lektynowa

Aktywacja dopełniacza na drodze lektynowej (LP) nie wymaga obecności przeciwciał. Dlatego też uznawana jest za jeden z istotnych mechanizmów pierwszej fazy odpowiedzi odpornościowej organizmu na zakażenie [252]. Podobnie jak w przypadku drogi alternatywnej, jej aktywatorami są struktury powierzchniowe komórek, np. polisacharydy czy glikokoniugaty. Jednak w jej przebieg, podobnie do drogi klasycznej, zaangażowane są składniki C4 i C2. Jak wspomniano, zdolność inicjowania aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej mają niektóre kolektyny (lektyna wiążąca mannozę, kolektyna 10, kolektyna 11) oraz fikoliny (fikolina-1, fikolina-2, fikolina-3), które są czynnikami rozpoznania, występującymi w kompleksach z proteazami serynowymi i nieaktywnymi enzymatycznie białkami rodziny MASP [253]. Kompleksy te są odpowiednikami C1q₂s₂ drogi klasycznej. Po rozpoznaniu PAMP przez fikolinę lub kolektynę, następują zmiany konformacyjne, co umożliwia autoaktywację MASP-1. Trawi ona proenzym MASP-2, powodując jego przekształcenie do formy aktywnej [254]. Substratami MASP-2 (podobnie jak C1s) są C4 i C2. Tak, jak w przebiegu aktywacji na drodze klasycznej, ze składnika C4 uwalniany jest fragment C4a, natomiast C4b przyłącza się do powierzchni komórki docelowej. Następuje związanie, a następnie proteoliza C2, co prowadzi do powstania konwertazy C3 (C4b2a). Również konwertaza dla C5 (C4b2a3b) ma postać identyczną, jak opisano wyżej omawiając CP [247-249, 255].

2.4.5. Proteazy serynowe związane z MBL i fikolinami (MASP) oraz białka pokrewne

Do rodziny MASP zaliczane są trzy enzymy (MASP-1, MASP-2, MASP-3) oraz dwa pozbawione właściwości enzymatycznych białka związane z MBL lub fikolinami, o masach 19 kDa (ang. MBL-associated protein, 19 kDa, MAp19) i 44 kDa (odpowiednio: MAp44). MAp19 określane jest także, jako małe białko związane z MBL (ang. small MBL-associated protein, sMAP), natomiast MAp44 - jako MAP-1 [256, 257]. Wspomniane czynniki są produktami dwóch genów: *MASPI/3* i *MASP2* [258]. W wyniku alternatywnego składowania pierwotnego transkryptu genu *MASPI/3*

powstają cząsteczki mRNA swoiste dla MASP-1, MASP-3 oraz MAp44, natomiast *MASP2* jest odpowiedzialny za syntezę MASP-2 i MAp19 [259].

Proteazy MASP są homologami enzymów uczestniczących w inicjowaniu aktywacji dopełniacza na drodze klasycznej - C1r oraz C1s. Występują one w postaci nieaktywnej (zymogen), jako pojedyncze łańcuchy polipeptydowe. Po aktywacji przekształcają się w formę złożoną z dwóch łańcuchów: ciężkiego (ang. heavy, H) oraz lekkiego (ang. light, L), stanowiącego domenę proteazy serynowej (ang. serine protease, SP), połączonych mostkiem disiarczkowym. W skład łańcucha H wchodzi pięć domen. Na końcu N znajduje się fragment CUB1 (jego nazwa pochodzi od białek wykazujących podobieństwo strukturalne: C1r i C1s, UEGF (czynnik wzrostu jeżowca, ang. sea urchin epidermal growth factor), BMP-1 (morfogenetyczne białko kości typu 1, ang. bone morphogenic protein). Kolejne domeny, to EGF (o strukturze podobnej do nabłonkowego czynnika wzrostu, ang. epidermal growth factor), CUB2 i dwa fragmenty CCP (CCP1 i CCP2, domeny białkowe kontroli dopełniacza, ang. complement control protein). Domeny CUB1, EGF oraz CUB2 odpowiedzialne są za dimeryzację cząsteczek MASP oraz tworzenie kompleksów z kolektynami i fikolinami (proces ten jest zależny od obecności jonów Ca^{2+}). Białka MAp44 i MAp19 pozbawione są domeny proteazy serynowej. Pierwsze z nich obejmuje domeny CUB1, EGF, CUB2 i CCP1 (wspólne z MASP-1 i MASP-3) oraz charakterystyczną dla niego sekwencję 17 reszt AA, natomiast drugie - domeny CUB1 i EGF (wspólne z MASP-2) oraz cztery specyficzne reszty aminokwasów (EQSL) na końcu C [256, 260, 261].

2.4.5.1. Proteazy serynowe MASP-1 i MASP-3 oraz białko nieenzymatyczne MAp44 jako produkty genu *MASPI/3*

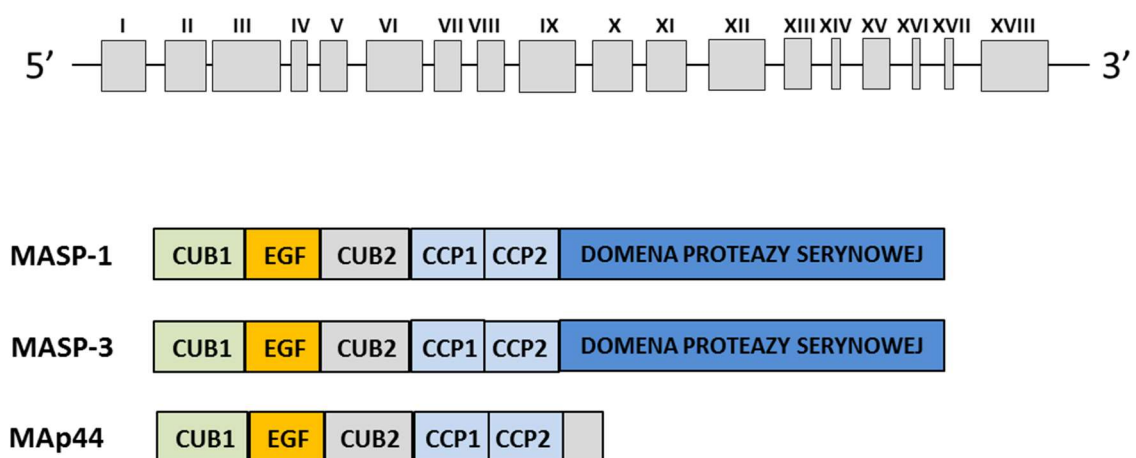
Ulegająca autoaktywacji proteaza MASP-1 jest, jak wspomniano, enzymem niezbędnym do zainicjowania aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej [254]. Obok zymogenu MASP-2, jej substratami są składnik C2 związany z C4b oraz C3 (z niską wydajnością) lecz nie C4. Dlatego, aktywacja dopełniacza na drodze lektynowej zachodzi jedynie, gdy kompleksy z kolektynami/fikolinami tworzą zarówno MASP-1, jak i MASP-2 [262]. Ostatnio, Parej i wsp. (2018) opisali udział MASP-1 w aktywacji dopełniacza na drodze alternatywnej przez lipopolisacharydy bakterii Gram-ujemnych [263]. Omawiany enzym odgrywa też kluczową rolę w zjawisku „cross-talk” między układami dopełniacza i krzepnięcia: trawi fibrynogen, czynnik XIII i protrombinę [264, 265]. Co więcej, MASP-1 może indukować tworzenie skrzepu nawet w osoczu niskopłytkowym [266]. Ma ponadto zdolność aktywacji receptora

aktywowanego proteazami PAR4 (protease-activated receptor 4), co przyczynia się do rozwoju reakcji zapalnej [267], a także uwalniania bradykininy (BK) z wysokocząsteczkowego kininogenu uczestnicząc w aktywacji układu kalikreina-kinina [268].

Pozostałe produkty genu *MASPI/3*, proteaza MASP-3 oraz białko nieenzymatyczne MAp44, prawdopodobnie pełnią funkcję regulatorową, poprzez konkutowanie o miejsce wiązania do czynników rozpoznania drogi lektynowej [256, 269]. MASP-3 tworzy kompleksy głównie z fikoliną-3, czynnikiem LP występującym w surowicy w najwyższym stężeniu, co może hamować nadmierną aktywację dopełniacza, natomiast jej kompleksy z MBL czy fikoliną-2 występują w stosunkowo niewielkich ilościach [256, 257]. Ostatnio uważa się, że enzym ten nie tylko reguluje aktywację dopełniacza na drodze lektynowej, lecz, jak wspomniano, może także uczestniczyć w aktywowaniu czynnika D drogi alternatywnej [270, 271].

2.4.5.1.1. Gen *MASPI/3* i ekspresja kodowanych przez niego białek

Gen *MASPI/3* zlokalizowany jest na chromosomie 3 w regionie 3.q27-28 [272]. Obejmuje on 18 eksonów. Region 5'-UTR kodowany jest przez ekson 1. Domeny wspólne dla wszystkich produktów kodowane są przez eksony 1-8, domena CCP-2 łańcucha ciężkiego MASP-1 oraz MASP-3 – 10-11, natomiast domeny proteazy serynowej przez eksony 13-18 (MASP-1) oraz 12 (MASP-3). Ekson 18 koduje również 3'-UTR. Ekson 9 odpowiedzialny jest za sekwencję 17 aminokwasów końca N MAp44 [273]. Schemat organizacji omawianego genu oraz jego produktów białkowych przedstawiono na ryc. 13.



Ryc. 13. Schemat organizacji genu *MASPI/3* oraz dojrzałych białek MASP-1, MASP-3 oraz MAp44 (wg Beltrame i wsp. [274], zmodyfikowano).

Głównym miejscem ekspresji genu *MASP1/3* jest wątroba, jednak obecność mRNA swoistego dla MASP-1 odnotowano w łożysku, szyjce macicy, pęcherzu moczowym, okrężnicy, jelicie cienkim, sercu, płucach, nerkach, jądrach i mózgu [256], a dla MASP-3 - w okrężnicy, pęcherzu moczowym i macicy [66, 269]. Najwyższą ekspresję MAp44 obserwowano w komórkach mięśnia sercowego, a znacznie niższą - w wątrobie, mózgu, szyjce macicy oraz mięśniach szkieletowych [257]. Wszystkie produkty genu *MASP1/3* obecne są w surowicy. W warunkach fizjologicznych, stężenie proteazy MASP-1 jest najwyższe (średnia u osób dorosłych 11 µg/ml) [169, 274-276], nieco niższą wartość odnotowano w przypadku MASP-3 (6-7 µg/ml) [257]. Przeciętny poziom MAp44 wynosi około 2 µg/ml [169, 256]. Stężenie MASP-1 w krwi jest wyższe u kobiet a stężenie MASP-3 – u mężczyzn. U osób dorosłych nie zaobserwowano istotnych różnic stężeń tych enzymów (jak również MAp44) w surowicy, w zależności od wieku [169]. Badania *in vitro* wykazały, że ekspresja mRNA swoistego dla MASP-1 ulega nasileniu pod wpływem interleukiny 6 (IL-6) i deksametazonu [277]. Ponadto, znaczący wzrost poziomu MASP-1 i MAp44 (lecz nie MASP-3) obserwuje się po zabiegach chirurgicznych (w czasie 4-20 dni), co sugeruje, że są to białka fazy ostrej [203, 269].

2.4.5.1.2. Polimorfizmy genu *MASP1/3* i ich wpływ na stężenie jego produktów w surowicy

Ammitzball i wsp. (2013), badając 15 polimorfizmów genu *MASP1/3*, stwierdzili znaczący wpływ 10 z nich na stężenie MASP-1, -3 i/lub MAp44 w surowicy. Na przykład, warianty polimorficzne: G (+44153 A>G; rs3774275), T (+45121 T>C; rs698090) i A (+56100 G>A; rs67143992) związane są z wyższym stężeniem MASP-1 i MAp44 oraz niższym MASP-3, natomiast warianty A (-1418 T>A; rs35089177) oraz C (+47837 A>C; rs72549154) - z efektem przeciwnym. U heterozygot pod względem polimorfizmu +2464 G>A (rs190590338), obserwuje się znacznie (nawet o 35%) wyższe stężenia MASP-1 niż u homozygot G/G [273].

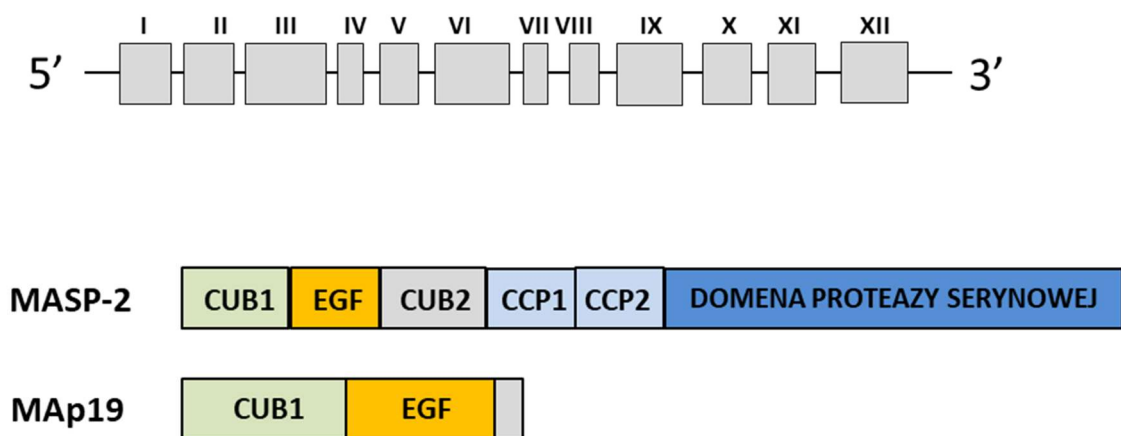
2.4.5.2. Proteaza serynowa MASP-2 oraz białko nieenzymatyczne MAp19 jako produkty genu *MASP2*

Proteaza serynowa MASP-2 oraz białko nieposiadające właściwości enzymatycznych MAp19 są, jak wspomniano, wariantami alternatywnego dojrzewania mRNA genu *MASP2*. MASP-2 jest kluczowym enzymem w aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej. Jej aktywność lityczna w stosunku do C2, a zwłaszcza C4 jest znacznie

wyższa niż aktywność C1s drogi klasycznej. Proteaza ta ma również zdolność trawienia, z niewielką wydajnością, składnika C3 [253, 278]. MASP-2 może nasilać aktywację kaskady krzepnięcia, gdyż w wyniku jej działania na protrombinę powstaje trombina [279]. Drugi produkt genu *MASP2*, białko MAp19, pozbawione domeny proteazowej, przypuszczalnie pełni rolę czynnika regulującego aktywację dopełniacza, poprzez współzawodniczenie z MASP-2 o miejsce wiązania do kolektyn lub fikolin. Jednak Degn i wsp. wykazali, że powinowactwo MAp19 do czynników rozpoznania drogi lektynowej jest dziesięciokrotnie niższe w porównaniu z MASP-2. Poza krwią, obecność omawianego białka stwierdzono w moczu, co może sugerować jego rolę w hamowaniu powstawania kamieni nerkowych [280].

2.4.5.2.1. Gen *MASP2* i ekspresja kodowanych przez niego białek

Gen *MASP2*, znajdujący się na chromosomie 1 w pozycji 1p36.23-31 obejmuje 12 eksonów (ryc. 14), z których pierwszy koduje fragment nieulegający translacji końca 5' oraz część peptydu sygnałowego, ekson drugi – dalszą część peptydu sygnałowego oraz, wraz z eksonem 3, domenę CUB1, natomiast ekson 4 – domenę EGF. Wymienione fragmenty są wspólne dla MASP-2 oraz MAp19. Ekson 5 koduje fragment specyficzny dla białka MAp19. Kolejne eksony odpowiadają za sekwencję aminokwasową domeny CUB2 (6 i 7), CCP1 (8 i 9), CCP2 (10 i 11) oraz SP i regionu UTR końca 3'(12), swoistych dla MASP-2 [281, 282].



Ryc. 14. Schemat organizacji genu *MASP2* oraz dojrzałych białek MAp19 i MASP-2 (wg Beltrame i wsp. [274], zmodyfikowano).

MASP-2 jest syntezowana głównie przez hepatocyty, jednak obecność swoistego mRNA wykazano również w jelicie cienkim [66]. Jej stężenie w surowicy jest najniższe

pośród proteaz serynowych LP i wynosi około 0,5 µg/ml [283]. Białko MAp19 syntezowane jest również w wątrobie, a jego poziom w surowicy wynosi około 0,2 µg/ml [261].

2.4.5.2.2. Polimorfizmy genu *MASP2* i ich wpływ na stężenie MASP-2 w surowicy oraz jej aktywność

Do najszerszej badanych i omawianych w literaturze polimorfizmów pojedynczych nukleotydów genu *MASP2*, wpływających na aktywność i stężenie jego produktów w surowicy należy SNP zlokalizowany w eksonie 3 w pozycji +359 A>G (kodon 120; Asp120Gly; rs72550870). W wyniku zastąpienia reszty kwasu asparaginowego glicyną w domenie CUB1, MASP-2 i MAp19 tracą zdolność tworzenia kompleksów z kolektynami i fikolinami [284]. U homozygot G/G obserwuje się całkowity niedobór MASP-2 (jak również MAp19), co skutkuje brakiem aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej. U heterozygot, stężenie tego enzymu w surowicy jest znacząco niższe niż u osób o genotypie A/A [281]. Dotychczas opisano 13 przypadków pierwotnego niedoboru MASP-2/MAp19 [285, 286].

Na poziom proteazy MASP-2 w surowicy znaczący wpływ mają również polimorfizmy w pozycjach: +377 C>T (rs56392418), +1130 T>C (rs2273346) oraz +1316 G>A (rs12085877). U homozygot T/T (SNP w pozycji +377) oraz A/A (SNP w pozycji +1316) zaobserwowano także upośledzenie aktywacji dopełniacza [287]. Niedobór MASP-2 może być również związany z duplikacją czterech aminokwasów w domenie EGF (p.156_159dupCHNH; rs2273343). Skutkiem tej mutacji, dotychczas zanotowanej jedynie w populacji chińskiej, są prawdopodobnie zmiany konformacyjne, które upośledzają wydzielanie enzymu na zewnątrz komórki [282, 284, 288].

2.4.6. Receptory Toll-podobne

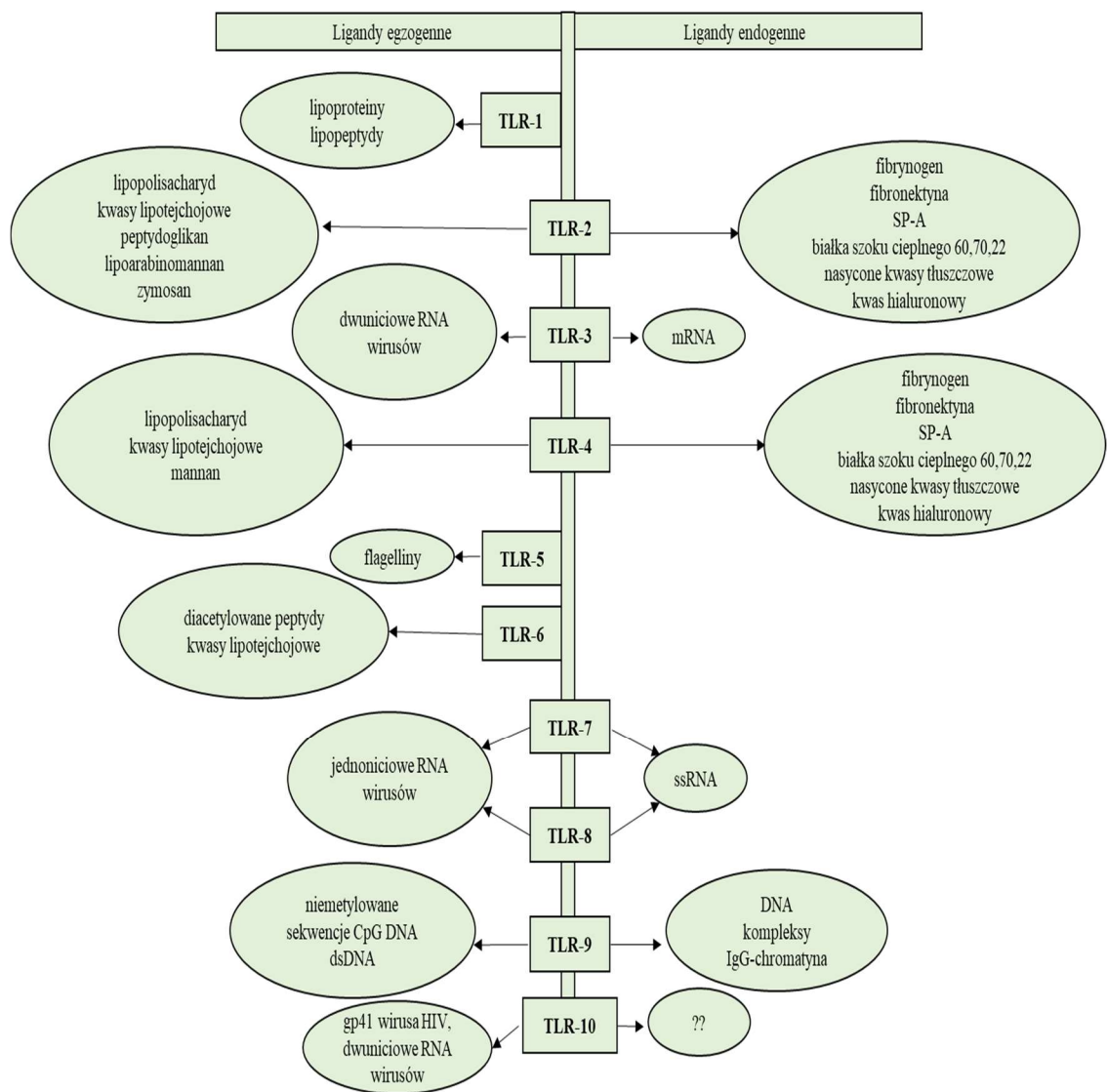
2.4.6.1. Ogólna charakterystyka receptorów TLR

Nazwa rodziny receptorów Toll-podobnych pochodzi od białka Toll występującego u *Drosophila melanogaster*, co związane jest z wysoką homologią sekwencji. Występują one na powierzchni leukocytów, komórek nabłonkowych, śródbłonna naczyń, kardiomiocytów, fibroblastów, keratynocytów lub wewnątrzkomórkowo [289]. Są ważnymi elementami odpowiedzi odpornościowej w zakażeniach bakteryjnych, wirusowych i grzybiczych. Po związaniu ze swoistymi ligandami, inicjują kaskadę reakcji, prowadzącą do syntezy mediatorów reakcji zapalnej, bezpośredniej aktywności bójczej, apoptozy bądź modulowania innych mechanizmów odpowiedzi [290]. U

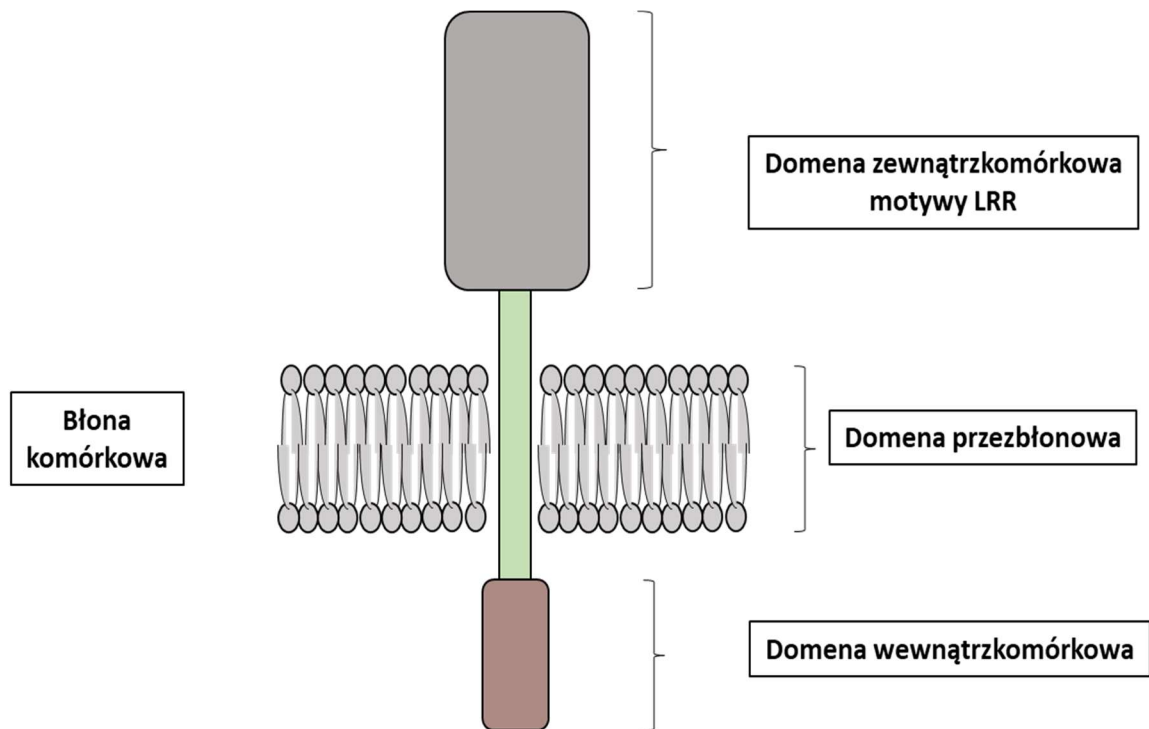
człowieka opisano dotychczas 10 białek należących do grupy receptorów Toll-podobnych (TLR-1-10) oraz 3 pseudogeny (*TLR11*, *TLR12*, *TLR13*) [291, 292]. Ekspresja TLR obserwowana jest w wielu tkankach, mRNA dla każdego z tych receptorów wykrywa się w śledzionie oraz krwi [293].

Ze względu na lokalizację, w omawianej rodzinie wyróżnia się receptory występujące w błonie komórkowej (receptory zaliczone do podrodziny TLR-1 (TLR-1, -2, -6 i -10), a także TLR-4 i TLR-5 oraz ulegające ekspresji w błonach organelli wewnątrzkomórkowych, np. endosomów (TLR-3, TLR-7, -8, -9). Pierwsze z wymienionych rozpoznają zazwyczaj struktury powierzchniowe drobnoustrojów, natomiast pozostałe - produkty degradacji mikroorganizmów pochłoniętych w procesie fagocytozy np. kwasy nukleinowe wirusów czy bakterii [294]. Receptory należące do rodziny Toll, występujące u człowieka, wraz z ich egzogennymi i endogennymi ligandami zostały przedstawione na ryc. 15.

TLR są glikoproteinami typu I o masie cząsteczkowej wynoszącej około 100 kDa. Jako białka transmembranowe, obejmują trzy domeny: odpowiedzialną za rozpoznanie ligandu (zlokalizowaną na końcu N), przezbłonową o charakterze α -helisy oraz sygnałową, na końcu C. Domenę rozpoznającą ligandy nazywa się również zewnątrzkomórkową (lub ektodomeną, ang. N-terminal ectodomain ECD) (ryc. 16). W przypadku receptorów wewnątrzkomórkowych, jest ona jednak skierowana do wnętrza organelli. Jej cechą charakterystyczną jest obecność powtarzających się motywów bogatych w reszty leucyny (ang. leucin-rich repeats, LRR). W skład ECD wchodzi od 550 do 800 reszt aminokwasów, w tym 16-28 powtórzeń LRR [295]. Motyw taki obejmuje konserwatywną ewolucyjnie sekwencję LxxLxLxxN (gdzie L – leucyna, N – asparagina, x – dowolny aminokwas) oraz region zmienny (łącznie 20-30 AA). Na obu końcach domeny zewnątrzkomórkowej znajdują się fragmenty bogate w reszty cysteinowe, które tworząc mostki disiarczkowe stabilizują motywy LRR [295].



Ryc. 15. Receptory TLR występujące u człowieka i wybrane ligandy. Schemat według Midwood i wsp., Akirę i wsp., Henrick i wsp. oraz Lee i wsp. [296-299], zmodyfikowano.



Ryc. 16. Schemat struktury receptorów Toll-podobnych (wg Harsini i wsp. [300], zmodyfikowano).

Przezbłonowa helisa zbudowana jest z 20-30 reszt aminokwasów [301]. Łączy się ona z domeną wewnętrzkomórkową, która zwana jest również sygnałową lub TIR (ang. Toll/interleukin 1 receptor), ze względu na wysoki stopień homologii do receptora dla interleukiny 1 (IL-1R1) [302]. W jej skład wchodzi około 200 reszt AA [301]. Fragment ten jest odpowiedzialny za inicjację wewnątrzkomórkowego szlaku transdukcji sygnału. Po rozpoznaniu i związaniu odpowiedniego ligandu do domeny zewnętrzkomórkowej, zachodzące w niej niewielkie zmiany konformacyjne powodują dimeryzację receptorów. Do dimerów domen TIR przyłączają się wtedy białka adaptorowe, co z kolei prowadzi do utworzenia kompleksów z kinazami IRAK (ang. interleukin 1 receptor-associated kinase) [303-305].

2.4.6.2. Receptory TLR zaangażowane w odpowiedź przeciwpłatkową

Wśród szerokiego spektrum rozpoznawanych przez receptory TLR ligandów znajdują się antygeny *Mycobacterium tuberculosis*. W odpowiedź przeciwpłatkową zaangażowany jest TLR-2, tworzące z nim heterodimery TLR-1 i TLR-6 oraz receptor TLR-4 wraz z koreceptorem MD2. Krótką charakterystykę wymienionych cząsteczek zamieszczono w tabeli 8.

Receptor TLR-2 występuje na powierzchni komórek układu odpornościowego, jak również w formie rozpuszczalnej, w surowicy i mleku. Łączy się on z niektórymi antygenami różnicowania komórek CD (ang. cluster of differentiation), m.in. CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD14, również mającymi charakter receptorów [306]. Może występować w postaci monomeru bądź tworzyć homodimery, a także wspomniane wyżej heterodimery z cząsteczkami TLR-1 lub TLR-6. Jako homodimer rozpoznaje lipopolisacharydy, lipoproteiny, peptydoglikan, kwasy lipotejchowe (*Staph. aureus*; *Str. pneumoniae*), lipoarabinomannan, arabinogalaktan, glikolipidy oraz poryny bakterii. Receptor ten wiąże ponadto białko szoku cieplnego HSP70 prątków gruźlicy, glikoproteinę B wirusa opryszczki (Herpes simplex virus, HSV) [307], osłonki wirusów ospy wietrznej i półpaśca (Varicella zoster virus, VZV), a także Epstein-Barr (Epstein-Barr virus, EBV) [308]. Dimer TLR-2-TLR-1 rozpoznaje triacylowane peptydy występujące u mykobakterii [309], m.in. lipoproteiny 19 kDa i 33 kDa *Mycobacterium leprae* [310], jak również syntetyczny triacylowany peptyd Pam3CSK4 [311, 312]. Ligandami heterodimeru TLR-2-TLR-6 są zymosan (składnik ściany komórkowej drożdży) [313], białka mykoplazm, peptydoglikan, modulina gronkowcowa oraz białko fuzyjne F wirusa RS [289]. Dimer ten rozpoznaje również diacylowane lipopetydy *Mycobacterium*. W badaniach *in vitro* wykazano, iż receptor TLR-2 jest niezbędny do indukcji odpowiedzi na zakażenie prątkami gruźlicy. Makrofagi po stymulacji antygenami prątków uwalniały TNF α oraz inne cytokiny prozapalne. Zablokowanie receptorów TLR-2 na powierzchni tych komórek skutkowało brakiem syntezy TNF α przez makrofagi i upośledzeniem ich aktywności bójczej [314].

Tabela 8. Wybrane receptory TLR zaangażowane w odpowiedź na zakażenie *Mycobacterium tuberculosis* [309, 314, 315].

	TLR-1	TLR-2	TLR-4	TLR-6
lokalizacja genu	4p14	4q32	9q32-33	4p14
liczba AA	786	784	839	796
masa cząsteczkowa (kDa)	84	84	90	91
liczba powtórzeń LRR	19	19	21	19
występowanie	monocyty, neutrofile, komórki dendrytyczne	monocyty, neutrofile, makrofagi, komórki dendrytyczne	monocyty, komórki tuczne, komórki dendrytyczne	monocyty, neutrofile, komórki dendrytyczne
rozpoznawane antygeny <i>Mycobacterium</i>	w kompleksie z TLR-2 triacylowane lipopeptydy	LAM, arabinogalaktan HSP70	HSP65, HSP70	w kompleksie z TLR-2 diacylowane lipopeptydy

Receptor TLR-4 również występuje w kompleksach z innymi białkami. Do jego prawidłowego funkcjonowania niezbędna jest cząsteczka MD2 [316, 317]. Jednym z podstawowych ligandów dla TLR-4/MD2 jest lipopolisacharyd, dlatego uważa się, iż receptor ten jest niezbędny w odpowiedzi na zakażenia, których czynnikami etiologicznymi są bakterie Gram-ujemne. Rozpoznanie LPS przez ten kompleks wymaga obecności innego białka, CD14. Cząsteczka CD14 charakteryzuje się wysokim powinowactwem do LPS, jednak nie jest zdolna do przekazania sygnału do wnętrza komórki [318]. Strukturami docelowymi dla kompleksu TLR-4/MD2 są także termolabilne białka HSP65 oraz HSP70 mykobakterii jak również białko HSP60 *Chlamydia pneumoniae* [315, 319]. Abel i wsp. wykorzystując model myszy wykazali, że receptor ten jest niezbędny do eliminacji prątków *Mycobacterium tuberculosis* [320]. Z drugiej strony Rejling i wsp. nie zaobserwowali różnic w podatności na zakażenie Mtb u myszy z normalną ekspresją TLR-4 jak i jej pozbawionych [321].

Jak wspomniano, przekazanie sygnału do wnętrza komórki po związaniu ligandu przez receptor TLR wymaga udziału białek adaptorowych, które indukują transdukcję sygnału, prowadzą do aktywacji czynników transkrypcyjnych i w konsekwencji syntezy czynników prozapalnych.

2.4.6.3. Szlaki aktywacji receptorów TLR

Szlaki sygnałowe uruchamiane przez receptory TLR prowadzą do aktywacji kilku głównych czynników transkrypcyjnych: czynnika jądrowego κ B (ang. nuclear factor κ -light chain-enhancer of activated B cells, NF κ B), AP-1 (ang. activator protein-1) oraz IRF-3, -5 i -7 (ang. interferon regulatory factor). Aktywacja dwóch pierwszych skutkuje ekspresją wielu genów, prowadzącą do uwolnienia cytokin i chemokin (TNF α ; interleukiny IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 czy IL-18). Czynniki transkrypcyjne IRF regulują natomiast ekspresję genów kodujących interferony typu I, IFN- α i IFN- β . Przekazywanie sygnału przez receptory TLR przebiega przy zaangażowaniu wielu białek adaptorowych i kinaz. Są to takie białka jak MyD88 (ang. myeloid differentiation primary response protein, 88 kDa), TIRAP/Mal (ang. MyD88 adaptor-like/Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein), TRIF/TICAM1 (ang. TIR domain-containing adaptor inducing interferon- β /TIR domain-containing adaptor molecule 1), TRAM/TICAM2 (ang. TRIF-related adaptor molecule/TIR domain-containing adaptor molecule 2). Grupę kinaz zaangażowanych w aktywację czynników transkrypcyjnych reprezentują: kinaza IRAK (ang. interleukin-1 receptor-associated kinase), kinaza TAK1 (ang. TGF- β -activated kinase), którym towarzyszą białka wiążące kinazę TAK1-TAB (ang. TAK1-binding proteins) oraz czynnik związany z receptorem czynnika martwicy nowotworu – TRAF6 (ang. TNF-receptor associated factor 6).

2.4.6.3.1. Szlak zależny od białka MyD88

Głównym szlakiem przekazywania sygnału dla większości TLR (z wyjątkiem TLR-3) jest szlak zależny od białka adaptorowego MyD88, które wiąże się do domeny wewnątrzkomórkowej receptora. Receptor TLR-4 może przekazywać sygnał w sposób zależny, ale także niezależny od MyD88. Połączenie domeny TIR receptorów TLR oraz białka MyD88 może odbywać się w sposób bezpośredni, jak to obserwowane jest w przypadku receptorów TLR-5, -7 oraz -9 bądź za pośrednictwem białka adaptorowego TIRAP/Mal, jak w przypadku TLR-1, TLR-2, TLR-4 i TLR-6 [322]. W kolejnym etapie, po aktywacji kinazy IRAK4, następuje aktywacja kinazy – IRAK1. Aktywna

IRAK1 zostaje uwolniona do cytoplazmy, gdzie po jej wpływie TRAF6 ulega fosforylacji, aktywując kompleks TAK1-TAB1,2, w którym TAB1 i TAB2 są białkami adaptorowymi TAK1. Aktywny kompleks TAK1/TAB pobudza kinazy czynnika I κ B (ang. I κ B kinase, IKK) oraz MAP (ang. mitogen-activated protein). W wyniku działania IKK dochodzi do degradacji inhibitora NF- κ B, białka I κ B α , i uwolnienia tego czynnika transkrypcyjnego. Przemieszcza się on następnie do jądra komórkowego i indukuje ekspresję genów kodujących cytokiny prozapalne [323, 324]. W wyniku fosforylacji przez aktywną IKK kinaz z rodziny MAP dochodzi do aktywacji kolejnych kinaz: JNK (ang. Jun N-terminal kinase) oraz p38 (kinaza o m. cz. 38 kDa), co prowadzi do stymulacji czynnika transkrypcyjnego AP1 (ang. activator protein 1), który również translokowany jest do jądra komórkowego, co skutkuje indukcją genów odpowiedzialnych za ekspresję czynników prozapalnych.

2.4.6.3.2. Szlak niezależny od białka MyD88

Aktywacja syntezy mediatorów reakcji zapalnej może wykorzystywać szlak niezależny od białka MyD88. Przebiega on z udziałem białka adaptorowego TRIF, aktywowanego w sposób bezpośredni przez receptor TLR-3 i pośredni przy współdziałaniu białka TRAF (ang. tumour necrosis factor receptor-associated factor) przez receptor TLR-4. Białko adaptorowe TRIF może oddziaływać z białkami TRAF3 bądź TRAF6. Po związaniu swoistych ligandów, w szlaku niezależnym od MyD88 z udziałem TRIF oraz białka TRAF3, dochodzi do aktywacji kinazy TBK1/NAK/T2K [ang. TRAF-family-member-associated NF κ B activator (TANK) binding kinase 1], należącej do rodziny kinaz I κ B. Prowadzi to do fosforylacji czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF (IRF-3 oraz IRF-7), które tworząc homodimery bądź heterodimery przedostają się do jądra komórkowego i indukują ekspresję genu dla IFN β . Przyłączenie do białka TRIF czynnika TRAF6 i współdziałających z nim kinaz RIP1 i RIP3 (ang. receptor interacting protein 1 and 3) skutkuje aktywacją czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i uwalnianiem cytokin prozapalnych [325-327].

2.4.6.4. Polimorfizmy wybranych genów kodujących receptory TLR oraz genu kodującego białko adaptorowe TIRAP i ich znaczenie kliniczne

Niżej omówiono niektóre polimorfizmy genów kodujących receptory TLR, wybrane na podstawie dostępnej literatury, w której opisano ich wpływ na ryzyko zachorowania na gruźlicę w różnych populacjach [328].

Wśród licznych SNP genu kodującego TLR-1, na szczególną uwagę zasługują takie, które wpływają na strukturę receptora [329-331]. Najwięcej doniesień literaturowych

dotyczy polimorfizmu +1805 T>G (Ile602Ser; rs5743618), zlokalizowanego we fragmencie kodującym domenę przezbłonową. W wyniku zastąpienia reszty izoleucyny w pozycji 602 białka seryną, dochodzi do upośledzenia odpowiedzi na zakażenia drobnoustrojami rozpoznawanymi przez kompleks TLR-2-TLR-1 [330, 332]. Inny polimorfizm omawianego genu, zlokalizowany w pozycji +742 (A>G, Asn248Ser; rs483309) także wpływa znacząco na funkcję jego produktu. Występowanie allelu G sprzyja niekorzystnym rokowaniom u osób, u których doszło do sepsy związanej z infekcjami bakteriami Gram-dodatnimi [333].

Gen *TLR2* jest wysoce polimorficzny a niektóre z jego wariantów mają wpływ na podatność na zakażenia. Występowanie allelu A, odpowiadającego SNP w pozycji +2258 (G>A; Arg753Gln; rs5743708) powoduje zmianę struktury domeny TIR receptora TLR-2 [334], co prowadzi do upośledzenia aktywacji makrofagów w odpowiedzi na antygeny bakteryjne, takie jak lipoproteiny *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum* i *M. tuberculosis* [335]. Nosicielstwo tego wariantu nasila ryzyko infekcji dróg moczowych u dzieci wywołanych przez bakterie Gram-dodatnie oraz rozwoju sepsy w zakażeniach *Staph. aureus* [336, 337]. Na podatność na niektóre zakażenia oraz choroby alergiczne (atopowe zapalenie skóry, astma, alergiczny nieżyt nosa) wpływają także inne polimorfizmy omawianego genu: -16934 A>T (rs4696480); +1892 C>A (Pro631His; rs5743704) oraz +2029 C>T (Arg677Trp; rs121917864) [337]. Do najpowszechniej (z częstością powyżej 5%) występujących polimorfizmów genu kodującego receptor TLR4, wpływających na jego aktywność, należą te zlokalizowane w pozycjach +896 (A>G; Asp299Gly; rs4986790) oraz +1196 (C>T; Thr399Ile; rs4986791) [334, 338]. Zmiany struktury białka mają konsekwencje w postaci upośledzenia zdolności rozpoznawania ligandów, indukcji i przekazywania sygnału do wnętrza komórki. Long i wsp. zaobserwowali, że występowanie allelu G w pozycji +896 wiąże się ze zmniejszoną ekspresją receptora oraz znacząco upośledzoną odpowiedzią na LPS i aktywacją NF-κB [339, 340]. Wariant ten związany jest również z wyższym ryzykiem zakażeń wywołanych przez bakterie Gram-ujemne [340], rozwoju sepsy w wyniku nadkażenia ran oparzeniowych [341], zapalenia płuc [342] oraz zapalenia oskrzeli w wyniku zakażenia wirusem RS u niemowląt i dzieci [343]. Allel G sprzyja także złym rokowaniom u osób, u których wystąpił zespół ogólnoustrojowej reakcji zapalnej (SIRS) [344]. Van der Graaf i wsp. wykazali także, że nosicielstwo wariantów polimorficznych G w pozycji +896 i T w pozycji +1196 zwiększa ryzyko infekcji wywołanych przez *Candida albicans* [345].

Niektóre z kilkudziesięciu znanych polimorfizmów genu *TLR6* wpływają na ekspresję lub funkcję białka będącego jego produktem, co może mieć znaczenie kliniczne. SNP zlokalizowany w regionie promotorowym, w pozycji -1401 (A>G, rs57437950) związany jest z ryzykiem zachorowania na raka prostaty (jest ono niższe u nosicieli alellu G) [346]. Występowanie wariantu T (odpowiadającego polimorfizmowi +745 C>T, rs5743810; Pro249Ser) może powodować zaburzenia rozpoznawania i wiązania ligadu do receptora, a w konsekwencji – aktywacji komórki. Wariant T nasila ryzyko rozwoju chorób zakaźnych, np. malarii [347] oraz o podłożu alergicznym, takich jak atopowe zapalenie skóry u dzieci w wieku przedszkolnym [348].

Gen *TIRAP* jest wysoce polimorficzny, a niektóre z opisanych w literaturze SNP wpływają na aktywność jego produktu [327]. Znaczenie kliniczne, przypisuje się przede wszystkim polimorfizmowi +975 C>T (Ser180Leu; rs8177374). Khor i wsp. zaobserwowali, iż zamiana reszty seryny na leucynę wpływa na wiązanie TIRAP do domeny TIR receptorów TLR, powodując upośledzenie przekazywania sygnału [349].

Panda i wsp. zauważyli, że heterozygoty C/T są stosunkowo odporne na rozwój malarii, a choroba u nich rzadko kończy się fatalnie [350]. Potwierdza to wcześniejsze obserwacje Khor i wsp., którzy opisali efekt protekcyjny genotypu C/T nie tylko w malarii, lecz także w pneumokokowym zapaleniu płuc i bakteriemii [349]. Również u pacjentów zakażonych wirusem HIV, u których liczba limfocytów T CD4+ jest niska, u heterozygot rzadziej dochodzi do infekcji [351]. W badaniach przeprowadzonych przez Hamann i wsp., badających populację niemiecką, większą podatność na rozwój sepsy obserwowano u nosicieli wariantu T [352].

3. Cel pracy

Celem pracy była ocena znaczenia wybranych czynników odporności wrodzonej w podatności na gruźlicę płuc, której czynnikiem etiologicznym jest *Mycobacterium tuberculosis*.

Przedmiotem badań były:

- czynniki występujące w postaci rozpuszczalnej w krwi: lektyna wiążąca mannozę (MBL), fikoliny (fikolina-1, -2, -3) oraz występujące z nimi w kompleksach proteazy serynowe MASP-1 i MASP-2
- czynniki występujące miejscowo w układzie oddechowym (kolektyny surfaktantu płucnego A i D (SP-A, SP-D))
- receptory Toll-podobne (TLR-1, -2, -4, -6) oraz uczestniczące w przekazywaniu sygnału po ich aktywacji białko TIRAP (Mal).

Jak wspomniano, fikolina-3 występuje także w układzie oddechowym, natomiast białka SP-A i SP-D – w krwi, co sprawia, że czynniki te mogą uczestniczyć zarówno w odpowiedzi ogólnoustrojowej, jak i lokalnej. Ponadto, fikolina-1, syntezowana przez leukocyty, wykrywana jest na powierzchni tych komórek. MBL i fikoliny, dzięki tworzeniu kompleksów z MASP mogą inicjować aktywację dopełniacza, podczas gdy kolektyny surfaktantu płucnego pozbawione są tej właściwości.

Przedstawiony cel pracy realizowano poprzez:

- oznaczanie częstości występowania wybranych mutacji i wariantów polimorficznych genów kodujących wspomniane czynniki u osób chorych na gruźlicę płuc (kryteriami kwalifikacji były wyniki badań bakteriologicznych i radiologicznych) oraz w grupie kontrolnej, w skład której wchodziłi zdrowi ochotnicy (bez historii ciężkich i nawracających zakażeń, chorób nowotworowych, autoimmunizacyjnych);
- badanie stężeń kolektyn (MBL, SP-D), fikolin (fikolina -1, -2, -3), a także aktywności kompleksów MBL-MASP-2 oraz MBL-MASP-1 w próbach surowicy pobranych od przedstawicieli wspomnianych grup;
- badanie zmian stężeń wybranych białek w surowicy chorych, w przebiegu leczenia przeciwgruźliczego.

4. Materiały i metody

4.1. Materiały

4.1.1. Grupy: badana i kontrolna

Do grupy badanej (TB) zakwalifikowano 279 mężczyzn, w wieku od 20 do 93 lat oraz 155 kobiet, w wieku od 18 do 94 lat (łącznie 434 osoby). Pacjenci kwalifikowani byli przez doświadczonych lekarzy, na podstawie diagnozy potwierdzonej badaniami mikrobiologicznymi i radiologicznymi. Kryterium wykluczającym pacjentów z grupy badanej były współistniejące zakażenia HIV oraz wirusami zapalenia wątroby.

Pacjentów rekrutowano dzięki współpracy z Instytutem Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, Wojewódzkim Szpitalem Chorób Płuc w Jaroszowcu, Mazowieckim Centrum Leczenia Chorób Płuc i Gruźlicy w Otwocku, Podkarpackim Centrum Chorób Płuc w Rzeszowie oraz Kujawsko-Pomorskim Centrum Pulmonologii w Bydgoszczy. Od niektórych pacjentów, próby krwi wykorzystywane do otrzymania surowicy zostały pobrane dwukrotnie (przed i podczas zastosowaniu leczenia przeciwgruźliczego), w celu oceny zmian stężeń badanych czynników odporności wrodzonej w przebiegu terapii.

Grupę kontrolną stanowiły osoby zdrowe, niezgłaszające w wywiadzie ciężkich i/lub nawracających zakażeń, chorób nowotworowych i autoimmunizacyjnych (C). Do grupy tej włączono 150 mężczyzn w wieku od 23 do 64 lat oraz 100 kobiet w wieku od 18 do 75 lat (łącznie 250 osób). Na wykonanie badań będących przedmiotem pracy uzyskano zgodę właściwych komisji bioetycznych wraz z pisemną świadomą zgodą pacjentów i zdrowych ochotników.

4.1.2. Materiał kliniczny

Materiałem do badań były próby surowicy i DNA otrzymane z krwi obwodowej pacjentów oraz od zdrowych ochotników. Próby krwi pełnej wykorzystywane do badań genetycznych pobierane były do probówek zawierających cytrynian sodu (BD Vacutainer, USA) i przechowywane do czasu ekstrakcji DNA w temperaturze -20°C. Otrzymane próby surowicy (krew pobierano do probówek niezawierających antykoagulantów) przechowywano w temperaturze -80°C.

4.1.3. Przeciwciała

- mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko ludzkiej lektynie wiążącej mannozę (klon HYB131-01, BioPorto, Dania)

- mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko fikolinie-1 (klon 7G1) oraz ich forma znakowana biotyną, otrzymane dzięki uprzejmości Prof. Jensa C. Jenseniusa (Aarhus University, Dania)
- mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko fikolinie-2 (klon GN4) oraz przeciwciała biotynylowane (klon GN5) otrzymane dzięki uprzejmości Prof. Misao Matsushity (Tokai University, Japonia)
- mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko ludzkiej fikolinie-3 (klon 4H5, Hycult Biotech, Holandia)
- królicze przeciwciała poliklonalne przeciwko produktom aktywacji ludzkiego czynnika C4 (Dako, Dania),
- królicze przeciwciała poliklonalne przeciwko immunoglobulinom mysim, znakowane peroksydazą chrzanową (Dako)
- kozie przeciwciała poliklonalne przeciwko immunoglobulinom króliczym, znakowane peroksydazą chrzanową (Dako)
- normalne ludzkie immunoglobuliny (Sigma-Aldrich, USA)

Wymienione przeciwciała wykorzystywano do oznaczania stężeń i aktywności badanych czynników odporności.

4.1.4. Surowice

- surowica ludzka o znanym stężeniu MBL (2 $\mu\text{g/ml}$), otrzymana od zdrowego ochotnika, stosowana, jako standard do oznaczeń stężenia tego białka oraz aktywności kompleksów MBL-MASP-2 i MBL-MASP-1 [jej aktywność określono arbitralnie jako 1 jednostkę umowną (1U)]
- surowica będąca źródłem składnika C4, wykorzystywana do oznaczeń aktywności kompleksów MBL-MASP-2. Otrzymano ją z krwi zdrowego dawcy, u którego stwierdzono niedobór MBL. Stężenie fikoliny-1, -2 i -3 w tej surowicy wynosiły 1,8 $\mu\text{g/ml}$, 1,5 $\mu\text{g/ml}$ oraz 10 $\mu\text{g/ml}$, natomiast C4 - 315 $\mu\text{g/ml}$. Niskie stężenie MBL oraz stosowane rozcieńczenie (szczegóły przedstawiono w dalszej części pracy) powodowały, że jej stosowanie nie wpływało na wyniki oznaczeń aktywności badanych kompleksów
- surowica ludzka o znanym stężeniu fikoliny-1 (0,8 $\mu\text{g/ml}$), otrzymana od zdrowego ochotnika, stosowana jako standard do oznaczeń stężenia tego białka
- surowica ludzka o znanym stężeniu fikoliny-2 (3,9 $\mu\text{g/ml}$), otrzymana od zdrowego ochotnika, stosowana jako standard do oznaczeń stężenia tego białka

- surowica ludzka o znanym stężeniu fikoliny-3 (25 µg/ml), otrzymana od zdrowego ochotnika, stosowana jako standard do oznaczeń stężenia tego białka

4.1.5. Odczynniki do sporządzania roztworów i buforów

- albumina surowicy bydłowej (bovine serum albumin, BSA) (BioShop, Kanada)
- azyd sodu, NaN₃ (Sigma-Aldrich)
- bromek etydyny, C₂₁H₂₀BrN₃ (BioShop)
- chlorek magnezu, MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, USA)
- chlorek potasu, KCl (BioShop)
- chlorek sodu, NaCl (BioShop)
- chlorek wapnia, dwuwodny, CaCl₂ x 2H₂O (BioShop)
- cytrynian sodu, dwuwodny, C₆H₅O₇Na₃ x 2H₂O (Sigma-Aldrich)
- deoksynukleotydy, dNTP (Invitrogen, USA)
- diwodorofosforan potasu, KH₂PO₄ (BioShop)
- etanol, C₂H₅OH (Lineal Chemicals, Polska)
- „enhancement solution” (PerkinElmer, USA)
- glicerol, C₃H₈O₃ (BioShop)
- HEPES, C₈H₁₈N₂O₄S (Sigma-Aldrich)
- imidazol, C₃H₄N₂ (Sigma-Aldrich)
- kwas 2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy), ABTS (Sigma-Aldrich)
- kwas cytrynowy, C₆H₈O₇ (BioShop)
- kwas etylenodiaminotetraoctowy, EDTA, C₁₀H₁₆N₂O₈ (BioShop)
- kwas octowy, CH₃COOH (Chempur, Polska)
- kwas szczawiowy, C₂H₂O₄ (BioShop)
- lipopolisacharyd (LPS) *Hafnia alvei* PCM 1200 (otrzymany dzięki uprzejmości Prof. Jolanty Łukasiewicz (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław)
- mieszanina akrylamid/bisakrylamid (30%, 37,5:1) (BioShop)
- marker wielkości cząsteczek DNA GeneRuler™ 100 Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)
- mannan drożdżowy (Sigma-Aldrich)
- nadsiarazan amonu, APS, (NH₄)₂S₂O₈ (Sigma-Aldrich)

- nadtlenek wodoru, H₂O₂, roztwór 30% (Bioshop)
- *N*, *N*, *N*, *N*'-tetrametyloetylenodiamina, TEMED, C₆H₁₆N₂ (Bioshop)
- 2-amino-2-hydroksymetylo-propano-1,3-diol, TRIS, C₄H₁₁NO₃ (BioShop)
- streptawidyna znakowana kationami europu (Eu³⁺) (PerkinElmer)
- Triton X-100 (Bioshop)
- Tween 20, C₅₈H₁₁₄O₂₆ (Bioshop)
- węglan sodu, Na₂CO₃ (Bioshop)
- wodorofosforan disodu, Na₂HPO₄ (Bioshop)
- wodorofosforan sodu, dwuwodny, NaH₂PO₄ x H₂O (Bioshop)
- wodorowęglan sodu, NaHCO₃ (Bioshop)
- Val-Pro-Arg-aminometylokumaryna zawierająca blokującą grupę tert-butyloksykarbonylową (Boc) (VPR-AMC) – substrat dla MASP-1 (Bachem, Szwajcaria)

4.1.6. Enzymy

- Enzymy restrykcyjne i dedykowane bufony

W tabeli 9 wymieniono endonukleazy używane do badania polimorfizmów wybranych genów za pomocą analizy polimorfizmów długości fragmentów powstałych po trawieniu produktów reakcji PCR (ang. restriction fragments length polymorphism, RFLP).

- Polimeraza Taq (Thermo Fisher Scientific)
- Proteinaza K (Thermo Fisher Scientific)

Tabela 9. Enzymy restrykcyjne wraz z dedykowanymi buforami stosowane w badaniach metodą PCR-RFLP.

Enzym	Bufor	Temperatura trawienia	Producent
AluI	Tango	37°C	Thermo Fisher Scientific
ApaI	B	37°C	Thermo Fisher Scientific
AvaII	R	37°C	Thermo Fisher Scientific
BshNI (BanI)	O	37°C	Thermo Fisher Scientific
BSExi (BbvI)	BseXI	65°C	Thermo Fisher Scientific
BsuRI (HaeIII)	R	37°C	Thermo Fisher Scientific
DdeI	Tango	37°C	Thermo Fisher Scientific
FspI	Tango	37°C	Thermo Fisher Scientific
HhaI	Tango	37°C	Thermo Fisher Scientific
Hpy188I	NEBuffer 4	37°C	NEB (USA)
MboII	B	37°C	Thermo Fisher Scientific
MluI	R	37°C	Thermo Fisher Scientific
MlnI	G	37°C	Thermo Fisher Scientific
MspI	Tango	37°C	Thermo Fisher Scientific
NcoI	Tango	37°C	Thermo Fisher Scientific
SsiI (AciI)	O	37°C	Thermo Fisher Scientific
αTaqI	Taq	65°C	Thermo Fisher Scientific
Tru9I	F	65°C	Promega (USA)

4.1.7. Bufory i roztwory

4.1.7.1. Bufory stosowane w badaniach genetycznych

- Bufor TAE (jako składnik żelu poliakrylamidowego oraz buforu do elektroforezy) (pH 7,8 - 8,0)
 - 40 mM TRIS
 - 1 mM EDTA
 - 0,1% CH₃COOH
- Bufor próbkowy, do nanoszenia/obciążania prób na żel poliakrylamidowy, DNA Gel Loading Dye (6x), (Thermo Fisher Scientific)
- Bufor dla polimerazy Taq z KCl (x10) (Thermo Fisher Scientific)
- Bufory dedykowane do enzymów restrykcyjnych (wymienione w tabeli 9)

4.1.7.2. Bufory i roztwory stosowane w testach immunoenzymatycznych

- Bufor węglanowy, pH 9,6
 - 15 mM Na₂CO₃
 - 35 mM NaHCO₃

Bufor ten był używany do przygotowania roztworu mannanu drożdżowego, służącego do opłaszczania płytek titracyjnych.
- Bufor TBS-Ca, pH 8,0
 - 10 mM Tris
 - 120 mM NaCl
 - 1 mM CaCl₂ x 2H₂O

Bufor ten, z dodatkiem 0,05% Tween 20, wykorzystywany był do płukania płytek, natomiast z dodatkiem 1% lub 0,1% BSA do blokowania wolnych miejsc wiązania na płytkach titracyjnych.
- Bufor PBS (fizjologiczny roztwór NaCl, buforowany fosforanem), stężony 5x, pH 7,4
 - 15 mM NaH₂PO₄ x H₂O
 - 150 mM NaCl

Bufor ten (po rozcieńczeniu) stosowany był do przygotowywania roztworów do opłaszczania płytek titracyjnych, a z dodatkiem 0,05% Tween 20, wykorzystywany był do płukania płytek.
- Bufor imidazolowy, pH 7,8
 - 40 mM C₃H₄N₂
 - 1,25 M NaCl
 - 50 mM CaCl₂ x 2H₂O

Bufor ten używany był do rozcieńczania prób surowicy podczas oznaczania stężenia MBL.
- Bufor do rozcieńczania prób surowicy wykorzystywanych do oznaczania stężenia fikoliny-1, pH 7,4
 - 50 mM Tris
 - 1 M NaCl
 - 5 mM EDTA

Bufor ten stosowano z dodatkiem 0,1% BSA; 0,05% Tween 20 oraz agregowanych (63°C, 30 min) ludzkich immunoglobulin (10 µg/ml).

- Bufor do rozcieńczania prób surowicy wykorzystywanych do oznaczania stężenia fikoliny-2, pH 7,4
 - 10 mM Tris
 - 140 mM NaCl
 - 3 mM CaCl₂ x 2H₂O

Bufor ten stosowano z dodatkiem 0,1% BSA; 0,05% Tween 20 oraz agregowanych (63°C, 30 min) ludzkich immunoglobulin (10 µg/ml).
 - Bufor o wysokiej sile jonowej („bufor wiążący MBL”, „MBL-binding buffer”), pH 7,4
 - 20 mM Tris
 - 10 mM CaCl₂ x 2H₂O
 - 1M NaCl

Bufor ten służył do rozcieńczania prób surowicy podczas oznaczania aktywności kompleksów MBL-MASP-2 oraz stężenia fikoliny-3. Stosowano go z dodatkiem 0,1% BSA i/lub 0,05% Triton X-100.
 - Bufor Tris-HCl/CaCl₂, pH 7,4
 - 10 mM Tris
 - 40 mM CaCl₂ x 2H₂O

Bufor ten stosowano do rozcieńczania przeciwciał („bufor do Ab”) używanych w testach immunoenzymatycznych.
 - Bufor substratowy dla peroksydazy, pH 4,5
 - 0,1 M C₆H₅O₇Na₃ x 2 H₂O

Bufor ten używano do przygotowania roztworu peroksydazy. Do uzyskania odpowiedniego pH używano 2,5 M roztworu kwasu cytrynowego (C₆H₈O₇)
 - Bufor do rozcieńczania streptawidyny znakowanej europem
 - 10 mM Tris
 - 140 mM NaCl
 - 15 mM NaN₃

Bufor ten stosowano z dodatkiem 10 mM EDTA oraz 0,05% Tween 20.
- Bufory stosowane do oznaczania aktywności kompleksów MBL-MASP-1:**
- Bufor blokujący, pH 7,4
 - 20 mM HEPES
 - 140 mM NaCl

- 5 mM EDTA
- 0,1% Tween 20
- Bufor płuczący, pH 7,4
 - 20 mM HEPES
 - 140 mM NaCl
 - 5 mM CaCl₂ x 2H₂O
 - 0,1% Tween 20
- Bufor do rozcieńczania prób surowicy, pH 7,4
 - 40 mM HEPES
 - 2 M NaCl
 - 10 mM CaCl₂ x 2H₂O
- Bufor płuczący o wysokiej sile jonowej, pH 7,4
 - 20 mM HEPES
 - 1M NaCl
 - 5mM CaCl₂ x 2H₂O
 - 0,1% Tween 20
- Bufor substratowy dla VPR-AMC, pH 8,5
 - 20 mM HEPES
 - 5 mM CaCl₂ x 2H₂O

4.1.8. Zestawy i testy komercyjne:

- Zestaw do ekstrakcji DNA z krwi obwodowej Quick Blood DNA Purification Kit (EURx, Polska). W skład zestawu wchodzi:
 - RNaza A
 - Proteinaza K
 - Bufor QB – bufor aktywacyjny
 - Bufor Sol QB – bufor lizujący
 - Bufor Wash QBX1– bufor do przepłukiwania kolumn
 - Bufor Wash QBX2– bufor do przepłukiwania kolumn
 - Bufor Elution – bufor do elucji
- Zestaw do oznaczania stężenia kolektyny surfaktantu płucnego D w surowicy, SP-D Human ELISA kit (Hycult Biotech). W skład zestawu wchodzi:
 - Wash Buffer – bufor płuczący
 - Dilution Buffer – bufor do rozcieńczeń

- Standard – roztwór białka SP-D do przygotowania krzywej standardowej
- Tracer biotynylated – biotynylowane przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiemu SP-D
- Streptavidin-peroxidase – streptawidyna skoniugowana z peroksydazą
- TMB substrate – substrat dla peroksydazy
- Stop solution – bufor hamujący reakcję barwną
- 2 plates precoated – płytki do oznaczeń

4.1.9. Sprzęt laboratoryjny

- Aparat do elektroforezy Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad, USA)
- Czytnik mikropłytek Benchmark Plus (BioRad)
- Czytnik wielofunkcyjny Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific)
- Komora z laminarnym przepływem powietrza MSC-Advantage (Thermo Fisher Scientific)
- Myjka płytek Wellwash Versa (Thermo Fisher Scientific)
- Spektrofotometr NanoDrop (Thermo Fisher Scientific)
- Termostatowany blok grzejny Thermomixer Comfort (Eppendorf, Niemcy)
- Termocykler C1000™ (BioRad)
- Transiluminator Fc8800 (Alpha Innotech Corporation, USA)
- Wirówka MiniSpinPlus (Eppendorf)
- Wirówka Sorvau ST16R (Thermo Fisher Scientific)
- Wstrząsarka z inkubatorem Unimax 1010 (Heidolph, Niemcy)
- Wstrząsarka typu Vortex (Heidolph)
- Zasilacz do elektroforezy PowerPack 1000 (BioRad)

4.1.10. Materiały i sprzęt jednorazowy

- Płytki titracyjne MaxiSorp U96 (Nunc, Dania)
- Płytki titracyjne Optiplate 384 (PerkinElmer)
- Płytki do odczytu fluorescencji MicroFluor white plate (Nunc)
- Probówki do próżniowego pobierania krwi bez antykoagulantu oraz zawierające cytrynian sodu do badań genetycznych (Becton Dickinson)

4.2. Metody

4.2.1. Ekstrakcja DNA z krwi pełnej

Do ekstrakcji DNA z komórek krwi obwodowej używano zestawu Quick Blood DNA Purification Kit (EURx). Próby krwi, która przechowywana była w temperaturze -20°C , rozmrażano w temperaturze pokojowej. Kolumny, zgodnie z zaleceniem producenta, aktywowano za pomocą buforu QB (40 μl). Następnie, 200 μl krwi przenoszono do probówek typu eppendorf, dodawano 200 μl buforu Sol QB oraz 10 μl proteiny K. Tak przygotowane próby, po zmieszaniu za pomocą wstrząsarki typu Vortex inkubowano 15 minut, w temperaturze 70°C , wykorzystując do tego termostatowany blok grzejny, po czym dodawano 200 μl etanolu (96%) i ponownie mieszano. Następnie, próby nanoszono na aktywowane kolumny i wirowano (9700 x g; 2 min). Po usunięciu przesączu, kolumny płukano buforem Wash QBX1 (500 μl) i ponownie wirowano (9700 x g; 1 min). Czynności te powtarzano, przy czym do kolejnego płukania używano buforu Wash QBX2. Kolumny umieszczano w nowych probówkach typu eppendorf i nanoszono 100 μl buforu Elution, ogrzanego do temperatury 70°C . Po 5 minutach, próby wirowano (9700 x g; 1 min), a następnie usuwano kolumny. Probówki zawierające otrzymane preparaty DNA przechowywano w temperaturze -20°C . Czystość otrzymanego materiału genetycznego oraz jego stężenie sprawdzano przy pomocy spektrofotometru NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

4.2.2. Badania polimorfizmów oraz mutacji wybranych genów

Polimorfizmy/mutacje badanych genów oznaczano za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR) lub metody analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. restriction fragments length polymorphism, PCR-RFLP).

W skład mieszaniny reakcyjnej zazwyczaj wchodziło: 2,5 μl buforu dla polimerazy Taq (Thermo Fisher Scientific), 2 μl roztworu MgCl_2 (o stężeniu 2,5 mM, Thermo Fisher Scientific), 2 μl mieszaniny deoksynukleotydów (dNTP, 2,5 mM, Invitrogen), po 1 μl odpowiednich starterów (0,4 μM), 0,2 μl polimerazy DNA Taq (5 U/ml, Thermo Fisher Scientific), 1 μl badanej próby DNA (o stężeniu mieszczącym się w zakresie 50-100 ng/ μl) oraz odpowiednia ilość wody demineralizowanej, uzupełniająca mieszaninę reakcyjną do objętości 25 μl . Jeżeli skład mieszaniny był odmienny od podanego wyżej (np., kiedy badania prowadzono stosując technikę allelospecyficznego PCR, z wykorzystaniem dodatkowych starterów), różnice przedstawiono w opisach

odpowiednich procedur. Gdy stosowano metodę PCR-RFLP, produkt amplifikacji poddawano trawieniu odpowiednim enzymem restrykcyjnym. W skład mieszaniny restrykcyjnej wchodziło: 8 µl produktu PCR, 0,2 µl (2 U) odpowiedniego enzymu, 1 µl dedykowanego buforu (tabela 9) oraz 0,8 µl wody demineralizowanej. Proces trawienia prowadzono w temperaturze optymalnej dla danego enzymu (zalecanej przez producenta, tabela 9), przez 1 h lub 24 h. Zarówno produkty allelospecyficznej PCR jak i produkty trawienia enzymami restrykcyjnymi poddawano rozdzielni elektroforetycznemu w 6% żelu poliakrylamidowym, przy stałym napięciu 100 V. Do wizualizacji używano bromku etydyny. Po jednodominutowej inkubacji, żele płukano wodą i oglądano w świetle UV przy użyciu transiluminatora Fc8800.

4.2.2.1. Badanie polimorfizmów genu *MBL2*, zlokalizowanych w regionie promotorowym (rs11003125; rs7096206) oraz eksonie 1 (rs5030737; rs1800450 i rs1800451)

W badaniach polimorfizmów regionu promotorowego genu *MBL2*, zlokalizowanych w pozycjach -550 (H/L) i -221 (Y/X) stosowano metodę allelospecyficznej amplifikacji [353, 354]. Reakcje amplifikacji prowadzono oddzielnie dla wariantów HY, LY oraz LX, stosując odpowiednio dobrane pary starterów (każdy w ilości 0,6 µM), spośród podanych poniżej:

H: 5'-CTTACCCAGGCAAGCCGGTG-3'

L: 5'-CTTACCCAGGCAAGCCGGTC-3'

Y: 5'-CTGGAAGACTATAAACATGCTGTCC-3'

X: 5'-CTGGAAGACTATAAACATGCTGTCG-3'

W każdej z reakcji wykorzystywano także dodatkową parę starterów, stanowiącą kontrolę amplifikacji:

Starter "forward": 5'-GCATCTTGCTCTGTGCAGAT-3'

Starter "reverse": 5'-TGCCAAGTGGAGCACCCAA-3'

Reakcje prowadzono w następujących warunkach:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	3 min
II.	30 cykli:		
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	62°C	30 s
	Wydłużanie	72°C	45 s
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	7 min

Warianty polimorficzne eksonu 1 oznaczano za pomocą PCR-RFLP. Dla polimorfizmów A/B (zlokalizowanego w kodonie 54) oraz A/C (zlokalizowanego w kodonie 57) przeprowadzono jedną reakcję amplifikacji przy użyciu pary starterów [353]:

Starter “forward”: 5'-AGTCGACCCAGATTGTAGGACAGAG-3'

Starter “reverse”: 5'-AGTTGTTGTTCTCCTGTCCAG-3'

Warunki amplifikacji:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	3 min
II.	Przyłączanie starterów	56°C	1 min
III.	35 cykli:		
	Wydłużanie	72°C	45 s
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	56°C	30 s
IV.	Końcowe wydłużanie	72°C	10 min

Powstający produkt, o długości 685 pz, poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi. W przypadku badania polimorfizmu A/B stosowano enzym BanI. W wyniku trawienia, prowadzonego 24 h w temperaturze 37°C, otrzymywano fragmenty o długościach: 308 pz, 261 pz i 116 pz (wariant A) i/lub: 569 pz i 116 pz (wariant B).

W celu oznaczenia polimorfizmu A/C, produkt PCR poddawano trawieniu enzymem MboII (24 h, 37°C), w wyniku czego uzyskiwano fragmenty o długościach: 508 pz, 94 pz i 83 pz (dla wariantu A) i/lub 280 pz, 228 pz, 94 pz i 83 pz (dla wariantu C).

Występowanie wariantów związanych z polimorfizmem zlokalizowanym w kodonie 52 eksonu 1 genu *MBL2* (A/D), badano wykorzystując parę starterów o sekwencjach [353]:

Starter “forward”: 5’-CATCAACGGCTTCCCAGGCAAAGACGCG-3’

Starter “reverse”: 5’-AGGATCCAGGCAGTTTCCTCGGAAGG-3’

Reakcję amplifikacji prowadzono w następujących warunkach:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	3 min
II.	Przyłączanie starterów	56°C	1 min
III.	35 cykli:		
	Wydłużanie	72°C	30 s
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	56°C	30 s
IV.	Końcowe wydłużanie	72°C	10 min

Uzyskany produkt (125 pz) poddawano działaniu enzymu restrykcyjnego MluI, 24 h, w temperaturze 37°C. W przypadku występowania wariantu D, otrzymywano fragmenty o długościach 100 pz oraz 25 pz, natomiast produkt odpowiadający wariantowi A był oporny na trawienie wspomnianą restryktazą.

4.2.2.2. Badanie występowania mutacji +359 (A>G; rs72550870) genu *MASP2*

Występowanie mutacji +359 A>G (D120G) genu *MASP2*, zlokalizowanej we fragmencie kodującym domenę CUB1 proteazy serynowej MASP-2 badano przy wykorzystaniu metody PCR-RFLP [355, 356]. Wykorzystywano startery o sekwencjach:

Starter “forward”: 5’- GCGAGTACGACTTCGTCAAGG -3’

Starter “reverse”: 5’- CTCGGCTGCATAGAAGGC -3’

Reakcję amplifikacji prowadzono w warunkach:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	5 min
II.	35 cykli:		
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	58°C	30 s
	Wydłużanie	72°C	30 s
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	10 min

Produkt amplifikacji o długości 350 pz trawiono enzymem restrykcyjnym MspI (24 h w temperaturze 37°C). W przypadku wystąpienia mutacji otrzymywano dwa fragmenty

(300 pz oraz 50 pz), natomiast produkt PCR odpowiadający haplotypowi A pozostawał niestrawiony.

4.2.2.3. Badanie polimorfizmów genów kodujących białka surfaktantu płucnego SP-A (*SFTP A1* oraz *SFTP A2*)

Analizowano polimorfizmy zlokalizowane w miejscach kodujących różne regiony cząsteczek kolektyn surfaktantu płucnego. Badania prowadzono przy użyciu metod PCR-RFLP opisanych przez Di Angelo i wsp. [357]. W przypadku genów kodujących białka SP-A1 oraz SP-A2 prowadzono wstępne reakcje amplifikacji, których produkty obejmowały wszystkie badane miejsca polimorficzne. Tak uzyskane matryce wykorzystano do dalszych analiz. W pierwszym etapie używano startery o sekwencjach podanych niżej:

Starter “forward” dla izoformy SP-A1: 5'-ACTCCATGACTGACCACCTT-3'

Starter “forward” dla izoformy SP-A2: 5'-ATCACTGACTGTGAGAGGGT-3'

Wspólny starter “reverse”: 5'-TGCCACAGAGACCTCAGAGT-3'

Pierwszą reakcję amplifikacji prowadzono w warunkach:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	2 min
II.	33 cykle:		
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	58°C	30 s
	Wydłużanie	72°C	3 min
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	5 min

Otrzymany produkt PCR ponownie poddawano amplifikacji z użyciem odpowiednich starterów. Następnie, uzyskane produkty poddawano trawieniu za pomocą wymienionych niżej enzymów restrykcyjnych.

4.2.2.3.1. Badanie polimorfizmów genu *SFTP A1*, zlokalizowanych w pozycjach +56 (T>C; Val19Ala; rs1059047) oraz +148 (G>C; Val50Leu; rs17883551)

Reakcje amplifikacji prowadzono przy użyciu jednej pary starterów o następujących sekwencjach:

Starter „forward”: 5'-ACCTCATCTTGATGTCAGCCTCTGGTGCAG-3'

Starter „reverse”: 5'-AGGGCCAGGGTCTCCTCTGA-3'

Warunki PCR:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	2 min
II.	33 cykle:		
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	56°C	30 s
	Wydłużanie	72°C	3 min
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	5 min

W celu oznaczenia wariantów polimorficznych kodonu 19, używano enzymu BbvI (24 h, 65°C). W przypadku występowania wariantu C, trawił on produkt PCR o długości 143 pz na 2 fragmenty (103 pz i 40 pz). Produkt odpowiadający wariantowi T był oporny na działanie restryktazy.

Trawienie produktu amplifikacji enzymem DdeI (24 h, 37°C) skutkowało otrzymaniem fragmentów o długościach 123 pz i 20 pz, jeżeli w kodonie 50 występował wariant G (produkt odpowiadający wariantowi C nie ulegał trawieniu).

4.2.2.3.2. Badanie polimorfizmu genu *SFTP1*, zlokalizowanego w pozycji +655 (C>T; Arg219Trp; rs4253527)

W badaniach SNP zlokalizowanego w pozycji +655, wykorzystywano startery:

Starter „forward”: 5’- TCTGCAGGGCTCCATAATGC -3’

Starter „reverse”: 5’- CACACACTGCTCTTTTCCTC -3’

Stosowano następujące warunki PCR:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	2 min
II.	33 cykle:		
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	59°C	30 s
	Wydłużanie	72°C	3 min
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	5 min

Produkt reakcji PCR o długości 299 pz poddawano działaniu enzymu restrykcyjnego, α TaqI w temperaturze 65°C, przez 24 h. Wspomniana restryktaza trawiła produkt odpowiadający wariantowi C na dwa fragmenty (278 pz i 21 pz). Produkt PCR specyficzny dla wariantu T był niewrażliwy na działanie enzymu.

4.2.2.3.3. Badanie polimorfizmu genu *SFTP2*, zlokalizowanego w pozycji +26 (C>A; Thr9Asn; rs1059046)

Polimorfizm genu *SFTP2*, zlokalizowany w pozycji +26 eksonu 1 analizowano, jak wspomniano, za pomocą metody PCR-RFLP. W reakcji amplifikacji wykorzystywano startery:

Starter „forward”: 5’-GCTGTGCCCTCTGGCCCTTA-3’

Starter „reverse”: 5’ -TCCTTTGACACCATCTC-3’

Reakcję tę prowadzono w warunkach:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	2 min
II.	33 cykle:		
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	56°C	30 s
	Wydłużanie	72°C	3 min
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	5 min

Endonukleaza Tru9I trawiła (24 h, 65°C) produkt PCR o długości 151 pz, w przypadku występowania wariantu A, na fragmenty o długościach 133 pz i 18 pz. Produkt specyficzny dla wariantu C nie posiadał natomiast miejsc restrykcyjnych dla tego enzymu.

4.2.2.3.4. Badanie polimorfizmu genu *SFTP2*, zlokalizowanego w pozycji +271 (G>C; Ala91Pro; rs17886395)

Polimorfizm zlokalizowany w pozycji +271 eksonu 2 analizowano prowadząc amplifikację próbek DNA przy użyciu starterów o sekwencjach:

Starter „forward”: 5’-AGAGCGTGGAGAGAAGGGGCA-3’

Starter „reverse”: 5’-GGGTTTGTCTGATCCCCATC-3’

Reakcję PCR prowadzono w warunkach:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	2 min
II.	33 cykle:		
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	58°C	30 s
	Wydłużanie	72°C	3 min
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	5 min

Produkt amplifikacji o długości 132 pz poddawano działaniu enzymu restrykcyjnego BbvI (24 h, 65°C). Endonukleaza ta trawiła produkt PCR odpowiadający allelowi C na fragmenty o długościach 101 pz i 31 pz, nie rozpoznawała natomiast produktu specyficznego dla wariantu G.

4.2.2.3.5. Badanie polimorfizmu genu *SFTP2*, zlokalizowanego w pozycji +667 (C>A; Glu223Lys; rs17881479)

W badaniach omawianego polimorfizmu, prowadzono reakcję amplifikacji w warunkach podanych wyżej, dla analizy SNP +26 C>A (punkt 4.2.2.3.3).

Wykorzystywano startery o sekwencjach:

Starter „forward”: 5’-GGAGCCTGCAGGTCGGGGAAAATCG-3’

Starter „reverse”: 5’-TCAGAACTCACAGATGGTCA-3’

Produkt PCR o długości 106 pz poddawany był działaniu endonukleazy α TaqI (65°C, 24 h). W przypadku, gdy w kodonie 223 występował wariant A, produkt był trawiony na fragmenty o długościach 83 pz i 23 pz. Produkt odpowiadający wariantowi C nie posiadał miejsca restrykcyjnego rozpoznawanego przez ten enzym.

4.2.2.4. Badanie wybranych polimorfizmów genu *SFTPD*

Badano trzy polimorfizmy genu *SFTPD*, zlokalizowane w pozycjach +32 (T>C, kodon 11, Met>Thr, rs721917), +478 (A>G, kodon 160, Ala>Thr, rs17885900) oraz +868 (T>A, kodon 270, Ser>Thr, rs3088308). Wykorzystywano metodę PCR -RFLP.

4.2.2.4.1. Badanie polimorfizmu genu *SFTPD*, zlokalizowanego w pozycji +32 (T>C; Met11Thr; rs721917)

Występowanie wariantów polimorficznych T/C, odpowiadających SNP zlokalizowanemu w pozycji +32 genu *SFTPD* badano metodą opisaną przez DiAngelo i wsp. [357], przy użyciu starterów o sekwencjach:

Starter „forward”: 5’-CTGGAAGCAGAAATGAAGAC-3’

Starter “reverse”: 5’-ACCAGGGTGCAAGCACTGCG-3’

Reakcję amplifikacji prowadzono w warunkach:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	2 min
II.	33 cykle:		
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	60°C	30 s
	Wydłużanie	72°C	3 min
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	5 min

Produkt PCR o długości 59 pz poddawano działaniu endonukleazy FspI (24 h, 37°C). Produkt odpowiadający wariantowi T (w odróżnieniu od allelu C) zawierał jedno miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez ten enzym. W wyniku trawienia otrzymywano fragmenty o długościach 40 pz i 19 pz.

4.2.2.4.2. Badanie polimorfizmu genu *SFTPD*, zlokalizowanego w pozycji +478 (G>A; Ala160Thr; rs17885900)

Polimorfizm genu *SFTPD*, zlokalizowany w pozycji +478 G>A eksonu 4 analizowano, według procedury zaproponowanej przez DiAngelo i wsp. [357]. W reakcji amplifikacji wykorzystywano startery o sekwencjach:

Starter „forward”: 5’-AGCGTGGAGTCCCTGGAAGC-3’

Starter “reverse”: 5’-AGATTCTCTCCATGTTCCCAG-3’

Reakcję PCR prowadzono w warunkach:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	2 min
II.	33 cykle:		
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	60°C	30 s
	Wydłużanie	72°C	3 min
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	5 min

Produkty PCR (163 pz) poddawano działaniu enzymu restrykcyjnego HhaI (24 h, 37°C). Enzym ten trawił produkt specyficzny dla wariantu G, co skutkowało

powstaniem dwóch fragmentów (142 pz i 21 pz), podczas gdy jeśli w badanej pozycji występował wariant A, produkt był niewrażliwy na działanie endonukleazy.

4.2.2.4.3. Badanie polimorfizmu genu *SFTPD*, zlokalizowanego w pozycji +868 (T>A; Ser270Thr; rs3088308)

Polimorfizm genu *SFTPD*, zlokalizowany w kodonie 270 analizowano korzystając z metody opisanej przez Lahti i wsp. [134]. Reakcję amplifikacji przeprowadzono przy użyciu pary starterów o sekwencjach:

Starter „forward”: 5'-ACGGAGGCACAGCTGCTG-3'

Starter “reverse”: 5'-GGAAAGCAGCCTCGTTCT-3'

Warunki reakcji PCR:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	2 min
II.	33 cykle:		
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	58°C	30 s
	Wydłużanie	72°C	3 min
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	5 min

Enzym MnlI użyty do trawienia produktów PCR o długości 115 pz (24 h, 37°C) w przypadku występowania wariantu T rozpoznawał dwa miejsca restrykcyjne, co skutkowało otrzymaniem trzech fragmentów: 54 pz, 42 pz oraz 19 pz. Produkt specyficzny dla wariantu A trawiony był w jednym miejscu, co powodowało powstanie dwóch fragmentów: 96 pz i 19 pz.

4.2.2.5. Badanie wybranych polimorfizmów genu *FCNI*

Metody badania polimorfizmów zlokalizowanych w regionie promotorowym w pozycjach -542 G>A oraz -144 C>A zostały opracowane przez autorkę rozprawy, w Pracowni Immunobiologii Zakażeń PAN. Sekwencje flankujące wybrane pozycje zostały zaprojektowane przy użyciu programu PRIMER3. Skuteczność metody została potwierdzona sekwencjonowaniem otrzymanych fragmentów (dane niezamieszczone).

4.2.2.5.1. Badanie polimorfizmu zlokalizowanego w regionie promotorowym, w pozycji -542 (G>A; rs10120023)

W celu badania polimorfizmu -542 G>A przeprowadzono reakcję amplifikacji z użyciem pary starterów o sekwencjach:

Starter „, forward”’: 5’ - CCCAGAAAATTCAGGGTTTG-3’

Starter „, reverse”’: 5’ - TAACTTTCAAATAATTTACTCCATC-3’

Warunki amplifikacji:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	3 min
II.	Przyłączanie starterów	59°C	30 s
III.	35 cykli:		
	Wydłużanie	72°C	30 s
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	59°C	30 s
IV.	Końcowe wydłużanie	72°C	3 min

Powstały produkt PCR poddawano działaniu enzymu restrykcyjnego α TaqI (24 h, 65°C). W przypadku występowania allelu G produkt (148 pz) był trawiony na fragmenty o długościach 123 pz i 25 pz, natomiast produkt odpowiadający wariantowi A pozostawał niestrawiony.

4.2.2.5.2. Badanie polimorfizmu zlokalizowanego w regionie promotorowym w pozycji -144 (C>A; rs10117466).

Badając polimorfizm genu *FCNI*, zlokalizowany w pozycji -144, stosowano metodę PCR-RFLP. Sekwencje wykorzystanych do tej reakcji starterów oraz warunki jej przebiegu przedstawiono niżej.

Starter „, forward”’: 5’ - TGAAGAGTCCCCCAGCTCT -3’

Starter „, reverse”’: 5’ - GGAAACATCCTTTGAGATGGC-3’

Warunki amplifikacji:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	3 min
II.	Przyłączanie starterów	59°C	30 s
III.	35 cykli:		
	Wydłużanie	72°C	30 s
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	59°C	30 s
IV.	Końcowe wydłużanie	72°C	3 min

Produkt PCR o długości 150 pz poddawano działaniu enzymu restrykcyjnego, BsuRI (HaeIII) w temperaturze 37°C (24 h). Wspomniana restryktaza trawiła produkt odpowiadający wariantowi C na dwa fragmenty (130 pz i 20 pz). Produkt PCR specyficzny dla wariantu A był niewrażliwy na działanie enzymu.

4.2.2.6. Badanie wybranych polimorfizmów genu *FCN2*

Polimorfizm zlokalizowany w pozycji: -64 A>C (region promotorowy, rs78654553), badano za pomocą PCR z wykorzystaniem allelospecyficznych starterów, natomiast w przypadku polimorfizmu w pozycji -4 A>G (region promotorowy, rs17514136) zastosowano technikę PCR-RFLP. Metody te zostały opracowane w Pracowni Immunobiologii Zakazań Instytutu Biologii Medycznej PAN [358].

4.2.2.6.1. Badanie polimorfizmu zlokalizowanego w regionie promotorowym, w pozycji -64 (A>C; rs78654553)

Badając polimorfizm genu *FCN2*, zlokalizowany w pozycji -64, prowadzono dwie reakcje amplifikacji. W każdej z nich stosowano 0,4 µM startera „forward”, 0,1 µM startera kontrolnego „reverse” (wspólne dla obu reakcji) oraz 0,4 µM startera „reverse”, specyficznego dla allelu A lub C. Sekwencje wspomnianych starterów przedstawiono niżej.

Starter “forward”: 5’-CACAAGCAAGTCAGCCTGTT-3’

Starter kontrolny “reverse”: 5’-CAGCTTTCAGGGACGAGAAG-3’

Starter “reverse”, specyficzny dla wariantu A:

5’-GGCTAGAGAAGCCAGCCTTACT-3’

Starter “reverse”, specyficzny dla wariantu C:

5’-GGCTAGAGAAGCCAGCCTCCCG-3’

Warunki amplifikacji:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	3 min
II.	35 cykli:		
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączenie starterów	62°C	30 s
	Wydłużanie	72°C	15 s
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	5 min

O obecności danego wariantu (A lub C) w badanej próbce DNA świadczył produkt o długości 207 pz, natomiast o prawidłowości wykonania doświadczenia produkt o długości 399 pz, powstający dzięki zastosowaniu startera kontrolnego, niezależnie od genotypu.

4.2.2.6.2. Badanie polimorfizmu zlokalizowanego w regionie promotorowym, w pozycji -4 (A>G; rs17514136)

W badaniach polimorfizmu genu *FCN2* w pozycji -4 wykorzystywano reakcję amplifikacji, przy zastosowaniu starterów o sekwencjach:

Starter „forward”: 5'-GAGCAGCCCTGGAGATGAT-3'

Starter „reverse”: 5'-AGAAGTTTCCAGGAGGAGGC-3'

Warunki amplifikacji:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	3 min
II.	35 cykli:		
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	63°C	30 s
	Wydłużanie	72°C	15 s
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	5 min

Powstający produkt o długości 296 pz, poddawano działaniu enzymu restrykcyjnego MboII, w temperaturze 37°C przez 24 h. W przypadku, gdy w badanej próbce występował wariant polimorficzny A, otrzymywano trzy fragmenty, o długościach: 80 pz, 88 pz i 128 pz. Obecność wariantu G związana była z utratą jednego z miejsc wrażliwych na trawienie, w związku z czym, pod wpływem stosowanego enzymu powstawały dwa fragmenty (88 pz i 208 pz).

4.2.2.7. Badanie występowania mutacji +1637delC genu *FCN3* (rs28357092)

Do badania występowania mutacji +1637delC genu *FCN3* stosowano metodę PCR-RFLP, według procedury opisanej przez Michalskiego i wsp. [217]. W reakcji amplifikacji wykorzystano startery o sekwencjach:

Starter „, forward”: 5'-GATCACATGGTGTTGGGTGT-3'

Starter „, reverse”: 5'-TTCACCTTTTTACCCAGGC-3'

Warunki amplifikacji:

I.	Wstępna denaturacja	98°C	3 min
II.	35 cykli:		
	Denaturacja	98°C	30 s
	Przyłączanie starterów	61°C	40 s
	Wydłużanie	72°C	40 s
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	3 min

Produkt PCR (650 pz) poddawano działaniu enzymu restrykcyjnego ApaI (1 h, 37°C). W przypadku braku badanej mutacji, otrzymywano fragmenty o długościach 266 pz i 384 pz, podczas gdy produkt odpowiadający wariantowi z delecją pozostawał niestrawiony.

4.2.2.8. Badanie polimorfizmów genów kodujących wybrane receptory Toll podobne oraz białko adaptorowe TIRAP/Mal

Badania wybranych polimorfizmów genów kodujących receptory Toll-podobne jak również białko adaptorowe TIRAP/Mal prowadzono za pomocą analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP).

4.2.2.8.1. Badanie polimorfizmu genu *TLR2*, zlokalizowanego w pozycji +2258 (G>A; Arg753Gln; rs5743708)

Celem oznaczenia występowania wariantów polimorficznych G i/lub A, próby DNA amplifikowano przy użyciu metody opisanej przez Schröder i wsp. [359]. Wykorzystywano startery o sekwencjach:

Starter „forward”: 5'-GCCTACTGGGTGGAGAACCT-3'

Starter „reverse”: 5'-GGCCACTCCAGGTAQGTCTT-3'

Warunki w jakich przebiegała reakcja:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	10 min
II.	30 cykli:		
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	55°C	30 s
	Wydłużanie	72°C	25 s
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	5 min

Produkt PCR o długości 340 pz poddawano działaniu enzymu restrykcyjnego SsiI (Acil) (24 h w temperaturze 37°C). Enzym ten trawił produkt odpowiadający wariantowi G w dwóch miejscach, co skutkowało otrzymaniem trzech fragmentów o długościach 227 pz, 75 pz i 38 pz. Obecność wariantu A powodowała utratę jednego miejsca restrykcyjnego, w wyniku czego powstawały fragmenty o długościach 302 pz i 38 pz.

4.2.2.8.2. Badanie polimorfizmu genu *TLR1*, zlokalizowanego w pozycji +1805 (T>G; Ile602Ser; rs5743618)

W badaniach omawianego polimorfizmu stosowano metodę opisaną przez Selvaraja i wsp. [328]. Zastosowano pary starterów, których sekwencje przedstawiono niżej:

Starter „forward”: 5’-GGAAAGTTATAGAGGAACCCT-3’

Starter “reverse”: 5’-CTTCACCCAGAAAGAATCGTGCC-3’

Warunki amplifikacji:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	5 min
II.	35 cykli:		
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	55°C	30 s
	Wydłużanie	72°C	30 s
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	2 min

Produkt PCR o długości 280 pz poddawano działaniu enzymu AluI (24 h, 37°C). Endonukleaza ta trawiła produkt odpowiadający wariantowi T na dwa fragmenty (129 pz oraz 151 pz), podczas gdy produkt odpowiadający wariantowi G pozostawał niestrawiony.

4.2.2.8.3. Badanie polimorfizmu genu *TLR6*, zlokalizowanego w pozycji +745 (C>T; Ser249Pro; rs5743810)

Celem oznaczenia występowania wariantów polimorficznych C i T próby DNA amplifikowano przy użyciu pary starterów o sekwencjach podanych niżej [328]:

Starter “forward”: 5’-GCATTTCCAAGTCGTTTCTATGT-3’

Starter “reverse”: 5’-GCAAAAACCCTTCACCTTGTT-3’

Warunki amplifikacji:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	5 min
II.	35 cykli:		
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	63°C	30 s
	Wydłużanie	72°C	30 s
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	2 min

Uzyskany produkt PCR o długości 210 pz poddawano działaniu restryktazy *AvaII* (24 h, 37°C). Wspomniany enzym rozpoznawał miejsce wrażliwe w produkcie odpowiadające wariantowi C, w wyniku czego powstawały fragmenty o długościach 160 pz oraz 50 pz. W przypadku występowania wariantu T, produkt amplifikacji nie ulegał trawieniu.

4.2.2.8.4. Badanie polimorfizmu genu *TLR4*, zlokalizowanego w pozycji +896 (A>G; Asp299Gly; rs4986790)

Polimorfizm genu *TLR4* w pozycji +896 badano metodą opisaną przez Lorenz i wsp. [360]. W reakcji PCR stosowano startery o sekwencjach:

Starter „forward”: 5'-GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG-3'

Starter „reverse”: 5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC-3'

Warunki amplifikacji:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	4 min
II.	30 cykli:		
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	55°C	30 s
	Wydłużanie	72°C	30 s
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	10 min

Produkty amplifikacji (249 pz) trawiono wykorzystując endonukleazę *NcoI* (24 h, 37°C). Produkt odpowiadający allelowi A nie posiadał miejsca restrykcyjnego dla wspomnianego enzymu, natomiast produkt specyficzny dla wariantu G ulegał trawieniu, w wyniku czego otrzymywano fragmenty o długościach 226 pz i 23 pz.

4.2.2.8.5. Badanie polimorfizmu genu *TIRAP*, zlokalizowanego w pozycji +975 (C>T; Ser180Leu; rs8177374)

W badaniach polimorfizmu genu *TIRAP* stosowano metodę PCR-RFLP, opisaną przez Selvaraja i wsp. [328]. Wykorzystywano startery o sekwencjach:

Starter „forward”: 5'-TGCTCATCACGCCGGGCTTCCTT-3'

Starter „reverse”: 5'-TAGGCAGCTCTGCTGAGGTCC-3'

Reakcję amplifikacji prowadzono w warunkach:

I.	Wstępna denaturacja	95°C	5 min
II.	35 cykli:		
	Denaturacja	95°C	30 s
	Przyłączanie starterów	62°C	30 s
	Wydłużanie	72°C	30 s
III.	Końcowe wydłużanie	72°C	2 min

Produkt PCR o długości 127 pz poddawano trawieniu enzymem restrykcyjnym Hpy188I (24 h, 37°C), w wyniku działania którego, w przypadku formy odpowiadającej wariantowi C powstawały dwa fragmenty (106 pz oraz 21 pz). Produkt charakterystyczny dla wariantu T był oporny na trawienie wspomnianą endonukleazą.

4.2.3. Metody immunologiczne

Oznaczenia stężeń białek i aktywności kompleksów MBL-MASP-1 oraz MBL-MASP-2 wykonywano za pomocą ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) i testów fluorescencji.

Inkubacje (za wyjątkiem opłaszczania płytek titracyjnych) prowadzono w komorze wilgotnej przy delikatnym wstrząsaniu, wykorzystując inkubator Unimax 1010 (Heidolph). Do płukania płytek pomiędzy poszczególnymi etapami zazwyczaj używano bufor TBS-Ca zawierający 0,05% Tween 20; w przypadkach użycia innego buforu zamieszczono odpowiedni opis.

4.2.3.1. Oznaczanie stężenia lektyny wiążącej mannozę (MBL) w surowicy

Stężenie lektyny wiążącej mannozę w surowicy badano stosując metodę ELISA opisaną przez Cedzyńskiego i wsp. [83]. Płytki titracyjne Maxisorp U96 (Nunc) opłaszczano roztworem mannanu drożdżowego (Sigma Aldrich) w buforze węglanowym (250 µg/ml, 50 µl na studzienkę) i inkubowano 18 h w temperaturze 4°C. Następnie blokowano miejsca niewysyczone antygenem za pomocą 1% roztworu BSA w buforze

TBS-Ca (200 μ l/studzienkę, 37°C, 2 godziny), płukano i nanoszono badane próby surowicy, rozcieńczone wstępnie 1:200 w 1% roztworze BSA w buforze imidazolowym (50 μ l/studzienkę). Jako wzorzec używano surowicę zdrowego dawcy o znanym stężeniu MBL (2000 ng/ml). Płytki z naniesionymi próbami inkubowano dwie godziny w temperaturze 37°C, a następnie przez noc w temperaturze 4°C. Do detekcji lektyny wykorzystywano swoiste mysie przeciwciała monoklonalne (rozcieńczenie 1:2000 w 1% roztworze BSA w „buforze do Ab”, klon HYB 131-01, BioPorto) oraz drugorzędowe królicze przeciwciała przeciwko mysim immunoglobulinom znakowane peroksydazą chrzanową (Dako, rozcieńczenie: 1:1000 w „buforze do Ab” z dodatkiem 1% BSA, 50 μ l/studzienkę). Inkubacje prowadzono w temperaturze 37°C (odpowiednio 2 h i 1 h). Po każdej inkubacji płytki trzykrotnie płukano. Jako substrat dla peroksydazy używano roztwór ABTS w buforze substratowym (2 mg/ml), z dodatkiem 0,025% H₂O₂ (50 μ l/studzienkę, 30 min, 37°C, w ciemności). Reakcję barwną hamowano za pomocą 2% roztworu kwasu szczawiowego (50 μ l/studzienkę). Absorbancję odczytywano przy użyciu czytnika Benchmark Plus (BioRad), przy długości fali 405 nm.

4.2.3.2. Oznaczanie aktywności kompleksów lektyny wiążącej mannozę z proteazą serynową MASP-1 (MBL-MASP-1) w surowicy

Aktywność kompleksów MBL-MASP-1 oznaczano za pomocą oceny zdolności trawienia syntetycznego substratu dla MASP-1 (VPR-AMC, Bachem), w teście fluorescencji [361]. W tym celu, białe płytki Microfluor (Nunc) opłaszczano roztworem mannanu drożdżowego (1 mg/ml, 50 μ l/studzienkę) w buforze węglanowym i inkubowano 18 h w temperaturze 4°C. Miejsca niewysyczone antygenem blokowano buforem blokującym (200 μ l/studzienkę, 2 h w temperaturze 37°C), po czym płytki płukano buforem płuczającym i nanoszono badane próby surowicy, rozcieńczone w buforze do rozcieńczeń w stosunku 1:10 (100 μ l/studzienkę). Inkubację prowadzono 24 h w temperaturze 4°C. Następnie płytki płukano buforem o wysokiej sile jonowej i nanoszono 0,1 mM roztwór substratu VPR-AMC w buforze substratowym (100 μ l/studzienkę). Skład buforów używanych w tym teście podano w podrozdziale 4.1.7.2. Pomiaru fluorescencji dokonywano przy długościach fali 355 nm/460 nm w czasie 1 godziny co 30 s, wykorzystując do tego celu czytnik wielofunkcyjny Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific). Wzorzec stanowiła surowica zdrowego dawcy o znanym stężeniu MBL (2000 ng/ml) i przyjętej umownie jako 1000 mU/ml aktywności kompleksów MBL-MASP-1.

4.2.3.3. Oznaczanie aktywności kompleksów lektyny wiążącej mannozę z proteazą serynową MASP-2 (MBL-MASP-2) w surowicy

Aktywność kompleksów MBL-MASP-2 oznaczano oceniając zdolność MASP-2 do trawienia składnika C4 metodą ELISA opisaną przez Petersena i wsp. [362], z modyfikacjami zaproponowanymi przez Świerzko i wsp. [75]. Płytki titracyjne Maxisorp U96 (Nunc) opłaszczano roztworem mannanu drożdżowego (10 µg/ml) w buforze węglanowym (50 µl/studzienkę, 4°C, 24 h), po czym płukano i miejsca niewysyczone blokowano 0,1% roztworem BSA w TBS-Ca (200 µl/studzienkę, 2 h w temperaturze 37°C). Następnie, наносzono próby surowicy (50 µl/studzienkę), rozcieńczone 1:400 w buforze o wysokiej sile jonowej („bufor wiążący MBL”), co zapewnia środowisko reakcji uniemożliwiające aktywację dopełniacza na drodze klasycznej a także powoduje inaktywację endogennego C4. Po 24 h inkubacji w temperaturze 4°C, płytki płukano i наносzono na nie surowicę zdrowego dawcy będącą źródłem C4 (50 µl/studzienkę, rozcieńczoną 1:4000 w buforze TBS z dodatkiem 0,05% Tween) i inkubowano płytki 2 h w temperaturze 37°C. Po etapie płukania dodawano królicze przeciwciała przeciwko produktom aktywacji składnika C4 (C4c, Dako), rozcieńczone 1:2000 w „buforze do Ab” z dodatkiem 1% BSA (50 µl/studzienkę)

i kontynuowano inkubację w tych samych warunkach. Po ponownym płukaniu, наносzono kozie przeciwciała przeciwko immunoglobulinom króliczym, znakowane peroksydazą chrzanową (Dako), rozcieńczone 1:1000 w 1% rozworze BSA w „buforze do Ab” (50 µl/studzienkę) i inkubowano płytki 1 h w temperaturze 37°C. Substratem dla peroksydazy był ABTS (roztwór 2 mg/ml w buforze substratowym, z dodatkiem 0,025% H₂O₂, 50 µl/studzienkę). Inkubację prowadzono w ciemności (30 min, w temperaturze 37°C). Reakcję barwną hamowano przy użyciu 2% roztworu kwasu szczawowego (50 µl/studzienkę). Wzorzec stanowiła surowica zdrowego dawcy o znanym stężeniu MBL (2000 ng/ml) i przyjętej umownie jako 1000 mU/ml aktywności kompleksów MBL-MASP-2. Absorbancję odczytywano przy długości fali 405 nm wykorzystując czytnik Benchmark Plus (BioRad).

4.2.3.4. Badanie stężenia białka surfaktantu płucnego SP-D w surowicy

Stężenie kolektyny SP-D w badanych próbach surowicy oceniano za pomocą dostępnego komercyjnie testu SP-D Human ELISA kit firmy Hycult. Wszystkie etapy testu prowadzono w temperaturze pokojowej, pomiędzy inkubacjami płytki płukano czterokrotnie buforem „Wash buffer”. Przed przystąpieniem do badań dołączone do

zestawu „Wash buffer” oraz „Dilution buffer” rozcieńczano, zgodnie z zaleceniami producenta, wodą demineralizowaną (odpowiednio 40x i 10x). Próby badane rozcieńczano w uprzednio przygotowanym „Dilution buffer” w stosunku 1:10, natomiast dołączony do zestawu „Standard” rozcieńczono zgodnie z zaleceniami producenta. Następnie, próby surowicy i „Standard” наносono na płytkę (100 μ l/studzienkę) i inkubowano 1 h. W kolejnym etapie dodawano przeciwciało pierwszorzędowe („Tracer biotynylated”), rozcieńczone według wskazań producenta w „Dilution buffer” (100 μ l/ studzienkę) i prowadzono inkubację przez kolejną godzinę. Następnie, do studzienek наносono „Streptavidin-peroxidase” (100 μ l/studzienkę), rozcieńczoną wstępnie wg wskazań producenta w buforze „Dilution buffer” i inkubowano jak wyżej, po czym dodawano substrat „TMB” (100 μ l/studzienkę). Inkubację kontynuowano w ciemności przez 30 min, po czym hamowano reakcję barwną dodając 100 μ l „Stop solution” i mierzono absorbancję za pomocą czytnika Benchmark Plus (BioRad), przy długości fali 450 nm.

4.2.3.5. Oznaczanie stężenia fikoliny-1 w surowicy

Do oznaczania stężenia fikoliny-1 w badanych próbach wykorzystano metodę TRIFMA (ang. time-resolved immunofluorometric assay) opisaną przez Wittenborn i wsp. [168]. Białe płytki titracyjne Optiplate 384 (PerkinElmer) opłaszczano swoistym przeciwciałem monoklonalnym (klon 7G1, 0,5 μ g/ml, 20 μ l/studzienkę) rozcieńczonym w PBS i inkubowano 18 h w temperaturze 4°C. Przeciwciała otrzymano dzięki uprzejmości Prof. Jensa C. Jenseniusa (Aarhus University, Dania). W kolejnym etapie, miejsca niewysyczone przeciwciałami blokowano za pomocą 0,1% roztworu BSA w buforze TBS-Ca (100 μ l/studzienkę, 2 h, 37°C). Do studzienek наносono następnie próby badane, rozcieńczone w buforze do rozcieńczania surowicy, skład którego podany został w podrozdziale 4.1.7.2 i inkubowano płytki przez noc w temperaturze 4°C. Do detekcji związanej fikoliny-1 używano biotynylowanych przeciwciał (klon 7G1, 0,5 μ g/ml w „buforze do Ab” z dodatkiem 0,1% BSA, 20 μ l/studzienkę). Po dwugodzinnej inkubacji w temperaturze 37°C наносono roztwór streptawidyny znakowanej europem (1:1000 w buforze do jej rozcieńczania z dodatkiem 0,05% Tween 20 oraz 10 mM EDTA, 20 μ l/studzienkę) i kontynuowano inkubację (1 h, 37°C). Pomiędzy wspomnianymi etapami, płytki płukano buforem TBS-Ca z dodatkiem 0,05% Tween. W celu wzmocnienia sygnału stosowano „Enhancement solution” w objętości 20 μ l/studzienkę (30 min) a następnie mierzono fluorescencję przy długościach fali 340 nm/615 nm używając czytnika Varioscan Flash. Wzorzec

stanowiła surowica pochodząca od zdrowego dawcy, o stężeniu fikoliny-1 wynoszącym 800 ng/ml.

4.2.3.6. Oznaczanie stężenia fikoliny-2 w surowicy

W celu oznaczenia stężenia fikoliny-2 w surowicy wykorzystano metodę opisaną przez Kilpatricka i wsp. [192], po modyfikacji. Białe płytki titracyjne Optiplat 384 (PerkinElmer) opłaszczano swoistymi monoklonalnymi przeciwciałami (klon GN4, 1,8 µg/ml w buforze PBS, 20 µl/studzienkę). Przeciwciała te otrzymano dzięki uprzejmości Prof. Misao Matsushity (Tokai University, Japonia). Po 24 h inkubacji w temperaturze 4°C płytki płukano buforem płuczającym i blokowano za pomocą TBS-Ca z dodatkiem 0,1% BSA (2 h, 37°C, 100 µl/studzienkę). Następnie, наносono badane próby surowicy, rozcieńczone 1:100 w buforze do rozcieńczeń, którego skład podano w podrozdziale 4.1.7.2. i inkubowano płytki przez noc, w temperaturze 4°C. W celu wykrycia związanego białka wykorzystywano przeciwciała monoklonalne (klon GN5) znakowane biotyną (również otrzymane od Prof. Misao Matsushity) (0,5 µg/ml w 0,1% roztworze BSA w buforze do rozcieńczania przeciwciał, 20 µl/studzienkę). Po dwóch godzinach inkubacji w temperaturze 37°C dodawano streptawidynę znakowaną europem (1:1000 w buforze TBS z dodatkiem 0,05% Tween 20 oraz 10 mM EDTA, 20 µl/studzienkę) i kontynuowano inkubację (1 h, 37°C). W celu wzmocnienia sygnału stosowano „Enhancement solution” (20 µl/studzienkę, 30 min). Fluorescencję (przy długościach fali 340 nm/615 nm) oceniano za pomocą czytnika Varioscans Flash. Wzorzec stanowiła surowica pochodząca od zdrowego dawcy, o stężeniu fikoliny-2 wynoszącym 3900 ng/ml.

4.2.3.7. Oznaczanie stężenia fikoliny-3 w surowicy

W celu oznaczenia stężenia fikoliny-3 w surowicy wykorzystano metodę opisaną przez Michalskiego i wsp. [207, 217]. Płytki titracyjne Maxisorp U96 (Nunc) opłaszczano roztworem LPS *Hafnia alvei* PCM 1200 (otrzymanego dzięki uprzejmości Prof. Jolanty Łukasiewicz z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław) w PBS (5 µg/studzienkę) i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C, a następnie niewysyczone miejsca blokowano 1% roztworem BSA w TBS-Ca (2 h, 37°C). Badane próby surowicy rozcieńczano 1:800 w 1% roztworze BSA w buforze o wysokiej sile jonowej („MBL binding buffer”) i наносono do studzienek (po 50 µl). Po 24 h inkubacji w temperaturze 4°C dodawano mysie przeciwciała monoklonalne, klon 4H5 (Hycult) rozcieńczone 1:200 w „buforze do Ab” (50 µl/studzienkę) i inkubowano płytki

kolejne 2 h w temperaturze 37°C. Następnie наносzono znakowane peroksydazą chrzanową królicze przeciwciała skierowane przeciwko immunoglobulinom mysim (Dako), rozcieńczone 1:1000 w „buforze do Ab” (50 µl/studzienkę) i kontynuowano inkubację (1 h, 37°C). Jako substrat dla enzymu wykorzystywano ABTS (Sigma-Aldrich) (roztwór 2 mg/ml w buforze substratowym, z dodatkiem 0,025% H₂O₂, 50 µl/studzienkę). Barwną reakcję hamowano przy użyciu 2% roztworu kwasu szczawiowego. Wzorzec stanowiła surowica zdrowego dawcy o znanym stężeniu fikoliny-3 (25 µg/ml). Absorbancję odczytywano za pomocą czytnika Benchmark Plus, przy długości fali 405 nm.

4.2.4. Analiza statystyczna wyników

Częstości występowania badanych genotypów w poszczególnych grupach porównywano za pomocą testu χ^2 . Analizę rozpoczynano od utworzenia tabeli 3x2, gdy w teście otrzymano istotność statystyczną niższą niż 0,05, poszczególne genotypy porównywano w tabelach 2x2. Posługując się testem χ^2 porównywano również częstości występowania alleli badanych polimorfizmów pomiędzy grupami. Szansy wystąpienia danego zdarzenia w porównywanych grupach określano za pomocą ilorazu szans (ang. odds ratio, OR). Stężenia oraz aktywności badanych białek w dwóch grupach niezależnych porównywano wykorzystując test *U* Manna-Whitneya. Częstość występowania wysokich i niskich stężeń oraz aktywności badanych czynników porównywano wykorzystując test χ^2 . Korelacje oznaczano przy użyciu testu Rang Spearmana. Zmiany stężenia badanych czynników odporności w trakcie leczenia (przy dwukrotnych pobraniach prób) analizowano za pomocą testu kolejności par Wilcoxon. Różnice uznawano za istotne statystycznie, gdy $p < 0,05$. Potencjał różnicujący badanych białek oceniano analizując krzywą ROC, indeks Yudena oraz regresję logistyczną. Do analiz wykorzystywano program GraphPad Prism 6.

5. Wyniki

5.1. Charakterystyka grup badanych

Do grupy chorych (TB) zostały zaklasyfikowane osoby, u których mikrobiologicznie i radiologicznie potwierdzono gruźlicę płuc. Zgromadzono 434 próby surowicy oraz DNA. Wybrane dane (wiek, płeć) przedstawiono w tabeli 10. Grupę odniesienia (grupa kontrolna, C; n=250) stanowiły osoby zdrowe, niezgłaszające w wywiadzie historii ciężkich/nawracających chorób zakaźnych, chorób z autoagresji i nowotworów. Średnia wieku w grupie C była istotnie niższa niż w grupie TB ($p < 0,0001$). Średni wiek kobiet chorujących na gruźlicę nie różnił się od wieku pacjentów płci męskiej, natomiast w przypadku grupy kontrolnej różnica była istotna statystycznie ($p < 0,0001$).

Tabela 10. Charakterystyka grup pacjentów z potwierdzoną gruźlicą płuc (TB) oraz zdrowych ochotników (C).

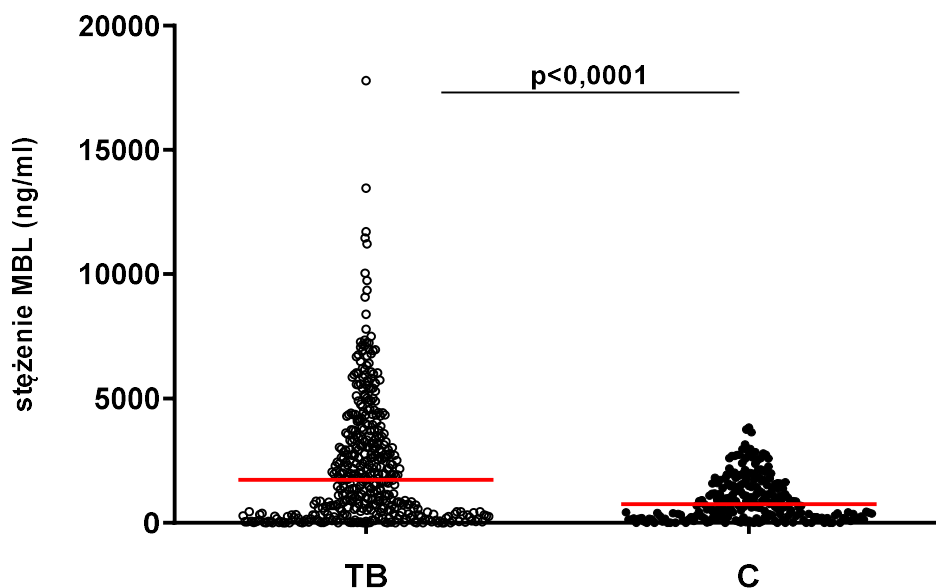
Grupa	Liczebność	Wiek (w latach)		
		średnia	±SD	zakres
TB	434	54	16,2	18-94
kobiety	155	54	19,4	18-94
mężczyźni	279	54	14,1	20-93
C	250	41	9,7	18-75
kobiety	100	49	8,0	18-75
mężczyźni	150	36	7,4	23-64

SD - odchylenie standardowe (ang. standard deviation)

5.2. Badanie stężenia lektyny wiążącej mannozę (MBL) w surowicy oraz polimorfizmów genu *MBL2*

5.2.1. Badanie stężenia aktywnej lektyny wiążącej mannozę (MBL) w surowicy

Stężenie MBL w surowicy określano za pomocą funkcjonalnego testu ELISA, pozwalającego na wykrycie biologicznie aktywnych cząsteczek tej lektyny, zdolnych do rozpoznania i przyłączania się do mannanu *Saccharomyces cerevisiae*. Zbadano próby otrzymane od 432 osób, u których rozpoznano gruźlicę płuc oraz od 239 zdrowych ochotników. Stężenia lektyny wiążącej mannozę w grupie pacjentów (mediana: 1741 ng/ml; zakres 0-17788 ng/ml) były znacząco wyższe w porównaniu z grupą osób zdrowych (mediana: 747 ng/ml; zakres 0-3829 ng/ml), $p < 0,0001$ (test *U* Manna-Whitneya). Uzyskane dane przedstawiono na ryc. 17.



Ryc. 17. Porównanie stężeń MBL w surowicy pacjentów chorych na gruźlicę (TB) oraz osób zdrowych (C). Na wykresie przedstawione zostały wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

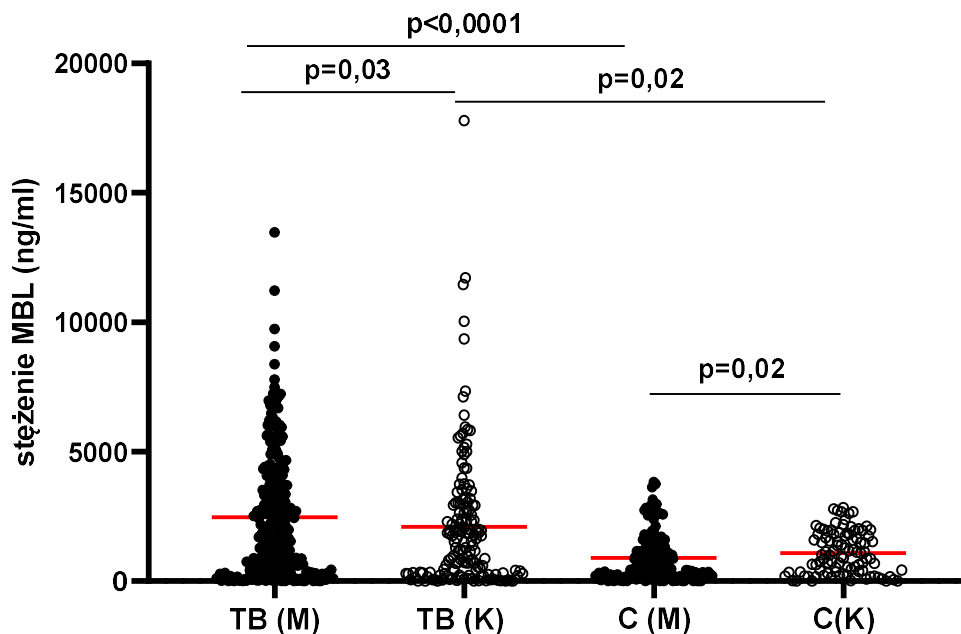
Nie zaobserwowano znaczących statystycznie różnic częstości występowania ilościowego niedoboru MBL (stężenie poniżej 100 ng/ml) pomiędzy analizowanymi grupami. U pacjentów leczonych z powodu gruźlicy istotnie częściej ($p < 0,0001$) występowały wysokie stężenia MBL (>2399 ng/ml; wartość odpowiadająca 90. centylowi wyznaczonemu dla grupy kontrolnej). Częstość występowania niskich i wysokich stężeń przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Porównanie częstości występowania niskich i wysokich stężeń MBL w grupie badanej (TB) oraz kontrolnej (C).

Stężenie MBL	Grupa		Istotność statystyczna	OR (95% CI)
	TB n (%)	C n (%)		
<100 ng/ml (niedobór)	58 (13,4)	34 (14,2)	$p=0,8$	0,94 (0,59-1,48)
>2399 ng/ml	172 (39,8)	23 (9,6)	$p < 0,0001$	6,9 (4,35-10,92)

OR - iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

Istotnie statystycznie różnice zaobserwowano również porównując stężenie MBL w zależności od płci badanych osób. Wśród pacjentów, mediana była znacząco wyższa w grupie mężczyzn (1910 ng/ml wobec 1443 ng/ml wśród kobiet, $p=0,03$). W grupie kontrolnej zaobserwowano przeciwną zależność (mediany, odpowiednio: 602 ng/ml i 987 ng/ml, $p=0,02$). Porównując dane uzyskane dla osób tej samej płci, obserwowano wyraźne różnice pomiędzy grupami TB i C (ryc. 18, tabela 12).



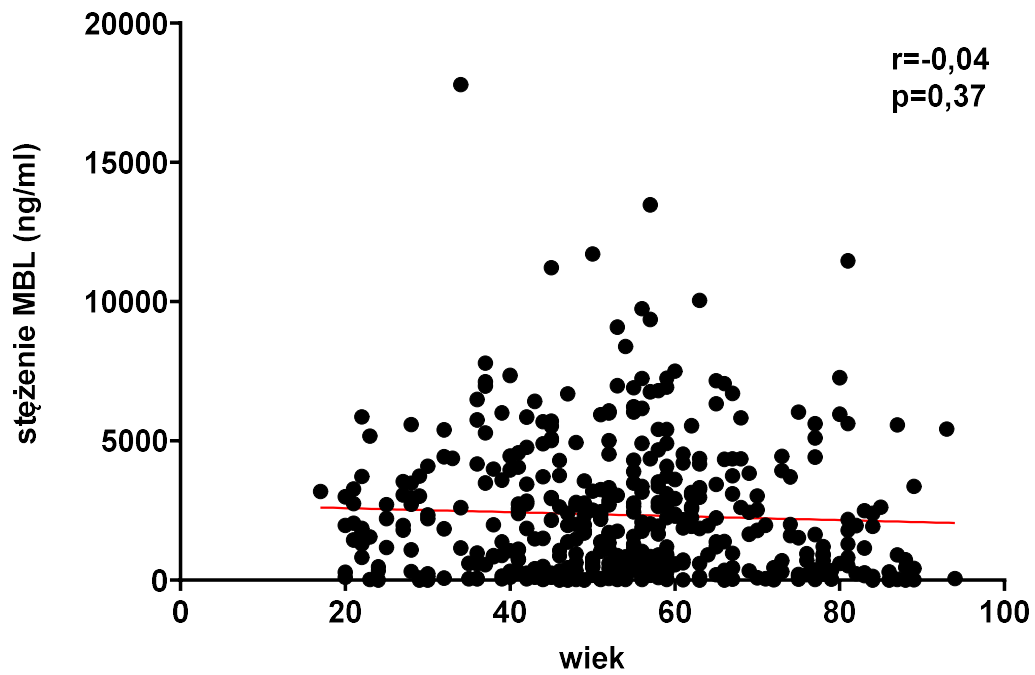
Ryc. 18. Stężenia MBL w próbach surowicy mężczyzn (M) i kobiet (K) zakwalifikowanych do grupy badanej (TB) i kontrolnej (C). Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

Zaobserwowano znaczącą korelację stężenia omawianego białka z wiekiem w grupie C, lecz nie w grupie osób chorych (TB) (ryc. 19). Analiza uzyskanych wyników w zależności od wieku, w większości przypadków potwierdziła wspomniane różnice stężeń (ryc. 20, 21). Stężenia MBL u mężczyzn chorych na gruźlicę w obu analizowanych grupach wiekowych były znacząco wyższe niż u mężczyzn zakwalifikowanych do grupy kontrolnej (ryc. 21). Jednakże, wśród kobiet, które ukończyły 40 lat, mediana wyznaczona dla chorych na gruźlicę płuc nie różniła się znacząco od tej, uzyskanej dla przedstawicielek grupy odniesienia (tabela 12). W przypadku kobiet młodszych, mimo znacznie wyższej mediany w grupie pacjentek, różnica również nie przekroczyła progu istotności statystycznej ($p=0,13$), co przypuszczalnie wynika z niewielkiej liczebności osób zdrowych w tej grupie wiekowej (tabela 12).

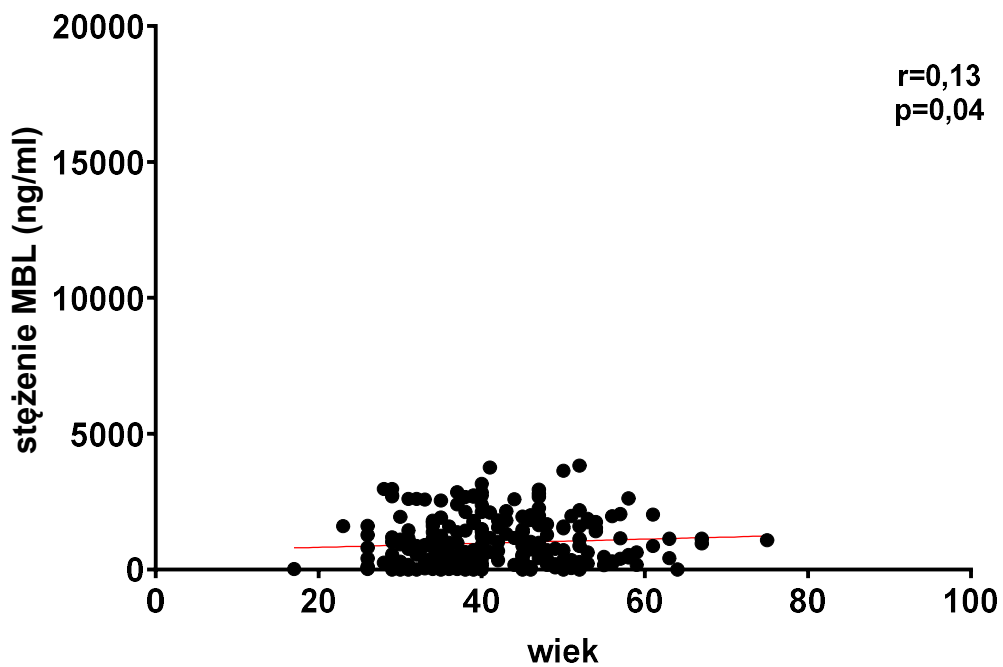
Tabela 12. Stężenia MBL w surowicy osób zakwalifikowanych do grupy badanej (TB) oraz kontrolnej (C).

		Stężenie MBL (ng/ml)		Istotność statystyczna
		Grupa TB	Grupa C	
ogółem	n	432	239	p<0,0001
	mediana	1741	747	
	średnia	2339	978	
	zakres	0-17788	0-3829	
<40 r.ż.	n	78	113	p<0,0001
	mediana	1963	602	
	średnia	2521	828	
	zakres	0-17788	0-2971	
≥40 r.ż.	n	354	126	p<0,0001
	mediana	1657	923	
	średnia	2299	112	
	zakres	0-13471	0-3829	
mężczyźni	n	278	141	p<0,0001
	mediana	1910	602	
	średnia	2475	903	
	zakres	0-13471	0-3829	
mężczyźni <40 r.ż.	n	40	110	p=0,0002
	mediana	1975	613	
	średnia	2450	834	
	zakres	0-7791	0-2971	
mężczyźni ≥40 r.ż.	n	238	31	p=0,003
	mediana	1873	479	
	średnia	2479	1147	
	zakres	0-13471	0-3829	
kobiety	n	154	98	p=0,02
	mediana	1443	987	
	średnia	2094	1086	
	zakres	0-17788	0-2846	
kobiety <40 r.ż.	n	38	5	p=0,13
	mediana	1911	198	
	średnia	2595	1153	
	zakres	0-17788	18-2828	
kobiety ≥40 r.ż.	n	116	93	p=0,2
	mediana	1173	1013	
	średnia	1930	1082	
	zakres	0-11708	0-2789	

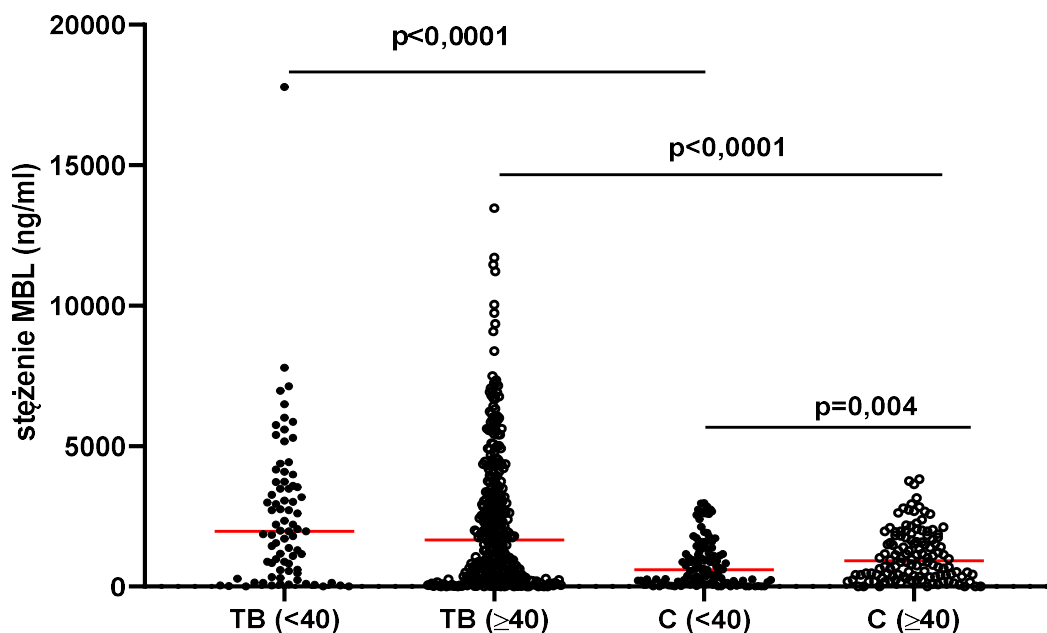
A



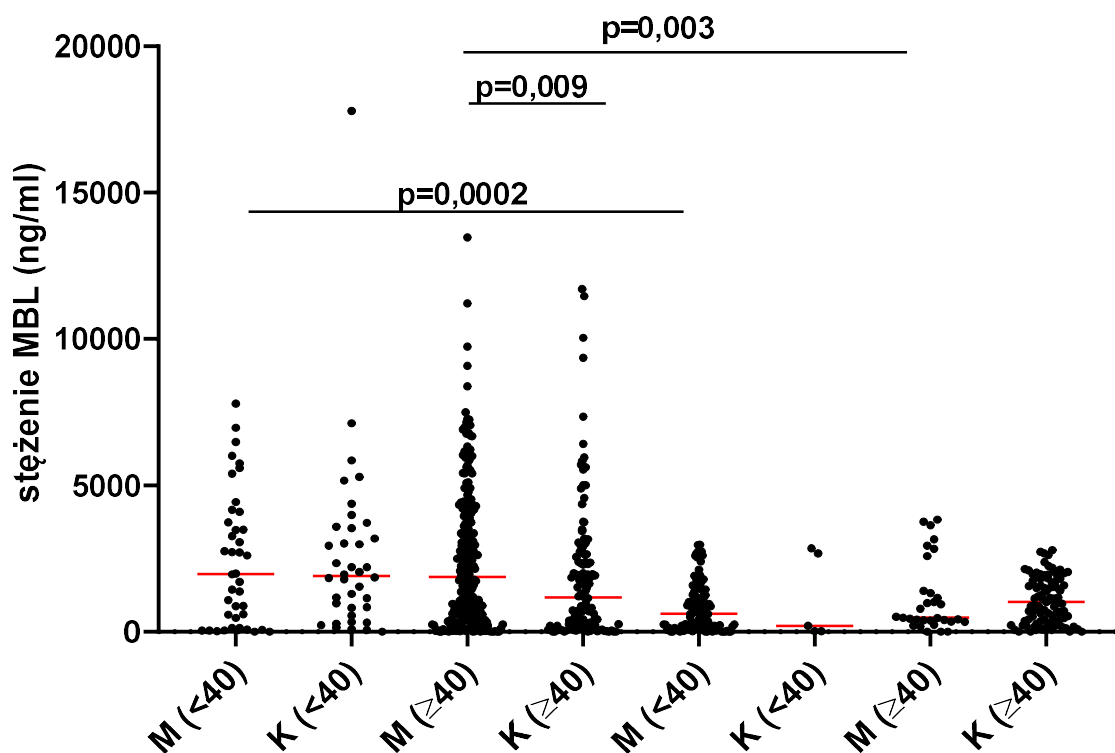
B



Ryc. 19. Korelacje stężenia MBL w surowicy z wiekiem w grupie pacjentów (TB – wykres A) oraz kontrolnej (C – wykres B). Wykresy przedstawiają wartości indywidualne oraz linie trendu; r - współczynnik korelacji Spearmana.



Ryc. 20. Porównanie stężeń MBL w surowicy w grupie pacjentów (TB) oraz kontrolnej (C), w zależności od wieku. Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany (czerwone linie).



Ryc. 21. Porównanie stężeń MBL w surowicy, w grupie pacjentów chorych na gruźlicę (TB) i kontrolnej (C) z uwzględnieniem wieku i płci badanych osób; M - mężczyźni, K - kobiety. Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

5.2.2. Badanie polimorfizmów genu *MBL2*, zlokalizowanych w eksonie 1 i regionie promotorowym oraz ich wpływu na stężenie MBL w surowicy

Za pomocą metod PCR oraz PCR-RFLP określono warianty polimorficzne genu *MBL2* u 418 pacjentów oraz 248 osób zdrowych. W grupie TB, 257 osób było homozygotami A/A, 145 - heterozygotami A/O, natomiast 16 – homo- lub heterozygotami O/O. W grupie kontrolnej zanotowano 163 genotypy A/A, 78 A/O oraz 7 O/O (tabela 13). Analiza statystyczna (test χ^2) nie wykazała znaczących różnic częstości występowania wariantów polimorficznych O między analizowanymi grupami. Różnic takich nie zaobserwowano również porównując częstość występowania poszczególnych alleli: D, B i C (odpowiadających polimorfizmom zlokalizowanym w kodonach 52, 54 oraz 57 eksonu 1 genu *MBL2*) (dane niezamieszczone). Uwzględniając SNP regionu promotorowego, stwierdzono, że genotypy YA/YA (związane z najwyższym stężeniem aktywnej MBL) w grupie chorych występują rzadziej niż w grupie kontrolnej, lecz różnica nie osiągnęła istotności statystycznej (31% vs 37%, $p=0,08$). Częstość występowania genotypów odpowiadających za niedobór MBL (LXA/O i O/O) nie różniła się pomiędzy analizowanymi grupami i wynosiła w grupie TB 15%, natomiast w grupie C - 10% ($p=0,09$).

Tabela 13. Częstość występowania genotypów oraz alleli związanych z polimorfizmami zlokalizowanymi w eksonie 1 genu *MBL2* w grupie pacjentów (TB) i kontrolnej (C).

Grupa	Genotyp			χ^2	p*	Allele (%)		OR (95% CI)	Istotność statystyczna
	A/A n (%)	A/O n (%)	O/O n(%)			A n (%)	O n (%)		
TB	257 (61,5)	145 (34,7)	16 (3,8)	1,4	0,5	659 (78,8)	177 (21,2)	1,18 (0,9 -1,56)	p=0,25
C	163 (65,7)	78 (31,5)	7 (2,8)			404 (81,5)	92 (18,5)		

*- wartości p, to wynik analizy tabeli 3x2; OR - iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

Określono również wpływ badanych polimorfizmów na stężenie MBL w surowicy. Zgodnie z oczekiwaniami, obecność wariantów D, B lub C (O) eksonu 1 oraz wariantu X regionu promotorowego genu *MBL2* wpływała znacząco na stężenie jego produktu w surowicy. U nosicieli genotypów YA/YA lub YA/XA obserwowano znacząco wyższe stężenie tego białka w surowicy, w porównaniu z osobami, u których

oznaczono genotyp XA/XA lub co najmniej jeden allel O (tabela 14). Najwyższe mediany stężeń MBL obserwowano u nosicieli genotypu YA/YA (tabela 14). Z drugiej strony, za wyjątkiem osób, u których stwierdzono genotyp O/O (stosunkowo nielicznych), wartości oznaczone w grupie TB były znacząco wyższe niż u osób zdrowych o odpowiednich genotypach (tabela 14).

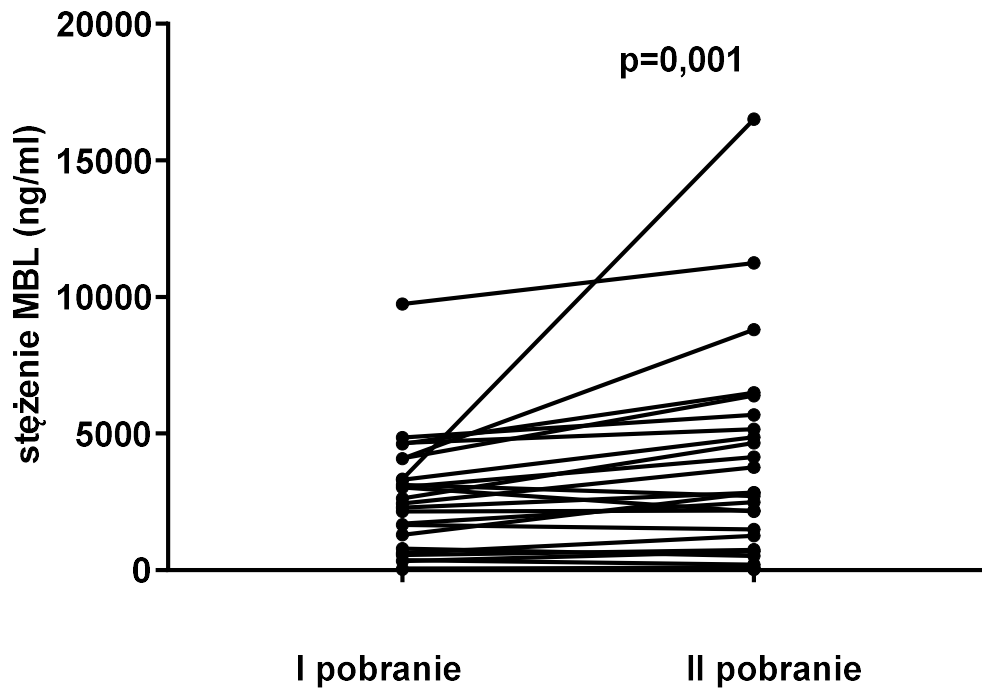
Tabela 14. Wpływ genotypu *MBL2* na stężenie lektyny wiążącej mannozę (MBL) w surowicy.

Genotyp <i>MBL2</i>	Grupa TB	Grupa C	Istotność statystyczna
	mediana (ng/ml)	mediana (ng/ml)	
YA/YA	3714	1492	p<0,0001
YA/XA	2636 ^a	960 ^b	p<0,0001
XA/XA	1368 ^a	357 ^c	p=0,003
YA/O	595 ^a	208 ^c	p<0,0001
O/O	15,5 ^a	0 ^c	p=0,2
XA/O+O/O	45 ^a	9 ^c	p=0,03

^a – p<0,0001 (vs YA/YA w grupie TB); ^b – p=0,004; ^c – p<0,0001 (vs YA/YA w grupie C)

5.2.3. Zmiany stężenia MBL w przebiegu leczenia

U 24 chorych zbadano po dwie próby surowicy, z których pierwsza otrzymana była z krwi obwodowej bezpośrednio po rozpoznaniu gruźlicy (tak jak u pozostałych pacjentów), natomiast druga – z krwi pobranej w trakcie leczenia (po kilku tygodniach antybiotykoterapii). Zaobserwowano, że u większości badanych osób, stężenie MBL wyraźnie wzrasta. Mediana wartości uzyskanych dla pierwszego pobrania wynosiła 2367 ng/ml, natomiast dla drugiego – 2771 ng/ml (p=0,002, test kolejności par Wilcoxon). Wzrost stężenia MBL po podjęciu leczenia obserwowano przede wszystkim u nosicieli genotypu A/A (mediana dla I pobrania: 3040 ng/ml; dla II pobrania: 4138 ng/ml, p=0,003). W przypadku nosicieli genotypów A/O oraz O/O różnice stężenia MBL pomiędzy pobraniami nie przekroczyły progu istotności statystycznej (odpowiednio 560 ng/ml i 683 ng/ml, p=0,09).

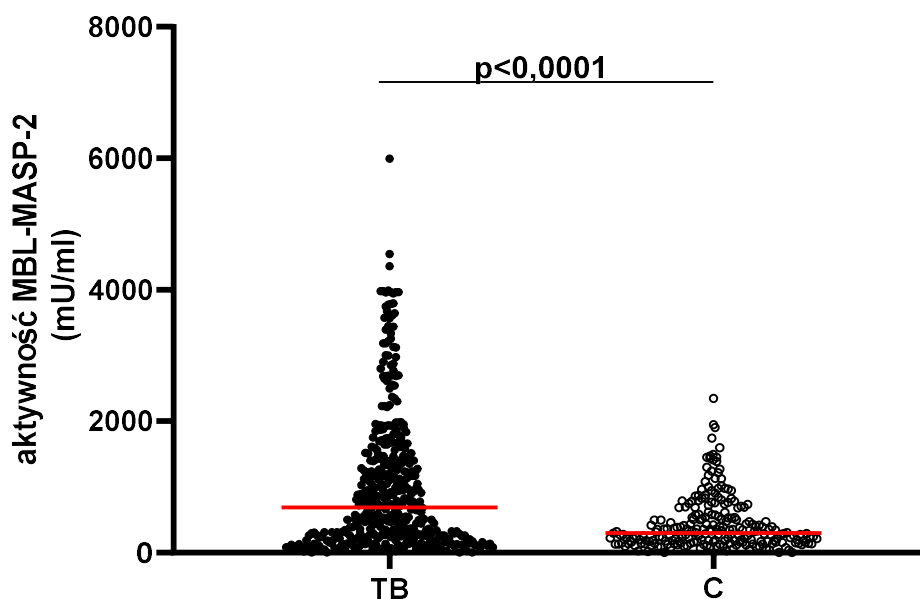


Ryc. 22. Porównanie stężeń MBL w surowicy pacjentów chorych na gruźlicę płuc przed podjęciem leczenia (I pobranie) i w trakcie antybiotykoterapii (II pobranie).

5.3. Badanie aktywności kompleksów MBL z proteazą serynową MASP-2 w surowicy oraz ocena wpływu polimorfizmów genu *MBL2* na aktywność tych kompleksów. Badanie występowania mutacji genu *MASP2* i ocena jej wpływu na aktywność kompleksów MBL-MASP-2.

5.3.1. Badanie aktywności kompleksów MBL-MASP-2 w surowicy

Zdolność kompleksów MBL-MASP-2 do trawienia składnika C4 dopełniacza oznaczono w 428 próbach surowicy pochodzących od osób chorych na gruźlicę oraz 232 próbach otrzymanych od osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej. Podobnie jak w przypadku stężenia MBL, mediana otrzymana dla grupy TB (689 mU/ml) okazała się istotnie wyższą niż wartość uzyskana dla grupy C (301 mU/ml, $p < 0,0001$, ryc. 23).



Ryc. 23. Porównanie aktywności kompleksów MBL-MASP-2 w surowicy pacjentów chorych na gruźlicę (TB) oraz osób zdrowych (C). Na wykresie przedstawione zostały wartości indywidualne oraz mediany aktywności (czerwone linie).

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic częstości występowania niskich aktywności (<math>< 98</math> mU/ml, wartości odpowiadającej 10. centylowi dla grupy kontrolnej). Natomiast wysokie aktywności kompleksów MBL-MASP-2 (>978 mU/ml, wartość odpowiadająca 90. centylowi dla grupy kontrolnej) występowały istotnie częściej (<math>p < 0,0001</math>) wśród pacjentów niż osób zdrowych. Szczegółowe wyniki zaprezentowano w tabeli 15.

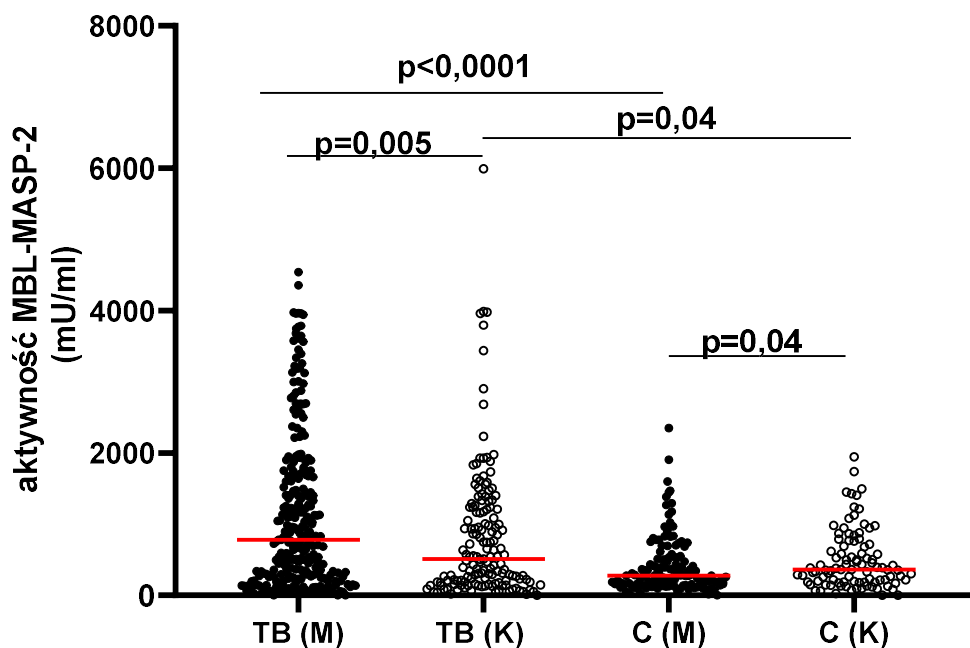
Tabela 15. Porównanie częstości występowania niskich i wysokich aktywności MBL-MASP-2 w grupie badanej (TB) oraz kontrolnej (C).

Aktywność kompleksów MBL-MASP-2	Grupa		Istotność statystyczna	OR (95% CI)
	TB n (%)	C n (%)		
<math>< 98</math> mU/ml	43 (10,0)	22 (9,5)	$p=0,8$	1,06 (0,62-1,84)
>978 mU/ml	168 (39,3)	24 (10,3)	$p < 0,0001$	5,6 (3,57-8,76)

OR - iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

Zarówno wśród chorujących mężczyzn, jak i kobiet zanotowano wyższą aktywność kompleksów MBL-MASP-2, w porównaniu z mężczyznami i kobietami zakwalifikowanymi do grupy odniesienia. Wyniki zostały przedstawione w tabeli 16 oraz na ryc. 24. Podobnie jak w przypadku stężenia MBL (ryc. 18), aktywność jej kompleksów z MASP-2 była znacząco wyższa u pacjentów płci męskiej niż płci żeńskiej (ryc. 24).

W grupie kontrolnej uzyskano wynik przeciwny, wśród kobiet mediana była wyższa niż w grupie mężczyzn (odpowiednio: 360 mU/ml i 275 mU/ml, $p=0,04$).



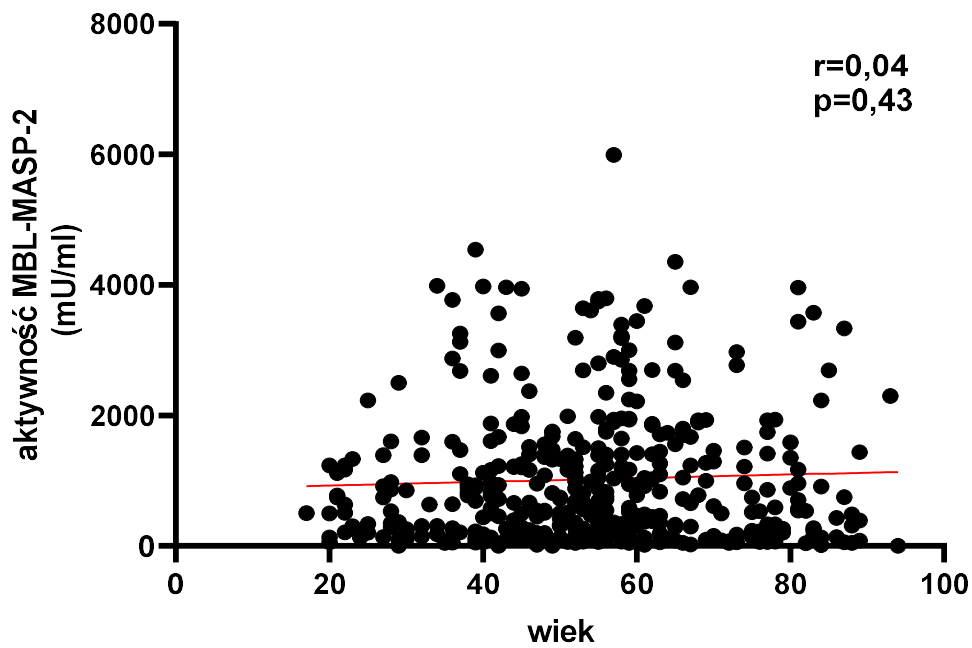
Ryc. 24. Aktywności kompleksów MBL-MASP-2 w próbach surowicy mężczyzn (M) i kobiet (K) zakwalifikowanych do grupy badanej (TB) i kontrolnej (C). Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany aktywności (czerwone linie)

Nie zanotowano znaczącej statystycznie korelacji aktywności kompleksów MBL-MASP-2 z wiekiem, zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej (ryc. 25 A, B).

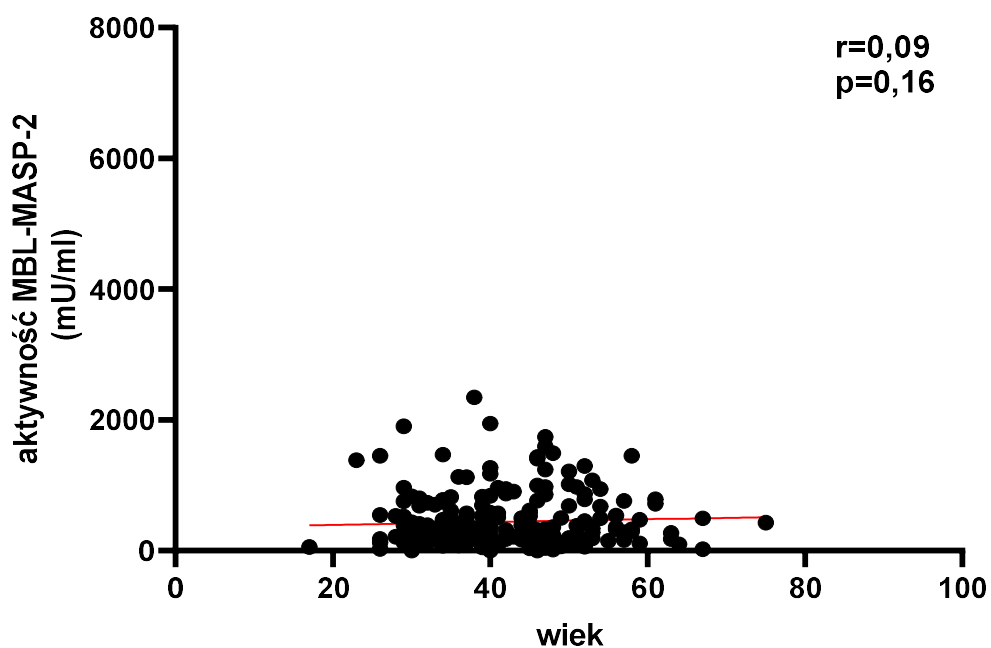
Tabela 16. Aktywności MBL-MASP-2 w surowicy osób zakwalifikowanych do grupy badanej (TB) oraz kontrolnej (C).

		Aktywność MBL-MASP-2 (mU/ml)		Istotność statystyczna
		Grupa TB	Grupa C	
ogółem	n	428	232	p<0,0001
	mediana	689	301	
	średnia	1023	443	
	zakres	0-5991	0-2349	
<40 r.ż.	n	77	112	p=0,0003
	mediana	635	267	
	średnia	891	397	
	zakres	0-4542	0-2349	
≥40 r.ż.	n	351	120	p<0,0001
	mediana	714	348	
	średnia	1052	486	
	zakres	0-5991	0-1946	
mężczyźni	n	275	137	p<0,0001
	mediana	778	275	
	średnia	1133	407	
	zakres	0-4542	0-2349	
mężczyźni <40 r.ż.	n	40	107	p=0,0005
	mediana	776	272	
	średnia	1073	398	
	zakres	0-4542	0-2349	
mężczyźni ≥40 r.ż.	n	235	30	p=0,0001
	mediana	780	280	
	średnia	1143	440	
	zakres	0-4356	16-1599	
kobiety	n	153	95	p=0,04
	mediana	508	360	
	średnia	825	495	
	zakres	0-5991	0-1946	
kobiety <40 r.ż.	n	37	5	p=0,3
	mediana	369	261	
	średnia	694	383	
	zakres	60-3989	60-1124	
kobiety ≥40 r.ż.	n	116	90	p=0,04
	mediana	541	372	
	średnia	867	501	
	zakres	0-5991	0-1946	

A

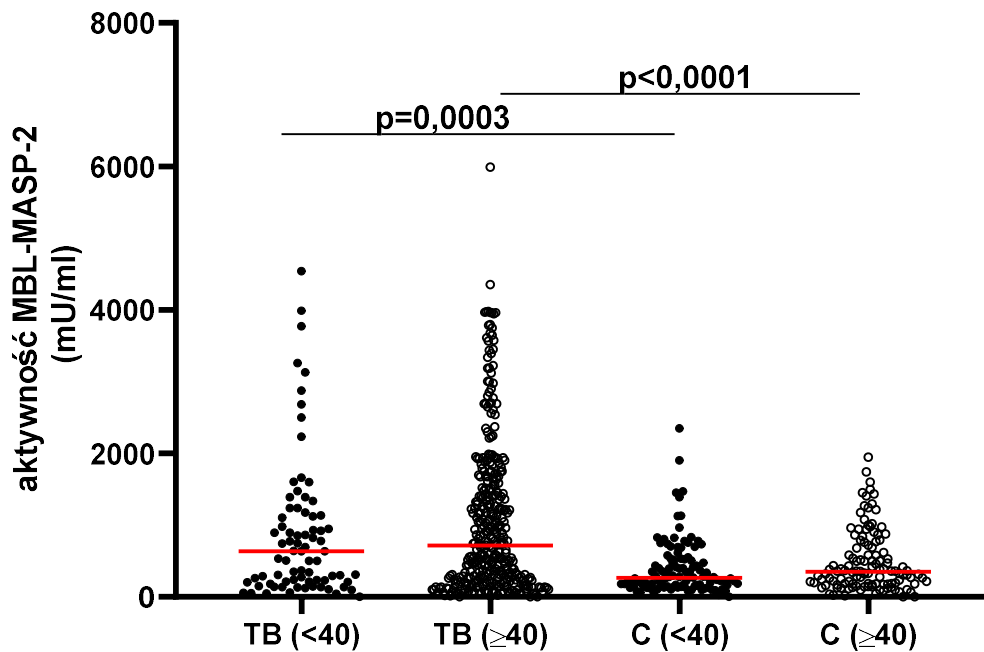


B



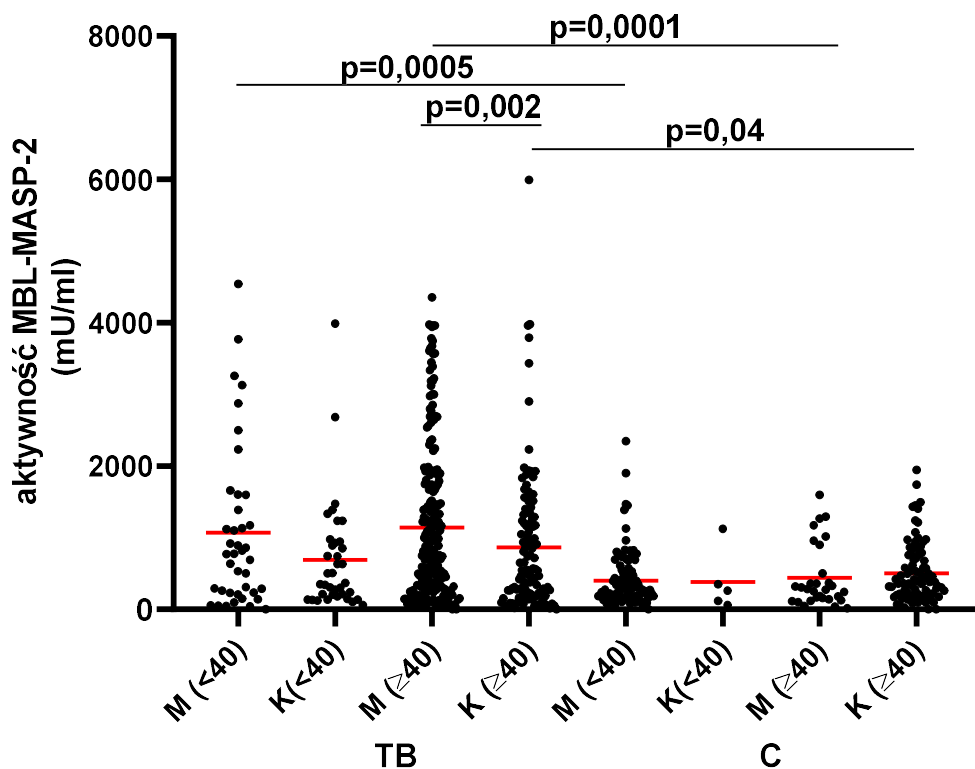
Ryc. 25. Korelacje aktywności kompleksów MBL-MASP-2 w surowicy z wiekiem w grupie pacjentów (TB – wykres A) oraz kontrolnej (C – wykres B). Wykresy przedstawiają wartości indywidualne i linie trendu; r - współczynnik korelacji Spearmana.

Po podziale na grupy wiekowe (<40 lat oraz ≥ 40 lat) nadal obserwowano znacząco wyższe aktywności kompleksów MBL-MASP-2 w grupie pacjentów w porównaniu z grupą odniesienia. U osób młodszych, mediany wynosiły: 635 mU/ml (pacjenci) oraz 267 mU/ml (grupa kontrolna, $p=0,0003$), podczas gdy u osób, które ukończyły 40 rok życia, odpowiednio: 714 mU/ml oraz 348 mU/ml ($p<0,0001$). Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic zależnych od wieku w poszczególnych grupach (ryc. 26).



Ryc. 26. Porównanie aktywności kompleksów MBL-MASP-2 w surowicy, w grupie pacjentów (TB) oraz kontrolnej (C), w zależności od wieku. Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany (czerwone linie).

U pacjentów płci męskiej, w obu przedziałach wiekowych zanotowano znacząco wyższe niż u zdrowych mężczyzn aktywności badanych kompleksów. Mediany w grupie do 40 lat wynosiły 776 mU/ml (grupa TB) oraz 272 mU/ml (grupa C, $p=0,0005$), natomiast w grupie osób starszych, odpowiednio 780 mU/ml oraz 280 mU/ml ($p=0,0001$) (ryc. 27, tabela 16).

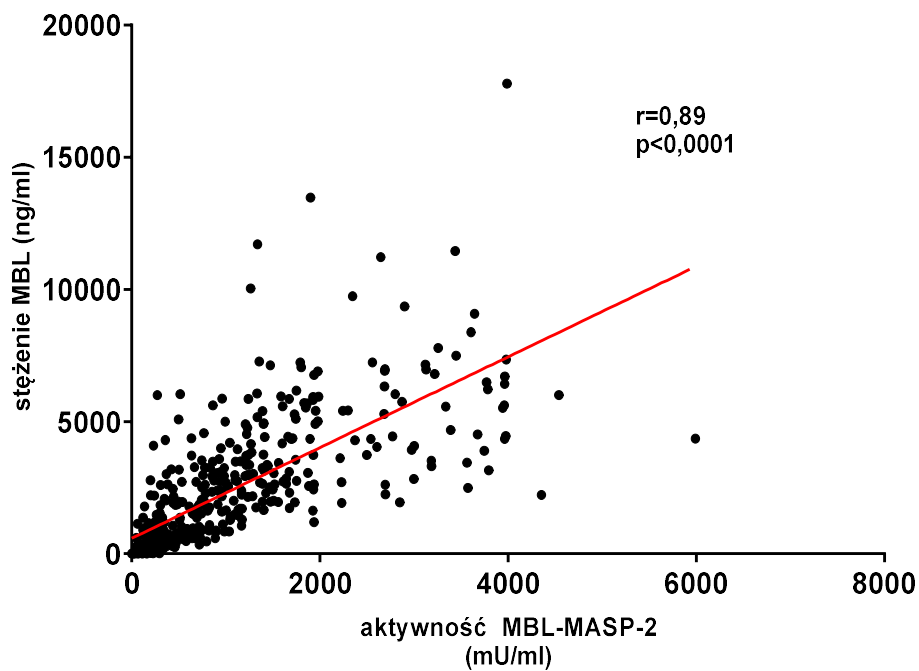


Ryc. 27. Porównanie aktywności kompleksów MBL-MASP-2 w surowicy, w grupie pacjentów chorych na gruźlicę (TB) i kontrolnej (C), z uwzględnieniem wieku i płci badanych osób; M - mężczyźni, K - kobiety. Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

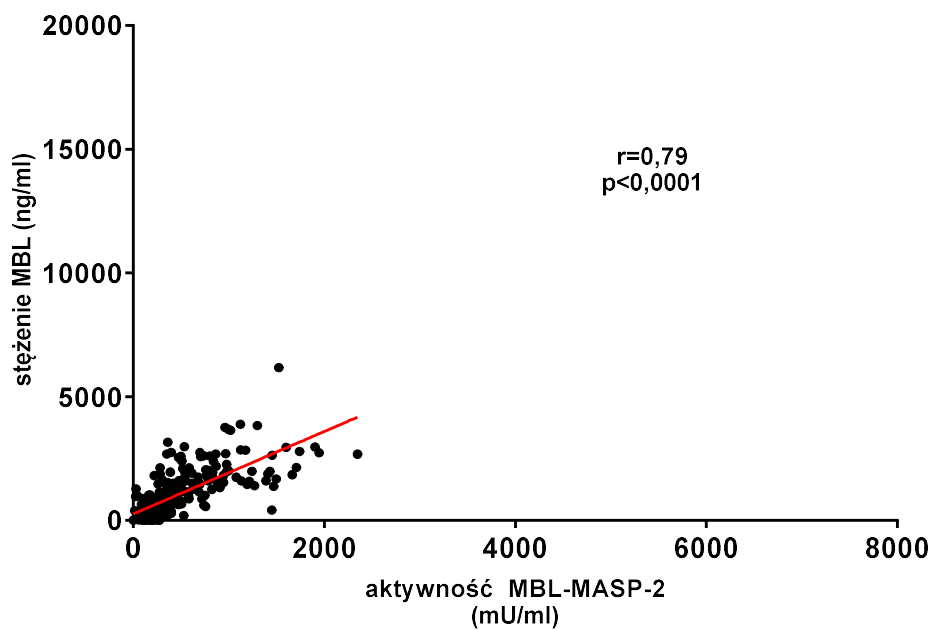
U kobiet, istotne różnice pomiędzy grupami zaobserwowano tylko w przedziale wiekowym ≥ 40 roku życia. Mediana aktywności kompleksów MBL-MASP-2 w grupie chorych wynosiła 541 mU/ml, natomiast w grupie odniesienia – 372 mU/ml ($p=0,04$) (ryc. 27, tabela 16). U młodszych kobiet, mediany wynosiły odpowiednio: 369 mU/ml oraz 261 mU/ml ($p=0,3$). Różnica nie przekroczyła progu istotności statystycznej, co prawdopodobnie związane jest ze stosunkowo niską liczebnością podgrup (pacjentki: $n=37$; kobiety zdrowe: $n=5$). W grupie pacjentów ≥ 40 roku życia, aktywności kompleksów MBL-MASP-2 u mężczyzn okazały się istotnie wyższe niż u kobiet ($p=0,02$).

Zgodnie z oczekiwaniem, zaobserwowano istotną statystycznie korelację pomiędzy stężeniem MBL a aktywnością jej kompleksów z MASP-2, zarówno w grupie pacjentów, jak i w grupie odniesienia (ryc. 28 A i B), niezależnie od płci czy wieku badanych osób (dane niezamieszczone).

A



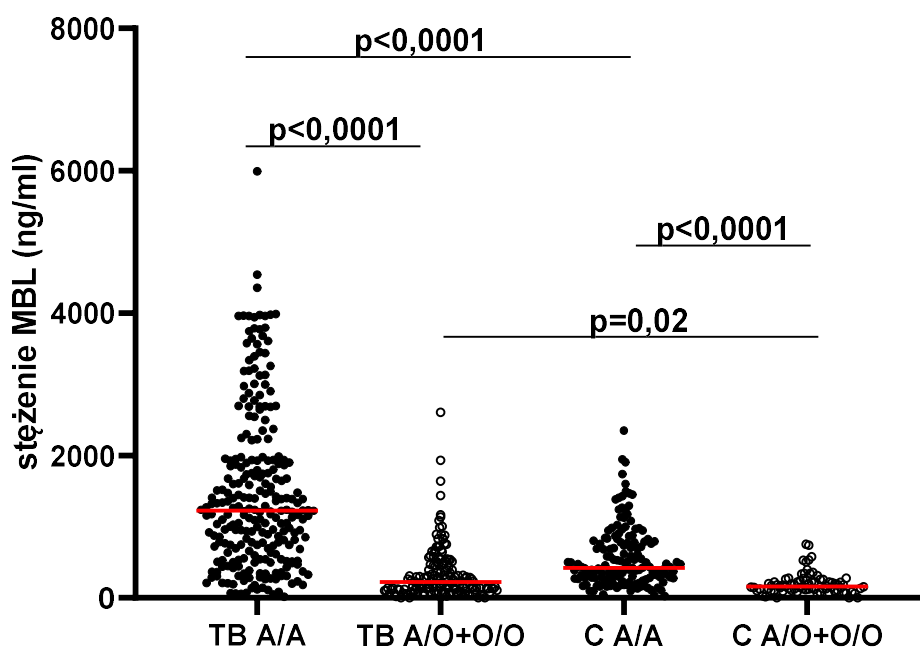
B



Ryc. 28. Zależność pomiędzy stężeniem MBL i aktywnością kompleksów MBL-MASP-2 w surowicy. A – w grupie osób chorych na gruźlicę płuc (TB); B – w grupie kontrolnej (C). Wykresy przedstawiają wartości indywidualne i linie trendu; r - współczynnik korelacji Spearmana.

5.3.2. Wpływ polimorfizmów genu *MBL2* na aktywność kompleksów MBL-MASP-2

Występowanie alleli typu O (odpowiadających polimorfizmom zlokalizowanym w eksonie 1 genu *MBL2*), wpływa znacząco nie tylko na stężenie MBL w surowicy, lecz również na aktywność kompleksów MBL-MASP-2. Zarówno w grupie pacjentów, jak i kontrolnej, istotnie wyższe ($p < 0,0001$) wartości aktywności kompleksów MBL-MASP-2 zaobserwowano u osób będących homozygotami A/A w porównaniu z heterozygotami A/O i homo- lub heterozygotami O/O.



Ryc. 29. Zależność pomiędzy genotypem *MBL2* i aktywnością kompleksów MBL-MASP-2 w grupie osób chorych na gruźlicę (TB) oraz kontrolnej (C). Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany (czerwone linie).

Znacząco wyższe niż u przedstawicieli grupy kontrolnej aktywności kompleksów MBL-MASP-2 obserwowano u osób chorych na gruźlicę, zarówno o genotypach A/A ($p < 0,0001$), jak i u nosicieli przynajmniej jednego allelu O ($p = 0,02$) (ryc. 29).

Tabela 17. Wpływ genotypu *MBL2* na aktywność kompleksów MBL-MASP-2 w surowicy.

Genotyp <i>MBL2</i>	Grupa TB	Grupa C	Istotność statystyczna
	mediana (mU/ml)	mediana (mU/ml)	
YA/YA	1256	501	p<0,0001
YA/XA	1257 ^a	372 ^d	p<0,0001
XA/XA	596 ^b	298 ^e	p=0,005
YA/O	349 ^c	194 ^f	p<0,0001
O/O	62 ^c	118 ^f	p=0,5
XA/O+O/O	115 ^c	125 ^f	p=0,6

^a - p=0,7; ^b - p=0,0005; ^c - p<0,0001 (vs YA/YA w grupie TB); ^d - p=0,08; ^e - p=0,002; ^f - p<0,0001 (vs YA/YA w grupie C)

W tabeli 17 przedstawiono szczegółowe dane, uwzględniające także polimorfizmy genu *MBL2* zlokalizowane w regionie promotorowym, w pozycjach -550 i -221. Podobnie jak w przypadku MBL, nie zanotowano znamienych różnic pomiędzy grupami osób zdrowych i chorujących na gruźlicę, u których występował pierwotny niedobór tej lektyny (genotypy XA/O i O/O).

5.3.3. Badanie występowania mutacji +359 A>G (rs72550870) genu *MASP2*

W celu zbadania występowania mutacji w pozycji +359 A>G genu *MASP2* wykorzystano metodę PCR-RFLP. Analizowano 417 prób DNA pochodzących od pacjentów, u których rozpoznano gruźlicę oraz 214 prób otrzymanych od przedstawicieli grupy kontrolnej. Nie zaobserwowano znaczących różnic częstości występowania badanej mutacji pomiędzy grupami. Należy jednak zwrócić uwagę, że u dwojga chorych i jednej osoby zdrowej wykazano mutację obu alleli, skutkującą niedoborem MASP-2 i białka MAp19. Szczegółowe dane dotyczące częstości występowania genotypów i alleli przedstawione zostały w tabeli 18.

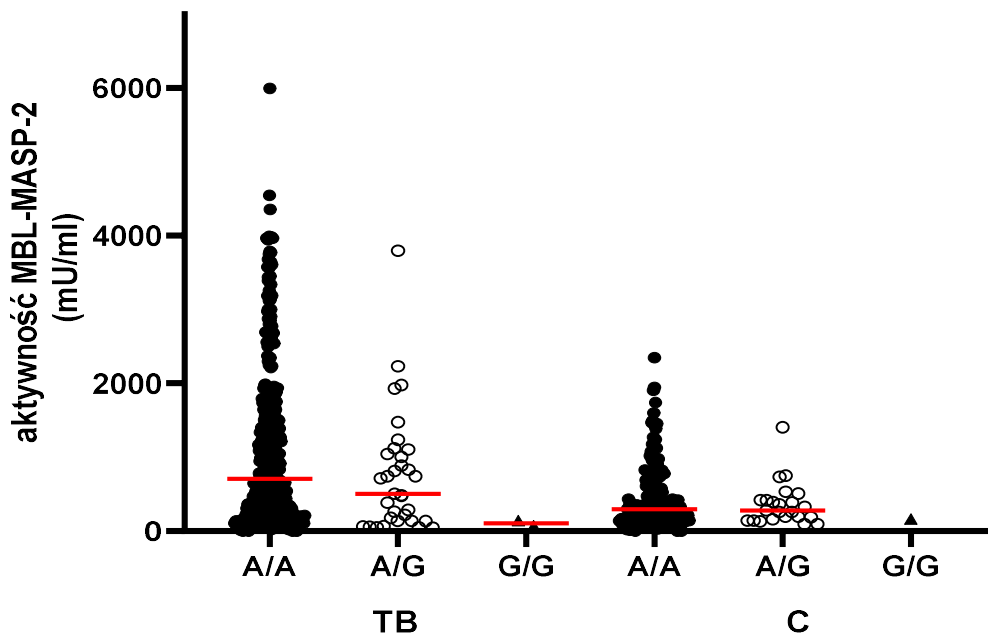
Tabela 18. Częstość występowania genotypów oraz alleli związanych z mutacją w pozycji +359 (A>G) genu *MASP2* w grupie pacjentów (TB) i kontrolnej (C).

Grupa	Genotyp			χ^2	p*	Allele (%)		OR (95% CI)	Istotność statystyczna
	A/A n (%)	A/G n (%)	G/G n(%)			A n (%)	G n (%)		
TB	382 (91,6)	33 (7,9)	2 (0,5)	1,9	0,4	797 (95,6)	37 (4,4)	0,7 (0,43 -1,2)	p=0,2
C	189 (88,3)	24 (11,2)	1 (0,5)			402 (93,9)	26 (6,1)		

* - wartości p, to wynik analizy tabeli 3x2; OR - iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

5.3.4. Wpływ występowania mutacji +359 A>G genu *MASP2* na aktywność kompleksów MBL-MASP-2

Widoczne, niewielkie różnice aktywności kompleksów MBL-MASP-2 pomiędzy homozygotami A/A i osobami, u których stwierdzono obecność jednego allelu G (zarówno w grupie TB jak i C) nie przekroczyły progu istotności statystycznej (odpowiednio: 706 mU/ml vs 503 mU/ml, p=0,1 i 295 mU/ml vs 279 mU/ml, p=0,8), natomiast u homozygot G/G aktywność kompleksów MBL-MASP-2 była niemal niewykrywalna (ryc. 30).

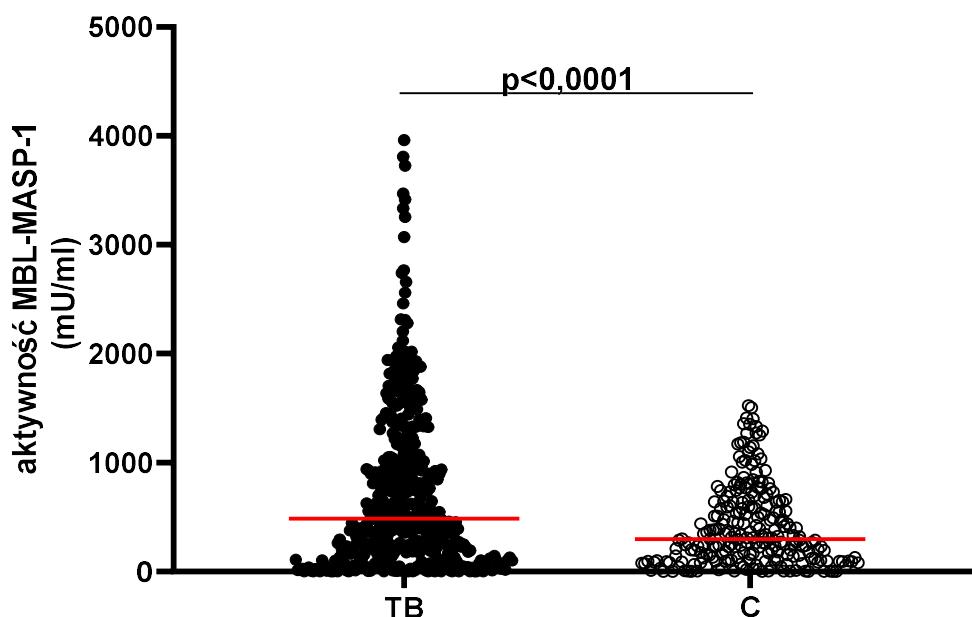


Ryc. 30. Wpływ mutacji +359 (A>G) genu *MASP2* na aktywność kompleksów MBL-MASP-2 w surowicy pacjentów (TB) i osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej (C). Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

5.4. Badanie aktywności kompleksów MBL z proteazą serynową MASP-1 w surowicy oraz ocena wpływu polimorfizmów genu *MBL2* na aktywność tych kompleksów

5.4.1. Badanie aktywności kompleksów MBL-MASP-1 w surowicy

Zdolność kompleksów MBL-MASP-1 do trawienia substratu fluorescencyjnego określono w 432 próbach surowicy pochodzących od osób chorych na gruźlicę oraz 238 próbach otrzymanych od osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej. Podobnie jak w przypadku stężeń MBL oraz aktywności kompleksów MBL-MASP-2, mediana wyznaczona dla pacjentów była znacząco wyższa w porównaniu z odpowiednią wartością uzyskaną dla osób zdrowych (odpowiednio: 486 mU/ml oraz 299 mU/ml, $p < 0,0001$; ryc. 31).



Ryc. 31. Porównanie aktywności kompleksów MBL-MASP-1 w surowicy pacjentów chorych na gruźlicę (TB) oraz osób zdrowych (C). Na wykresie przedstawione zostały wartości indywidualne oraz mediany aktywności (czerwone linie).

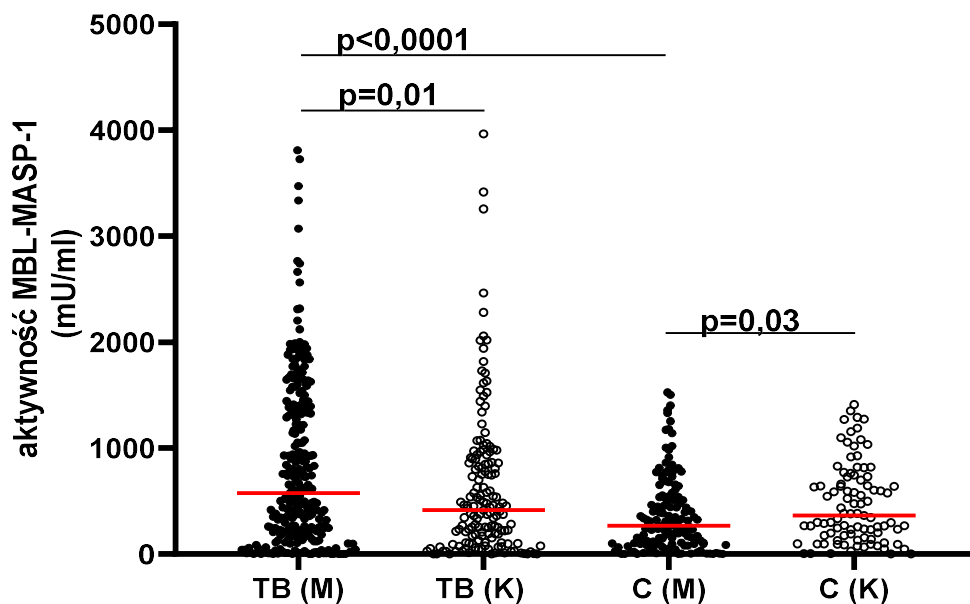
W przypadku niskich aktywności (< 29 mU/ml, wartość odpowiadająca 10. centylowi dla grupy C) nie obserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami, natomiast wysokie aktywności badanych kompleksów (> 986 mU/ml, wartość odpowiadająca 90. centylowi dla grupy C) notowano istotnie częściej wśród przedstawicieli grupy TB (tabela 19).

Tabela 19. Porównanie częstości występowania niskich i wysokich aktywności MBL-MASP-1 w grupie badanej (TB) oraz kontrolnej (C).

Aktywność kompleksów MBL-MASP-1	Grupa		Istotność statystyczna	OR (95% CI)
	TB n (%)	C n (%)		
< 29 mU/ml	51 (11,8)	22 (9,2)	$p=0,3$	1,3 (0,77-2,2)
> 986 mU/ml	118 (27,3)	24 (10,1)	$p < 0,0001$	3,4 (2,1-5,31)

OR - iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

Wspomniana wyżej, istotna różnica aktywności kompleksów MBL-MASP-1 pomiędzy grupami związana była z wyższymi wartościami notowanymi wśród mężczyzn chorych (mediana: 578 mU/ml), niż wśród niechorujących na gruźlicę (mediana: 268 mU/ml, $p < 0,0001$). Wyniki uzyskane dla kobiet kwalifikowanych do grupy TB (mediana: 413 mU/ml) i C (362 mU/ml) nie różniły się znacząco ($p = 0,7$). Wyniki przedstawiono w tabeli 20 oraz na ryc. 32. Podobnie jak w przypadku omówionych wyżej kompleksów lektyny wiążącej mannozę z drugą z proteaz – MASP-2, w grupie pacjentów mediana aktywności MBL-MASP-1 okazała się znamienne wyższa u mężczyzn niż u kobiet ($p = 0,01$). W grupie kontrolnej natomiast obserwowano przeciwną zależność, ($p = 0,03$, ryc. 32).



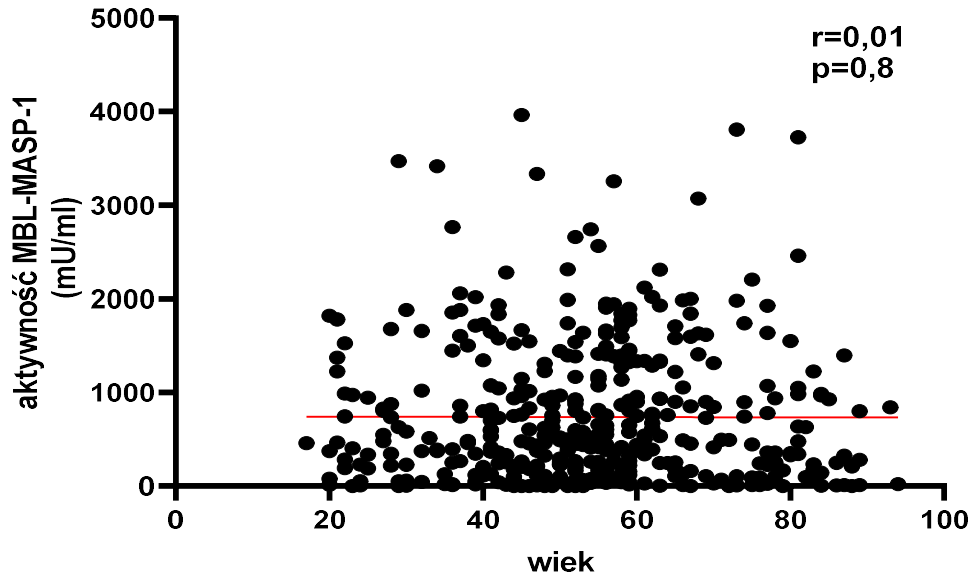
Ryc. 32. Aktywności kompleksów MBL-MASP-1 w próbach surowicy mężczyzn (M) i kobiet (K) zakwalifikowanych do grupy badanej (TB) i kontrolnej (C). Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany aktywności (czerwone linie).

Tabela 20. Aktywności MBL-MASP-1 w surowicy osób zakwalifikowanych do grupy badanej (TB) oraz kontrolnej (C).

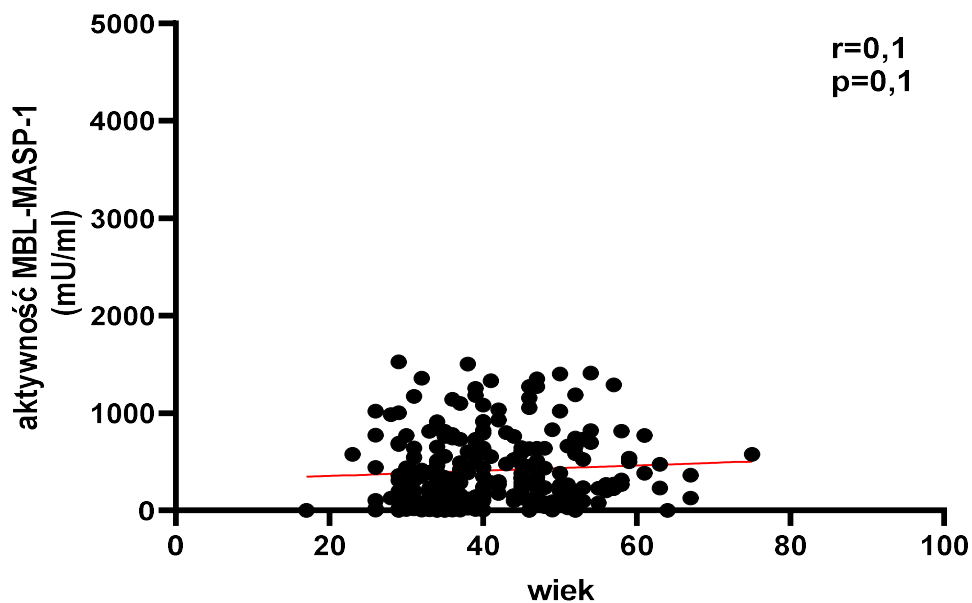
		Aktywność MBL-MASP-1 (mU/ml)		Istotność statystyczna
		Grupa TB	Grupa C	
ogółem	n	432	238	p<0,0001
	mediana	486	310	
	średnia	738	411	
	zakres	0-3962	0-1525	
<40 r.ż.	n	78	117	p=0,002
	mediana	462	268	
	średnia	750	378	
	zakres	0-3471	0-1525	
≥40 r.ż.	n	354	121	p=0,004
	mediana	496	312	
	średnia	735	442	
	zakres	0-3962	1-1411	
mężczyźni	n	277	145	p<0,0001
	mediana	578	268	
	średnia	807	376	
	zakres	0-3808	0-1525	
mężczyźni <40 r.ż.	n	39	113	p=0,003
	mediana	734	268	
	średnia	882	376	
	zakres	0-3471	0-1525	
mężczyźni ≥40 r.ż.	n	238	32	p=0,002
	mediana	565	256	
	średnia	795	364	
	zakres	0-3808	0-1402	
kobiety	n	155	93	p=0,7
	mediana	413	362	
	średnia	615	470	
	zakres	0-3962	2-1411	
kobiety <40 r.ż.	n	39	4	p=0,5
	mediana	402	366	
	średnia	618	458	
	zakres	4-3416	2-1099	
kobiety ≥40 r.ż.	n	116	89	p=0,8
	mediana	424	362	
	średnia	613	470	
	zakres	0-3962	2-1411	

W żadnej z grup nie zaobserwowano znaczącej statystycznie korelacji aktywności kompleksów MBL-MASP-1 z wiekiem (ryc. 33 A i B).

A

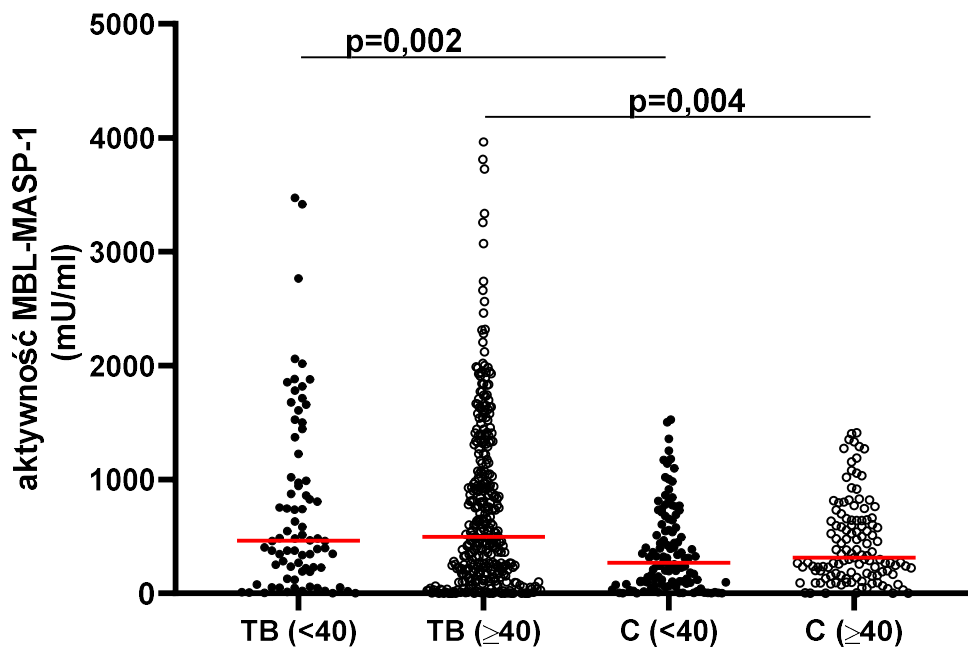


B



Ryc. 33. Korelacje aktywności kompleksów MBL-MASP-1 w surowicy z wiekiem w grupie pacjentów (TB – wykres A) oraz kontrolnej (C – wykres B). Wykresy przedstawiają wartości indywidualne i linie trendu; r - współczynnik korelacji Spearmana.

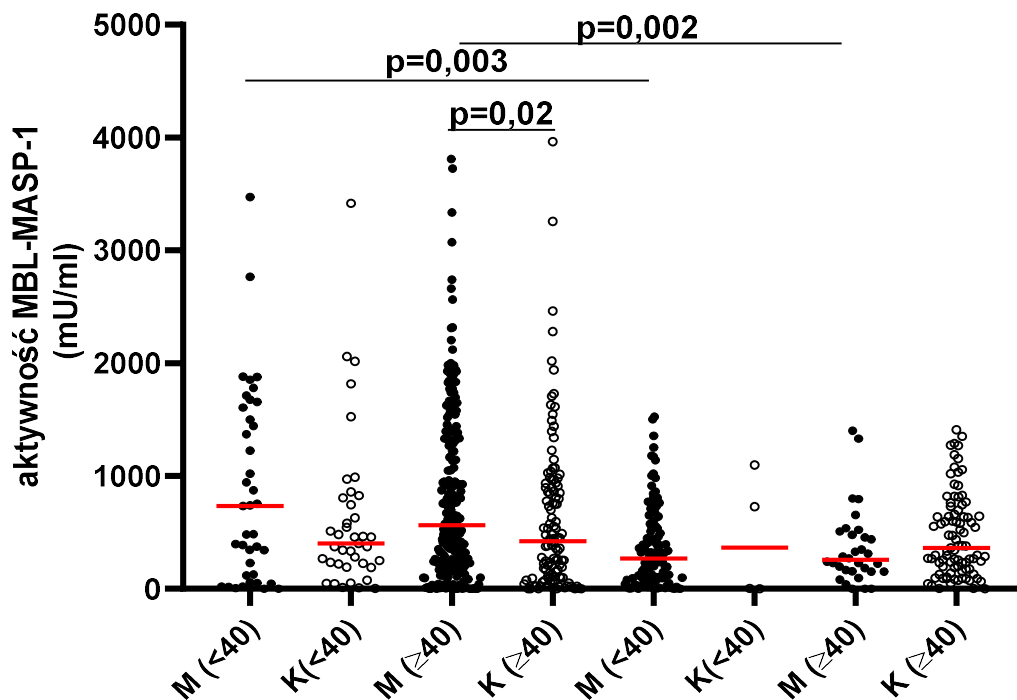
Zgodnie z oczekiwaniem, różnice aktywności zanotowane pomiędzy grupami są niezależne od wieku: w przypadku osób, które nie ukończyły 40 roku życia, mediana w grupie TB wynosiła 462 mU/ml, natomiast w grupie C - 268 mU/ml ($p=0,002$). Wśród osób starszych, wartości te były równe, odpowiednio: 496 mU/ml i 312 mU/ml ($p=0,004$). Wyniki przedstawiono na ryc. 34 i w tabeli 19.



Ryc. 34. Porównanie aktywności kompleksów MBL-MASP-1 w surowicy, w grupie pacjentów (TB) oraz kontrolnej (C), w zależności od wieku. Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany (czerwone linie).

Podobnie jak w przypadku stężenia MBL oraz aktywności kompleksów MBL z proteazą serynową MASP-2, u mężczyzn chorych na gruźlicę, bez względu na wiek obserwowano znacząco wyższe wartości aktywności kompleksów MBL-MASP-1 w porównaniu z mężczyznami zakwalifikowanymi do grupy kontrolnej. U mężczyzn w wieku poniżej 40 lat, mediana aktywności badanych kompleksów w grupie TB wynosiła 734 mU/ml, zaś w grupie C - 268 mU/ml ($p=0,003$). U przedstawicieli tej płci, którzy ukończyli 40 rok życia, przeciętne wartości, to odpowiednio: 565 mU/ml oraz 256 mU/ml ($p=0,002$). W przypadku kobiet, różnice pomiędzy grupami pacjentek i odniesienia nie były istotne statystycznie, w obu przedziałach wiekowych (ryc. 35). W grupie osób młodszych, mediana aktywności MBL-MASP-1 wśród chorych wynosiła 402 mU/ml, natomiast wśród zdrowych - 366 mU/ml. Przeciętne aktywności

kompleksów w grupie kobiet w wieku ≥ 40 lat wynosiły odpowiednio: 424 mU/ml oraz 362 mU/ml.

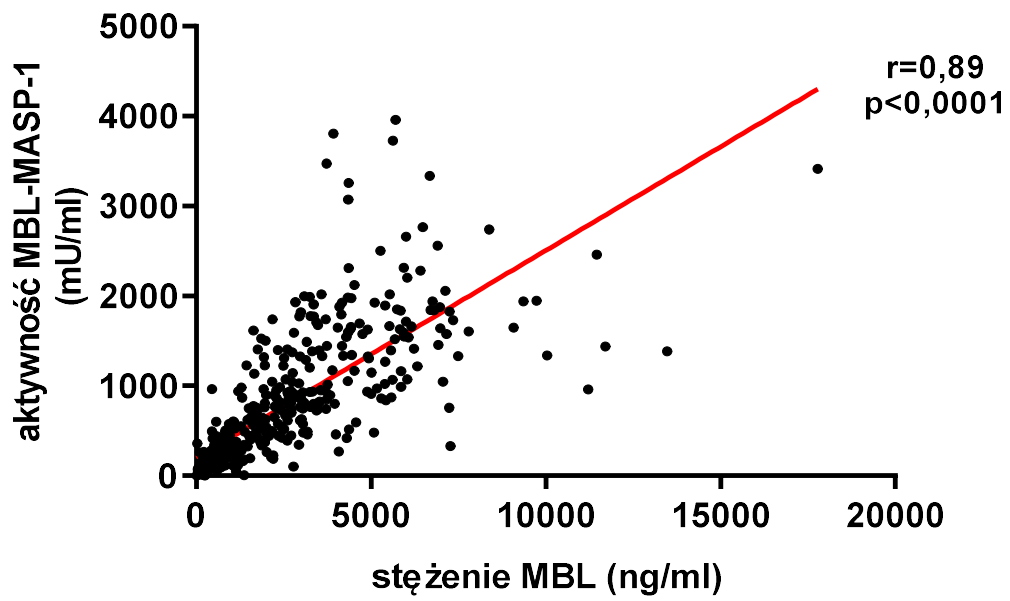


Ryc. 35. Porównanie aktywności kompleksów MBL-MASP-1 w surowicy, w grupie pacjentów chorych na gruźlicę (TB) i kontrolnej (C), z uwzględnieniem wieku i płci badanych osób; M - mężczyźni, K - kobiety. Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

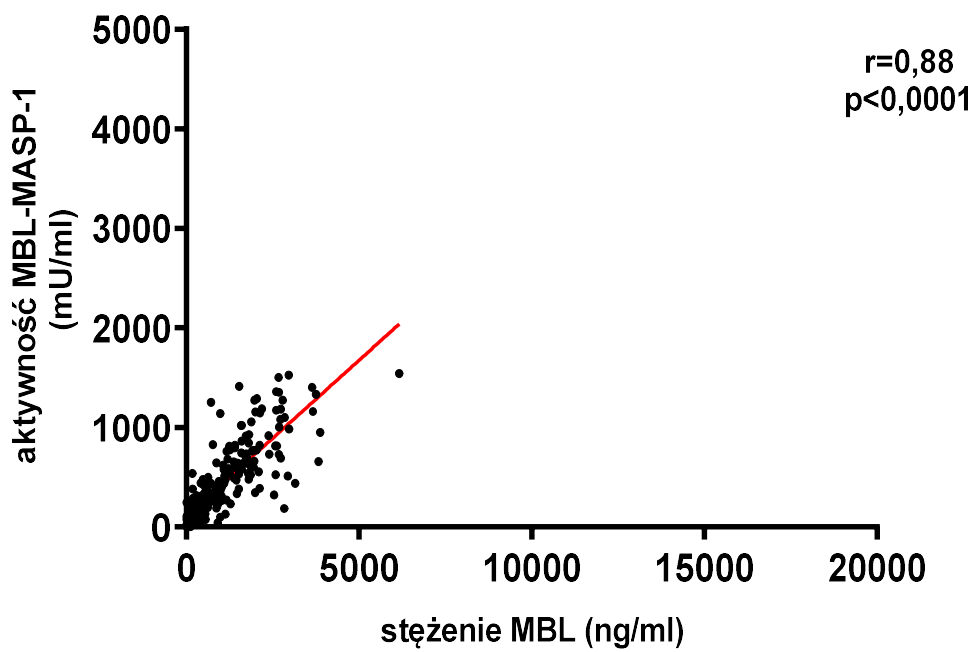
Ponadto, w grupie pacjentów, którzy ukończyli 40 rok życia, aktywność kompleksów MBL i proteazy serynowej MASP-1 u mężczyzn okazała się wyższa niż u kobiet ($p=0,02$). Szczegółowe dane zamieszczono na ryc. 35 i w tabeli 19.

Zgodnie z oczekiwaniem, zaobserwowano istotną korelację pomiędzy aktywnością kompleksów MBL-MASP-1 i stężeniem MBL oraz aktywnością MBL-MASP-2, zarówno w grupie pacjentów jak i w grupie kontrolnej. Wyniki zaprezentowano na ryc. 36 A-D.

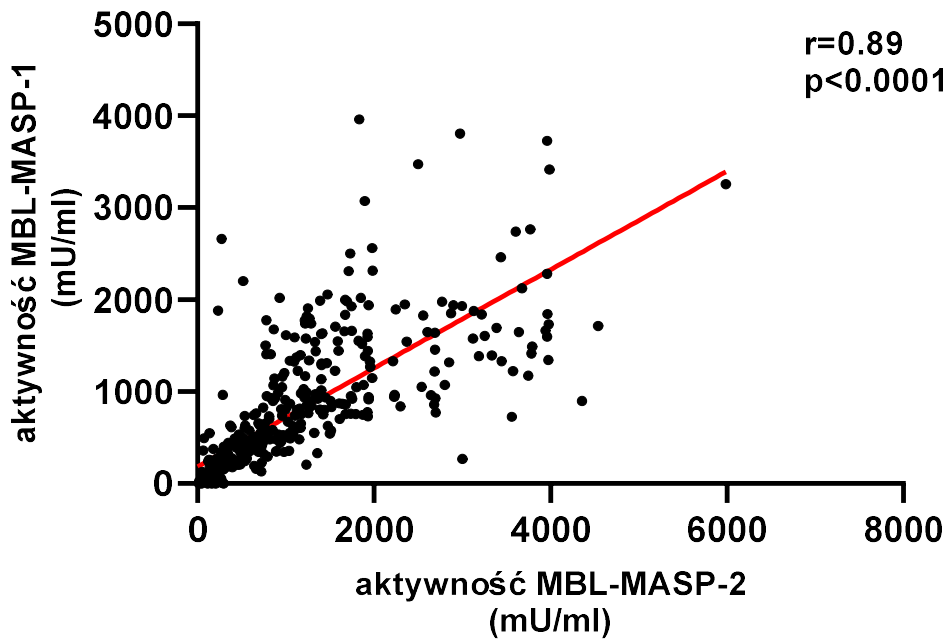
A



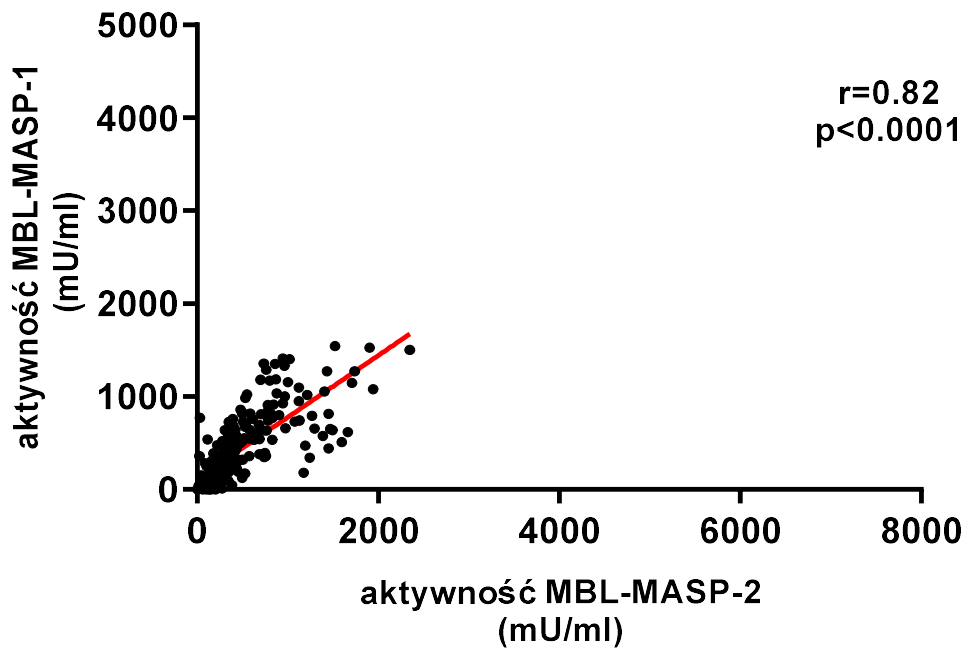
B



C



D

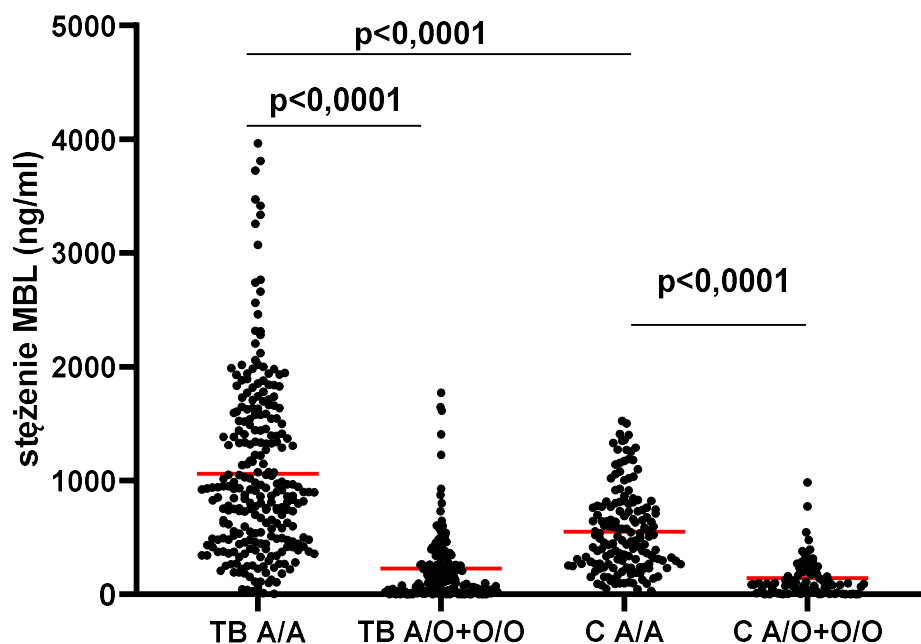


Ryc. 36. Korelacje pomiędzy aktywnością kompleksów MBL-MASP-1 i stężeniem MBL/aktywnością kompleksów MBL-MASP-2 w surowicy. Wykres A: Korelacja aktywności MBL-MASP-1 ze stężeniem MBL w grupie osób chorych na gruźlicę (TB);

Wykres B: Korelacja aktywności MBL-MASP-1 ze stężeniem MBL w grupie kontrolnej (C); Wykres C: Korelacja pomiędzy aktywnościami kompleksów MBL-MASP-1 i MBL-MASP-2 w grupie TB; Wykres D: Korelacja pomiędzy aktywnościami kompleksów MBL-MASP-1 i MBL-MASP-2 w grupie C. Wykresy przedstawiają wartości indywidualne i linie trendu; r – współczynnik korelacji Spearmana.

5.4.2. Wpływ polimorfizmów genu *MBL2* na aktywność kompleksów MBL-MASP-1 w surowicy

Tak jak w przypadku stężenia lektyny wiążącej mannozę i aktywności jej kompleksów z proteazą serynową MASP-2, nosicielstwo alleli typu O genu *MBL2* związane jest ze znacząco niższą niż u homozygot A/A aktywnością kompleksów MBL-MASP-1 (tabela 21). Istotne różnice pomiędzy grupami zanotowano porównując wyniki otrzymane dla homozygot A/A, nie obserwowano ich natomiast u osób, u których występował przynajmniej jeden allel D, B lub C genu *MBL2*. Wyjątek stanowiły heterozygoty YA/O. Wyniki przedstawiono na ryc. 37 i w tabeli 21.



Ryc. 37. Wpływ polimorfizmów zlokalizowanych w eksonie 1 genu *MBL2* na aktywność kompleksów MBL-MASP-1 w surowicy pacjentów (TB) i osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej (C). Wykres przedstawia wartości indywidualne i mediany aktywności (czerwone linie).

Tabela 21. Wpływ genotypu *MBL2* na aktywność kompleksów MBL-MASP-1 w surowicy.

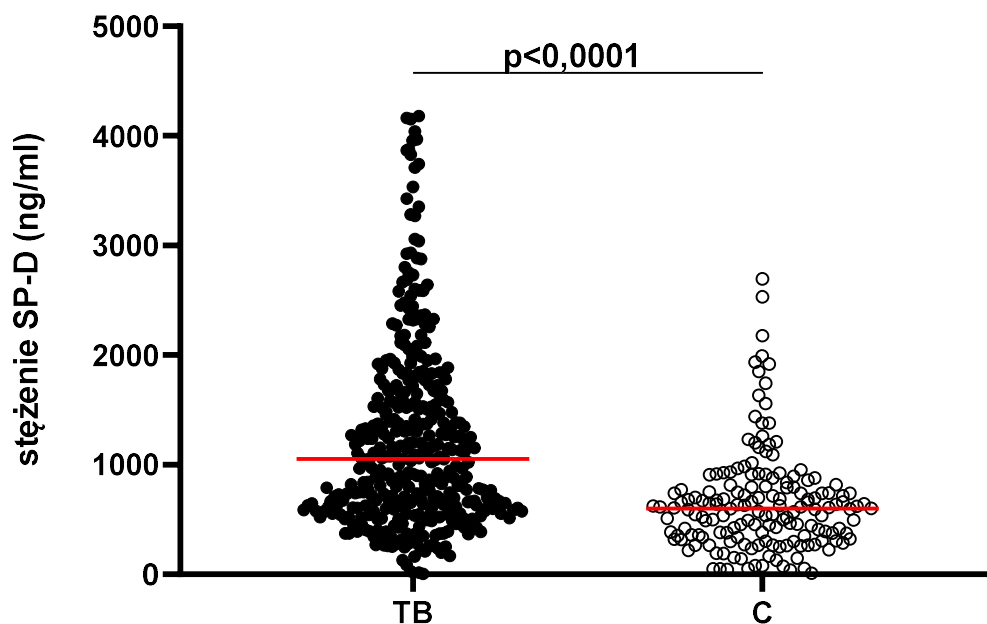
Genotyp <i>MBL2</i>	Grupa TB	Grupa C	Istotność statystyczna
	mediana (mU/ml)	mediana (mU/ml)	
YA/YA	966	618	p<0,0001
YA/XA	864 ^a	399 ^c	p<0,0001
XA/XA	500 ^b	268 ^d	p=0,02
YA/O	242 ^b	126 ^d	p=0,0006
O/O	0 ^b	2 ^d	p=0,4
XA/O+O/O	19 ^b	9 ^d	p=0,4

^a - p=0,03; ^b - p<0,0001 (vs YA/YA w grupie TB); ^c - p=0,002, ^d - p<0,0001 (vs YA/YA w grupie C)

5.5. Badanie stężenia kolektyny surfaktantu płucnego D (SP-D) w surowicy, polimorfizmów genu *SFTPD* oraz ich wpływu na poziom białka

5.5.1. Badanie stężenia białka surfaktantu płucnego D (SP-D) w surowicy

Stężenia kolektyny surfaktantu płucnego D (SP-D) w surowicy określano za pomocą dostępnego komercyjnie testu ELISA typu „sandwich” (SP-D, Human, ELISA kit, Hycult). Zbadano próby pobrane od 381 osób, u których zdiagnozowano gruźlicę oraz od 164 zdrowych ochotników. Mediana uzyskana dla grupy pacjentów (1051 ng/ml; zakres 3-4181 ng/ml) była znacząco wyższa niż w przypadku grupy kontrolnej (601 ng/ml; zakres 10-2695 ng/ml, p<0,0001). Wyniki przedstawiono na ryc. 38.



Ryc. 38. Porównanie stężeń kolektywnych SP-D w surowicy pacjentów chorych na gruźlicę (TB) oraz osób zdrowych (C). Na wykresie przedstawione zostały wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

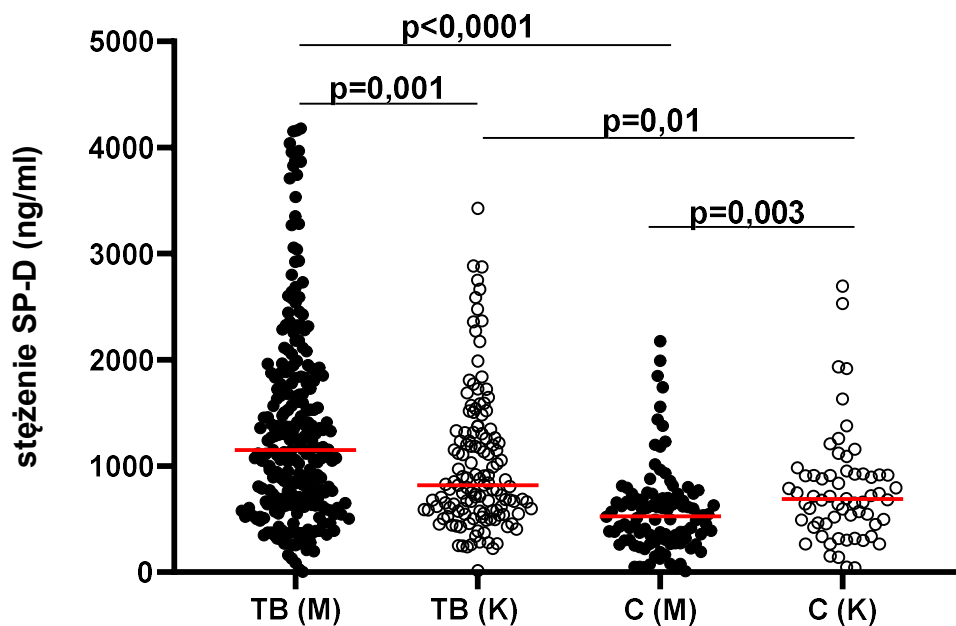
Stężenia SP-D poniżej 191 ng/ml (wartość odpowiadająca 10. centylowi, wyznaczona dla grupy kontrolnej) występowały istotnie częściej u osób niechorujących, niż u osób, u których rozpoznano gruźlicę płuc (tabela 22; $p=0,0001$). Przeciwnie, wysokie stężenia (powyżej wartości odpowiadającej 90. centylowi dla grupy odniesienia: 1207 ng/ml) obserwowano znacząco częściej w grupie TB.

Tabela 22. Porównanie częstości występowania niskich i wysokich stężeń SP-D w grupie badanej (TB) oraz kontrolnej (C).

Stężenie SP-D	Grupa		Istotność statystyczna	OR (95% CI)
	TB n (%)	C n (%)		
< 191 ng/ml	7 (1,8)	16 (9,8)	$p < 0,0001$	0,17 (0,07-0,41)
> 1207 ng/ml	157 (41,2)	16 (9,8)	$p < 0,0001$	6,48 (3,75-11,19)

OR - iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

Istotne różnice pomiędzy grupami obserwowano niezależnie od płci osób badanych: zarówno u mężczyzn jak i u kobiet chorych na gruźlicę, stężenia SP-D w surowicy były wyższe niż u odpowiednich przedstawicieli grupy kontrolnej (ryc. 39, tabela 23). Dodatkowo, w grupie pacjentów, istotnie wyższą medianę odnotowano u mężczyzn (1152 ng/ml; mediana uzyskana dla kobiet: 820 ng/ml, $p=0,001$), natomiast w grupie kontrolnej, zależność okazała się przeciwna (mediany, odpowiednio: 529 ng/ml i 689 ng/ml, $p=0,003$).



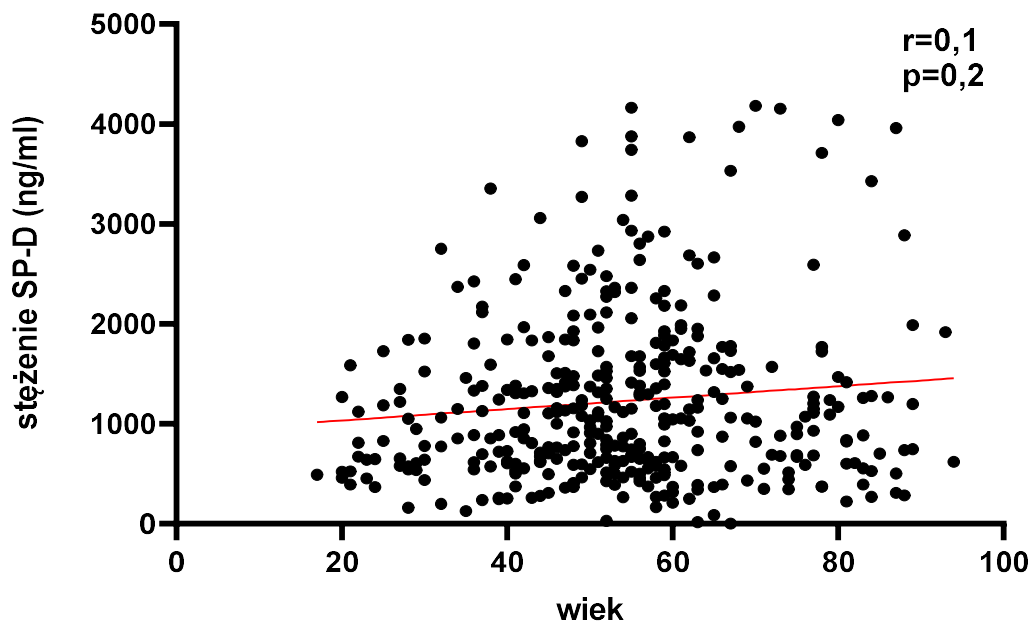
Ryc. 39. Stężenia kolektywy SP-D w próbach surowicy mężczyzn (M) i kobiet (K) zakwalifikowanych do grupy badanej (TB) i kontrolnej (C). Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

Analizując zależność stężenia SP-D od wieku, zaobserwowano istotną statystycznie korelację w grupie kontrolnej, lecz nie w grupie pacjentów (ryc. 40).

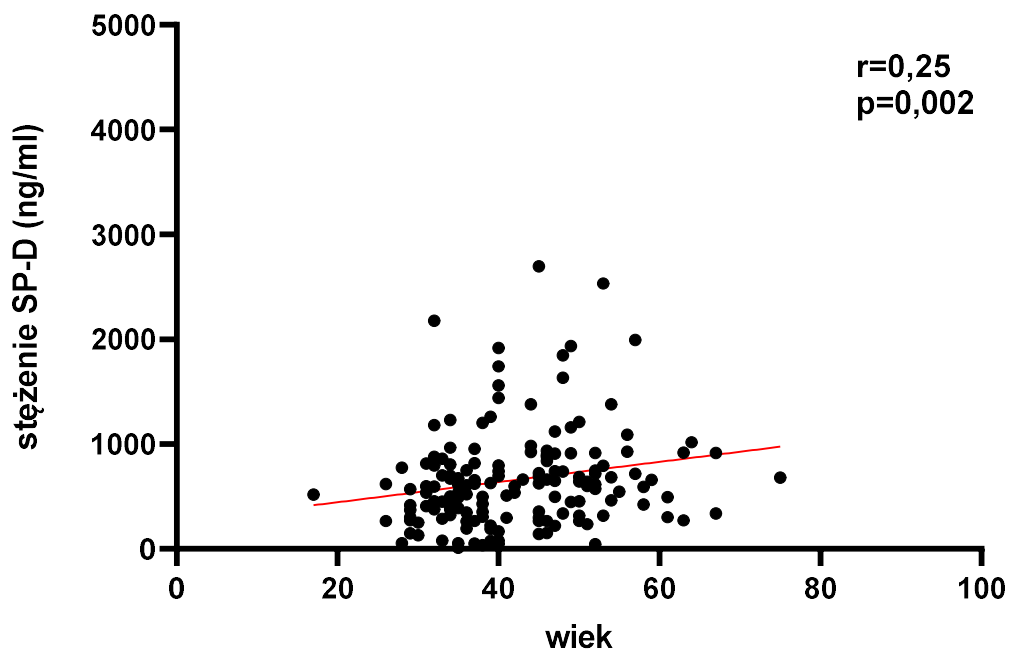
Tabela 23. Stężenia SP-D w surowicy osób zakwalifikowanych do grupy badanej (TB) oraz kontrolnej (C).

		Stężenie SP-D (ng/ml)		Istotność statystyczna
		Grupa TB	Grupa C	
ogółem	n	381	164	p<0,0001
	mediana	1051	601	
	średnia	1227	655	
	zakres	3-4181	10-2695	
<40 r.ż.	n	66	78	p<0,0001
	mediana	805	473	
	średnia	1004	520	
	zakres	128-3354	10-2177	
≥40 r.ż.	n	315	86	p<0,0001
	mediana	1092	685	
	średnia	1274	777	
	zakres	3-4181	43-2695	
mężczyźni	n	248	102	p<0,0001
	mediana	1152	529	
	średnia	1340	582	
	zakres	3-4181	10-2177	
mężczyźni <40 r.ż.	n	34	75	p<0,0001
	mediana	870	453	
	średnia	1012	504	
	zakres	128-3354	10-2177	
mężczyźni ≥40 r.ż.	n	214	27	p=0,001
	mediana	1245	686	
	średnia	1392	798	
	zakres	3-4181	78-1993	
kobiety	n	133	62	p=0,01
	mediana	820	689	
	średnia	1016	775	
	zakres	17-3427	43-2695	
kobiety <40 r.ż.	n	32	3	p=0,9
	mediana	790	953	
	średnia	996	911	
	zakres	239-2751	520-1260	
kobiety ≥40 r.ż.	n	101	59	p=0,01
	mediana	840	683	
	średnia	1022	768	
	zakres	17-3427	43-2695	

A

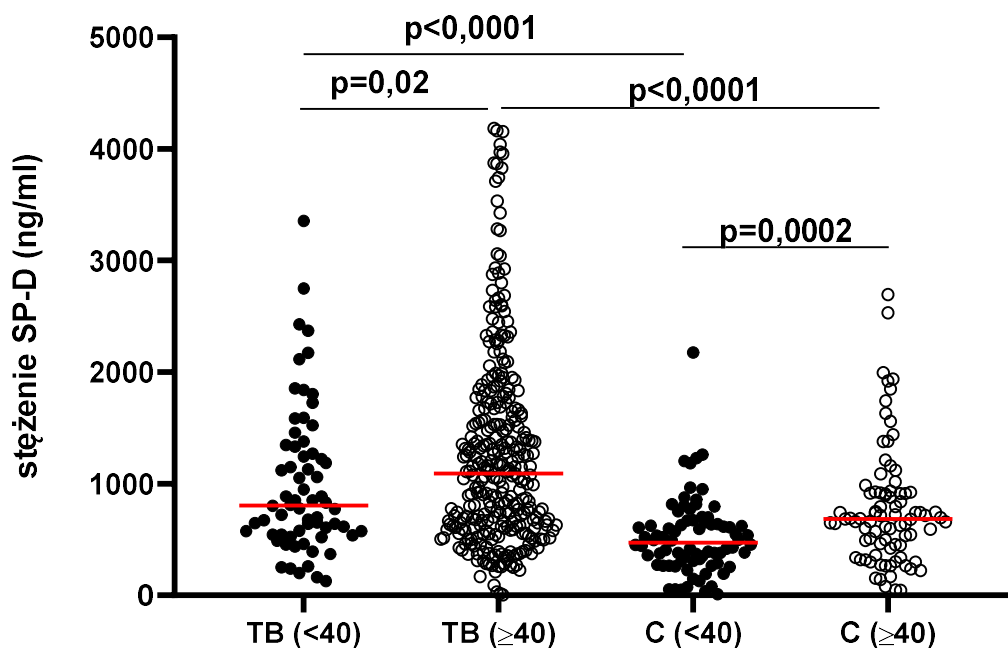


B



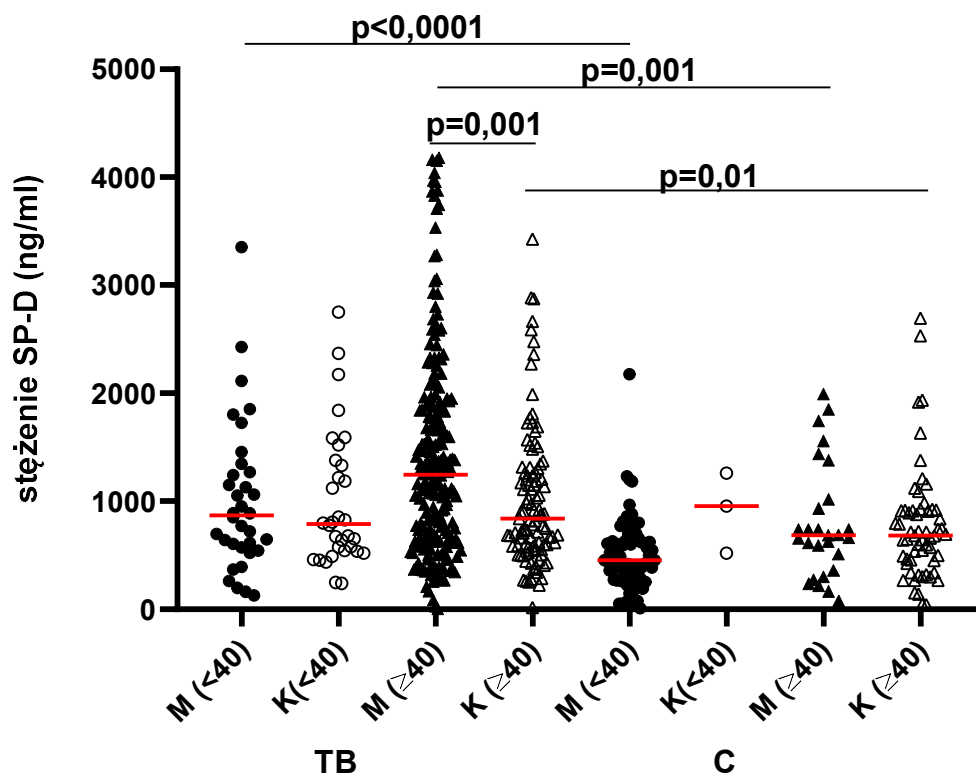
Ryc. 40. Korelacje stężenia SP-D w surowicy z wiekiem w grupie pacjentów (TB – wykres A) oraz kontrolnej (C – wykres B). Wykresy przedstawiają wartości indywidualne i linie trendu; r - współczynnik korelacji Spearmana.

Zaobserwowano, iż bez względu na wiek (przed lub po ukończeniu 40 lat), stężenia SP-D były wyższe u pacjentów niż u przedstawicieli grupy kontrolnej (ryc. 41). Ponadto, mediany dla osób starszych w obu grupach różniły się istotnie w porównaniu z wartościami wyznaczonymi dla osób młodszych (ryc. 41). Różnice te odzwierciedlały znacząco wyższe stężenia badanego białka u mężczyzn, którzy ukończyli 40 rok życia w porównaniu z młodszymi. U kobiet, istotne statystycznie różnice stężeń SP-D pomiędzy pacjentkami i osobami zdrowymi, zaobserwowano jedynie w grupie ≥ 40 lat (ryc. 42 oraz tabela 23).



Ryc. 41. Porównanie stężeń SP-D w surowicy, w grupie pacjentów (TB) oraz kontrolnej (C), w zależności od wieku. Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany (czerwone linie).

W grupie starszych pacjentów mediana stężenia SP-D u mężczyzn (1245 ng/ml) była znacząco wyższa niż u kobiet (840 ng/ml, $p=0,001$, ryc. 42), różnic takich nie obserwowano w przypadku chorych, którzy nie ukończyli 40 lat (mediany odpowiednio 870 ng/ml i 790 ng/ml; $p=0,9$). W grupie odniesienia, różnice pomiędzy medianami wyznaczonymi dla kobiet i mężczyzn w obu przedziałach wiekowych nie przekroczyły progu istotności statystycznej (ryc. 42, tabela 23).



Ryc. 42. Porównanie stężeń SP-D w surowicy, w grupie pacjentów chorych na gruźlicę (TB) i kontrolnej (C), z uwzględnieniem wieku i płci badanych osób; M - mężczyźni, K - kobiety. Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

5.5.2. Badanie wybranych polimorfizmów genu *SFTPD*

Występowanie wariantów polimorficznych genu *SFTPD*, zlokalizowanych w pozycjach +32 (T>C, Met11Thr, rs721917), +478 (G>A, Ala160Thr, rs17885900) oraz +868 (T>A, Ser270Thr, rs3088308), badano za pomocą metody PCR-RFLP. Nie zaobserwowano znaczących różnic częstości występowania poszczególnych genotypów pomiędzy badanymi grupami. Szczegółowe dane przedstawiono w tabeli 24.

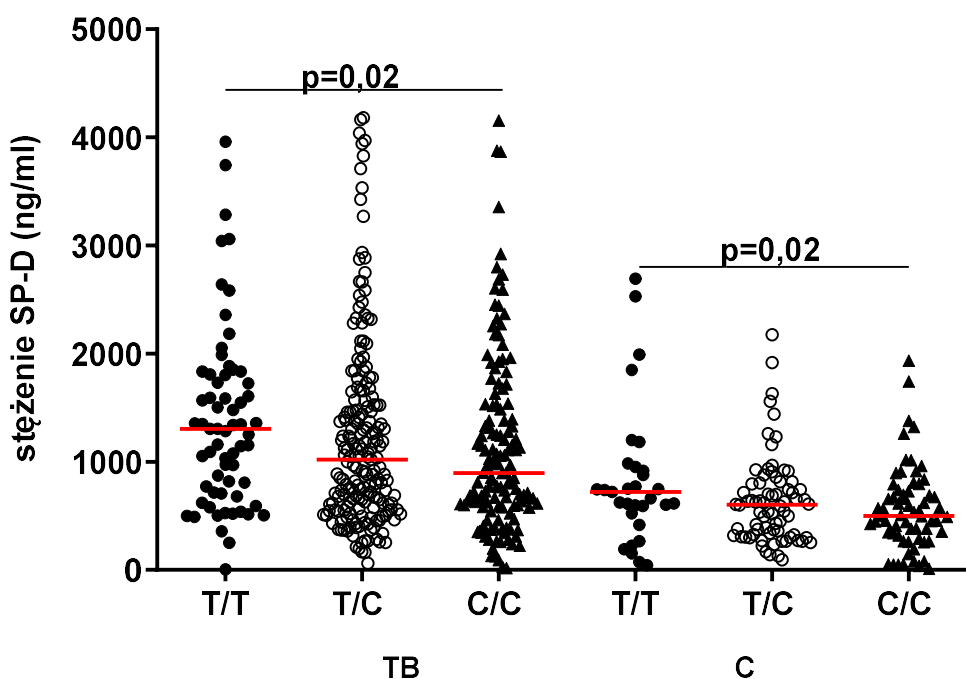
Tabela 24. Częstość występowania genotypów oraz alleli związanych z wybranymi polimorfizmami genu *SFTPD* w grupie pacjentów (TB) i kontrolnej (C).

SNP	Grupy	n	Genotypy (%)			χ^2	p*	Allele (%)		OR (95% CI)	Istotność statystyczna
			T/T	T/C	C/C			T	C		
+32 T>C			T/T	T/C	C/C	1,4	0,5	T	C	1,1 (0,83-1,44)	p=0,5
	TB	418	145 (34,7)	201 (48,1)	72 (17,2)			491 (58,7)	345 (41,3)		
	C	139	55 (39,6)	59 (42,4)	25 (18)			169 (60,8)	109 (39,2)		
+478 G>A			G/G	G/A	A/A	0,16	0,9	G	A	0,99 (0,75-1,3)	p=0,9
	TB	417	154 (36,9)	193 (46,3)	70 (16,8)			501 (60,1)	333 (39,9)		
	C	139	52 (37,4)	62 (44,6)	25 (18)			166 (59,7)	112 (40,3)		
+868 T>A			T/T	T/A	A/A	0,2	0,6	T	A	0,87 (0,49-1,58)	p=0,6
	TB	418	373 (89,2)	45 (10,8)	0 (0)			791 (94,6)	45 (5,4)		
	C	139	122 (87,8)	17 (12,2)	0 (0)			261 (93,9)	17 (6,1)		

* - wartości p, to wynik analizy tabeli 3x2; OR-iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

5.5.3. Wpływ polimorfizmów genu *SFTPD* na stężenie SP-D w surowicy

Analiza uzyskanych wyników wykazała zależność stężenia SP-D w surowicy od wariantów polimorficznych genu *SFTPD* (SNP zlokalizowane w kodonach 11 i 160 lecz nie 270). Przeciętne wartości (mediany) były znacząco wyższe u osób chorych na gruźlicę, w porównaniu z przedstawicielami grupy kontrolnej o tym samym genotypie. W przypadku polimorfizmu w pozycji +32 T>C (kodon 11), zarówno w grupie TB, jak i C zanotowano wyższe stężenia badanej kolektyny u nosicieli genotypu T/T (mediany, TB: 1304 ng/ml i C: 721 ng/ml) niż u homozygot C/C (TB: 895 ng/ml i C: 498 ng/ml). W obu grupach różnica była istotna statystycznie ($p=0,02$). Mediany uzyskane dla heterozygot (TB - 1021 ng/ml; C - 603 ng/ml) nie różniły się znacząco od wspomnianych wyżej. Wyniki przedstawiono na ryc. 43 oraz w tabeli 25.

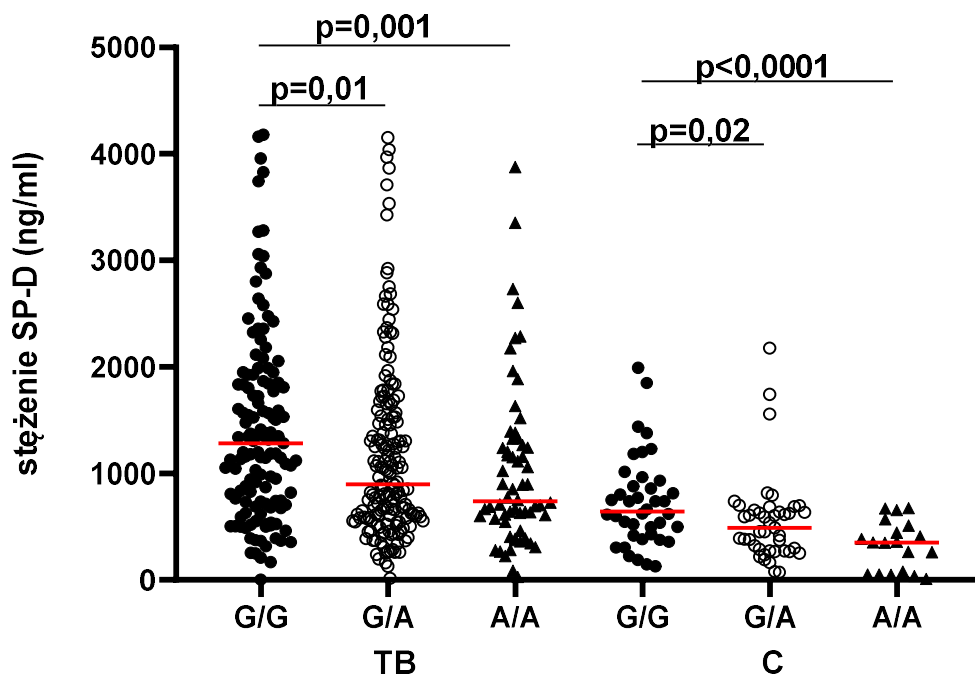


Ryc. 43. Wpływ polimorfizmu +32 T>C genu *SFTPD* na stężenie SP-D w surowicy pacjentów (TB) i osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej (C). Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

Tabela 25. Wpływ genotypu *SFTPD* (polimorfizm w pozycji +32 T>C) na stężenie kolektyny surfaktantu płucnego SP-D w surowicy.

Genotyp	Grupa TB	Grupa C	Istotność statystyczna
	mediana (ng/ml)	mediana (ng/ml)	
T/T	1304	721	p<0,0001
T/C	1021	603	p<0,0001
C/C	895	498	p=0,002

Jak wspomniano, polimorfizm w pozycji +478 (G>A, kodon 160) również istotnie wpływa na stężenie SP-D w surowicy. W tym przypadku, mediany dla homozygot G/G były znacząco wyższe zarówno w porównaniu z wartościami wyznaczonymi dla osób o genotypie A/A, jak i dla heterozygot. Nie zaobserwowano jednak istotnych różnic stężeń pomiędzy nosicielami genotypu G/A i homozygotami A/A. Wyniki przedstawiono na ryc. 44 oraz w tabeli 26.



Ryc. 44. Wpływ polimorfizmu +478 G>A genu *SFTPD* na stężenie SP-D w surowicy pacjentów (TB) i osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej (C). Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

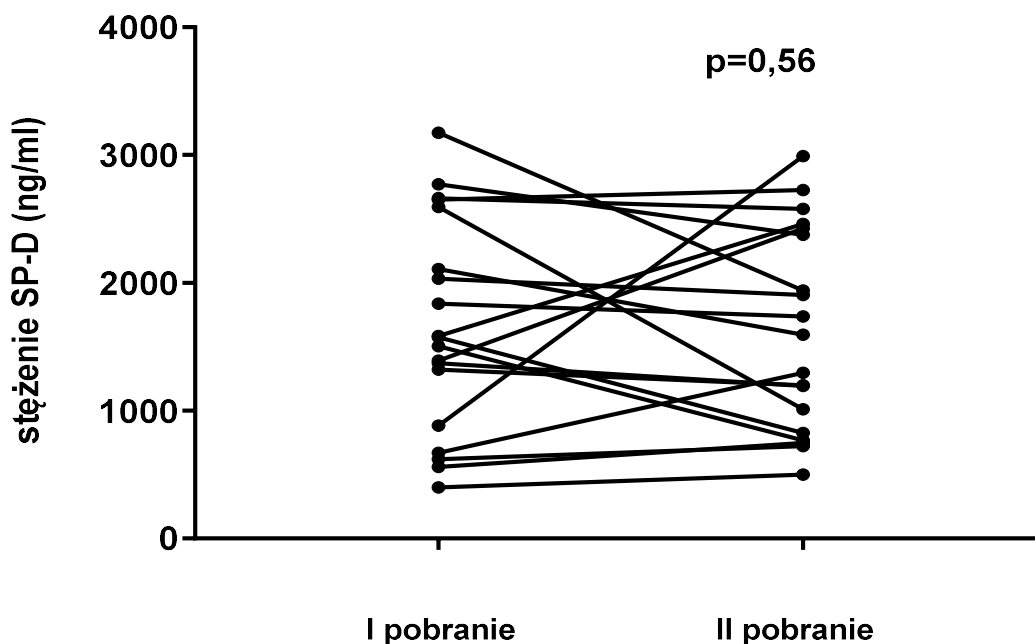
Tabela 26. Wpływ genotypu *SFTPD* (polimorfizm w pozycji +478 G>A) na stężenie kolektyny surfaktantu płucnego SP-D w surowicy.

Genotyp	Grupa TB	Grupa C	Istotność statystyczna
	mediana (ng/ml)	mediana (ng/ml)	
G/G	1283	642	p<0,0001
G/A	898	491	p<0,0001
A/A	739	354	p<0,0001

Jak wspomniano, SNP +868 T>A (Ser270Thr) nie wpływał znacząco na stężenie białka SP-D w surowicy (dane niezamieszczone).

5.5.4. Zmiany stężenia SP-D w przebiegu leczenia

U 24 pacjentów porównano wyniki oznaczeń w próbach surowicy pobranych bezpośrednio po rozpoznaniu choroby oraz w trakcie leczenia przeciwegruźliczego (po kilku tygodniach od rozpoczęcia antybiotykoterapii). W odróżnieniu od omówionej wyżej innej kolektyny – MBL, stężenia SP-D nie ulegały istotnym zmianom, mimo znacznych różnic obserwowanych dla niektórych pacjentów: mediana przy pierwszym pobraniu wynosiła 1575 ng/ml, natomiast przy drugim - 1596 ng/ml (p=0,56, test kolejności par Wilcoxon) (ryc. 45).



Ryc. 45. Porównanie stężeń SP-D w surowicy pacjentów chorych na gruźlicę płuc przed podjęciem leczenia (I pobranie) i w trakcie antybiotykoterapii (II pobranie).

5.6. Badanie wybranych polimorfizmów genów *SFTPA1* oraz *SFTPA2*

Drugą z kolektyn surfaktantu płucnego jest SP-A, która występuje w dwóch formach, SP-A1 oraz SP-A2, kodowanych przez odrębne geny. Badano częstość występowania wariantów polimorficznych związanych z SNP w pozycjach +56 (T>C), +148 (G>C) i +655 (C>T) genu *SFTPA1* (dla SP-A1) oraz +26 (C>A), +271 (G>C) i +667 (C>A) genu *SFTPA2* (SP-A2). Zastosowano metodę PCR-RFLP opisaną przez DiAngelo i wsp. [357]. Sekwencje starterów oraz odpowiednie enzymy restrykcyjne zostały przedstawione w rozdziale Materiały i metody.

5.6.1. Badanie wybranych polimorfizmów genu *SFTPA1*

Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic częstości występowania wariantów polimorficznych genu *SFTPA1* pomiędzy grupami TB i C. Szczegółowe dane, wraz z częstością występowania alleli odpowiadających poszczególnym polimorfizmom wraz z wynikami analizy statystycznej przedstawiono w tabeli 27.

Tabela 27. Częstość występowania genotypów oraz alleli związanych z wybranymi polimorfizmami genu *SFTPA1* w grupie pacjentów (TB) i kontrolnej (C).

SNP	Grupy	n	Genotypy (%)			χ^2	p*	Allele (%)		OR (95% CI)	Istotność statystyczna
			T/T	T/C	C/C			T	C		
+56 T>C			T/T	T/C	C/C	0,6	0,8	T	C	0,98 (0,6-1,61)	p=0,9
	TB	416	365 (87,8)	50 (12,0)	1 (0,2)			780 (93,8)	52 (6,2)		
	C	212	185 (87,3)	27 (12,7)	0 (0)			397 (93,6)	27 (6,4)		
+148 G>C			G/G	G/C	C/C	0,5	0,8	G	C	0,95 (0,75-1,21)	p=0,7
	TB	415	110 (26,5)	219 (52,8)	86 (20,7)			439 (52,9)	391 (47,1)		
	C	212	56 (25,7)	107 (52,6)	49 (21,7)			219 (51,7)	205 (48,3)		
+655 C>T			C/C	C/T	T/T	0,9	0,6	C	T	1,1 (0,68-1,78)	p=0,7
	TB	418	359 (85,9)	57 (13,6)	2 (0,5)			775 (92,7)	61 (7,3)		
	C	192	166 (86,5)	26 (13,5)	0 (0)			358 (93,2)	26 (6,8)		

* - wartości p, to wynik analizy tabeli 3x2; OR-iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

5.6.2. Badanie wybranych polimorfizmów genu *SFTPA2*

W przypadku polimorfizmów zlokalizowanych w pozycjach +26 i +667 wykazano znaczące statystycznie różnice pomiędzy badanymi grupami. Genotypy A/A występowały istotnie rzadziej wśród pacjentów, w porównaniu z grupą osób zdrowych [odpowiednio: $p=0,01$; $OR=0,5$, 95% CI (0,31-0,83) i $p=0,03$; $OR=0,51$, 95% CI (0,28-0,94)]. Częstości alleli C i A nie różniły się jednak znacząco. Nie zanotowano także znamiennych różnic analizując trzeci z badanych SNP, +271 G>C. Szczegółowe dane wraz z wynikami analizy statystycznej przedstawiono w tabeli 28.

Tabela 28. Częstość występowania genotypów oraz alleli związanych z wybranymi polimorfizmami genu *SFTPA2* w grupie pacjentów (TB) i kontrolnej (C).

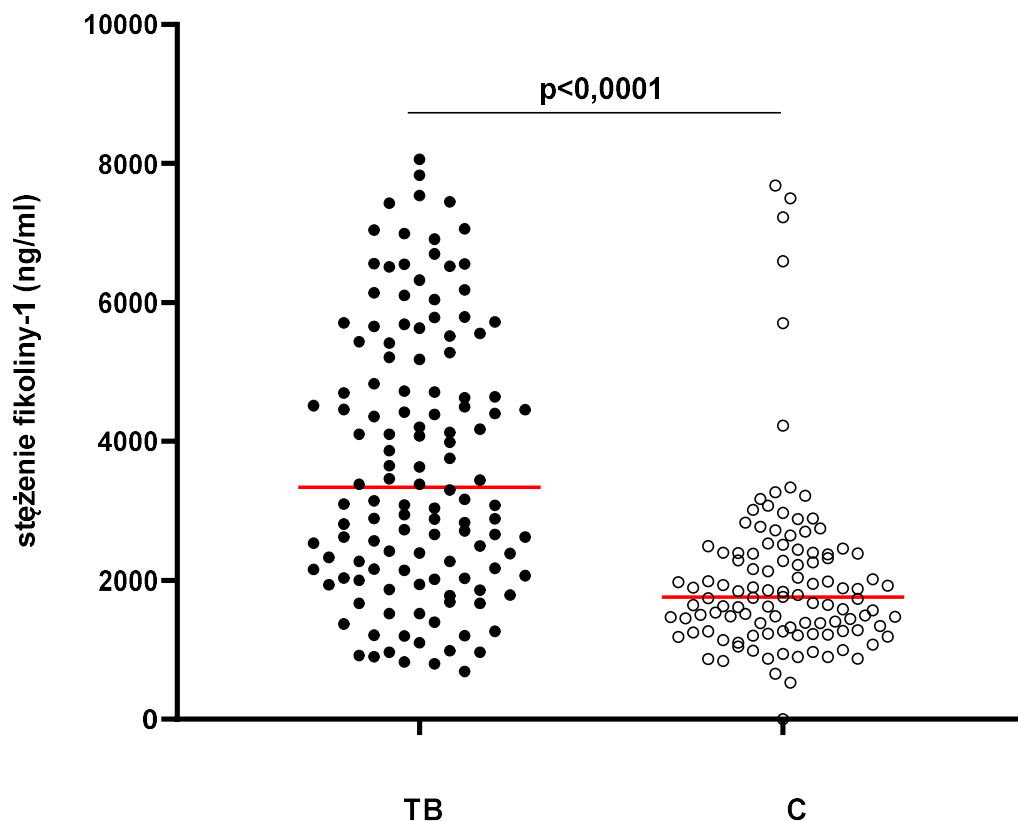
SNP	Grupa	n	Genotypy (%)			χ^2	p*	Allele (%)		OR (95% CI)	Istotność statystyczna
			C/C	C/A	A/A			C	A		
+26 C>A						10,1	0,01			0,93 (0,73-1,18)	p=0,5
	TB	416	99 (23,8)	278 (66,8)	39 (9,4)			476 (57,2)	356 (42,8)		
	C	193	53 (27,5)	107 (55,4)	33 (17,1)			213 (55,2)	173 (44,8)		
+271 G>C			G/G	G/C	C/C	0,9	0,6	G	C	1,14 (0,79-1,65)	p=0,5
	TB	418	316 (75,6)	101 (24,2)	1 (0,2)			733 (87,8)	103 (12,2)		
	C	210	164 (78,1)	46 (21,9)	0 (0)			374 (89,0)	46 (11,0)		
+667 C>A			C/C	C/A	A/A	8,9	0,01	C	A	1,02 (0,78-1,33)	p=0,9
	TB	407	211 (51,8)	173 (42,5)	23 (5,7)			595 (73,1)	219 (26,9)		
	C	211	121 (57,4)	68 (32,2)	22 (10,4)			310 (73,5)	112 (26,5)		

* - wartości p, to wynik analizy tabeli 3x2; OR - iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

5.7. Badanie stężenia fikoliny-1 w surowicy i polimorfizmów genu *FCN1*

5.7.1. Badanie stężenia fikoliny-1 w surowicy

Fikolina-1, jak wspomniano, jest syntezowana w szpiku kostnym, monocytach, neutrofilach oraz komórkach epitelialnych płuc. Białko to, mające zdolność aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej, obecne jest także w surowicy [63, 155]. Stężenie fikoliny-1 oznaczano metodą „sandwich” TRIFMA. Zbadano 126 prób pobranych od pacjentów oraz 112 od osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej. Mediana uzyskana w grupie chorych była znacząco wyższa (3141 ng/ml, zakres 691-8059 ng/ml), niż w grupie odniesienia (1757 ng/ml, zakres 0-7682 ng/ml, $p < 0,0001$). Wyniki przedstawiono na ryc. 46.



Ryc. 46. Porównanie stężeń fikoliny-1 w surowicy pacjentów chorych na gruźlicę (TB) oraz osób zdrowych (C). Na wykresie przedstawione zostały wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

Stężenia fikoliny-1 poniżej 975 ng/ml (wartość odpowiadająca 10. centylowi, wyznaczona dla grupy kontrolnej) występowały rzadziej u osób chorujących na gruźlicę, niż u osób niechorujących, jednak różnica nie przekroczyła progu istotności statystycznej (tabela 29; $p = 0,2$). Przeciwnie, wysokie stężenia (powyżej 3054 ng/ml,

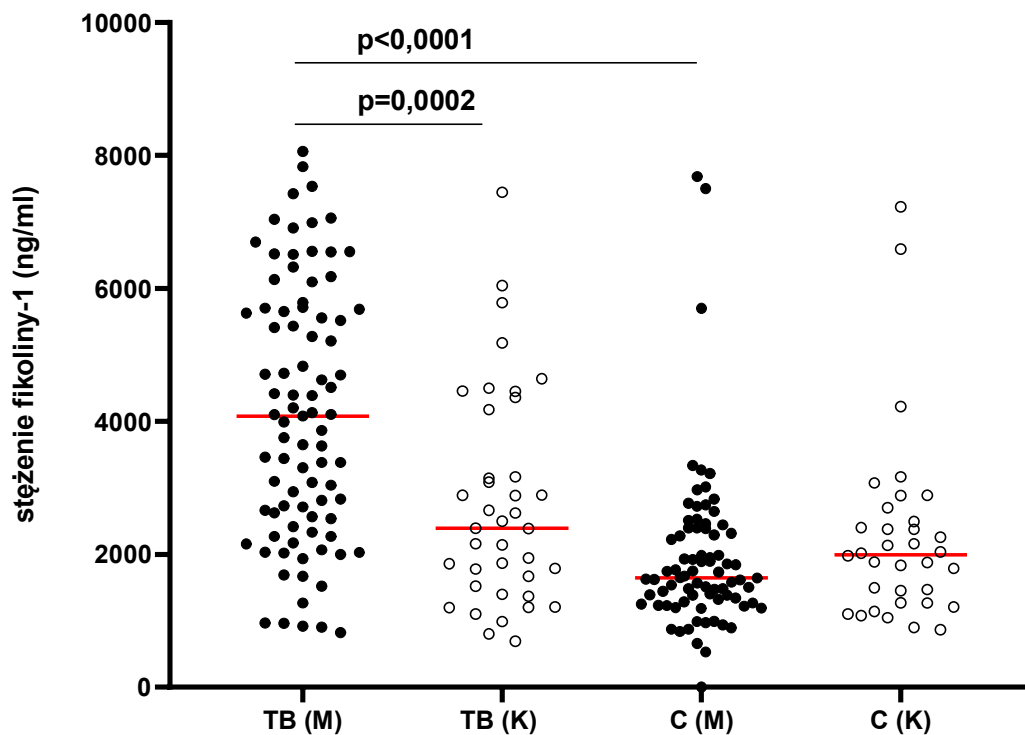
wartości odpowiadającej 90. centylowi dla grupy odniesienia) obserwowano znacząco częściej w grupie TB niż w grupie C ($p < 0,0001$).

Tabela 29. Porównanie częstości występowania niskich i wysokich stężeń fikoliny-1 w grupie badanej (TB) oraz kontrolnej (C).

Stężenie fikoliny-1	Grupa		Istotność statystyczna	OR (95% CI)
	TB n (%)	C n (%)		
<975 ng/ml	7 (5,6)	11 (9,8)	$p=0,2$	0,54 (0,21-1,44)
>3054 ng/ml	69 (54,8)	11 (9,8)	$p < 0,0001$	11,1 (5,57-22,87)

OR - iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

Istotne statystycznie różnice zaobserwowano również porównując stężenia fikoliny-1 pomiędzy osobami różnych płci. Wśród pacjentów, mediana była znacząco wyższa w grupie mężczyzn, w porównaniu z grupą kobiet (odpowiednio: 4078 ng/ml i 2392 ng/ml, $p=0,0002$). Wśród osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej zaobserwowano przeciwną zależność (mediany, odpowiednio: 1647 ng/ml i 1996 ng/ml), jednak różnica nie okazała się istotną statystycznie ($p=0,2$). Porównując dane uzyskane dla osób tej samej płci, obserwowano wyraźne różnice pomiędzy grupami TB i C, tylko wśród mężczyzn. Wyniki analiz przedstawiono na ryc. 47 oraz w tabeli 30.



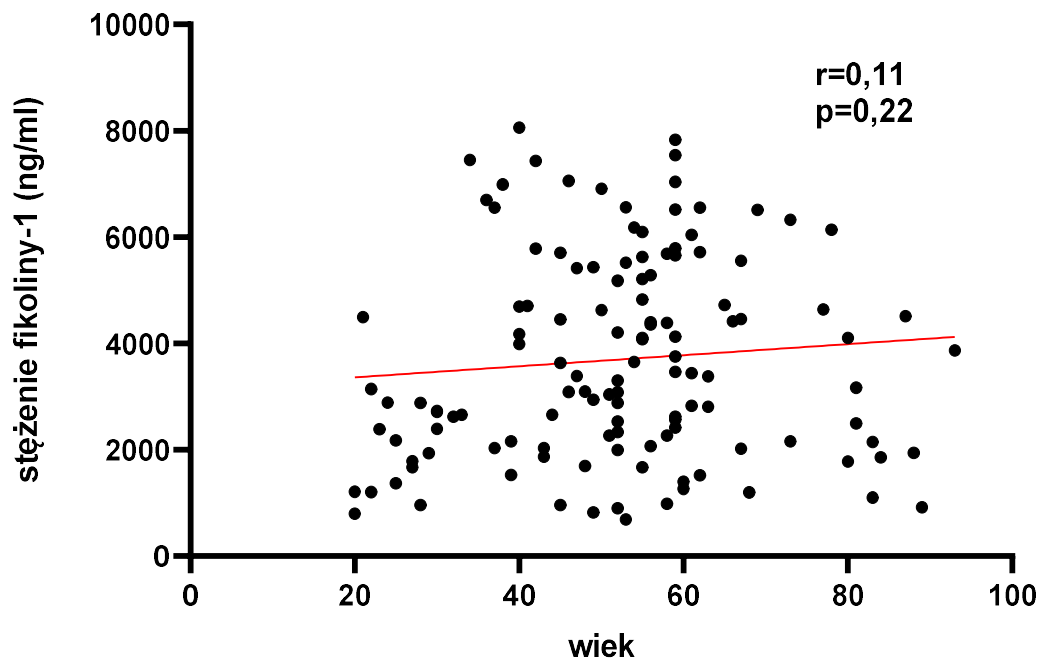
Ryc. 47. Stężenia fikoliny-1 w próbach surowicy mężczyzn (M) i kobiet (K) zakwalifikowanych do grupy badanej (TB) i kontrolnej (C). Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

W żadnej z grup (także po ich podziale ze względu na płeć) nie zaobserwowano znaczącej korelacji stężenia fikoliny-1 w surowicy z wiekiem (ryc. 48).

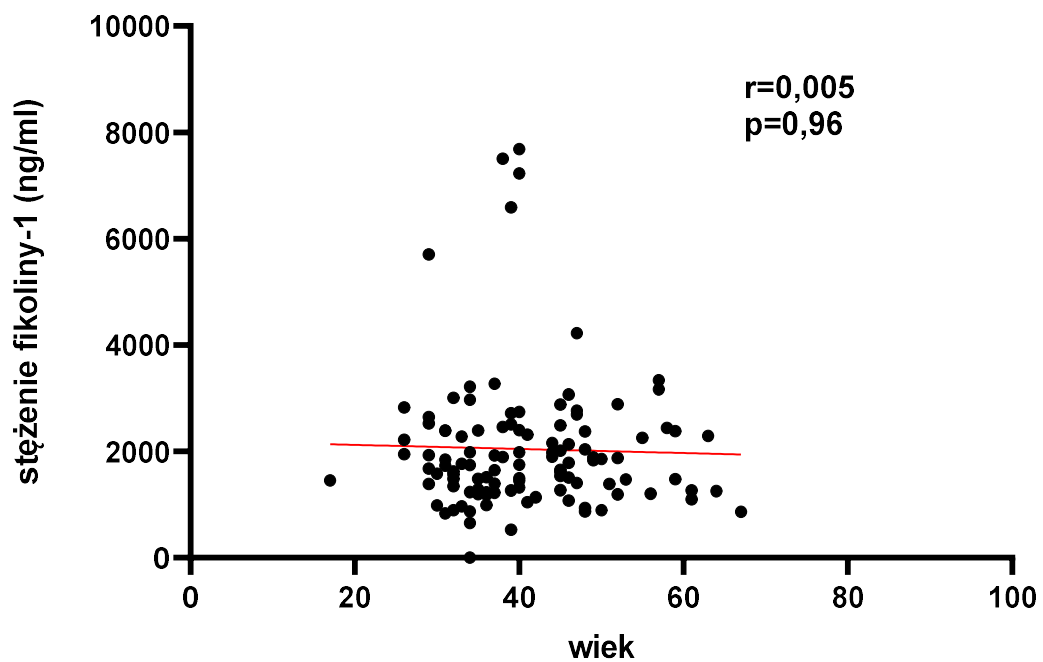
Tabela 30. Stężenia fikoliny-1 w surowicy osób zakwalifikowanych do grupy badanej (TB) oraz kontrolnej (C).

		Stężenie fikoliny-1 (ng/ml)		Istotność statystyczna
		Grupa TB	Grupa C	
ogółem	n	126	112	p<0,0001
	mediana	3341	1757	
	średnia	3696	2043	
	zakres	691-8059	0-7682	
<40 r.ż.	n	26	56	p=0,01
	mediana	2390	1659	
	średnia	2901	1992	
	zakres	801-7449	0-7500	
≥40 r.ż.	n	100	56	p<0,0001
	mediana	3928	1865	
	średnia	3903	2094	
	zakres	691-8059	867-7682	
mężczyźni	n	87	78	p<0,0001
	mediana	4078	1647	
	średnia	4108	1951	
	zakres	823-8059	0-7682	
mężczyźni <40 r.ż.	n	10	54	p=0,01
	mediana	2444	1659	
	średnia	3494	1916	
	zakres	963-6991	0-7500	
mężczyźni ≥40 r.ż.	n	77	24	p<0,0001
	mediana	4104	1632	
	średnia	4188	2028	
	zakres	823-8059	872-7682	
kobiety	n	39	34	p=0,14
	mediana	2392	1996	
	średnia	2778	2255	
	zakres	691-7449	867-7226	
kobiety <40 r.ż.	n	16	2	-
	mediana	2390	4023	
	średnia	2531	4023	
	zakres	801-7449	1451-6594	
kobiety ≥40 r.ż.	n	23	32	p=0,09
	mediana	2496	1996	
	średnia	2950	2144	
	zakres	691-6043	867-7226	

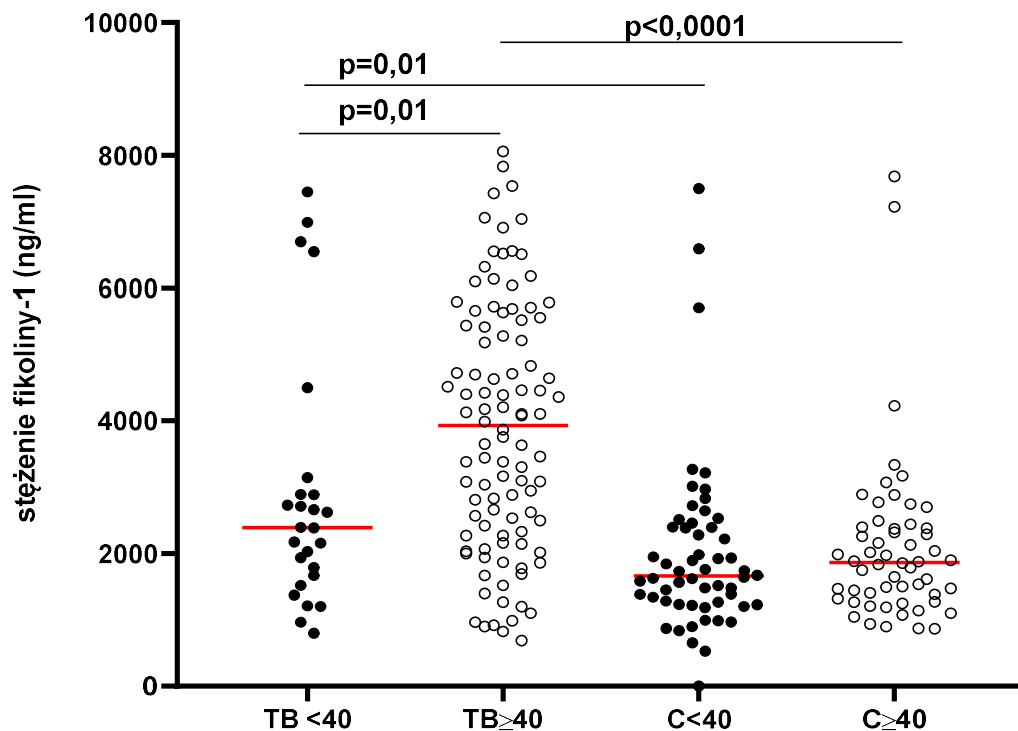
A



B

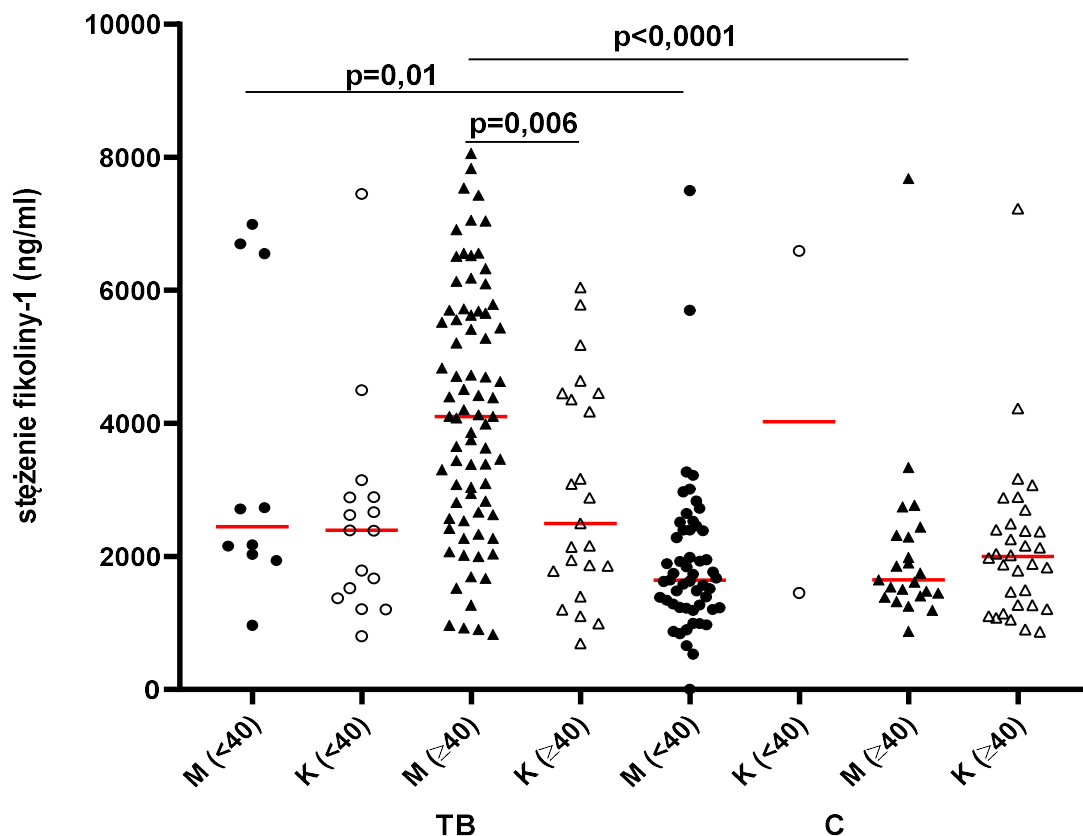


Ryc. 48. Korelacje stężenia ficoliny-1 w surowicy z wiekiem w grupie pacjentów (TB – wykres A) oraz kontrolnej (C – wykres B). Wykresy przedstawiają wartości indywidualne oraz linie trendu; r - współczynnik korelacji Spearmana.



Ryc. 49. Porównanie stężeń fikoliny-1 w surowicy, w grupie pacjentów (TB) oraz kontrolnej (C), w zależności od wieku. Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

Opisane wyżej znaczące różnice pomiędzy grupami nie były zależne od wieku (ryc. 49). Mediany stężeń omawianego białka wśród osób, które nie ukończyły 40 roku życia wynosiły 2390 ng/ml (grupa TB) i 1659 ng/ml (grupa C, $p=0,01$). Dla osób starszych, wartości te, to odpowiednio 3928 ng/ml i 1865 ng/ml ($p<0,0001$). Z drugiej strony, mimo wspomnianego braku korelacji, u pacjentów w wieku ≥ 40 lat, stężenia fikoliny-1 były wyższe niż u młodszych przedstawicieli grupy TB ($p=0,01$). W przypadku grupy odniesienia, różnica nie przekroczyła progu istotności statystycznej (ryc. 49, tabela 30).



Ryc. 50. Porównanie stężeń fikoliny-1 w surowicy, w grupie pacjentów chorych na gruźlicę (TB) i kontrolnej (C), z uwzględnieniem wieku i płci badanych osób; M - mężczyźni, K - kobiety. Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

Ponadto, u mężczyzn chorych na gruźlicę, w obu przedziałach wiekowych zaobserwowano wyższe stężenia fikoliny-1 niż u zdrowych przedstawicieli tej płci. Mediany uzyskane dla grupy TB wynosiły 2444 ng/ml (<40 lat) i 4104 ng/ml (≥40 lat), zaś dla grupy odniesienia, odpowiednio: 1659 ng/ml ($p=0,01$) i 1632 ng/ml ($p<0,0001$). Pomiędzy grupami chorych i zdrowych kobiet, które ukończyły 40 lat nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic median stężenia tego białka. Ponieważ zbadano nieliczne próby otrzymane od kobiet młodszych, nie przeprowadzono analizy statystycznej dla tej grupy wiekowej (ryc. 50 i tabela 30).

5.7.2. Badanie wybranych polimorfizmów genu *FCNI*

Występowanie wariantów polimorficznych genu *FCNI*, odpowiadających SNP zlokalizowanych w regionie promotorowym, w pozycjach -542 (G>A) oraz -144 (C>A) badano za pomocą metody PCR-RFLP. Analizowano 107 prób DNA pochodzących od pacjentów chorych na gruźlicę oraz 71 prób od osób zakwalifikowanych do grupy

kontrolnej. Analizując częstość występowania polimorfizmu w pozycji -542 G>A, stosując tabelę 3x2, otrzymano wartość p około 0,1, dlatego podjęto dalsze analizy z wykorzystaniem tabeli 2x2. Zaobserwowano, że genotyp G/G występuje znacząco częściej u osób chorych na gruźlicę w porównaniu z grupą odniesienia [p=0,04; OR=1,9, 95% CI (1,02-3,49)]. W przypadku drugiego badanego polimorfizmu, zaobserwowano wyższą częstość występowania genotypu C/C [p=0,02; OR=2,07, 95% CI (1,1-3,89)] w grupie TB. Szczegółowe dane przedstawiono w tabeli 31.

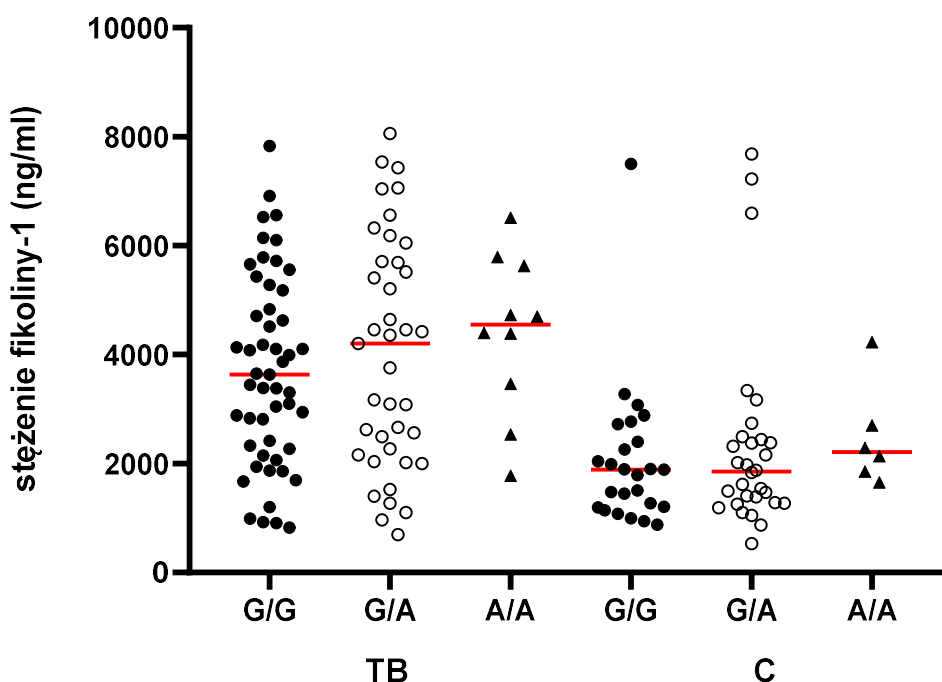
Tabela 31. Częstość występowania genotypów oraz alleli związanych z wybranymi polimorfizmami genu *FCNI* w grupie pacjentów (TB) i kontrolnej (C).

SNP	Grupa	n	Genotypy (%)			χ^2	p*	Allele (%)		OR (95% CI)	Istotność statystyczna
			G/G	G/A	A/A			G	A		
-542 G>A			G/G	G/A	A/A	4,3	0,12	G	A	0,67 (0,43-1,1)	p=0,08
	TB	107	56 (52,3)	41 (38,3)	10 (9,4)			153 (71,5)	61 (28,5)		
	C	71	26 (36,6)	37 (52,1)	8 (11,3)			89 (62,7)	53 (37,3)		
-144 C>A			C/C	C/A	A/A	6,67	0,04	C	A	0,66 (0,42-1,03)	p=0,07
	TB	107	55 (51,4)	41 (38,3)	11 (10,3)			151 (70,6)	63 (29,4)		
	C	71	24 (33,8)	39 (54,9)	8 (11,3)			87 (61,3)	55 (38,7)		

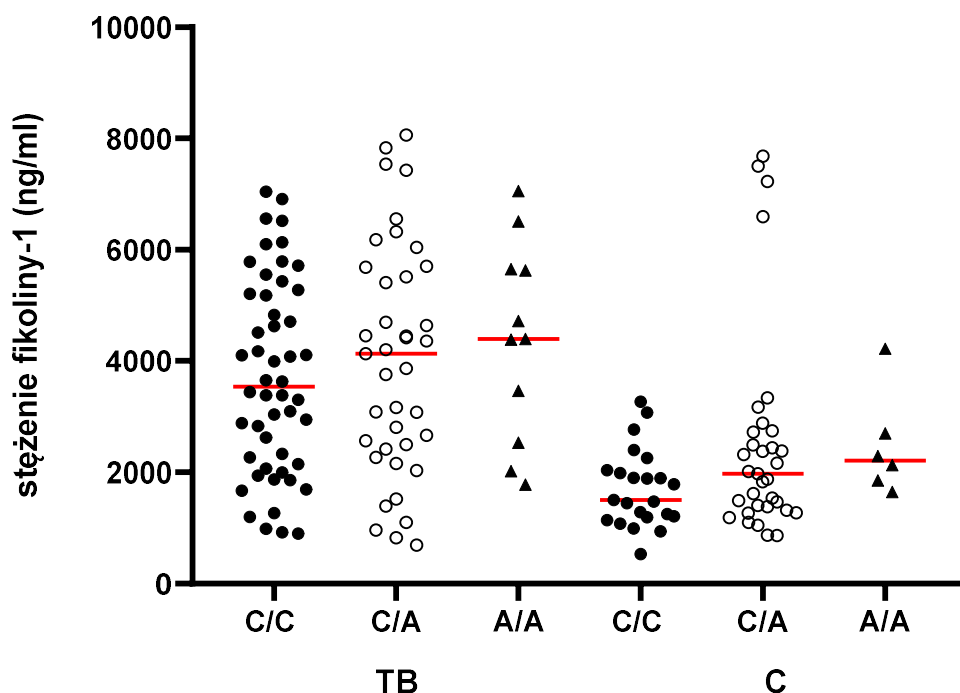
* - wartości p, to wynik analizy tabeli 3x2; OR-iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

5.7.3. Wpływ polimorfizmów genu *FCNI* na stężenie fikoliny-1 w surowicy

Wyniki analizy zależności stężenia fikoliny-1 od genotypów, związanych z SNP w pozycjach -542 G>A i -144 C>A przedstawiono na ryc. 51 i 52. W przypadku pierwszego z wymienionych, zaobserwowano wprawdzie wyższe mediany stężeń fikoliny-1 u homozygot A/A w porównaniu z nosicielami genotypu G/G (w grupie TB: 4548 ng/ml vs 3631 ng/ml; w grupie C: 2211 ng/ml vs 1886 ng/ml), różnice te nie okazały jednak się istotnymi statystycznie (wartość p w obu przypadkach wynosiła 0,2).



Ryc. 51. Wpływ polimorfizmu w pozycji -542 (G>A) genu *FCNI* na stężenie fikoliny-1 w surowicy pacjentów (TB) i osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej (C). Wykres przedstawia wartości indywidualne i mediany stężeń (czerwone linie).

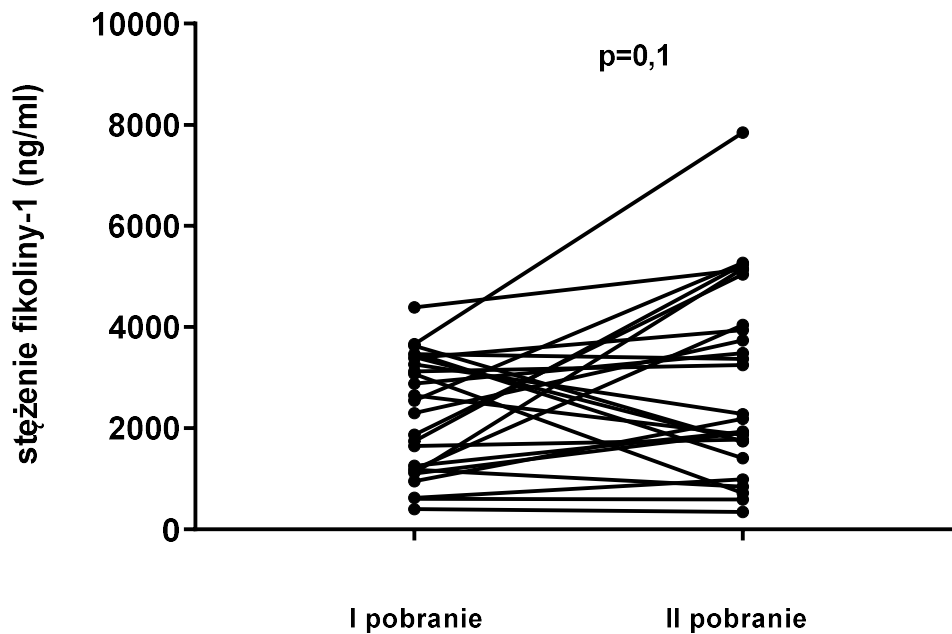


Ryc. 52. Wpływ polimorfizmu w pozycji -144 (C>A) genu *FCNI* na stężenie fikoliny-1 w surowicy pacjentów (TB) i osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej (C). Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

Porównując wyniki dotyczące polimorfizmu -144 C>A, w grupie osób zdrowych zanotowano wyraźne różnice stężeń fikoliny-1 pomiędzy homozygotami C/C oraz A/A (odpowiednio 1505 ng/ml i 2211 ng/ml), nie przekroczyły one jednak poziomu istotności statystycznej ($p=0,05$), co może wynikać z niewielkiej liczby osób o genotypie A/A. W grupie pacjentów, uzyskane mediany dla nosicieli genotypów C/C i A/A wynosiły odpowiednio 3537 ng/ml i 4399 ng/ml, $p=0,3$) (ryc. 52).

5.7.4. Zmiany stężenia fikoliny-1 w surowicy pacjentów w przebiegu leczenia

U 24 chorych, stężenia fikoliny-1 w surowicy oznaczono dwukrotnie, w próbach pobranych przed i po rozpoczęciu antybiotykoterapii. Zaobserwowano, że poziom omawianego białka nie zmienia się znacząco, mimo niekiedy wyraźnych różnic obserwowanych dla poszczególnych osób. Mediana wartości uzyskanych dla pierwszego pobrania wynosiła 2423 ng/ml, natomiast dla drugiego pobrania – 2231 ng/ml ($p=0,1$, test kolejności par Wilcozona). Wyniki przedstawiono na ryc. 53.

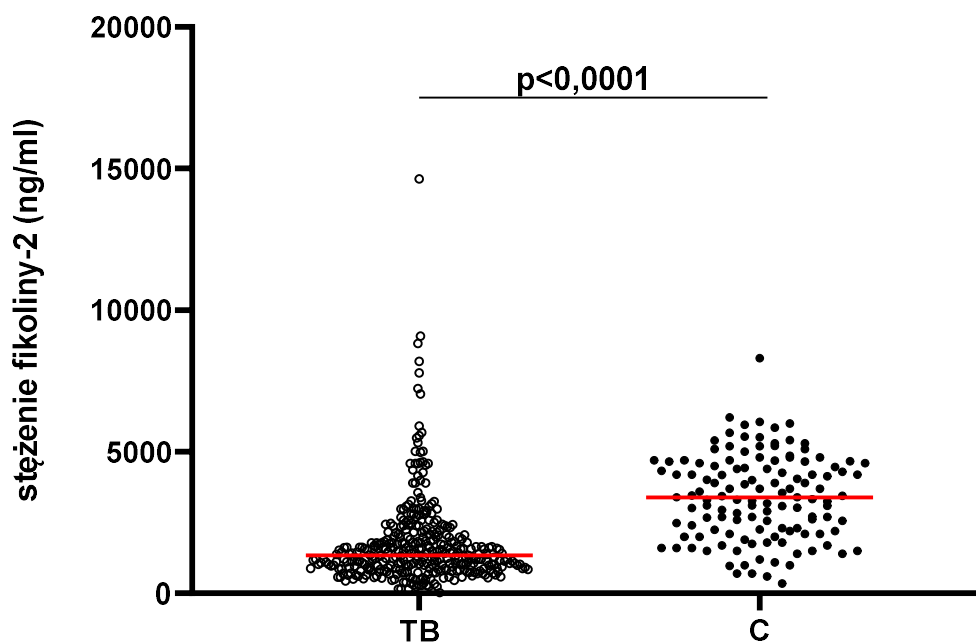


Ryc. 53. Porównanie stężeń fikoliny-1 w surowicy pacjentów chorych na gruźlicę płuc przed podjęciem leczenia (I pobranie) i w trakcie antybiotykoterapii (II pobranie).

5.8. Badanie stężenia fikoliny-2 w surowicy i polimorfizmów genu *FCN2*

5.8.1. Badanie stężenia fikoliny-2 w surowicy

Stężenia fikoliny-2 w surowicy badano za pomocą metody TRIFMA. Oznaczenia wykonano w 357 próbach otrzymanych od osób chorych na gruźlicę płuc oraz 126 osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej. W odróżnieniu do opisanych wcześniej czynników odporności, mediana uzyskana dla grupy TB była znacząco niższa (1346 ng/ml) w porównaniu z wartością wyznaczoną dla grupy C (3400 ng/ml, $p < 0,0001$). Wyniki przedstawiono na ryc. 54.



Ryc. 54. Porównanie stężeń fikoliny-2 w surowicy pacjentów chorych na gruźlicę (TB) oraz osób zdrowych (C). Na wykresie przedstawione zostały wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

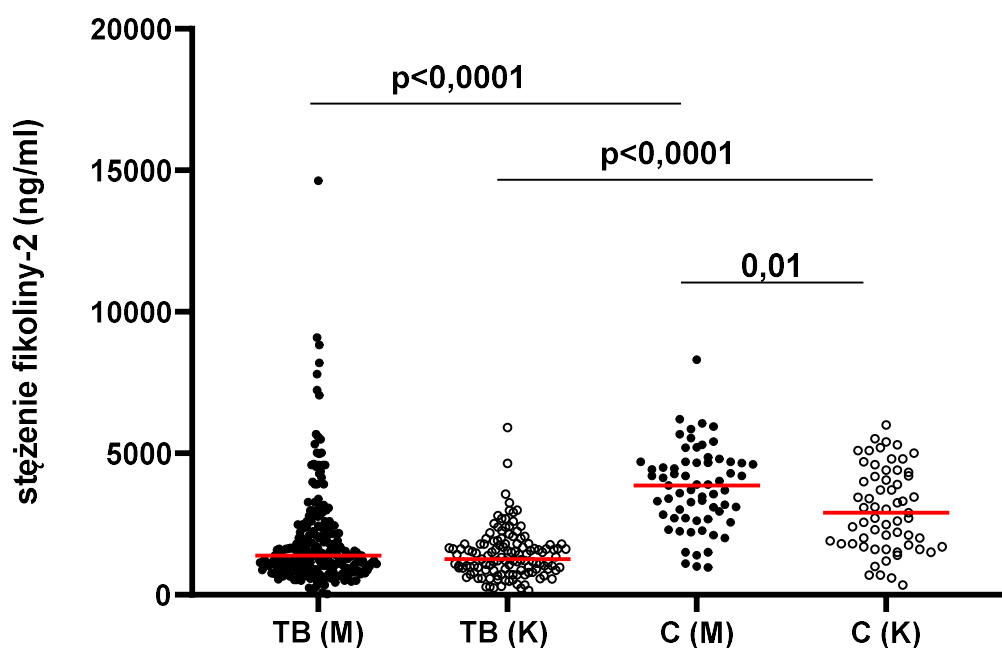
Stężenia fikoliny-2 poniżej 1500 ng/ml (wartość odpowiadająca 10. centylowi, wyznaczona dla grupy kontrolnej) występowały istotnie częściej u osób, u których rozpoznano gruźlicę płuc w porównaniu z osobami zakwalifikowanymi do grupy odniesienia ($p < 0,0001$) (tabela 32). Przeciwnie, wysokie stężenia (powyżej 5301 ng/ml) obserwowano znacząco częściej w grupie C.

Tabela 32. Porównanie częstości występowania niskich i wysokich stężeń fikoliny-2 w grupie badanej (TB) oraz kontrolnej (C).

Stężenie fikoliny-2	Grupa		Istotność statystyczna	OR (95% CI)
	TB n (%)	C n (%)		
<1500 ng/ml	197 (55,2)	11 (8,7)	p<0,0001	12,87 (6,83-24,00)
>5301 ng/ml	12 (3,4)	12 (9,5)	p=0,004	0,3 (0,14-0,73)

OR - iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

Obserwowane, istotne różnice były niezależne od płci (ryc. 55, tabela 33). Należy jednak zwrócić uwagę, że w grupie odniesienia (C), stężenia fikoliny-2 u mężczyzn okazały się wyższe niż u kobiet (p=0,01).



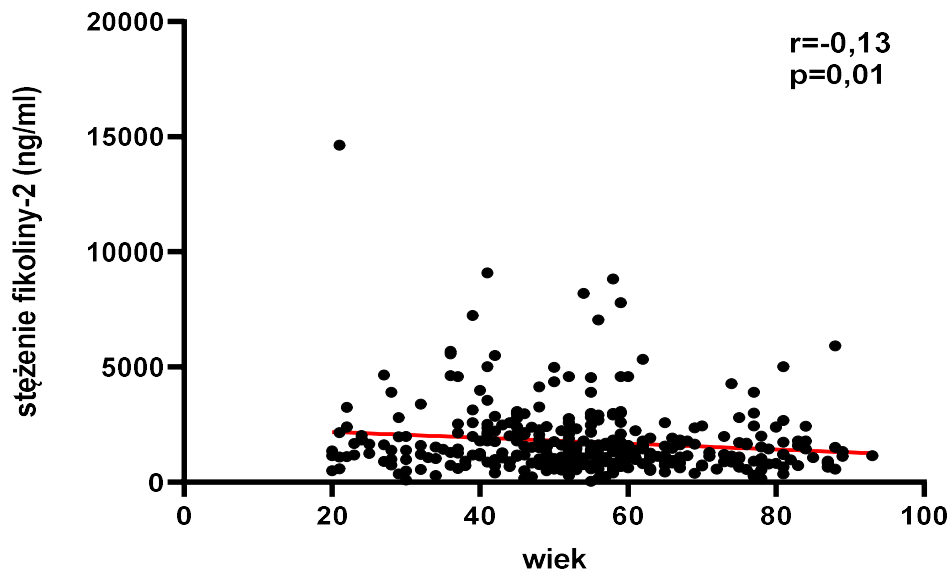
Ryc. 55. Stężenia fikoliny-2 w próbkach surowicy mężczyzn (M) i kobiet (K) zakwalifikowanych do grupy badanej (TB) i kontrolnej (C). Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

Tabela 33. Stężenia fikoliny-2 w surowicy osób zakwalifikowanych do grupy badanej (TB) oraz kontrolnej (C).

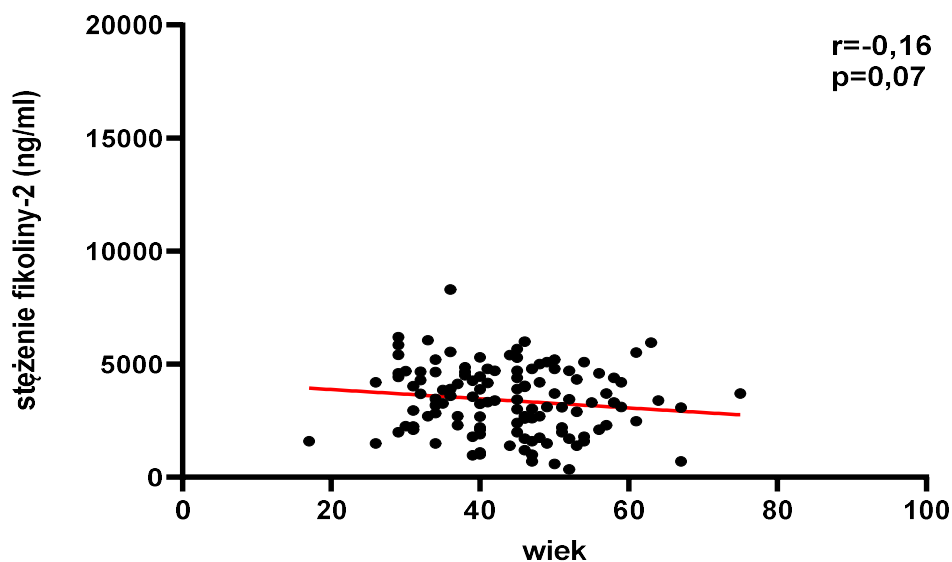
		Stężenie fikoliny-2 (ng/ml)		Istotność statystyczna
		Grupa TB	Grupa C	
ogółem	n	357	126	p<0,0001
	mediana	1346	3400	
	średnia	1751	3401	
	zakres	32-14629	350-8302	
<40 r.ż.	n	64	44	p<0,0001
	mediana	1403	3959	
	średnia	2048	3817	
	zakres	89-14629	971-8302	
≥40 r.ż.	n	293	82	p<0,0001
	mediana	1325	3100	
	średnia	1686	3178	
	zakres	32-9082	350-6000	
mężczyźni	n	230	65	p<0,0001
	mediana	1385	3862	
	średnia	1926	3765	
	zakres	32-14629	971-8302	
mężczyźni <40 r.ż.	n	33	40	p<0,0001
	mediana	1420	4167	
	średnia	2513	3989	
	zakres	89-14629	971-8302	
mężczyźni ≥40 r.ż.	n	197	25	p<0,0001
	mediana	1325	3300	
	średnia	1827	3407	
	zakres	32-9082	1002-5952	
kobiety	n	127	61	p<0,0001
	mediana	1266	2900	
	średnia	1434	3014	
	zakres	151-5912	350-6000	
kobiety <40 r.ż.	n	31	4	p=0,07
	mediana	1346	2051	
	średnia	1553	2100	
	zakres	482-4645	1600-2700	
kobiety ≥40 r.ż.	n	96	57	p<0,0001
	mediana	1228	3080	
	średnia	1395	3078	
	zakres	151-5912	350-6000	

Zaobserwowano znaczącą, odwrotną korelację stężenia fikoliny-2 w surowicy z wiekiem w grupie osób chorych na gruźlicę. W grupie kontrolnej, mimo wyższej wartości współczynnika korelacji Spearmana, wynik nie był znamieny statystycznie, co prawdopodobnie wynika z mniejszej liczby zbadanych prób (ryc. 56 A i B).

A

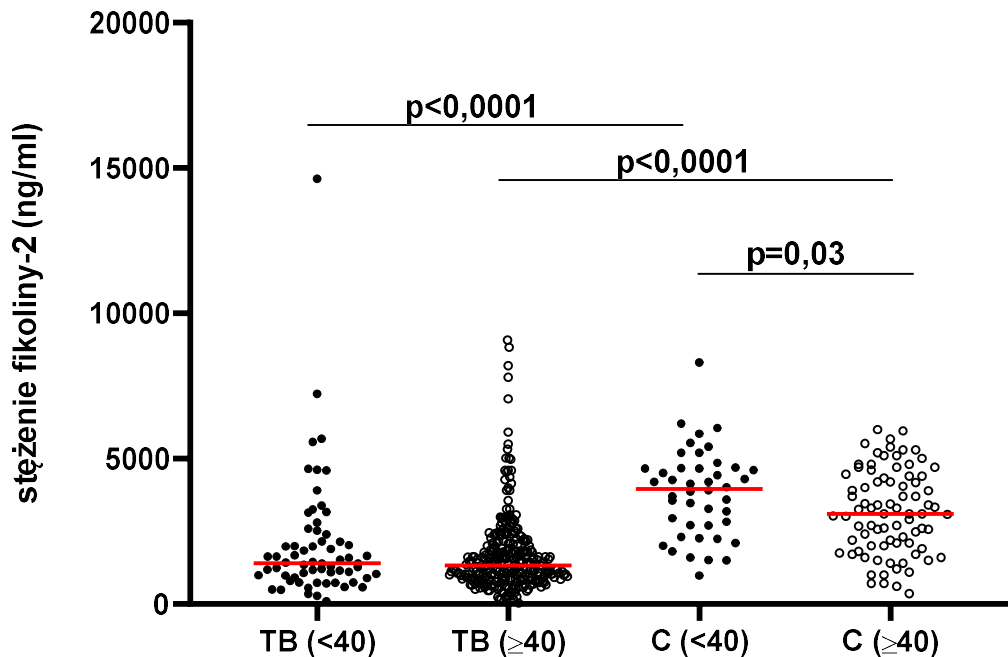


B



Ryc. 56. Korelacje stężenia fikoliny-2 w surowicy z wiekiem, w grupie pacjentów (TB – wykres A) oraz kontrolnej (C – wykres B) Wykresy przedstawiają indywidualne wartości oraz linie trendu; r - współczynnik korelacji Spearmana.

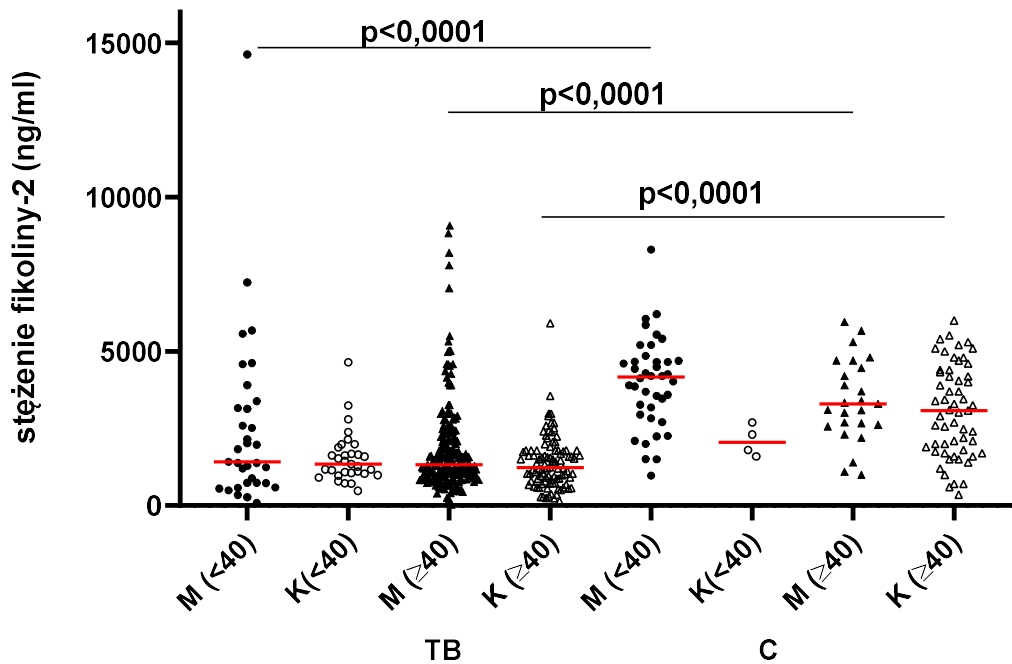
Zaobserwowano, iż bez względu na wiek (przed lub po ukończeniu 40 lat), stężenia fikoliny-2 były znacząco wyższe u osób zdrowych niż u chorych na gruźlicę (ryc. 57).



Ryc. 57. Porównanie stężeń fikoliny-2 w surowicy, w grupie pacjentów (TB) oraz kontrolnej (C), w zależności od wieku. Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

U starszych osób, należących do grupy kontrolnej, mediana stężenia tego białka była istotnie niższa niż u osób, które nie ukończyły 40 roku życia (odpowiednio 3100 ng/ml i 3959 ng/ml, $p=0,03$). Różnicy takiej nie zaobserwowano w grupie pacjentów (mediany, odpowiednio: 1325 ng/ml i 1403 ng/ml, $p=0,4$) (ryc. 57).

Analizując dane z uwzględnieniem płci i wieku zaobserwowano wyższe mediany stężeń w grupie C zarówno u mężczyzn, którzy nie ukończyli 40 roku życia jak i u starszych, w porównaniu z przedstawicielami tej samej płci w grupie TB. U kobiet różnice te osiągnęły poziom istotności statystycznej tylko w grupie wiekowej ≥ 40 lat, co przypuszczalnie wynika z niewielkiej liczby zbadanych prób, otrzymanych od zdrowych kobiet w wieku do 40 lat (ryc. 58, tabela 33).



Ryc. 58. Porównanie stężeń ficoliny-2 w surowicy, w grupie pacjentów chorych na gruźlicę (TB) i kontrolnej (C), z uwzględnieniem wieku i płci badanych osób; M - mężczyźni, K - kobiety. Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

5.8.2. Badanie wybranych polimorfizmów genu *FCN2*

W badaniach polimorfizmów w pozycjach -64 (A>C) oraz -4 (A>G) genu *FCN2* wykorzystano odpowiednio metody PCR oraz PCR-RFLP, opisane przez Szalę i wsp. [358]. Występowanie poszczególnych genotypów, związanych z pierwszym z wymienionych SNP oceniono u 92 pacjentów oraz 104 przedstawicieli grupy kontrolnej, natomiast wariantów odpowiadających drugiemu polimorfizmowi – odpowiednio, u 173 i 105 osób. Wyniki przedstawiono w tabeli 34.

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic częstości występowania genotypów czy alleli w pozycji -64 pomiędzy porównywanymi grupami, natomiast w przypadku polimorfizmu pozycji -4, w grupie kontrolnej, znacząco częściej obserwowano genotyp A/G [p=0,01; OR=0,51, 95% CI (0,32-0,85), tabela 34].

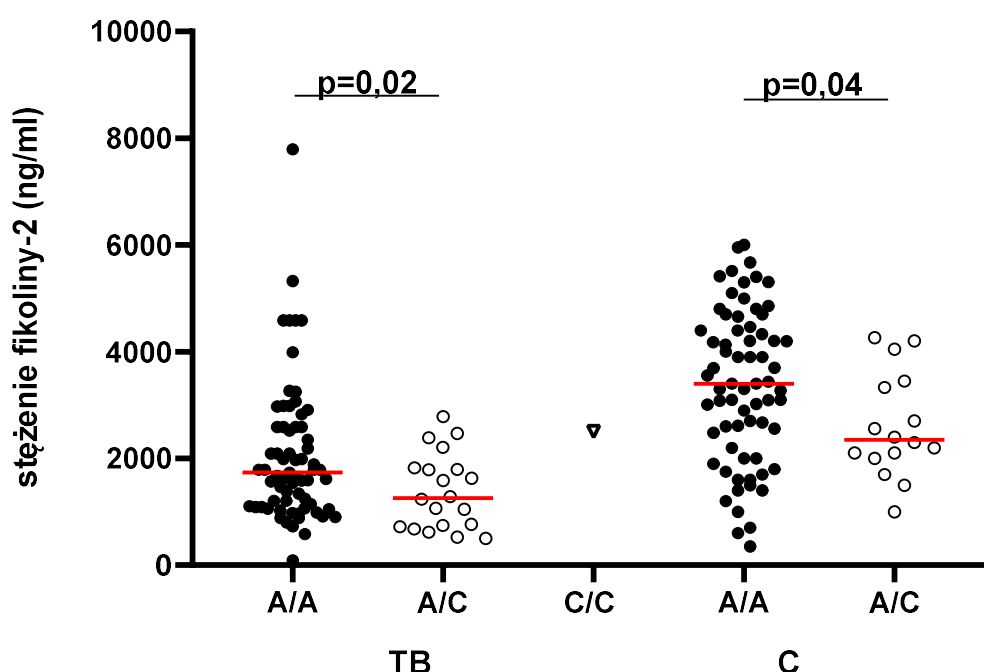
Tabela 34. Częstość występowania genotypów oraz alleli związanych z wybranymi polimorfizmami genu *FCN2* w grupie pacjentów (TB) i kontrolnej (C).

SNP	Grupa	n	Genotypy (%)			χ^2	p*	Allele (%)		OR (95% CI)	Istotność statystyczna
			A/A	A/C	C/C			A	C		
-64 A>C	TB	92	70 (76,1)	21 (22,8)	1 (1,1)	3,0	0,22	161 (87,5)	23 (12,5)	1,7 (0,86-3,3)	p=0,1
	C	104	88 (84,6)	16 (15,4)	0 (0)			192 (92,3)	16 (7,7)		
-4 A>G	TB	173	87 (50,3)	64 (37,0)	22 (12,7)	7,4	0,02	238 (68,8)	108 (31,2)	0,87 (0,79-1,65)	p=0,5
	C	105	41 (39,0)	56 (53,3)	8 (7,7)			138 (65,7)	72 (34,3)		

* - wartości p, to wynik analizy tabeli 3x2; OR - iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

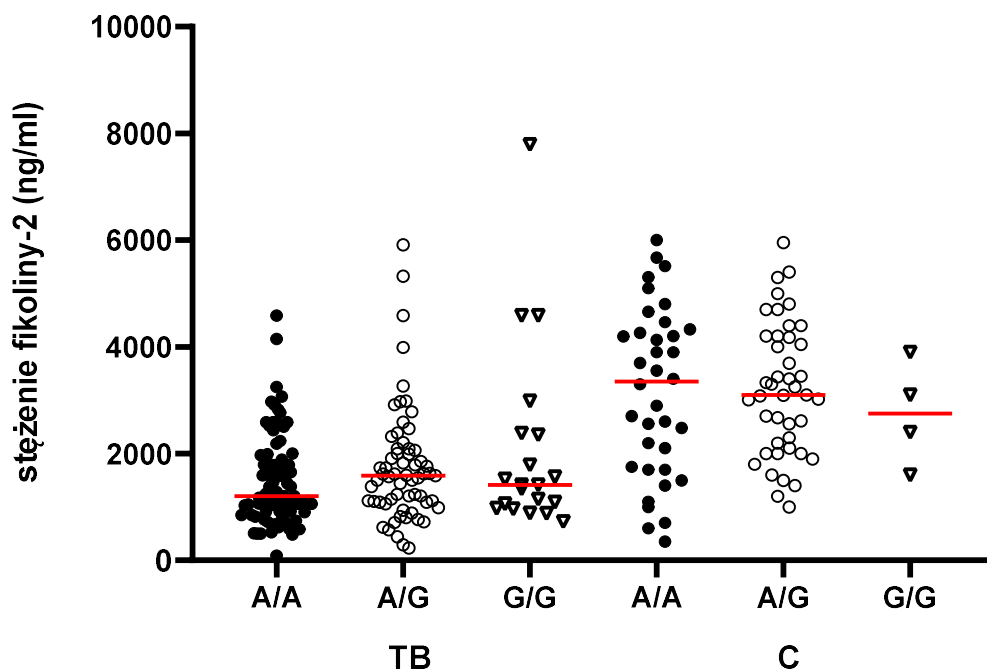
5.8.3. Wpływ badanych polimorfizmów genu *FCN2* na stężenie fikoliny-2 w surowicy

Analiza zależności stężenia fikoliny-2 od genotypów wykazała, że niższe wartości związane są z obecnością wariantu C pozycji -64. W grupie TB, mediana uzyskana dla heterozygot A/C (1262 ng/ml) była znacząco niższa niż w przypadku homozygot A/A (1737 ng/ml, $p=0,02$). W grupie kontrolnej, różnica również okazała się istotną statystycznie (2350 ng/ml vs 3400 ng/ml, $p=0,04$) (ryc. 59). Jediną homozygotą C/C była osoba chora na gruźlicę płuc, w której surowicy oznaczono stosunkowo wysokie stężenie badanego białka (2507 ng/ml).



Ryc. 59. Wpływ polimorfizmu -64 (A>C) genu *FCN2* na stężenie fikoliny-2 w surowicy pacjentów (TB) i osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej (C). Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

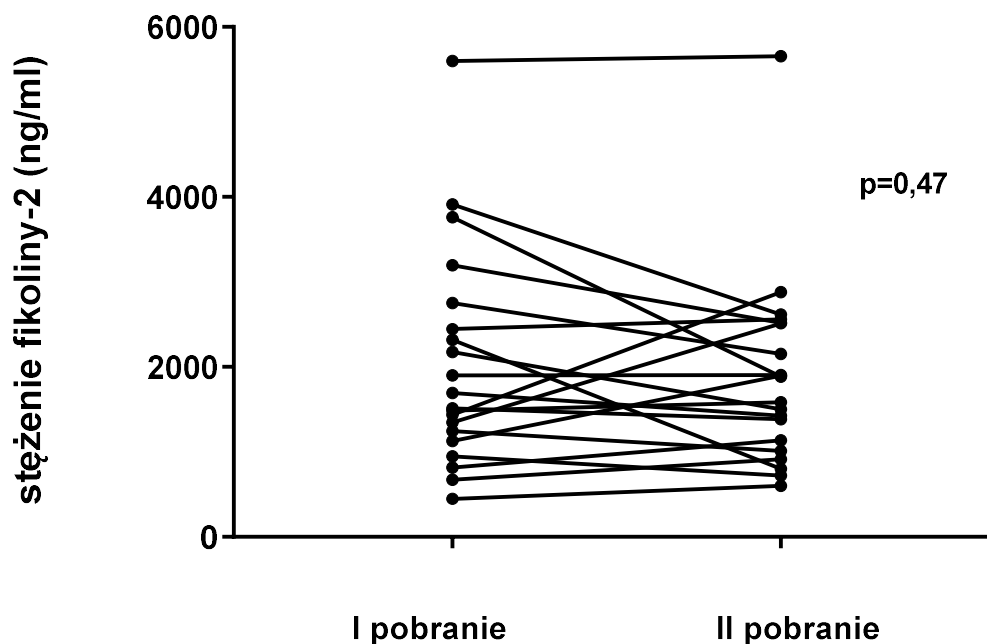
Polimorfizm w pozycji -4 genu *FCN2*, nie wpływał znacząco na stężenie fikoliny-2 w surowicy. Mediany dla homozygot A/A w obu grupach (TB: 1208 ng/ml; C: 3350 ng/ml) nie różniły się istotnie od median oznaczonych dla heterozygot (TB: 1588 ng/ml, $p=0,1$; C: 3100 ng/ml, $p=0,9$) i homozygot G/G (TB: 1413 ng/ml, $p=0,3$; C: 2750 ng/ml, $p=0,6$). Wyniki przedstawiono na ryc. 60.



Ryc. 60. Wpływ polimorfizmu -4 (A>G) genu *FCN2* na stężenie fikoliny-2 w surowicy pacjentów (TB) i osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej (C). Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

5.8.4. Zmiany stężenia fikoliny-2 w przebiegu leczenia

Stężenia fikoliny-2 oznaczono w próbach surowicy pobranych od 24 pacjentów bezpośrednio po rozpoznaniu choroby oraz w trakcie leczenia przeciwgruźliczego (po kilku tygodniach od rozpoczęcia antybiotykoterapii). Wykazano, podobnie jak w przypadku fikoliny-1, brak istotnych zmian poziomu badanego białka: mediana przy pierwszym pobraniu wynosiła 1603 ng/ml, natomiast przy drugim: 1734 ng/ml ($p=0,47$, test kolejności par Wilcoxon) (ryc. 61).



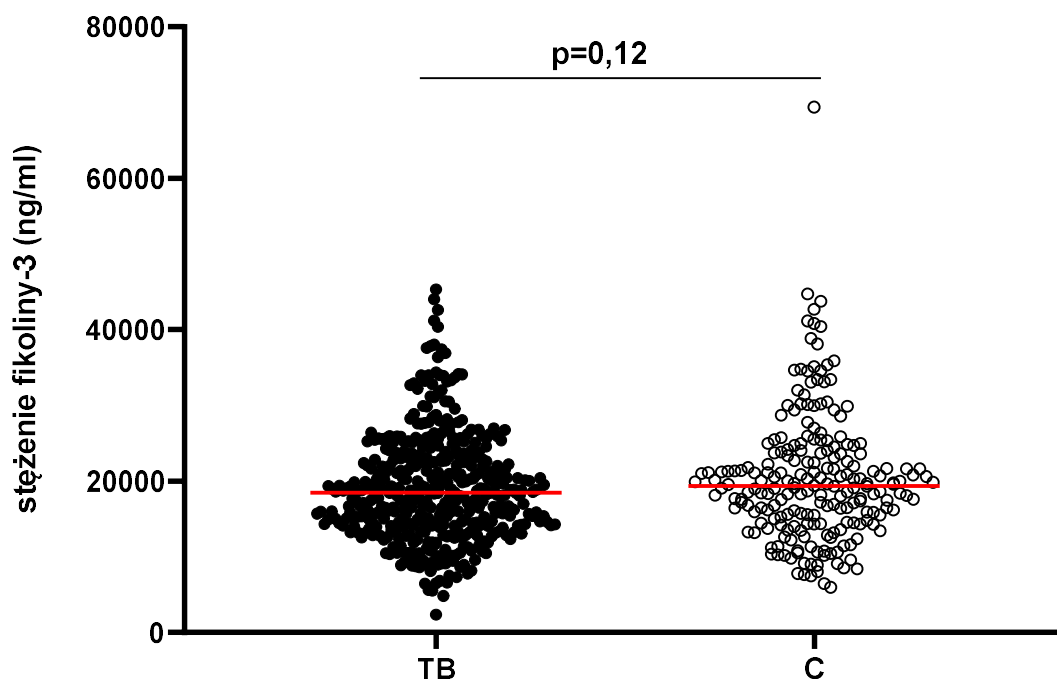
Ryc. 61. Porównanie stężeń fikoliny-2 w surowicy pacjentów chorych na gruźlicę płuc przed podjęciem leczenia (I pobranie) i w trakcie antybiotykoterapii (II pobranie).

5.9. Badanie stężenia fikoliny-3 w surowicy i mutacji genu *FCN3*

5.9.1. Badanie stężenia fikoliny-3 w surowicy

Stężenie fikoliny-3 badano za pomocą metody ELISA, wykorzystującej interakcję tego białka z LPS *Hafnia alvei* PCM 1200. Oznaczenia wykonano w 430 próbach surowicy otrzymanych od osób chorych na gruźlicę oraz 214 próbach pobranych od osób zdrowych. Mediana stężeń fikoliny-3 była nieistotnie niższa w grupie TB (18466 ng/ml), w porównaniu z grupą C (19362 ng/ml, $p=0,12$) (ryc. 62).

Porównując wyniki otrzymane dla grup TB i C nie zaobserwowano istotnych różnic częstości występowania niskich (poniżej wartości odpowiadającej 10. centylowi wyznaczonemu dla grupy kontrolnej, 10633 ng/ml) oraz wysokich stężeń (powyżej wartości odpowiadającej 90. centylowi w grupie C, 31693 ng/ml) fikoliny-3 w surowicy (tabela 35).



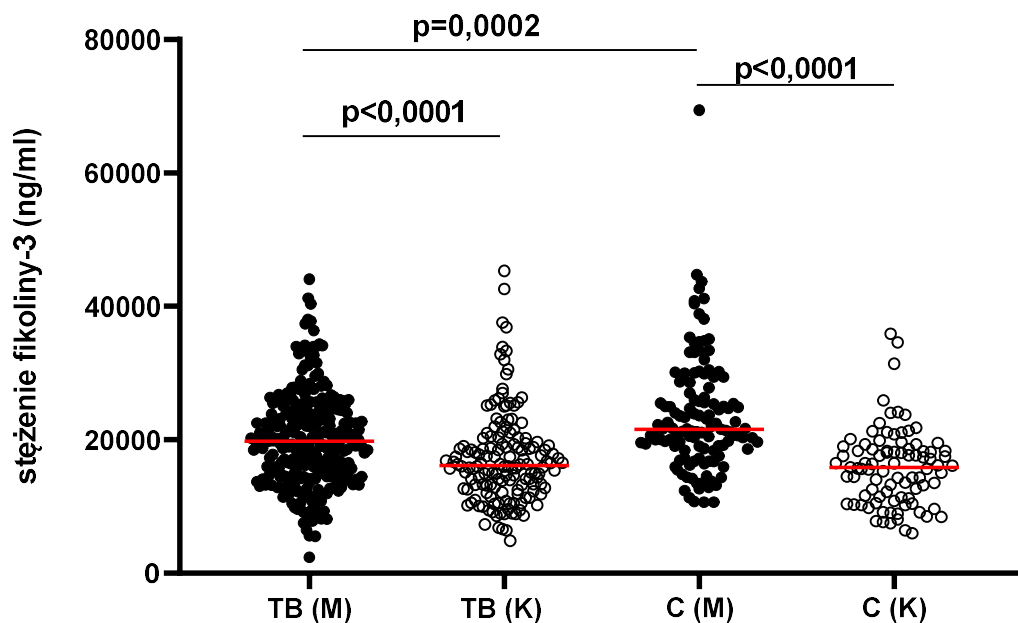
Ryc. 62. Porównanie stężeń fikoliny-3 w surowicy pacjentów chorych na gruźlicę (TB) oraz osób zdrowych (C). Na wykresie przedstawione zostały wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

Tabela 35. Porównanie częstości występowania niskich i wysokich stężeń fikoliny-3 w surowicy grupie badanej (TB) oraz kontrolnej (C).

Stężenie fikoliny-3	Grupa		Istotność statystyczna	OR (95% CI)
	TB n (%)	C n (%)		
<10633 ng/ml	45 (10,5)	21 (9,8)	p=0,8	1,07 (0,62-1,9)
>31693 ng/ml	27 (6,3)	21 (9,8)	p=0,1	0,62 (0,34-1,1)

OR - iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

Analiza statystyczna wykazała jednak istotne różnice stężeń badanego białka pomiędzy mężczyznami należącymi do grupy badanej i grupy kontrolnej ($p=0,0002$). Porównanie danych otrzymanych dla kobiet nie przyniosło rezultatu znaczącego statystycznie ($p=0,22$; ryc. 63, tabela 36). Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, stężenia fikoliny-3 okazały się wyższe u mężczyzn niż u kobiet, zarówno w grupie pacjentów jak i kontrolnej ($p<0,0001$, ryc. 63).



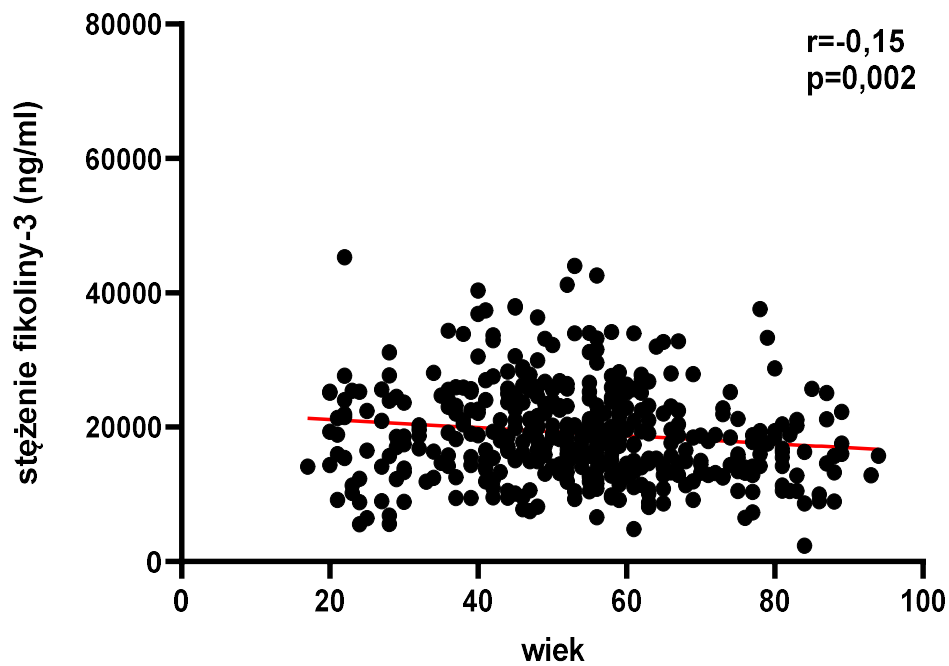
Ryc. 63. Stężenia ficoliny-3 w próbach surowicy mężczyzn (M) i kobiet (K) zakwalifikowanych do grupy badanej (TB) i kontrolnej (C). Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

W obu analizowanych grupach zaobserwowano istotną statystycznie, odwrotną korelację stężenia ficoliny-3 z wiekiem (ryc. 64 A i B).

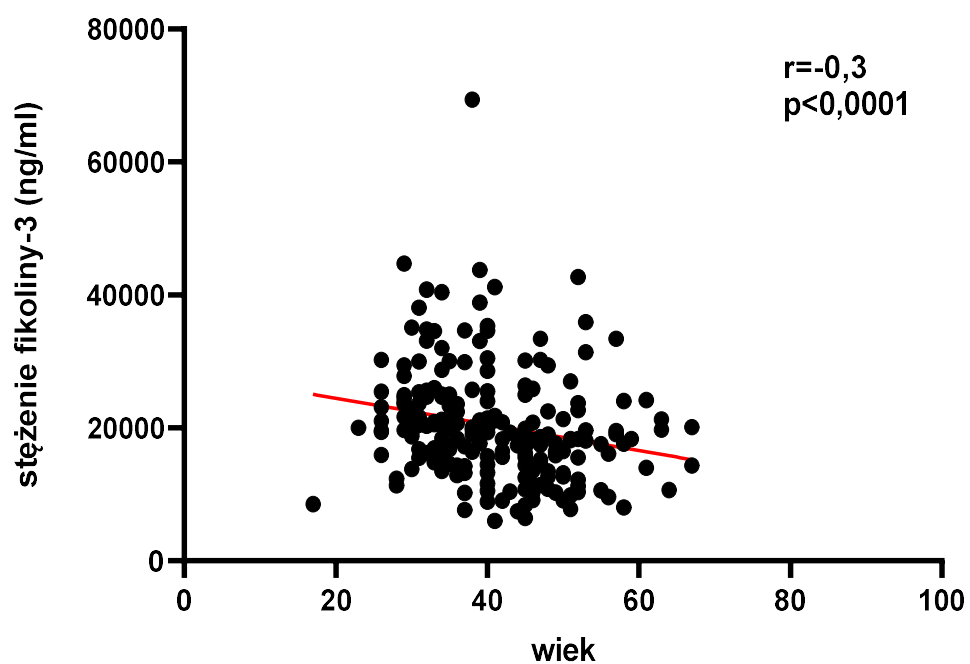
Tabela 36. Stężenia fikoliny-3 w surowicy osób zakwalifikowanych do grupy badanej (TB) oraz kontrolnej (C).

		Stężenie fikoliny-3 (ng/ml)		Istotność statystyczna
		Grupa TB	Grupa C	
ogółem	n	430	214	p=0,12
	mediana	18466	19362	
	średnia	19101	20370	
	zakres	2377-45313	5993-69394	
<40 r.ż.	n	79	102	p=0,005
	mediana	18874	21123	
	średnia	18939	22834	
	zakres	5538-45313	7649-69394	
≥40 r.ż.	n	351	112	p=0,1
	mediana	18441	17576	
	średnia	19137	18126	
	zakres	2377-44045	5993-42700	
mężczyźni	n	278	125	p=0,0002
	mediana	19819	21589	
	średnia	20104	23595	
	zakres	2377-44045	10625-69394	
mężczyźni <40 r.ż.	n	40	97	p=0,4
	mediana	21702	21228	
	średnia	20714	23388	
	zakres	5538-34338	11333-69394	
mężczyźni ≥40 r.ż.	n	238	28	p=0,01
	mediana	19388	24519	
	średnia	20001	24313	
	zakres	2377-44045	10625-42700	
kobiety	n	152	89	p=0,2
	mediana	16170	15853	
	średnia	17266	15841	
	zakres	4848-45313	5993-35900	
kobiety <40 r.ż.	n	39	5	p=0,15
	mediana	15396	10200	
	średnia	17118	12088	
	zakres	6444-45313	7649-17673	
kobiety ≥40 r.ż.	n	113	84	p=0,3
	mediana	16320	15991	
	średnia	17317	16064	
	zakres	4848-42614	5993-35900	

A

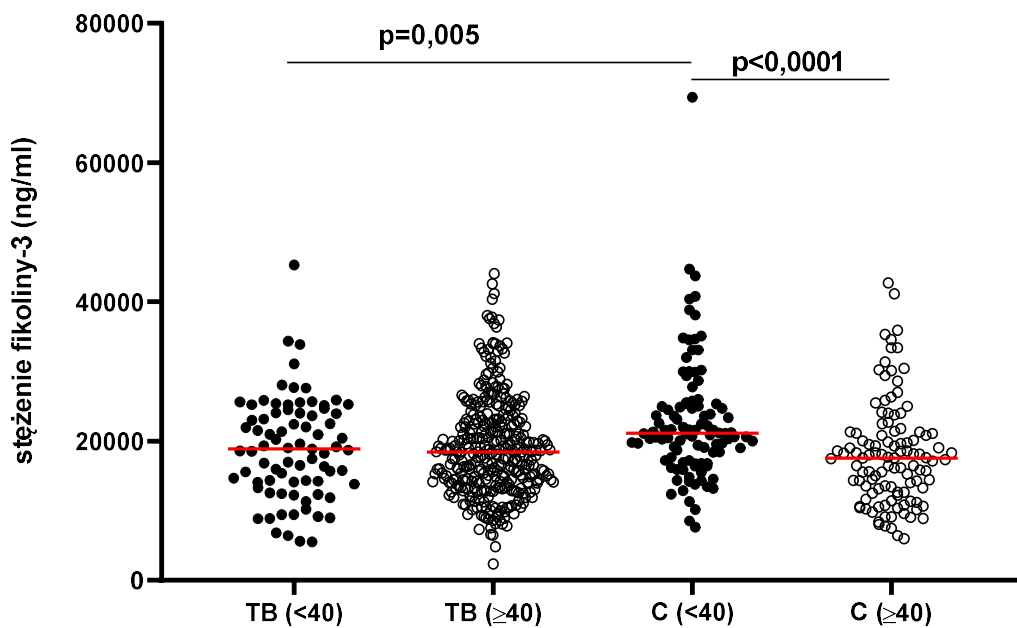


B



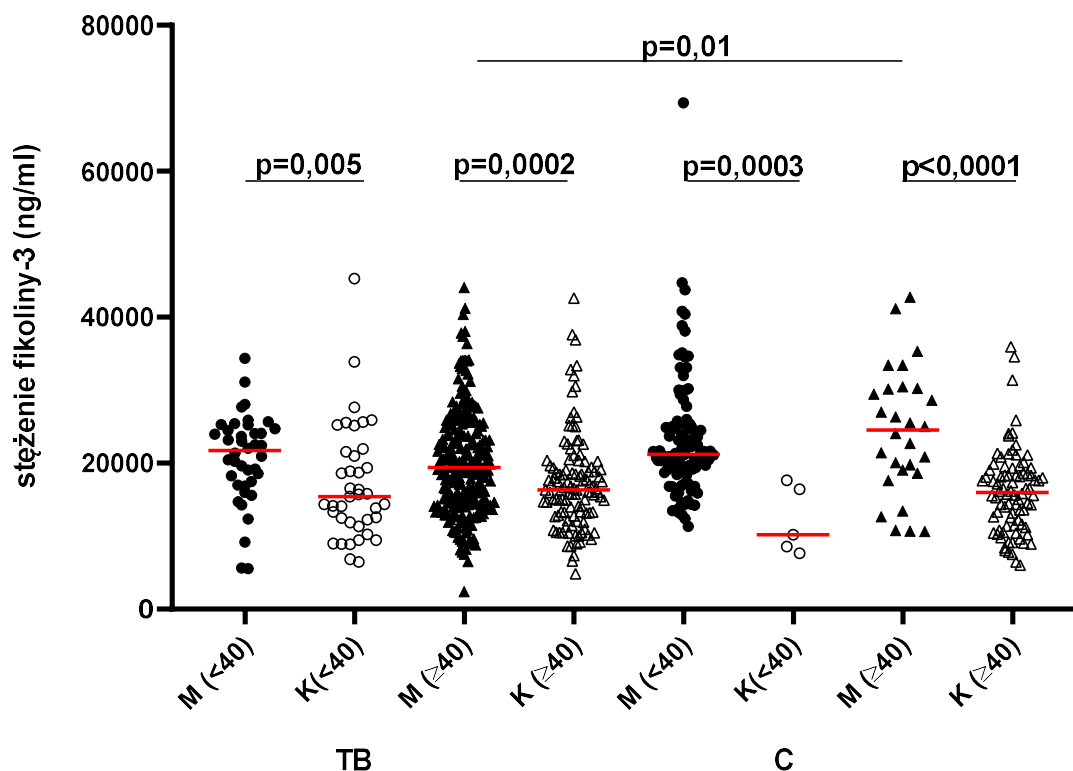
Ryc. 64. Korelacje stężenia ficoliny-3 w surowicy z wiekiem w grupie pacjentów (TB – wykres A) oraz kontrolnej (C – wykres B). Wykresy przedstawiają indywidualne wartości oraz linie trendu; r - współczynnik korelacji Spearmana.

U osób w wieku do 40 lat, mediana stężenia fikoliny-3 w grupie kontrolnej (21123 ng/ml) okazała się znacząco wyższa, w porównaniu z grupą badaną (18874 ng/ml, $p=0,005$). U osób starszych, różnica nie była istotna statystycznie (mediany odpowiednio: 18441 ng/ml oraz 17576 ng/ml, $p=0,1$) (ryc. 65). W grupie osób zdrowych zauważono ponadto znaczącą statystycznie różnicę median stężeń pomiędzy osobami młodszymi i starszymi ($p<0,0001$). Zależności takiej nie wykazano w przypadku chorych na gruźlicę płuc.



Ryc. 65. Porównanie stężeń fikoliny-3 w surowicy, w grupie pacjentów (TB) oraz kontrolnej (C), w zależności od wieku. Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

Wykazano, że wspomniane wyżej różnice stężenia fikoliny-3 związane z płcią były niezależne od wieku (porównano grupy <40 lat i ≥40 lat) (ryc. 66, tabela 36). Ponadto, mediana wyznaczona dla zdrowych mężczyzn, którzy ukończyli 40 rok życia była znacząco wyższa niż u chorych na gruźlicę, w porównywalnym wieku (odpowiednio 24519 ng/ml i 19388 ng/ml, $p=0,01$).



Ryc. 66. Porównanie stężeń fikoliny-3 w surowicy, w grupie pacjentów chorych na gruźlicę (TB) i kontrolnej (C), z uwzględnieniem wieku i płci badanych osób; M - mężczyźni, K - kobiety. Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

Jak wspomniano, bez względu na wiek, u mężczyzn zanotowano wyższe stężenia fikoliny-3 niż u kobiet, co potwierdza wcześniejsze obserwacje własne i dane literaturowe (ryc. 66).

5.9.2. Badanie występowania mutacji +1637delC (rs28357092) genu *FCN3*

Do oceny występowania mutacji +1637delC wykorzystano metodę PCR-RFLP opracowaną przez Michalskiego i wsp. [217]. Zbadano 418 prób DNA pochodzących od pacjentów (TB) oraz 221 od osób zdrowych (C). Żadna z badanych osób nie okazała się homozygotą delC/delC (-/-) (genotyp ten związany jest z pierwotnym niedoborem fikoliny-3). Liczba heterozygot, jak również częstość występowania allelu z delecją pojedynczego nukleotydu nie różniły się pomiędzy badanymi grupami. Szczegółowe dane przedstawiono w tabeli 37.

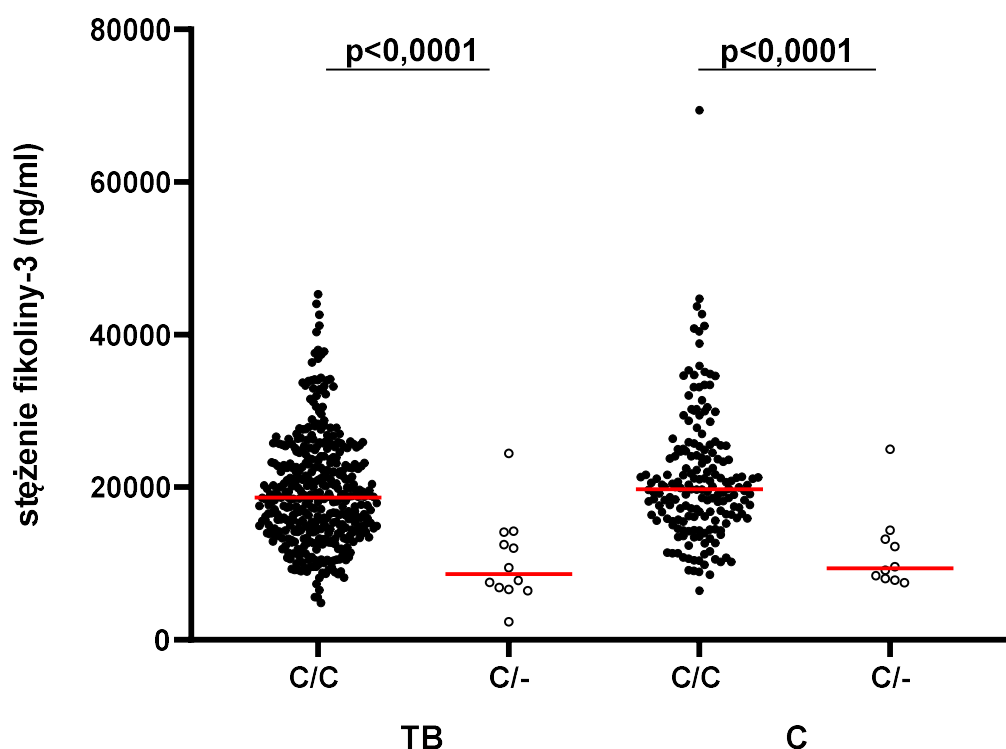
Tabela 37. Częstość występowania genotypów oraz alleli związanych z mutacją w pozycji +1637delC genu *FCN3* w grupie pacjentów (TB) i kontrolnej (C).

Grupa	n	Genotypy (%)		χ^2	p	Allele (%)		OR (95% CI)	Istotność statystyczna
		C/C	C/-			C	delC		
TB	418	406 (97,1)	12 (2,9)	1,85	0,17	824 (98,6)	12 (1,4)	0,57 (0,25-1,26)	0,17
C	221	210 (95,0)	11 (5,0)			431 (97,5)	11 (2,5)		

OR - iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

5.9.3. Wpływ występowania mutacji +1637delC na stężenie fikoliny-3 w surowicy

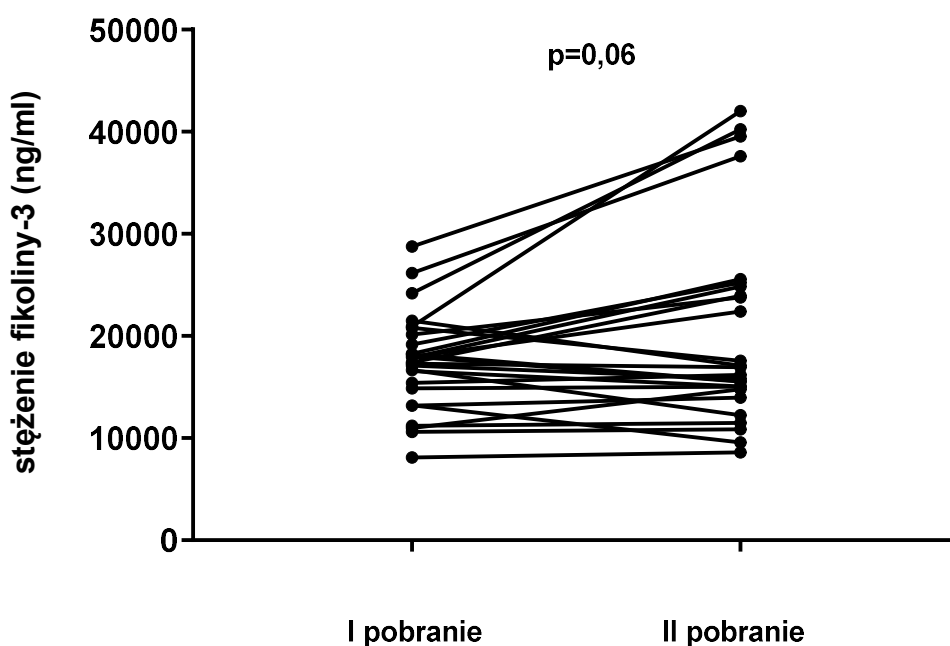
Zgodnie z oczekiwaniem, badana mutacja wpływała znacząco na stężenie fikoliny-3 w surowicy (ryc. 67). Mediany uzyskane dla homozygot C/C wynosiły 18480 ng/ml (w grupie pacjentów) oraz 19320 ng/ml (w grupie odniesienia). Znacząco niższe wartości otrzymano dla heterozygot (odpowiednio: 8613 ng/ml oraz 9369 ng/ml).



Ryc. 67. Wpływ mutacji +1637delC genu *FCN3* na stężenie fikoliny-3 w surowicy pacjentów (TB) i osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej (C). Wykres przedstawia wartości indywidualne oraz mediany stężeń (czerwone linie).

5.9.4. Zmiany stężenia fikoliny-3 w przebiegu leczenia

U 24 pacjentów oceniono zmiany stężenia fikoliny-3 w przebiegu leczenia (jak wspomniano wyżej, dzięki uzyskaniu prób surowicy przed rozpoczęciem antybiotykoterapii i w jej trakcie). Obserwowana różnica nie była znacząca statystycznie: mediana przy pierwszym pobraniu wynosiła 17641 ng/ml, natomiast przy drugim 16554 ng/ml ($p=0,06$; test kolejności par Wilcozona). Wyniki przedstawiono na ryc. 68.



Ryc. 68. Porównanie stężeń fikoliny-3 w surowicy pacjentów chorych na gruźlicę płuc przed podjęciem leczenia (I pobranie) i w trakcie antybiotykoterapii (II pobranie).

5.10. Ocena potencjalnego znaczenia diagnostycznego badanych białek

Dane dotyczące stężeń badanych białek i aktywności kompleksów MBL z proteazami serynowymi MASP zostały poddane analizie krzywych ROC (ang. receiver characteristic operating curves), pozwalającej na ocenę potencjału diagnostycznego tych czynników. W tabeli 38 zebrano wartości AUC (pole powierzchni pod krzywą, ang. area under curve) oraz odpowiednie przedziały ufności otrzymane w wyniku analizy. Wśród zbadanych czynników odporności wrodzonej, dwa: fikolina-1 i -2, charakteryzowały się wysoką ($>0,8$) wartością AUC, co świadczyło o ich znacznym potencjale różnicującym osoby chore na gruźlicę płuc od osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej. Na podstawie powyższej analizy wyznaczono graniczne wartości stężeń tych białek, które mogłyby służyć, jako markery pomocnicze w diagnostyce

gruźlicy płuc. Najlepsze dopasowanie dla fikoliny-1 osiągnięto dla wartości 2528 ng/ml, która pozwala na odróżnienie pacjentów od osób zdrowych przy czułości 65,4% i specyficzności 80,6%). W przypadku fikoliny-2 wartość ta wynosiła 2090 ng/ml (czułość 75,9% i specyficzność 77,9%). Stężenia fikoliny-1 powyżej, a fikoliny-2 poniżej wyznaczonych wartości granicznych u osób z podejrzeniem zachorowania na gruźlicę, mogłyby (jako dodatkowe wskaźniki) ułatwić rozpoznanie.

Tabela 38. Jednoczynnikowe modele diagnostyczne.

Białko/kompleks	AUC	95% CI	Istotność statystyczna
MBL	0,66	0,62-0,7	p<0,0001
MBL/MASP-2	0,66	0,62-0,7	p<0,0001
MBL-MASP-1	0,61	0,56-0,65	p<0,0001
SP-D	0,74	0,7-0,78	p<0,0001
<u>Fikolina-1</u>	<u>0,81</u>	<u>0,74-0,86</u>	p<0,0001
<u>Fikolina-2</u>	<u>0,82</u>	<u>0,78-0,86</u>	p<0,0001
Fikolina-3	0,54	0,49-0,58	p=0,12

AUC - pole powierzchni pod krzywą (ang. area under curve); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

W kolejnym etapie testowano potencjalne modele diagnostyczne tworzone w oparciu o odpowiednio dobrane zestawy stężeń wybranych białek (tabela 39), wykorzystując metodę regresji logistycznej. Otrzymane wartości prawdopodobieństwa przynależności [logit(p)] analizowano metodą ROC i wyznaczono (jak uprzednio) wartości AUC i 95% przedziały ufności (95% CI) oraz, stosując parametr Yudena, wartość graniczną. Zaobserwowano, że wartości AUC dla zestawienia fikoliny-1 i -2 są wyższe niż te liczone dla pojedynczych czynników, co zwiększa ich użyteczność, jako potencjalnych biomarkerów w diagnozowaniu gruźlicy płuc. Najlepsze dopasowanie dla tego modelu osiągnięto dla wartości logit(p) równej 0,47 przy czułości 91,3% i specyficzności 78,8%.

Tabela 39. Wieloczynnikowy model diagnostyczny.

Model	AUC	5-95% CI	Logit(p)=
fikolina-1/-2	0,88	0,83-0,92	$1,2605+0,0006* X_1+(-0,001* X_2)$

X_1, X_2 – stężenia białek w kolejności podanej w kolumnie pierwszej

Zatem, w celu zakwalifikowania pacjenta do grupy ryzyka, celem jest wykonanie obliczeń przy wykorzystaniu wzoru przedstawionego w tabeli 39. Następnie wyznaczoną wartość należy porównać z otrzymaną wartością graniczną modelu fikolina-1/-2 (0,47).

5.11. Badanie polimorfizmów genów kodujących wybrane receptory Toll-podobne oraz białko adaptorowe TIRAP

Badano wybrane polimorfizmy genów kodujących powierzchniowe receptory Toll-podobne, występujące m.in. na monocytach i makrofagach, komórkach uczestniczących w odpowiedzi na zakażenie Mtb (TLR-2, TLR-1, TLR-6, TLR-4). Analizowano także jeden z SNP genu dla białka adaptorowego TIRAP, oddziałującego z wymienionymi receptorami i umożliwiającego uruchomienie szlaków przekazywania sygnału w komórce.

5.11.1. Badanie polimorfizmu genu *TLR2*, zlokalizowanego w pozycji +2258 (G>A; Arg753Gln; rs5743708)

Polimorfizm ten badano przy zastosowaniu metody PCR-RFLP opisanej przez Schröder i wsp. [359]. Genotypy oznaczono u 417 osób chorych na gruźlicę płuc oraz 214 osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej. Szczegółowe dane, wraz z częstością występowania alleli G i A oraz wynikami analizy statystycznej (wykazano brak istotnych różnic pomiędzy grupami) przedstawiono w tabeli 40.

Tabela 40. Częstość występowania genotypów oraz alleli związanych z polimorfizmem w pozycji +2258 (G>A) genu *TLR2* w grupie pacjentów (TB) i kontrolnej (C).

Grupa	n	Genotypy (%)			χ^2	p*	Allele (%)		OR (95% CI)	p
		G/G	G/A	A/A			G	A		
TB	417	384 (92,1)	32 (7,7)	1 (0,2)	1,96	0,4	800 (95,9)	34 (4,1)	1,61 (0,8- 3,19)	0,2
C	214	203 (94,9)	11 (5,1)	0 (0)			417 (97,4)	11 (2,6)		

* - wartości p, to wynik analizy tabeli 3x2; OR - iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

5.11.2. Badanie polimorfizmu genu *TLR1*, zlokalizowanego w pozycji +1805 (T>G, Ile602Ser; rs5723618)

Badanie wykonano za pomocą metody PCR-RFLP opisanej przez Selvaraja i wsp. [328], u 417 pacjentów oraz 214 osób należących do grupy kontrolnej. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic częstości występowania wariantów polimorficznych genu *TLR1* pomiędzy wymienionymi grupami. Wyniki podsumowano w tabeli 41.

Tabela 41. Częstość występowania genotypów oraz alleli związanych z polimorfizmem w pozycji +1805 (T>G) genu *TLR1* w grupie pacjentów (TB) i kontrolnej (C).

Grupa	n	Genotypy (%)			χ^2	p	Allele (%)		OR (95% CI)	p
		T/T	T/G	G/G			T	G		
TB	417	253 (60,6)	150 (36,0)	14 (3,4)	0,68	0,7	656 (78,7)	178 (21,3)	0,95 (0,72-1,26)	0,7
C	214	129 (60,3)	75 (35,0)	10 (4,7)			333 (77,8)	95 (22,2)		

* - wartości p, to wynik analizy tabeli 3x2; OR - iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

5.11.3. Badanie polimorfizmu genu *TLR6*, zlokalizowanego w pozycji +745 (C>T; Ser249Pro; rs5743810)

Oznaczanie genotypów *TLR6* w pozycji +745 u 417 pacjentów (TB) oraz 210 osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej (C) prowadzono przy użyciu metody PCR-RFLP opisanej przez Selvaraja i wsp. [328]. Analiza otrzymanych wyników wykazała

brak istotnych statystycznie różnic częstości występowania genotypów czy alleli C i T odpowiadających omawianemu polimorfizmowi (tabela 42).

Tabela 42. Częstość występowania genotypów oraz alleli związanych z polimorfizmem w pozycji +745 (C>T) genu *TLR6* w grupie pacjentów (TB) i kontrolnej (C).

Grupa	n	Genotypy (%)			χ^2	p*	Allele (%)		OR (95% CI)	p
		C/C	C/T	T/T			C	T		
TB	417	146 (35,0)	214 (51,3)	57 (13,7)	1,14	0,6	506 (60,7)	328 (39,3)	0,89 (0,7-1,13)	0,3
C	210	68 (32,4)	107 (51,0)	35 (16,6)			243 (57,9)	177 (42,1)		

* - wartości p, to wynik analizy tabeli 3x2; OR-iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

5.11.4. Badanie polimorfizmu genu *TLR4*, zlokalizowanego w pozycji +896 (A>G; Asp299Gly; rs4986790)

Badania prób DNA uzyskanych od 417 pacjentów i 214 osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej, prowadzono za pomocą metody PCR-RFLP zaproponowanej przez Lorenz i wsp. [336]. Szczegółowe dane, wraz z częstością występowania alleli A i G oraz wynikami analizy statystycznej (ponownie nie zaobserwowano istotnych różnic) przedstawiono w tabeli 43.

Tabela 43. Częstość występowania genotypów oraz alleli związanych z polimorfizmem w pozycji +896 (A>G) genu *TLR4* w grupie pacjentów (TB) i kontrolnej (C).

Grupa	n	Genotypy (%)			χ^2	p*	Allele (%)		OR (95% CI)	p
		A/A	A/G	G/G			A	G		
TB	417	367 (88,0)	49 (11,8)	1 (0,2)	3,3	0,2	783 (93,9)	51 (6,1)	0,75 (0,49-1,18)	0,2
C	214	183 (85,5)	28 (13,1)	3 (1,4)			394 (92,1)	34 (7,9)		

*- wartości p, to wynik analizy tabeli 3x2; OR - iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

5.11.5. Badanie polimorfizmu genu *TIRAP*, zlokalizowanego w pozycji +975 (C>T; Ser180Leu; rs8177374)

Badania prowadzono przy użyciu metody PCR-RFLP opisanej przez Selvaraja i wsp. [328]. Analizowano materiał uzyskany od 417 pacjentów, u których rozpoznano gruźlicę (TB) oraz 203 osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej (C). Wykazano brak różnic znaczących statystycznie pomiędzy grupami. Uzyskane wyniki podsumowano w tabeli 44.

Tabela 44. Częstość występowania genotypów oraz alleli związanych z polimorfizmem w pozycji +975 (C>T) genu *TIRAP* w grupie pacjentów (TB) i kontrolnej (C).

Grupa	n	Genotypy (%)			χ^2	p*	Allele (%)		OR (95% CI)	p
		C/C	C/T	T/T			A	G		
TB	417	305 (73,1)	102 (24,5)	10 (2,4)	2,7	0,3	712 (85,4)	122 (14,6)	0,93 (0,67-1,29)	0,7
C	203	142 (70,0)	59 (29,1)	2 (0,9)			343 (84,5)	63 (15,5)		

*- wartości p, to wynik analizy tabeli 3x2; OR - iloraz szans (ang. odds ratio); 95% CI - 95% przedział ufności (ang. confidence interval)

6. Dyskusja

Gruźlica to choroba zakaźna, która towarzyszy człowiekowi od zarania dziejów i nadal stanowi istotny problem epidemiologiczny i medyczny współczesnego świata. Uważa się, że czynnik etiologiczny - prątek gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) spowodował śmierć większej liczby osób niż jakikolwiek inny drobnoustroj. Pomimo szeroko rozwiniętej profilaktyki oraz opracowania metod leczenia nowej generacji, nadal pozostaje ona chorobą wysoce zakaźną. Walka z tą chorobą jest jednym z głównych zadań Światowej Organizacji Zdrowia. Gruźlica wcześnie wykryta i prawidłowo leczona jest uleczalna, jednak, jak wspomniano, z jej powodu umiera ponad milion osób rocznie [2, 363].

Patogeny wykształciły szereg mechanizmów umożliwiających im zasiedlenie organizmu gospodarza i przetrwania w nim. Niezwykle efektywne w unikaniu odporności wrodzonej gospodarza są bytujące wewnątrzkomórkowo prątki gruźlicy. W zakażeniu Mtb, szczególnie ważna jest pierwsza faza odpowiedzi, bezpośrednio po ich wniknięciu do płuc. Od jej przebiegu zależy, czy dojdzie do całkowitej eliminacji patogenu, infekcji latentnej czy rozwoju choroby. Makrofagi, dzięki swoim właściwościom fagocytarnym i ekspresji wielu receptorów na powierzchni oddziałujących z antygenami drobnoustrojów lub zmienionych chorobowo komórek, należą do istotnych czynników odpowiedzialnych za utrzymanie stanu homeostazy w organizmie [26]. Na powierzchni makrofagów występują liczne receptory, do których należą między innymi:

- receptory dla składników dopełniacza CR1, CR3, CR4 (ang. complement receptors),
- receptor mannozowo-fukozyłowy,
- receptory dla fragmentów Fc immunoglobulin,
- receptor dla fibronektyny,
- receptory dla białka surfaktantu płucnego A,
- receptory integrynowe,
- receptory „zmiatacze” (ang. scavenger receptors).

W wyniku interakcji pomiędzy drobnoustrojami i komórkami odpornościowymi dochodzi do aktywacji szeregu szlaków, prowadzących do uwolnienia czynników prozapalnych i chemotaktycznych, takich jak cytokiny, składniki dopełniacza czy białka ostrej fazy, oddziałujących na kolejne komórki żerne. Fagocytoza przebiegać może w sposób bezpośredni, kiedy bakterie są wychwytywane przez receptory

zlokalizowane na powierzchni fagocytów bądź pośredni, gdy bakterie są uprzednio opsonizowane przez takie czynniki jak aktywowane składniki dopełniacza, białko C-reaktywne, kolektyny (MBL, SP-A i SP-D) czy fikoliny.

W prezentowanej pracy podjęto próbę oceny znaczenia wybranych czynników odporności wrodzonej w podatności na zakażenie prątkami *Mycobacterium tuberculosis* i rozwoju gruźlicy płuc. Wśród nich były białka występujące w formie niezwiązanej z komórką (takie jak lektyna wiążąca mannozę, białka surfaktantu płucnego A i D, fikoliny, proteazy serynowe MASP) oraz receptory zlokalizowane na powierzchni komórki (receptory Toll-podobne) i jeden z czynników uczestniczących w przekazywaniu sygnału (białko adaptorowe TIRAP). Grupę chorych stanowili pacjenci, u których rozpoznano na podstawie badań mikrobiologicznych i radiologicznych pierwotną postać choroby. Grupę kontrolną stanowiły osoby, które w wywiadzie nie zgłaszały ciężkich lub nawracających zakażeń, chorób nowotworowych i chorób o podłożu autoimmunizacyjnym. Badano polimorfizmy i/lub mutacje genów kodujących wspomniane czynniki, a w przypadku białek rozpuszczalnych, także ich stężenie i/lub aktywność w surowicy pacjentów oraz osób zdrowych (u części chorych również ich zmiany w czasie leczenia). Na powierzchni komórek Mtb występują struktury będące strukturami docelowymi dla badanych czynników. Lektyna wiążąca mannozę i białka surfaktantu płucnego rozpoznają ManLAM, natomiast fikoliny - ManLAM i kompleks Ag85 [84, 239]. Ligandami prątkowymi dla receptora TLR-2 są: lipoproteina o masie 19 kDa, LAM, LM, PIM, diacylowane (kompleks TLR-2/TLR-6) i triacylowane (kompleks TLR-2/TLR-1) lipopeptydy, natomiast TLR-4 rozpoznaje białka szoku cieplnego HSP 60/65 oraz antygen prątków o masie 38 kDa [17].

O istotnym znaczeniu MBL w odpowiedzi na różnorodne zakażenia, świadczą liczne prace, w których wykazano związek pomiędzy jej niedoborem i nawracającymi infekcjami bakteryjnymi, wirusowymi czy grzybiczymi [83, 364-366]. Białko to rozpoznaje szereg wzorców molekularnych związanych z patogenami, opsonizując niektóre drobnoustroje przyczynia się do nasilenia fagocytozy (m.in. *M. tuberculosis* [39]), a dzięki tworzeniu kompleksów z MASP jest jednym z czynników inicjujących aktywację układu dopełniacza na drodze lektynowej. Znane, niekiedy bardzo znaczne różnice osobnicze stężenia MBL w surowicy (zakres od poziomu niewykrywalnego do ponad 10 µg/ml) są w pewnym stopniu wynikiem polimorfizmów zlokalizowanych w regionie promotorowym i eksonie 1 genu *MBL2* [73]. Często jednak, wyraźne różnice obserwuje się wśród osób o tym samym genotypie [79], co może wskazywać na wpływ

innych polimorfizmów lub regulacji epigenetycznej ekspresji genu *MBL2* [367]. W prezentowanej pracy, jak wspomniano, oceniano stężenia MBL w surowicy i częstość występowania wybranych wariantów polimorficznych *MBL2* u pacjentów chorych na gruźlicę płuc oraz osób zdrowych. Należy podkreślić, że znaczenie lektyny wiążącej mannozę w podatności na zakażenie *Mtb*, jego rozwój i przebieg ciągle pozostaje kontrowersyjne: publikowane dane są rozbieżne, co może wynikać z różnej liczebności grup badanych, różnic etnicznych czy odmiennych protokołów badań (np. określania tylko stężenia MBL w surowicy/osoczu lub genotypu). Badając populację polską, Bonar i wsp. wykazali, iż stężenia MBL w surowicy dorosłych pacjentów chorych na gruźlicę były znacząco wyższe w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla osób z rozpoznaniem innych chorób płuc oraz zdrowych [368]. Zbieżne wyniki przedstawili Garcia-Gasalla i wsp. (badania w regionie Morza Śródziemnego) [369, 370], Alagarasu i wsp. (w Indiach) [371] oraz Chalmers i wsp. (Wielka Brytania) [372]. Podobnie, wyższe niż u przedstawicieli odpowiedniej wiekowo grupy kontrolnej stężenia MBL zaobserwowano u dzieci chorych na gruźlicę. Wynik ten odzwierciedlał niższą częstość występowania allelu B genu *MBL2*, związanych z niskim poziomem tej lektyny u chorych, w porównaniu z grupą dzieci zdrowych [373].

Dane przedstawione w niniejszej rozprawie są spójne z omówionymi wyżej: mediana stężenia MBL w grupie pacjentów chorych na gruźlicę była istotnie wyższa od wartości uzyskanej dla grupy kontrolnej. Znaczące różnice notowano bez względu na wiek i płeć badanych osób. U prawie 40% pacjentów obserwowano stężenia wyższe niż wartość odpowiadająca 90. centylowi wyznaczonemu dla grupy odniesienia [gdzie tak wysokie stężenia MBL w surowicy stwierdzono tylko u 9,6% przedstawicieli ($p < 0,0001$)]. Znaczące różnice (przy zgodnej z oczekiwaniem, wysokiej korelacji z poziomem lektyny wiążącej mannozę) wykazano także w przypadku aktywności kompleksów MBL z proteazami serynowymi MASP-1 oraz MASP-2 (ponownie przy braku związku z wiekiem czy płcią).

Cosar i wsp. badając polimorfizmy genu *MBL2* zlokalizowane w eksonie 1, zaobserwowali znacząco niższą częstość występowania genotypów A/B oraz B/B (związanych z niskim stężeniem w surowicy i aktywnością MBL lub jej pierwotnym niedoborem) wśród dzieci chorych na gruźlicę niż wśród dzieci zdrowych [373]. Podobne wyniki uzyskali Soborg i wsp., którzy zasugerowali efekt ochronny allelu B u dorosłych mieszkańców Danii [374] oraz Hoal-Van Helden i wsp. w populacji południowoafrykańskiej [375]. Uwagę zwracają prace opublikowane przez Singla i

wsp. [376], w których potwierdzono wspomniane obserwacje w przypadku kobiet, lecz nie mężczyzn.

Z drugiej strony, szereg publikacji wskazuje na wysoką podatność na zakażenie *M. tuberculosis* i rozwój gruźlicy u osób będących nosicielami alleli typu O, które mają związek z niższym stężeniem MBL w surowicy. Capparelli i wsp. zaobserwowali obniżoną aktywność bójczą surowicy pozbawionej MBL w stosunku do prątków *M. tuberculosis*, sugerując, że niedobór tej lektyny może nasilać ryzyko infekcji. Autorzy ci, badając populację włoską, zanotowali istotnie częstsze występowanie genotypu związanego z niskim stężeniem tej lektyny w surowicy - LYB/LYD u osób, u których rozpoznano gruźlicę płuc, natomiast genotypy odpowiedzialne za wysokie stężenie MBL (HYA/HYA) znacząco częściej występowały u osób zdrowych [377]. Podobnie, Selvaraj i wsp. zaobserwowali u mieszkańców Indii wyższą częstość występowania homo-/heterozygot O/O (pod względem alleli B, C jak i D) u osób chorych na gruźlicę, w porównaniu z osobami zakwalifikowanymi do grupy kontrolnej [378]. Liu i wsp., badając populację chińską, zanotowali, że haplotyp XA/B (związany z niskim stężeniem MBL w surowicy – LXA/O) występował istotnie częściej u pacjentów chorych na gruźlicę płuc [379]. Również Alagarasu i wsp. przedstawili wyniki sugerujące zależność pomiędzy niskim stężeniem MBL oraz genotypami O/O (zwłaszcza odpowiadającymi SNP zlokalizowanemu w kodonie 57) i podwyższonym ryzykiem rozwoju choroby [371]. Ponadto, ponownie Liu i wsp. oraz Shi i wsp. (badania przedstawicieli populacji chińskiej) zaobserwowali, że allel B (haplotyp LYPB) i związane z nim niskie stężenie MBL w surowicy, sprzyja zachorowaniu na gruźlicę [377, 380, 381]. Wietnamscy autorzy wskazali na protekcyjne działanie MBL: jej wysokie stężenie w surowicy chroniło przed rozwojem aktywnej postaci choroby [382].

Przedstawione w rozprawie dane wskazują na brak istotnych statystycznie różnic częstości występowania genotypów związanych z niskim stężeniem MBL czy alleli O, odpowiadającym SNP zlokalizowanym w eksonie 1 genu *MBL2* pomiędzy grupą chorych i grupą odniesienia (tabela 13). Z drugiej strony, zaobserwowano, że warianty YA/YA, odpowiadające wysokim stężeniom MBL w surowicy, częściej obserwowano wśród osób zdrowych, niż wśród pacjentów, jednak różnica nie przekroczyła progu istotności statystycznej (odpowiednio: 37% vs 31%, $p=0,08$). Ponieważ, jak wspomniano, mediana stężeń lektyny wiążącej mannozę była znacząco niższa w grupie kontrolnej, można przypuszczać, że na poziom MBL u chorych, decydujący wpływ

mają czynniki inne niż analizowane warianty polimorficzne regionu promotorowego i eksonu 1.

Brak związku między określonymi haplotypami *MBL2* i zachorowalnością na gruźlicę postulują także autorzy brytyjscy [372]. Również Solgun i wsp. nie zaobserwowali związku nosicielstwa alleli B i C omawianego genu z ryzykiem zachorowania tureckich dzieci na gruźlicę [383].

Zaprezentowane w pracy wyniki sugerują protekcyjny wpływ stosunkowo niskich stężeń MBL przed rozwojem gruźlicy płuc, jednak z drugiej strony, wysoki poziom tego białka może świadczyć o toczącym się w organizmie stanie zapalnym. Wysoka częstość występowania stężeń >2399 ng/ml w surowicy pacjentów może wynikać z faktu, iż próby pobierane były bezpośrednio po rozpoznaniu (potwierdzeniu) gruźlicy, a więc przypuszczalnie w początkowej fazie choroby, kiedy następuje ogólny wzrost poziomu białek ostrej fazy w krwiobiegu. Traktując MBL jako taki właśnie czynnik [384], zjawiskiem oczekiwanym jest podwyższenie jej stężenia w surowicy. Tak, więc obserwowana różnica między grupami może oznaczać, że wysokie stężenie tej lektyny u chorych jest raczej skutkiem aktywnego zakażenia niż jednym z czynników sprzyjających jego rozwojowi. Wyjaśnienia wymaga obserwacja wskazująca na istotny statystycznie wzrost poziomu MBL po podjęciu terapii. Należy traktować ją, jako wynik wstępny (uzyskany po badaniu stosunkowo niewielkiej liczby prób), sugerujący kierunek dalszych prac. Podobne, choć dotyczące chorób o odmiennej etiologii i sposobach leczenia, zjawisko, zanotowano ostatnio w Pracowni Immunobiologii Zakażeń IBM PAN. Wykazano, że u osób chorych na szpiczaka mnogiego czy różne typy chłoniaków, poddawanych agresywnej chemioterapii, a następnie przeszczepieniu autologicznych komórek krwiotwórczych, stężenie MBL w surowicy wzrasta systematycznie, w stosunku do wartości oznaczonej przed rozpoczęciem leczenia. Wysoki poziom tej lektyny związany był ze stosunkowo wysokim ryzykiem zakażeń szpitalnych oraz dłuższym czasem trwania gorączki z neutropenią [91].

Jak wspomniano wcześniej, dane literaturowe na temat związku występowania poszczególnych wariantów polimorficznych genu *MBL2* z podatnością na zakażenie *Mtb* i ryzykiem rozwoju gruźlicy nie są spójne. Dostępne wyniki metaanaliz wskazują, że rozbieżności te wynikają w dużej mierze z różnic etnicznych. Denholm i wsp. w swojej metaanalizie dowodzą, że u pacjentów chorych na gruźlicę stężenie MBL jest znacząco wyższe w porównaniu z odpowiednimi grupami odniesienia, przy jednoczesnym braku różnic w częstości występowania genotypów [385]. W oparciu o

badania przeprowadzone w populacjach kaukaskiej, afrykańskiej i azjatyckiej, Wu i wsp. wskazali na istotny związek pomiędzy podatnością na rozwój gruźlicy a częstością występowania wariantów polimorficznych w eksonie 1 genu *MBL2* [386]. Na podstawie przeprowadzonych analiz, postulują oni, że nosicielstwo alleli typu O zwiększa ryzyko infekcji, zwłaszcza w populacji azjatyckiej. Wniosek ten potwierdza wyniki niektórych wcześniejszych badań, prezentowanych między innymi przez Cao i wsp. [387]. Również Tong X. i wsp. w swojej metaanalizie zaobserwowali, że niskie stężenie MBL oraz obecność alleli D i B (w kodonach 54 i 52) zwiększają ryzyko zachorowania na gruźlicę. Z drugiej strony z ich badań wynika, że obecność allelu C związanego z innym polimorfizmem eksonu 1 (kodon 57), może mieć protekcyjny efekt przed zakażeniem *Mtb* w populacji chińskiej [388]. Także metaanaliza przeprowadzona przez Mandala i wsp., sugeruje podwójną rolę polimorfizmów genu *MBL2* w gruźlicy. Po przeanalizowaniu 14 oryginalnych prac, autorzy ci zaobserwowali, że występowanie allelu C (rs1800451) zwiększa, natomiast allelu D (rs5030737) obniża ryzyko rozwoju aktywnej postaci choroby [389]. Z uwagi na fakt, iż dystrybucja alleli oraz częstość występowania genotypów *MBL2* różnią się pomiędzy grupami etnicznymi, dostępne dane literaturowe nie prowadzą do jednoznacznych wniosków dotyczących znaczenia MBL w patogenezie gruźlicy [390].

Interesującą próbę wyjaśnienia udziału MBL w przebiegu zakażenia prątkami *M. tuberculosis* podjęli Soborg i wsp. [371]. Na podstawie wyników badań mieszkańców Danii, zaproponowali trzy możliwe warianty zaangażowania lektyny wiążącej mannozę w odpowiedź na zakażenie *Mtb*. Wysoki poziom tego białka w krążeniu może przyczyniać się do nasilenia fagocytozy prątków opłaszczonych aktywowanymi składnikami układu dopełniacza (za pośrednictwem odpowiednich receptorów na powierzchni makrofagów). Z drugiej strony, całkowity niedobór MBL powoduje, iż prątki są bezpośrednio pochłaniane przez komórki fagocytujące, przy udziale receptorów mannozowych. Według autorów, najkorzystniejsze dla organizmu gospodarza jest niskie stężenie, (lecz nie niedobór) tej kolektyny (związane z genotypami A/O), gdyż nie sprzyja ono nadmiernej aktywacji dopełniacza i jednocześnie, w pewnym stopniu, hamuje pochłanianie prątków, zapobiegając ich rozpoznaniu przez receptory mannozowe [374].

W rozdziale 5.3.3. zaprezentowano wyniki dotyczące częstości występowania wariantów polimorficznych w pozycji +359 (A>G) genu *MASP2*. Genotyp G/G związany jest z niedoborem proteazy serynowej MASP-2 oraz nieenzymatycznego

białka MAp19 [288]. Pierwsze udokumentowane przypadki takiego pierwotnego niedoboru związane były z wysoką podatnością na ciężkie i/lub nawracające zakażenia [83, 281]. Później jednak, opisano kilka homozygot G/G, u których takich infekcji nie notowano [87, 391-393]. W omawianych w rozprawie badaniach własnych, częstość występowania allelu G wśród osób, u których rozpoznano gruźlicę płuc i osób zakwalifikowanych do grupy odniesienia nie różniły się znacząco. W grupie pacjentów odnotowano dwie homozygoty G/G, podczas gdy w grupie kontrolnej - jedną (dane opublikowane [286]). Zgodnie z oczekiwaniem, odpowiednie próby surowicy nie wykazywały zdolności aktywowania składnika C4 na drodze zależnej od kompleksów MBL-MASP-2. Obserwowano niewielkie różnice aktywności tych kompleksów pomiędzy nosicielami genotypów A/A i A/G, jednak nie przekroczyły one progu istotności statystycznej. Tak więc, jak wykazały również wcześniejsze badania prowadzone w Pracowni Immunobiologii Zakażeń IBM PAN [355] ilość aktywnego enzymu u heterozygot jest wystarczająca do zainicjowania kaskady dopełniacza. W głównej mierze o aktywności kompleksu MBL-MASP-2 decyduje, zatem przede wszystkim genotyp *MBL2*.

Chalmers i wsp. również nie zanotowali znaczących różnic częstości występowania wariantów polimorficznych +359 A>G pomiędzy grupą chorych i grupą odniesienia [372]. Związek między zwiększonym ryzykiem zachorowania na gruźlicę i częstością występowania dwóch innych polimorfizmów genu *MASP2*, (rs2273346 oraz rs6695096) zaobserwowali natomiast Chen i wsp. [394].

Białka SP-A i SP-D są kolektynami, które nie mają zdolności inicjowania aktywacji dopełniacza. Jak wspomniano wcześniej, rozpoznają one *M. tuberculosis* [228, 395]. W przedstawionej pracy wykazano, że stężenia SP-D w surowicy pacjentów chorych na gruźlicę są znacząco wyższe niż u przedstawicieli grupy kontrolnej. Obserwowane różnice były niezależne od płci i wieku badanych osób. Uzyskane wyniki są zgodne z dostępnymi danymi literaturowymi. Kondo i wsp. zanotowali znacząco wyższe stężenia SP-D u osób chorych na gruźlicę oraz ich korelację ze stopniem zaawansowania choroby (informacje pochodzą z dostępnego w języku angielskim streszczenia artykułu) [396]. Wyższy niż wśród przedstawicieli grupy kontrolnej, przeciętny poziom tego białka oznaczono również u pacjentów, u których rozpoznano zapalenie płuc i przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP) [140, 142]. W związku z powyższym, można przypuszczać, że tak jak w przypadku typowych białek ostrej fazy, stężenie SP-D wzrasta w odpowiedzi na zakażenie, co związane jest z procesem zapalnym.

Enomoto i wsp. zaobserwowali, że jej poziom (jak również takich markerów zapalenia jak białko C-reaktywne) ulegał znaczącemu obniżeniu w trakcie leczenia [397]. Przedstawione w rozdziale nr 5.5.4. wyniki nie potwierdziły jednak istotnej zmiany stężenia SP-D po zastosowaniu antybiotykoterapii. Należy jednak uwzględnić, że zbadano stosunkowo niewielką liczbę prób i możliwe było porównanie danych dotyczących tylko dwóch punktów czasowych.

W celu zbadania znaczenia omawianej kolektyny w zakażeniach *Mtb* skutkujących rozwojem gruźlicy płuc badano także trzy polimorfizmy genu *SFTPD*, kodującego to białko, wybrane na podstawie dostępnych danych literaturowych [112, 134]. Są one związane z zamianą reszt aminokwasów w różnych fragmentach cząsteczki: regionie N-końcowym (+32 T>C, Met11Thr), kolagenowym (+478 G>A, Ala160Thr) oraz regionie CRD (+868 T>A, Ser270Thr). Nie zanotowano znaczących różnic częstości występowania analizowanych genotypów czy alleli pomiędzy badanymi grupami. Wcześniej, Floros i wsp. zasugerowali, że allel C w pozycji +32 może być związany z wyższą podatnością na zakażenie prątkami i rozwój gruźlicy [112]. Jednak do przeciwnych wniosków doszli Hsieh i wsp., którzy zaobserwowali z kolei związek pomiędzy występowaniem wariantu T a ryzykiem zachorowania na gruźlicę [398].

Znacząca różnica median stężeń pomiędzy badanymi grupami, wskazywać również może na wpływ innych polimorfizmów genu *SFTPD* na poziom ekspresji SP-D.

Zaobserwowano, że allele C i A (odpowiednio w pozycjach +32 oraz +478) odpowiadają niższym stężeniom SP-D, zarówno w grupie badanej (TB), jak i kontrolnej (C). U homozygot C/C oraz A/A, mediany stężenia tego białka były znacząco niższe w porównaniu, odpowiednio, z homozygotami T/T oraz G/G. Podobne wyniki przedstawiające wpływ polimorfizmu w pozycji +32 T>C na stężenie SP-D w surowicy zostały przedstawione przez Leth-Larsen i wsp. [133]. W odróżnieniu od wcześniejszego doniesienia Shakoori i wsp. [140], nie zanotowano jednak istotnego wpływu polimorfizmu +868 T>A na poziom omawianej kolektyny. Należy jednak podkreślić, że żadna z badanych osób nie była homozygotą A/A.

W przypadku polimorfizmów genów *SFTPA1* oraz *SFTPA2* i wpływu ich określonych wariantów na podatność na zakażenie *Mtb*, Malik i wsp. badając populację afrykańską (mieszkańcy Etiopii) wykazali, że allele A i T (SNP odpowiednio w pozycjach +307 G>A oraz +655 C>T genu *SFTPA1*) oraz C (SNP w pozycjach +271 G>C +667 C/A genu *SFTPA2*) są związane z podwyższonym ryzykiem zachorowania na gruźlicę

[122]. Floros i wsp. zaobserwowali także częstsze występowanie alleli G (+148 G>C) i T (+665 C>T) genu dla SP-A1 u pacjentów meksykańskich, w porównaniu z odpowiednio dobraną grupą kontrolną [112]. Madan i wsp. sugerują, że występowanie allelu C w pozycji +271 G>C genu *SFTPA2* wiąże się z wyższą zachorowalnością na gruźlicę w populacji indyjskiej [399], natomiast Yang i wsp. badając populację chińską, zaobserwowali znacząco częstsze występowanie wariantu G u osób chorych [400]. Analiza wyników badań wybranych SNP genów kodujących białka surfaktantu płucnego SP-A1 oraz SP-A2 przedstawionych w niniejszej pracy, wykazała istotne różnice pomiędzy grupami TB i C, jedynie w przypadku polimorfizmów +26 C>A oraz +667 C>A genu *SFTPA2*. Genotyp A/A w obu pozycjach występował znacząco rzadziej w grupie pacjentów, w porównaniu z grupą odniesienia [odpowiednio +26: p=0,01; OR=0,5, 95% CI (0,31-0,83) oraz +667: p=0,03; OR=0,51, 95% CI (0,28-0,94)], co w pewnym stopniu potwierdza wyniki przedstawione przez Malik i wsp. [122]. W przypadku pozostałych polimorfizmów genu *SFTPA1* (+56T>C; +148 G>C; +655 C>T) oraz genu *SFTPA2* (+271 G>C) nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy porównywanymi grupami.

Jak wspomniano, fikoliny stanowią grupę czynników odporności, które pod względem struktury i aktywności przypominają kolektyny. Należą do niej fikolina-1, -2 oraz -3, posiadające właściwości opsonizacyjne oraz zdolność aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej. W doniesieniu opublikowanym przez Lei i wsp. opisano znacząco niższy poziom ekspresji fikoliny-1 w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cell, PBMC) osób chorych na gruźlicę, zarówno na poziomie mRNA jak i na poziomie białka, w porównaniu z komórkami uzyskanymi z krwi osób należących do grupy kontrolnej [401]. W przedstawionej pracy oceniano stężenia tego białka w surowicy. Mediana uzyskana dla grupy pacjentów była znacząco wyższa, w porównaniu z wartością wyznaczoną w grupie porównawczej, bez względu na wiek badanych osób. Mogło to być wynikiem toczącego się stanu zapalnego, chociaż w próbach surowicy pobranych od pacjentów po podjęciu leczenia przeciwgruźliczego nie obserwowano obniżenia stężenia fikoliny-1.

Poddając otrzymane wyniki analizie krzywej ROC, zaobserwowano, że fikolina-1 charakteryzuje się stosunkowo silnym potencjałem różnicującym osoby chore, w szczególności mężczyźni na gruźlicę od osób zdrowych (AUC=0,81), co może czynić ją pomocniczym markerem diagnostycznym. W prezentowanej pracy badano dwa polimorfizmy genu *FCNI* zlokalizowane w regionie promotorowym, w pozycjach -542

G>A oraz -144 C>A, które według doniesień literaturowych mają wpływ na stężenie tej fikoliny w surowicy [166]. Zaobserwowano, że częstość genotypów G/G w pozycji -542 oraz C/C w pozycji -144 jest znacząco wyższa (odpowiednio $p=0,04$ oraz $p=0,02$) u chorych w porównaniu do osób z grupy odniesienia. Nie zaobserwowano jednakże istotnej statystycznie zależności pomiędzy wariantami polimorficznymi i poziomem fikoliny-1 w surowicy (rozdział 5.7.3).

Fikolina-2, podobnie jak MBL syntezowana jest w głównie w wątrobie. Białko to wiąże się do powierzchni *M. tuberculosis* H₃₇Rv, a jako mykobakteryjny ligand dla fikoliny-2 wskazuje się kompleks antygenów Ag85 [84]. W cytowanej pracy nie obserwowano natomiast oddziaływania tego białka z ManLAM, co wcześniej sugerowali Luo i wsp. [239]. Mogło to wynikać z faktu, że użyty w doświadczeniach przeprowadzonych przez Świerzko i wsp. lipoarabinomannan, pochodził ze szczepu *M. tuberculosis* Aoyama B, natomiast Luo i wsp. wykazali wiązanie fikoliny-2 do ManLAM na powierzchni szczepu Mtb H₃₇Rv. Zaobserwowali oni ponadto w badaniach *in vitro*, że związana z powierzchnią prątków fikolina-2 hamuje rozwój zakażenia komórek linii A549 (ludzka linia komórkowa nowotworu płuc). W badaniach *in vivo*, stwierdzono natomiast, że myszy pozbawione genu kodującego fikolinę A, będącą odpowiednikiem ludzkiej fikoliny-2, są znacznie bardziej podatne na zakażenie prątkami H₃₇Rv [239]. Ci sami autorzy oznaczyli znacząco wyższe stężenia fikoliny-2 w surowicy osób zdrowych w porównaniu z pacjentami chorującymi na gruźlicę (badając populację chińską) [239]. Do odwrotnych wniosków doszli Wang i wsp. badając mieszkańców tego kraju. Zaobserwowali oni znacząco wyższe stężenia fikoliny-2 u chorych, w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto, zauważyli, że w ciągu dwóch miesięcy po podjęciu leczenia poziom omawianego białka w surowicy pacjentów ulega istotnemu obniżeniu [402].

Brak istotnych statystycznie różnic stężeń fikoliny-2 pomiędzy grupami osób zdrowych i chorych zaobserwowano badając populację brytyjską. Chalmers i wsp. zanotowali jednak, że niski poziom tego białka (<1200 ng/ml) oznaczany jest nieco (nieistotnie) częściej u pacjentów [372]. Również Lei i wsp. badając ekspresję genu *FCN2* w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej nie stwierdzili różnic jej poziomu pomiędzy osobami chorymi na gruźlicę i zdrowymi [401]. Wyniki przedstawione w rozprawie pozostają w zgodzie z doniesieniami Luo i wsp. [239]. Stężenia fikoliny-2 w próbach surowicy uzyskanych od pacjentów, u których rozpoznano gruźlicę były znacząco niższe niż w próbach pobieranych od osób zaliczonych do grupy kontrolnej, co może sugerować efekt ochronny tego czynnika przed rozwojem aktywnego

zakażenia *Mtb* lub jego konsumpcję w wyniku odpowiedzi na infekcję. Również w przypadku tego białka, analiza krzywej ROC wykazała, że oznaczenie jego poziomu w surowicy ma stosunkowo silny potencjał różnicujący osoby chore od zdrowych. Niskie wartości (<1500 ng/ml) znacząco częściej obserwowano u osób, u których rozpoznano gruźlicę. Pozwala to sugerować możliwość wykorzystania omawianego czynnika odporności jako markera pomocniczego w badaniach w kierunku gruźlicy płuc. Wartość AUC dla fikoliny-2 wynosiła 0,82, natomiast w analizie dwuczynnikowej (po dołączeniu danych dla opisanej wcześniej fikoliny-1) – 0,88 (tabela 39).

W przedstawionej pracy oceniano również częstość występowania wariantów polimorficznych genu *FCN2*, które według danych literaturowych mają znaczący wpływ na stężenie fikoliny-2 w surowicy. Wybrano SNP zlokalizowane w regionie promotorowym w pozycjach -64 (A>C) oraz -4 (A>G). Allel C (pierwszy z wspomnianych polimorfizmów) związany jest z niskim, podczas gdy allel G (w pozycji -4) - z wysokim stężeniem białka. W przedstawionej pracy zaobserwowano w obu badanych grupach znacząco niższy poziom fikoliny-2 u heterozygot A/C w porównaniu nosicielami genotypu A/A (pozycja -64). Nie zanotowano natomiast znaczącego wpływu występowania allelu G w pozycji -4 na stężenie białka w badanych próbach surowicy, jednak należy podkreślić, że w grupie pacjentów znacznie rzadziej, w porównaniu z grupą kontrolną, obserwowano genotyp A/G [$p=0,01$; OR=0,51, 95% CI (0,32-0,85), tabela 34], co może sugerować protekcyjny efekt występowania allelu G. Niższa częstość wariantu A/G mogła mieć związek z niższą medianą stężenia fikoliny-2 uzyskaną w przypadku chorych na gruźlicę płuc. Nie można także wykluczyć wpływu innych, niebadanych polimorfizmów genu *FCN2* lub czynników pozagenetycznych na poziom omawianego białka w surowicy. Wcześniej Xu i wsp. wykazali niższą częstość występowania wariantów związanych z niższą ekspresją fikoliny-2 (C/C oraz T/T, odpowiednio dla polimorfizmów: -64 A>C i +6424 G>T) u pacjentów w porównaniu z grupą odniesienia [403].

Stężenie fikoliny-3 w surowicy ludzkiej jest najwyższe wśród czynników rozpoznania charakterystycznych dla aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej [78] Bartłomiejczyk i wsp. wykazali, że białko to aglutynuje komórki *Mtb* szczepu H₃₇Rv, co nasila ich fagocytozę przez makrofagi [39]. Wyniki zamieszczone w rozprawie, wskazują, że mediany stężeń fikoliny-3 w surowicy nie różnią się znacząco pomiędzy badanymi grupami. Należy jednak zauważyć, że analiza przeprowadzona po ich podziale ze względu na płeć wykazała, że przeciętny poziom badanego białka u

zdrowych mężczyzn był istotnie wyższy niż u chorych. Różnicy takiej nie obserwowano u kobiet. Ponadto, stężenia fikoliny-3 okazały się znamienne wyższe u osób z grupy odniesienia, które nie ukończyły 40 lat w porównaniu z pacjentami z tej samej grupy wiekowej, podczas gdy w przypadku osób starszych nie zaobserwowano znaczących różnic. W związku z powyższym, nie można jednoznacznie wykluczyć udziału fikoliny-3 w odpowiedzi na zakażenie *Mtb*. Wcześniej, Chalmers i wsp. wykazali brak znaczącej różnicy pomiędzy medianą stężeń tego czynnika w grupie chorych na gruźlicę i grupie kontrolnej. Autorzy ci nie analizowali jednak wyników w zależności od płci i wieku [372]. Lei i wsp. zaobserwowali, że poziom ekspresji genu *FCN3* w PBMC otrzymywanych od pacjentów i osób zdrowych nie różni się istotnie, w odróżnieniu od genu dla fikoliny-1 (*FCN1*) [401]. U żadnego z badanych pacjentów i przedstawicieli grupy kontrolnej nie stwierdzono pierwotnego niedoboru fikoliny-3, związanego z delecją nukleotydu w pozycji +1637 obu alleli genu *FCN3*. Dane literaturowe (włączając publikacje opracowane na podstawie badań prowadzonych w Pracowni Immunobiologii Zakażeń IBM PAN) świadczą, że takie zaburzenie odporności występuje z niską częstością [221]. U heterozygot C/- obserwowano znacząco niższe stężenia fikoliny-3 w surowicy niż u homozygot C/C, co potwierdza wcześniejsze doniesienia [217, 218]. Mimo, że jak wspomniano wyżej, stężenie fikoliny-3 w surowicy jest wysokie w porównaniu z innymi fikolinami i kolektynami, jej znaczenie w odporności przeciwzakaźnej nie zostało precyzyjnie określone. Ostatnio sugeruje się, że jej podstawową rolą nie jest ochrona przed infekcjami, których czynnikami etiologicznymi są patogeny obligatoryjne. Wśród rozpoznawanych przez fikolinę-3 drobnoustrojów są natomiast patogeny fakultatywne, jak np. *Hafnia alvei*, wchodząca w skład naturalnej mikroflory człowieka, dlatego aktywność przeciwdrobnoustrojowa tego białka może polegać przede wszystkim na kontroli mikroorganizmów bytujących w organizmie w warunkach fizjologicznych [208]. Na podstawie analizy opisanych w literaturze przypadków niedoboru fikoliny-3, Troldborg i wsp. [226] zasugerowali ponadto, że mutacja obu alleli genu *FCN3* w pozycji +1637 stanowi czynnik ryzyka rozwoju układowego tocznia rumieniowatego.

W przedstawionych w rozprawie badaniach określono również częstość występowania wariantów związanych z wybranymi polimorfizmami genów kodujących receptory Toll-podobne, zaangażowane w odpowiedź odpornościową na zakażenie prątkami gruźlicy (TLR-1, -2, -6, -4) oraz białko adaptorowe TIRAP, uczestniczące w transdukcji sygnału, skutkującej aktywacją czynników transkrypcyjnych. Receptor

TLR-2, którego ekspresja w komórkach epitelialnych w drogach oddechowych jest obfita, pełni kluczową rolę w odporności na zakażenie wieloma drobnoustrojami. W przedstawionej pracy badano polimorfizm genu *TLR2* w pozycji +2258 (G>A; Arg753Glu; rs5743708). Lorentz i wsp. jako pierwsi zaobserwowali, że występowanie tego polimorfizmu związane jest z upośledzonym rozpoznawaniem peptydów bakteryjnych [336]. Istnieje szereg artykułów sugerujących związek pomiędzy występowaniem wariantu A i podwyższoną podatnością na gruźlicę. Ogus i wsp. wykazali, iż zamiana reszty argininy na glutaminę znacząco zwiększa ryzyko zachorowania na gruźlicę, w populacji tureckiej. Było ono sześciokrotnie wyższe u homozygot A/A, w porównaniu z homozygotami G/G [404]. Dalgic i wsp. badając tę samą populację, zaobserwowali istotną różnicę częstości występowania allelu A: u osób z latentną postacią gruźlicy wariant ten występował znacząco częściej niż u osób zdrowych [405]. W populacji afrykańskiej, wśród chorych istotnie częściej obserwowano genotyp G/A [406]. Również wśród mieszkańców Iranu, wariant A występował częściej u pacjentów, niż u przedstawicieli grupy odniesienia (odpowiednio: 30% i 10%) [407]. Wyniki metaanalizy 23 oryginalnych prac dotyczących związku pomiędzy występowaniem polimorfizmu +2258 G>A i podatnością na gruźlicę, przeprowadzonej przez Hu i wsp. potwierdziły, że ryzyko zachorowania na gruźlicę jest wyższe u nosicieli wariantu A. Zależność ta dotyczyła osób z postacią płucną choroby [408].

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki nie potwierdzają związku pomiędzy badanym SNP i podatnością na gruźlicę w populacji polskiej. Częstości występowania analizowanych genotypów *TLR2* nie różniły się istotnie pomiędzy porównywanymi grupami. Do podobnych wniosków prowadzą dane opublikowane przez Selvaraja i wsp. [328], Biswasa i wsp. [409], Mittal i wsp. [410] (badania mieszkańców Indii) oraz Sanchez i wsp. [411] (Kolumbia). Polimorfizm ten nie wpływa również znacząco na ekspresję receptora na powierzchni monocytów, co zostało zaobserwowane przez Strapagiela i wsp. [412].

Jak wspomniano, receptor TLR-2 tworzy heterodimery z innymi białkami tej rodziny, TLR-1 oraz TLR-6, co umożliwia np. rozpoznanie triacylowanych i diacylowanych lipopeptydów mykobakterii. Występowanie wariantu G, związanego z polimorfizmem w pozycji +1805 T>G (Ile602Ser; rs5743618) genu *TLR1*, powoduje zaburzenia zakotwiczenia kodowanego przez niego receptora w błonie komórkowej. Na powierzchni monocytów nosicieli genotypu G/G TLR-1 nie ulega ekspresji, co skutkuje

brakiem rozpoznania triacylowanych lipopeptydów i uwalnianiem znacznie mniejszych ilości cytokin prozapalnych po stymulacji [331]. Potwierdzają to wyniki badań Hawna i wsp., którzy zaobserwowali, że zarówno u heterozygot, jak i u homozygot G/G, aktywacja czynnika transkrypcji NF- κ B po stymulacji lizatami komórkowymi mykobakterii, była w znacznym stopniu upośledzona [332]. Uciechowski i wsp. opisali związek allelu G i genotypu G/G z zapadalnością na gruźlicę w populacji niemieckiej [331]. Wyższą częstość występowania wariantu G u chorych, niż u osób kwalifikowanych do odpowiednich wiekowo grup odniesienia zanotowano także w populacjach: hiszpańskiej i afroamerykańskiej (dorośli) [413, 414] oraz chińskiej (dzieci) [415]. Barletta-Naveca i wsp. zasugerowali ponadto związek pomiędzy występowaniem allelu G u osób nadużywających alkoholu i zwiększonym ryzykiem zachorowania na gruźlicę [416]. Z drugiej strony, aktywacja receptora TLR-2, występującego w kompleksach z TLR-1, przez antygeny *M. tuberculosis*, prowadzi do uniewrażliwienia makrofagów na INF- γ i osłabia ich właściwości bójcze [330]. Zatem zaburzenia ekspresji receptora TLR-1 w wyniku występowania wariantu G, podczas zakażenia patogenami wewnątrzkomórkowymi mogą mieć efekt ochronny, co zostało opisane w przypadku infekcji innymi prątkami, *Mycobacterium leprae*. Występowanie allelu G znacząco rzadziej obserwowano u osób chorych na trąd, w porównaniu z osobami zakwalifikowanymi do grupy odniesienia [330, 417]. Natomiast brak związku pomiędzy zachorowalnością na gruźlicę a częstością występowania genotypów i alleli związanych z polimorfizmem w pozycji +1805 genu *TLR1*, zaobserwowano badając mieszkańców Ghany [331] oraz Indii [328, 418]. Także dane zamieszczone w przedstawionej pracy sugerują brak związku pomiędzy badanym polimorfizmem i podatnością na gruźlicę wywołaną przez Mtb w populacji polskiej. Wpływ innego polimorfizmu genu *TLR1* w pozycji +742 (A>G) na zachorowalność na gruźlicę opisali Dittrich i wsp [419]. Zaobserwowali oni, że allel A istotnie rzadziej występował u osób chorych w porównaniu z osobami należącymi do grupy kontrolnej. Wykazali oni również, że zarówno jednojądrzaste komórki krwi obwodowej nosiciele allelu A, jak również komórki linii HEK293 transfekowane tym wariantem genu, silniej odpowiadają na stymulację lizatami Mtb.

Receptor TLR-6, wraz z TLR-2 uczestniczy w rozpoznawaniu diacylowanych lipopeptydów *Mycobacterium*. Obecność allelu T w pozycji +745 (C>T) genu *TLR6* powoduje upośledzenie wiązania ligandów przez ten czynnik, co prawdopodobnie skutkuje obniżoną efektywnością odpowiedzi na infekcję. Reaktywność komórek linii

HEK293 z nadekspresją genu *TLR6* z wariantem T w pozycji +745, stymulowanych lipopeptydami Mtb jest zaburzona, co skutkuje niższym poziomem syntezy IL-6 [420]. Występowanie tego allelu (a szczególnie genotypu T/T) obserwowano znacznie częściej wśród osób chorych na gruźlicę (w populacji afroamerykańskiej) [414], w porównaniu z odpowiednią grupą kontrolną, co mogłoby wskazywać na związek pomiędzy występowaniem wariantu T i ryzykiem rozwoju choroby. Jednak Zhang i wsp., na podstawie metaanalizy opublikowanych wcześniej danych wykazali, że występowanie genotypu T/T skutkuje raczej obniżeniem ryzyka zachorowania na gruźlicę [421]. Brak wpływu omawianego polimorfizmu na podatność na infekcje prątkami zaobserwowano natomiast w dwóch niezależnych badaniach prowadzonych w Indiach [328, 418], jak również w badaniach własnych, omówionych w przedstawionej pracy. Analiza otrzymanych wyników sugeruje, że obecność allelu T nie wpływa na ryzyko rozwoju choroby.

Jednym z najszerszej badanych i szczegółowo scharakteryzowanych receptorów rodziny Toll jest TLR-4. Zaburzenia syntezy, a w związku z tym funkcji TLR-4 mogą prowadzić do upośledzenia odpowiedzi odpornościowej gospodarza i mieć poważne konsekwencje kliniczne. Polimorfizmy +896 A>G (Asp299Gly; rs4986790) oraz +1196 C>T (Thr399Ile; rs4986791) genu *TLR4* przyczyniają się do nasilenia podatności na różne infekcje [422]. Najmi i wsp. badając (w populacji indyjskiej) występowanie wariantów polimorficznych w pozycjach +896 i +1196 zaobserwowali znacznie wyższą częstość występowania wariantów (odpowiednio) G i T u osób chorych na gruźlicę, niż wśród osób zdrowych. Genotypy G/G i T/T notowano szczególnie często u pacjentów, u których rozwinęła się ostra postać choroby [340]. Związek pomiędzy polimorfizmem zlokalizowanym w pozycji +896 omawianego genu i ryzykiem zachorowania na gruźlicę wykazano także u osób zakażonych HIV, w populacji afrykańskiej (Tanzania) i zamieszkującej rejon Morza Śródziemnego [423, 424]. Również Jahantigh i wsp. zauważyli wpływ występowania allelu G w pozycji +896 genu *TLR4* [pod warunkiem współwystępowania z genotypem C/C odpowiadającym polimorfizmowi w pozycji +1486 (T>C) genu *TLR9*] na ryzyko zachorowania [425]. Wyniki przedstawione w rozdziale 5.11.4. rozprawy sugerują natomiast brak zależności pomiędzy omawianym polimorfizmem i podatnością na gruźlicę w populacji polskiej. Częstość występowania allelu G nie różniła się istotnie pomiędzy badanymi grupami. Należy jednak podkreślić, że koinfekcja HIV stanowiła kryterium wyłączenia. Wyniki te potwierdzają

wcześniejsze dane, opublikowane na podstawie badań prowadzonych w Gambii i Meksyku [426], Indiach [328] oraz Kolumbii [411].

Szlaki sygnałowe uruchamiane przez receptory rodziny TLR prowadzą do aktywacji czynników transkrypcyjnych takich jak NF- κ B, za pośrednictwem białek adaptorowych, do których należy TIRAP [427]. Polimorfizm genu kodującego to białko (*TIRAP*), w pozycji +975 (C>T; Ser180Leu; rs8177374) wpływa znacząco na jego aktywność. Sugeruje się, że występowanie allelu T, skutkujące upośledzeniem transdukcji sygnału, może działać ochronnie przed rozwojem malarii, zakażenia pneumokokami (także z bakterią) [349], jak również gruźlicy wywołanej infekcją *Mtb* [428]. Według Selvaraja i wsp. (cytowana wyżej praca dotycząca populacji indyjskiej [328]), częstość występowania wariantu T była jednak znacząco wyższa w grupie osób chorych na gruźlicę, w porównaniu z grupą odniesienia. Podobne wyniki, sugerujące podwyższoną podatność nosicieli allelu T na gruźlicę przedstawili Naderi i wsp., na podstawie badań prowadzonych w Iranie [429]. Analiza danych przedstawionych w rozprawie nie wykazała istotnej statystycznie różnicy częstości występowania wariantu T związanego z omawianym SNP pomiędzy grupami TB i C. Wyniki te są zgodne z niektórymi wcześniejszymi doniesieniami, wskazującymi na brak związku pomiędzy polimorfizmem +975 C>T i ryzykiem rozwoju choroby u osób mieszkańców Ghany, Rosji, Indonezji [430], Kolumbii i Wietnamu [411, 431]. Miao i wsp. w swojej metaanalizie na podstawie dziewięciu doniesień stwierdzili, że występowanie allelu T nie wpływa na podatność na gruźlicę, w populacjach afrykańskiej i azjatyckiej [427].

Diagnostyka gruźlicy jest nadal bardzo złożona, gdyż nie zawsze istnieje możliwość potwierdzenia choroby poprzez badania mikrobiologiczne (hodowla czynnika zakaźnego). Brak biomarkerów pozwalających na szybkie odróżnienie zakażenia *Mtb* od innego rodzaju infekcji powoduje, że szybkie rozpoznanie jest utrudnione. Obserwowane wyższe stężenia fikoliny-1 oraz niższe fikoliny-2 w surowicy osób zakwalifikowanych do grupy pacjentów w porównaniu z osobami zdrowymi, wskazywać mogą na ich potencjalny charakter różnicujący osoby chore od zdrowych. Analizy krzywych ROC potwierdzają, że można białka te rozpatrywać jako potencjalne, pomocnicze biomarkery w diagnostyce gruźlicy płuc. Każde z nich mogłoby stanowić taki biomarker, ale analiza dwuczynnikowa wydaje się przynosić lepsze efekty. Oznaczenia stężenia omawianych fikolin w grupie badanej wykonywano w próbach surowicy pobranych bezpośrednio po rozpoznaniu choroby,

można, więc przypuszczać, że w większości przypadków, w początkowej jej fazie. Wysokie stężenia fikoliny-1 oraz niskie fikoliny-2 mogłyby sugerować celowość podjęcia dalszych kroków diagnostycznych.

Różnice częstości występowania wariantów polimorficznych genów *MBL2*, *FCN1*, *FCN2* oraz *SFTPA2* pomiędzy grupą osób chorych na gruźlicę płuc i osób zdrowych, sugerują udział ich produktów w odpowiedzi na zakażenie prątkami *M. tuberculosis*. Należy jednak zwrócić uwagę, że mimo wyraźnie (choć nieistotnie statystycznie) niższej częstości występowania genotypów *MBL2* YA/YA (HYA/HYA, HYA/LYA, LYA/LYA), odpowiadających wysokiemu poziomowi ekspresji aktywnej MBL) w grupie TB niż w grupie kontrolnej, mediana stężenia lektyny wiążącej mannozę w surowicy pacjentów była znacząco wyższa. W przypadku polimorfizmów genu *FCN1*, obserwujemy podobną sytuację: częstość genotypów związanych z niskim stężeniem tego białka w surowicy (G/G w pozycji -542 oraz C/C w pozycji -144) była znacząco wyższa w grupie pacjentów niż w grupie kontrolnej. Mimo tego, obserwowano wyższą medianę stężeń fikoliny-1 u osób chorych na gruźlicę w porównaniu z osobami zakwalifikowanymi do grupy kontrolnej. Świadczy to o prawdopodobnym wpływie czynników pozagenetycznych na wzrost ekspresji wspomnianych białek lub wzroście ich stężenia w odpowiedzi na infekcję.

Brak różnic częstości występowania wariantów polimorficznych pozostałych badanych genów sugeruje brak ich wpływu (lub niewielki wpływ) na ryzyko rozwoju gruźlicy płuc wywołanej przez *M. tuberculosis* u osób dorosłych w populacji polskiej. Celowym wydaje się rozszerzenie badań – uwzględnienie innych polimorfizmów a także genów kodujących inne czynniki odporności wrodzonej oraz przeprowadzenie analiz wieloczynnikowych. Omówione wyżej różnice w stosunku do niektórych wyników przedstawionych przez innych badaczy mogą wynikać z różnych kryteriów kwalifikacji osób badanych, różnic etnicznych, jak również liczebności grup. Prezentowana praca pozwala na uzupełnienie wiedzy dotyczącej znaczenia niektórych czynników odporności wrodzonej w podatności na gruźlicę, chorobę będącą wciąż przyczyną licznych zgonów, także w Polsce.

7. Podsumowanie

1. Grupę badaną (TB) stanowiły osoby chorujące na gruźlicę płuc, która została potwierdzona bakteriologicznie i radiologicznie. Badaniami objęto 434 osoby, w tym 279 mężczyzn i 155 kobiet. Do grupy kontrolnej (C) zakwalifikowano 250 osób, w tym 150 mężczyzn i 100 kobiet, które w wywiadzie nie zgłaszały ciężkich lub nawracających zakażeń, chorób nowotworowych i o podłożu autoimmunizacyjnym.
2. Mediany stężeń lektyny wiążącej mannozę (MBL) oraz aktywności jej kompleksów z proteazami serynowymi MASP-1 i MASP-2 były znacząco wyższe u pacjentów z rozpoznaną gruźlicą płuc, w porównaniu z grupą osób zdrowych, niezależnie od płci i wieku.
3. Mediany stężeń MBL oraz aktywności kompleksów MBL-MASP-1 i MBL-MASP-2 były znacząco wyższe u mężczyzn chorujących na gruźlicę niż u kobiet. W grupie kontrolnej zaobserwowano odwrotną zależność. Na aktywność kompleksów MBL-MASP-2 wpływał przede wszystkim genotyp *MBL2*, nie zaś *MASP2*. Wyjątek stanowiły osoby, u których stwierdzono rzadki, pierwotny niedobór tej proteazy.
4. Zaobserwowano znaczący wzrost stężenia lektyny wiążącej mannozę w surowicy pacjentów po podjęciu leczenia. Nie obserwowano podobnego zjawiska w przypadku innych badanych białek.
5. Mediana stężeń kolektyny surfaktantu płucnego SP-D była znacząco wyższa u pacjentów z potwierdzoną gruźlicą, w porównaniu z osobami zdrowymi, niezależnie od płci i wieku.
6. Mediana stężeń kolektyny surfaktantu płucnego SP-D była znacząco wyższa u chorych na gruźlicę mężczyzn, w porównaniu z kobietami. W grupie kontrolnej zaobserwowano przeciwną zależność.
7. Mediana stężeń fikoliny-1 była znacząco wyższa u osób chorych na gruźlicę płuc niż w grupie osób zdrowych, niezależnie od płci i wieku.
8. Mediana stężeń fikoliny-1 była znacząco wyższa u chorych na gruźlicę mężczyzn, w porównaniu z kobietami. W grupie kontrolnej nie zaobserwowano takiej zależności.

9. Pomimo braku korelacji stężenia fikoliny-1 z wiekiem, w grupie chorych zaobserwowano znacząco wyższe stężenia fikoliny-1 u osób, które ukończyły 40 rok życia, w porównaniu z osobami młodszymi.
10. Mediana stężeń fikoliny-2 w surowicy osób chorych, w porównaniu z osobami zakwalifikowanymi do grupy kontrolnej była znacząco niższa, niezależnie od płci i wieku.
11. Stężenia fikoliny-3 (mediana) nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy przedstawicielami grupy badanej TB i grupy kontrolnej C. Zaobserwowano jednak, że przeciętny poziom badanego białka u zdrowych mężczyzn był istotnie wyższy niż u chorych.
12. Stężenie fikoliny-3 było znacząco wyższe u mężczyzn niż u kobiet w obu analizowanych grupach.
13. Wysokie wartości AUC dla fikoliny-1 oraz fikoliny-2, świadczą o ich znacznym potencjale różnicującym osoby chore na gruźlicę płuc od osób zdrowych. W przypadku pozostałych badanych białek wartości AUC nie wskazywały na ich potencjalną użyteczność jako markerów.
14. Genotypy A/A w pozycjach +26 (C>A) oraz +667 (C>A) genu *SFTPA2* występowały istotnie rzadziej w grupie pacjentów w porównaniu z grupą osób zdrowych.
15. Genotypy G/G i C/C w pozycjach odpowiednio -542 i -144 genu *FCNI* występowały znacząco częściej u osób chorych niż u osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej.
16. Genotyp A/G w pozycji -4 A>G genu *FCN2* występował znacząco częściej u osób zdrowych w porównaniu z grupą pacjentów.
17. Częstości występowania wariantów polimorficznych/mutacji genów *MBL2*, *MASP-2*, *SFTPA1*, *SFTPD*, *FCN3*, genów kodujących receptory TLR (*TLR1*, *TLR2*, *TLR4* i *TLR6*) oraz białka adaptorowego TIRAP (*TIRAP*) nie różniły się znacząco pomiędzy grupą pacjentów i grupą osób zdrowych.

8. Wnioski

1. Wysokie stężenia MBL, SP-D i fikoliny-1 w surowicy osób chorych na gruźlicę płuc mogą wskazywać na ich udział w patogenezie choroby. Naturalnie wysoki, osobniczy poziom wymienionych czynników odporności w surowicy (SP-D także w surfaktancie płucnym) może sprzyjać rozwojowi aktywnej postaci gruźlicy, np. poprzez ułatwienie fagocytozy prątków w wyniku ich opsonizacji/aglutynacji.
2. Wysokie stężenia MBL i SP-D w surowicy osób chorych na gruźlicę płuc, mimo braku różnic w częstości występowania badanych wariantów polimorficznych, mogą także sugerować wpływ innych, niebadanych polimorfizmów genów *MBL2* i *SFTPD*, wzrost ich ekspresji pod wpływem czynników pozagenetycznych lub w odpowiedzi na infekcję (jako białek fazy ostrej).
3. Wzrost stężenia MBL w surowicy osób chorych, pomimo rozpoczętej antybiotykoterapii, może świadczyć o wpływie podjętego leczenia na poziom ekspresji tej lektyny. Celowym jest prowadzenie dalszych badań w tym kierunku.
4. Statystycznie istotne różnice aktywności kompleksów MBL z proteazami serynowymi MASP pomiędzy grupami TB i C mogą świadczyć o udziale aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej w odpowiedzi na zakażenie *Mtb*. Mogą jednak być efektem wzrostu stężenia MBL w przebiegu infekcji.
5. Różnice częstości występowania genotypu A/A polimorfizmów w pozycjach +26 (C>A) i +667 (C>A) genu *SFTPA2* pomiędzy badanymi grupami potwierdzają wpływ białka SP-A2 na rozwój zakażenia *Mtb*.
6. Wysokie stężenia fikoliny-1 w surowicy osób chorych na gruźlicę płuc, przy znacząco częstszym występowaniu genotypów mających związek z niższym stężeniem tego białka w surowicy, mogą świadczyć o kluczowym znaczeniu innych, niebadanych polimorfizmów, wpływie czynników pozagenetycznych na poziom ekspresji genu *FCNI* lub jego wzroście w odpowiedzi na zakażenie *Mtb*.
7. Wyższe stężenia fikoliny-2 w surowicy osób zdrowych, mogą mieć związek z wyższą częstością występowania w tej grupie genotypu A/G w pozycji -4 A>G genu *FCN2*. Uzyskane wyniki mogą świadczyć też o wpływie tego

polimorfizmu na ryzyko rozwoju aktywnej gruźlicy (potencjalny efekt ochronny wariantu A/G i wysokiego stężenia fikoliny-2).

8. Znacząco niższe stężenia fikoliny-2 w grupie pacjentów, mogą być także związane z toczącym się procesem zapalnym (konsumpcja aktywnego białka), wpływie innych polimorfizmów *FCN2* bądź regulacji pozagenetycznej.
9. Wysokie wartości AUC otrzymane dla fikoliny-1 i fikoliny-2 sugerują ich potencjalną użyteczność jako biomarkerów pomocniczych w diagnostyce gruźlicy. Celowym jest kontynuowanie prac, uwzględniających np. pobieranie prób w różnych fazach choroby oraz potwierdzenie uzyskanych wyników w niezależnych badaniach.
10. Brak różnic częstości występowania mutacji genu *FCN3* oraz stężeń fikoliny-3 w surowicy pomiędzy grupami pacjentów i osób zdrowych (traktowanymi jako całość) sugeruje, że białko to nie ma znaczącego wpływu na podatność na aktywne zakażenie prątkami *M. tuberculosis*. Na podstawie analizy danych uzyskanych dla osób młodszych oraz mężczyzn nie można jednak jednoznacznie wykluczyć udziału fikoliny-3 w odpowiedzi na infekcję.
11. Brak różnic częstości występowania wariantów polimorficznych genów kodujących wybrane receptory TLR i białko adaptorowe TIRAP pomiędzy badanymi grupami może wskazywać na brak wpływu tych czynników na podatność na zakażenie i rozwój gruźlicy.
12. Różnorodność danych dostępnych w literaturze i niekiedy sprzeczność wynikających z nich wniosków, mogą być związane z różnicami etnicznymi, liczebnością zakwalifikowanych do badań grup, jak również przyjętymi schematami badań. W przedstawionej pracy badane grupy były stosunkowo liczne i homogenne etnicznie, uzyskane wyniki należy więc traktować jako reprezentatywne dla populacji polskiej.

9. Wykaz publikacji i komunikatów konferencyjnych związanych z rozprawą

- **Publikacje**

1. **Sokołowska A.**, Świerzko A. St., Szala-Poździej A., Augustynowicz-Kopec E., Kozińska M., Niemiec T., Błachnio M., Borkowska-Tatar D., Jensenius J.C., Thiel S., Dziadek J., Cedzynski M.: *Selected factors of the innate immunity in Polish patients suffering from pulmonary tuberculosis*. Immunobiology. 2020, w druku (IF 2,798) doi: 10.1016/j.imbio.2020.151905
2. **Sokołowska A.**, Szala A., Świerzko A. St., Kozińska M., Niemiec T., Błachnio M., Augustynowicz-Kopec E., Dziadek J., Cedzyński M.: *Mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2) deficiency in two patients with pulmonary tuberculosis and one healthy control. (Letter to Editor)* Cell Mol Immunol. 2015; 12(1): 119-21 (IF 5,193)

- **Komunikaty konferencyjne**

1. The 3rd Workshop on Microbiology in Health and Environmental Protection, Łódź, 2013
Sokołowska A., Świerzko A. St., Szala A., Michalski M., Augustynowicz-Kopec E., Niemiec T., Błachnio M., Dziadek J., Cedzyński M.: *Selected innate immunity factors in pulmonary tuberculosis patients*, Postępy Mikrobiologii, (52, supl. 1); 21 (I-O2) (prezentacja ustna)
3. 14th European Meeting on Complement in Human Disease, Jena (Niemcy), 2013
Sokołowska A., Świerzko A. St., Szala A., Michalski M., Augustynowicz-Kopec E., Niemiec T., Błachnio M., Dziadek J., Cedzyński M.: *Collectins and ficolins in Mycobacterium tuberculosis infections in Polish patients*, Mol. Immunol., (56), 303 (P CII 10) (poster)
4. 10th International Conference on Innate Immunity, Kos (Grecja), 2013
Sokołowska A., Świerzko A. St., Szala A., Michalski M., Augustynowicz-Kopec E., Niemiec T., Błachnio M., Dziadek J., Cedzyński M.: *Mannan-binding lectin and H-ficolin (ficolin-3) in pulmonary tuberculosis*, Aegean Conference Series., vol. 74, Abstract 84, 122 (poster)
5. 10th International Conference on Innate Immunity, Kos (Grecja), 2013
Szala A., Świerzko A. St., **Sokołowska A.**, Michalski M., Augustynowicz-Kopec E., Niemiec T., Błachnio M., Dziadek J., Cedzyński M.: *Surfactant*

proteins-SP-A and SP-D in tuberculosis patients, Aegean Conference Series, vol. 95, Abstract 60, 136 (poster)

6. XXXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc, Wisła, 2012
Sokołowska A., Świerzko A. St., Szala A., Michalski M., Augustynowicz-Kopeć E., Niemiec T., Błachnio M., Dziadek J., Cedzyński M.: *Kolektyna surfaktantu płucnego SP-D u osób chorych na gruźlicę*. (poster)
7. XXXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc, Wisła, 2012
Szala A., **Sokołowska A.**, Świerzko A. St., Augustynowicz-Kopeć E., Niemiec T., Błachnio M., Dziadek J., Cedzyński M.: *Surowicze stężenia lektyny wiążącej mannan (MBL) i polimorfizmy genu MBL2 u osób chorych na gruźlicę*. (poster)
8. XXXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc, Wisła, 2012
Michalski M., Dziadek J., Maciejewska A., Błachnio M., Niemiec T., Augustynowicz-Kopeć E., Świerzko A. St., **Sokołowska A.**, Łukasiewicz J., Szala A., Cedzyński M.: *Badania surowiczych stężeń fikoliny H oraz mutacji genu FCN3 u osób chorych na gruźlicę*. (poster)
9. 5th International Conference on Complement Therapeutics, Rodos, (Grecja), 2011
Sokołowska A., Świerzko A. St., Szala A., Augustynowicz-Kopeć E., Niemiec T., Dziadek J., Cedzyński M.: *High serum levels of mannan-binding lectin in pulmonary tuberculosis patients*, Aegean Conference Series, vol. 59, abstract 50. (poster)
10. INTERLEC 24 - 24th International Lectin Meeting, Brisbane, (Australia), 2011
Sokołowska A., Świerzko A. St., Szala A., Augustynowicz-Kopeć E., Niemiec T., Dziadek J., Cedzyński M.: *High serum levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL-MASP-2 complex activities in pulmonary tuberculosis patients*, Abstract Book, 2 (wykład w sekcji)

10. Wykaz pozostałych publikacji i komunikatów konferencyjnych

• Publikacje

1. Bąk-Romaniszyn L., Świerzko A. St., **Sokołowska A.**, Durko Ł., Mierzwa G., Szala-Poździej A., Małecka-Panas E., Cedzyński M.: *Mannose-binding lectin (MBL) in adult patients with inflammatory bowel disease*. Immunobiology. 2020, w druku (IF 2,798) doi: 10.1016/j.imbio.2019.10.008

2. Świerzko A. S., Michalski M., **Sokołowska A.**, Nowicki M., Szala-Poździej A., Eppa Ł., Mitrus I., Szmigielska-Kapłon A., Sobczyk-Kruszelnicka M., Michalak K., Gołos A., Wierzbowska A., Giebel S., Jamroziak K., Kowalski M.L., Brzezińska O., Thiel S., Matsushita M., Jensenius J.C., Gajek G., Cedzyński M. 2020. *Associations of ficolins with haematological malignancies in patients receiving high-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell transplantations (auto-HSCT)*. *Front. Immunol.* 2020, 10:3097. doi: 10.3389/fimmu.2019.03097. (IF 4,716)
3. Świerzko A. St., Michalski M., **Sokołowska A.**, Nowicki M., Eppa Ł., Szala-Poździej A., Mitrus I., Szmigielska-Kapłon A., Sobczyk-Kruszelnicka M., Michalak K., Gołos A., Wierzbowska A., Giebel S., Jamroziak K., Kowalski M.L., Brzezińska O., Thiel S., Jensenius J.C., Kasperkiewicz K., Cedzyński M.: *The role of complement activating collectins and associated serine proteases in patients with hematological malignancies, receiving high-dose chemotherapy, and autologous hematopoietic stem cell transplantations (auto-HSCT)*. *Front Immunol.* 2018, 9:2153. (IF 4,716)
4. Świerzko A. St., Szala-Poździej A., Kilpatrick D.C., Sobociński M., Chojnacka K., **Sokołowska A.**, Michalski M., Mazerant K., Jensenius J.C., Matsushita M., Krajewski W.R., Szczapa J., Bąk-Romaniszyn L., Zeman K., Cedzyński M.: *Components of the lectin pathway of complement activation in paediatric patients of intensive care units*. *Immunobiology.* 2016; 221(5): 657-69. (IF 2,720)
5. Pągowska-Klimek I., Świerzko A. St., Michalski M., Głowacka E., Szala-Poździej A., **Sokołowska A.**, Moll M., Krajewski W.R., Romak J., Cedzyński M.: *Activation of the lectin pathway of complement by cardiopulmonary bypass contributes to the development of systemic inflammatory response syndrome after paediatric cardiac surgery*. *Clin Exp Immunol.* 2016; 184(2):257-63. (IF 3,410)
6. Pągowska-Klimek I., Świerzko A. St., Michalski M., Moll M., Szala-Poździej A., **Sokołowska A.**, Krajewski W.R., Cedzyński M.: *Mannose-binding lectin (MBL) insufficiency protects against the development of systemic inflammatory response after pediatric cardiac surgery*. *Immunobiology.* 2016; 221(2): 175-81. (IF 2,720)

7. Świerzko A. St., Szala-Poździej A., Michalski M., Sokołowska A., Cedzyński M., Sawicki S., Śniadecki M., Wydra D., Szemraj J., Kałużynski A.: *The lectin pathway of complement activation in ovarian cancer*. Polish Academy of Sciences Annual Report, 2015, 72-74
8. Świerzko A. St., Szala A., Sawicki S., Szemraj J., Śniadecki M., **Sokołowska A.**, Kałużynski A., Wydra D., Cedzyński M.: *Mannose-Binding Lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2) in women with malignant and benign ovarian tumours*. Cancer Immunol Immunother. 2014; 63(11): 1129-40. (IF 3,941)
9. Michalski M., Szala A., Świerzko A. St., Łukasiewicz J., Maciejewska A., Kilpatrick D.C., Matsushita M., Domżańska-Popadiuk I., Borkowska-Kłós M., **Sokołowska A.**, Szczapa J., Ługowski C., Cedzyński M.: *H-ficolin (ficolin-3) concentrations and FCN3 gene polymorphism in neonates*. Immunobiology. 2012; 217(7): 730-7. (IF 2,814)
10. Szala A., Paradowska E., Nowakowska D., Świerzko A. St., Dzierżanowska-Fangrat K., **Sokołowska A.**, Studzińska M., Gaj Z., Suski P., Kasztelewicz B., Wilczyński J., Cedzyński M.: *Mannan-binding lectin-2 (MBL2) gene polymorphisms in prenatal and perinatal cytomegalovirus infections*. Mol Immunol. 2011; 48(15-16): 2203-6 (IF 2,897)
11. Bąk-Romaniszyn L., Szala A., **Sokołowska A.**, Mierzwa G., Czerwionka-Szaflarska M., Świerzko A. St., Zeman K., Cedzyński M.: *Mannan-binding lectin deficiency in pediatric patients with inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol. 2011; 46(10): 1275-8. (IF 2,019)

- **Komunikaty konferencyjne**

1. 17th European Meeting on Complement in Human Disease, Madrid (Hiszpania), 2019
 Świerzko A. St., Michalski M., **Sokołowska A.**, Nowicki M., Szala-Poździej A., Eppa Ł., Mitrus I., Szmigielska-Kapłon A., Sobczyk-Kruszelnicka M., Michalak K., Gołos A., Wierzbowska A., Giebel S., Jamroziak K., Kowalski M.L., Brzezińska O., Thiel S., Matsushita M., Jensenius J.C., Gajek G., Cedzyński M.: *Ficolins in patients with haematological malignancies receiving high-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell transplantations (auto-HSCT)*. Abstracts, 123 (poster)

2. Annual Next Gen Immuno Oncology Congress & Global Summit on Toxicology and Risk Assessment, Paris (Francja), 2018
 Świerzko A. St., Michalski M., **Sokołowska A.**, Nowicki M., Eppa Ł., Szala-Póździej A., Mitrus I., Szmigielska-Kapłon A., Sobczyk-Kruszelnicka M., Michalak K., Gołos A., Wierzbowska A., Giebel S., Jamroziak J., Kowalski M.L., Cedzyński M.: *The MBL2 gene polymorphisms and serum mannose-binding lectin (MBL) concentration/activity in patients suffering from haematological malignancies, treated with autologous haematopoietic stem cells transplantations.*, J. Forensic Toxicol. Pharmacol., 2018, (7), 56 (poster)
3. 10th International Conference on Clinical and Cellular Immunology, Madrid (Hiszpania), 2018
 Świerzko A. St., Michalski M., **Sokołowska A.**, Nowicki M., Eppa Ł., Szala-Póździej A., Mitrus I., Szmigielska-Kapłon A., Sobczyk-Kruszelnicka M., Michalak K., Gołos A., Wierzbowska A., Giebel S., Jamroziak K., Kowalski M.L., Cedzyński M.: *The role of mannose-binding lectin (MBL) in patients with haematological malignancies, receiving high-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell transplantations (auto-HSCT).* J. Clin. Cell. Immunol., 2018, (9), 61 (poster)
4. 4th Workshop on Microbiology in Health Care and Environmental Protection MIKROBIOT, Łódź, 2017
 Eppa Ł., Nowicki M., Mitrus I., **Sokołowska A.**, Sobczyk-Kruszelnicka M., Szmigielska-Kapłon A., Michalak K., Gołos A., Wierzbowska A., Giebel S., Jamroziak K., Świerzko A. St., Kasperkiewicz K., Cedzyński M.: *Mannose-binding lectin (MBL) in patients haematological malignancies, receiving autologous hematopoietic stem cell transplantations (auto-HSCT)* (poster I-P 30); Postępy Mikrobiologii 2017, 56 (supl. 1) (poster)
5. 4th Workshop on Microbiology in Health Care and Environmental Protection MIKROBIOT, Łódź, 2017
Sokołowska A., Gołos A., Wolska A., Nowicki M., Jamroziak K., Wierzbowska A., Szala-Póździej A., Świerzko A. St., Cedzyński M.: *Ficolin-1 in patients suffering from acute myeloid leukemia* (poster I-P 29); Postępy Mikrobiologii 2017, 56 (supl. 1): 36 (poster)
6. 53rd ERA-EDTA Congress, Wiedeń (Austria), 2016

- Niemir Z., Woźniczka K., Świerzko A. St., Smykał-Jankowiak K, Polcyn-Adamczak M., **Sokołowska A.**, Szala A., Cedzyński M.: *The immunological activity of lupus nephritis associates with the concurrent deficiency of mannose-binding lectin and C1q*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2016, suppl.1; 360 (abstract MP054) (poster)
7. 8th International Conference on Complement Therapeutics, Chania (Grecja), 2015
Pągowska-Klimek I., Świerzko A. St., Michalski M., Moll M., Szala-Poździej A., **Sokołowska A.**, Krajewski W., Cedzyński M.: *Complement lectin pathway activation by cardiopulmonary bypass contributes to the development of systemic inflammatory response syndrome after pediatric cardiac surgery*. Aegean Conferences Series vol. 93, Abstract 60, 85 (poster)
8. International Conference on Innate Immunity, Barcelona (Hiszpania), 2015
Pągowska-Klimek I., Świerzko A. St., Michalski M., Moll M., Szala A., **Sokołowska A.**, Cedzyński M.: *Mannose-binding lectin (MBL) and postoperative complications rate in pediatric cardiac surgery*. J. Clin. Cell. Immunol., (6:3), 34 (poster)
9. 51st Congress of the European-Renal-Association(ERA)/European-Dialysis-and-Transplant-Association (EDTA), Amsterdam (Holandia), 2014
Niemir Z., Woźniczka K., Świerzko A. St., Cedzyński M., Polcyn-Adamczak M., **Sokołowska A.**, Szala A.: *The relationship between the mannan-binding protein genotypes and clinical manifestation of lupus nephritis*. Nephrology Dialysis Transplantation, (29, suppl. 3), 440 (poster)
10. The 3rd Workshop on Microbiology in Health and Environmental Protection, Łódź, 2013
Michalski M., Świerzko A. St., Łukasiewicz J., Man-Kupisińska A., **Sokołowska A.**, Cedzyński M.: *An interaction of H-ficolin with lipopolysaccharide contributes to aggregation, phagocytosis and killing of Hafnia alvei 1200 bacterial cells.*, Postępy Mikrobiologii, (52, suppl.1); 88 (III-P11) (poster)
11. Ogólnopolski Zjazd Młodych Biotechnologów, Katowice, 2013
Cedzyński M., Szala A., **Sokołowska A.**, Michalski M., Świerzko A. St.: *Lektyna wiążąca mannan, fikoliny i związana z nimi proteaza serynowa MASP-2 u noworodków.*, Chemik Light, (3), 4-5 (wykład plenarny)

12. 15th International Congress of Immunology, Mediolan (Włochy), 2013
 Michalski M., Świerzeko A. St., Łukasiewicz J., Man-Kupisińska A., **Sokołowska A.**, Cedzyński M., *An interaction of H-ficolin with lipopolysaccharide contributes to aggregation, phagocytosis and killing of Hafnia alvei 1200 bacterial cells.*, Abstracts, PI.12.17 (poster)
13. 14th European Meeting on Complement in Human Disease, Jena (Niemcy), 2013
 Cedzyński M., Chojnacka K., Sobociński M., Świerzeko A. St., Szala A., **Sokołowska A.**, Michalski M., Łukasiewicz J., Maciejewska A., Szczapa J., Krajewski W., Matsushita M., Kilpatrick D.C.: *Complement activating lectins in neonatal sepsis.*, Mol. Immunol., 56, 302, (P CII 7) (poster)
14. 14th European Meeting on Complement in Human Disease, Jena (Niemcy), 2013
 Michalski M., Świerzeko A. St., Łukasiewicz J., Man-Kupisińska A., **Sokołowska A.**, Cedzyński M.: *An interaction of H-ficolin with lipopolysaccharide contributes to aggregation, phagocytosis and killing of Hafnia alvei 1200 bacterial cells.*, Mol. Immunol., 56, 302-303 (P CII 9) (poster)
15. 10th International Conference on Innate Immunity, Kos (Grecja), 2013
 Michalski M., Świerzeko A. St., Łukasiewicz J., Man-Kupisińska A., **Sokołowska A.**, Cedzyński M.: *An interaction of H-ficolin with lipopolysaccharide contributes to aggregation, phagocytosis and killing of Hafnia alvei 1200 bacterial cells.*, Aegean Conference Series , vo. 74, Abstarct 60, 94 (poster)
16. 50th European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association Congress, Sтамбуł (Turcja), 2013
 Niemir Z., Świerzeko A. St., Polcyn-Adamczak M., Cedzyński M., **Sokołowska A.**, Szala A.: *Is there any relationship between serological responsiveness to the Epstein-Barr virus antigens and serum levels of mannose binding lectin in patients with lupus nephritis and primary glomerulonephritides?*, Nephrol. Dial. Transplant., (28, suppl. 1), 410, (MP357) (poster)
17. Overcoming Chalanges in IBD Management. Falk Symposium, 187, Barcelona (Hiszpania), 2013

- Szala A., Bąk-Romaniszyn L., **Sokołowska A.**, Świerzko A. St., Durko Ł., Małecka-Panas E., Cedzyński M.: *Mannan-binding lectin (MBL) in inflammatory bowel disease*. Falk Symposium, Abstracts, 187, 42 (poster)
18. 20th United Gastroenterology Week, Amsterdam (Holandia), 2012
- Bąk-Romaniszyn L., **Sokołowska A.**, Świerzko A. St., Durko Ł., Szala A., Małecka-Panas E., Cedzyński M., *Mannan-binding lectin (MBL) in adult patients with inflammatory bowel disease.*, Abstracts, P1370 (poster)
19. 19th United European Gastroenterology Week, Stockholm, (Szwecja), 2011
- Bąk-Romaniszyn L., Szala A., **Sokołowska A.** Mierzwa G., Czerwionka-Szaflarska M., Świerzko A. St., Zeman K., Cedzyński M.: *Mannan-binding lectin (MBL) in inflammatory bowel disease – preliminary report*. Gut, (60, suppl. 3), A412, P1481 (poster)

11. Literatura

1. Cruz-Knight W., Blake-Gumbs L.: *Tuberculosis: an overview*. Prim Care, 2013. **40**(3): 743-756.
2. World Health Organization: *Global tuberculosis report 2018*, Geneva 2018, s. 265.
3. Nguyen T.N.A., Anton-Le Berre V., Banuls A.L., Nguyen T.V.A.: *Molecular Diagnosis of drug-resistant tuberculosis; a literature review*. Front Microbiol, 2019. **10**: 794; doi: 10.3389/fmicb.2019.00794.
4. World Health Organization Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control: *Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2019 – 2017 data*. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2019, s.164.
5. Korzeniewska-Kosela M.: *Tuberculosis in Poland in 2017*. Przegl Epidemiol, 2019. **73**(2): 211-226.
6. Salo W.L., Aufderheide A.C., Buikstra J., Holcomb T.A.: *Identification of Mycobacterium tuberculosis DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(6): 2091-2094.
7. Konomi N., Lebwahl E., Mowbray K., Tattersall I., Zhang D.: *Detection of mycobacterial DNA in Andean mummies*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(12): 4738-4740.
8. *LPSN List of procaryotic names with standing in nomenclature*; <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>.
9. Nouioui I., Brunet L.R., Simpson D., Klenk H.P., Goodfellow M.: *Description of a novel species of fast growing mycobacterium: Mycobacterium kyogaense sp. nov., a scotochromogenic strain received as Mycobacterium vaccae*. Int J Syst Evol Microbiol, 2018. **68**(12): 3726-3734.
10. Fol M., Olek J., Kowalewicz-Kulbat M., Druszczynska M., Rudnicka W.: *Prątki niegruźlicze: M. marinum, M. ulcerans, M. xenopi – krótka charakterystyka drobnoustrojów i zmian klinicznych przez nie wywoływanych*. Postepy Hig Med Dosw, 2011. **65**: 574-583.
11. O'Garra A., Redford P.S., McNab F.W., Bloom C.I., Wilkinson R.J., Berry M.P.: *The immune response in tuberculosis*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: 475-527.
12. Xavier Emmanuel F., Seagar A.L., Doig C., Rayner A., Claxton P., Laurenson I.: *Human and animal infections with Mycobacterium microti, Scotland*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(12): 1924-1927.
13. Grange J.M.: *Mycobacterium bovis infection in human beings*. Tuberculosis (Edinb), 2001. **81**(1-2): 71-77.
14. Brennan P.J.: *Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2003. **83**(1-3): 91-97.
15. Ben-Ali M., Barbouche M.R., Bousnina S., Chabbou A., Dellagi K.: *Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients*. Clin Diagn Lab Immunol, 2004. **11**(3): 625-626.
16. Torrelles J.B., Schlesinger L.S.: *Diversity in Mycobacterium tuberculosis mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host*. Tuberculosis (Edinb), 2010. **90**(2): 84-93.

17. Kleinnijenhuis J., Oosting M., Joosten L.A., Netea M.G., Van Crevel R.: *Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis*. Clin Dev Immunol, 2011. **2011**: 405310; doi: 10.1155/2011/405310
18. Sakamoto K.: *The pathology of Mycobacterium tuberculosis infection*. Vet Pathol, 2012. **49**(3): 423-439.
19. Sanchez A., Espinosa P., Garcia T., Mancilla R.: *The 19 kDa Mycobacterium tuberculosis lipoprotein (LpqH) induces macrophage apoptosis through extrinsic and intrinsic pathways: a role for the mitochondrial apoptosis-inducing factor*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: 950503; doi: 10.1155/2012/950503
20. Ducati R.G., Ruffino-Netto A., Basso L.A., Santos D.S.: *The resumption of consumption-a review on tuberculosis*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2006. **101**(7): 697-714.
21. Daniel T.M.: *The history of tuberculosis*. Respir Med, 2006. **100**(11): 1862-1870.
22. Moller M., Hoal E.G.: *Current findings, challenges and novel approaches in human genetic susceptibility to tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2010. **90**(2): 71-83.
23. Comstock G.W.: *Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey*. Am Rev Respir Dis, 1978. **117**(4): 621-624.
24. Simonds B.: *The collection of 300 twin index cases for a study of tuberculosis in twins and their families*. Acta Genet Stat Med, 1957. **7**(1): 42-47.
25. van der Eijk E.A., van de Vosse E., Vandenbroucke J.P., van Dissel J.T.: *Heredity versus environment in tuberculosis in twins: the 1950s United Kingdom Proffit Survey Simonds and Comstock revisited*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(12): 1281-1288.
26. Rudnicka W.: *Molekularne mechanizmy odporności na gruźlicę*. Postępy Mikrobiologii, 2004. **43**: 107-127.
27. Kaufmann S.H.: *How can immunology contribute to the control of tuberculosis?* Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): 20-30.
28. Barnes P.F., Wikel B.: *Type 1 cytokines and the pathogenesis of tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(6): 1773-1774.
29. Verbon A., Juffermans N., Van Deventer S.J., Speelman P., Van Deutekom H., Van Der Poll T.: *Serum concentrations of cytokines in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment*. Clin Exp Immunol, 1999. **115**(1): 110-113.
30. Tufariello J.M., Chan J., Flynn J.L.: *Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection*. Lancet Infect Dis, 2003. **3**(9): 578-590.
31. Rudnicka W., Brzychcy M., Klink M., Lopez A.G., Fonteyne P.A., Rusch-Gerdes S., Rozalska B.: *The production of nitric oxide and tumor necrosis factor by murine macrophages infected with mycobacterial strains differing by hemolytic activity*. Microbiol Immunol, 1999. **43**(7): 637-644.
32. Gonzalez-Juarrero M., Turner O.C., Turner J., Marietta P., Brooks J.V., Orme I.M.: *Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 2001. **69**(3): 1722-1728.
33. Manabe Y.C., Bishai W.R.: *Latent Mycobacterium tuberculosis-persistence, patience, and winning by waiting*. Nat Med, 2000. **6**(12): 1327-1329.
34. Lawn S.D., Zumla A.I.: *Tuberculosis*. Lancet, 2011. **378**(9785): 57-72.

35. Campbell I.A., Bah-Sow O.: *Pulmonary tuberculosis: diagnosis and treatment*. BMJ, 2006. **332**(7551): 1194-1197.
36. Garred P., Honore C., Ma Y.J., Rorvig S., Cowland J., Borregaard N., Hummelshoj T.: *The genetics of ficolins*. J Innate Immun, 2010. **2**(1): 3-16.
37. Kishore U., Greenhough T.J., Waters P., Shrive A.K., Ghai R., Kamran M.F., Bernal A.L., Reid K.B., Madan T., Chakraborty T.: *Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors*. Mol Immunol, 2006. **43**(9): 1293-1315.
38. Polotsky V.Y., Belisle J.T., Mikusova K., Ezekowitz R.A., Joiner K.A.: *Interaction of human mannose-binding protein with Mycobacterium avium*. J Infect Dis, 1997. **175**(5): 1159-1168.
39. Bartłomiejczyk M.A., Swierczko A.S., Brzostek A., Dziadek J., Cedzynski M.: *Interaction of lectin pathway of complement-activating pattern recognition molecules with mycobacteria*. Clin Exp Immunol, 2014. **178**(2): 310-319.
40. Arika S., Kojima T., Gasa S., Saito A., Nishitani C., Takahashi M., Shimizu T., Kurimura Y., Sawada N., Fujii N., Kuroki Y.: *Pulmonary collectins play distinct roles in host defense against Mycobacterium avium*. J Immunol, 2011. **187**(5): 2586-2594.
41. van de Wetering J.K., van Golde L.M., Batenburg J.J.: *Collectins: players of the innate immune system*. Eur J Biochem, 2004. **271**(7): 1229-1249.
42. Hansen S., Holm D., Moeller V., Vitved L., Bendixen C., Reid K.B., Skjoedt K., Holmskov U.: *CL-46, a novel collectin highly expressed in bovine thymus and liver*. J Immunol, 2002. **169**(10): 5726-5734.
43. Gupta G., Surolia A.: *Collectins: sentinels of innate immunity*. Bioessays, 2007. **29**(5): 452-464.
44. Wright J.R.: *The "wisdom" of lung surfactant: balancing host defense and surface tension-reducing functions*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **291**(5): L847-850.
45. Crouch E., Chang D., Rust K., Persson A., Heuser J.: *Recombinant pulmonary surfactant protein D. Post-translational modification and molecular assembly*. J Biol Chem, 1994. **269**(22): 15808-15813.
46. Jensenius H., Klein D.C., van Hecke M., Oosterkamp T.H., Schmidt T., Jensenius J.C.: *Mannan-binding lectin: structure, oligomerization, and flexibility studied by atomic force microscopy*. J Mol Biol, 2009. **391**(1): 246-259.
47. Turner M.W.: *The role of mannose-binding lectin in health and disease*. Mol Immunol, 2003. **40**(7): 423-429.
48. Kelly P., Jack D.L., Naeem A., Mandanda B., Pollok R.C., Klein N.J., Turner M.W., Farthing M.J.: *Mannose-binding lectin is a component of innate mucosal defense against Cryptosporidium parvum in AIDS*. Gastroenterology, 2000. **119**(5): 1236-1242.
49. Jack D.L., Klein N.J., Turner M.W.: *Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis*. Immunol Rev, 2001. **180**: 86-99.
50. Kuroki Y., Takahashi M., Nishitani C.: *Pulmonary collectins in innate immunity of the lung*. Cell Microbiol, 2007. **9**(8): 1871-1879.
51. Cedzyński M., Kilpatrick D. C., Świerczko Ś.A., *Mannose-binding lectin*, [w:] *The Complement Factsbook*. 2018, Academic Press, Elsevier, London. p. 33-43.
52. Presanis J.S., Kojima M., Sim R.B.: *Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL)*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 4): 748-752.

53. Shang S.Q., Chen G.X., Shen J., Yu X.H., Wang K.Y.: *The binding of MBL to common bacteria in infectious diseases of children*. J Zhejiang Univ Sci B, 2005. **6**(1): 53-56.
54. Auriti C., Prencipe G., Moriondo M., Bersani I., Bertaina C., Mondini V., Inglese R.: *Mannose-binding lectin: biologic characteristics and role in the susceptibility to infections and ischemia-reperfusion related injury in critically ill neonates*. J Immunol Res, 2017. **2017**: 7045630; doi: 10.1155/2017/7045630
55. van Emmerik L.C., Kuijper E.J., Fijen C.A., Dankert J., Thiel S.: *Binding of mannan-binding protein to various bacterial pathogens of meningitis*. Clin Exp Immunol, 1994. **97**(3): 411-416.
56. Ezekowitz R.A., Kuhlman M., Groopman J.E., Byrn R.A.: *A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus*. J Exp Med, 1989. **169**(1): 185-196.
57. Neth O., Jack D.L., Dodds A.W., Holzel H., Klein N.J., Turner M.W.: *Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition*. Infect Immun, 2000. **68**(2): 688-693.
58. Holmskov U., Thiel S., Jensenius J.C.: *Collectins and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: 547-578.
59. Takahashi K., Ip W.E., Michelow I.C., Ezekowitz R.A.: *The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(1): 16-23.
60. de Wit E., van der Merwe L., van Helden P.D., Hoal E.G.: *Gene-gene interaction between tuberculosis candidate genes in a South African population*. Mamm Genome, 2011. **22**(1-2): 100-110.
61. Ip W.K., Takahashi K., Moore K.J., Stuart L.M., Ezekowitz R.A.: *Mannose-binding lectin enhances Toll-like receptors 2 and 6 signaling from the phagosome*. J Exp Med, 2008. **205**(1): 169-181.
62. Ip W.K., Takahashi K., Ezekowitz R.A., Stuart L.M.: *Mannose-binding lectin and innate immunity*. Immunol Rev, 2009. **230**(1): 9-21.
63. Hummelshoj T., Munthe-Fog L., Madsen H.O., Sim R.B., Garred P.: *Comparative study of the human ficolins reveals unique features of Ficolin-3 (Hakata antigen)*. Mol Immunol, 2008. **45**(6): 1623-1632.
64. Swierzko A.S., Florczak K., Cedzynski M., Szmraj J., Wydra D., Bak-Romaniszyn L., Emerich J., Sulowska Z.: *Mannan-binding lectin (MBL) in women with tumours of the reproductive system*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(7): 959-971.
65. Swierzko A.S., Szala A., Sawicki S., Szmraj J., Sniadecki M., Sokolowska A., Kaluzynski A., Wydra D., Cedzynski M.: *Mannose-Binding Lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2) in women with malignant and benign ovarian tumours*. Cancer Immunol Immunother, 2014. **63**(11): 1129-1140.
66. Seyfarth J., Garred P., Madsen H.O.: *Extra-hepatic transcription of the human mannose-binding lectin gene (MBL2) and the MBL-associated serine protease 1-3 genes*. Mol Immunol, 2006. **43**(7): 962-971.
67. Lanzrein A.S., Jobst K.A., Thiel S., Jensenius J.C., Sim R.B., Perry V.H., Sim E.: *Mannan-binding lectin in human serum, cerebrospinal fluid and brain tissue and its role in Alzheimer's disease*. Neuroreport, 1998. **9**(7): 1491-1495.
68. Tregoeat V., Montagne P., Bene M.C., Faure G.: *Changes in the mannan binding lectin (MBL) concentration in human milk during lactation*. J Clin Lab Anal, 2002. **16**(6): 304-307.

69. Plovsing R.R., Berg R.M., Munthe-Fog L., Konge L., Iversen M., Moller K., Garred P.: *Alveolar recruitment of ficolin-3 in response to acute pulmonary inflammation in humans*. Immunobiology, 2016. **221**(5): 690-697.
70. Garred P., Genster N., Pilely K., Bayarri-Olmos R., Rosbjerg A., Ma Y.J., Skjoedt M.O.: *A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond*. Immunol Rev, 2016. **274**(1): 74-97.
71. Saevarsdottir S., Ding B., Steinsson K., Grondal G., Valdimarsson H., Alfredsson L., Klareskog L., Padyukov L.: *Mannan Binding Lectin (MBL) genotypes coding for high MBL serum levels are associated with rheumatoid factor negative rheumatoid arthritis in never smokers*. Arthritis Res Ther, 2011. **13**(2): R65; doi: 10.1186/ar3321.
72. Dommett R.M., Klein N., Turner M.W.: *Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future*. Tissue Antigens, 2006. **68**(3): 193-209.
73. Swierzko A.S., Kilpatrick D.C., Cedzynski M.: *Mannan-binding lectin in malignancy*. Mol Immunol, 2013. **55**(1): 16-21.
74. Madsen H.O., Satz M.L., Hogh B., Svejgaard A., Garred P.: *Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America*. J Immunol, 1998. **161**(6): 3169-3175.
75. Swierzko A.S., Atkinson A.P., Cedzynski M., Macdonald S.L., Szala A., Domzalska-Popadiuk I., Borkowska-Klos M., Jopek A., Szczapa J., Matsushita M., Szemraj J., Turner M.L., Kilpatrick D.C.: *Two factors of the lectin pathway of complement, L-ficolin and mannan-binding lectin, and their associations with prematurity, low birthweight and infections in a large cohort of Polish neonates*. Mol Immunol, 2009. **46**(4): 551-558.
76. Kalia N., Sharma A., Kaur M., Kamboj S.S., Singh J.: *A comprehensive in silico analysis of non-synonymous and regulatory SNPs of human MBL2 gene*. Springerplus, 2016. **5**(1): 811; doi: 10.1186/s40064-016-2543-4.
77. Aittoniemi J., Miettinen A., Laippala P., Isolauri E., Viikari J., Ruuska T., Soppi E.: *Age-dependent variation in the serum concentration of mannan-binding protein*. Acta Paediatr, 1996. **85**(8): 906-909.
78. Sallenbach S., Thiel S., Aebi C., Otth M., Bigler S., Jensenius J.C., Schlapbach L.J., Ammann R.A.: *Serum concentrations of lectin-pathway components in healthy neonates, children and adults: mannan-binding lectin (MBL), M-, L-, and H-ficolin, and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2)*. Pediatr Allergy Immunol, 2011. **22**(4): 424-430.
79. Swierzko A.S., Szala A., Cedzynski M., Domzalska-Popadiuk I., Borkowska-Klos M., Jopek A., Szczapa J., Szemraj J., Atkinson A.P., MacDonald S.L., Turner M.L., Kilpatrick D.C.: *Mannan-binding lectin genotypes and genotype-phenotype relationships in a large cohort of Polish neonates*. Hum Immunol, 2009. **70**(1): 68-72.
80. Kilpatrick D.C., Chalmers J.D.: *Human L-ficolin (ficolin-2) and its clinical significance*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: 138797; doi: 10.1155/2012/138797.
81. Sorensen C.M., Hansen T.K., Steffensen R., Jensenius J.C., Thiel S.: *Hormonal regulation of mannan-binding lectin synthesis in hepatocytes*. Clin Exp Immunol, 2006. **145**(1): 173-182.
82. Arai T., Tabona P., Summerfield J.A.: *Human mannose-binding protein gene is regulated by interleukins, dexamethasone and heat shock*. Q J Med, 1993. **86**(9): 575-582.

83. Cedzynski M., Szemraj J., Swierzko A.S., Bak-Romaniszyn L., Banasik M., Zeman K., Kilpatrick D.C.: *Mannan-binding lectin insufficiency in children with recurrent infections of the respiratory system*. Clin Exp Immunol, 2004. **136**(2): 304-311.
84. Swierzko A.S., Bartłomiejczyk M.A., Brzostek A., Lukasiewicz J., Michalski M., Dziadek J., Cedzynski M.: *Mycobacterial antigen 85 complex (Ag85) as a target for ficolins and mannose-binding lectin*. Int J Med Microbiol, 2016. **306**(4): 212-221.
85. Akaiwa M., Yae Y., Sugimoto R., Suzuki S.O., Iwaki T., Izuhara K., Hamasaki N.: *Hakata antigen, a new member of the ficolin/opsonin p35 family, is a novel human lectin secreted into bronchus/alveolus and bile*. J Histochem Cytochem, 1999. **47**(6): 777-786.
86. Pałowska-Klimek I., Świerzek A.S., Michalski M., Moll M., Szala-Poździej A., Sokołowska A., Krajewski W.R., Cedzyński M.: *Mannose-binding lectin (MBL) insufficiency protects against the development of systemic inflammatory response after pediatric cardiac surgery*. Immunobiology, 2016. **221**(2): 175-181.
87. Garcia-Laorden M.I., Sole-Violan J., Rodriguez de Castro F., Aspa J., Briones M.L., Garcia-Saavedra A., Rajas O., Blanquer J., Caballero-Hidalgo A., Marcos-Ramos J.A., Hernandez-Lopez J., Rodriguez-Gallego C.: *Mannose-binding lectin and mannose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility, severity, and outcome of pneumonia in adults*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(2): 368-374.
88. Roy S., Knox K., Segal S., Griffiths D., Moore C.E., Welsh K.I., Smarason A., Day N.P., McPheat W.L., Crook D.W., Hill A.V.: *MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case-control study*. Lancet, 2002. **359**(9317): 1569-1573.
89. Peterslund N.A., Koch C., Jensenius J.C., Thiel S.: *Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy*. Lancet, 2001. **358**(9282): 637-638.
90. Mullighan C.G., Heatley S., Doherty K., Szabo F., Grigg A., Hughes T.P., Schwarzer A.P., Szer J., Tait B.D., Bik To L., Bardy P.G.: *Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with major infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation*. Blood, 2002. **99**(10): 3524-3529.
91. Świerzek A.S., Michalski M., Sokołowska A., Nowicki M., Eppa Ł., Szala-Poździej A., Mitrus I., Szmigielska-Kapłon A., Sobczyk-Kruszelnicka M., Michalak K., Gołos A., Wierzbowska A., Giebel S., Jamroziak K., Kowalski M.L., Brzezińska O., Thiel S., Jensenius J.C., Kasperkiewicz K., Cedzyński M.: *The role of complement activating collectins and associated serine proteases in patients with hematological malignancies, receiving high-dose chemotherapy, and autologous hematopoietic stem cell transplantations (auto-HSCT)*. Front Immunol, 2018. **9**: 2153; doi: 10.3389/fimmu.2018.02153.
92. Sano H., Kuroki Y.: *The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity*. Mol Immunol, 2005. **42**(3): 279-287.
93. Parra E., Alcaraz A., Cruz A., Aguilera V.M., Perez-Gil J.: *Hydrophobic pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C induce pore formation in planar lipid membranes: evidence for proteolipid pores*. Biophys J, 2013. **104**(1): 146-155.

94. Haagsman H.P.: *Structural and functional aspects of the collectin SP-A*. Immunobiology, 2002. **205**(4-5): 476-489.
95. Wright J.R.: *Immunoregulatory functions of surfactant proteins*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(1): 58-68.
96. Pastva A.M., Wright J.R., Williams K.L.: *Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease*. Proc Am Thorac Soc, 2007. **4**(3): 252-257.
97. Jakel A., Qaseem A.S., Kishore U., Sim R.B.: *Ligands and receptors of lung surfactant proteins SP-A and SP-D*. Front Biosci (Landmark Ed), 2013. **18**: 1129-1140.
98. Vandivier R.W., Ogden C.A., Fadok V.A., Hoffmann P.R., Brown K.K., Botto M., Walport M.J., Fisher J.H., Henson P.M., Greene K.E.: *Role of surfactant proteins A, D, and Clq in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex*. J Immunol, 2002. **169**(7): 3978-3986.
99. Davies J., Turner M., Klein N.: *The role of the collectin system in pulmonary defence*. Paediatr Respir Rev, 2001. **2**(1): 70-75.
100. Crouch E.C.: *Collectins and pulmonary host defense*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **19**(2): 177-201.
101. Mikerov A.N., Umstead T.M., Huang W., Liu W., Phelps D.S., Floros J.: *SP-A1 and SP-A2 variants differentially enhance association of Pseudomonas aeruginosa with rat alveolar macrophages*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **288**(1): L150-158.
102. Oberley R.E., Snyder J.M.: *Recombinant human SP-A1 and SP-A2 proteins have different carbohydrate-binding characteristics*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **284**(5): L871-881.
103. Kabha K., Schmegner J., Keisari Y., Parolis H., Schlepper-Schaeffer J., Ofek I.: *SP-A enhances phagocytosis of Klebsiella by interaction with capsular polysaccharides and alveolar macrophages*. Am J Physiol, 1997. **272**(2 Pt 1): L344-352.
104. Zimmerman P.E., Voelker D.R., McCormack F.X., Paulsrud J.R., Martin W.J., 2nd: *120-kD surface glycoprotein of Pneumocystis carinii is a ligand for surfactant protein A*. J Clin Invest, 1992. **89**(1): 143-149.
105. Benne C.A., Kraaijeveld C.A., van Strijp J.A., Brouwer E., Harmsen M., Verhoef J., van Golde L.M., van Iwaarden J.F.: *Interactions of surfactant protein A with influenza A viruses: binding and neutralization*. J Infect Dis, 1995. **171**(2): 335-341.
106. Ghildyal R., Hartley C., Varrasso A., Meanger J., Voelker D.R., Anders E.M., Mills J.: *Surfactant protein A binds to the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and neutralizes virion infectivity*. J Infect Dis, 1999. **180**(6): 2009-2013.
107. Mason R.J., Greene K., Voelker D.R.: *Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease*. Am J Physiol, 1998. **275**(1 Pt 1): L1-13.
108. van Iwaarden J.F., van Strijp J.A., Visser H., Haagsman H.P., Verhoef J., van Golde L.M.: *Binding of surfactant protein A (SP-A) to herpes simplex virus type 1-infected cells is mediated by the carbohydrate moiety of SP-A*. J Biol Chem, 1992. **267**(35): 25039-25043.
109. Ramet M., Haataja R., Marttila R., Hamalainen A.M., Knip M., Hallman M.: *Human surfactant protein-A gene locus for genetic studies in the Finnish population*. Dis Markers, 2000. **16**(3-4): 119-124.

110. Hoover R.R., Floros J.: *Organization of the human SP-A and SP-D loci at 10q22-q23. Physical and radiation hybrid mapping reveal gene order and orientation.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **18**(3): 353-362.
111. Liu W., Bentley C.M., Floros J.: *Study of human SP-A, SP-B and SP-D loci: allele frequencies, linkage disequilibrium and heterozygosity in different races and ethnic groups.* BMC Genet, 2003. **4**: 13; doi: 10.1186/1471-2156-4-13.
112. Floros J., Lin H.M., Garcia A., Salazar M.A., Guo X., DiAngelo S., Montano M., Luo J., Pardo A., Selman M.: *Surfactant protein genetic marker alleles identify a subgroup of tuberculosis in a Mexican population.* J Infect Dis, 2000. **182**(5): 1473-1478.
113. Hallman M., Haataja R.: *Surfactant protein polymorphisms and neonatal lung disease.* Semin Perinatol, 2006. **30**(6): 350-361.
114. Sorensen G.L., Husby S., Holmskov U.: *Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease.* Immunobiology, 2007. **212**(4-5): 381-416.
115. Takahashi H., Sano H., Chiba H., Kuroki Y.: *Pulmonary surfactant proteins A and D: innate immune functions and biomarkers for lung diseases.* Curr Pharm Des, 2006. **12**(5): 589-598.
116. Madsen J., Tornoe I., Nielsen O., Koch C., Steinhilber W., Holmskov U.: *Expression and localization of lung surfactant protein A in human tissues.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **29**(5): 591-597.
117. Floros J.: *Structure, function, and expression of pulmonary surfactant proteins; considerations for use in artificial surfactants. Part I. Introduction.* Pediatr Pathol Mol Med, 2001. **20**(4); doi: 10.1080/15513810109168820.
118. Haczku A.: *Protective role of the lung collectins surfactant protein A and surfactant protein D in airway inflammation.* J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(5): 861-879.
119. Silveyra P., Floros J.: *Genetic variant associations of human SP-A and SP-D with acute and chronic lung injury.* Front Biosci (Landmark Ed), 2012. **17**: 407-429.
120. Lin Z., Pearson C., Chinchilli V., Pietschmann S.M., Luo J., Pison U., Floros J.: *Polymorphisms of human SP-A, SP-B, and SP-D genes: association of SP-B Thr131Ile with ARDS.* Clin Genet, 2000. **58**(3): 181-191.
121. Lofgren J., Ramet M., Renko M., Marttila R., Hallman M.: *Association between surfactant protein A gene locus and severe respiratory syncytial virus infection in infants.* J Infect Dis, 2002. **185**(3): 283-289.
122. Malik S., Greenwood C.M., Eguale T., Kifle A., Beyene J., Habte A., Tadesse A., Gebrexabher H., Britton S., Schurr E.: *Variants of the SFTPA1 and SFTPA2 genes and susceptibility to tuberculosis in Ethiopia.* Hum Genet, 2006. **118**(6): 752-759.
123. Jack D.L., Cole J., Naylor S.C., Borrow R., Kaczmarek E.B., Klein N.J., Read R.C.: *Genetic polymorphism of the binding domain of surfactant protein-A2 increases susceptibility to meningococcal disease.* Clin Infect Dis, 2006. **43**(11): 1426-1433.
124. Crouch E., Persson A., Chang D., Heuser J.: *Molecular structure of pulmonary surfactant protein D (SP-D).* J Biol Chem, 1994. **269**(25): 17311-17319.
125. Hartshorn K.L., White M.R., Tecle T., Tornoe I., Sorensen G.L., Crouch E.C., Holmskov U.: *Reduced influenza viral neutralizing activity of natural human trimers of surfactant protein D.* Respir Res, 2007. **8**: 9; doi: 10.1186/1465-9921-8-9.

126. Murakami S., Iwaki D., Mitsuzawa H., Sano H., Takahashi H., Voelker D.R., Akino T., Kuroki Y.: *Surfactant protein A inhibits peptidoglycan-induced tumor necrosis factor-alpha secretion in U937 cells and alveolar macrophages by direct interaction with toll-like receptor 2*. J Biol Chem, 2002. **277**(9): 6830-6837.
127. Schelenz S., Malhotra R., Sim R.B., Holmskov U., Bancroft G.J.: *Binding of host collectins to the pathogenic yeast Cryptococcus neoformans: human surfactant protein D acts as an agglutinin for acapsular yeast cells*. Infect Immun, 1995. **63**(9): 3360-3366.
128. Meschi J., Crouch E.C., Skolnik P., Yahya K., Holmskov U., Leth-Larsen R., Tornoe I., Tecle T., White M.R., Hartshorn K.L.: *Surfactant protein D binds to human immunodeficiency virus (HIV) envelope protein gp120 and inhibits HIV replication*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 11): 3097-3107.
129. Crouch E., Rust K., Veile R., Donis-Keller H., Grosso L.: *Genomic organization of human surfactant protein D (SP-D). SP-D is encoded on chromosome 10q22.2-23.1*. J Biol Chem, 1993. **268**(4): 2976-2983.
130. Madsen J., Kliem A., Tornoe I., Skjodt K., Koch C., Holmskov U.: *Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues*. J Immunol, 2000. **164**(11): 5866-5870.
131. Wu H., Kuzmenko A., Wan S., Schaffer L., Weiss A., Fisher J.H., Kim K.S., McCormack F.X.: *Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability*. J Clin Invest, 2003. **111**(10): 1589-1602.
132. Postle A.D., Mander A., Reid K.B., Wang J.Y., Wright S.M., Moustaki M., Warner J.O.: *Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(1): 90-98.
133. Leth-Larsen R., Garred P., Jensenius H., Meschi J., Hartshorn K., Madsen J., Tornoe I., Madsen H.O., Sorensen G., Crouch E., Holmskov U.: *A common polymorphism in the SFTPD gene influences assembly, function, and concentration of surfactant protein D*. J Immunol, 2005. **174**(3): 1532-1538.
134. Lahti M., Lofgren J., Marttila R., Renko M., Klaavuniemi T., Haataja R., Ramet M., Hallman M.: *Surfactant protein D gene polymorphism associated with severe respiratory syncytial virus infection*. Pediatr Res, 2002. **51**(6): 696-699.
135. Ampuero S., Luchsinger V., Tapia L., Palomino M.A., Larranaga C.E.: *SP-A1, SP-A2 and SP-D gene polymorphisms in severe acute respiratory syncytial infection in Chilean infants*. Infect Genet Evol, 2011. **11**(6): 1368-1377.
136. Brandt E.B., Mingler M.K., Stevenson M.D., Wang N., Khurana Hershey G.K., Whitsett J.A., Rothenberg M.E.: *Surfactant protein D alters allergic lung responses in mice and human subjects*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(5): 1140-1147.
137. Deng Y.Q., Tao Z.Z., Kong Y.G., Xiao B.K., Chen S.M., Xu Y., Wang Y., He Q.: *Association between single nucleotide polymorphisms of surfactant protein D and allergic rhinitis in Chinese patients*. Tissue Antigens, 2009. **73**(6): 546-552.
138. Thomas N.J., Fan R., Diangelo S., Hess J.C., Floros J.: *Haplotypes of the surfactant protein genes A and D as susceptibility factors for the development of respiratory distress syndrome*. Acta Paediatr, 2007. **96**(7): 985-989.
139. Thomas N.J., DiAngelo S., Hess J.C., Fan R., Ball M.W., Geskey J.M., Willson D.F., Floros J.: *Transmission of surfactant protein variants and haplotypes in*

- children hospitalized with respiratory syncytial virus.* *Pediatr Res*, 2009. **66**(1): 70-73.
140. Shakoori T.A., Sin D.D., Bokhari S.N., Ghafoor F., Shakoori A.R.: *SP-D polymorphisms and the risk of COPD.* *Dis Markers*, 2012. **33**(2): 91-100.
 141. Abe S., Takahashi H.: [*Surfactant proteins A and D as biomarkers of disease activity in diffuse interstitial pneumonia*]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*, 2000. **38**(3): 157-65 (*artykuł w języku japońskim; wykorzystano streszczenie w języku angielskim*).
 142. Guzel A., Karadag A., Okuyucu A., Alacam H., Kucuk Y.: *The evaluation of serum surfactant protein D (SP-D) levels as a biomarker of lung injury in tuberculosis and different lung diseases.* *Clin Lab*, 2014. **60**(7): 1091-1098.
 143. Matsushita M.: *Ficolins*, [w:] *The Complement Factsbook 2018*, Academic Press, Elsevier, London. p. 45-56.
 144. Ren Y., Ding Q., Zhang X.: *Ficolins and infectious diseases.* *Viol Sin*, 2014. **29**(1): 25-32.
 145. Endo Y., Matsushita M., Fujita T.: *The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity.* *Int J Biochem Cell Biol*, 2011. **43**(5): 705-712.
 146. Matsushita M., Fujita T.: *The role of ficolins in innate immunity.* *Immunobiology*, 2002. **205**(4-5): 490-497.
 147. Kenjo A., Takahashi M., Matsushita M., Endo Y., Nakata M., Mizuochi T., Fujita T.: *Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, Halocynthia roretzi.* *J Biol Chem*, 2001. **276**(23): 19959-19965.
 148. Andrade F.A., Beltrame M.H., Bini V.B., Goncalves L.B., Boldt A.B., Messias-Reason I.J.: *Association of a new FCN3 haplotype with high ficolin-3 levels in leprosy.* *PLoS Negl Trop Dis*, 2017. **11**(2); doi: 10.1371/journal.pntd.0005409.
 149. Lu J., Tay P.N., Kon O.L., Reid K.B.: *Human ficolin: cDNA cloning, demonstration of peripheral blood leucocytes as the major site of synthesis and assignment of the gene to chromosome 9.* *Biochem J*, 1996. **313** (Pt 2): 473-478.
 150. Frederiksen P.D., Thiel S., Larsen C.B., Jensenius J.C.: *M-ficolin, an innate immune defence molecule, binds patterns of acetyl groups and activates complement.* *Scand J Immunol*, 2005. **62**(5): 462-473.
 151. Hummelshoj T., Munthe-Fog L., Madsen H.O., Garred P.: *Functional SNPs in the human ficolin (FCN) genes reveal distinct geographical patterns.* *Mol Immunol*, 2008. **45**(9): 2508-2520.
 152. Zhang J., Yang L., Ang Z., Yoong S.L., Tran T.T., Anand G.S., Tan N.S., Ho B., Ding J.L.: *Secreted M-ficolin anchors onto monocyte transmembrane G protein-coupled receptor 43 and cross talks with plasma C-reactive protein to mediate immune signaling and regulate host defense.* *J Immunol*, 2010. **185**(11): 6899-6910.
 153. Moreno-Amaral A.N., Gout E., Danella-Polli C., Tabarin F., Lesavre P., Pereira-da-Silva G., Thielens N.M., Halbwachs-Mecarelli L.: *M-ficolin and leukosialin (CD43): new partners in neutrophil adhesion.* *J Leukoc Biol*, 2012. **91**(3): 469-474.
 154. Rorvig S., Honore C., Larsson L.I., Ohlsson S., Pedersen C.C., Jacobsen L.C., Cowland J.B., Garred P., Borregaard N.: *Ficolin-1 is present in a highly mobilizable subset of human neutrophil granules and associates with the cell surface after stimulation with fMLP.* *J Leukoc Biol*, 2009. **86**(6): 1439-1449.
 155. Liu Y., Endo Y., Iwaki D., Nakata M., Matsushita M., Wada I., Inoue K., Munakata M., Fujita T.: *Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway.* *J Immunol*, 2005. **175**(5): 3150-3156.

156. Gout E., Moriscot C., Doni A., Dumestre-Perard C., Lacroix M., Perard J., Schoehn G., Mantovani A., Arlaud G.J., Thielens N.M.: *M-ficolin interacts with the long pentraxin PTX3: a novel case of cross-talk between soluble pattern-recognition molecules.* J Immunol, 2011. **186**(10): 5815-5822.
157. Gout E., Garlatti V., Smith D.F., Lacroix M., Dumestre-Perard C., Lunardi T., Martin L., Cesbron J.Y., Arlaud G.J., Gaboriaud C., Thielens N.M.: *Carbohydrate recognition properties of human ficolins: glycan array screening reveals the sialic acid binding specificity of M-ficolin.* J Biol Chem, 2010. **285**(9): 6612-6622.
158. Kajiwara H., Toda M., Mine T., Nakada H., Wariishi H., Yamamoto T.: *Visualization of sialic acid produced on bacterial cell surfaces by lectin staining.* Microbes Environ, 2010. **25**(3): 152-155.
159. Kjaer T.R., Hansen A.G., Sorensen U.B., Nielsen O., Thiel S., Jensenius J.C.: *Investigations on the pattern recognition molecule M-ficolin: quantitative aspects of bacterial binding and leukocyte association.* J Leukoc Biol, 2011. **90**(3): 425-437.
160. Kjaer T.R., Hansen A.G., Sorensen U.B., Holm A.T., Sorensen G.L., Jensenius J.C., Thiel S.: *M-ficolin binds selectively to the capsular polysaccharides of Streptococcus pneumoniae serotypes 19B and 19C and of a Streptococcus mitis strain.* Infect Immun, 2013. **81**(2): 452-459.
161. Haerynck F., Van Steen K., Cattaert T., Loeys B., Van Daele S., Schelstraete P., Claes K., Van Thielen M., De Canck I., Mahachie John J.M., De Baets F.: *Polymorphisms in the lectin pathway genes as a possible cause of early chronic Pseudomonas aeruginosa colonization in cystic fibrosis patients.* Hum Immunol, 2012. **73**(11): 1175-1183.
162. Favier A.L., Gout E., Reynard O., Ferraris O., Kleman J.P., Volchkov V., Peyrefitte C., Thielens N.M.: *Enhancement of Ebola virus infection via ficolin-1 interaction with the mucin domain of gp Glycoprotein.* J Virol, 2016. **90**(11): 5256-5269.
163. Varki A.: *Sialic acids in human health and disease.* Trends Mol Med, 2008. **14**(8): 351-360.
164. Honore C., Rorvig S., Hummelshoj T., Skjoedt M.O., Borregaard N., Garred P.: *Tethering of Ficolin-1 to cell surfaces through recognition of sialic acid by the fibrinogen-like domain.* J Leukoc Biol, 2010. **88**(1): 145-158.
165. Genster N., Ma Y.J., Munthe-Fog L., Garred P.: *The pattern recognition molecule ficolin-1 exhibits differential binding to lymphocyte subsets, providing a novel link between innate and adaptive immunity.* Mol Immunol, 2014. **57**(2): 181-190.
166. Ammitzboll C.G., Kjaer T.R., Steffensen R., Stengaard-Pedersen K., Nielsen H.J., Thiel S., Bogsted M., Jensenius J.C.: *Non-synonymous polymorphisms in the FCNI gene determine ligand-binding ability and serum levels of M-ficolin.* PLoS One, 2012. **7**(11); doi: 10.1371/journal.pone.0050585.
167. Honore C., Rorvig S., Munthe-Fog L., Hummelshoj T., Madsen H.O., Borregaard N., Garred P.: *The innate pattern recognition molecule Ficolin-1 is secreted by monocytes/macrophages and is circulating in human plasma.* Mol Immunol, 2008. **45**(10): 2782-2789.
168. Wittenborn T., Thiel S., Jensen L., Nielsen H.J., Jensenius J.C.: *Characteristics and biological variations of M-ficolin, a pattern recognition molecule, in plasma.* J Innate Immun, 2010. **2**(2): 167-180.

169. Troldborg A., Hansen A., Hansen S.W., Jensenius J.C., Stengaard-Pedersen K., Thiel S.: *Lectin complement pathway proteins in healthy individuals*. Clin Exp Immunol, 2017. **188**(1): 138-147.
170. Munthe-Fog L., Hummelshoj T., Honore C., Moller M.E., Skjoedt M.O., Palsgaard I., Borregaard N., Madsen H.O., Garred P.: *Variation in FCN1 affects biosynthesis of ficolin-1 and is associated with outcome of systemic inflammation*. Genes Immun, 2012. **13**(7): 515-522.
171. Boldt A.B., Sanchez M.I., Stahlke E.R., Steffensen R., Thiel S., Jensenius J.C., Prevedello F.C., Mira M.T., Kun J.F., Messias-Reason I.J.: *Susceptibility to leprosy is associated with M-ficolin polymorphisms*. J Clin Immunol, 2013. **33**(1): 210-219.
172. Vander Cruyssen B., Nuytinck L., Boullart L., Elewaut D., Waegeman W., Van Thielen M., De Meester E., Lebeer K., Rossau R., De Keyser F.: *Polymorphisms in the ficolin 1 gene (FCN1) are associated with susceptibility to the development of rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(12): 1792-1795.
173. Anjosa Z.P., Santos M.M., Rodrigues N.J., Lacerda G.A., Araujo J., Silva J.A., Tavares N.A., Guimaraes R.L., Crovella S., Brandao L.A.: *Polymorphism in ficolin-1 (FCN1) gene is associated with an earlier onset of type 1 diabetes mellitus in children and adolescents from northeast Brazil*. J Genet, 2016. **95**(4): 1031-1034.
174. Zhang X.L., Ali M.A.: *Ficolins: structure, function and associated diseases*. Adv Exp Med Biol, 2008. **632**: 105-115.
175. Schlapbach L.J., Thiel S., Aebi C., Hirt A., Leibundgut K., Jensenius J.C., Ammann R.A.: *M-ficolin in children with cancer*. Immunobiology, 2011. **216**(5): 633-638.
176. Tanha N., Pilely K., Faurschou M., Garred P., Jacobsen S.: *Plasma ficolin levels and risk of nephritis in Danish patients with systemic lupus erythematosus*. Clin Rheumatol, 2017. **36**(2): 335-341.
177. Schlapbach L.J., Kjaer T.R., Thiel S., Mattmann M., Nelle M., Wagner B.P., Ammann R.A., Aebi C., Jensenius J.C.: *M-ficolin concentrations in cord blood are related to circulating phagocytes and to early-onset sepsis*. Pediatr Res, 2012. **71**(4 Pt 1): 368-374.
178. Swierzko A.S., Szala-Pozdziej A., Kilpatrick D.C., Sobocinski M., Chojnacka K., Sokolowska A., Michalski M., Mazerant K., Jensenius J.C., Matsushita M., Krajewski W.R., Szczapa J., Bak-Romaniszyn L., Zeman K., Cedzynski M.: *Components of the lectin pathway of complement activation in paediatric patients of intensive care units*. Immunobiology, 2016. **221**(5): 657-669.
179. Schlapbach L.J., Kessler U., Thiel S., Hansen A.G., Nelle M., Ammann R.A., Aebi C., Jensenius J.C.: *M-ficolin in the neonatal period: Associations with need for mechanical ventilation and mortality in premature infants with necrotising enterocolitis*. Mol Immunol, 2009. **46**(13): 2597-2603.
180. Matsushita M., Endo Y., Taira S., Sato Y., Fujita T., Ichikawa N., Nakata M., Mizuochi T.: *A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin*. J Biol Chem, 1996. **271**(5): 2448-2454.
181. Endo Y., Liu Y., Fujita T.: *Structure and function of ficolins*. Adv Exp Med Biol, 2006. **586**: 265-279.
182. Krarup A., Sorensen U.B., Matsushita M., Jensenius J.C., Thiel S.: *Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern*

- recognition molecules mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin.* Infect Immun, 2005. **73**(2): 1052-1060.
183. Ali Y.M., Lynch N.J., Haleem K.S., Fujita T., Endo Y., Hansen S., Holmskov U., Takahashi K., Stahl G.L., Dudler T., Girija U.V., Wallis R., Kadioglu A., Stover C.M., Andrew P.W., Schwaebler W.J.: *The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection.* PLoS Pathog, 2012. **8**(7); doi: 10.1371/journal.ppat.1002793.
 184. Ma Y.G., Cho M.Y., Zhao M., Park J.W., Matsushita M., Fujita T., Lee B.L.: *Human mannose-binding lectin and L-ficolin function as specific pattern recognition proteins in the lectin activation pathway of complement.* J Biol Chem, 2004. **279**(24): 25307-25312.
 185. Ma Y.J., Doni A., Hummelshoj T., Honore C., Bastone A., Mantovani A., Thielens N.M., Garred P.: *Synergy between ficolin-2 and pentraxin 3 boosts innate immune recognition and complement deposition.* J Biol Chem, 2009. **284**(41): 28263-28275.
 186. Pan Q., Chen H., Wang F., Jeza V.T., Hou W., Zhao Y., Xiang T., Zhu Y., Endo Y., Fujita T., Zhang X.L.: *L-ficolin binds to the glycoproteins hemagglutinin and neuraminidase and inhibits influenza A virus infection both in vitro and in vivo.* J Innate Immun, 2012. **4**(3): 312-324.
 187. Kuraya M., Ming Z., Liu X., Matsushita M., Fujita T.: *Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation.* Immunobiology, 2005. **209**(9): 689-697.
 188. Jensen M.L., Honore C., Hummelshoj T., Hansen B.E., Madsen H.O., Garred P.: *Ficolin-2 recognizes DNA and participates in the clearance of dying host cells.* Mol Immunol, 2007. **44**(5): 856-865.
 189. Endo Y., Sato Y., Matsushita M., Fujita T.: *Cloning and characterization of the human lectin P35 gene and its related gene.* Genomics, 1996. **36**(3): 515-521.
 190. Szala A., Sawicki S., Swierzko A.S., Szemraj J., Sniadecki M., Michalski M., Kaluzynski A., Lukasiewicz J., Maciejewska A., Wydra D., Kilpatrick D.C., Matsushita M., Cedzynski M.: *Ficolin-2 and ficolin-3 in women with malignant and benign ovarian tumours.* Cancer Immunol Immunother, 2013. **62**(8): 1411-1419.
 191. Le Y., Lee S.H., Kon O.L., Lu J.: *Human L-ficolin: plasma levels, sugar specificity, and assignment of its lectin activity to the fibrinogen-like (FBG) domain.* FEBS Lett, 1998. **425**(2): 367-370.
 192. Kilpatrick D.C., Fujita T., Matsushita M.: *P35, an opsonic lectin of the ficolin family, in human blood from neonates, normal adults, and recurrent miscarriage patients.* Immunol Lett, 1999. **67**(2): 109-112.
 193. Munthe-Fog L., Hummelshoj T., Hansen B.E., Koch C., Madsen H.O., Skjodt K., Garred P.: *The impact of FCN2 polymorphisms and haplotypes on the Ficolin-2 serum levels.* Scand J Immunol, 2007. **65**(4): 383-392.
 194. Herpers B.L., Immink M.M., de Jong B.A., van Velzen-Blad H., de Jongh B.M., van Hannen E.J.: *Coding and non-coding polymorphisms in the lectin pathway activator L-ficolin gene in 188 Dutch blood bank donors.* Mol Immunol, 2006. **43**(7): 851-855.
 195. Cedzynski M., Nuytinck L., Atkinson A.P., Swierzko A. St., Zeman K., Szemraj J., Szala A., Turner M.L., Kilpatrick D.C.: *Extremes of L-ficolin concentration in children with recurrent infections are associated with single nucleotide polymorphisms in the FCN2 gene.* Clin Exp Immunol, 2007. **150**(1): 99-104.

196. Kilpatrick D.C., Swierzko A. St., Matsushita M., Domzalska-Popadiuk I., Borkowska-Klos M., Szczapa J., Cedzynski M.: *The relationship between FCN2 genotypes and serum ficolin-2 (L-ficolin) protein concentrations from a large cohort of neonates*. Hum Immunol, 2013. **74**(7): 867-871.
197. Hummelshoj T., Munthe-Fog L., Madsen H.O., Fujita T., Matsushita M., Garred P.: *Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of Ficolin-2*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(12): 1651-1658.
198. Mishra A., Antony J.S., Sundaravadivel P., Tong H.V., Meyer C.G., Jalli R.D., Velavan T.P., Thangaraj K.: *Association of ficolin-2 serum levels and FCN2 genetic variants with Indian visceral leishmaniasis*. PLoS One, 2015. **10**(5); doi: 10.1371/journal.pone.0125940.
199. Atkinson A.P., Cedzynski M., Szemraj J., Swierzko A St., Bak-Romaniszyn L., Banasik M., Zeman K., Matsushita M., Turner M.L., Kilpatrick D.C.: *L-ficolin in children with recurrent respiratory infections*. Clin Exp Immunol, 2004. **138**(3): 517-520.
200. de Messias-Reason I., Kremsner P.G., Kun J.F.: *Functional haplotypes that produce normal ficolin-2 levels protect against clinical leprosy*. J Infect Dis, 2009. **199**(6): 801-804.
201. Schlapbach L.J., Mattmann M., Thiel S., Boillat C., Otth M., Nelle M., Wagner B., Jensenius J.C., Aebi C.: *Differential role of the lectin pathway of complement activation in susceptibility to neonatal sepsis*. Clin Infect Dis, 2010. **51**(2): 153-162.
202. Kilpatrick D.C., McLintock L.A., Allan E.K., Copland M., Fujita T., Jordanides N.E., Koch C., Matsushita M., Shiraki H., Stewart K., Tsujimura M., Turner M.L., Franklin I.M., Holyoake T.L.: *No strong relationship between mannan binding lectin or plasma ficolins and chemotherapy-related infections*. Clin Exp Immunol, 2003. **134**(2): 279-284.
203. Ameye L., Paesmans M., Thiel S., Jensenius J.C., Aoun M.: *M-ficolin levels are associated with the occurrence of severe infections in patients with haematological cancer undergoing chemotherapy*. Clin Exp Immunol, 2012. **167**(2): 303-308.
204. Sugimoto R., Yae Y., Akaiwa M., Kitajima S., Shibata Y., Sato H., Hirata J., Okochi K., Izuhara K., Hamasaki N.: *Cloning and characterization of the Hakata antigen, a member of the ficolin/opsin p35 lectin family*. J Biol Chem, 1998. **273**(33): 20721-20727.
205. Degn S.E., Thiel S.: *Humoral pattern recognition and the complement system*. Scand J Immunol, 2013. **78**(2): 181-193.
206. Tsujimura M., Ishida C., Sagara Y., Miyazaki T., Murakami K., Shiraki H., Okochi K., Maeda Y.: *Detection of serum thermolabile beta-2 macroglycoprotein (Hakata antigen) by enzyme-linked immunosorbent assay using polysaccharide produced by Aerococcus viridans*. Clin Diagn Lab Immunol, 2001. **8**(2): 454-459.
207. Swierzko A., Lukasiewicz J., Cedzynski M., Maciejewska A., Jachymek W., Niedziela T., Matsushita M., Lugowski C.: *New functional ligands for ficolin-3 among lipopolysaccharides of Hafnia alvei*. Glycobiology, 2012. **22**(2): 267-280.
208. Michalski M., Swierzko A. St., Lukasiewicz J., Man-Kupisinska A., Karwaciak I., Przygodzka P., Cedzynski M.: *Ficolin-3 activity towards the opportunistic pathogen, Hafnia alvei*. Immunobiology, 2015. **220**(1): 117-123.

209. Sahagun-Ruiz A., Breda L.C., Valencia M.M., Elias W.P., Munthe-Fog L., Garred P., Barbosa A.S., Isaac L.: *Studies of the binding of ficolin-2 and ficolin-3 from the complement lectin pathway to Leptospira biflexa, Pasteurella pneumotropica and Diarrheogenic Escherichia coli.* Immunobiology, 2015. **220**(10): 1177-1185.
210. Bidula S., Sexton D.W., Yates M., Abdolrasouli A., Shah A., Wallis R., Reed A., Armstrong-James D., Schelenz S.: *H-ficolin binds Aspergillus fumigatus leading to activation of the lectin complement pathway and modulation of lung epithelial immune responses.* Immunology, 2015. **146**(2): 281-291.
211. Cestari Idos S., Krarup A., Sim R.B., Inal J.M., Ramirez M.I.: *Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of Trypanosoma cruzi.* Mol Immunol, 2009. **47**(2-3): 426-437.
212. Evans-Osses I., Ansa-Addo E.A., Inal J.M., Ramirez M.I.: *Involvement of lectin pathway activation in the complement killing of Giardia intestinalis.* Biochem Biophys Res Commun, 2010. **395**(3): 382-386.
213. Verma A., White M., Vathipadiekal V., Tripathi S., Mbianda J., Jeong M., Qi L., Taubenberger J.K., Takahashi K., Jensenius J.C., Thiel S., Hartshorn K.L.: *Human H-ficolin inhibits replication of seasonal and pandemic influenza A viruses.* J Immunol, 2012. **189**(5): 2478-2487.
214. Honore C., Hummelshoj T., Hansen B.E., Madsen H.O., Eggleton P., Garred P.: *The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells.* Arthritis Rheum, 2007. **56**(5): 1598-1607.
215. Bay J.T., Hein E., Sorensen S.S., Hansen J.M., Garred P.: *Pre-transplant levels of ficolin-3 are associated with kidney graft survival.* Clin Immunol, 2013. **146**(3): 240-247.
216. Wang C.C., Yim K.W., Poon T.C., Choy K.W., Chu C.Y., Lui W.T., Lau T.K., Rogers M.S., Leung T.N.: *Innate immune response by ficolin binding in apoptotic placenta is associated with the clinical syndrome of preeclampsia.* Clin Chem, 2007. **53**(1): 42-52.
217. Michalski M., Szala A., Swierzko A. St., Lukasiewicz J., Maciejewska A., Kilpatrick D.C., Matsushita M., Domzalska-Popadiuk I., Borkowska-Klos M., Sokolowska A., Szczapa J., Lugowski C., Cedzynski M.: *H-ficolin (ficolin-3) concentrations and FCN3 gene polymorphism in neonates.* Immunobiology, 2012. **217**(7): 730-737.
218. Munthe-Fog L., Hummelshoj T., Honore C., Madsen H.O., Permin H., Garred P.: *Immunodeficiency associated with FCN3 mutation and ficolin-3 deficiency.* N Engl J Med, 2009. **360**(25): 2637-2644.
219. Munthe-Fog L., Hummelshoj T., Ma Y.J., Hansen B.E., Koch C., Madsen H.O., Skjodt K., Garred P.: *Characterization of a polymorphism in the coding sequence of FCN3 resulting in a Ficolin-3 (Hakata antigen) deficiency state.* Mol Immunol, 2008. **45**(9): 2660-2666.
220. Schlapbach L.J., Thiel S., Kessler U., Ammann R.A., Aebi C., Jensenius J.C.: *Congenital H-ficolin deficiency in premature infants with severe necrotising enterocolitis.* Gut, 2011. **60**(10): 1438-1439.
221. Michalski M., Swierzko A.S., Pagowska-Klimek I., Niemir Z.I., Mazerant K., Domzalska-Popadiuk I., Moll M., Cedzynski M.: *Primary Ficolin-3 deficiency - Is it associated with increased susceptibility to infections?* Immunobiology, 2015. **220**(6): 711-713.
222. Metzger M.L., Michelfelder I., Goldacker S., Melkaoui K., Litzman J., Guzman D., Grimbacher B., Salzer U.: *Low ficolin-2 levels in common variable*

- immunodeficiency patients with bronchiectasis*. Clin Exp Immunol, 2015. **179**(2): 256-264.
223. Troldborg A., Thiel S., Trendelenburg M., Friebus-Kardash J., Nehring J., Steffensen R., Hansen S.W.K., Laska M.J., Deleuran B., Jensenius J.C., Voss A., Stengaard-Pedersen K.: *The lectin pathway of complement activation in patients with systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 2018. **45**(8): 1136-1144.
224. Schlapbach L.J., Aebi C., Hansen A.G., Hirt A., Jensenius J.C., Ammann R.A.: *H-ficolin serum concentration and susceptibility to fever and neutropenia in paediatric cancer patients*. Clin Exp Immunol, 2009. **157**(1): 83-89.
225. Zhang X., Hu Y., Shen J., Zeng H., Lu J., Li L., Bao Y., Liu F., Jia W.: *Low levels of ficolin-3 are associated with diabetic peripheral neuropathy*. Acta Diabetol, 2016. **53**(2): 295-302.
226. Troldborg A., Steffensen R., Trendelenburg M., Hauser T., Winther K.G., Hansen A.G., Stengaard-Pedersen K., Voss A., Thiel S.: *Ficolin-3 deficiency is associated with disease and an increased risk of systemic lupus erythematosus*. J Clin Immunol, 2019. **39**(4): 421-429.
227. Bonar A., Chmiela M., Rudnicka W., Rozalska B.: *Mannose-binding lectin enhances the attachment and phagocytosis of mycobacteria in vitro*. Arch Immunol Ther Exp, 2005. **53**(5): 437-441.
228. Ferguson J.S., Voelker D.R., McCormack F.X., Schlesinger L.S.: *Surfactant protein D binds to Mycobacterium tuberculosis bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages*. J Immunol, 1999. **163**(1): 312-321.
229. Sidobre S., Puzo G., Riviere M.: *Lipid-restricted recognition of mycobacterial lipoglycans by human pulmonary surfactant protein A: a surface-plasmon-resonance study*. Biochem J, 2002. **365**(Pt 1): 89-97.
230. Lemos M.P., McKinney J., Rhee K.Y.: *Dispensability of surfactant proteins A and D in immune control of Mycobacterium tuberculosis infection following aerosol challenge of mice*. Infect Immun, 2011. **79**(3): 1077-1085.
231. Gaynor C.D., McCormack F.X., Voelker D.R., McGowan S.E., Schlesinger L.S.: *Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis by a direct interaction with human macrophages*. J Immunol, 1995. **155**(11): 5343-5351.
232. Gold J.A., Hoshino Y., Tanaka N., Rom W.N., Raju B., Condos R., Weiden M.D.: *Surfactant protein A modulates the inflammatory response in macrophages during tuberculosis*. Infect Immun, 2004. **72**(2): 645-650.
233. Pasula R., Downing J.F., Wright J.R., Kachel D.L., Davis T.E., Jr., Martin W.J., 2nd: *Surfactant protein A (SP-A) mediates attachment of Mycobacterium tuberculosis to murine alveolar macrophages*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **17**(2): 209-217.
234. Pasula R., Wright J.R., Kachel D.L., Martin W.J., 2nd: *Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Invest, 1999. **103**(4): 483-490.
235. Weikert L.F., Lopez J.P., Abdolrasulnia R., Chroneos Z.C., Shepherd V.L.: *Surfactant protein A enhances mycobacterial killing by rat macrophages through a nitric oxide-dependent pathway*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(2): L216-223.

236. Lopez J.P., Clark E., Shepherd V.L.: *Surfactant protein A enhances Mycobacterium avium ingestion but not killing by rat macrophages*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(4): 523-530.
237. Ferguson J.S., Martin J.L., Azad A.K., McCarthy T.R., Kang P.B., Voelker D.R., Crouch E.C., Schlesinger L.S.: *Surfactant protein D increases fusion of Mycobacterium tuberculosis-containing phagosomes with lysosomes in human macrophages*. Infect Immun, 2006. **74**(12): 7005-7009.
238. Moliva J.I., Duncan M.A., Olmo-Fontanez A., Akhter A, Arnett E., Scordo J.M., Ault R., Sasindran S.J., Azad A.K., Montoya M.J., Reinhold-Larsson N., Rajaram M.V.S., Merrit R.E., Lafuse W.P., Zhang L., Wang S.H., Beamer G., Wang Y., Proud K., Maselli D.J., Peters J., Weintraub S.T., Turner J., Schlesinger L.S., Torrelles J.B.: *The lung mucosa environment in the elderly increases host susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection*. J Infect Dis, 2019. **220**(3): 514-523.
239. Luo F., Sun X., Wang Y., Wang Q., Wu Y., Pan Q., Fang C., Zhang X.L.: *Ficolin-2 defends against virulent Mycobacteria tuberculosis infection in vivo, and its insufficiency is associated with infection in humans*. PLoS One, 2013. **8**(9): doi: 10.1371/journal.pone.0073859.
240. Carroll M.V., Lack N., Sim E., Krarup A., Sim R.B.: *Multiple routes of complement activation by Mycobacterium bovis BCG*. Mol Immunol, 2009. **46**(16): 3367-3378.
241. Lachmann P.: *Complement before molecular biology*. Mol Immunol, 2006. **43**(6): 496-508.
242. Rus H., Cudrici C., Niculescu F.: *The role of the complement system in innate immunity*. Immunol Res, 2005. **33**(2): 103-112.
243. Remes A., Williams D.F.: *Relationship between chemotaxis and complement activation by ceramic biomaterials*. Biomaterials, 1991. **12**(7): 661-667.
244. Tegla C.A., Cudrici C., Patel S., Trippe R. 3rd, Rus V., Niculescu F., Rus H.: *Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes*. Immunol Res, 2011. **51**(1): 45-60.
245. Hallstrom T., Riesbeck K.: *Haemophilus influenzae and the complement system*. Trends Microbiol, 2010. **18**(6): 258-265.
246. Mold C., Gewurz H., Du Clos T.W.: *Regulation of complement activation by C-reactive protein*. Immunopharmacology, 1999. **42**(1-3): 23-30.
247. Trouw L.A., Daha M.R.: *Role of complement in innate immunity and host defense*. Immunol Lett, 2011. **138**(1): 35-37.
248. Ehrnthaller C., Ignatius A., Gebhard F., Huber-Lang M.: *New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system*. Mol Med, 2011. **17**(3-4): 317-329.
249. Madalinski K., Cedzynski M., Swierzko A., Szczepanska-Szerej A.: *Układ dopełniacza-efektor reakcji zapalnej. Możliwość regulacji aktywności dopełniacza w chorobach niedokrwiniowych*. Przegl Epidemiol, 2007. **61**(4): 701-711.
250. Takahashi M., Iwaki D., Kanno K., Ishida Y., Xiong J., Matsushita M., Endo Y., Miura S., Ishii N., Sugamura K., Fujita T.: *Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway*. J Immunol, 2008. **180**(9): 6132-6138.
251. Dobo J., Szakacs D., Oroszlan G., Kortvely E., Kiss B., Boros E., Szasz R., Zavodszky P., Gal P., Pal G.: *MASP-3 is the exclusive pro-factor D activator in*

- resting blood: the lectin and the alternative complement pathways are fundamentally linked.* Sci Rep, 2016. **6**: 31877; doi: 10.1038/srep31877.
252. Thiel S.: *Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins.* Mol Immunol, 2007. **44**(16): 3875-3888.
 253. Wallis R.: *Structural and functional aspects of complement activation by mannose-binding protein.* Immunobiology, 2002. **205**(4-5): 433-445.
 254. Degn S.E., Jensen L., Hansen A.G., Duman D., Tekin M., Jensenius J.C., Thiel S.: *Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function.* J Immunol, 2012. **189**(8): 3957-3969.
 255. Takahashi M., Mori S., Shigeta S., Fujita T.: *Role of MBL-associated serine protease (MASP) on activation of the lectin complement pathway.* Adv Exp Med Biol, 2007. **598**: 93-104.
 256. Degn S.E., Hansen A.G., Steffensen R., Jacobsen C., Jensenius J.C., Thiel S.: *MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation.* J Immunol, 2009. **183**(11): 7371-7378.
 257. Skjoedt M.O., Hummelshoj T., Palarasah Y., Honore C., Koch C., Skjodt K., Garred P.: *A novel mannose-binding lectin/ficolin-associated protein is highly expressed in heart and skeletal muscle tissues and inhibits complement activation.* J Biol Chem, 2010. **285**(11): 8234-8243.
 258. Sato T., Endo Y., Matsushita M., Fujita T.: *Molecular characterization of a novel serine protease involved in activation of the complement system by mannose-binding protein.* Int Immunol, 1994. **6**(4): 665-669.
 259. Sorensen R., Thiel S., Jensenius J.C.: *Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations.* Springer Semin Immunopathol, 2005. **27**(3): 299-319.
 260. Yongqing T., Drentin N., Duncan R.C., Wijeyewickrema L.C., Pike R.N.: *Mannose-binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: two genes, five proteins and many functions?* Biochim Biophys Acta, 2012. **1824**(1): 253-262.
 261. Degn S.E., Thiel S., Nielsen O., Hansen A.G., Steffensen R., Jensenius J.C.: *MAp19, the alternative splice product of the MASP2 gene.* J Immunol Methods, 2011. **373**(1-2): 89-101.
 262. Chen C.B., Wallis R.: *Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases.* J Biol Chem, 2004. **279**(25): 26058-26065.
 263. Parej K., Kocsis A., Enyingi C., Dani R., Oroszlan G., Beinrohr L., Dobo J., Zavodszky P., Pal G., Gal P.: *Cutting Edge: A new player in the alternative complement pathway, MASP-1 is essential for LPS-Induced, but not for zymosan-induced, alternative pathway activation.* J Immunol, 2018. **200**(7): 2247-2252.
 264. Hajela K., Kojima M., Ambrus G., Wong K.H., Moffatt B.E., Ferluga J., Hajela S., Gal P., Sim R.B.: *The biological functions of MBL-associated serine proteases (MASPs).* Immunobiology, 2002. **205**(4-5): 467-475.
 265. Gulla K.C., Gupta K., Krarup A., Gal P., Schwaeble W.J., Sim R.B., O'Connor C.D., Hajela K.: *Activation of mannan-binding lectin-associated serine*

- proteases leads to generation of a fibrin clot. Immunology, 2010. 129(4): 482-495.*
266. Jenny L., Dobo J., Gal P., Schroeder V.: *MASP-1 of the complement system promotes clotting via prothrombin activation. Mol Immunol, 2015. 65(2): 398-405.*
 267. Megyeri M., Mako V., Beinrohr L., Doleschall Z., Prohaszka Z., Cervenak L., Zavodszky P., Gal P.: *Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function. J Immunol, 2009. 183(5): 3409-3416.*
 268. Dobo J., Major B., Kekesi K.A., Szabo I., Megyeri M., Hajela K., Juhasz G., Zavodszky P., Gal P.: *Cleavage of kininogen and subsequent bradykinin release by the complement component: mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1. PLoS One, 2011. 6(5); doi: 10.1371/journal.pone.0020036.*
 269. Degn S.E., Jensen L., Gal P., Dobo J., Holmvad S.H., Jensenius J.C., Thiel S.: *Biological variations of MASP-3 and MAP44, two splice products of the MASPI gene involved in regulation of the complement system. J Immunol Methods, 2010. 361(1-2): 37-50.*
 270. Dobo J., Pal G., Cervenak L., Gal P.: *The emerging roles of mannose-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) in the lectin pathway of complement and beyond. Immunol Rev, 2016. 274(1): 98-111.*
 271. Pihl R., Jensen L., Hansen A.G., Thogersen I.B., Andres S., Dagnaes-Hansen F., Oexle K., Enghild J.J., Thiel S.: *Analysis of factor D isoforms in Malpuech-Michels-Mingarelli-Carnevale patients highlights the role of MASP-3 as a maturase in the alternative pathway of complement. J Immunol, 2017; doi: 10.4049/jimmunol.1700518.*
 272. Takada F., Seki N., Matsuda Y., Takayama Y., Kawakami M.: *Localization of the genes for the 100-kDa complement-activating components of Ra-reactive factor (CRARF and Crarf) to human 3q27-q28 and mouse 16B2-B3. Genomics, 1995. 25(3): 757-759.*
 273. Ammitzboll C.G., Steffensen R., Jorgen Nielsen H., Thiel S., Stengaard-Pedersen K., Bogsted M., Jensenius J.C.: *Polymorphisms in the MASPI gene are associated with serum levels of MASP-1, MASP-3, and MAP44. PLoS One, 2013. 8(9); doi: 10.1371/journal.pone.0073317.*
 274. Beltrame M.H., Boldt A.B., Catarino S.J., Mendes H.C., Boschmann S.E., Goeldner I., Messias-Reason I.: *MBL-associated serine proteases (MASPs) and infectious diseases. Mol Immunol, 2015. 67(1): 85-100.*
 275. Moller-Kristensen M., Jensenius J.C., Jensen L., Thielens N., Rossi V., Arlaud G., Thiel S.: *Levels of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 in healthy individuals. J Immunol Methods, 2003. 282(1-2): 159-167.*
 276. Terai I., Kobayashi K., Matsushita M., Fujita T.: *Human serum mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1): determination of levels in body fluids and identification of two forms in serum. Clin Exp Immunol, 1997. 110(2): 317-323.*
 277. Knittel T., Fellmer P., Neubauer K., Kawakami M., Grundmann A., Ramadori G.: *The complement-activating protease P100 is expressed by hepatocytes and is induced by IL-6 in vitro and during the acute phase reaction in vivo. Lab Invest, 1997. 77(3): 221-230.*
 278. Rossi V., Cseh S., Bally I., Thielens N.M., Jensenius J.C., Arlaud G.J.: *Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. J Biol Chem, 2001. 276(44): 40880-40887.*

279. Krarup A., Wallis R., Presanis J.S., Gal P., Sim R.B.: *Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2*. PLoS One, 2007. **2**(7); doi: 10.1371/journal.pone.0000623.
280. Kang I., Kim J.I., Chang S.G., Lee S.J., Choi S.L., Ha J., Kim S.S.: *Mannan-binding lectin (MBL)-associated plasma protein present in human urine inhibits calcium oxalate crystal growth*. FEBS Lett, 1999. **462**(1-2): 89-93.
281. Stengaard-Pedersen K., Thiel S., Gadjeva M., Moller-Kristensen M., Sorensen R., Jensen L.T., Sjöholm A.G., Fugger L., Jensenius J.C.: *Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2*. N Engl J Med, 2003. **349**(6): 554-560.
282. Boldt A.B., Luz P.R., Messias-Reason I.J.: *MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic Chagas disease*. Clin Immunol, 2011. **140**(1): 63-70.
283. Ytting H., Christensen I.J., Steffensen R., Alsner J., Thiel S., Jensenius J.C., Hansen U., Nielsen H.J.: *Mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease 2 (MASP-2) genotypes in colorectal cancer*. Scand J Immunol, 2011. **73**(2): 122-127.
284. Thiel S., Kolev M., Degn S., Steffensen R., Hansen A.G., Ruseva M., Jensenius J.C.: *Polymorphisms in mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease 2 affect stability, binding to MBL, and enzymatic activity*. J Immunol, 2009. **182**(5): 2939-2947.
285. Bjarnadóttir H., Arnadóttir M., Ludvíksson B.R.: *Frequency and distribution of FCN2 and FCN3 functional variants among MBL2 genotypes*. Immunogenetics, 2016. **68**(5): 315-325.
286. Sokolowska A., Szala A., Swierzko A. St., Kozinska M., Niemiec T., Blachnio M., Augustynowicz-Kopec E., Dziadek J., Cedzynski M.: *Mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2) deficiency in two patients with pulmonary tuberculosis and one healthy control*. Cell Mol Immunol, 2015. **12**(1): 119-121.
287. Goeldner I., Skare T., Boldt A.B., Nass F.R., Messias-Reason I.J., Utiyama S.R.: *Association of MASP-2 levels and MASP2 gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in patients and their relatives*. PLoS One, 2014. **9**(3); doi: 10.1371/journal.pone.0090979.
288. Thiel S., Steffensen R., Christensen I.J., Ip W.K., Lau Y.L., Reason I.J., Eiberg H., Gadjeva M., Ruseva M., Jensenius J.C.: *Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms*. Genes Immun, 2007. **8**(2): 154-163.
289. Majewska M., Szczepanik M.: *Rola receptorów toll-podobnych (TLR) w odporności wrodzonej i nabytej oraz ich funkcja w regulacji odpowiedzi immunologicznej*. Postepy Hig Med Dosw, 2006. **60**: 52-63.
290. Krutzik S.R., Modlin R.L.: *The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria*. Semin Immunol, 2004. **16**(1): 35-41.
291. Hasan U., Chaffois C., Gaillard C., Saulnier V., Merck E., Tancredi S., Guet C., Briere F., Vlach J., Lebecque S., Trinchieri G., Bates E.E.: *Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88*. J Immunol, 2005. **174**(5): 2942-2950.
292. Zhang D., Zhang G., Hayden M.S., Greenblatt M.B., Bussey C., Flavell R.A., Ghosh S.: *A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): 1522-1526.

293. Zarembek K.A., Godowski P.J.: *Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines*. J Immunol, 2002. **168**(2): 554-61.
294. Kumar H., Kawai T., Akira S.: *Pathogen recognition in the innate immune response*. Biochem J, 2009. **420**(1): 1-16.
295. Matsushima N., Tanaka T., Enkhbayar P., Mikami T., Taga M., Yamada K., Kuroki Y.: *Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors*. BMC Genomics, 2007. **8**: 124; doi: 10.1186/1471-2164-8-124.
296. Midwood K.S., Piccinini A.M., Sacre S.: *Targeting Toll-like receptors in autoimmunity*. Curr Drug Targets, 2009. **10**(11): 1139-1155.
297. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O.: *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): 783-801.
298. Henrick B.M., Yao X.D., Zahoor M.A., Abimiku A., Osawe S., Rosenthal K.L.: *TLR10 senses HIV-1 proteins and significantly enhances HIV-1 infection*. Front Immunol, 2019. **10**: 482; doi: 10.3389/fimmu.2019.00482.
299. Lee S.M., Yip T.F., Yan S., Jin D.Y., Wei H.L., Guo R.T., Peiris J.S.M.: *Recognition of double-stranded RNA and regulation of interferon pathway by Toll-Like receptor 10*. Front Immunol, 2018. **9**: 516; doi: 10.3389/fimmu.2018.00516.
300. Harsini S., Beigy M., Akhavan-Sabbagh M., Rezaei N.: *Toll-like receptors in lymphoid malignancies: double-edged sword*. Crit Rev Oncol Hematol, 2014. **89**(2): 262-283.
301. Manavalan B., Basith S., Choi S.: *Similar structures but different roles - an updated perspective on TLR structures*. Front Physiol, 2011. **2**: 41; doi: 10.3389/fphys.2011.00041.
302. O'Neill L.A., Bowie A.G.: *The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): 353-364.
303. Jin M.S., Lee J.O.: *Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes*. Immunity, 2008. **29**(2): 182-191.
304. Latz E., Verma A., Visintin A., Gong M., Sirois C.M., Klein D.C., Monks B.G., McKnight C.J., Lamphier M.S., Duprex W.P., Espevik T., Golenbock D.T.: *Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9*. Nat Immunol, 2007. **8**(7): 772-779.
305. Nunez Miguel R., Wong J., Westoll J.F., Brooks H.J., O'Neill L.A., Gay N.J., Bryant C.E., Monie T.P.: *A dimer of the Toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins*. PLoS One, 2007. **2**(8): e788; doi: 10.1371/journal.pone.0000788.
306. Janot L., Secher T., Torres D., Maillet I., Pfeilschifter J., Quesniaux V.F., Landmann R., Ryffel B., Erard F.: *CD14 works with toll-like receptor 2 to contribute to recognition and control of Listeria monocytogenes infection*. J Infect Dis, 2008. **198**(1): 115-124.
307. Cai M., Li M., Wang K., Wang S., Lu Q., Yan J., Mossman K.L., Lin R., Zheng C.: *The herpes simplex virus 1-encoded envelope glycoprotein B activates NF-kappaB through the Toll-like receptor 2 and MyD88/TRAF6-dependent signaling pathway*. PLoS One, 2013. **8**(1): e54586; doi: 10.1371/journal.pone.0054586.

308. Ariza M.E., Glaser R., Kaumaya P.T., Jones C., Williams M.V.: *The EBV-encoded dUTPase activates NF-kappa B through the TLR2 and MyD88-dependent signaling pathway*. J Immunol, 2009. **182**(2): 851-859.
309. Harding C.V., Boom W.H.: *Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(4): 296-307.
310. Krutzik S.R., Ochoa M.T., Sieling P.A., Uematsu S., Ng Y.W., Legaspi A., Liu P.T., Cole S.T., Godowski P.J., Maeda Y., Sarno E.N., Norgard M.V., Brennan P.J., Akira S., Rea T.H., Modlin R.L.: *Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy*. Nat Med, 2003. **9**(5): 525-532.
311. Kang J.Y., Nan X., Jin M.S., Youn S.J., Ryu Y.H., Mah S., Han S.H., Lee H., Paik S.G., Lee J.O.: *Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer*. Immunity, 2009. **31**(6): 873-884.
312. Takeuchi O., Sato S., Horiuchi T., Hoshino K., Takeda K., Dong Z., Modlin R.L., Akira S.: *Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins*. J Immunol, 2002. **169**(1): 10-14.
313. Farhat K., Riekenberg S., Heine H., Debarry J., Lang R., Mages J., Buwitt-Beckmann U., Roschmann K., Jung G., Wiesmuller K.H., Ulmer A.J.: *Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(3): 692-701.
314. Underhill D.M., Ozinsky A., Smith K.D., Aderem A.: *Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): 14459-14463.
315. Bulut Y., Michelsen K.S., Hayrapetian L., Naiki Y., Spallek R., Singh M., Arditi M.: *Mycobacterium tuberculosis heat shock proteins use diverse Toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals*. J Biol Chem, 2005. **280**(22): 20961-20967.
316. Fitzgerald K.A., Rowe D.C., Golenbock D.T.: *Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex*. Microbes Infect, 2004. **6**(15): 1361-1367.
317. Miyake K.: *Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2*. Int Immunopharmacol, 2003. **3**(1): 119-128.
318. Palsson-McDermott E.M., O'Neill L.A.: *Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4*. Immunology, 2004. **113**(2): 153-162.
319. Bulut Y., Faure E., Thomas L., Karahashi H., Michelsen K.S., Equils O., Morrison S.G., Morrison R.P., Arditi M.: *Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway*. J Immunol, 2002. **168**(3): 1435-1440.
320. Abel B., Thieblemont N., Quesniaux V.J., Brown N., Mpagi J., Miyake K., Bihl F., Ryffel B.: *Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice*. J Immunol, 2002. **169**(6): 3155-3162.
321. Reiling N., Holscher C., Fehrenbach A., Kroger S., Kirschning C.J., Goyert S., Ehlers S.: *Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 2002. **169**(7): 3480-3484.
322. Sacre S.M., Andreacos E., Kiriakidis S., Amjadi P., Lundberg A., Giddins G., Feldmann M., Brennan F., Foxwell B.M.: *The Toll-like receptor adaptor*

- proteins MyD88 and Mal/TIRAP contribute to the inflammatory and destructive processes in a human model of rheumatoid arthritis. Am J Pathol, 2007. 170(2): 518-525.*
323. Dong W., Liu Y., Peng J., Chen L., Zou T., Xiao H., Liu Z., Li W., Bu Y., Qi Y.: *The IRAK-1-BCL10-MALT1-TRAF6-TAK1 cascade mediates signaling to NF-kappaB from Toll-like receptor 4. J Biol Chem, 2006. 281(36): 26029-26040.*
 324. Botos I., Segal D.M., Davies D.R.: *The structural biology of Toll-like receptors. Structure, 2011. 19(4): 447-459.*
 325. Meylan E., Burns K., Hofmann K., Blancheteau V., Martinon F., Kelliher M., Tschopp J.: *RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. Nat Immunol, 2004. 5(5): 503-507.*
 326. Takeuchi O., Akira S.: *Innate immunity to virus infection. Immunol Rev, 2009. 227(1): 75-86.*
 327. Noreen M., Arshad M.: *Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. Immunol Res, 2015. 62(2): 234-252.*
 328. Selvaraj P., Harishankar M., Singh B., Jawahar M.S., Banurekha V.V.: *Toll-like receptor and TIRAP gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis patients of South India. Tuberculosis (Edinb), 2010. 90(5): 306-310.*
 329. Hart B.E., Tapping R.I.: *Differential trafficking of TLR1 I602S underlies host protection against pathogenic mycobacteria. J Immunol, 2012. 189(11): 5347-5355.*
 330. Johnson C.M., Lyle E.A., Omueti K.O., Stepensky V.A., Yegin O., Alpsyoy E., Hamann L., Schumann R.R., Tapping R.I.: *Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. J Immunol, 2007. 178(12): 7520-7524.*
 331. Uciechowski P., Imhoff H., Lange C., Meyer C.G., Browne E.N., Kirsten D.K., Schroder A.K., Schaaf B., Al-Lahham A., Reinert R.R., Reiling N., Haase H., Hatzmann A., Fleischer D., Heussen N., Kleines M., Rink L.: *Susceptibility to tuberculosis is associated with TLR1 polymorphisms resulting in a lack of TLR1 cell surface expression. J Leukoc Biol, 2011. 90(2): 377-388.*
 332. Hawn T.R., Misch E.A., Dunstan S.J., Thwaites G.E., Lan N.T., Quy H.T., Chau T.T., Rodrigues S., Nachman A., Janer M., Hien T.T., Farrar J.J., Aderem A.: *A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. Eur J Immunol, 2007. 37(8): 2280-2289.*
 333. Wurfel M.M., Gordon A.C., Holden T.D., Radella F., Strout J., Kajikawa O., Ruzinski J.T., Rona G., Black R.A., Stratton S., Jarvik G.P., Hajjar A.M., Nickerson D.A., Rieder M., Sevransky J., Maloney J.P., Moss M., Martin G., Shanholtz C., Garcia J.G., Gao L., Brower R., Barnes K.C., Walley K.R., Russell J.A., Martin T.R.: *Toll-like receptor 1 polymorphisms affect innate immune responses and outcomes in sepsis. Am J Respir Crit Care Med, 2008. 178(7): 710-720.*
 334. Georgel P., Macquin C., Bahram S.: *The heterogeneous allelic repertoire of human toll-like receptor (TLR) genes. PLoS One, 2009. 4(11): e7803; doi: 10.1371/journal.pone.0007803.*
 335. Means T.K., Wang S., Lien E., Yoshimura A., Golenbock D.T., Fenton M.J.: *Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis. J Immunol, 1999. 163(7): 3920-3927.*

336. Lorenz E., Mira J.P., Cornish K.L., Arbour N.C., Schwartz D.A.: *A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection*. *Infect Immun*, 2000. **68**(11): 6398-6401.
337. Tabel Y., Berdeli A., Mir S.: *Association of TLR2 gene Arg753Gln polymorphism with urinary tract infection in children*. *Int J Immunogenet*, 2007. **34**(6): 399-405.
338. Chen R., Gu N., Gao Y., Cen W.: *TLR4 Asp299Gly (rs4986790) polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis*. *PeerJ*, 2015. **3**: e1412; doi: 10.7717/peerj.1412.
339. Long H., O'Connor B.P., Zemans R.L., Zhou X., Yang I.V., Schwartz D.A.: *The Toll-like receptor 4 polymorphism Asp299Gly but not Thr399Ile influences TLR4 signaling and function*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): e93550; doi: 10.1371/journal.pone.0093550.
340. Najmi N., Kaur G., Sharma S.K., Mehra N.K.: *Human Toll-like receptor 4 polymorphisms TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile influence susceptibility and severity of pulmonary tuberculosis in the Asian Indian population*. *Tissue Antigens*, 2010. **76**(2): 102-109.
341. Barber R.C., Chang L.Y., Arnoldo B.D., Purdue G.F., Hunt J.L., Horton J.W., Aragaki C.C.: *Innate immunity SNPs are associated with risk for severe sepsis after burn injury*. *Clin Med Res*, 2006. **4**(4): 250-255.
342. Cai X., Fu Y., Chen Q.: *Association between TLR4 A299G polymorphism and pneumonia risk: a meta-analysis*. *Med Sci Monit*, 2015. **21**: 625-629.
343. Awomoyi A.A., Rallabhandi P., Pollin T.I., Lorenz E., Sztejn M.B., Boukhvalova M.S., Hemming V.G., Blanco J.C., Vogel S.N.: *Association of TLR4 polymorphisms with symptomatic respiratory syncytial virus infection in high-risk infants and young children*. *J Immunol*, 2007. **179**(5): 3171-3177.
344. Child N.J., Yang I.A., Puletz M.C., de Courcy-Golder K., Andrews A.L., Pappachan V.J., Holloway J.W.: *Polymorphisms in Toll-like receptor 4 and the systemic inflammatory response syndrome*. *Biochem Soc Trans*, 2003. **31**(Pt 3): 652-653.
345. Van der Graaf C.A., Netea M.G., Morre S.A., Den Heijer M., Verweij P.E., Van der Meer J.W., Kullberg B.J.: *Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for Candida bloodstream infection*. *Eur Cytokine Netw*, 2006. **17**(1): 29-34.
346. Sun J., Wiklund F., Hsu F.C., Balter K., Zheng S.L., Johansson J.E., Chang B., Liu W., Li T., Turner A.R., Li L., Li G., Adami H.O., Isaacs W.B., Xu J., Gronberg H.: *Interactions of sequence variants in interleukin-1 receptor-associated kinase4 and the toll-like receptor 6-1-10 gene cluster increase prostate cancer risk*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. **15**(3): 480-485.
347. Leoratti F.M., Farias L., Alves F.P., Suarez-Mutis M.C., Coura J.R., Kalil J., Camargo E.P., Moraes S.L., Ramasawmy R.: *Variants in the toll-like receptor signaling pathway and clinical outcomes of malaria*. *J Infect Dis*, 2008. **198**(5): 772-780.
348. Koponen P., Vuononvirta J., Nuolivirta K., Helminen M., He Q., Korppi M.: *The association of genetic variants in toll-like receptor 2 subfamily with allergy and asthma after hospitalization for bronchiolitis in infancy*. *Pediatr Infect Dis J*, 2014. **33**(5): 463-466.
349. Khor C.C., Chapman S.J., Vannberg F.O., Dunne A., Murphy C., Ling E.Y., Frodsham A.J., Walley A.J., Kyrieleis O., Khan A., Aucan C., Segal S., Moore C.E., Knox K., Campbell S.J., Lienhardt C., Scott A., Aaby P., Sow

- O.Y., Grignani R.T., Sillah J., Sirugo G., Peshu N., Williams T.N., Maitland K., Davies R.J., Kwiatkowski D.P., Day N.P., Yala D., Crook D.W., Marsh K., Berkley J.A., O'Neill L.A., Hill A.V.: *A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis*. *Nat Genet*, 2007. **39**(4): 523-528.
350. Panda A.K., Das B.K., Panda A., Tripathy R., Pattnaik S.S., Mahto H., Pied S., Pathak S., Sharma S., Ravindran B.: *Heterozygous mutants of TIRAP (S180L) polymorphism protect adult patients with Plasmodium falciparum infection against severe disease and mortality*. *Infect Genet Evol*, 2016. **43**: 146-150.
351. Papadopoulos A.I., Ferwerda B., Antoniadou A., Sakka V., Galani L., Kavatha D., Panagopoulos P., Poulakou G., Protopapas K., van der Meer J.W., Netea M.G., Giamarellos-Bourboulis E.J.: *Association of Mal/TIRAP S180L variant polymorphism with decreased infection risk in patients with advanced HIV-1 infection*. *Cytokine*, 2012. **60**(1): 104-107.
352. Hamann L., Kumpf O., Schuring R.P., Alpsy E., Bedu-Addo G., Bienzle U., Oskam L., Mockenhaupt F.P., Schumann R.R.: *Low frequency of the TIRAP S180L polymorphism in Africa, and its potential role in malaria, sepsis, and leprosy*. *BMC Med Genet*, 2009. **10**: 65; doi: 10.1186/1471-2350-10-65.
353. Bak-Romaniszyn L., Szala A., Sokolowska A., Mierzwa G., Czerwionka-Szaflarska M., Swierzko A.S., Zeman K., Cedzynski M.: *Mannan-binding lectin deficiency in pediatric patients with inflammatory bowel disease*. *Scand J Gastroenterol*, 2011. **46**(10): 1275-1278.
354. Madsen H.O., Garred P., Thiel S., Kurtzhals J.A., Lamm L.U., Ryder L.P., Svejgaard A.: *Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein*. *J Immunol*, 1995. **155**(6): 3013-3020.
355. Swierzko A.S., Cedzynski M., Domzalska-Popadiuk I., MacDonald S.L., Borkowska-Klos M., Atkinson A.P., Szala A., Jopek A., Jensenius J.C., Kawakami M., Szczapa J., Matsushita M., Szemraj J., Turner M.L., Kilpatrick D.C.: *Mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2) in a large cohort of neonates and its clinical associations*. *Mol Immunol*, 2009. **46**(8-9): 1696-1701.
356. Ramasawmy R., Spina G.S., Fae K.C., Pereira A.C., Nisihara R., Messias Reason I.J., Grinberg M., Tarasoutchi F., Kalil J., Guilherme L.: *Association of mannose-binding lectin gene polymorphism but not of mannose-binding serine protease 2 with chronic severe aortic regurgitation of rheumatic etiology*. *Clin Vaccine Immunol*, 2008. **15**(6): 932-936.
357. DiAngelo S., Lin Z., Wang G., Phillips S., Ramet M., Luo J., Floros J.: *Novel, non-radioactive, simple and multiplex PCR-cRFLP methods for genotyping human SP-A and SP-D marker alleles*. *Dis Markers*, 1999. **15**(4): 269-281.
358. Szala A., Swierzko A. St., Cedzynski M.: *Cost-effective procedures for genotyping of human FCN2 gene single nucleotide polymorphisms*. *Immunogenetics*, 2013. **65**(6): 439-446.
359. Schroder N.W., Hermann C., Hamann L., Gobel U.B., Hartung T., Schumann R.R.: *High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR*. *J Mol Med (Berl)*, 2003. **81**(6): 368-372.
360. Lorenz E., Hallman M., Marttila R., Haataja R., Schwartz D.A.: *Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population*. *Pediatr Res*, 2002. **52**(3): 373-376.

361. Presanis J.S., Hajela K., Ambrus G., Gal P., Sim R.B.: *Differential substrate and inhibitor profiles for human MASP-1 and MASP-2*. Mol Immunol, 2004. **40**(13): 921-929.
362. Petersen S.V., Thiel S., Jensen L., Steffensen R., Jensenius J.C.: *An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation*. J Immunol Methods, 2001. **257**(1-2): 107-116.
363. Horsburgh C.R. Jr.: *Priorities for the treatment of latent tuberculosis infection in the United States*. N Engl J Med, 2004. **350**(20): 2060-2067.
364. Eisen D.P., Minchinton R.M.: *Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases*. Clin Infect Dis, 2003. **37**(11): 1496-1505.
365. Rashidi E., Fazlollahi M.R., Zahedifard S., Talebzadeh A., Kazemnejad A., Saghafi S., Pourpak Z.: *Mannose-binding lectin deficiency in patients with a history of recurrent infections*. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2016. **15**(1): 69-74.
366. Holdaway J., Deacock S., Williams P., Karim Y.: *Mannose-binding lectin deficiency and predisposition to recurrent infection in adults*. J Clin Pathol, 2016. **69**(8): 731-736.
367. Zanetti K.A., Haznadar M., Welsh J.A., Robles A.I., Ryan B.M., McClary A.C., Bowman E.D., Goodman J.E., Bernig T., Chanock S.J., Harris C.C.: *3'-UTR and functional secretor haplotypes in mannose-binding lectin 2 are associated with increased colon cancer risk in African Americans*. Cancer Res, 2012. **72**(6): 1467-1477.
368. Bonar A., Chmiela M., Rozalska B.: *Poziom lektyny wiążącej mannozę (MBL) u chorych na gruźlicę*. Pneumonol Alergol Pol, 2004. **72**(5-6): 201-205.
369. Selvaraj P., Jawahar M.S., Rajeswari D.N., Alagarasu K., Vidyarani M., Narayanan P.R.: *Role of mannose binding lectin gene variants on its protein levels and macrophage phagocytosis with live Mycobacterium tuberculosis in pulmonary tuberculosis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006. **46**(3): 433-437.
370. Garcia-Gasalla M., Mila Llambi J., Losada-Lopez I., Cifuentes-Luna C., Fernandez-Baca V., Pareja-Bezares A., Mir-Villadrich I., Payeras-Cifre A.: *Mannose-binding lectin exon 1 and promoter polymorphisms in tuberculosis disease in a Mediterranean area*. Int J Immunogenet, 2014. **41**(4): 306-311.
371. Alagarasu K., Selvaraj P., Swaminathan S., Raghavan S., Narendran G., Narayanan P.R.: *Mannose binding lectin gene variants and susceptibility to tuberculosis in HIV-1 infected patients of South India*. Tuberculosis (Edinb), 2007. **87**(6): 535-543.
372. Chalmers J.D., Matsushita M., Kilpatrick D.C., Hill A.T.: *No strong relationship between components of the lectin pathway of complement and susceptibility to pulmonary tuberculosis*. Inflammation, 2015. **38**(4): 1731-1737.
373. Cosar H., Ozkinay F., Onay H., Bayram N., Bakiler A.R., Anil M., Can D., Ozkinay C.: *Low levels of mannose-binding lectin confers protection against tuberculosis in Turkish children*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008. **27**(12): 1165-1169.
374. Soborg C., Madsen H.O., Andersen A.B., Lillebaek T., Kok-Jensen A., Garred P.: *Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis*. J Infect Dis, 2003. **188**(5): 777-782.
375. Hoal-Van Helden E.G., Epstein J., Victor T.C., Hon D., Lewis L.A., Beyers N., Zurakowski D., Ezekowitz A.B., Van Helden P.D.: *Mannose-binding protein B allele confers protection against tuberculous meningitis*. Pediatr Res, 1999. **45**(4 Pt 1): 459-464.

376. Singla N., Gupta D., Joshi A., Batra N., Singh J., Birbian N.: *Association of mannose-binding lectin gene polymorphism with tuberculosis susceptibility and sputum conversion time*. Int J Immunogenet, 2012. **39**(1): 10-14.
377. Capparelli R., Iannaccone M., Palumbo D., Medaglia C., Moscariello E., Russo A., Iannelli D.: *Role played by human mannose-binding lectin polymorphisms in pulmonary tuberculosis*. J Infect Dis, 2009. **199**(5): 666-672.
378. Selvaraj P., Narayanan P.R., Reetha A.M.: *Association of functional mutant homozygotes of the mannose binding protein gene with susceptibility to pulmonary tuberculosis in India*. Tuber Lung Dis, 1999. **79**(4): 221-227.
379. Liu W., Zhang F., Xin Z.T., Zhao Q.M., Wu X.M., Zhang P.H., de Vlas S., Richardus J.H., Habbema J.D., Yang H., Cao W.C.: *Sequence variations in the MBL gene and their relationship to pulmonary tuberculosis in the Chinese Han population*. Int J Tuberc Lung Dis, 2006. **10**(10): 1098-1103.
380. Shi J., Xie M., Wang J.M., Xu Y.J., Xiong W.N., Liu X.S.: *Mannose-binding lectin two gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility in Chinese population: a meta-analysis*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2013. **33**(2): 166-171.
381. Liu C., He T., Rong Y., Du F., Ma D., Wei Y., Mei Z., Wang Y., Wang H., Zhu Y., Zhang Z., Zheng L., Wu X., Liu H., Ding W.: *Association of mannose-binding lectin polymorphisms with tuberculosis susceptibility among Chinese*. Sci Rep, 2016. **6**: 36488; doi: 10.1038/srep36488.
382. Hijikata M., Matsushita I., Hang N.T., Maeda S., Thuong P.H., Tam do B., Shimbo T., Sakurada S., Cuong V.C., Lien L.T., Keicho N.: *Age-dependent association of mannose-binding lectin polymorphisms with the development of pulmonary tuberculosis in Viet Nam*. Hum Immunol, 2014. **75**(8): 840-846.
383. Solgun H.A., Tastemir D., Aksaray N., Inan I., Demirhan O.: *Polymorphisms in NRAMP1 and MBL2 genes and their relations with tuberculosis in Turkish children*. Tuberk Toraks, 2011. **59**(1): 48-53.
384. Dean M.M., Minchinton R.M., Heatley S., Eisen D.P.: *Mannose binding lectin acute phase activity in patients with severe infection*. J Clin Immunol, 2005. **25**(4): 346-352.
385. Denholm J.T., McBryde E.S., Eisen D.P.: *Mannose-binding lectin and susceptibility to tuberculosis: a meta-analysis*. Clin Exp Immunol, 2010. **162**(1): 84-90.
386. Wu Y.J., Yang X., Chen T.D., Zhang Z.X., You Y.Z., Fan Z.D.: *Genetic polymorphisms of exon 1 of MBL2 contribute to tuberculosis risk especially in Asian populations: an updated meta-analysis of 26 studies*. Infect Drug Resist, 2018. **11**: 1237-1248.
387. Cao Y., Wang X., Cao Z., Wu C., Wu D., Cheng X.: *Genetic polymorphisms of MBL2 and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis of 22 case-control studies*. Arch Med Sci, 2018. **14**(6): 1212-1232.
388. Tong X., Wan Q., Li Z., Liu S., Huang J., Wu M., Fan H.: *Association between the mannose-binding lectin (MBL)-2 gene variants and serum MBL with pulmonary tuberculosis: An update meta-analysis and systematic review*. Microb Pathog, 2019. **132**: 374-380.
389. Mandal R.K., Khan M.A., Hussain A., Dar S.A., Aloufi S., Jawed A., Wahid M., Panda A.K., Lohani M., Akhter N., Khan S., Mishra B.N., Haque S.: *Association of MBL2 gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis susceptibility: trial sequence meta-analysis as evidence*. Infect Drug Resist, 2019. **12**: 185-210.

390. Araujo M.S., Graca E.S., Azevedo V.N., Cayres-Vallinoto I., Machado L.F., Ishak M.O., Ishak R., Vallinoto A.C.: *No evidence of association between MBL2A/O polymorphisms and Mycobacterium tuberculosis infection in populations from the Brazilian Amazon region*. Hum Immunol, 2013. **74**(1): 82-84.
391. Stover C., Barrett S., Lynch N.J., Barker J.N., Burden D., Trembath R., Schwaeble W., Veal C.: *Functional MASP2 single nucleotide polymorphism plays no role in psoriasis*. Br J Dermatol, 2005. **152**(6): 1313-1315.
392. Garcia-Laorden M.I., Garcia-Saavedra A., de Castro F.R., Violan J.S., Rajas O., Blanquer J., Borderias L., Rodriguez-Gallego C.: *Low clinical penetrance of mannose-binding lectin-associated serine protease 2 deficiency*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(6): 1383-1386.
393. Olszowski T., Poziomkowska-Gesicka I., Jensenius J.C., Adler G.: *Lectin pathway of complement activation in a Polish woman with MASP-2 deficiency*. Immunobiology, 2014. **219**(4): 261-262.
394. Chen M., Liang Y., Li W., Wang M., Hu L., Abuaku B.K., Huang X., Tan H., Wen S.W.: *Impact of MBL and MASP-2 gene polymorphism and its interaction on susceptibility to tuberculosis*. BMC Infect Dis, 2015. **15**: 151; doi: 10.1186/s12879-015-0879-y.
395. Hall-Stoodley L., Watts G., Crowther J.E., Balagopal A., Torrelles J.B., Robison-Cox J., Bargatze R.F., Harmsen A.G., Crouch E.C., Schlesinger L.S.: *Mycobacterium tuberculosis binding to human surfactant proteins A and D, fibronectin, and small airway epithelial cells under shear conditions*. Infect Immun, 2006. **74**(6): 3587-3596.
396. Kondo A., Oketani N., Maruyama M., Taguchi Y., Yamaguchi Y., Miyao H., Mashima I., Oono M., Wada K., Tsuchiya T., Takahashi H., Abe S.: *[Significance of serum surfactant protein-D (SP-D) level in patients with pulmonary tuberculosis]*. Kekkaku, 1998. **73**(10): 585-590 (artykuł w języku japońskim; wykorzystano streszczenie w języku angielskim).
397. Enomoto Y., Hagiwara E., Komatsu S., Nishihira R., Baba T., Ogura T.: *[Comparison of biomarkers of pulmonary tuberculosis activity --serum surfactant proteins A and D, KL-6, C-reactive protein, and erythrocyte sedimentation rate]*. Kekkaku, 2014. **89**(7): 637-642 (artykuł w języku japońskim; wykorzystano streszczenie w języku angielskim).
398. Hsieh M.H., Ou C.Y., Hsieh W.Y., Kao H.F., Lee S.W., Wang J.Y., Wu L.S.H.: *Functional analysis of genetic variations in surfactant protein D in mycobacterial infection and their association with tuberculosis*. Front Immunol, 2018. **9**: 1543; doi: 10.3389/fimmu.2018.01543.
399. Madan T., Saxena S., Murthy K.J., Muralidhar K., Sarma P.U.: *Association of polymorphisms in the collagen region of human SP-A1 and SP-A2 genes with pulmonary tuberculosis in Indian population*. Clin Chem Lab Med, 2002. **40**(10): 1002-1008.
400. Yang H.Y., Li H., Wang Y.G., Xu C.Y., Zhao Y.L., Ma X.G., Li X.W., Chen H.: *Correlation analysis between single nucleotide polymorphisms of pulmonary surfactant protein A gene and pulmonary tuberculosis in the Han population in China*. Int J Infect Dis, 2014. **26**: 31-36.
401. Lei D., Guanhui Z., Jian F., Jing Y., Shaoqing H.: *Expression of M-ficolin, H-ficolin, and L-ficolin in peripheral blood mononuclear cell of tuberculosis patients*. Asian Biomedicine, 2011. **5**(6): 747-754; doi: 10.5372/1905-7415.0506.101

402. Wang C., Wei L.L., Shi L.Y., Pan Z.F., Yu X.M., Li T.Y., Liu C.M., Ping Z.P., Jiang T.T., Chen Z.L., Mao L.G., Li Z.J., Li J.C.: *Screening and identification of five serum proteins as novel potential biomarkers for cured pulmonary tuberculosis*. *Sci Rep*, 2015. **5**: 15615; doi: 10.1038/srep15615.
403. Xu D.D., Wang C., Jiang F., Wei L.L., Shi L.Y., Yu X.M., Liu C.M., Liu X.H., Feng X.M., Ping Z.P., Jiang T.T., Chen Z.L., Li Z.J., Li J.C.: *Association of the FCN2 gene single nucleotide polymorphisms with susceptibility to pulmonary tuberculosis*. *PLoS One*, 2015. **10**(9): e0138356; doi: 10.1371/journal.pone.0138356.
404. Ogus A.C., Yoldas B., Ozdemir T., Uguz A., Olcen S., Keser I., Coskun M., Cilli A., Yegin O.: *The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease*. *Eur Respir J*, 2004. **23**(2): 219-223.
405. Dalgic N., Tekin D., Kayaalti Z., Soylemezoglu T., Cakir E., Kilic B., Kutlubay B., Sancar M., Odabasi M.: *Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene from infection to disease in pediatric tuberculosis*. *Hum Immunol*, 2011. **72**(5): 440-445.
406. Saleh M.A., Ramadan M.M., Arram E.O.: *Toll-like receptor-2 Arg753Gln and Arg677Trp polymorphisms and susceptibility to pulmonary and peritoneal tuberculosis*. *APMIS*, 2017. **125**(6): 558-564.
407. Shahsavari F., Shahsavari G., Azargoon A.: *753 G/A polymorphism of TLR2 in the susceptibility to pulmonary tuberculosis in the Lur population of Iran*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2016. **6**(5): 354-357.
408. Hu L., Tao H., Tao X., Tang X., Xu C.: *TLR2 Arg753Gln gene polymorphism associated with tuberculosis susceptibility: an updated meta-analysis*. *Biomed Res Int*, 2019. **2019**: 2628101; 10.1155/2019/2628101.
409. Biswas D., Gupta S.K., Sindhwani G., Patras A.: *TLR2 polymorphisms, Arg753Gln and Arg677Trp, are not associated with increased burden of tuberculosis in Indian patients*. *BMC Res Notes*, 2009. **2**: 162; doi: 10.1186/1756-0500-2-162.
410. Mittal M., Biswas S.K., Singh V., Arela N., Katoch V.M., Das R., Yadav V.S., Bajaj B., Mohanty K.K.: *Association of Toll like receptor 2 and 9 gene variants with pulmonary tuberculosis: exploration in a northern Indian population*. *Mol Biol Rep*, 2018. **45**(4): 469-476.
411. Sanchez D., Lefebvre C., Rioux J., Garcia L.F., Barrera L.F.: *Evaluation of Toll-like receptor and adaptor molecule polymorphisms for susceptibility to tuberculosis in a Colombian population*. *Int J Immunogenet*, 2012. **39**(3): 216-223.
412. Strapagiel D., Kasztalska K., Druszczynska M., Kowalewicz-Kulbat M., Vrba A., Matusiak A., Chmiela M., Rudnicka W.: *Monocyte response receptors in BCG driven delayed type hypersensitivity to tuberculin*. *Folia Histochem Cytobiol*, 2008. **46**(3): 353-359.
413. Ocejjo-Vinyals J.G., Puente de Mateo E., Ausin F., Agüero R., Arroyo J.L., Gutierrez-Cuadra M., Farinas M.C.: *Human toll-like receptor 1 T1805G polymorphism and susceptibility to pulmonary tuberculosis in northern Spain*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2013. **17**(5): 652-654.
414. Ma X., Liu Y., Gowen B.B., Graviss E.A., Clark A.G., Musser J.M.: *Full-exon resequencing reveals toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease*. *PLoS One*, 2007. **2**(12): e1318; doi: 10.1371/journal.pone.0001318.

415. Qi H., Sun L., Wu X., Jin Y., Xiao J., Wang S., Shen C., Chu P., Qi Z., Xu F., Guo Y., Jiao W., Tian J., Shen A.: *Toll-like receptor 1(TLR1) Gene SNP rs5743618 is associated with increased risk for tuberculosis in Han Chinese children.* Tuberculosis (Edinb), 2015. **95**(2): 197-203.
416. Barletta-Naveca R.H., Naveca F.G., de Almeida V.A., Porto J.I.R., da Silva G.A.V., Ogusku M.M., Sadahiro A., Ramasawmy R., Boechat A.L.: *Toll-Like receptor-1 single-nucleotide polymorphism 1805T/G is associated with predisposition to multibacillary tuberculosis.* Front Immunol, 2018. **9**: 1455; doi: 10.3389/fimmu.2018.01455.
417. Misch E.A., Macdonald M., Ranjit C., Sapkota B.R., Wells R.D., Siddiqui M.R., Kaplan G., Hawn T.R.: *Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction.* PLoS Negl Trop Dis, 2008. **2**(5): e231; doi: 10.1371/journal.pntd.0000231.
418. Sinha E., Biswas S.K., Mittal M., Bajaj B., Singh V., Arela N., Katoch V.M., Mohanty K.K.: *Toll-like Receptor 1 743 A>G, 1805 T>G & Toll-like Receptor 6 745 C>T gene polymorphism and tuberculosis: a case control study of north Indian population from Agra (India).* Hum Immunol, 2014. **75**(8): 880-886.
419. Dittrich N., Berrocal-Almanza L.C., Thada S., Goyal S., Slevogt H., Sumanlatha G., Hussain A., Sur S., Burkert S., Oh D.Y., Valluri V., Schumann R.R., Conrad M.L.: *Toll-like receptor 1 variations influence susceptibility and immune response to Mycobacterium tuberculosis.* Tuberculosis (Edinb), 2015. **95**(3): 328-335.
420. Shey M.S., Randhawa A.K., Bowmaker M., Smith E., Scriba T.J., de Kock M., Mahomed H., Hussey G., Hawn T.R., Hanekom W.A.: *Single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor 6 are associated with altered lipopeptide- and mycobacteria-induced interleukin-6 secretion.* Genes Immun, 2010. **11**(7): 561-572.
421. Zhang Y., Jiang T., Yang X., Xue Y., Wang C., Liu J., Zhang X., Chen Z., Zhao M., Li J.C.: *Toll-like receptor -1, -2, and -6 polymorphisms and pulmonary tuberculosis susceptibility: a systematic review and meta-analysis.* PLoS One, 2013. **8**(5): e63357 doi: 10.1371/journal.pone.0063357.
422. Ziakas P.D., Prodromou M.L., El Khoury J., Zintzaras E., Mylonakis E.: *The role of TLR4 896 A>G and 1196 C>T in susceptibility to infections: a review and meta-analysis of genetic association studies.* PLoS One, 2013. **8**(11): e81047; doi: 10.1371/journal.pone.0081047.
423. Ferwerda B., Kibiki G.S., Netea M.G., Dolmans W.M., van der Ven A.J.: *The toll-like receptor 4 Asp299Gly variant and tuberculosis susceptibility in HIV-infected patients in Tanzania.* AIDS, 2007. **21**(10): 1375-1377.
424. Pulido I., Leal M., Genebat M., Pacheco Y.M., Saez M.E., Soriano-Sarabia N.: *The TLR4 ASP299GLY polymorphism is a risk factor for active tuberculosis in Caucasian HIV-infected patients.* Curr HIV Res, 2010. **8**(3): 253-258.
425. Jahantigh D., Salimi S., Alavi-Naini R., Emamdadi A., Owaysee Osquee H., Farajian Mashhadi F.: *Association between TLR4 and TLR9 gene polymorphisms with development of pulmonary tuberculosis in Zahedan, southeastern Iran.* Sci World J, 2013. **2013**: 534053; doi: 10.1155/2013/534053.
426. Newport M.J., Allen A., Awomoyi A.A., Dunstan S.J., McKinney E., Marchant A., Sirugo G.: *The toll-like receptor 4 Asp299Gly variant: no influence on LPS responsiveness or susceptibility to pulmonary tuberculosis in The Gambia.* Tuberculosis (Edinb), 2004. **84**(6): 347-352.

427. Miao R., Li J., Sun Z., Xu F., Shen H.: *Meta-analysis on the association of TIRAP S180L variant and tuberculosis susceptibility*. Tuberculosis (Edinb), 2011. **91**(3): 268-272.
428. Castiblanco J., Varela D.C., Castano-Rodriguez N., Rojas-Villarraga A., Hincapie M.E., Anaya J.M.: *TIRAP (MAL) S180L polymorphism is a common protective factor against developing tuberculosis and systemic lupus erythematosus*. Infect Genet Evol, 2008. **8**(5): 541-544.
429. Naderi M., Hashemi M., Pourmontaseri Z., Eskandari-Nasab E., Bahari G., Taheri M.: *TIRAP rs8177374 gene polymorphism increased the risk of pulmonary tuberculosis in Zahedan, southeast Iran*. Asian Pac J Trop Med, 2014. **7**(6): 451-455.
430. Nejentsev S., Thye T., Szeszko J.S., Stevens H., Balabanova Y., Chinbuah A.M., Hibberd M., van de Vosse E., Alisjahbana B., van Crevel R., Ottenhoff T.H., Png E., Drobniowski F., Todd J.A., Seielstad M., Horstmann R.D.: *Analysis of association of the TIRAP (MAL) S180L variant and tuberculosis in three populations*. Nat Genet, 2008. **40**(3): 261-262.
431. Hawn T.R., Dunstan S.J., Thwaites G.E., Simmons C.P., Thuong N.T., Lan N.T., Quy H.T., Chau T.T., Hieu N.T., Rodrigues S., Janer M., Zhao L.P., Hien T.T., Farrar J.J., Aderem A.: *A polymorphism in Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein is associated with susceptibility to meningeal tuberculosis*. J Infect Dis, 2006. **194**(8): 1127-1134.