

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA" BUCUREȘTI
SCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

**EVALUAREA MODIFICĂRILOR DE IMUNITATE LA PACIENTUL
HEMODIALIZAT CRONIC – STUDIUL FENOTIPIC AL POPULAȚIILOR
LEUCOCITARE IMPLICATE ÎN RĂSPUNSUL IMUN
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. ANA MARIA VLĂDĂREANU

Student-doctorand:

APOSTOLEANU căs. BUMBEA VIORICA-ILEANA

ANUL

2024

CUPRINS

	Pagina
Lista cu lucrările științifice publicate	iii
CAPITOLUL 1: IPOTEZA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI	1
CAPITOLUL 2: STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
CAPITOLUL 3: METODOLOGIA DE CERCETARE	5
3.1 Obiectivele studiului	5
3.2 Loturile de studiu	6
3.3 Protocolul studiului	7
3.4 Analiza statistică	8
CAPITOLUL 4: ANALIZA FENOTIPICĂ A LIMFOCITELOR T	10
CAPITOLUL 5: ANALIZA FENOTIPICĂ A LIMFOCITELOR B	17
CAPITOLUL 6: ANALIZA FENOTIPICĂ A MONOCITELOR	21
CAPITOLUL 7: ANALIZA FENOTIPICĂ A POPULAȚIILOR LEUCOCITARE ÎN TIMPUL INFECȚIEI COVID	27
7.1 Limfocitele T în infecția Covid	27
7.2 Limfocitele B în infecția Covid	29
7.3 Monocitele în infecția Covid	32
CAPITOLUL 8: CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	35
Bibliografie	43

Lista cu lucrările științifice publicate:

Articole publicate în reviste de specialitate

- 1. Bumbea V.I.,** Bumbea H., Vladareanu A.M., Immune dysfunction in patients with end stage kidney disease; Immunosenescence – Review, Rom J Intern Med, PMID 37991332, 2023 Nov 22, DOI: 10.2478/rjim-2023-0030, ISI , factor de impact 1,6 , introducere pag 8, capitolul 1 pag 13, 16-19, capitolul 2 pag 22-28
- 2. Bumbea V.,** Ardelean L., Radulescu L., Damian L., Bumbea H., Dumitru I., Lambert C., Vladareanu A-M., Proinflammatory roles of monocytes in SARS-CoV-2 infection in chronic hemodialysis patients, Front. Immunol., 3:14:1210961, 2023 Aug, DOI: 10.3389/fimmu.2023.1210961, ISI, factor de impact 5,7, capitolul 1 pag 20-21, capitolul 2 pag 30, capitolul 3 pag 41, capitolul 8 pag 146-153 și pag 165-170

Lucrări prezentate la manifestări științifice internaționale

- 3.** Proinflammatory role of monocytes in SARS-CoV-2 infection in chronic hemodialysis patients , Horia Bumbea, **Viorica Bumbea***, Ion Dumitru, Luminita Ardelean, Luminita Radulescu, Luminita Damian, , Claude Lambert, Ana-Maria Vladareanu, prezentare orala la al 17-lea Congres National de Citometrie cu participare internațională, 16-17 Mai 2024
- 4.** MONOCYTE’S INVOLVEMENT IN INFLAMMATORY RESPONSE IN COVID-19 INFECTION IN CHRONIC RENAL DISEASE Horia Bumbea, **Viorica Bumbea***, Luminita Ardelean, Luminita Radulescu, Luminita Damian, Ion Dumitru, Claude Lambert, Viola Popov, Ciprian Tomuleasa, Ana-Maria Vladareanu, Final Abstract Code: PB2259, EHA 2022 Hybrid Congress, June 9 - 12, 2022 - Vienna, Austria

CAPITOLUL 1. IPOTEZA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

Rezistența organismului în fața agenților patogeni străini este realizată, printre altele, prin acțiunea sistemului imun care are un rol complex: apărare împotriva infecțiilor, acțiune antitumorală, reparare tisulară. Pe de altă parte, în cazul unei funcționări imune defectuoase, poate apare inflamația cronică cu consecințe importante asupra morbidității sau chiar asupra mortalității pacienților [1].

Organismul se apără împotriva diverșilor patogeni din mediul înconjurător prin barierele fizice (de la nivelul pielii, mucoaselor etc) prin acțiunea celulelelor implicate în imunitatea înăscută (limfocite natural killer, complement sau celule fagocitare) sau prin imunitatea dobândită (reprezentată de acțiunea limfocitelor B și T) [2,3,4].

Dintre patologiiile asociate practicii medicale una dintre cele mai frecvente este cea renală. Rinichiul este conectat cu majoritatea sistemelor din organismul uman, patologia renală fiind extrem de variată, cu repercusiuni asupra altor aparate și sisteme, sistemul imun și sistemul cardiovascular fiind dintre cele mai importante sisteme afectate [4].

Boala cronică de rinichi este definită ca fiind o afectare renală structurală (albuminuria peste sau egală cu 30 mg/zi) sau funcțională (GFR sub 60 ml/min/1,73m²) prezente 3 sau peste 3 luni. Acest interval de timp face diferența între o boală renală cronică și injuria renală acută [5].

Stadializarea actuală a bolii cronice de rinichi include, pe lângă pacienții cu GFR scăzut și pe aceia care au funcție renală bună dar au modificări cronice la nivelul sumarului de urină sau prezintă modificări radiologice compatibile cu o afectare renală cronică, ireversibilă. Stadiul 1 reprezintă pacienții cu GFR normal dar cu afectare renală cronică evidențiată prin microalbuminurie, proteinurie, hematurie sau modificări radiologice, în stadiul 2 sunt incluși pacienții cu afectare ușoară GFR între 89-60 ml/min/1,73 m² având de asemenea modificări cronice la nivelul sumarului de urină sau radiologice, stadiul 3 are două componente: 3a cu GFR între 59-45 ml/min/1,73 m² și 3b cu GFR între 44-30 ml/min/1,73 m², stadiul 4 GFR între 29-15 ml/min/1,73 m² și stadiul 5 GFR sub 15 ml/min/1,73 m². În stadiul 5 de boală cronică de rinichi se iau în considerare tratamentul prin dializă sau transplantul renal pentru a susține viața acestor pacienți [6].

Afectarea imunității la pacientul cu insuficiență renală este caracterizată atât prin creșterea receptivității la infecții, rezultatul fiind apariția unei imunodeficiențe precum și prin prezența unei inflamații cronice secundară activării sistemului imun. Asistăm, în cazul pacienților cu boală cronică de rinichi, la un dezechilibru între factori pro și antiinflamatorii și între factori pro și antiapoptoza [7].

Pacienții cu boală cronică de rinichi prezintă, pe de o parte, o activare cronică a sistemului imun, inflamație cronică, ceea ce duce la arterioscleroză și creșterea incidenței bolilor cardiovasculare, pe de alta parte o imunodeficiență tradusă printr-un răspuns imun scăzut secundar vaccinării precum și o susceptibilitate crescută la infecții [4].

Ipoteza inițială a cercetării a fost faptul că pacienții hemodializați cronic prezintă modificări de distribuție la nivelul celulelor sistemului imun față de pacienții uremici nedializați sau față de subiecții sănătoși. De asemenea am presupus că o parte dintre modificările de imunitate apărute pe parcursul evoluției bolii cronice de rinichi se ameliorează, sau din contra, se agravează odată cu inițierea hemodializei.

Obiectivul principal al acestei lucrări a fost identificarea, din punct de vedere fenotipic, a modificărilor apărute la nivelul leucocitelor implicate în răspunsul imun în cazul pacienților hemodializați cronic față de subiecți sănătoși și față de pacienții cu boală cronică de rinichi în stadiul 5 aflați înaintea inițierii hemodializei. Pe baza studiilor asemănătoare găsite în literatura de specialitate am discutat implicațiile clinice ale modificărilor imunofenotipice identificate la nivelul loturilor studiate. Importanța acestui studiu este dată de patologia pacienților cu boală cronică de rinichi unde un factor declanșator principal pentru afecțiunile cardiovasculare și predispoziția la infecții este reprezentat de o imunitate defectuoasă.

Studiul s-a axat pe cuantificarea acelor modificări ale celulelor implicate în răspunsul imun care au fost dovedite, prin alte studii publicate, a fi esențiale în dezvoltarea patologiilor cardiovasculare, în imunodepresie sau în imunosenescență. Pentru a identifica și a evalua populațiile celulare implicate în răspunsul imun s-au folosit metode imunofenotipice prin flowcitometrie iar rezultatele au fost comparate prin metode statistice.

CAPITOLUL 2: STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În cazul GFR sub 45ml/min/1,73 m² riscul de mortalitate cardiovasculara crește cu scăderea GFR [8]. Mortalitatea prin boli cardiovasculare crește de 20 de ori la pacientul dializat cronic fata de populația generală iar infecțiile care apar la acești pacienți se soldează cu o mortalitate între 12-22% [4,8]. În uremie atât incidența crescută a bolilor cardiovasculare cât și riscul crescut de infecție sunt rezultatul unui răspuns imun defectuos [4,8]. În stadiul final al bolii cronice de rinichi (GFR sub 15 ml/min) și în special la pacienții dializați, îmbătrânirea prematură a sistemului imun, pierderea funcției timusului, expansiunea limfocitelor T de memorie sunt factorii importanți în apariția patologiei secundare imunodepresiei la acești pacienți [4].

Studiu publicat în 2016 de către Fang-Fang Xiang et al efectuat pe un lot de 472 de pacienți cu boală cronică de rinichi în diferite stadii de evoluție evidențiază o scădere a numărului total de limfocite înainte de apariția stadiului 5 de boala cronică de rinichi [4,9]. De asemenea, acesta arată că pacienții cu stadii avansate de boală cronică de rinichi prezintă, pe lângă scăderea numărului total de limfocite, scăderea procentului de limfocite B, creșterea procentului de limfocite NK, fără a putea evidenția modificări în ceea ce privește numărul total de leucocite, monocite, limfocite T CD4+, limfocite T CD8+ sau a raportului CD4+/CD8+ [4,9].

În cazul pacienților cu boala cronică de rinichi stadiul final numărul monocitelor CD16+ este crescut și ar putea avea un rol în inflamația sistemică și creșterea stresului oxidativ observate la acești pacienți [3,4]. De asemenea se observă o scădere la nivelul rolului fagocitar al monocitelor pacientului uremic, acest lucru având legătură cu creșterea incidenței și severității infecțiilor [3,4].

La pacienții dializați există o corelație pozitivă între numărul de monocite CD16+ și mortalitatea acestora, mai ales în cazul pacienților cu boli cardiovasculare preexistente [4,10]. În mod particular există studii predictive pentru bolile cardiovasculare la pacienții cu boală cronică de rinichi în care s-a stabilit o corelație certă între creșterea numărului de monocite intermediare și apariția bolilor cardiovasculare [4,11].

Yen –Ling Chiu et al raportează în 2018 un studiu efectuat pe 412 pacienți hemodializați care pune în evidență o îmbătrânire accelerate a limfocitelor T și monocitelor caracterizată prin scăderea numărului limfocitelor CD4+naive, CD8+

naive și creșterea numărului de monocite proinflamatorii CD16+. Aceste modificări se asociază cu vârsta pacienților dar și cu lungimea perioadei de când aceștia sunt dializați (posibil prin expunerea prelungită la mediul uremic) [4,12]. Studiul pornește de la premiza ca pacienții dializați cronic prezintă multe similitudini legate de modificările fiziologice și creșterea morbidității și mortalității similare cu cele ale persoanelor vârstnice (printre acestea scăderea masei musculare, osteoporoza, declinul funcțiilor cognitive, accelerarea bolilor vasculare și creșterea riscului de deces explicate prin stresul oxidativ, acumularea toxinelor uremice și inflamația cronică) [4,12,13]. Studiul a comparat cei 412 pacienți dializați cronic cu 57 de pacienți vrâstnici sănătoși. Pacienții dializați cronic prezintă scăderea procentului de limfocite T naive CD4+ și CD8+ și creșterea nivelului procentual de CD8+ effector memory și a nivelului procentual de limfocite T effector memory cu nivel ridicat de diferențiere (TEMRA) [4,12].

Pandemia de COVID 19 a oferit oportunitatea de a vedea cum reacționează sistemul imun al pacienților cu boală cronică de rinichi aflați în stadiul final în fața provocării produse de aceasta maladie. COVID-19 este o boală deosebit de contagioasă produsă de virusul SARS-CoV-2 care a apărut inițial în China, regiunea Wuhan în decembrie 2019, pentru ca apoi să se răspândească rapid în toată lumea devenind pandemie și caracterizată printr-o rată crescută de mortalitate în special în cazul pacienților vârstnici sau cu comorbidități nevaccinați.

În 2021 Michiel G.H. Betjes publică un articol referitor la severitatea infecției COVID asociată uremiei. Încă de la începutul pandemiei gravitatea cazurilor a fost asociată cu vârsta înaintată și prezenta comorbidităților. Printre acestea un rol important în apariția formelor severe de COVID și a mortalității acestor pacienți îl deține boala cronică de rinichi și mai ales pacienții care urmează tratament prin metode de suplere a funcției renale și acei pacienți care au suferit un transplant renal [14]. Dintre pacienții decedați peste 20% aveau boală cronică de rinichi [15].

O explicație a numărului crescut de forme severe în cazul pacientului uremic ar fi scăderea numărului de limfocite T naive și un declin funcțional la nivelul întregii populații de limfocite T. Un rol îl poate avea și scăderea numărului de celule detritice plasmocitoide [14]. Se produce astfel un clearance întârziat al virusului și o expansiune a limfocitelor T de memorie prin stimulare prelungită [14]. Creșterea numărului de limfocite de memorie T reactive asociată cu scăderea eficienței funcției limfocitelor Treg duc la încetinirea vindecării infecției virale [14].

CAPITOLUL 3: METODOLOGIA DE CERCETARE

3.1 Obiectivele studiului

Studiul a fost inițiat după ce au fost obținute aprobările comisiilor de etică din Spitalul Universitar de Urgență București și din Spitalul Clinic de Urgență București, acesta derulându-se cu pacienți internați în ambele spitale care și-au dat în prealabil acordul pentru participare prin semnarea acordului informat, de asemenea analizele paraclinice au fost efectuate în laboratoarele ambelor spitale.

Detaliat, obiectivele acestui studiu includ:

- Evaluarea imunofenotipică, numerică sau procentuală a limfocitelor T, B și a monocitelor incluzând subpopulații reprezentative pentru răspunsul imun
- Am urmărit, în cadrul fiecărei populații studiate, ponderea celulelor activate sau a celulelor dovedite a fi implicate în inflamația cronică
- Compararea rezultatelor obținute în cazul pacienților hemodializați cronic cu rezultatele obținute în cazul subiecților sănătoși și a pacienților cu boală cronică de rinichi stadiul 5 nedializați. De asemenea rezultatele pacienților cu boală cronică de rinichi stadiul 5 nedializași au fost comparate cu rezultatele subiecților sănătoși
- Identificarea unor asocieri de tip corelație pozitivă sau negative statistic semnificative între populațiile studiate
- Corelarea modificărilor evidențiate cu literatura de specialitate, respectiv cu alte studii asemănătoare, care asociază aceste modificări cu dezvoltarea patologiei cardiovasculare, cu apariția imunodeficiențelor sau a imunosenescenței.
- Evoluția, din punct de vedere imun, a pacienților hemodializați cronic în timpul unei infecții virale - pandemia de COVID care a apărut pe perioada culegerii datelor studiului ne-a dat posibilitatea de a vedea cum influențează o infecție virală profilul imun studiat în cazul pacientului dializat cronic

Studiul este de tip observațional analitic prospectiv de tip caz-martor și cuprinde pacienți internați în Spitalul Clinic de Urgență București și Spitalul Universitar de Urgență în perioada 2020-2021 care au fost comparați cu subiecți sănătoși, fără boală cronică de rinichi.

3.2 Loturile de studiu

Subiecții au fost împărțiți în loturi: un lot de pacienți cu boală cronică de rinichi stadiul 5 aflați în program de hemodializă cronică în Spitalul Clinic de Urgență București, un lot de pacienți cu boală cronică de rinichi stadiul 5 înainte de a fi inițiați în dializă, care au fost internați în Spitalul Clinic de Urgență București sau în Spitalul Universitar de Urgență București și un lot de subiecți sănătoși, voluntari, care a reprezentat lotul control.

Astfel au fost identificate 4 loturi de studiu:

1. lotul de pacienți dializați cronic care a cuprins 15 pacienți hemodializați cronic de cel puțin 1 an care erau deja în programul de dializă cronică în spitalul Clinic de Urgență București și care au fost comparați cu subiecți sănătoși sau cu pacienți uremici înainte de inițierea dializei.
2. lotul de pacienți uremici care a cuprins 12 pacienți aflați în stadiul 5 de BCR, internați în Spitalul Clinic de Urgență București sau în Spitalul Universitar de Urgență București pentru inițiere în programul de hemodializă cronică. În cazul acestor pacienți hemogramele necesare analizei imunologice au fost recoltate înainte de inițierea dializei. Analizele la internare au arătat un GFR mediu de $4.35 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ cu limite între 2,1 și 6,8 corespunzând unor creatinine sanguine între 6,33 și 18,9 mg/dl, cu o medie de 11,45 mg/dl.
3. lotul martor care a cuprins 27 de subiecți sănătoși în cazul studiului limfocitelor T (15 din baza de date a Spitalului Universitar de Urgență care aveau deja lucrată fenotiparea limfocitelor T la care s-au adăugat 12 noi voluntari), 12 martori pentru studiul limfocitelor B și monocitelor care au fost identificați în Spitalul Clinic de Urgență București. Subiecții sănătoși au fost selectați în așa fel încât să fie asemănători ca sex sau vârstă cu pacienții dializați astfel încât să obținem loturi omogene având drept obiectiv reducerea incidenței factorilor de confuzie.

Acestor 3 loturi inițiale li s-a adăugat pe parcursul studiului un lot de pacienți care au suferit de o formă medie de infecție Covid:

4. Lotul de 5 pacienți dializați cronic desprins din lotul 1 care au dezvoltat o formă medie de infecție Covid în timpul studiului datorită cărora am analizat răspunsul imun al acestor pacienți în fața unei infecții virale extrem de bine analizate în timpul pandemiei.

3.3 Protocolul studiului

Pentru a studia modificările de imunitate apărute în diferite situații se folosește metoda flowcitometrică prin care se pot diferenția diferitele subpopulații limfocitare și subtipurile monocitare astfel putând aprecia influența uremiei asupra statusului imun al pacienților.

Testul folosit pentru analiza limfocitelor T este un test preformat, DuraClone IM T cell subsets Tube, 25 tests, RUO (REF B53328). Acesta este un kit Beckman Coulter – Dura Clone IM T subset și conține (anticorp/clona(fluorocrom): CD45RA/2H4(FITC), CD28/CD28.2(ECD), CD279(PD1)/PD1.3.5(PC5.5), CD197(CCR7)/G043H7(PE), CD57/NC1(PacificBlue), CD27/1A4.CD27(PC7), CD4/13B8.2(APC), CD8/B9.11(A700), CD3/UCHT-1(APC-A750), CD45/J33(Krome Orange) [16].

Pentru identificarea subtipurilor limfocitului B implicate în răspunsul imun: s-a utilizat de asemenea un test preformat DuraClone IM B cell subsets Tube, 25 tests, RUO (REF B53318). Acest kit Beckman Coulter – DuraClone IM B subset conține (anticorp(clona)-fluorocrom): IgD(IA6-2)-FITC / CD21(BL13)-PE / CD19(J3-119)-ECD / CD27(1A4CD27)-PC7 / CD24(ALB9)-APC / CD38(LS198-4-3)-APC-A750 / IgM(SA-DA4)-Pacific Blue / CD45(J33)-Krome Orange [17].

Pentru studiul monocitelor s-au folosit următorii markeri de la suprafața membranei: CD64, CD14, CD16, CD300e, HLADR. Anticorpii folosiți în acest scop sunt anticorp (clona) -fluorocrom: HLA-DR (L243) – V450/CD45 (HI30) – OC515/CD36 (CLB-IVC7) - FITC/CD64 (10.1) – PE/CD300e (UP-H2) - APC/CD14 (MφP9) – APCH7/CD16(Fc-Gran1)-FITC.

Pentru efectuarea analizelor de imunofenotipare am utilizat flowcitometrul Gallios produs de Becton Dickinson, dotat cu 3 lasere, și 10 culori prin care se determină mărimea, tipul celulelor examinate și particularitățile fluorescențe ale acestora [18].

Sistemul de lasere este reprezentat de un laser albastru (488nm), un laser roșu (638nm) și un laser violet (405nm). Aparatul detectează simultan 10 fluorescențe diferite ceea ce reprezintă 10 markeri simultani [18].

Protocolul de lucru pentru studiul leucocitelor implicate în răspunsul imun cuprinde:

1. Stabilirea protocolului/panelului de anticorpi.
2. Recoltarea probei de sânge periferic prin puncție endovenoasă, în vacutainer

- cu EDTA pentru hemoleucogramă, și păstrarea probelor de sânge la temperatura camerei. După colectarea probelor de sânge acestea au fost transportate în laborator la temperatura camerei.
3. Prelevarea unei cantități de 100 μ l din probă (sânge periferic) și introducerea în tuburile Falcon / tuburi dry pentru paneluri cu anticorpii monoclonali liofilizați în tub.
 4. Marcarea cu anticorpi monoclonali 5-20 μ l / tub.
 5. Vortexare probă.
 6. Incubare 15 minute la întuneric și temperatura camerei.
 7. Lizarea hematiilor și fixarea membranei celulare +/- paraformaldehida (dacă se păstrează proba mai mult timp) prin 2 metode:
 - a. cu ImmunoPrep, reactivul A, B și C
 - b. cu FACS Lyse Solution câte 500 μ l
 8. Introducerea tubului în citometru și efectuarea achiziției cu software-ul de achiziție al aparatului (citire în flowcitometru după procesarea cu ImmunoPrep sau după 10–15-minute dacă am folosit FACS Lyse solution).
 9. Analiza probei cu control izotipic pentru fiecare fluorescență utilizată și fixarea limitelor cadranelor astfel încât cadrantul 3 (dublu negativ) să aibă cel puțin 98% dintre celule. Setarea canalelor de fluorescență a fost realizată folosind protocolul Harmonemia (*Harmonemia: a universal strategy for flow cytometry immunophenotyping—A European LeukemiaNet WP10 study, Leukemia volume 30, pages1769–1772 (2016)*).

3.4 Analiza statistică

Baza de date a fost întocmită pe baza fișelor efectuate pentru fiecare pacient în parte, cu introducerea datelor clinice, biologice și paraclinice ca variabile. Interpretarea statistică a datelor a fost realizată utilizând Microsoft Office Excel pentru Windows 2007 și Jasp 0.14.1. O valoare $p < 0.05$ a fost considerată relevantă din punct de vedere statistic. Graficele au fost lucrate în Excel și Jasp.

Loturile studiate au fost mici dar pacienții au fost selectați dintr-o populație puțin numeroasă, subiecții care au alcătuit loturile de studiu au îndeplinit anumite criterii de includere și excludere astfel încât acestea să fie comparabile.

Pentru alegerea metodelor statistice corespunzătoare acestor loturi s-a avut în vedere în primul rând că datele obținute au fost numerice astfel încât s-au utilizat metode statistice adaptate acestui tip de date. Pentru studiul statistic s-a folosit t-test pentru două eșantioane care este adecvat loturilor mici.

Pentru alegerea tipului de analiză utilizată: parametrică sau nonparametrică, s-a avut în vedere faptul că datele obținute au fost independente, a fost utilizat testul Shapiro-Wilk pentru toate loturile examinate pentru a verifica normalitatea distribuției datelor și a fost utilizat testul Levene pentru a verifica, de asemenea, omogenitatea varianței. Toate aceste teste au fost aplicate în programul Jasp înainte de a selecta tipul de analiză statistică.

Pentru cazurile în care datele au avut o distribuție normală și o varianță omogenă loturile caz-martor au fost analizate folosind testul Student. În cazul abaterii de la normalitate sau în cazul unui test Levene care indică varianță neomogenă a fost preferat testul nonparametric Mann-Whitney pentru două eșantioane pentru compararea datelor cantitative neîmperecheate.

Pentru datele „în pereche”, s-a utilizat testul Student pentru perechi dacă datele au avut o distribuție normală și testul Wilcoxon în cazul în care distribuția nu a fost normală.

Indicii de corelație utilizați au fost de tip Spearman's rho, s-a preferat un test nonparametric de corelație deoarece nu toate seturile de date au avut o distribuție normală sau o varianță omogenă.

CAPITOLUL 4: ANALIZA FENOTIPICĂ A LIMFOCITELOR T

Conform instrucțiunilor de utilizare a panelului propus de firma Beckman Coulter pentru cercetarea răspunsului imun mediat de limfocitele T am urmărit limfocitele T naive care circulă în sânge după ce au părăsit timusul cu expresie CD45RA+CCR7+, limfocitele T care își pierd expresia CD27 sau CD28 după expunere la antigene străine devenind limfocite T effector antigen specific, limfocite T central memory cu viață lungă care exprimă CD45RA-CCR7+, limfocite T effector memory cu expresie CD45RA-CCR7- ambele asigurând un răspuns imun rapid antigen specific. Stadiile terminale de diferențiere pentru limfocitul T cu expresie CD45RA+CCR7- și sunt descrise în literatură ca celule TEMRA. Unii autori consideră celulele TEMRA ca fiind celule efectoare diferențiate terminale care au proprietatea de a secreta interferon gamma, au citotoxicitate ridicată, capacitate de proliferare redusă și mare sensibilitate la apoptoză [4,19]. Există autori care descriu mai multe subgrupuri de celule TEMRA în funcție și de expresia CD27 și CD28, subclasele rezultate având efecte specifice, cele CD27-/CD28- fiind limfocitele T înalt citotoxice cu diferențiere tardivă [4,19]. Limfocitele TEMRA sunt identificate în sânge în special pentru limfocitele T CD8+, în schimb limfocitele TEMRA CD4+ sunt rar detectate în sânge, apar în cazul infectării cu unele virusuri și se consideră a avea rol protector [4,20].

Conform OMIP-069 CD57 este un indicator al senescentei celulare prezent la nivelul limfocitelor T cu capacitate scăzută de proliferare. Receptorul inhibitor PD-1 este crescut la nivelul limfocitelor T activate [16,21,22,23].

Rezultatele studiului arată, în ceea ce privește numărul de limfocite, faptul că acestea scad semnificativ ($p < 0.012$) în cazul pacienților dializați cronic față de lotul control iar scăderea este și mai accentuată în cazul lotului de pacienți uremici față de control ($p < 0.002$). Tendința la scădere în cazul pacienților uremici față de dializați nu are semnificație statistică ($p > 0.2$). Limfopenia este considerată în literatură a fi comună pacienților cu boală cronică de rinichi stadiul 5 [25] (figura 4.1).

Studiul publicat în 2016 de către Fang-Fang Xiang et al efectuat pe un lot de 472 de pacienți cu boală cronică de rinichi în diferite stadii de evoluție evidențiază o scădere a numărului total de limfocite înainte de apariția stadiului final (5) de boală cronică de rinichi [4,9].

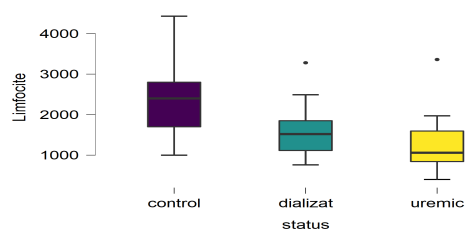


Figura 4.1: Reprezentarea grafică a numărului de limfocite între cele trei loturi studiate

Numărul de limfocite T are aceeași tendință ca și în cazul limfocitelor totale. În cazul pacienților dializați numărul scade semnificativ statistic ($p = 0.007$) față de lotul control iar în cazul pacienților uremici nedializați scăderea este mai accentuată ($p < 0.001$). Deși numărul de limfocite T are tendința la scădere în cazul pacienților uremici față de dializați această scădere nu are semnificație statistică ($p = 0.1$). Apoptoza limfocitelor T, crescută în uremie, ar putea explica limfopenia, imunodeficiența și riscul crescut de infecții al acestor pacienți [7] (figura 4.2).

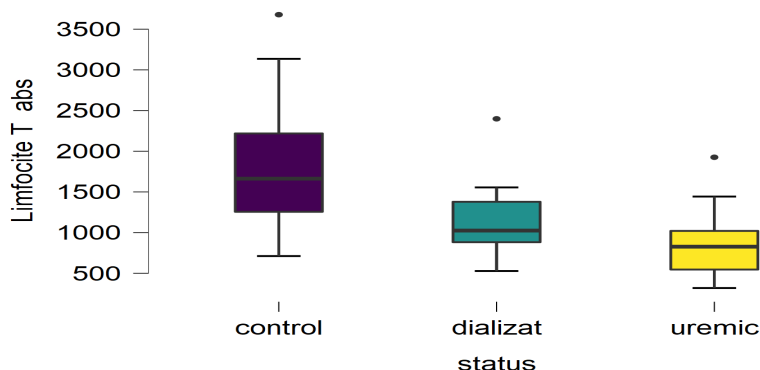


Figura 4.2: Reprezentarea grafică a numărului de limfocite T între cele trei loturi studiate

Numărul de limfocite T CD4+ este scăzut semnificativ în cazul pacienților dializați ($p = 0.003$) și uremici ($p < 0.001$) față de control, fără să existe diferențe semnificative între numărul de limfocite T CD4+ între loturile dializat/uremic ($p = 0.2$) (figura 4.3).. Numărul de limfocite T CD8+ nu variază semnificativ între loturile dializat/control ($p = 0.2$) sau între loturile dializat/uremic ($p = 0.1$) dar scad semnificativ statistic în cazul pacienților uremici față de lotul control ($p = 0.01$) (figura 4.3). Un studiu asemănător publicat în 2020 de către Sampani E. et al care compara pacienți uremici la intrarea în dializă cu un lot control și aceeași pacienți la 6 luni după inițierea dializei, descrie același lucru, scăderea semnificativă a numărului de

limfocite T CD4+ și CD8+ la intrarea în dializă (pacienți uremici înainte de efectuarea dializei) față de lotul control [24]. În cazul pacienților uremici, secundar inflamației cronice, stresului oxidativ, malnutriției apare o involuție ireversibilă a timusului având rezultat scăderea numărului total de limfocite T CD4+ și a expresiei CD28 de la suprafața limfocitelor [25].

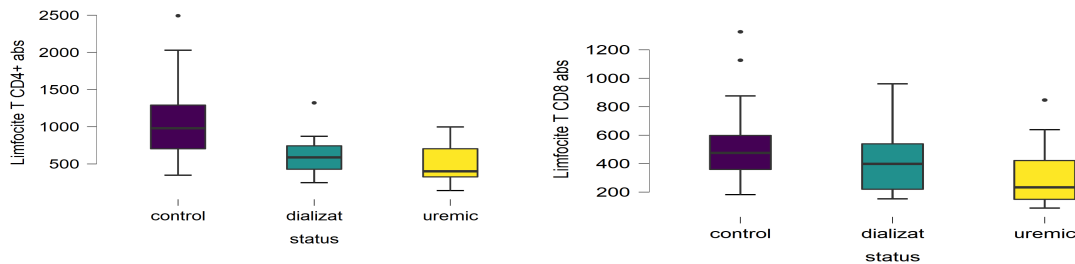


Figura 4.3: Reprezentarea grafică a numărului și de limfocite T CD4+ și CD8+ între cele trei loturi studiate

Deși din punct de vedere statistic nu există diferențe semnificative în ceea ce privește raportul limfocitelor T CD4+/CD8+ între loturile studiate dacă calculăm procente de valori subunitare rezultă că 14.8% dintre subiecții lotului control au avut raport subunitar, 26.6% dintre pacienții dializați cronic au avut raport subunitar și 25% dintre pacienții uremici nedializați de asemenea au avut raport subunitar.

Numărul de limfocite T CD4+ central memory scade nesemnificativ la pacienții dializați față de lotul control (p 0.2) dar scăderea este semnificativă (p 0.05) la pacienții uremici față de lotul control. Scăderea numărului de limfocite central memory în cazul pacienților uremici față de cei dializați cronic este nesemnificativă statistic (p 0.2) (figura 4.4)

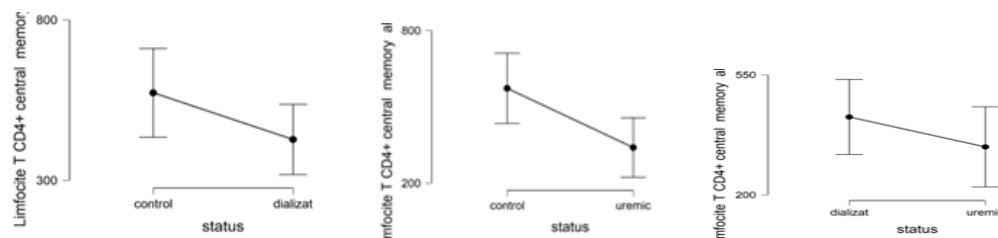


Figura 4.4 : Reprezentarea grafică a numărului de limfocite T CD4+ Central memory între cele trei loturi studiate

Numărul de limfocite T CD8+ central memory scade în cazul pacienților dializați cronoc față de control (p 0.7), în cazul pacienților uremici față de control (p 0.2) și în cazul pacienților uremici față de cei dializați cronic (p 0.4) fără ca aceste diferențe să fie semnificative din punct de vedere statistic. (figura 4.5)

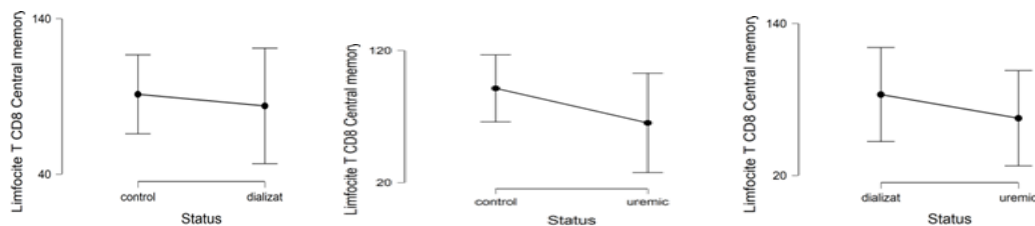


Figura 4.5: Reprezentarea grafică a numărului de limfocite T CD8+Central memory între cele trei loturi studiate

Numărul de limfocite T central memory se corelează pozitiv și va scădea odată cu scăderea numărului de limfocite, a numărului de limfocite T sau CD4+ respectiv CD8+ ceea ce se corelează cu literatura.

Exprimarea procentuală arată însă în cazul limfocitelor T CD4+ central memory un procent crescut semnificativ statistic ($p = 0.003$) la pacienții dializați cronic față de lotul control și la pacienții uremici nedializați față de lotul control ($p = 0.001$). Nu există diferențe între loturile uremic și dializat cronic ($p = 0.89$). În cazul limfocitelor T CD8+ central memory nu există diferențe semnificative între loturile studiate.

Aceleași rezultate apar în studiul efectuat pe 412 pacienți cu boală cronică de rinichi în stadiul final versus 57 de subiecți sănătoși publicat de Chiu Y-L et al: dacă ne uităm în tabelul care centralizează rezultatele vedem că procentul de limfocite CD4+ central memory crește semnificativ la pacienții dializați cronic față de lotul control pe când numărul absolut nu variază semnificativ în cazul limfocitelor T CD4+ și CD8+ central memory față de lotul control [12].

Procentul de Limfocite T CD4+ effector, care corespund fenotipului CCR7-CD45RA+ și apar în literatură drept celule TEMRA, este mic, aceste celule nu sunt numeroase, scad semnificativ la pacienții dializați cronic față de lotul control ($p = 0.01$) și este scăzut semnificativ la pacienții uremici față de lotul control ($p = 0.003$). Între pacienții uremici și cei dializați cronic nu există diferențe semnificative ($p = 0.98$). În ceea ce privește procentul de limfocite T CD8+ TEMRA acesta apare mult crescut la pacienții dializați cronic față de lotul control ($p = 0.009$), deși uremicul are mai puține limfocite T CD8+ effector față de pacienții dializați cronic procentele nu sunt semnificativ diferite statistic ($p = 0.09$) iar între lotul control și cel al pacienților uremici nu par să fie diferențe semnificative ($p = 0.7$). Prin îmbătrânirea prematură a sistemului

imun, la pacientul dializat cronic, apar mai multe limfocite T de memorie înalt diferențiate care au o acțiune proinflamatorie destabilizând placa aterosclerotică și menținând statusul de inflamație cronică la pacientul uremic [7]. În studiul publicat de Chiu Y-L apare o creștere semnificativă atât a numărului cât și a procentului de limfocite CD8+ diferențiate terminal la pacienții cu boală cronică de rinichi stadiul 5. În schimb numărul și procentele de limfocite T CD4+ diferențiate terminal nu par a fi influențate semnificativ de boala cronică de rinichi [12]. (figura 4.6)

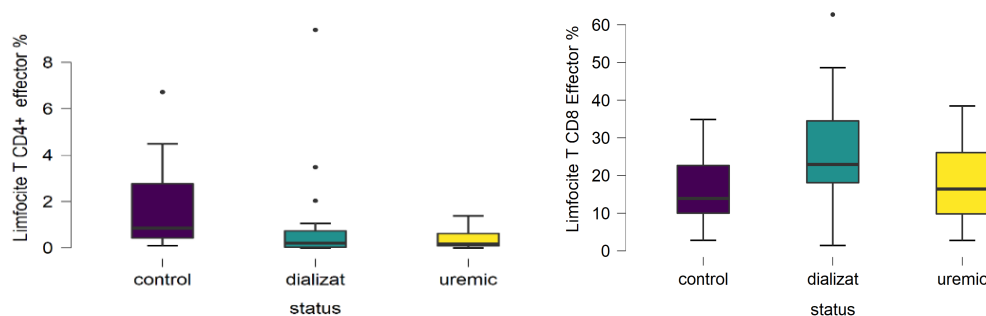


Figura 4.6 : Reprezentarea grafică a procentului de limfocite T CD4+ și CD8+ TEMRA (effector) între cele trei loturi studiate

Procentul de limfocite CD4+ naive scade semnificativ în cazul pacienților dializați cronic față de lotul control (p sub 0.001), de asemenea acest procent este scăzut semnificativ în cazul pacienților uremici față de lotul control (p sub 0.001). Între loturile uremic și dializat cronic nu există diferențe semnificative (p 0.9). Și în cazul limfocitelor T CD8+ naive apare o scădere semnificativă statistic în cazul pacienților dializați cronic față de lotul control (p 0.01) și o scădere semnificativă statistic în cazul pacienților uremici față de lotul control (p 0.002)(figura 4.7)

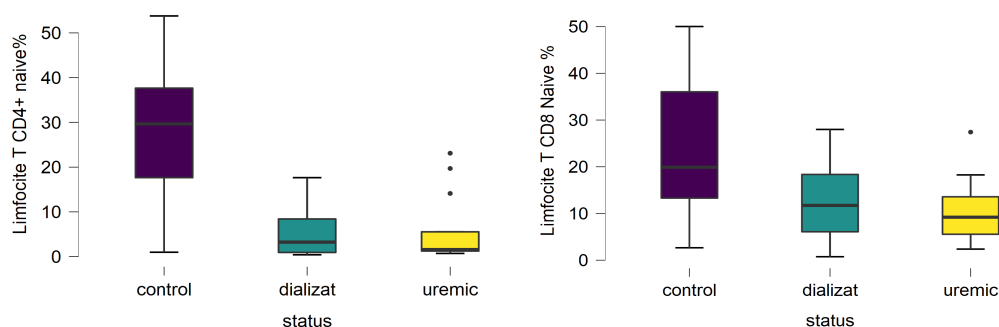


Figura 4.7 : Reprezentarea grafică a procentului de limfocite T CD4+ și CD8+ Naive între cele trei loturi studiate

Studiul publicat în 2018 de Chiu Y-L evidențiază o scădere procentuală și numerică semnificativă atât a limfocitelor T CD4+ naive cât și a limfocitelor T CD8+

naive, acestea din urmă, împreună cu creșterea procentului de limfocite T CD8+ TEMRA la pacienții cu boală cronică de rinichi în stadiul final fiind considerate elemente importante în diagnosticul imunosenescentei implicate în procesul de ateroscleroză [12].

În cazul limfocitelor T CD4+CD57+ se observă o creștere procentuală semnificativă la pacienții dializați cronic (p 0.01) și pacienții uremici (p 0.02) față de lotul control în timp ce între pacienții uremici și cei dializați cronic nu există diferențe (p: 1). În cazul limfocitelor T CD8+CD57+ creșterea procentuală în cazul pacienților dializați cronic este ne semnificativă (p 0.6) față de lotul control, la fel pacienții uremici au ne semnificativ mai multe procente de limfocite T CD8+CD57+ față de cei dializați cronic (p 0.1) iar pacienții uremici nedializați au un procent semnificativ mai mare față de lotul control (p 0.03). (figura 4.8)

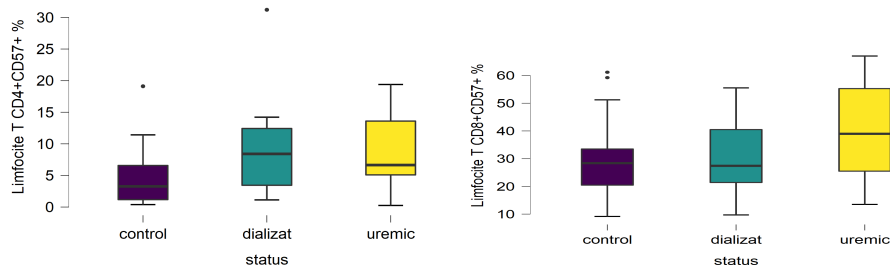


Figura 4.8 : Reprezentarea grafică a procentului de limfocite T cd4+ și CD8+CD57+ între cele trei loturi studiate

În cazul limfocitelor T CD4+CD27-CD28- se observă o creștere procentuală semnificativă statistic în cazul pacienților dializați cronic față de lotul control (p0.02), de asemenea pacienții uremici au semnificativ mai multe limfocite T CD4+CD27-CD28- față de lotul control (p 0.01). Loturile dializat cronic și uremic nedializat nu au fost diferite din punct de vedere statistic (p 0.6). În ceea ce privește limfocitele T CD8+CD27-CD28- acestea cresc semnificativ în cazul pacientului dializat cronic față de lotul control (p 0.02), creștere care se repeat în cazul pacientului uremic față de control (p 0.004). Creșterea în cazul pacienților uremici față de cei dializați cronic este ne semnificativă statistic (p 0.3)

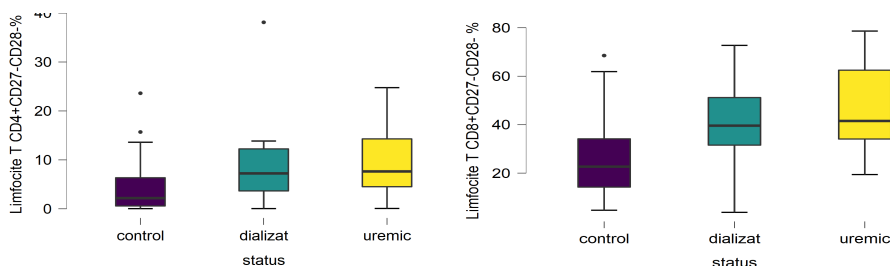


Figura 5.16 : Reprezentarea grafică a procentului de limfocite T CD4+ și CD8+CD27-CD28- între cele trei loturi studiate

In studiul nostru în cazul pacienților aflați în program de hemodializă vârsta se corelează doar cu procentul de limfocite naive, în schimb procentele crescute de limfocite senescente, proinflamatorii, differentiate terminal se corelează între ele dar sunt independente de vârstă ceea ce pledează pentru imunosenescența pacienților dializați independent de vârsta acestora.

CAPITOLUL 5: ANALIZA FENOTIPICĂ A LIMFOCITELOR B

Numărul de limfocite B nu diferă din punct de vedere statistic între pacienții dializați și lotul control ($p:0,981$), între pacienții dializați și cei uremici ($p: 0,683$) sau între lotul control și pacienții uremici ($p:0,669$)

În ceea ce privește limfocitele B de tranziție din punct de vedere statistic nu există corelație semnificativă între pacienții din lotul control și cei dializați cronic ($p:0,82$). Pacienții uremici au un procent semnificativ statistic mai mic de limfocite de tranziție față de cei dializați ($p:0,04$) iar față de lotul control scăderea este de asemenea semnificativă din punct de vedere statistic cu un p sub $0,001$. Deci pacienții uremici au semnificativ mai puține limfocite B de tranziție ceea ce pare să se corecteze odată cu inițierea dializei cronice.

În ceea ce privește limfocitele B naive dacă analizăm din punct de vedere statistic lotul dializat față de control se remarcă un procent crescut semnificativ ($p:0,03$) de limfocite B naive în lotul de pacienți dializați. De asemenea pacienții aflați în program de hemodializă cronică au un procent semnificativ mai mare ($p:0,05$) de limfocite B naive față de pacienții uremici. În ceea ce privește lotul pacienților cu boală cronică de rinichi în stadiul final nedializați nu există diferențe semnificative față de lotul control ($p:0,893$). Aceste rezultate evidențiază creșterea procentului de limfocite B naive doar în cazul pacienților dializați creștere care nu se regăsește și la pacienții uremici. (figura5.1). Studiile efectuate până în prezent descriu un procent de limfocite B imature mai mare la pacienții dializați cronic față de cei uremici care se confirmă în cazul studiului nostru atât pentru limfocitele de tranziție cât și pentru cele naive [26]

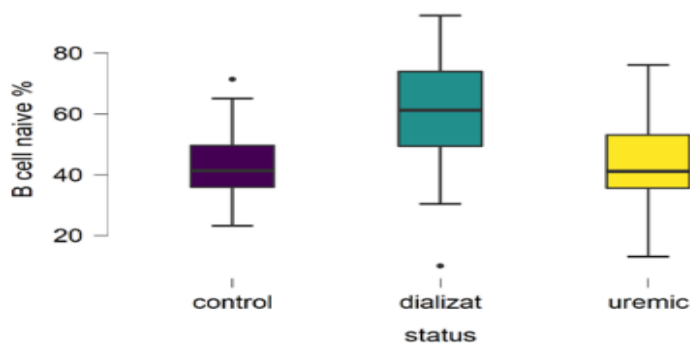


Figura 5.1: reprezentarea grafică a celor trei loturi de limfocite B naive.

Procentul de limfocite B unswitched este crescut semnificativ la pacienții uremici față de cei aflați în program de hemodializă (p: 0,005) și față de lotul control (p:0,035) în timp ce între loturile de pacienți dializați și lotul control nu există diferențe semnificative din punct de vedere statistic (p 0.3) deși pacientul dializat tinde să aibă mai puține limfocite B unswitched față de grupul control (figura 5.2). Cu alte cuvinte limfocitele B unswitched sunt crescute la pacienții uremici înainte de începerea dializei și prezintă o scădere importantă odată cu intrarea în hemodializă.

În cazul procentului de limfocite B switched din punct de vedere statistic nu se constată diferențe semnificative între loturile studiate: p:0,217 pentru loturile control/dializat, p:0,139 pentru loturile dializat/uremic și p: 0,887 pentru loturile control/uremic

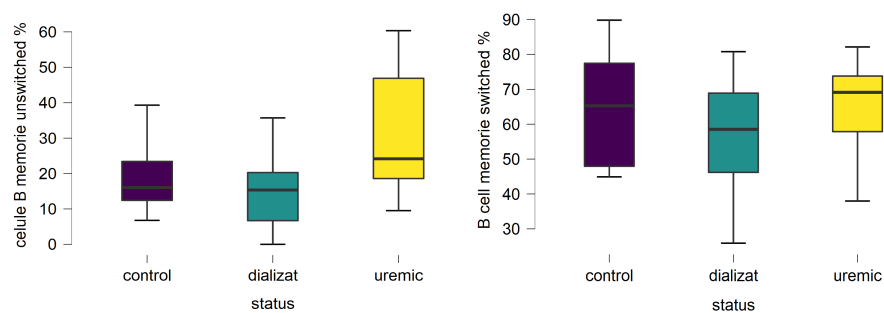


Figura 5.2: reprezentarea grafică a limfocitelor B unswitched și switched în cazul celor trei loturi studiate

Dacă analizăm din punct de vedere statistic diferențele dintre loturile dializat/control, uremic/dializat și uremic/control pentru limfocitele B CD21lowCD38low se observă faptul că între loturile de pacienți dializați și control nu există o diferență semnificativă statistic (p:0,103) în schimb pacienții uremici nedializați au un procent semnificativ mai mare (p:0,010) de limfocite B CD21lowCD38low față de pacienții dializați și nesemnificativ mai mare (p:0,143) față de control posibil fiind un indicator de inflamație cronică a acestor pacienți. Cu alte cuvinte, odată cu începerea hemodializei ca metodă de tratament procentul de limfocite B CD21lowCD38low prezintă o scădere semnificativă în cazul pacienților dializați (figura 5.3).

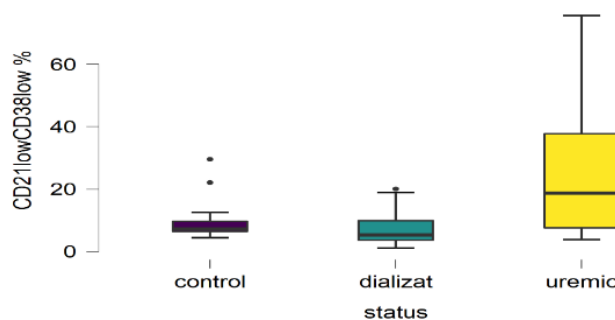


Figura 5.3: Reprezentarea grafică a limfocitelor B CD21lowCD38low a celor trei loturi studiate

Procentul de plasmoblaști este scăzut semnificativ în cazul pacienților uremici față de pacienții dializați dar nu și față de lotul control față de care prezintă de asemenea un procent mai mic dar nesemnificativ din punct de vedere statistic acesta fiind un indicator de răspuns imun inadecvat care apare în cazul pacienților cu boală cronică de rinichi stadiul 5 și se ameliorează odată cu începerea dializei (figura 5.4).

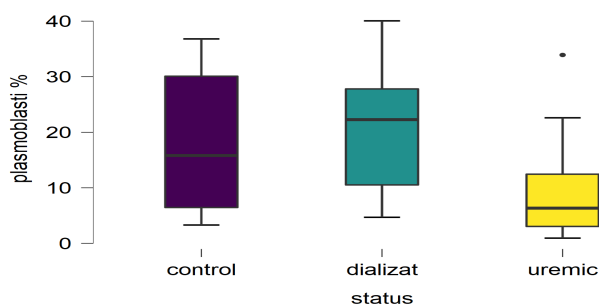


Figura 5.4: reprezentarea grafică a plasmoblaștilor în cazul celor trei loturi studiate

În studiul nostru numărul de limfocite scade atât la pacienții uremici cât și la cei dializați cronic față de control, procentul de limfocite B naive este crescut la pacienții dializați față de cei uremici sau control, procentul de limfocite B de memorie unswitched crește la pacienții uremici față de cei dializați și control dar limfocitele B de memorie unswitched rămân nemodificate, procentul de plasmoblaști este scăzut la pacienții uremici față de dializați și este posibil ca să existe diferențe în ceea ce privește răspunsul la vaccinare la pacienții uremici față de cei dializați cronic, iar limfocitele B de tranziție sunt scăzute la pacienții uremici față de cei dializați sau grupul control. Aceste rezultate sunt comparabile cu cele obținute de Kyoung Woon Kim et al în 2012 când publică un studiu care compară subpopulațiile limfocitare B între 27 pacienți hemodializați cronic, 17 pacienți cu boală cronică de rinichi aflați în predializă și 27 de voluntari sănătoși pornind de la observația că doar 50-75% dintre pacienții cu boală cronică de rinichi în stadiul final dezvoltă anticorpi protectivi după

vaccinarea împotriva hepatitei B deci există modificări de imunitate la nivelul limfocitului B [4,26]. Rezultatele studiului au arătat faptul că procentul limfocitelor B CD19+ nu a fost diferit în cele trei grupuri, procentul de limfocite B imature este mai mare în grupul pacienților hemodializați față de cei aflați în predializă iar procentul de limfocite B de memorie a fost mai mare în grupul pacienților aflați în predializă față de cei hemodializați [4,26]. Conform autorilor acestui studiu scăderea procentului limfocitelor B imature și creșterea procentului limfocitelor B de memorie la pacientul aflat în predializă ar fi urmarea dezechilibrului de balanță între acțiunea efectoare și reglatoare [4,26]. În mod neașteptat în acest studiu nu au existat diferențe semnificativ statistic între grupul de control-sănătoși și pacienții din predializă [4,26]. În cazul pacienților dializați se constată o scădere a limfocitelor B de memorie față de lotul martor [4,26] ceea ce în studiul nostru nu s-a observat.

Uremia este responsabilă de reducerea numărului de limfocite B naive și de memorie ceea ce conduce la un răspuns imun umoral deficitar la pacienții cu boală cronică de rinichi în stadiul final în cazul infecțiilor sau al vaccinării [3,4]. După cum se observă și în studiul nostru pacienții uremici nedializați au mai puține limfocite B naive față de pacienții dializați dar prezintă mai multe limfocite B CD21lowCD38low (proinflamatorii) și mai multe limfocite B de memorie unswitched față de pacienții dializați. Studiu publicat în 2010 de către Madeleine V. Pahl et al efectuat pe 21 de pacienți stabili aflați în program de hemodializă versus 21 pacienți control a evidențiat scăderea numărului tuturor subpopulațiilor de limfocite B cu excepția limfocitelor B de tranziție, fără a se putea demonstra creșterea apoptozei limfocitelor B la pacientul hemodializat cronic față de cel nonuremic [4,27]. Această scădere este pusă pe seama down-regulation receptorului BAFF de la nivelul limfocitelor B de tranziție. Rezulta o rezistență la acțiunea BAFF (B-cell – activating factor of the tumor necrosis factor family) care are un rol important în diferențierea și supraviețuirea limfocitului B [4,27]. În studiul nostru nu am evidențiat aceste scăderi dar trebuie ținut cont de faptul că dializoarele folosite acum sunt din ce în ce mai performante, a crescut numărul de ședințe de hemodiafiltrare, eficiența ședințelor de hemodializă este în continua creștere ceea ce probabil se reflectă în ameliorarea tulburărilor de imunitate în cazul pacienților dializați cronic.

CAPITOLUL 6: ANALIZA FENOTIPICĂ A MONOCITELOR

Rezultatele studiului arată că procentul de monocitele clasice scade semnificativ atât în grupul de pacienți dializați cât și în grupul uremic față de control cu o scădere mai accentuată ne semnificativă în grupul dializat iar procentul de monocite proinflamatorii CD16+ (nonclasice și intermediare) sunt crescute atât la pacientul dializat cât și uremic ceea ce susține statusul proinflamator al pacientului cu boală de rinichi în stadiul final.

Evidențierea creșterii preferențiale a monocitelor proinflamatorii este importantă pentru clinician deoarece această creștere este legată direct de patologia pacientului cu boală cronică de rinichi.

Monocitele clasice au rol în repararea tisulară și răspunsul imun (fagocitoză), cele intermediare sunt responsabile pentru stimularea și proliferarea celulelor T, produc cea mai mare cantitate de ROS și au rol în angiogeneză iar monocitele nonclasice produc stimularea și proliferarea celulelor T CD4+, produc citokine proinflamatorii și migrează prin endoteliul vascular [28].

Creșterea ponderii monocitelor intermediare este asociată cu evoluția bolii cronice de rinichi [28]. Numărul de monocite intermediare la pacientul dializat este un predictor important al evenimentelor cardiovasculare [28]. De asemenea un număr crescut de monocite nonclasice sunt găsite la pacienții cu boală cronică de rinichi în stadiul final [28].

Identificarea subpopulațiilor monocitare și acțiunea lor proinflamatorie ar putea ajuta ca biomarkeri în diverse boli incluzând bolile cardiovasculare la pacienții uremici pentru cuantificarea riscului, de asemenea pot fi markeri de evoluție sub diferite tratamente aplicate inclusiv pacienților uremici (de ex antiinflamator) [28]. De asemenea găsirea unei modalități terapeutice de scădere a monocitelor proinflamatorii la pacienții uremici poate influența evoluția bolilor cardiovasculare la acești bolnavi.

Un studiu realizat de V. Liakopoulos et al și publicat în 2018 pe 15 pacienți hemodializați și 16 persoane sănătoase-lotul control evidențiază o creștere semnificativă a numărului de monocite și o distribuție diferită a subgrupurilor monocitare corespunzător statusului proinflamator: monocitele clasice scad

semnificativ, iar monocitele intermediare si cele nonclasice cresc semnificativ statistic la fel ca în studiul nostru [29].

Un alt studiu publicat în 2017 de Yachung Jeng et al pe un lot de 136 pacienți hemodializați cronic arată ca numărul crescut de monocite CD16+ crește riscul de mortalitate cardiacă si mortalitate de alte cauze în special în cazul pacienților dializați care au istoric de boală coronariană [10]. Evaluarea microinflamației ar putea ajuta clinicienii să recunoască pacienții cu risc, să reducă inflamația, in viitor poate să regleze funcționarea sistemului imun astfel reducând mortalitatea [10].

Studiu publicat in 1998 de către W.A. Nockher et al evidențiază în cazul pacienților hemodializați cronic creșteri ale numărului monocitelor CD16+, acestea prezentând o creștere suplimentară în caz de infecții . În plus acestea exprimă un nivel mai mare de HLA-DR la suprafață [30].

Creșterea monocitelor CD16+ in cazul pacienților hemodializați este urmată de leziuni endoteliale având astfel rol în rata crescută de morbiditate si mortalitate a acestor pacienți (monocitele CD14+CD16+ produc citokine proinflamatorii și au o capacitate crescută de a migra in peretele vascular, exprimă un mare număr de molecule de adeziune) [31].

Pacienții cu boală cronică de rinichi si mai ales cei hemodializați prezintă stres oxidativ, producție crescută de ROS si o capacitate defectuoasă de fagocitoză explicate posibil prin creșterea monocitelor intermediare și scăderea monocitelor clasice [30]. Cercetări recente arată faptul că monocitele exprimă componente ale sistemului angiotensina [30]. Studiu publicat in 2012 de A Merino et al evidentiaza faptul că tratamentul antireceptor de angiotensină de tip Losartan scade activarea monocitelor în dializă cu scăderea numărului de monocite CD14+CD16+(monocite nonclasice) pe perioada tratamentului [32].

Microinflamația este comună în cazul pacienților cu boală cronică de rinichi si are un rol important in dezvoltarea bolilor cardiovasculare. Pacienții cu boală cronică de rinichi asociază frecvent inflamației malnutriția si ateroscleroza prezența lor fiind denumită sindrom MIA, acestea fiind parțial datorate expansiunii monocitelor proinflamatorii CD14+CD16+. De asemenea monocitele CD14+CD16+ se corelează cu gradul bolii cronice de rinichi si cu indexul de rigiditate vasculară, rigiditatea vasculară fiind semnalată în stadiul final al bolii cronice de rinichi îndeosebi la pacienții dializați cronic [33].

Studiu publicat în 2018 de S.D. Naicker et al evidențiază creșterea monocitelor intermediare odată cu evoluția bolii cronice de rinichi și în special monocitele intermediare HLADR high prezintă creștere semnificativă [34]. Heine și colaboratorii au arătat că numărul de monocite intermediare crește încă în stadiul pacienților aflați în predializă iar numărul de monocite nonclasice crește doar la pacienții dializați [34]. Aceste rezultate au fost evidențiate și în studiul de față cu diferența că în studiul nostru au fost raportate creșteri procentuale atât ale monocitelor intermediare cât și a celor nonclasice la pacientul dializat și uremic.

În studiul nostru monocitele clasice acestea scad procentual semnificativ la pacientul dializat ($p < 0.001$) și cel uremic ($p = 0.003$) față de grupul control cu o tendință la scădere la pacienții dializați față de cei uremici ($p = 0.08$). (figura 6.1), aceste scăderi fiind raportate și în literatură[29].

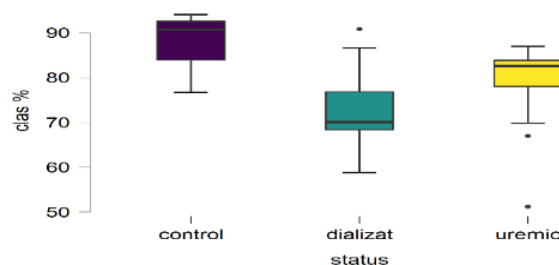


Figura 6.1 Reprezentarea grafică a procentului de monocite clasice în cele trei loturi studiate

Monocitele nonclasice sunt crescute procentual semnificativ la pacienții dializați ($p < 0.001$) și uremici ($p = 0.04$) față de control, sunt de asemenea crescute procentual semnificativ monocitele nonclasice în grupul dializat față de uremic ($p = 0.04$). (figura 6.2). Aceste rezultate sunt, de asemenea în concordanță cu literatură [28,29].

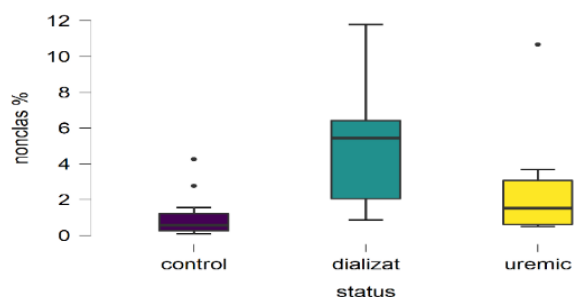


Figura 6.2 Reprezentarea grafică a procentului de monocite nonclasice în cele trei loturi studiate

În cazul monocitelor intermediare nu există diferențe semnificative între grupul dializat și uremic ($p 0.9$) dar se remarcă o creștere procentuală semnificativă a lor atât în grupul dializat (p sub 0.001) cât și uremic ($p 0.004$) față de grupul control. (figura 6.3), și aceste rezultate fiind în concordanță cu datele obținute din studii anterioare[28,29].

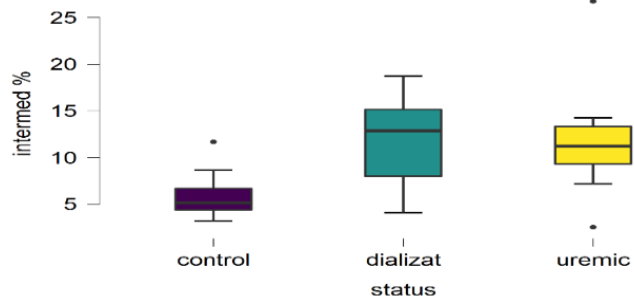


Figura 6.3 Reprezentarea grafică a procentului de monocite intermediare în cele trei loturi de studiu.

În studiul nostru procentul de monocite CD300e+ este semnificativ mai mare la pacientul dializat față de cel uremic ($p 0.03$). (figura 7.9)

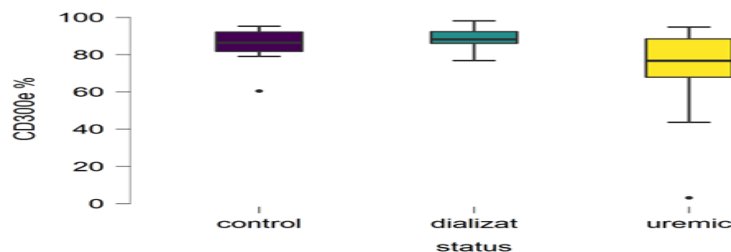


Figura 6.4: Reprezentarea grafică a procentului de monocite CD300e+ în cele trei loturi studiate

De asemenea procentul de monocite clasice CD300e+ este crescut semnificativ la pacientul dializat ($p 0.003$) față de cel uremic(figura 6.5).

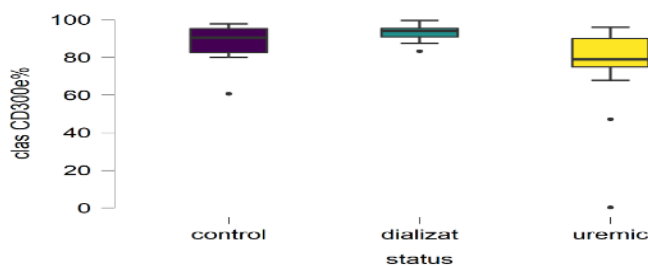


Figura 6.5: Reprezentarea grafică a procentului de monocite clasice CD300e+ în cele trei loturi studiate

Procentele de monocite nonclasice CD300e+ sunt semnificativ mai mari în cazul pacienților dializați față de cei uremici ($p = 0.004$) și scăzute procentual în cazul pacienților uremici față de control ($p = 0.02$). (figura 6.6)

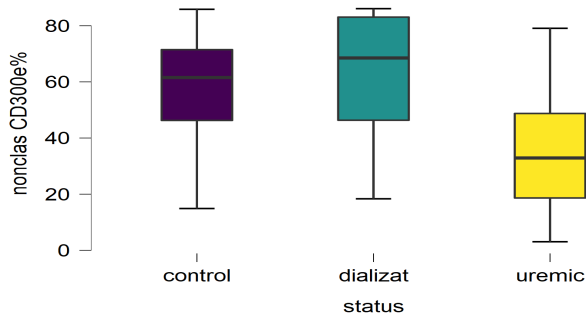


Figura 6.6: Reprezentarea grafică a procentului de monocite nonclasice CD300e+ în cele trei loturi studiate

Procentele de monocite intermediare CD300e+ nu sunt diferite statistic comparând cele trei grupuri (uremici, dializați și control). (figura 6.7)

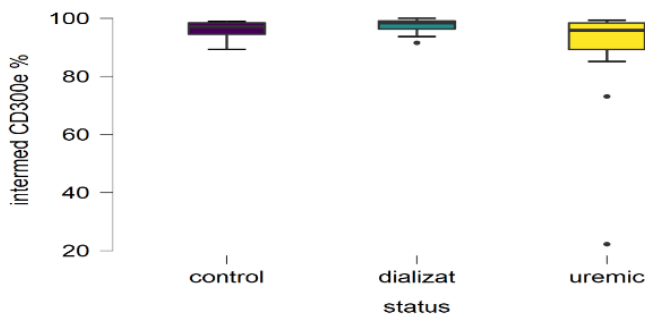


Figura 6.7: Reprezentarea grafică a procentului de monocite intermediare CD300e+ în cele trei loturi studiate

CD300e este considerat un receptor de activare imună, capabil să moduleze răspunsul inflamator, activarea lui fiind urmată de eliberarea de citokine proinflamatorii [35]. Activarea CD300e este urmată de activarea monocitelor, crește supraviețuirea acestora, crește producția de citokine proinflamatorii și crește expresia moleculelor de costimulare ceea ce duce în final la activarea limfocitului T [36]. În studiul nostru se remarcă creșterea procentului de monocite CD300e+ în special în cazul pacienților dializați cronic, de asemenea se remarcă creșterea importantă a monocitelor nonclasice CD300e+ la pacienții dializați cronic. Altfel spus, odată cu tratamentul prin dializă cronică monocitele nonclasice sunt activate imun și crește producția de citokine proinflamatorii.

Vârsta pacienților s-a corelat doar în cazul lotului martor negativ cu procentul de monocite clasice ($p:0,002$), pozitiv cu procentul de monocite nonclasice ($p:0,020$) și pozitiv cu valoarea absolută a monocitelor nonclasice ($p:0,044$). Nu au existat corelații semnificative legate de vârstă pentru nici un parametru în cazul loturilor pacienților uremici sau dializați.

Am putea spune că modificările apărute la nivelul populațiilor monocitare sunt independente de vârstă în cazul pacienților cu boală cronică de rinichi, posibil sunt legate de modificările induse de uremie sau dializă și sunt una dintre cauzele imunosenescenței la acești pacienți.

CAPITOLUL 7: ANALIZA FENOTIPICĂ A POPULAȚIILOR LEUCOCITARE ÎN TIMPUL INFECȚIEI COVID

În studiul nostru, în timpul infecției Covid numărul de leucocite (p 0.02) și limfocite (p 0.02) scad semnificativ din punct de vedere statistic față de perioada anterioară infecției. Nu există diferențe semnificative între numărul de leucocite din timpul infecției/post Covid (p 0.2) sau anterior infecției raportate la cele de după infecție (p 0.1) În aceeași măsură numărul de limfocite nu diferă semnificativ între determinările Covid/post Covid (p 0.3) sau ante Covid/post Covid (p 0.5) (figura 7.1)

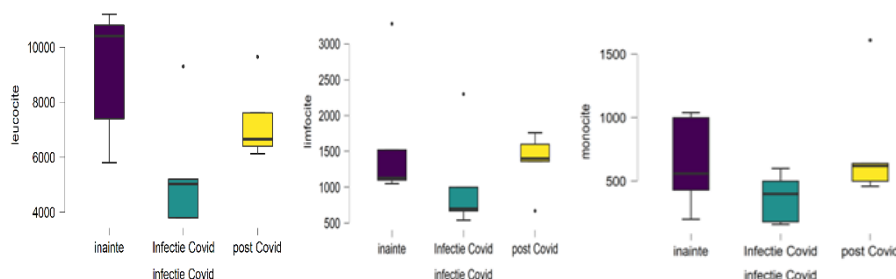


Figura 7.1: Reprezentarea grafică a numărului de leucocite, limfocite și monocite înainte, în timpul infecției Covid și după infecția Covid

7.1 Limfocitele T în infecția Covid

Numărul de limfocite T scade semnificativ statistic (p 0.04) în cazul pacienților cu infecție Covid față de perioada anterioară bolii fără să existe semnificație statistică între determinările din timpul bolii și cele post Covid (p 0.3). De asemenea nu există semnificație statistică între determinările anterioare infecției și cele post Covid (p 0.3). Din punct de vedere procentual avem valori comparabile în determinările anterior Covid/Covid (p 0.3), Covid/post Covid (p 0.8) iar post Covid se remarcă o scădere procentuală semnificativă a limfocitelor T față de perioada anterioară infecției (p 0.01). (figura 7.2)

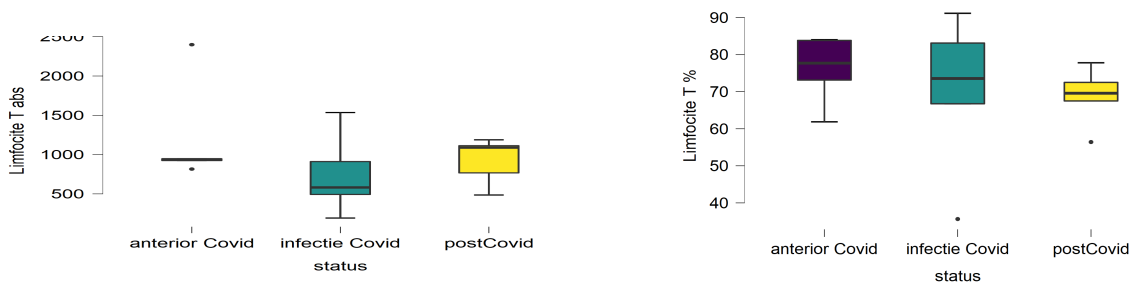


Figura 7.2: Reprezentarea grafică a numărului și a procentului de limfocite T înainte, în timpul și după infecția Covid

În cazul limfocitelor T CD4+ nu există modificări semnificativ statistic între valorile studiate, p variind între 0.11 și 0.88. Cu alte cuvinte infecția Covid nu pare să influențeze limfocitele T CD4+. Numărul de limfocite T CD8+ de asemenea nu pare să fie influențat de infecția Covid: scad nesemnificativ (p 0.07) în timpul infecției față de perioada anterioară, obținem un p 0.3 între valorile din timpul infecției comparate cu cele post Covid și p 0.1 dacă comparăm valorile anterioare Covid cu cele post Covid. Valorile procentuale ne arată o creștere nesemnificativă în timpul infecției Covid față de perioada anterioară (p 0.1) dar observăm scăderi semnificative de limfocite T CD8+ post Covid față de perioada infecției (p 0.002) și de asemenea scădere procentuală semnificativă post Covid față de valorile din perioada ante Covid (p 0.05). (figura 7.3)

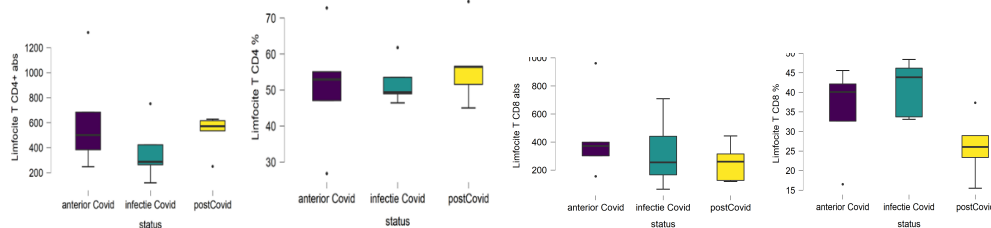


Figura 7.3: Reprezentarea grafică a numărului și procentului de limfocite T CD4+ și CD8+.

Raportul limfocitelor T CD4+/CD8+ nu a fost influențat de infecția Covid, am obținut valori de p între 0.2 și 0.9. (figura 8.6)

Limfocitele T CD4+ effector memory nu variază procentual semnificativ în timpul infecției Covid cu p între 0.1 și 0.2. În cazul limfocitelor T CD8+ effector memory se remarcă o creștere a lor în timpul infecției Covid fără semnificație statistică (p 0.1) iar procentul scade semnificativ (p 0.02) post Covid față de valorile obținute în timpul infecției. Dacă comparăm valorile post Covid cu cele anterioare infecției acestea sunt comparabile (p 0.6). Rezultatele sugerează faptul că infecția Covid nu influențează limfocitele T effector memory, de asemenea acestea nu sunt afectate post Covid.

În cazul limfocitelor T effector, TEMRA, Limfocitele T CD4+ TEMRA, deși procentele sunt mici, cresc nesemnificativ în timpul infecției Covid (p 0.4), urmează o

creștere nesemnificativă statistic post Covid față de valorile din timpul infecției (0.4) pentru ca în perioada post Covid să identificăm o creștere semnificativă a acestor limfocite față de perioada anterioară bolii (p 0.01). În aceeași măsură variază și limfocitele T CD8+ effector care cresc ușor, nesemnificativ în timpul bolii (p 0.4), continuă să crească post Covid față de valorile din timpul bolii (p 0.2) pentru a identifica valori procentuale semnificativ crescute din punct de vedere statistic post Covid față de perioada anterioară îmbolnăvirii (p 0.01). (figura 7.4)

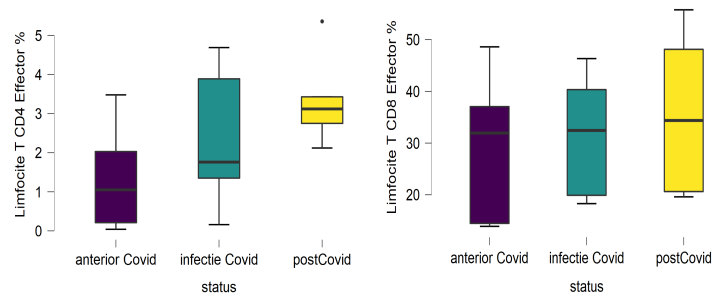


Figura 7.4: Reprezentarea grafică a procentului de limfocite T CD4+ și CD8+ effector înainte, în timpul și după infecția Covid

Din rezultatele prezentate avem leucopenie, limfopenie, scăderea numărului de limfocite T în timpul infecției Covid toate fiind reversibile post Covid. Post Covid apare totuși o scădere semnificativă a procentului de limfocite T față de perioada anterioară bolii. Scade de asemenea semnificativ procentul de limfocite T CD8+ post Covid față de perioada anterioară sau valorile din timpul bolii. Cele mai interesante rezultate sunt totuși la nivelul compartimentului de limfocite CD8+. Limfocitele TEMRA CD4+ și CD8+ cresc post Covid semnificativ față de perioada anterioară bolii. În timpul infecției Covid de asemenea scade semnificativ procentul de limfocite T CD8+ naive și crește semnificativ procentul de limfocite T CD8+ CD57+ probabil prin creșterea inflamației dar aceste modificări sunt reversibile post Covid. Cel mai important rezultat al acestui studiu consider că este creșterea procentului de limfocite cu grad înalt de diferențiere la distanță de infecția Covid, putem sugera că această infecție contribuie independent la semescența sistemului imun și probabil accelerează procesul de ateroscleroză.

7.2 Limfocitele B în infecția Covid

Limfocitele B, elemente esențiale ale răspunsului imun umoral, ale apărării organismului împotriva virusurilor, reprezintă un element important în mecanismul de protecție imună a organismului împotriva SARS-CoV-2. După infectarea cu virusul

SARS-CoV-2 sunt activate limfocitele B naive care se transformă în plasmocite cu durată scurtă de viață și care secretă anticorpi cu afinitate scăzută. O parte din limfocitele B intră în centrul germinativ unde suportă fenomenul de switch pentru a se transforma în plasmocite cu durată lungă de viață, producătoare de anticorpi cu afinitate crescută și limfocite B de memorie [37]. În mod particular, s-a observat că în cazul infecției cu SARS-CoV-2 producția de IgG apare aproape simultan cu cea de IgM și IgA, în primele 2 săptămâni de la debutul simptomatologiei. O altă particularitate este faptul că cantitatea de anticorpi protectori este mai mare în cazul pacienților care au avut forme severe de boală față de pacienții cu forme medii de boală sau cei cu reinfecții de asemenea cu forme medii de boală [38].

Rezultatele studiului nostru arată că numărul și procentul de limfocite B este scăzut în timpul infecției cu SARS Cov 2 această scădere fiind semnificativă statistic: $p:0,020$ pentru numărul de limfocite B și $p:0,006$ pentru procentul de limfocite B. (figura 7.5)

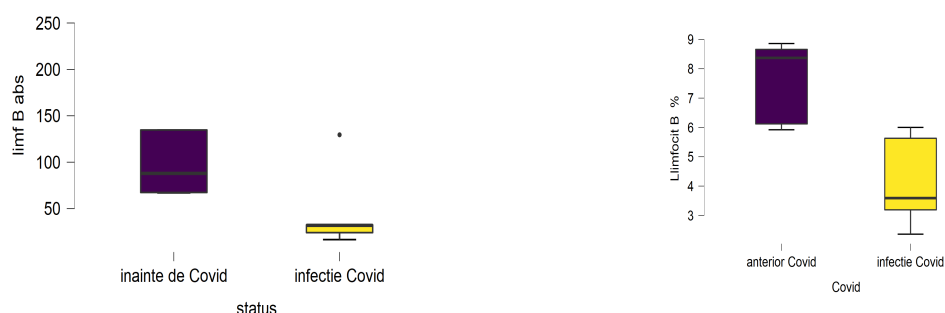


Figura 7.5: Numărul și procentul de limfocite B înainte și în timpul infecției Covid

Limfocitele B unswitched scad ușor procentual în timpul infecției Covid dar fără semnificație din punct de vedere statistic ($p:0,471$).

Limfocitele B de memorie switched scad procentual în timpul infecției, scăderea fiind semnificativă din punct de vedere statistic ($p:0,021$). (figura 7.6)

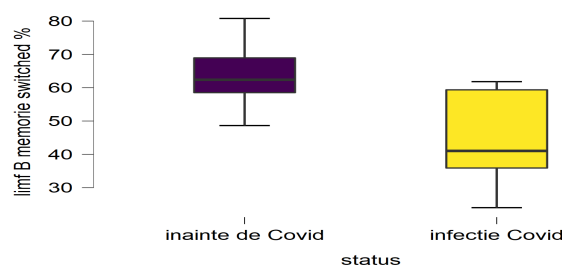


Figura 7.6: Procentul de limfocite B de memorie switched înainte și în timpul infecției Covid

Procentul de plasmoblaști prezintă o creștere în timpul infecției COVID creștere care este semnificativă din punct de vedere statistic ($p:0,042$). (figura 7.7)

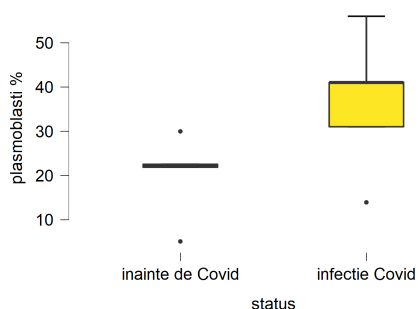


Figura 7.7: Procentul de plasmoblaști înainte și în timpul infecției Covid

În concluzie în timpul infecției Covid pacienții dializați prezintă o scădere semnificativă a numărului de limfocite și limfocite B. Procentul de limfocite B marginale, limfocite B naive și limfocite de tranziție nu se modifică semnificativ din punct de vedere statistic dar limfocitele B de memorie switched scad în timpul infecției în timp ce procentul plasmoblaștilor crește semnificativ statistic în timpul infecției Covid ceea ce sugerează o activitate imună crescută cu accent pe transformarea limfocitelor B în plasmocite producătoare de anticorpi cu un accent probabil pe plasmocitele de scurtă durată dacă este să luăm în considerare scăderea procentuală a limfocitelor B switched. Acest lucru ar putea fi explicat de faptul că recoltarea probelor a fost realizată imediat după apariția simptomelor de boală și pozitivarea testelor Covid adică în primele zile de infecție.

Un studiu publicat în 2022 dar care a exclus pacienții cu boală cronică de rinichi sau cu comorbidități importante a arătat o corelație între riscul de mortalitate al pacienților infectați cu Covid 19 și numărul scăzut de limfocite B, numărul scăzut de limfocite B naive și numărul scăzut de limfocite B de memorie switched. La fel ca și în studiul prezent pacienții au fost analizați în perioada acută a bolii [39]. Pacienții

studiați în prezent, diagnosticați cu insuficiență renală și infecție Covid au un profil asemănător al afectării limfocitului B.

7.3 Monocitele în infecția Covid

Un studiu publicat de Arianna Gatti et al în iulie 2020 a arătat o scădere a numărului de monocite nonclasice și intermediare, deci a numărului de monociteCD16+ în formele severe de Covid și creșterea lor paradoxală în formele moderate de boală [40,41].

În studiul nostrum dacă analizăm subseturile monocitare în cazul pacienților cu forme medii de infecție Covid și boală cronică de rinichi în stadiul final se observă o distribuție diferită a răspunsului inflamator cu scăderea procentului de monocite nonclasice asemănător formelor severe de boală dar fără agravarea stării pacientului. De asemenea, monocitele nonclasice exprimă un nivel mai mare de HLA-DR în cazul pacienților noștri contrar raportărilor în ceea ce privește pacienții cu forme medii de infecție Covid fără boală cronică de rinichi în stadiul final [40,42]. Procentul de monocite intermediare are tendința la creștere ca în formele medii de infecție Covid fără boală cronică de rinichi. Crește de asemenea expresia HLA-DR la nivelul monocitelor intermediare contrar scăderii observate și raportate în alte studii la pacienții cu forme medii de infecție Covid fără boală renală [40,42]. Aceste modificări ar putea sugera o activitate antivirală crescută la nivelul monocitelor nonclasice și o activitate proinflamatorie și fagocitară crescută la nivelul monocitelor intermediare în cazul pacienților cu boală cronică de rinichi în stadiul final și forme medii de infecție Covid. Dacă analizăm rezultatele obținute la aproximativ 10 luni după infecția Covid se pare că statusul proinflamator al monocitelor se menține luni după infecție [40].

Monocitele clasice par a fi afectate mai puțin în timpul infecției Covid și nu putem spune în acest studiu că prezintă o activitate crescută în timpul infecției sau după vindecare [40].

În ceea ce privește monocitele nonclasice prezintă o scădere semnificativă în timpul infecției Covid și de asemenea prezintă o expresie crescută semnificativ a expresiei HLADR+ și o tendință la creștere a expresiei CD300e contrar altor studii care raportează ocazional o scădere a expresiei HLADR+ la pacienții cu forme medii de boală fără boală cronică de rinichi stadiul terminal [40,42]. În concluzie, desi scăzute procentual, prezintă o activare crescută.

La un interval de aproximativ 10 luni de la vindecarea infecției procentul de monocite nonclasice continua să scadă și să își piardă din expresia markerilor de activare datorati infecției Covid [40]. (figura 7.8)

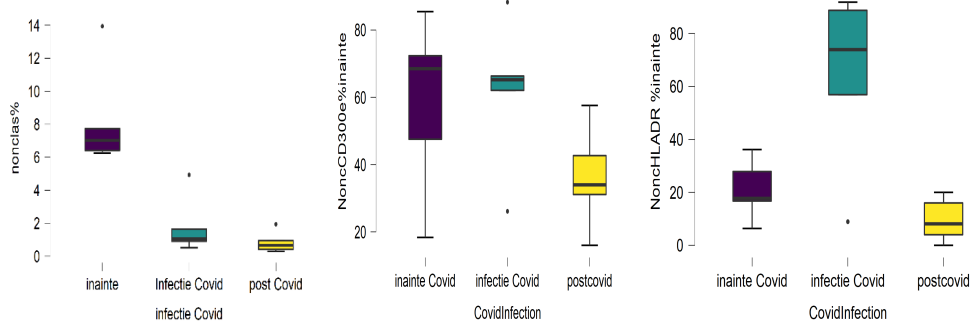


Figura 7.8: Reprezentarea grafică a procentului de monocite nonclasice, expresiei CD300e+ și HLADR+ înainte, în timpul infecției Covid și după infecția Covid

Contrar monocitelor nonclasice, procentul de monocite intermediare are o tendință la creștere în timpul bolii comparabil cu alte studii efectuate pe pacienți cu forme medii de boală nedializați dar cu o tendință de creștere a expresiei HLADR+ contrar altor studii care arată o scădere a expresiei HLADR+ în cazul pacienților cu forme medii de boală nedializați iar creșterea expresiei HLA-DR persistă după vindecarea infecției în ciuda faptului că procentul de monocite intermediare scade după infecție. [40,42].

Deci, ca și în cazul monocitelor nonclasice, procentul de monocite intermediare scade după infecția Covid la valori inferioare celor dinaintea infecției dar capătă o activitate importantă proinflamatorie cu o creștere semnificativă a expresiei HLA-DR față de cea anterioară infecției. Considerăm acesta cel mai important rezultat al studiului asupra monocitelor în cursul infecției Covid la pacienții cu boală cronică de rinichi în stadiul final: cel al persistenței caracterului proinflamator al monocitelor intermediare deoarece acestea sunt implicate în creșterea morbidității și mortalității de cauze cardiovasculare la pacientul dializat cronic.

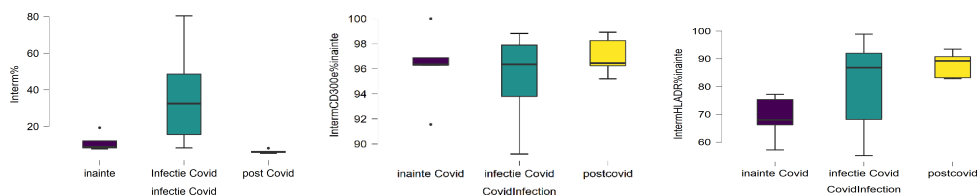


Figura 7.9: Reprezentarea grafică a procentului de monocite intermediare, expresiei CD300e+ și HLADR+ înainte, în timpul infecției Covid și după infecția Covid

Am putea spune că infecția Covid acționează ca un trigger pentru activarea proinflamatorie a monocitelor intermediare [40]. (figura 7.9)

Expresiile HLADR+ și CD300e+ la nivelul întregii populații monocitare în timpul infecției Covid au o tendință de creștere atât pentru expresia CD300e cât și pentru HLADR similară cu a altor studii efectuate pe pacienți cu forme medii de boală dar nedializați. Am putea considera că boala cronică de rinichi în stadiul final tratată prin hemodializă nu schimbă răspunsul inflamator împotriva SARS-Cov2 în formele medii de boală [40].

În schimb dacă determinăm expresia CD300e și HLA-DR în toată populația monocitară se remarcă creșterea semnificativă a acestora după vindecarea infecției Covid ceea ce ar fi un indicator în plus al activării proinflamatorii a monocitelor secundară infecției Covid. Este ca și cum infecția modifică pe termen lung statusul proinflamator al monocitelor cu toate consecințele care derivă de aici [40]. Interesantă este observația creșterii, la distanță după vindecarea infecției COVID, a expresiei procentuale a monocitelor CD300e+(p:0.025) față de valorile anterioare infecției și p=0.036 față de valorile din timpul infecției) și HLADR+ (p=0.009 comparativ cu valorile anterioare infecției). Procentul de monocite HLADR+ nu diferă semnificativ în timpul infecției COVID față de valorile postinfecție (p=0.625). Aceste rezultate ar indica faptul că după infecția COVID monocitele pacienților hemodializați cronic rămân cu un status proinflamator semnificativ care în mod sigur contribuie suplimentar la evoluția imunosenescenței [40]. (figura 7.10)

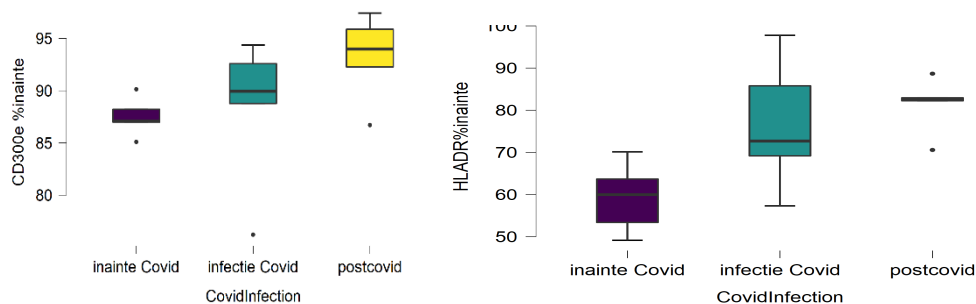


Figura 7.10: Reprezentarea grafică a procentului de monocite CD300e+ și HLADR+ înainte, în timpul infecției Covid și după infecția Covid

În următorii ani acești pacienți ar trebui monitorizați pentru a vedea dacă acest status proinflamator persistă care sunt consecințele, ce comorbidități apar și în particular evenimentele cardiovasculare [40].

CAPITOLUL 8: CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Scopul lucrării de cercetare a fost de a determina în ce măsură este afectată imunitatea în cazul pacienților cu boală cronică de rinichi stadiul 5 înainte de intrarea în dializă și în ce măsură aceasta este modificată în cazul pacienților stabili aflați deja în program de dializă cronică. După înrolarea pacienților în studiu și efectuarea analizelor ne-am confruntat cu pandemia de Covid care a oferit oportunitatea de a vedea cum reacționează sistemul imun al pacienților dializați cronic în fața acestei provocări, înainte de a putea fi vaccinați deci fără imunizare împotriva bolii. De asemenea, acești pacienți fiind dializați cronic și astfel putând fi monitorizați permanent, au putut fi retestați la distanță de momentul îmbolnăvirii pentru a vedea ce urmări ar putea avea asupra sistemului imun această infecție.

Au fost luate în calcul subtipurile de limfocite T, limfocite B și monocite, analizele fiind lucrate în acord cu recomandările grupurilor de imunofenotipare pentru diagnosticul, screeningul și clasificarea imunodeficiențelor publicate în EuroFlow educational book.

Multe din rezultatele obținute au fost comparabile cu cele din literatura de specialitate dar am obținut și o serie de rezultate diferite. Tehnica de imunofenotipare prin care s-au lucrat probele pacienților este o metodă rapidă de diagnostic, sigură dar oarecum limitată de un cost ridicat.

Rezultatele obținute în cursul studiului arată un număr mai mare de leucocite la pacientul uremic nedializat care revine la valori comparabile cu cele ale lotului control după inițierea dializei. În schimb atât pacienții dializați cât și cei uremici prezintă limfopenie semnificativă față de lotul control, scădere care este mai pronunțată în cazul pacienților uremici. Cu alte cuvinte, tratamentul prin hemodializă ameliorează parțial statusul limfopenic al pacienților uremici fără a soluționa însă limfopenia apărută secundar mediului uremic.

Limfocitele T sunt scăzute la pacienții uremici nedializați în special, cresc ușor în cazul pacienților dializați cronic dar rămân semnificativ statistic scăzute față de lotul control. În schimb numărul de limfocite B nu diferă semnificativ statistic între cele trei loturi studiate. Putem spune în concluzie că limfopenia apărută în cazul

pacienților uremici este datorată în special scăderii numărului de limfocite T, apare o imunodeficiență la nivelul imunității celulare.

Analiza subtipurilor de limfocite T ne arată că numărul de limfocite T CD4+ este scăzut semnificativ la pacienții uremici (nedializați și dializați cronic) față de lotul control, iar numărul de limfocite T CD8+ scade semnificativ doar în cazul pacienților uremici față de lotul control pentru ca după inițierea dializei valorile să fie comparabile cu cele ale lotului control. Explicația neafectării numărului de limfocite T CD8+ este creșterea populației de limfocite cu grad înalt de diferențiere, cu alte cuvinte numărul se menține prin creșterea acelei populații limfocitare cu citotoxicitate ridicată. Procentual nu există variații semnificative între cele trei loturi studiate nici în cazul limfocitelor T CD4+ nici în cazul limfocitelor T CD8+, loturile au aceeași dispoziție a populațiilor limfocitare pentru CD4+ și CD8+.

Avem valori comparabile ale raportului de limfocite T CD4+/CD8+ dar aici trebuie menționat un procent mai mare subunitar în cazul pacienților dializați cronic și uremici nedializați care arată o tendință la inversare a raportului la pacienții uremici care nu se corectează, ci dimpotrivă, pare să se accentueze odată cu efectuarea tratamentului prin hemodializă cronică.

În analiza statistică a diferitelor subpopulații limfocitare T s-a preferat analiza procentuală a acestora pentru că reflectă mai bine distribuția lor, tendințele la scădere sau creștere în condițiile unui număr diferit semnificativ de limfocite T CD4+ sau CD8+ între populațiile studiate.

În mod neașteptat procentul de limfocite T CD4+ central memory crește semnificativ în cazul pacienților uremici și dializați cronic față de lotul control, procentul de limfocite T CD8+ central memory nu se modifică în cazul celor trei loturi studiate iar dacă analizăm numărul de limfocite T CD4+ central memory acestea scad semnificativ doar la pacienții uremici față de lotul control (rezultat în corelație cu literatura de specialitate) iar numărul de limfocite T central memory CD8+ ramâne nemodificat în studiul nostru între cele trei loturi studiate. Rezultatele studiului nu arată o afectare semnificativă a limfocitelor T central memory în cazul pacienților dializați cronic în contradicție cu literatura de specialitate.

Limfocitele T CD8+ cu grad înalt de diferențiere sunt semnificativ mai mari la pacienții dializați cronic față de lotul control. În concluzie pe măsură ce pacienții uremici își desfășoară tratamentul prin hemodializă cronică crește ponderea limfocitelor T CD8+ citotoxice, imunosenescența progresează. În cazul limfocitelor T

CD4+ care sunt puțin studiate, par a avea rol protector și sunt asociate cu infecții virale, acestea sunt scăzute semnificativ atât la pacientul uremic nedializat cât și la pacientul dializat cronic față de lotul control.

Rezultatele au fost clare în ceea ce privește limfocitele naive CD4+ și CD8+ aceste fiind semnificativ mult scăzute atât în cazul pacienților uremici nedializați cât și în cazul celor dializați cronic.

Cu alte cuvinte în cazul loturilor studiate imunosenescența apare pe măsură ce boala cronică de rinichi progresează și se accentuează odată cu inițierea dializei cronice. În studiul prezent cele mai importante modificări la nivelul distribuției limfocitelor T care arată populații limfocitare îmbătrânite în cazul pacienților uremici sunt declinul limfocitelor T naive și expansiunea celor cu grad înalt de diferențiere sau senescente.

Limfocitele T senescente CD57+ cresc semnificativ doar în cazul limfocitelor T CD4+ atât la pacienții dializați cronic cât și la cei uremici iar în compartimentul CD8+ creșterea este semnificativă doar în cazul pacienților uremici nedializați, procentul pare să se amelioreze în cazul pacienților tratați prin dializă.

Limfocitele T CD4+ PD1+ sunt scăzute procentual la pacienții uremici din cele două loturi rezultând probabil o disfuncție în reglarea activității limfocitelor T în ceea ce privește toleranța imună.

Rezultatele evidențiază creșterea procentuală limfocitelor T CD28-CD27- în ambele grupuri studiate CD4+ și CD8+ care ar putea fi corelată cu patologia dominată de inflamație cronică și ateroscleroză a acestor pacienți, situație care nu se ameliorează adată cu efectuarea dializei cronice.

Analizele de corelație au dat rezultate interesante. Vârsta s-a corelat în cazul grupului control, așa cum era de așteptat, cu procentul de limfocite T CD4+ central memory, naive, CD57+, CD27-CD28- iar în cazul limfocitelor CD8+ cu cele central memory, CD57+, CD27-CD28-, naive. În lotul de pacienți dializați vârsta se corelează doar cu limfocitele CD4+ și CD8+ naive iar în cazul pacienților uremici nedializați vârsta nu s-a corelat cu nimic. Concluzia este că modificările care apar în contextual imunosenescenței la pacienții uremici sunt în mare independente de vârsta acestor pacienți situație care nu se regăsește în cazul lotului control. În schimb în cazul lotului control, pacienților uremici nedializați cât și a celor dializați cronic observăm o corelație între numărul de limfocite central memory cu numărul de limfocite, limfocite T și a limfocitelor TCD4+ și CD8+, concluzia fiind că limfopenia

descrișă în literatură pentru limfocitele central memory este legată de limfopenia pacientului uremic. Pentru scăderea procentului de limfocite T naive în afară de corelația menționată legată de vârstă nu avem alte corelații, pare să apară independent, este posibil ca aceasta să fie legată de mediul uremic și imunosenescentă. Apar de asemenea corelații pozitive așteptate între procentele de limfocite cu grad înalt de diferențiere.

Infecția Covid este dominată de leucopenie, limfopenie și scăderea numărului de limfocite T modificări care se remit ulterior. Procentul de limfocite TEMRA CD4+ crește semnificativ post Covid față de perioada anterioară bolii probabil ca o reacție la infecția virală dar cea mai importantă este creșterea procentului de limfocite T CD8+ TEMRA postCovid sugerând faptul ca această infecție virală agravează imunosenescenta pacienților dializați cronic. Infecția Covid afectează limfocitele CD8+ naive care scad semnificativ procentual în timpul infecției dar această scădere este reversibilă postCovid. Modificările care apar la nivelul limfocitelor T CD57+ sau CD27-CD28- în timpul infecției Covid au fost reversibile după vindecare.

În ceea ce privește limfocitul B acesta este mai puțin afectat, nu există diferențe între loturile studiate.

Analiza subtipurilor limfocitare B a avut rezultate surprizătoare. Procentul de limfocite B naive crește neașteptat în lotul pacienților dializați cronic față de lotul control sau uremic nedializat.

Pacienții uremici nedializați au un procent semnificativ mai mare de limfocite B proinflamatorii CD21^{low}CD38^{low} față de pacienții dializați cronic concluzia fiind ca dializa ca metodă de tratament este eficientă în ceea ce privește acest subtip proinflamator.

De asemenea procentul de limfocite B unswitched crește semnificativ la pacienții uremici față de lotul control și față de pacienții dializați.

Plasmablastii scad semnificativ în lotul pacienților uremici față de cei dializați, după începerea dializei cronice acest procent tinde să fie comparabil cu al lotului control ceea ce ar sugera o disfuncție la nivelul imunității umorale în special la pacientul uremic nedializat.

De asemenea pacienții uremici au semnificativ mai puține limfocite B de tranziție față de lotul control sau dializați, această scădere părănd să se corecteze odată cu începerea dializei.

În concluzie pacientul uremic nedializat prezintă modificări importante de distribuție la nivelul subpopulațiilor limfocitare B cu creșterea procentului de limfocite proinflamatorii, creșterea procentului de limfocite unswitched, scăderea procentului de limfocite de tranziție și a plasmablaștilor dar aceste modificări apărute în cazul limfocitului B au tendința de ameliorare după începerea tratamentului prin hemodializă.

În timpul infecției Covid apare scăderea numărului de limfocite B, procentul limfocitelor B de memorie switched scade semnificativ în timpul infecției, procentul de plasmablaști crește semnificativ în timpul infecției iar această creștere sugerează o activitate imună crescută.

Numărul de monocite este comparabil în cele trei grupuri dar pacienții dializați cronic prezintă un procent semnificativ mai mare de monocite CD300e față de pacienții uremici nedializați, procentul de monocite HLADR+ fiind comparabil în toate cele trei grupuri studiate. CD300e este considerat un receptor de activare imună, capabil să moduleze răspunsul inflamator, activarea lui fiind urmată de eliberarea de citokine proinflamatorii. Activarea CD300e este urmată de activarea monocitelor, crește supraviețuirea acestora, crește producția de citokine proinflamatorii și crește expresia moleculelor de costimulare ceea ce duce în final la activarea limfocitului T.

Dacă analizăm subgrupurile monocitare se observă că procentul de monocite clasice scade la pacienții uremici în ambele grupuri față de control, monocitele nonclasice cresc semnificativ la pacienții dializați și uremici față de control cu o creștere de asemenea semnificativă în grupul de pacienți dializați față de pacienții uremici nedializați, de asemenea procentul de monocite intermediare este crescut în grupurile de pacienți dializați și uremici față de control. Concluzia este că procentul de monocite proinflamatorii crește la pacienții uremici cu menționarea faptului că pacienții dializați cronic au un profil proinflamator mai mare decât cei uremici nedializați. Identificarea subpopulațiilor monocitare, care nu necesită tehnici complicate, ar putea fi folosită pentru identificarea pacienților uremici predispuși la un risc crescut de inflamație cronică și implicit la evenimente cardiovasculare.

Procentul de monocite clasice CD300e+ crește semnificativ la pacientul dializat față de cel uremic și, la fel ca în cazul monocitelor per ansamblu nu există diferențe semnificative între procentele de monocite clasice HLADR+ între grupurile studiate.

Procentul de monocite nonclasice CD300e este semnificativ mai mare pacienții dializați față de uremici dar și în cazul lotului control față de uremici. Aceste valori pot fi interpretate de fapt ca o scădere a procentului de monocite nonclasice CD300e care apare în cazul pacienților uremici nedializați. De asemenea procentele de monocite nonclasice HLADR+ nu variază între loturile studiate.

În cazul monocitelor intermediare nu au existat diferențe semnificative pentru monocitele CD300e sau HLADR+ între cele trei loturi studiate.

În concluzie pacienții uremici nedializați au un procent mic de monocite clasice și nonclasice CD300e dar un procent crescut de monocite ale pacienților aflați în program de hemodializă cronică exprimă mai mult CD300e la nivelul monocitelor în general, al monocitelor nonclasice și clasice în special. Altfel spus, odată cu tratamentul prin dializă cronică monocitele și în special monocitele nonclasice sunt activate imun și crește producția de citokine proinflamatorii.

O altă concluzie a studiului este că modificările apărute la nivelul populațiilor monocitare sunt independente de vârstă în cazul pacienților cu boală cronică de rinichi, posibil sunt legate de modificările induse de uremie sau dializă și sunt una dintre cauzele imunoseneșcenței la acești pacienți.

O observație a modificărilor monocitare în cursul infecției Covid este scăderea semnificativă a procentului de monocite nonclasice în timpul infecției, această scădere fiind raportată în literatură în cazurile severe de boală la pacienți fără boală cronică de rinichi, ceea ce poate explica fragilitatea pacienților dializați cronic în fața acestei maladii cu posibilitatea de a se fi transformat oricând într-o formă letală.

Aceste monocite nonclasice prezintă o expresie crescută semnificativ a expresiei HLADR+ și o tendință la creștere a expresiei CD300e contrar altor studii care raportează ocazional o scădere a expresiei HLADR+ la pacienții cu forme medii de boală fără boală cronică de rinichi stadiul terminal. În concluzie, desi scăzute procentual, prezintă o activare crescută, ambii marker CD300e și HLADR fiind marker de activare monocitară.

În concluzie, dacă analizăm subseturile monocitare în cazul pacienților cu forme medii de infecție Covid și boală cronică de rinichi în stadiul final se observă o distribuție diferită a răspunsului inflamator cu scăderea procentului de monocite nonclasice asemănător formelor severe de boală dar fără agravarea stării pacientului. Procentul de monocite intermediare și expresia HLADR la nivelul monocitelor intermediare au tendința la creștere ca în formele medii de infecție Covid fără boală

cronică de rinichi. Aceste modificări ar putea sugera o activitate antivirală crescută la nivelul monocitelor nonclasice și o activitate proinflamatorie și fagocitară crescută la nivelul monocitelor intermediare în cazul pacienților cu boală cronică de rinichi în stadiul final și forme medii de infecție Covid. Dacă analizăm rezultatele obținute la aproximativ 10 luni după infecția Covid se pare că statusul proinflamator al monocitelor se menține luni după infecție.

La un interval de aproximativ 10 luni de la vindecarea infecției procentul de monocite nonclasice continua să scadă și să își piardă din expresia markerilor de activare datorati infecției Covid.

Ca și în cazul monocitelor nonclasice, procentul de monocite intermediare scade după infecția Covid la valori inferioare celor dinaintea infecției dar capătă o activitate importantă proinflamatorie cu o creștere semnificativă a expresiei HLA-DR față de cea anterioară infecției. Considerăm acesta cel mai important rezultat al studiului asupra monocitelor în cursul infecției Covid la pacienții cu boală cronică de rinichi în stadiul final: cel al persistenței caracterului proinflamator al monocitelor intermediare deoarece acestea sunt implicate în creșterea morbidității și mortalității de cauze cardiovasculare la pacientul dializat cronic. Am putea spune că infecția Covid acționează ca un trigger pentru activarea proinflamatorie a monocitelor intermediare.

Dacă determinăm expresia CD300e și HLA-DR în toată populația monocitară se remarcă creșterea semnificativă a acestora după vindecarea infecției Covid ceea ce ar fi un indicator în plus al activării proinflamatorii a monocitelor secundară infecției Covid. Este ca și cum infecția modifică pe termen lung statusul proinflamator al monocitelor cu toate consecințele care derivă de aici. Interesantă este observația creșterii, la distanță după vindecarea infecției COVID, a expresiei procentuale a monocitelor CD300e+ ($p=0.025$ față de valorile anterioare infecției și $p=0.036$ față de valorile din timpul infecției) și HLADR+ ($p=0.009$ comparativ cu valorile anterioare infecției). Procentul de monocite HLADR+ nu diferă semnificativ în timpul infecției COVID față de valorile postinfecție ($p=0.625$). Aceste rezultate ar indica faptul că după infecția COVID monocitele pacienților hemodializați cronic rămân cu un status proinflamator semnificativ care în mod sigur contribuie suplimentar la evoluția imunosenescenței.

În următorii ani acești pacienți ar trebui monitorizați pentru a vedea dacă acest status proinflamator persistă care sunt consecințele, ce comorbidități apar și în particular evenimentele cardiovasculare.

Contribuția personală a acestei lucrări constă în evidențierea agravării imunosenescentei în special la pacienții dializați cronic independentă de vârsta acestor pacienți (capitolele 6.4 și 8.5). De asemenea studiul efectuat asupra pacienților dializați cronic cu forme medii de infecție Covid a evidențiat accentuarea imunosenescentei și a statusului proinflamator al pacienților dializați cronic la distanță (aproximativ un an) de la vindecare, rezultate care au fost publicate parțial în „Frontiers of Immunology” negăsind, la momentul publicației, alt studiu de acest gen în literatură (capitolele 6.4, 7.4 și 8.5).

Studiile care privesc modificările imune apărute la pacienții uremici sunt extrem de importante deoarece pe baza lor, cunoscând în momentul de față faptul că acești pacienți prezintă o involuție accentuată și ireversibilă a timusului urmată de imunosenescență, s-ar putea găsi metode terapeutice care să oprească sau să facă reversibil acest fenomen de involuție. Cercetările ulterioare trebuie să se axeze pe factorii care ar putea ameliora modificările demonstrate de distribuție apărute la nivelul celulelor sistemului imun, fie că se referă la îmbunătățirea calității dializei și reducerea mediului uremic, la metode generale cum ar fi activitatea fizică sau alimentația până la metode farmacologice iar aici se discută despre tratamente hormonale sau administrări de interleukine (IL-7 sau IL-22).

În același timp, lucrarea deschide o cale de înțelegere mai bună a mecanismelor fiziopatologice ale infecției COVID, orientând spre studiul mecanismelor inflamatorii persistente și asupra rolului monocitelor într-o viziune neexplorată până în acest moment

BIBLIOGRAFIE

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S., Basic Immunology, sixth edition, Elsevier, 2016
2. Dropulic L.K. and Lederman H.M., Overview of Infections in the Immunocompromised Host, Microbiol Spectr. 4(4):10.1128/microbiolspec. DMIH2-0026-2016. 2016 Aug
3. Vaziri N.D., Pahl M. V., Norris K., Effect of Uremia on Structure and Function of Immune System, Journal of renal nutrition, 22(1); 149-156, 2012 Jan;
4. **Bumbea V.I.**, Bumbea H., Vladareanu A.M., Immune dysfunction in patients with end stage kidney disease; Immunosenescence – Review, Rom J Intern Med, PMID 37991332, 2023 Nov 22
5. Rosenberg M., Overview of the management of chronic kidney disease in adults, last updated Nov 2022, UpToDate, www.uptodate.com, accesat iunie 2024
6. Floege J., Johnson R.J., Feehally J., Comprehensive Clinical Nephrology, fourth edition, Elsevier Saunders, 2010
7. Cohen G., Horl W.H., Immune Dysfunction in Uremia-An Update, Toxins (Basel), 4(11); 962-990, 2012 Nov
8. Cohen G., Immune Dysfunction in Uremia 2020, Toxins (Basel), 12(7): 439, 2020, jul
9. Xiang F-f., Zhu J-m., Cao X-s., Shen B., Zou J-z., Liu Z-h., Lymphocyte depletion and subset alteration correlate to renal function in chronic kidney disease patients, Ren. Fail., 38(1):7-14, 2016
10. Jeng Y., Lim P.S., Wu M.Y., Tseng T-Y., Chen, C.H., Chen H.P. and Wu T-K., Proportion of Proinflammatory Monocytes Are Important Predictors of Mortality Risk in Hemodialysed Patients, Mediators Inflamm., PMID: 29200664, PMC5671738, 2017
11. Rogacev K.S., Seiler S., Zawada A M., Reichart B., HerathE., D., Ulrich C., Fliser D., Heine G.H., CD14++CD16+monocytes and

- cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease, *European Heart Journal*, 32(1):84-92, 2011
12. Chiu Y-I, Shu K-H., Yang F-J., Chou T-Y., Chen P-M, Lay F-Y., Pan S-Y., Lin C-J., Litjens N.H.R., Betjes M.G.H., Bermudez S., Kao K-C., Chia J-S., Wang G., Peng Y-S. and Chuang Y-F., A comprehensive characterization of aggravated aging-related changes in T lymphocytes and monocytes in end-stage renal disease: the iESRD study, *Immunology & Aging* DOI:10.1186/s12979-018-0131-x, 2018
 13. Ducloux D., Legendre M., Bamoulid J., Saas P., Courivaud C., Crepin T., End-Stage Renal Disease-Related Accelerated Immune Senescence: Is Rejuvenation of the Immune System a Therapeutic Goal? *Front. Med.*, 3:8:720402, 2021
 14. Betjes M.G., Uremia-Associated Immunological Aging and Severity of COVID-19 Infection, *Front. Med.* doi: 10.3389/fmed.2021.675573, 14 April 2021
 15. Gagliardi I., Patella G., Michael A., Serra R., Provenzano M., and Andreucci M., COVID-19 and the Kidney: From Epidemiology to Clinical Practice, *J. Clin Med*, 9(8):2506, 2020 Aug
 16. Product availability DuraClone IM T cell subsets Tube, 25 tests, RUO REF B53328 Beckman Coulter, 2020
 17. Product availability DuraClone IM B cell subsets Tube , 25 tests, RUO REF B53318 Beckman Coulter, 2020
 18. <https://www.bionand.es/equipment/beckman-coulter-gallios-flow-cytometer> accesat in 24.08.2018
 19. Verma K., Ogonek J., Varanasi P.R., Luther S., Bunting I., Thomay K., Behrens Y.L., Mischak-Weissinger E., Hambach L., Human CD8+CD57—TEMRA cells: TOO young to be called „old”, *PLoS One*, 12(5):e0177405, 2017
 20. Kumar B.V., Connors T. and Farber D.L., Human T cell development, localization, and function throughout life, *Immunity*, 48(2):202-213, 2018, feb

21. Wingender G., Kronenberg M., OMIP-030: Characterization of human T cell subsets via surface markers *Cytometry A*, 87(12):1067-9, 2015
22. Payne K., Li W., Salomon R., Ma C.S., OMIP-063: 28-Color Flow Cytometry Panel for Broad Human Immunophenotyping *Cytometry A*, 97(8):777-781, 2020
23. Park L.M., Lannigan J., Jaimes M.C., OMIP-069: Forty-Color Full Spectrum Flow Cytometry Panel for Deep Immunophenotyping of Major Cell Subsets in Human Peripheral Blood, *Cytometry A*, 97(10):1044-1051, 2020
24. Sampani E, Stangou M., Daikidou D.-M., Nikolaidou V., Asouchidou D., Dimitriadis C., Lioulios G., Xochelli A., Fylaktou A., Papagianni A., Influence of end stage renal disease on CD28 expression and T-cell immunity, *Nephrology*, 26(2): 185-196, 2020
25. Lisowska A., Storoniak H., Debska-Slizien A., T cell subpopulations and cytokine levels in hemodialysis patients, *Human Immunology*, 83(2): 134-143, 2022
26. Kim K.W., Chung B.H., Jeon E.J., Kim B-M., Choi B.S., Park C.W., Kim Y-S, Cho S-G., Cho M-L. and Yang C.W., B cell-associated immune profiles in patients with end-stage renal disease (ESRD), *Exp Mol Med*, 44(8): 465–472, 2012
27. Pahl M.V., Gollapudi S., Sepassi L., Gollapudi P., Elahimehr R., Vaziri N.D., Effect of end-stage renal disease on B-lymphocyte subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression, *Nephrol Dial Transplant.*, 25(1): 205–212, 2010 Jan
28. Ozanska A., Szymczak D., Rybka J., Pattern of human monocyte subpopulation in health and disease, *Scandinavian Journal of Immunology*, 92(1):e12883, 2020
29. Liakopoulos V., Jeron A., Shah A., Bruder D., Mertens P.R. and Gorny X., Hemodialysis-related changes in phenotypical features of monocytes, *Scientific Reports*, 8(1):13964, 2018
30. Gimdt M., Trojanowicz B. and Ulrich C., Monocytes in Uremia, *Toxins (Basel)* 12(5):340, 2020

31. Ramirez R., Carracedo J., Merino A., Soriano S., Ojeda R., Alvarez-Lara M.A., Martin-Malo A., Aljama P., CD14+CD16+ monocytes from chronic kidney disease patients exhibit increased adhesion ability to endothelial cells, *Contrib. Nephrol.*, 171:57-61, 2011
32. Merino A., Alvarez-Lara M.A., Ramirez R., Carracedo J., Martin-Malo A., Aljama P., Losartan prevents the development of the pro-inflammatory monocytes CD14+CD16+ in haemodialysis patients, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 27(7):2907-12, 2012
33. Lee J-W., Cho E., Kim M-G., Jo S-K., Cho W.Y., Kim H.K., Proinflammatory CD14+CD16+ monocytes are associated with vascular stiffness in predialysis patients with chronic kidney disease, *Kidney Research and Clinical Practice*, 32(4):147-52, 2013
34. Naicker S.D., Cormican S., Griffin T.P., Maretto S., Martin W.P., Ferguson J.P., Cotter D., Connaughton E.P., Denny M.C., and Griffin M.D., Chronic Kidney Disease Severity Is Associated With Selective Expansion of a Distinctive Intermediate Monocyte Subpopulation, *Front. Immunol.* 6:9:2845, 2018
35. Coletta S., Salvi V., Della Bella C., Bertocco A., Lonardi S., Trevellin E., Fassan M., D'Elisio M.M., Vermi W., Vettor R., Cagnin S., Sozzani S., Codolo G., de Bernard M., The immune receptor CD300e negatively regulates T cell activation by impairing the STAT1-dependent antigen presentation, *Sci.Rep.* 10(1):16501, 2020
36. Brckalo T., Calzetti F., Perez-Cabezas B., Borrás F.E., Functional analysis of the CD300e receptor in human monocytes and myeloid dendritic cells, *European Journal of Immunology*, 40[3]:722-32, march 2010A. Lekkou, M. Karakantza, A. Mouzaki, E. Kalfarentzos and C.A. Gogos, Cytokine Production and Monocyte HLA-DR Expression as Predictors of Outcome for Patients with Community-Acquired Severe Infections, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11910: 161-167, 2004 Jan
37. Chen S., Guan F., Candotti F., Benlagha K., Olsen N., Camara S., Herrada A.A., James L.K., Lei J., Miller H., Kubo M., Ning Q., Liu C., The role of B cells in COVID-19 infection and vaccination, *Front. Immunol.* 30:13:988536, 2022

38. Roltgen K., Boyd S.D. Antibody and B cell responses to SARS-CoV-2 infection and vaccination, *Cell Host & Microbe*, 29(7):1063-1075, 2021
39. Colkesen F., Kepenek Kurt E., Vatansev H., Korkmaz C., Colkesen F., Yucel F., Yıldız E., Recep Evcen R., Aykan F.S., Kılınç M., Aytekin G., Feyzioğlu B., Doğan M., Arslan Ş., Teke T., Keleş S., Reisli I., Memory B cells and serum immunoglobulins are associated with disease severity and mortality in patients with COVID-19, *Postgrad Med J*, 98(1164):765-771, 2022
40. **Bumbea V.**, Ardelean L., Radulescu L., Damian L., Bumbea H., Dumitru I., Lambert C., Vladareanu A-M., Proinflammatory roles of monocytes in SARS-CoV-2 infection in chronic hemodialysis patients, *Front. Immunol.*, 3:14:1210961, 2023 Aug
41. Gatti A., Radrizzani D., Viganò P., Mazzone A., Brando B., Decrease of Non-Classical and Intermediate Monocyte Subsets in Severe Acute SARS-CoV-2 Infection, *Cytometry A*, 97(9):887-890, 2020
42. Boumaza A., Gay L., Mezouar S., Bestion E., Bailo Diallo A., Michel M., Desnues B., Raoult D., Scola B., Halfon P., Vitte J., Olive D., Mege J-L., Monocytes and Macrophages, Targets of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus: The Clue for Coronavirus Disease 2019 Immunoparalysis, *The Journal of Infectious Diseases*, 224(3):395-406, 2021