Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

DISERTAČNÍ PRÁCE

obor Fyziologie a patofyziologie člověka

Role imunitní odpovědi v patofyziologii infekční meningitidy

MUDr. Ondřej Beran

Praha 2007

Poděkování

Svému školiteli doc. Holubovi bych chtěl poděkovat za odbornou pomoc, důsledné vedení a přátelský přístup v průběhu postgraduálního studia.

Jarmile Hnykové děkuji za technickou spolupráci na vědeckých projektech.

Doc. Lobovské děkuji za odbornou pomoc při postgraduálním studiu na III. klinice infekčních a tropických nemocí 1. LF UK.

Prof. Autran a prof. Lawrencovi děkuji za vedení a odbornou pomoc během svých zahraničních stáží.

Obsah

1. ÚVOD **4**

2. PATOFYZIOLOGIE INFEKČNÍ MENINGITIDY **8**

2.1. HEMATOENCEFALICKÁ BARIÉRA 9
2.2. LOKÁLNÍ A NESPECIFICKÉ IMUNITNÍ REAKCE PŘI INFEKČNÍ MENINGITIDĚ 11
2.3. SPECIFICKÁ IMUNITNÍ REAKCE PŘI INFEKČNÍ MENINGITIDĚ 16
2.4. CYTOKINY A CHEMOKINY PŘI INFEKČNÍ MENINGITIDĚ 17
2.5. VÝZNAM GLUKOKORTIKOIDŮ PŘI INFEKČNÍ MENINGITIDĚ 19

2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE **21**

3. METODY **23**

3.1. PŘIROZENÁ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ U PACIENTŮ S BAKTERIÁLNÍ MENINGITIDOU 23
3.2. EXPERIMENTÁLNÍ STUDIE IMUNOSTIMULAČNÍHO POTENCIÁLU KMENŮ *NEISSERIA MENINGITIDIS* ZÍSKANÝCH OD PACIENTŮ S INVAZIVNÍM MENINGOKOKOVÝM ONEMOCNĚNÍM ... 24
3.3. ADAPTIVNÍ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ U PACIENTŮ S BAKTERIÁLNÍ MENINGITIDOU 25
3.4. ADAPTIVNÍ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ U PACIENTŮ S ASEPTICKOU MENINGITIDOU 25

4. VÝSLEDKY **28**

4.1. PŘIROZENÁ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ U PACIENTŮ S BAKTERIÁLNÍ MENINGITIDOU 28
4.2. EXPERIMENTÁLNÍ STUDIE IMUNOSTIMULAČNÍHO POTENCIÁLU KMENŮ *NEISSERIA MENINGITIDIS* ZÍSKANÝCH OD PACIENTŮ S INVAZIVNÍM MENINGOKOKOVÝM ONEMOCNĚNÍM ... 34
4.3. ADAPTIVNÍ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ U PACIENTŮ S BAKTERIÁLNÍ MENINGITIDOU 35
4.4. ADAPTIVNÍ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ U PACIENTŮ S ASEPTICKOU MENINGITIDOU 36

5. DISKUZE **42**

SOUHRN **47**

SUMMARY **49**

SEZNAM ZKRATEK **51**

LITERATURA **53**

PŘÍLOHY **57**

PŘÍLOHA 1. PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK *ČESKÁ A SLOVENSKÁ NEUROLOGIE A NEUROCHIRURGIE* 57
PŘÍLOHA 2. PŮVODNÍ ČLÁNEK *CRITICAL CARE* 58
PŘÍLOHA 3. PŮVODNÍ ČLÁNEK *PRAGUE MEDICAL REPORT* 59
PŘÍLOHA 4. PŮVODNÍ ČLÁNEK *FOLIA MICROBIOLOGICA* 60
PŘÍLOHA 5. PŮVODNÍ ČLÁNEK *CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION* 61
PŘÍLOHA 6. PŮVODNÍ ČLÁNEK *ACTA NEUROLOGICA SCANDINAVICA* 62
PŘÍLOHA 7. PŮVODNÍ ČLÁNEK *ACTA VIROLOGICA* 63
PŘÍLOHA 8. PŮVODNÍ ČLÁNEK *SCANDINAVIAN JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES* 64
PŘÍLOHA 9. PŮVODNÍ ČLÁNEK *ACTA VIROLOGICA* 65
PŘÍLOHA 10. SEZNAM PUBLIKACÍ, ABSTRAKT A PŘEDNÁŠEK. 66

1. Úvod

Infekce centrálního nervového systému (CNS) jsou význačné svou velkou diverzitou. Mohou mít formu akutní či chronickou, klinický průběh od lehkého až po velmi těžký s nepříznivou prognózou a liší se rovněž incidencí od častých po relativně vzácná onemocnění. Navzdory pokrokům v diagnostice a léčbě infekcí CNS zůstává řada z nich závažným zdravotnickým problémem.

Infekční meningitida (IM) je zánětlivé postižení vnějších obalů mozkových, mening, způsobené celou řadou infekčních agens a charakteristické přítomností zvýšeného počtu leukocytů v mozkomíšním moku (MM). V etiologii IM se uplatňují převážně viry a bakterie, vzácněji rovněž paraziti a mykotické organismy. Meningitický syndrom může být rovněž vyvolán neinfekčními příčinami (systémové choroby, tumory, léky atd.). V případě prolomení ochranných bariér CNS infekčním agens dochází k rozvoji zánětlivé reakce, kdy charakter vyvolávajícího mikroorganismu určuje její povahu: v případě většiny bakteriálních agens vzniká hnisavý zánět a bakteriální (purulentní) meningitida (BM), zatímco viry a některé bakterie (např. spirochety, mykoplasmata, *Mycobacterium tuberculosis*) indukují zánět aseptický, aseptickou meningitidu (AM).

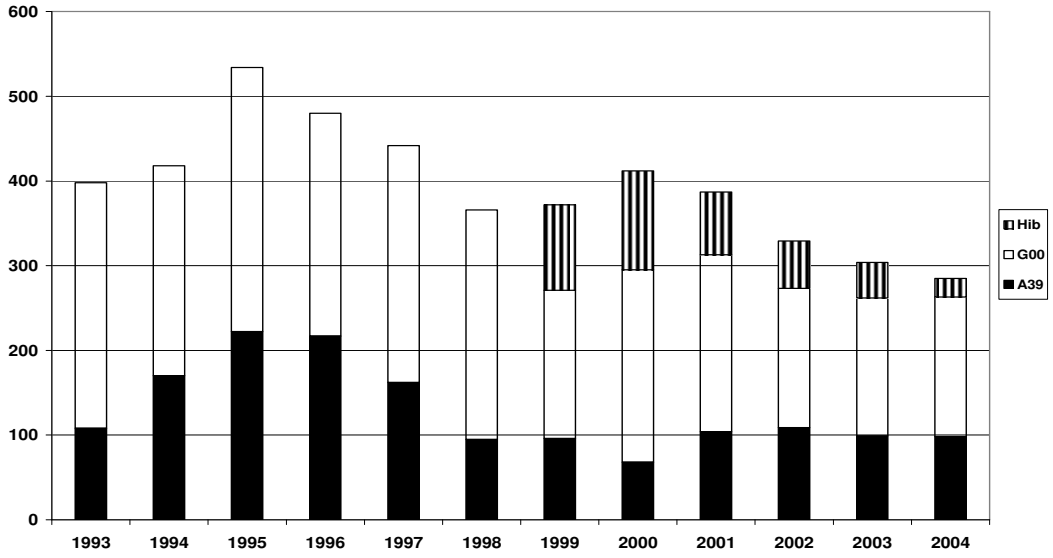
U většiny pacientů s IM bakteriální i virové etiologie je v popředí klinického obrazu vysoká horečka a příznaky nitrolební hypertenze: bolest hlavy, kvantitativní i kvalitativní porucha vědomí, fotofobie, zvracení a silně vyjádřené meningeální příznaky. Tyto symptomy se obvykle rozvíjejí během několika dní, ale při rychle progredujícím průběhu může být tato doba kratší. Klinický obraz IM významně ovlivňuje několik faktorů; věk pacienta, vyvolávající infekční agens, přítomnost imunodeficience popřípadě dalších onemocnění. Protože je často obtížné klinicky odlišit meningitidu bakteriální a virové etiologie, hraje v diagnostice těchto infekčních zánětů CNS důležitou roli laboratorní vyšetření MM. Likvorový nález leukocytární pleocytózy s převahou neutrofilů

je spolu se zvýšenou koncentrací proteinu a sníženou hladinou glukózy charakteristickým nálezem při BM, nicméně ne ve všech případech je rozlišení BM a AM spolehlivé[1]. Pro zlepšení etiologické diagnostiky se proto používají ještě další parametry analyzované v krvi (např. C-reaktivní protein [CRP], prokalcitonin), nebo v MM (např. laktát, cytokiny). Přesto je i nadále patrná potřeba dalšího citlivého a snadno proveditelného testu, který by spolehlivě identifikoval všechny pacienty s BM v časné fázi onemocnění[2-5].

BM patří celosvětově mezi deset nejčastěji smrtících infekčních onemocnění[6]. Incidence BM v České republice se v posledním desetiletí pohybuje na přibližně stejné úrovni představující 2-3 případy na 100 000 obyvatel ročně[7]. Smrtnost onemocnění je vysoká a dosahuje 25 % u dospělých a 5-10 % u dětí[8,9]. Onemocnění má rovněž řadu dlouhodobých následků, které postihují až 30-50 % přeživších pacientů[10]. Značným problémem, jehož význam v posledních letech narůstá i u nás, je rozvoj rezistence původců BM na používaná antibiotika. V některých zemích EU rezistence nejčastějších původců BM na základní antibiotika dosahuje až 70 %[11]. Za posledních 15 let se v ČR výskyt BM nijak dramaticky nemění, podobně jako ve vyspělém světě i u nás patří mezi nejčastěji diagnostikovaná agens způsobující BM *Streptococcus pneumoniae* a *Neisseria meningitidis* (obr. 1). Rovněž je patrný postupný pokles incidence invazivních hemofilových onemocnění (včetně BM) po zavedení celoplošné vakcinace u dětí v r. 2001[7].

Incidence AM je v České republice významně vyšší než v případě BM, nicméně její průběh je nejčastěji mírný, i bez léčby dochází většinou k úzdravě. Přesto mají tyto infekce CNS velký zdravotnický význam vzhledem k jejich potenciálně fatálním následkům a dlouhodobým neurologickým i psychiatrickým komplikacím.

Obr. 1. Výskyt bakteriálních meningitid v ČR v letech 1993-2004[7]



A 39 - invazivní meningokokové infekce, Hib - invazivní onemocnění způsobené Haemophilus influenzae, G 00 - ostatní bakteriální meningititidy včetně pneumokokových.

Nejčastějším prokazovaným etiologickým agens vyvolávajícím AM je u nás virus klíšťové meningoencefalitidy (KM). Za rok 2006 bylo hlášeno 1027 případů onemocnění vyvolaných virem klíšťové meningoencefalitidy[12]. K dalším častým agens patří *Borrelia burgdorferi* vyvolávající ročně desítky onemocnění, ostatní prokazovaná agens (např. herpetické viry, leptospiry, *M. tuberculosis*) jsou již vzácnější. U více než poloviny pacientů s aseptickým zánětem CNS se nepodaří vyvolávající agens prokázat. V těchto případech se dá předpokládat, že jejich významná část je způsobena enteroviry. Jejich vyšetření se v ČR rutinně neprovádí, nicméně například v USA jsou enteroviry zodpovědné za většinu případů AM[13].

Infekční záněty CNS zůstávají onemocněními s vysokou morbiditou a mortalitou. Z tohoto důvodu je nutné zdokonalit současné diagnostické a terapeutické postupy či případně zavést nové metody diagnostiky a léčby. Tento vývoj je podmíněn dokonalejším poznáním patofyziologických mechanizmů, které provázejí tyto závažné infekce. Cílem

této disertační práce bylo proto objasnit úlohu některých důležitých aspektů přirozené i adaptivní imunity při IM. Výzkum byl prováděn pomocí několika klinických i experimentálních studií.

2. Patofyziologie infekční meningitidy

Úroveň znalostí patogeneze a patofyziologie IM se během posledních několika desetiletí významně zvýšila. Lépe jsou známy například mechanizmy, jakými patogeny kolonizují hostitele a pronikají do subarachnoideálního prostoru (SAP). Rovněž byla objevena řada nových faktorů virulence, které hrají roli v prolomení obranných mechanizmů hostitele a zvyšují mikrobiální schopnost invaze do organismu.

IM vzniká po přímém průniku etiologického agens do CNS, kde lze agens často izolovat z likvoru nebo z mozkové tkáně. V případě virů bylo historicky za hlavní cestu infekce do CNS pokládáno šíření podél periferních nervů, nicméně dnes se předpokládá, že neuronální přenos se uplatňuje výjimečně, např. u viru vztekliny a Herpes simplex virus (HSV). Virová agens (včetně většiny enterovirů a arbovirů) pronikají do CNS hematogenně a šíření zpravidla předchází jejich replikace v místě vstupu do organismu a primární virémie. Bakteriální infekce CNS vzniká většinou sekundárně při kontinuálním šíření či hematogenním rozsevu. Primární ložiska jsou nejčastěji lokalizovaná v ORL oblasti (mastoiditida, otitida), ale zdrojem BM může být rovněž bakteriální pneumonie, infekční endokarditida, infekce GIT (vyvolané zejména *Escherichia coli*), urosepse atd. Za určitých okolností se BM rozvíjí po kraniotraumatu či operacích v dané oblasti jako následek porušení externí ochranné bariéry CNS (dura mater, lebka). Konkrétní průběh dané infekce nicméně zaléží nejen na etiologickém agens, ale rovněž na řadě hostitelských faktorů[1,14]. Důležité je dostatečné pomnožení viru nebo bakterie, což je nezbytné pro překonání bariér při vstupu do CNS a dostatečný kontakt s vnímavými cílovými buňkami. Přesná patofyziologie přestupu infekčních agens z krve do CNS není známa, nicméně se předpokládá, že virus i bakterie mohou infikovat endoteliální buňky a proniknout porušeným endotelem[15]. Dalším mechanizmem může být transport

přes hematoencefalickou bariéru (HEB) uvnitř migrujících leukocytů[16]. V CNS pak může zůstat infekce lokalizovaná na meningách, nebo se dále rozšíří do mozkového parenchymu. Přítomnost patogenu vyvolá v CNS bezprostřední lokální imunitní odpověď, která má řadu zvláštností ve srovnání s imunitní reakcí jinde v organismu. Významnou roli zde hraje především mikroglie a rezidentní makrofágy (MΦ). Později dochází k migraci dalších imunitních buněk z krve přes HEB a intratekálně pak probíhá specifická a nespecifická imunitní reakce[14,15].

2.1. Hematoencefalická bariéra

V patogenezi infekčních zánětů CNS hraje klíčovou roli anatomické uspořádání tohoto kompartmentu. Mozek a mícha jsou obaleny třemi meningami, které tvoří vnější dura mater, arachnoidea a pia mater. Subarachnoideální prostor mezi arachnoideou a pia mater je vyplněn MM, který je vytvářen zejména choriodeálním plexem mozkových komor. Na produkci MM se podílí jak pasivní filtrace, tak aktivní transport. Reabsorpce MM probíhá přes arachnoideální klky, které umožňují jeho jednocestný odtok skrz dura mater do venózních splavů. V důsledku infekčních procesů v CNS dochází ke kvalitativním i kvantitativním změnám MM, které poskytují nejen důležité klinické informace týkající se charakteru zánětu a případně i jeho specifické etiologie, ale i údaje umožňující studovat patofyziologii daného onemocnění. Za normálních okolností jsou mozek a MM chráněny bariérovým systémem, jehož nejdůležitější součástí je HEB a bariéra hematolikvorová, u níž funguje jako hlavní rozhraní mezi krví a likvorem plexus choroideus. Obě bariéry nejenom že strukturně a funkčně chrání mozek od mikrobů a toxinů cirkulujících v krvi, ale udržují uvnitř CNS i jedinečné vnitřní prostředí. HEB je tvořena endoteliálními buňkami vystýlajícími nejmenší mozkové cévy (brain microvascular endothelial cells - BMEC), které jsou funkčně odlišné od buněk endotelu

jinde v organismu[15]. BMEC se vyznačují sníženou možností využívat mechanizmus pinocytózy, a naopak jsou vybaveny speciálními transportními mechanizmy. Dále jsou mezi BMEC charakteristická těsná spojení, tzv. tight junctions. Toto vše výrazně omezuje transport iontů, bílkovin a dalších vysokomolekulárních látek, buněk i infekčních agens do CNS. Prostupnost HEB je navíc ještě regulována astrocyty, které produkují faktory ovlivňující zejména vlastnosti a organizaci tight junctions[17].

Obě bariéry rovněž zajišťují, že jsou mozek a mícha chráněny proti řadě imunitních reakcí, které se uplatňují v obraně hostitele proti infekci na jiných místech organismu. Dříve byl dokonce mozek nazýván jako tzv. imunologicky privilegovaný orgán, dnes se spíše používá termínu imunologicky specifický[18]. U zdravého jedince jsou T a B lymfocyty přítomny v MM ve velmi malých počtech (do 5 buněk/µl) a vzácně v mozkovém parenchymu. Rovněž koncentrace imunoglobulinů a komplementových faktorů jsou v MM velmi nízké a opsonizační kapacita MM je mnohem nižší než v případě séra, a to i v průběhu IM. Infekce CNS tak probíhají ve tkáni, kde jsou velmi omezené možnosti k zabránění jejich šíření. Během posledních několika desítek let bylo dokumentováno, že bariéry izolující mozek, míchu a MM od krevního řečiště nejsou statické, ale naopak vysoce dynamické systémy schopné regulace transportu i produkce různých substancí včetně cytokinů.

Po překonání HEB může virus či bakterie pokračovat v průniku do CNS, který je usnadněn nepřítomností řady obranných mechanizmů. Publikované klinické a experimentální studie prokázaly, že při BM jsou závažné důsledky způsobeny především sekundárními komplikacemi, mezi něž patří zvláště edém mozku, zvýšený intrakraniální tlak, cévní ischémie, hydrocefalus atd. Současná představa o mechanizmech rozvoje BM je schematicky uvedena na obr. 2. K poškození CNS během purulentního zánětu dochází na podkladě toxických účinků řady cytokinů, chemokinů, proteolytických enzymů,

oxidantů a dalších metabolitů, které jsou v průběhu BM produkovány ve vysokých koncentracích buňkami imunitního, nervového nebo cévního systému[19]. Při studiu těchto mechanizmů jsou velmi důležité poznatky získané na zvířecích modelech i v *in vitro* studiích s populacemi buněk, jenž hrají důležitou roli v rozvoji BM. Při hodnocení závěrů takových studií je samozřejmě vždy nutné kriticky posoudit možnost jejich aplikace na situaci *in vivo* v lidském organismu. Například pokud se u zvířecích studií injikují bakterie přímo do likvoru, je zde zcela vyloučen ochranný efekt HEB.

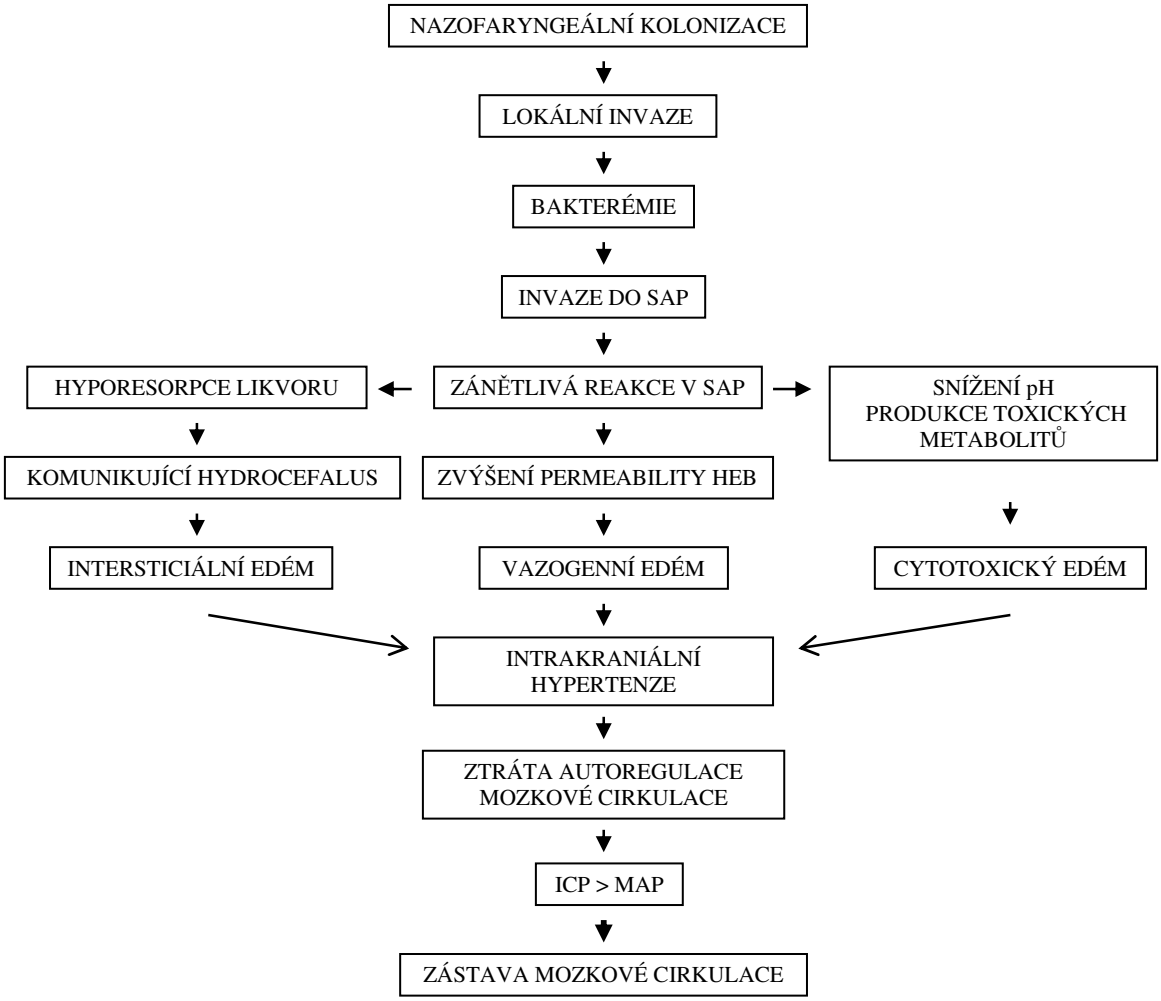
Při AM je celková zánětlivá reakce na průnik virovového či bakteriálního patogenu méně intenzivní, nicméně i zde může dojít ke vzniku mozkového edému a zvýšení intrakraniálního tlaku. V takovém případě může dojít k poruchám vědomí, bolestem hlavy, zvracení, křečím a parézám hlavových nervů. Pokud infekce napadá neurony, dochází k jejich lýze a může dojít k demyelinizaci bílé hmoty nebo ke spongioformní degeneraci. Imunitní odpověď je pouze výjimečně nedostatečná a onemocnění mají většinou dobrou klinickou prognózu.

2.2. Lokální a nespecifické imunitní reakce při infekční meningitidě

V lokální obraně CNS jsou velmi významné buňky gliové (mikroglie, astrocyty a oligodendrocyty) a ependymové (buňky chorioidálního plexu a leptomening), které mají četné specializované imunitní funkce. V časné fázi IM se mezi prvními aktivují rovněž tzv. rezidentní MΦ, které spolu s mikroglií zajišťují v klidovém stavu imunitní surveillance v CNS. Mikroglie tvořící 10-20 % celkové populace glie je funkčně příbuzná buňkám monocytární řady, se kterými zřejmě sdílí stejný původ, ačkoli některé studie naznačují i její možné odvození od neuroektodermu[20,21]. Buňky mikroglie jsou při styku s antigenem schopny jej zpracovat a prezentovat, nicméně například ve srovnání s perivaskulárními MΦ vykazují podstatně menší aktivitu. Mikroglie je také schopna produkce a sekrece

interleukinu (IL)-1, IL-6 a tumory-nekrotizujícího faktroru (TNF)-α. Během IM se významně zvyšuje počet meningeálních MΦ na leptomeningách a perivaskulárních MΦ, které tvoří druhou největší populaci v CNS odvozenou z monocytárních prekurzorů.

Obr. 2. Přehled předpokládaných patofyziologických mechanizmů u bakteriální meningitidy



SAP, subarachnoideální prostor; ICP, intrakraniální tlak; MAP, střední arteriální tlak.

Je pravděpodobné, že perivaskulární MΦ lokalizované mezi cévním endotelem a mozkovým parenchymem (obr. 3) jsou stejně jako mikroglie schopny zachytit proteinové

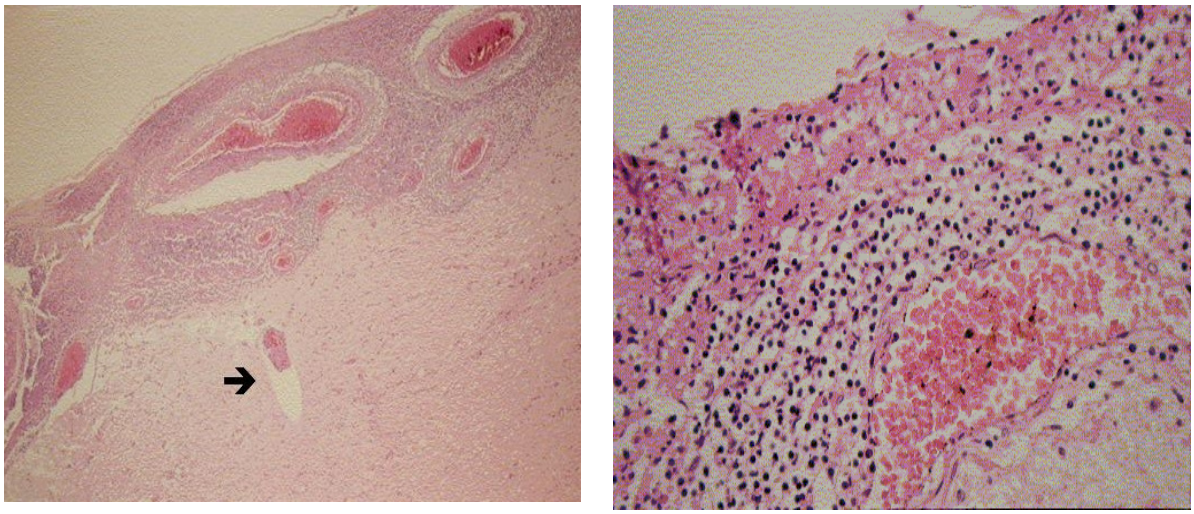
antigeny v mozkomíšním moku, zpracovat je a prezentovat na svém povrchu procházejícím T lymfocytům. Perivaskulární MΦ tedy mohou prezentovat imunitním buňkám antigeny přítomné jak v krvi, tak i v CNS[22]. Aktivace těchto buněk je doprovázena změnou anatomických a funkčních vlastností – zvyšuje se povrchová exprese antigenů MHC (major histocompatibility complex) II. třídy, adhezních molekul a tvorba inducibilní syntázy oxidu dusnatého (iNOS), což je dále zvýrazněno působením prozánětlivých cytokinů – hlavní roli zde hrají zejména TNF-α, IL-1β a IL-6[1]. Pokud lokální obrana infekční proces nezvládne, dochází k migraci leukocytů do CNS. Tato migrace je směrovaná, neboť k průniku leukocytů dochází v důsledku intracerebrálních antigenních podnětů. Působením cytokinů, chemokinů (IL-8, macrophage inflammatory protein [MIP]-1 a 2) a dalších mediátorů tzv. 2. řádu (např. NO, prostaglandiny ad.) dochází k porušení HEB a následnému masivnímu průniku leukocytů, čímž vzniká pro IM charakteristická intratekální pleocytóza, která je v akutní fázi tvořena zejména MΦ a neutrofily (hlavně při BM)[14]. Později, v souvislosti s rozvojem adaptivní imunitní odpovědi, migrují do CNS rovněž lymfocyty.

Krevní monocyty, stejně jako z nich odvozené rezidentní MΦ, rozeznávají pomocí Toll-like receptorů a receptoru CD14 řadu bakteriálních a virových komponent a mají rovněž funkci antigen-prezentujících buněk (APC), které po fagocytóze a degradaci patogenu exprimují lymfocytům jeho mikrobiální fragmenty ve vazbě na antigeny MHC II. třídy[23]. Předpokládá se, že u pacientů s IM je vyšší exprese antigenů MHC II. třídy a dalších aktivačních molekul na MΦ asociována s výraznější produkcí zánětlivých mediátorů. MΦ jsou také významným producentem cytokinů, chemokinů, reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a NO. Ačkoliv jsou v likvoru poměrně často nacházeny MΦ i při virových meningitidách, jejich úloha není zcela jasná (prezentace virového antigenu pomocí MHC II. třídy je dosti raritní). V současné době se předpokládá, že jejich role,

podobně jako v případě dendritických buněk, je spíše imunoregulační a souvisí s produkcí protizánětlivých cytokinů (IL-10)[24].

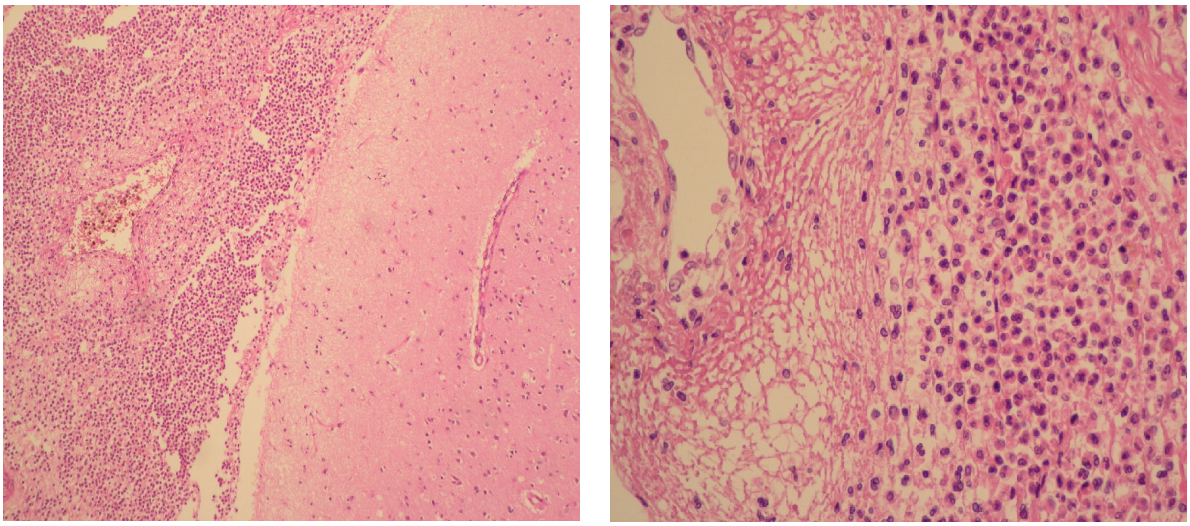
Obr. 3. Meningeální infiltrace perivaskulárními makrofágy u pacienta s tuberkulózní meningitidou (Orthovy buňky) s průnikem do Virchow-Robinova prostoru (A, označen šipkou) s detailem (B). HE, zvětšení 100x (A), 200x (B).

A **B**



Obr.4. Meningeální infiltrát s vaskulitidou u pacienta s pneumokokovou meningitidou. HE, zvětšení 100x (A), 200x (B).

A **B**



Dalšími výkonnými fagocytárními buňkami jsou neutrofily, které při IM migrují do CNS, kde se za normálních okolností vůbec nenacházejí. Chemotaxe neutrofilů do CNS je řízena zvláště chemokiny MIP-2 a IL-8, které jsou produkovány rezidentními MΦ. Aktivované neutrofily produkují ROS a některé proteolytické enzymy, např. matrixové metaloproteinázy, které degradací kolagenu, fibronektinu, lamininu a dalších součástí extracelulární matrix přispívají k poškození mozkové tkáně i HEB[25]. Jejich role v imunitních reakcích u serózních zánětů není zcela jasná, neboť jde o buňky s významnou fagocytární aktivitou, která se uplatňuje u celé řady infekcí vyvolaných extracelulárními bakteriemi. U enterovirových meningitid bylo v této souvislosti upozorněno na zvýšené hladiny IL-6, IL-8 a G-CSF v likvoru, které jsou zřejmě zodpovědné za migraci neutrofilů přes HEB[26]. Dá se předpokládat, že v počátku serózního zánětu dojde především k aktivaci nespecifické imunitní reakce, což se může projevit právě přítomností neutrofilů. Nicméně neutrofily jsou rychle nahrazeny především antigen-specifickými T lymfocyty.

NK buňky jsou pravděpodobně schopné relativně rychlého nahromadění v CNS, nicméně u AM bylo poukázáno na jejich nižší koncentraci v likvoru ve srovnání s periferní krví[27]. NK buňky jsou nezanedbatelnými producenty INF-γ, který potencuje schopnost buněk mikroglie prezentovat antigen T lymfocytům a současně urychluje apoptózu těchto lymfocytů po zhojení zánětu[22]. NK buňky se zúčastňují nespecifických obranných pochodů - cizí antigeny rozpoznávají podle lektinových struktur. Jsou schopny rozpoznat a zlikvidovat i volný antigen (virus), který není prezentován pomocí MHC. U serózních zánětů CNS se předpokládá, že NK buňky jsou vzhledem k jejich nižší intracerebrální kumulaci v CNS nahrazovány antigen-specifickými lymfocyty. Je však také možné, že dochází k jejich přestupu do místa zánětu, tj. mozkového parenchymu, což se právě může projevit jejich nižším zastoupením v likvoru[27,28].

2.3. Specifická imunitní reakce při infekční meningitidě

V souvislosti s rozvojem adaptivní imunitní odpovědi migrují později do CNS při IM rovněž lymfocyty. V případě rychle probíhající BM se tato specifická imunitní odpověď rozvíjí až za několik dnů po začátku infekce. Při stimulaci adaptivní imunity hrají roli APC přítomné v CNS (především rezidentní MΦ a buňky glie). Existuje rovněž hypotéza, že mikrobiální antigeny při IM jsou v CNS pouze zachyceny a poté transportovány do lymfatických uzlin[29]. Pro tento mechanizmus může svědčit průkaz dendritických buněk v likvoru u pacientů s BM. Dendritické buňky jsou nejpotentnější APC, které se intenzivně pohybují mezi tkáněmi a lymfatickými uzlinami, kde prezentují zachycené cizorodé antigeny. T lymfocyty představují hlavní lymfocytární subpopulaci, která je zodpovědná za lymfocytární pleocytózu u AM[30]. Mechanizmus přestupu T lymfocytů přes HEB je velmi důležitý, neboť na rozdíl od MΦ a granulocytů jde o buňky, které reagují na konkrétní specifický antigen. Pro přechod T lymfocytů přes HEB je důležitá jejich aktivace antigenem, o čemž svědčí zvýšená koncentrace CD4/CD45RO T lymfocytů (paměťové CD4 T lymfocyty) a lymfocytů exprimujících znak CD29 v likvoru u KM. Naivní buňky, které se dosud do kontaktu s antigenem nedostaly, do CNS zřejmě vůbec neproniknou. Aktivované T lymfocyty produkují cytokiny INF-γ a TNF-α. Jejich metabolismus je ovlivněn produkcí IL-2, což je nezbytný růstový faktor T lymfocytů. Při jeho poklesu je narušena proliferace T lymfocytů a ty podléhají apoptóze[22]. Toto je asi nesmírně důležitý regulační mechanizmus, který chrání buňky CNS před destruktivním procesem způsobeným aktivovanými T lymfocyty.

Na specifické mechanizmy uplatňující se při AM upozorňují změny lymfocytárních subpopulací, které byly popsány u různých meningitid vyvolaných viry a spirochetami. Při srovnání různých lymfocytárních subpopulací dochází v likvoru převážně k nahromadění CD4 T lymfocytů, CD8 T lymfocyty se naopak koncentrují méně[31]. CD4 T lymfocyty jsou pravděpodobně nezbytné pro kontrolu spirochetových infekcí

(experimentální CD4 lymfopenie vedla k progresi borreliózy u myší)[32]. CD4 T lymfocyty se mohou podle situace změnit na jeden ze dvou možných fenotypů a následně převažující imunitní odpověď je pak označena jako Th1 nebo Th2. Při převaze Th1 odpovědi dochází k vystupňované produkci INF-γ, který má výrazné protivirové působení. U serózních zánětů CNS (například u enterovirové meningitidy, KM, Japonské B encefalitidy a dalších) bylo poukázáno na zvýšené hladiny INF- γ v CNS, což by právě mohlo souviset s převahou Th1 odpovědi. Experimentálně bylo prokázáno, že Th1 imunitní odpověď je protektivní u některých virových infekcí, ale v případě jiné etiologie může být škodlivá[33]. Th2 odpověď, která se dá například charakterizovat podle zvýšené sekrece IL-4, IL-5 a IL-10, slouží k aktivaci specifické protilátkové odpovědi, která je například důležitá pro likvidaci spirochet v CNS[34].

B lymfocyty jsou při neuroinfekcích subpopulací intratekálně poměrně málo zastoupenou a jejich přítomnost v likvoru byla popsána zejména při neuroborrelióze a dalších neuroinfekcích vyvolaných spirochetami[31,34]. Málo známý je způsob jejich migrace přes HEB. V experimentálním modelu na zvířeti byla migrace aktivovaných B lymfocytů pozorována až s určitou latencí po aplikaci antigenu do CNS. Tato latence je pravděpodobně nezbytná pro přechod antigenu z CNS do periferie a následnou aktivaci naivních B lymfocytů[14]. Zatím není jednoznačně vyřešeno, zda se B lymfocyty akumulují v CNS, anebo po antigenní stimulaci díky převaze Th2 odpovědi při spirochetové infekci nedochází k jejich vystupňované proliferaci až za HEB.

2.4. Cytokiny a chemokiny při infekční meningitidě

Cytokiny a chemokiny hrají důležitou úlohu při regulaci imunitních mechanizmů v CNS. Jak již bylo uvedeno, imunitní odpověď v CNS při IM je iniciována rezidentními MΦ bezprostředně po průniku patogenu přes HEB. Jejím základem je produkce

chemokinů, např. MIP-1 a MIP-2, které atrahují další výkonné imunitní buňky, což jsou v případě MIP-1 převážně monocyty a lymfocyty, u MIP-2 hlavně granulocyty. Zánětlivá reakce se poté dále zvýrazňuje a zároveň dochází k aktivaci buněk glie v mozkovém parenchymu. Pro iniciální stádium BM jsou charakteristické vysoké hladiny zejména TNF-α, IL-1β a IL-6, které jsou produkovány několika typy buněk včetně BMEC, astrocytů a mikroglie. Prozánětlivé mediátory IL-1β, IL-6, IL-8 a G-CSF byly opakovaně prokázány i u AM ve zvýšených koncentracích v likvoru především na počátku onemocnění[35]. U pacientů s AM byla popsána asociace zvýšené koncentrace IL-6 v MM a vyšší produkce antivirových protilátek, přičemž koncentrace TNF-α zvýšena nebyla. V případě IL-1β byla prokázána korelace jeho vysoké koncentrace v MM s prognózou BM[36]. Další akumulace a aktivace leukocytů nadále zvyšuje produkci TNF-α, jehož vysoké koncentrace přítomné v CNS při BM mohou být škodlivé. TNF-α působí toxicky přímo (indukcí buněčné apoptózy) nebo způsobuje tkáňové poškození nepřímým mechanizmem, který pravděpodobně spočívá v indukci zvýšené syntézy NO[37]. NO je zejména při BM produkován ve vysokých koncentracích za účasti inducibilní NO syntházy, která je v CNS přítomna v MΦ, astrocytech a buňkách mikroglie i endotelu. Takto zvýšený NO reaguje s ROS, které se uvolňují z aktivovaných MΦ a neutrofilů, a vznikají agresivní peroxynitráty[38]. Tyto produkty se podílí na porušení HEB a rovněž poškozují neurony oxidací membránových lipidů a aktivací apoptózy uvolněním cytochromu c z mitochondrií[7]. TNF-α hraje spolu s cytokiny IL-1β a IL-6 roli též při spuštění zánětlivé kaskády s uvolněním faktoru aktivujícího destičky a IFN-γ, což může vést k trombotizaci malých cév s následnou ischémií. Všechny tyto procesy jsou v důsledku příčinou vazogenního a cytotoxického edému mozku[39]. INF-γ je zřejmě nejdůležitějším cytokinem v obraně CNS proti virovým a některým bakteriálním agens. *In vitro* byl prokázán jeho ochranný efekt pro neurony před viry varicella-zoster (VZV) a HSV. Na produkci INF-γ a

její souvislost s perzistencí virových agens v CNS bylo poukázáno rovněž u Japonské encefalitidy B, St. Louiské encefalitidy a KM[40]. V dalším průběhu infekčního zánětu dochází k poklesu prozánětlivých cytokinů a začíná se zřejmě uplatňovat protizánětlivý účinek IL-10, jehož zvýšené hladiny byly popsány u dětí s AM[24].

2.5. Význam glukokortikoidů při infekční meningitidě

Protizánětlivé homeostatické mechanizmy ovlivňují přirozenou a adaptivní imunitní odpověď likvidující infekční agens při IM. Hypotalamo-hypofýzo-adrenální (HHA) osa hraje centrální roli v regulaci přes glukokortikoidový receptor. Neuronální, endokrinní a cytokinové podněty modulují na úrovni periventrikulárního jádra hypothalamu sekreci kortikotropin-uvolňujícího hormonu, který následně stimuluje uvolnění kortikotropinu z hypofýzy a syntézu kortizolu v kůře nadledvin. Účinek kortizolu je převážně imunomodulační a interakce mezi nervovým systémem, HHA osou a imunitním systémem jsou klíčové v regulaci zánětu a imunitní odpovědi[41,42].

Při zánětlivé imunitní odpovědi u neuroinfekcí se pravděpodobně rovněž uplatňuje imunomodulační role kortizolu, nicméně jeho intratekální hladiny nebyly u IM dosud studovány. Zvýšené koncentrace kortizolu v likvoru byly dosud dokumentovány u několika jiných onemocnění CNS, např. roztroušené sklerózy, Alzheimerovy nemoci, deprese a posttraumatické stresové poruchy[43-45]. Nízká hladina kortizolu v likvoru je za normálních okolností udržována zejména aktivním efluxem tohoto hormonu z CNS[46]. Narušení tohoto mechanizmu při zánětu v souvislosti s poškozením HEB může vést k dlouhodobě zvýšené koncentraci intratekálního kortizolu. Kromě imunomodulačního působení v akutní i pozdější fázi IM by se zvýšený kortizol mohl podílet na imunopatogenezi dlouhodobých neurogických následků IM.

V adjuvantní terapii IM jsou glukokortikoidy nejdéle klinicky využívanými imunomodulans. V experimentech na zvířatech bylo prokázáno, že dexamethazon potlačuje nadměrnou imunitní odpověď zprostředkovanou prozánětlivými mediátory a matrixovými metaloproteinázami, což se spolu s jeho efektem na stabilizaci endotelu podílí na obnově funkce HEB[47]. Glukokortikoidy rovněž snižují produkci TNF-α, IL-1β a IL-6[48,49]. V důsledku snížení edému mozku a intrakraniálního tlaku vykázal dexamethazon nižší riziko poškození CNS při BM[50]. V minulosti byla provedena řada klinických studií u nemocných s BM i AM, které podávaly o efektu dexamethazonu v těchto indikacích často rozporuplné výsledky. Naopak byl prokázán pozitivní efekt dexamethazonu u dětí s hemofilovou meningitidou, kde byl zjištěn jeho ochranný účinek před poškozením sluchu[51]. V případě pneumokokové BM u dětí nebyl tento efekt s jistotou prokázán. Nedávno publikované prospektivní, randomizované studie u dospělých pacientů s BM pneumokokové a tuberkulózní etiologie prokázaly příznivý vliv dexamethazonu na průběh a prognózu onemocnění[52,53]. Na jejich základě byla vypracována současná doporučení pro adjuvantní terapii dexamethazonem při BM. Naopak jedním z možných argumentů proti podávání dexamethazonu u meningitid je jeho stabilizační účinek na HEB, přičemž právě porušená HEB je podmínkou průniku hydrofilních antibiotik (betalaktamy a vankomycin) do SAP[1]. Výsledky studie metabolizmu kortizolu v průběhu IM předvedené v této disertační práci by mohly přispět do diskuze o významu léčebného podávání exogenních glukokortikoidů.

Přehled současných znalostí mechanizmů patofyziologie IM i možností léčby tohoto onemocnění jsme publikovali v časopise *Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie* v r. 2005 (příloha 1)[54].

2. Hypotézy a cíle práce

Ve 4 klinických studiích u pacientů s IM jsme studovali mechanizmy přirozené a adaptivní imunity. Tyto klinické studie byly rovněž doplněny experimentální *in vitro* studií.

Předpokládali jsme, že v průběhu IM dochází k výraznému nahromadění aktivovaných leukocytů v SAP asociovanému se zvýšenými hladinami prozánětlivých cytokinů a chemokinů v likvoru, což může být příčinou zánětlivého poranění mozku a těžšího průběhu onemocnění. Naše hypotéza byla, že dominující prozánětlivá reakce bude do určité míry kontrolována působením protizánětlivých mediátorů a aktivací endogenní endokrinní odpovědi. Rovněž jsme se domnívali, že bude existovat značný rozdíl mezi charakterem a intenzitou imunitní reakce v mozku a systémové imunitní odpovědi. K našim předpokladům patřilo i to, že během akutní BM i AM bude docházet ke změnám v adaptivní imunitní odpovědi v závislosti na jejich etiologii. Další hypotézou bylo, že zvýšené hladiny zánětlivých cytokinů v SAP budou asociovány s nahromaděním intratekálního kortizolu a jeho koncentrace budou rovněž záviset na vyvolavateli IM.

V *in vitro* modelu na dárcovské krvi stimulované klinickými izoláty *N. meningitidis* jsme studovali, zda je intenzita hostitelské imunitní reakce ovlivněna rozdíly v imunostimulačním potenciálu mezi různými bakteriálními kmeny.

Z těchto hypotéz vyplynuly následující cíle:

Cíl 1. Provést fenotypizaci Mϕ stanovením povrchové exprese HLA-DR, stanovit koncentrace zánětlivých cytokinů, chemokinů a kortizolu v séru a likvoru během akutní IM, analyzovat závislost hladin kortizolu na koncentraci zánětlivých a protizánětlivých cytokinů v séru i likvoru a zhodnotit vztah vyšetřovaných mediátorů ke klinickému průběhu BM. V *in vitro* modelu vyšetřit význam

mikrobiálních a hostitelských faktorů v patogenezi BM pomocí vyšetření imunostimulační schopnosti 3 různých kmenů *N. meningitidis* izolovaných od pacientů s meningokokovou meningitidou.

Cíl 2. Posoudit možnost využití stanovení kortizolu v diferenciální diagnostice BM a AM.

Cíl 3. Posoudit alterace adaptivní imunity při IM, stanovit charakter intratekální imunitní odpovědi při IM na základě stanovení počtů lymfocytárních subpopulací v likvoru a analýzy Th1/Th2 cytokinů a zjistit vztah těchto parametrů k etiologii a klinickému průběhu IM.

3. Metody

3.1. Přirozená imunitní odpověď u pacientů s bakteriální meningitidou

Do prospektivní studie bylo v letech 2002-2006 zařazeno 56 pacientů přijatých na Infekční kliniku FN Na Bulovce s podezřením na diagnózu BM. Kritéria pro zařazení pacientů do studie byla věk > 15 let, trvání symptomů (horečka, bolest hlavy, meningeální syndrom) < 72 hodin a provedená diagnostická lumbální punkce (LP) s charakteristickým nálezem v MM prokazujícím BM: leukocytární pleocytózou s predominancí neutrofilů, zvýšenou proteinorhachií (≥ 0,6 g/l) a koncentrací laktátu (≥ 3 mmol/l) a rovněž sníženou glykorhachií (≤ 2,2 mmol/l) a/nebo sníženým poměrem glykorhachie/glykémie (≤ 45 %). Z hodnocení bylo vyřazeno 9 pacientů pro jejich předchozí léčbu antibiotiky a kortikosteroidy.

Etiologická diagnóza byla provedena na základě pozitivního kultivačního nálezu v MM a/nebo krvi nebo pomocí PCR (polymerase chain reaction). V séru a MM byly dále kromě běžných laboratorních vyšetření stanoveny koncentrace zánětlivých cytokinů IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 a TNF-α pomocí cytometrické metody CBA (BD™ Cytometric Bead Array + Human Inflammatory Cytokine kit™) na průtokovém cytometru FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Kortizol byl stanoven radioimunometrickou technikou (RIA) s využitím kitu DSL-2000 (DSL, Webster, TX, USA). Detekční limit byl 20 pg/ml pro všechny cytokiny a 5 nmol/l pro kortizol. V MM byla vyšetřena povrchová exprese HLA-DR na MΦ pomocí průtokové cytometrie a monoklonálních protilátek anti-CD14 a anti-HLA-DR.

Tíže průběhu BM byla stanovena na základě skórovacích systémů APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation), SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) a GCS (Glasgow Coma Scale).

3.2. Experimentální studie imunostimulačního potenciálu kmenů *Neisseria meningitidis* získaných od pacientů s invazivním meningokokovým onemocněním

Kmeny *N. meningitidis* izolované od pacientů s různým klinickým průběhem invazivní menigokokového onemocnění (IMO) byly kryoprezervovány v tekutém dusíku na Státním zdravotním ústavu v Národní referenční laboratoři pro meningokokové infekce. Charakteristiky kmenů *N. meningitidis* a klinické parametry příslušných pacientů jsou shrnuty v tab. 1. U všech izolátů byla zjištěna séroskupina a sérosubtyp. Sekvenční typy byly identifikovány pomocí multilokusového sekvenčního typování.

Před experimenty byly bakterie usmrceny teplem při 70 °C po dobu 40 minut a připravena suspenze v médiu RPMI 1640 v koncentraci 10^6 CFU (colony-forming units)/ml. V experimentech byla použita periferní krev 4 zdravých dárců s negativními anti-meningokokovými protilátkami anti-B a anti-C. U každého dárce byly provedeny minimálně 2 nezávislé experimenty. Všechny experimenty byly provedeny za pyrogen-prostých podmínek (podle certifikátů výrobců jednotlivých reagencií a pomůcek).

Vzorky plné krve aktivované usmrcenými kmeny *N. meningitidis* byly inkubovány 6 hodin při 37 °C za stálého horizontálního míchání s pravidelným otáčením zkumavek o 360° (v intervalech 15 min) a poté centrifugovány při 3000 g po dobu 30 minut. Supernatanty byly alikvótovány a ihned uloženy při -80 °C před stanovením cytokinů a lipooligosacharidu (LOS).

V séru a MM byly dále kromě běžných laboratorních vyšetření stanoveny koncentrace zánětlivých cytokinů IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 a TNF-α pomocí CBA.

Tab. 1. Demografické a klinické údaje pacientů s invazivním meningokokovým onemocněním a charakteristiky příslušných izolátů *Neisseria meningitidis*

Izolované kmeny NM	Demografické a klinické parametry pacientů s IMO								Sérum		Mozkomíšní mok		
	Věk roky	Sex	APACHE	SOFA body	GCS body	nástup	Klinická diagnóza	Výsledek	CRP mg/l	Leuko buňky/mm3	Leuko buňky/mm3	Protein g/l	Glukóza mmol/l
137/05 séroskupina C (C:NT:P1.2,5; ST-11, ET-37 HC) VR1: 5, VR2: 2, VR3: 36-2	22	Ž	14	3	8	8(9)	meningitida + sepse	příznivý	271	20700	7253	2,68	1,86
285/05 séroskupina B (B:1:NST; ST-41/44/Lineage 3 complex) VR1: 7.II, VR2: 14, VR3: 35	19	M	10	4	11	8	meningitida + sepse	příznivý	165	16700	3840	2,8	1,6
113/04 séroskupina B (B:22:P1.14; ST-18 HC) VR1: 22, VR2: 14, VR3: 36	14	Ž	25	12	14	9(10)	fulminantní meningokoková sepse	úmrtí	102	2700	5	0,23	3,1

NM, Neisseria meningitidis; HC, hypervirulentní komplex; IMO, invazívní meningokokové onemocnění; Ž, žena; M, muž; APACHE, Acute Physiologic Health Evaluation; SOFA, Sepsis Organ Failure Assessement; Leu, leukocyty; GCS, Glasgow Coma Scale score

3.3. Adaptivní imunitní odpověď u pacientů s bakteriální meningitidou

Do klinické studie bylo zařazeno 23 pacientů s potvrzenou diagnózou BM. U pacientů jsme sledovali kinetiku lymfocytárních subpopulací v periferní krvi. Imunologická vyšetření byla prováděna v průběhu prvních 14 dnů hospitalizace. U sledovaných parametrů jsme posuzovali jejich vztah ke klinické tíži onemocnění a rovněž k jeho bakteriální etiologii.

3.4. Adaptivní imunitní odpověď u pacientů s aseptickou meningitidou

Imunopatofyziologie AM byla studována ve 2 klinických studiích. Do první prospektivní studie bylo zařazeno 51 pacientů přijatých na Infekční kliniku FN Na Bulovce. Na základě provedené diagnostické LP byla prokázána lymfocytární pleocytóza v MM a následnými sérologickými vyšetřeními potvrzena diagnóza KM nebo neuroborreliózy. Důvody pro LP byly meningeální syndrom a/nebo paréza lícního nervu. Klinická data byla získána retrospektivně z lékařské dokumentace. Do skupiny pacientů s KM bylo zařazeno 42 pacientů (14 žen, 28 mužů) s průměrným věkem 38,2 let

(v rozmezí 13-66 let). Skupina pacientů s lymeskou borreliózou zahrnovala 9 pacientů (7 žen, 2 muži) s průměrným věkem 26,1 let (v rozmezí 9-73 let).

Imunofenotypizace lymfocytárních subpopulací. Čerstvý likvor s více jak 15 leukocyty/µl byl vyšetřen ihned po provedení LP. Po centrifugaci a resuspendaci byly buňky obarveny monoklonálními protilátkami pro stanovení procentuálního zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací: anti-CD45, anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD16+56 (vše Becton-Dickinson, Heidelberg, Německo). Rovněž byla vyšetřena úroveň aktivace T lymfocytů měřením exprese HLA-DR. Analýza byla provedena dvoubarevnou průtokovou cytometrií na cytometru FACSTrek™ (BD, San Jose, USA). Absolutní počty lymfocytárních subpopulací byly stanoveny na základě jejich procenta a celkového počtu lymfocytů získaného rutinním cytologickým vyšetřením.

Do druhé prospektivní studie bylo zařazeno 37 pacientů (15 žen a 22 mužů, průměrný věk byl 37,5 ± 3,0 let) přijatých na Infekční kliniku FN Na Bulovce od října 2002 do prosince 2003. Na základě provedené diagnostické LP byla prokázána lymfocytární pleocytóza v MM a následnými sérologickými a/nebo molekulárně-biologickými vyšetřeními potvrzena diagnóza AM. Do kontrolní skupiny bylo zařazeno 13 osob (8 žen a 5 mužů, průměrný věk 36,7 ± 4,9 let) s diagnózou bolesti hlavy a vertebrogenního algického syndromu, u kterých byla laboratorními vyšetřeními neuroinfekce vyloučena.

KM byla diagnostikována serologicky pomocí průkazu IgM protilátek proti viru KM metodou ELISA (Test Line, Brno, Česká republika). Diagnóza borreliózy byla ověřena metodami ELISA a Western blot detekcí specifických IgM a IgG protilátek proti *B. burgdorferi* v likvoru[55]. Enterovirová neuroinfekce byla prokazována detekcí IgM protilátek v séru pomocí ELISA (Virotech, Russelsheim, Německo). Kromě těchto

základních metod bylo využito metod semi-nested PCR a kvantitativní PCR v reálném čase k průkazu RNA enterovirů, viru KM a herpetických virů [56].

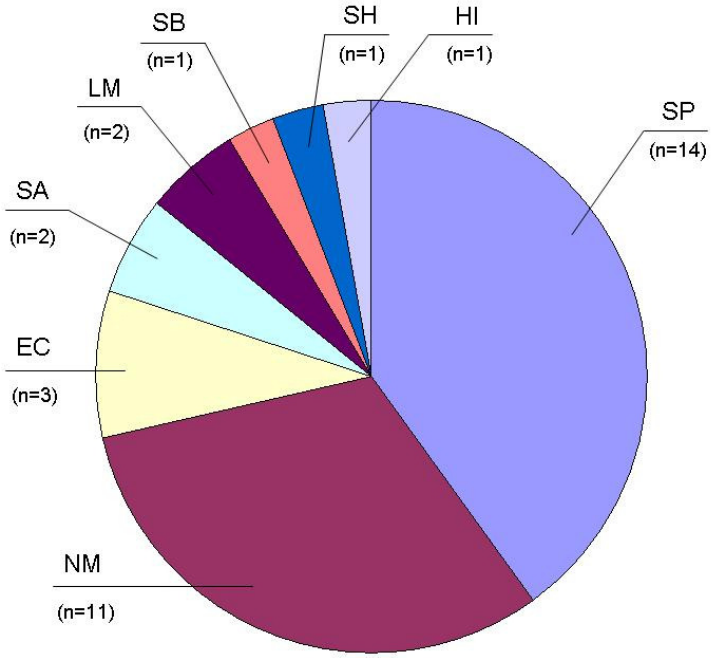
Koncentrace cytokinů IL-2, IL- 4, IL-5, IL-10, IFN-γ a TNF-α byly měřeny v MM pomocí průtokové cytometrie a metody CBA s využitím kitu Th1/Th2 kitu™ (BD, Heidelberg, Německo). Koncentrace kortizolu v MM byly opět stanoveny pomocí RIA.

4. Výsledky

4.1. Přirozená imunitní odpověď u pacientů s bakteriální meningitidou

V této studii byla vyhodnocena data získaná od 47 pacientů s BM. Průměrný věk této skupiny byl 42 let (věkové rozmezí 16 až 76 let), 29 pacientů byli muži, žen bylo 18 (tab. 2). Průměrné GCS při přijetí bylo 12, APACHE II 13 a SOFA skóre 4. Celkem 36 nemocných (77 %) přežilo BM bez následků, u 4 nemocných (8 %) BM zanechala trvalé následky a 7 pacientů (15 %) BM podlehlo. Celkem 40 pacientů (85 %) bylo hospitalizováno na jednotce intenzivní péče (JIP), průměrná délka hospitalizace na JIP byla 9 dní. Etiologie BM byla objasněna u 45 (85 %) pacientů a je uvedena na obr. 5.

Obr. 5. Etiologická agens prokázaná u pacientů s bakteriální meningitidou (n=35)



SP, *Streptococcus pneumoniae*; NM, *Neisseria meningitidis*; EC, *Escherichia coli*; SA, *Staphylococcus aureus*; LM, *Listeria monocytogenes*, SB, *Streptococcus bovis*; SH, *Streptococcus haemolyticus*; HI, *Haemophilus influenzae*.

Tab. 2. Demografická, klinická a laboratorní data pacientů s bakteriální meningitidou.

Pacient č.	Věk (roky)	APACHE II (body)	SOFA (body)	Leukocyty* (bb/mm^3)	Protein* (g/l)	Glukóza* (mmol/l)	Laktát* (mmol/l)	Etiologie	Výsledek
1	16	3	0	8704	2,73	2,5	N.u.	N.meningitidis B	Dobrý
2	17	8	4	5120	0,42	2,5	N.u.	N.meningitidis B	Dobrý
3	22	14	3	7253	2,68	1,86	9,7	N.meningitidis C	Dobrý
4	25	21	4	20677	16,4	0	N.u.	N.meningitidis C	Dobrý
5	25	3	2	2269	2,1	1,5	8,2	N.u.	Úmrtí
6	32	7	2	393	2,33	3	7,9	S.pneumoniae	Dobrý
7	40	11	1	3109	8,12	0,5	N.u.	S.pneumoniae	Dobrý
8	42	0	0	2837	2,62	2,9	N.u.	N.u.	Dobrý
9	52	11	3	3413	2,63	3,3	4,3	N.meningitidis B	Dobrý
10	55	25	7	17067	6,35	0,5	12	N.u.	Úmrtí
11	61	23	4	258	4,44	0,5	N.u.	S.pneumoniae	Úmrtí
12	63	14	4	2005	4,64	0,5	14,8	S.pneumoniae	Enc.
13	67	20	11	558	0,86	2,4	3,5	S.aureus	Úmrtí
14	68	12	3	857	2,35	3,7	5,6	L.monocyt.	Dobrý
15	69	34	10	195242	33,6	<0,5	5,6	S.pneumoniae	Úmrtí
16	72	23	7	7873	7,66	1,1	13,6	N.u.	Enc.
17	73	31	13	3179	6	4,3	N.u.	E.coli	Dobrý
18	75	28	10	632	6,9	7,7	N.u.	E.coli	Enc.
19	76	32	19	119	2,7	1,1	9,4	E.coli	Úmrtí
20	15	8	1	1585	5,71	3,5	8,7	N.meningitidis C	Dobrý
21	17	3	0	13313	6,29	0,1	N.u.	N.meningitidis C	Dobrý
22	18	11	4	230	2,37	2	7,5	N.meningitidis B	Dobrý
23	18	8	2	624	1,77	4,3	2,9	N.u.	Dobrý
24	18	6	3	5153	3,35	3,4	5,7	N.meningitidis B	Dobrý
25	19	10	4	3840	2,8	1,6	7,4	N.meningitidis B	Dobrý
26	21	17	6	11666	7,73	<0,50	17,2	N.meningitidis B	Dobrý
27	22	19	7	11093	18	0,6	N.u.	S.pneumoniae	Enc.
28	23	3	0	712	1,31	3,9	N.u.	N.u.	Dobrý
29	29	1	0	516	2,69	3,1	4,8	N.u.	Dobrý
30	29	4	1	5120	1,51	0,6	N.u.	S.pneumoniae	Dobrý
31	30	9	2	688	4,68	1,3	N.u.	N.meningitidis B	Dobrý
32	31	3	1	7632	2,96	<0,5	N.u.	S.pneumoniae	Dobrý
33	32	3	0	2048	0,69	2,7	3,2	N.u.	Dobrý
34	36	3	2	1458	1,92	3,6	N.u.	N.u.	dobrý
35	36	10	7	6597	8,06	0	N.u.	S.pneumoniae	Úmrtí
36	37	0	0	1707	2,57	1,5	4,2	N.u.	Dobrý
37	42	N.u.	N.u.	370	1,84	1,9	N.u.	L.monocyt.	Dobrý
38	45	13	3	1851	3,94	<0,5	13	S.pneumoniae	Dobrý
39	46	9	0	8000	6,2	0,6	10,7	S.bovis	Dobrý
40	49	3	0	275	2,69	2,4	6,2	N.u.	Dobrý
41	51	10	5	12995	5,37	1,4	N.u.	N.meningitidis C	Dobrý
42	54	14	5	13333	7,53	0,5	N.u.	N.meningitidis C	Dobrý
43	55	17	11	267	3,6	<0,5	13,3	S.aureus	Dobrý
44	59	15	7	3342	15,06	0,5	N.u.	H.influenzae	Dobrý
45	59	15	3	2581	2,9	2,7	N.u.	N.u.	Dobrý
46	62	7	0	269	1,96	2	3,5	N.u.	Dobrý
47	67	22	5	3337	5,9	4,1	N.u.	S.pneumoniae	Dobrý

* v likvoru; bb, buňky; N.u., nebylo určeno, Enc., encefalopatie, L. monocyt., L. monocytogenes

Výsledky rutinního cytologického a biochemického vyšetření v séru a likvoru u pacientů s BM jsou uvedeny v tab.3.

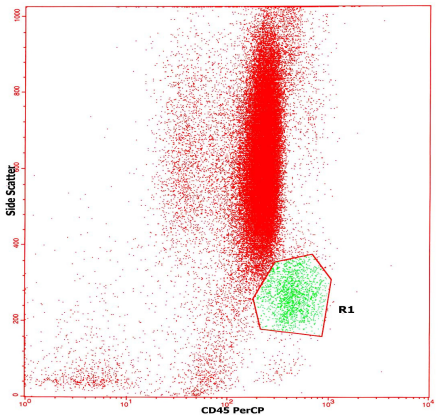
Tab. 3. Základní laboratorní parametry v séru a likvoru u pacientů s bakteriální meningitidou

Parametr	
Krev	
Počet leukocytů (buňky/mm^3)	15 800 (11 825 - 20 525)
CRP (mg/l)	226 (101 - 308)
Mozkomíšní mok	
Počet leukocytů (buňky/mm^3)	3 072 (700 - 7 443)
Počet neutrofilů (buňky/mm^3)	3 030 (654 - 7 443)
Protein (g/l)	3,0 (2,3 - 6,3)
Glukóza (mmol/l)	1,4 (0,5 - 2,98)
Glykorhachie/glykémie	0,23 (0,06 - 0,38)
Laktát (mmol/l)	8,1 (5,6 - 12,1)

Data jsou prezentována jako median (dolní kvartil - horní kvartil)

V rámci studie bylo zjištěno, že v likvoru pacientů s BM jsou významně přítomny Mϕ, které byly definovány jako CD45+ buňky s charakteristickou granularitou (Side Scatter). Na obr. 4 jsou patrny jako body v gate R1. Populace, která je označena červeně, představuje granulocyty (granulocyty jsou CD45+ a současně mají vysokou granularitu). Na histogramu je rovněž patrné, že v likvoru v akutním stádiu BM téměř nejsou přítomny lymfocyty (nacházely by se pod R1).

Obr. 4. Histogram z vyšetření likvoru od pacienta s bakteriální meningitidou

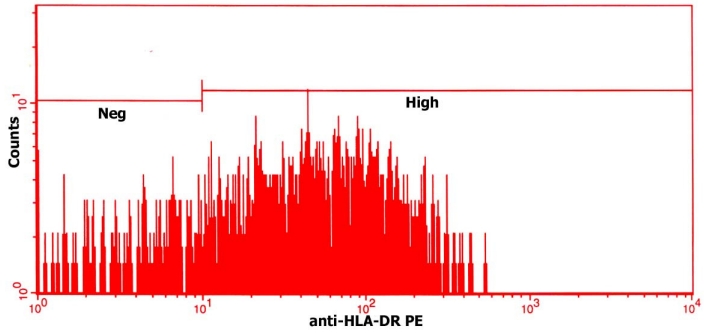


Side Scatter, parametr odrážející granularitu buněk

CD45, společný leukocytární antigen

Dalším zjištěním bylo, že Mϕ v likvoru ve zvýšené míře exprimují na svém povrchu molekuly HLA-DR (obr. 5). Tato exprese negativně korelovala s tíží průběhu BM vyjádřené skórem SOFA (r= -0,928, $P < 0{,}02$).

Obr. 5. Histogram zobrazující expresi HLA II. třídy (HLA-DR) na makrofázích v likvoru u pacienta s bakteriální meningitidou



Srovnání koncentrací kortizolu a cytokinů v likvoru u pacientů s AM a BM je uvedeno v tab. 4.

Tab. 4. Koncentrace kortizolu a zánětlivých cytokinů v likvoru u pacientů s bakteriální meningitidou a aseptickou meningitidou

Parametr	BM (n = 47)	AM (n = 37)	Kontroly (n = 13)	*P**
TNF-α (pg/ml)	245 (20 - 4978)	< 20	< 20	0.001
IL-1β (pg/ml)	254 (20 - 1239)	n.a.	< 20	n.a.
IL-6 (pg/ml)	187245 (75275 - 312289)	157 (38 - 410)	< 20	0.001
IL-8 (pg/ml)	16830 (4776 - 133236)	130 (54 - 321)	< 20	0.001
IL-10 (pg/ml)	260 (20 - 1153)	71 (61 - 116)	< 20	0.001
Kortizol (nmol/l)	133 (59 - 278)	17 (13 - 28)	10 (8 - 12)	0.001

Data jsou prezentována jako median (dolní kvartil - horní kvartil)
*Bakteriální meningitida (BM) vs. aseptická meningitida (AM), Mann-Whitney *U* test
n.a., nebylo analyzováno

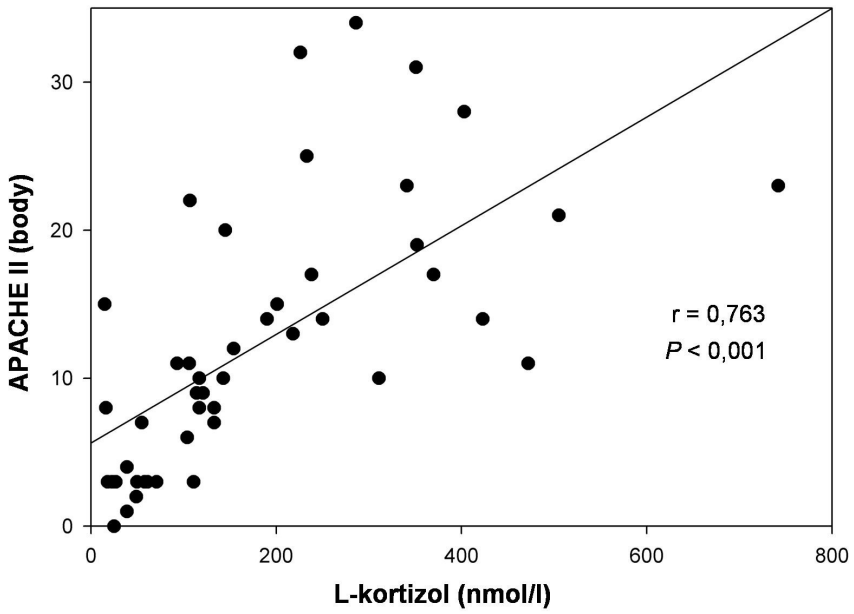
Při BM byly sérové hladiny kortizolu významně zvýšeny oproti jeho koncentracím v MM a navzájem spolu pozitivně korelovaly (r = 0,587, p < 0,001). Naopak cytokiny IL-1β, IL-6, IL-10 a TNF-α vykázaly významně vyšší koncentrace v MM oproti sérovým

hodnotám. V případě IL-8 a IL-12 byla akumulace v MM rovněž naznačena, ale rozdíly u nich nenabyly statistické významnosti.

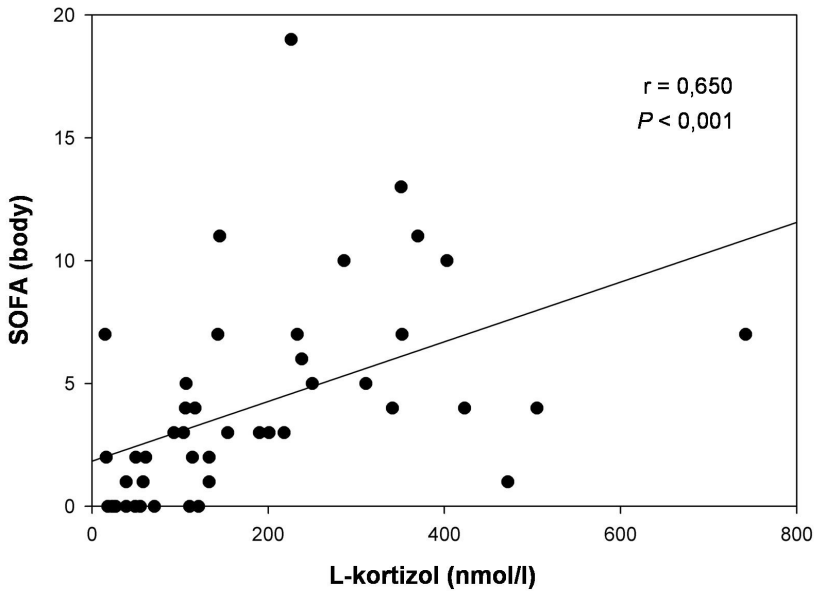
Z prokázaných korelací je zajímavý vztah kortizolu v MM ke skóre APACHE II ($r = 0,763$, $p < 0,001$; obr. 6), SOFA ($r = 0,65$, $p < 0,001$; obr.7) a GCS ($r = -0,547$, $p = 0,001$). Intratekální kortizol byl dále asociován s proteinorhachií ($r = 0,534$, $p < 0,001$) a koncentrací laktátu v MM ($r = 0,734$, $p < 0,001$). Oproti MM nebyla poměrně překvapivě nalezena žádná korelace sérového kortizolu s tíží průběhu BM. Naopak sérová koncentrace kortizolu pozitivně korelovala se sérovými hladinami IL-6 ($r = 0,696$, $p = 0,001$), IL-10 ($r = 0,501$, $p = 0,001$) a IL-8 ($r = 0,62$; $p = 0,001$).

V případě koncentrací cytokinů v séru a MM nebyla prokázána korelace s tíží průběhu. Intratekální IL-6 koreloval s koncentrací laktátu ($r = 0,668$, $p < 0,001$), proteinu ($r = 0,701$, $p < 0,001$), IL-8 ($r = 0,451$, $p < 0,001$) a počtem leukocytů v MM ($r = 0,475$, $p < 0,001$). IL-8 v MM dále rovněž koreloval s TNF-α ($r = 0,739$, $p < 0,001$).

Obr. 6. Vztah koncentrace kortizolu v likvoru (L) a tíže průběhu bakteriální meningitidy vyjádřené skórem APACHE II

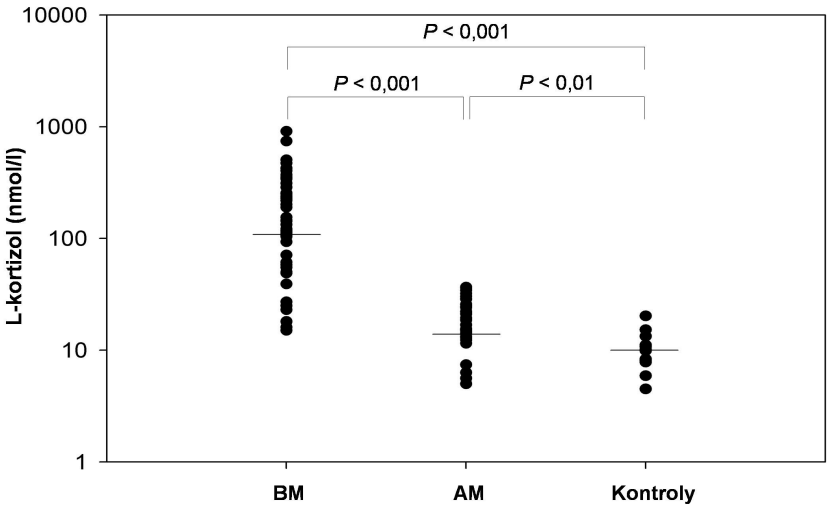


Obr. 7. Vztah koncentrace kortizolu v likvoru (L) a tíže průběhu bakteriální meningitidy vyjádřené skórem SOFA



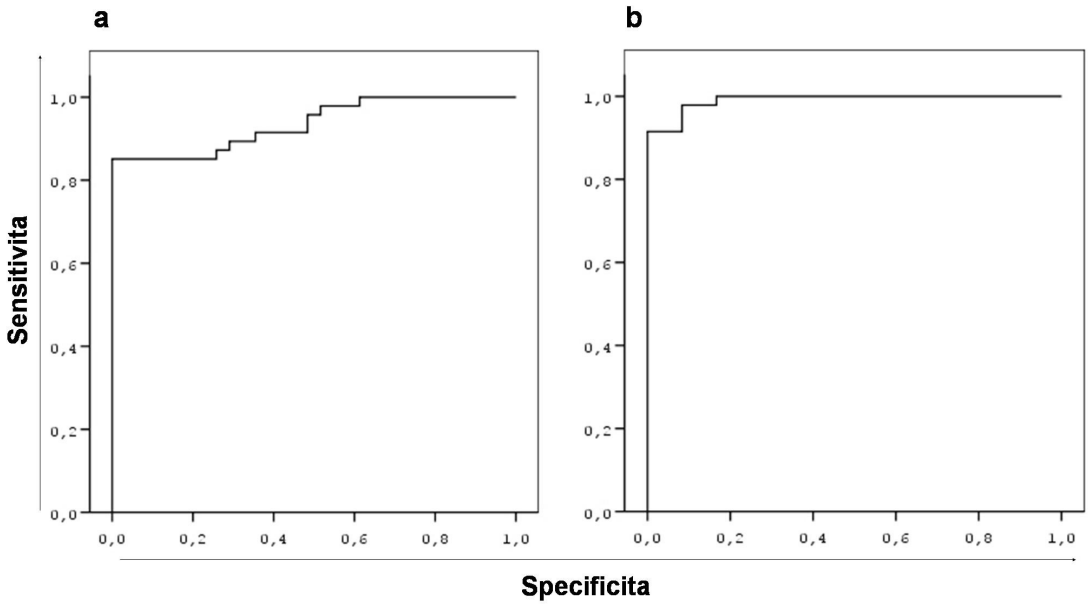
Zajímavým zjištěním byl nález odlišné koncentrace kortizolu v likvoru v závislosti na etiologii meningitidy: koncentrace kortizolu byla nejvyšší u BM ve srovnání s AM i se zdravými kontrolami (obr. 8).

Obr. 8. Rozdíly v hladině kortizolu v likvoru mezi bakteriální meningitidou, aseptickou meningitidou a kontrolní skupinou



Toto zjištění bylo posouzeno z hlediska využití kortizolu v diferenciální diagnostice BM a určení hladiny kortizolu v likvoru bylo posouzeno z hlediska senzitivity a specificity pro diagnózu BM. Senzitivita pro hraniční hodnotu koncentrace 46,1 nmol/l byla určena jako 82 % a specificita jako 100 %. Tato data jsou uvedena na obr. 9.

Obr. 9. Senzitivita a specificita koncentrace kortizolu v likvoru pro diagnostiku bakteriální meningitidy



Uvedené výsledky byly zpracovány jako rukopis, který je v současné době v recenzním řízení v časopise *Critical Care* (příloha 2). Dále byly prezentovány na tuzemských i zahraničních konferencích (příloha 10). Data skupiny pacientů s AM byla publikována v časopise *Prague Medical Report* (příloha 3)[56].

4.2. Experimentální studie imunostimulačního potenciálu kmenů *Neisseria meningitidis* získaných od pacientů s invazivním meningokokovým onemocněním

Výsledky produkce cytokinů a hladiny LOS po stimulaci různými kmeny *N. meningitidis* jsou zobrazeny v tab. 5. Mezi testovanými kmeny byly signifikantní rozdíly v indukci IL-1β, IL-6, IL-10 a TNF-α.

Tab. 5. Srovnání *in vitro* stimulované produkce cytokinů pomocí *Neisseria meningitidis* a cytokinových koncentrací v séru od pacientů s invazivním meningokokovým onemocněním vyvolaným stejným bakteriálním kmenem

Kmen NM	IL-1β (pg/ml)		IL-6 (pg/ml)		IL-8 (pg/ml)		IL-10 (pg/ml)		TNF-α (pg/ml)		Endotoxin (EU/ml)	
	IMO	*in vitro*	IMO	*in vitro*	IMO	*in vitro*	IMO	*in vitro*	IMO	*in vitro*	IMO	*in vitro*
285/05	0	8638 ± 1280[1,2]	3870	59579 ± 20561[1,2]	0	29822 ± 14898	3105	1438 ± 2145	0	11875 ± 4217 [1,2]	0.5	80.6 ± 17.5 [2]
137/05	0	1518 ± 1472 [3]	3400	12105 ± 10970 [3]	154	28458 ± 13576	113	33 ±	0	2671 ± 1332 [3]	0.5	26.3 ± [3] 7.4
113/04	5458	6046 ± 931	810046	41233 ± 14929	189105	26834 ± 11618	26086	597 ± 1428	0	7769 ± 2499	125	65.1 ± 17.5

NM, *Neisseria meningitidis*; IMO, invazivní meningokokové onemocnění; EU, endotoxin unit
[1]285/05 vs. 137/05, [2]285/05 vs. 113/04, [3]137/05 vs. 113/04, vše $p < 0,01$

Výsledky této studie jsou součástí rukopisu odeslaného do časopisu *Folia microbiologica* (příloha 4).

4.3. Adaptivní imunitní odpověď u pacientů s bakteriální meningitidou

Signifikantní pokles počtu cirkulujících CD4, CD8 a celkových T-lymfocytů i NK buněk pozorovaný u pacientů s BM přetrvával 3 dny u CD4 T lymfocytů a 7 dní v případě NK buněk; počty v ostatních subpopulacích se rychle normalizovaly. Sledované změny nekorelovaly s klinickou tíží průběhu septického onemocnění, nicméně kinetika restituce cirkulujících lymfocytárních subpopulací byla významně ovlivněna bakteriální etiologií sepse. Grampozitivní BM (n=10), která byla převážně vyvolána *Streptococcus pneumoniae* a *Staphylococcus aureus*, způsobila protrahovanou supresi CD4, CD8 a celkových T-lymfocytů. Snížení absolutních počtů NK buněk u nemocných

s grampozitivní etiologií infekce přetrvávalo více než 14 dní. Naopak u nemocných s gramnegativní meningitidou (*N. meningitidis*, n=8; enterobakterie, n=2) byla sledována rychlá normalizace cirkulujících lymfocytárních subpopulací v průběhu prvních 3 dnů hospitalizace. V průběhu ústupu gramnegativní meningitidy byl patrný signifikantně rychlejší nárůst počtu aktivovaných T a CD4 T lymfocytů i rychlé zvýšení B lymfocytů v krvi ve srovnání s BM vyvolanou grampozitivními koky. Tyto výsledky naznačují, že grampozitivní BM způsobuje významnější supresi lymfocytárních subpopulací v krvi ve srovnání s BM vyvolanou gramnegativními patogeny.

Tyto výsledky byly součástí práce, která byla v březnu 2003 publikována v časopise *Clinical Microbiology and Infection* a je uvedena jako příloha 5[57].

4.4. Adaptivní imunitní odpověď u pacientů s aseptickou meningitidou

Klinická studie u pacientů s aseptickou meningitidou I

U pacientů s KM se neurologické symptomy objevily v průměru 5,1 ± 0,5 dnů před provedením diagnostické LP oproti 6,4 ± 0,8 dnů u skupiny s neuroborreliózou a tento parametr se významně nelišil mezi oběma skupinami. Trvání symptomů u pacientů s KM pozitivně korelovalo s absolutním počtem lymfocytů v MM ($r = 0,31$, $p < 0,05$). Naopak u pacientů s neuroborreliózou byla nalezena pozitivní korelace mezi trváním symptomů a počtem NK buněk ($r = 0,68$, $p < 0,05$) a negativní korelace s indexem CD4/CD8 v MM ($r = -0,74$, $p < 0,05$). Celkový počet leukocytů v MM u pacientů s akutní neuroborreliózou byl vyšší než u pacientů s KM (118 ± 21 vs. 81 ± 11 buněk/µl, $p < 0,05$). Podobně absolutní počet lymfocytů v MM byl vyšší u skupiny s neuroborreliózou oproti skupině

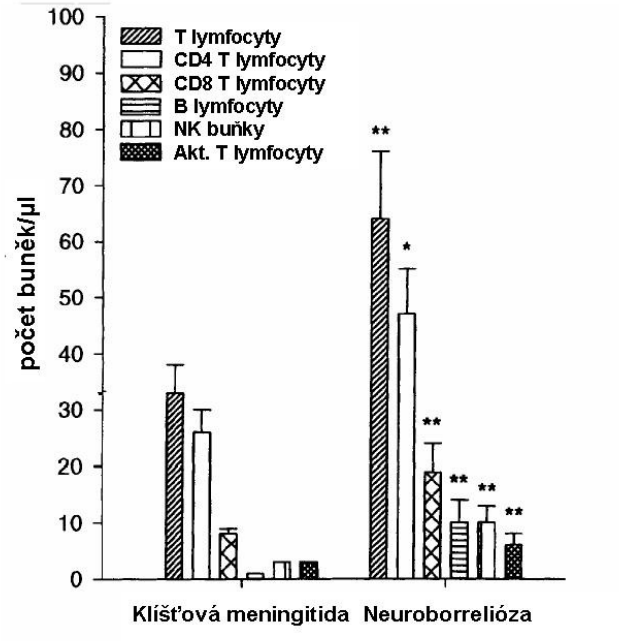
s KM (82 ± 16 vs. 33 ± 5 buněk/µl, $p < 0,01$). Obě skupiny se významně nelišily v koncentraci bílkoviny, glukózy a chloridů v MM.

Ve skupině pacientů s neuroborreliózou byly nalezeny vyšší absolutní počty u všech sledovaných lymfocytárních subpopulací oproti skupině pacientů s KM (obr. 10), konkrétně u T lymfocytů (64,0 ± 12 vs 33 ± 5 buněk/µl, $p < 0,01$), CD4 T lymfocytů (47 ± 8 vs 26 ± 4 buněk/µl, $p < 0,02$), CD8 T lymfocytů (19 ± 5 vs 8 ± 1 buněk/µl, $p < 0,01$), B lymfocytů (10 ± 4 vs 1 ± 0 buněk/µl, $p < 0,01$), a aktivovaných T lymfocytů (6 ± 2 vs 3 ± 0 buněk/µl, $p < 0,01$). Zvýšený počet B lymfocytů v MM u pacientů s neuroborreliózou byl asociován s přítomností protilátek třídy IgG specifických proti *B. burgdorferi* (obr. 11).

U pacientů s neuroborreliózou korelovala koncentrace bílkoviny v MM s absolutním počtem lymfocytů ($r = 0,87$, $p < 0,01$), T lymfocytů ($r = 0,78$, $p < 0,01$), CD4 T lymfocytů ($r = 0,81$, $p < 0,01$) a aktivovaných T lymfocytů ($r = 0,78$, $p < 0,01$) v MM. Podobně byla rovněž u pacientů s KM nalezena pozitivní korelace bílkoviny v MM s absolutním počtem lymfocytů ($r = 0,62$, $p < 0,01$), T lymfocytů ($r = 0,61$, $p < 0,01$) a CD4 T lymfocytů ($r = 0,64$, $p < 0,01$) a aktivovaných T lymfocytů ($r = 0,78$, $p < 0,01$) v MM. Na rozdíl od pacientů s neuroborreliózou korelovala koncentrace bílkoviny v MM rovněž s počtem CD8 T lymfocytů ($r = 0,47$, $p < 0,01$) a NK buněk ($r = 0,61$, $p < 0,01$).

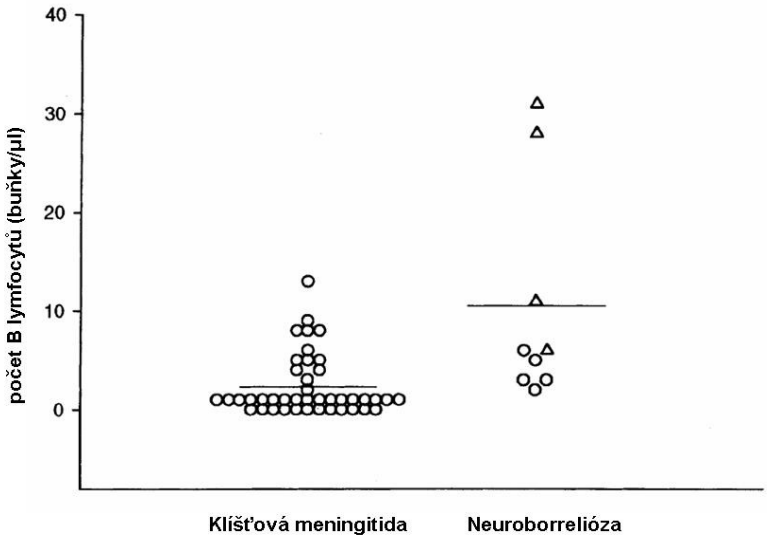
Uvedené výsledky byly publikovány v časopise *Acta Neurologica Scandinavica* (příloha 6)[58].

Obr. 10. Srovnání počtů lymfocytárních subpopulací u pacientů s klíšťovou meningoencefalitidou a neuroborreliózou



(* p < 0,05, ** p < 0,01).

Obr. 11. Srovnání počtů B lymfocytů u pacientů s klíšťovou meningoencefalitidou a neuroborreliózou a vliv zvýšené produkce protilátek proti *B. burgdorferi*



Trojúhelník označuje počty B lymfocytů u pacientů s pozitivitou IgG protilátek proti *B. burgdorferi* v mozkomíšním moku.

Klinická studie pacientů s aseptickou meningitidou II

Klinická a laboratorní data získaná od pacientů s AM v této studii jsou uvedena v tab. 6.

Cytologie a biochemie mozkomíšního moku. Počet leukocytů v MM od pacientů s AM byl 218 ± 38 buněk/µl (normální počet ≤ 5 buněk/µl) a nebyl závislý na etiologii AM. Podobně se nelišil ani počet lymfocytů, který byl 146 ± 24 buněk/µl Průměrná koncentrace bílkoviny v MM byla zvýšena na 0,92 ± 0,07 g/l (norma ≤ 0,6 g/l).

PCR diagnostika aseptické meningitidy. Vyšetření PCR bylo pozitivní u 8 z 37 vzorků MM (16 %): 2x VZV, 2x enterovirus, 1x HSV-1, 1x Cytomegalovirus (CMV), 1x duální infekce HSV-1/Epstein-Barrová virus (EBV), 1x duální infekce HSV-1/Human herpes virus (HHV)-7. RNA viru KM nebyla detekována v žádném vzorku MM včetně pacientů se sérologicky ověřenou KM.

Koncentrace Th1 a Th2 cytokinů. IFN-γ byl pozitivní v likvoru u 32 pacientů (87 %) s průměrnou koncentrací 206 ± 57 pg/ml. Naznačené byly rozdíly v koncentraci IFN-γ u pacientů s AM neznámé etiologie oproti pacientům s KM (117,5 ± 15,9 vs. 226,4 ± 59,5 pg/ml; $p = 0,06$). IL-10 byl detekován u 9 pacientů (24 %) a jeho průměrná koncentrace v MM byla 83 ± 11 pg/ml. IL-2 a IL-5 byly pozitivní pouze v jednom případě. IL-4 a TNF-α nebyly detekovatelné v žádném vzorku. Dále byla prokázána negativní korelace IFN-γ s dobou trvání AM ($r = -0,53$; $p < 0,01$).

Kortizol v mozkomíšním moku. Kortizol byl detekován ve všech vzorcích MM získaného od pacientů s AM. Průměrná koncentrace byla 18,6 ± 1,5 nmol/l. Jak je dokumentováno na obr. 12, intratekální hladina kortizolu u pacientů s KM byla 27,3 ± 2,7 nmol/l, což je koncentrace vyšší než u pacientů s AM neznámé etiologie (14,9 ± 2,7 nmol/l; $p < 0,01$), pacientů s neuroborreliózou (14,7 ± 1,1 nmol/l; $p < 0.01$) i kontrolní

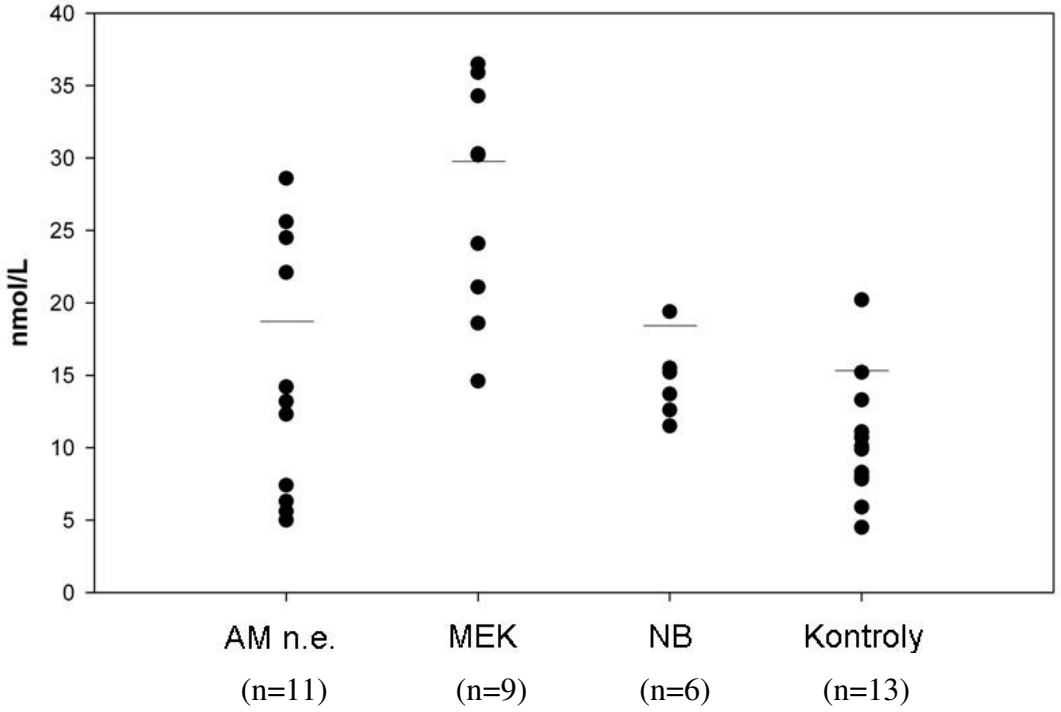
skupiny (10,4 ± 1,2 nmol/l; $p < 0,01$). Koncentrace kortizolu v likvoru pozitivně korelovala s intratekální hladinou IFN-γ ($r = 0,40$; $p = 0,03$) a IL-10 ($r = 0,65$, $p = 0,05$).

Tab. 6. Klinická a laboratorní data pacientů s aseptickou meningitidou

			Mozkomíšní mok								
Nr.	Věk (roky)	Pohlaví	Protein (mg/ml)	Glukóza (mmol/l)	Leuko (buňky/µl)	Lymfo (buňky/µl)	IFN-γ (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	Kortizol (nmol/l)	Doba trvání# (dny)	Etiologie
1	27	M	0,7	3,4	77	39	172	N/D	30,2	3	KM
2	32	M	1,39	2,6	515	395	535	N/D	24,1	3	KM
3	33	M	1,13	3,2	256	52	112	N/D	36,5	3	KM
4	48	M	0,96	2,9	70	63	421	N/D	21,1	5	KM
5	58	M	0,76	5,9	41	11	98	71	34,3	4	KM
6	29	Ž	0,83	2,9	119	22	105	N/D	18,6	7	KM
7	35	Ž	0,72	2,9	32	24	102	N/D	14,6	12	KM
8	61	Ž	1,47	3,7	90	67	267	N/D	35,9	3	KM
9	67	Ž	0,50	3,0	170	2	N/D	N/D	30,3	1	KM
10	9	M	1,02	2,9	296	296	122	113	19,4	4	NB
11	49	M	1,57	2,7	280	255	86	N/D	11,5	10	NB
12	56	M	1,22	3,9	25	21	58	66	13,7	35	NB
13	56	M	0,43	3,2	2	2	N/D	N/D	12,6	110	NB
14	21	Ž	0,98	2,8	299	291	105	57	15,2	6	NB
15	64	Ž	0,74	4,1	99	88	N/D	N/D	15,5	6	NB
16	24	M	1,21	2,9	201	124	111	N/D	15,4	4	KM +NB
17	18	M	0,57	3,5	587	587	127	N/D	12,3	3	EM
18	23	M	0,81	3,1	1232	248	523	124	28,8	2	EM
19	25	Ž	1,36	2,3	172	167	N/D	N/D	32,0	8	EM
20	33	Ž	0,72	3,6	154	144	197	78	16,8	2	EM
21	35	M	0,74	2,9	317	307	76	N/D	12,9	4	HSV-1
22	67	M	0,85	4,9	251	235	140	N/D	5,0	10	HSV-1/EBV
23	16	Ž	1,49	3,1	432	405	1793	N/D	14,9	2	HSV-1/HHV-7
24	50	M	1,74	2,9	387	323	127	N/D	21,6	12	CMV
25	66	M	1,78	6,2	78	76	48	N/D	16,9	17	VZV
26	56	Ž	0,61	2,9	61	53	91	N/D	14,0	8	VZV
27	10	M	0,24	3,7	103	97	96	N/D	7,4	4	AM n.e.
28	15	M	0,55	3,1	47	43	112	N/D	6,3	6	AM n.e.
29	18	M	0,57	3,6	133	23	51	N/D	25,6	3	AM n.e.
30	20	M	0,55	2,8	312	208	153	62	24,5	7	AM n.e.
31	28	M	0,76	3,8	149	123	239	134	28,6	4	AM n.e.
32	41	M	0,61	3,2	25	21	79	N/D	14,2	7	AM n.e.
33	13	Ž	0,54	3,3	216	213	130	N/D	5,6	1	AM n.e.
34	28	Ž	0,34	3,1	35	27	N/D	N/D	12,3	10	AM n.e.
35	52	Ž	0,68	3,1	213	113	147	N/D	22,1	6	AM n.e.
36	52	Ž	1,91	2,2	528	427	51	N/D	5,0	13	AM n.e.
37	52	Ž	0,87	2,4	58	55	110	39	13,2	2	AM n.e.

KM, klíšťová meningoencefalitida; NB, neuroborrelióza; EM, enterovirová meningitida; HSV, Herpes simplex virus; EBV, Epstein-Barrová virus; HHV, Human herpes virus; CMV, Cytomegalovirus; VZV, Varicella-zoster virus; AM n.e., aseptická meningitida nejasné etiologie, N/D, nedetekováno, # trvání symptomů od začátku onemocnění do provedení lumbální punkce

Obrázek 12. Porovnání koncentrací kortizolu v likvoru u klíšťové meningo-encefalitidy (MEK), neuroborreliózy (NB), aseptické meningitidy nezjištěné etiologie (AM n.e.) a kontrolní skupiny



Tato data byla v r. 2006 publikována jako článek v časopise *Prague Medical Report* (příloha 3)[56] a byla rovněž prezentována v přednáškách na odborných konferencích (příloha 10).

5. Diskuze

Výsledky studií předložené v této disertační práci přinesly několik prioritních zjištění. Prokázali jsme, že imunitní odpověď je při akutní IM kompartmentalizovaná do CNS a hlavní změny probíhají v intratekálním prostoru. Rovněž v periferní krvi byly dokumentovány alterace některých parametrů přirozené a adaptivní imunity v průběhu IM. Při akutní BM byla v likvoru zaznamenána dominance neutrofilů, i když prokázáno bylo také výrazné zastoupení aktivovaných Mϕ charakterizovaných vysokou expresí HLA-DR, jejichž procento souviselo s tíží průběhu onemocnění. Naopak při AM byly dominantní populací přítomnou v CNS lymfocyty, jejichž jednotlivé subpopulace se významně lišily v závislosti na etiologii onemocnění.

Přestože o významu kortizolu v imunopatofyziologii BM i AM nebylo dosud publikováno mnoho údajů, naše studie prokázaly jeho zvýšené koncentrace v likvoru u BM i AM. Navíc v případě BM byl dokumentován vztah intratekálního kortizolu k tíži průběhu onemocnění, silnější než v případě jeho sérových koncentrací. Tento nález by mohl naznačovat význam kompartmentalizace kortizolu v intratekálním prostoru v patofyziologii BM. U pacientů s AM byla dokumentována závislost hladin kortizolu v likvoru na etiologii, když nejvyšší koncentrace byly pozorovány při KM. Naše studie rovněž prokázaly možnost klinického využití tohoto snadno vyšetřitelného biomarkeru v rámci rozlišení aseptické a purulentní neuroinfekce stanovením jeho likvorové koncentrace v akutním stádiu onemocnění. Koncentrace kortizolu v likvoru u pacientů s BM byly výrazně vyšší než u pacientů s AM nebo roztroušenou sklerózou[23,45]. Otázkou je, zda vysoká koncentrace kortizolu v MM hraje roli při exacerbaci zánětlivého poranění mozku při BM, anebo je naopak zvýšený intratekální kortizol reakcí na přehnanou

zánětlivou odpověď v SAP. Proti druhému vysvětlení svědčí fakt, že u pacientů s BM nebyla prokázána žádná korelace kortizolu se zánětlivými cytokiny.

Kortizol je malá molekula rozpustná v tucích, která za normálního stavu snadno přechází přes HEB[59]. Tento hormon je produkován v nadledvinkách v důsledku stimulace HHA osy. K akumulaci kortizolu v MM dokumentované v našich studiích při BM a AM dochází pravděpodobně pasivním mechanizmem, což podporuje nález korelace sérových a likvorových koncentrací. Rovnováha mezi oběma kompartmenty je za normálních okolností kontrolována převážně aktivním efluxem kortizolu z CNS, nicméně tento mechanizmus může být při zánětu narušen[46]. Další mechanizmus, který by se mohl uplatňovat při zvýšení kortizolu v CNS, je *de novo* produkce kortizolu pomocí enzymu 11β-hydroxysteroid dehydrogenázy typu 1[60]. V případě BM doprovázené sepsí je rovnováha sérového a likvorového kortizolu ovlivněna zvýšením biologicky aktivní volné frakce kortizolu v krvi v důsledku poklesu koncentrace albuminu a kortizol-vázajícího globulinu, jejichž hladina klesá při sepsi až o 50 %[61]. Vztah mezi intratekálními koncentracemi IFN-γ a kortizolu u pacientů s AM by mohl odrážet stimulaci HHA osy, nicméně dosud nebylo popsáno, že by IFN-γ přímo HHA osu aktivoval[62]. HHA osa je stimulována IL-1β, který však může být produkován buňkami mikroglie po aktivaci IFN-γ[63].

Zajímavé zjištění vyšších koncentrací kortizolu v likvoru u pacientů s KM ve srovnání s neuroborreliózou a AM nejasné etiologie by mohlo podpořit hypotézu, že kortizol může exacerbovat neuronální poškození. Dřívější práce u pacientů s KM totiž prokázala, že rozvoj paretických komplikací při tomto onemocnění je negativně ovlivněn léčbou kortikosteroidy[64]. V experimentální studii u králíků dexamethazon indukoval apoptózu neuronů v hipokampu[19]. Na druhou stranu ve stejné studii dexamethazon snížil celkové poškození neuronů. Protizánětlivý účinek kortizolu může zmírnit zánětlivou

odpověď způsobující poškození nervové tkáně během neuroinfekcí pomocí suprese aktivace mikroglie[65]. Kortizol může rovněž snížit produkci ROS neutrofily, které tvoří největší populaci zánětlivých buněk při BM[66].

Výsledky našich studií potvrdily zvýšenou produkci většiny sledovaných zánětlivých cytokinů v intratekálním prostoru u pacientů s BM a AM a dokumentují výraznou kompartmentalizaci imunitní odpovědi do CNS při neuroinfekci[67]. Podle očekávání nejvyšší koncentrace v likvoru i séru u BM vykázaly IL-6 a IL-8. Analýza obou mediátorů je spolu s detekcí laktátu v likvoru doporučována jako spolehlivá pro diskriminaci BM od AM[2]. Význam laktátu v MM při BM je podpořen zjištěním jeho vztahu s intratekálními koncentracemi kortizolu, IL-6 a IL-8. Neprokázaná korelace laktátu a počtu leukocytů v MM u pacientů s BM nasvědčuje spíše pro jeho produkci neurony v důsledku hypoxie nervové tkáně. Jestliže na základě studie Wellmera et al. předpokládáme, že většina laktátu je při BM produkována hostitelskými buňkami, námi pozorovaná asociace intratekálního laktátu a kortizolu svědčí pro vliv kortizolu na metabolizmus mozkové tkáně. Poněkud překvapivě nebyla oproti původní hypotéze v naší studii nalezena korelace zvýšených cytokinů a tíže průběhu BM. Vysoké intratekální koncentrace IL-6 byly v literatuře dokumentovány u neléčených pacientů s těžkým průběhem tuberkulózní meningitidy[68]. Low et al. zjistili, že jediné cytokiny v MM asociované s klinickými komplikacemi BM jsou TNF-α a IL-1β, podobně korelace s tíží onemocnění byla prokázána v případě IL-1β u meningokokové meningitidy[67,69]. Jedním z důvodů, proč nelze většinou prokázat vztah produkce jednotlivých cytokinů v likvoru během BM a tíže průběhu či prognózy onemocnění, je velké množství variabilních hostitelských a mikrobiálních faktorů, které ovlivňují cytokinovou reakci. Bylo prokázáno, že patogeneze IMO je ovlivněna cytokinovou produkcí závislou na virulenci *N. meningitidis*, ale rovněž na genetické predispozici pacienta[70]. Prins et al. dokumentovali

nižší produkci IL-6 po stimulaci kmenem *N. meningitidis* od pacienta s lehčím IMO než kmenem od pacienta se septickým šokem[71]. V naší experimentální studii byly naopak nejvyšší hladiny IL-1β, TNF-α a IL-6 pozorovány po inkubaci s kmenem *N. meningitidis* izolovaným od pacienta s lehčím IMO, zatímco klinický izolát od pacienta se septickým šokem vyvolal slabší odpověď. Tento rozdíl může být způsoben odlišnou metodikou Prinse et el., kteří použili pro experimenty krev pouze od 1 dárce, zatímco my od 4 zdravých dárců. Díky tomu jsme výrazně eliminovali efekt genetických faktorů testovaných osob a podařilo se nám prokázat, že na intenzitě cytokinové reakce po infekci *N. meningitidis* se významně podílejí hostitelské faktory.

Co se týče významu cytokinů u AM, byla v naší studii prokázána významná role IFN-γ v CNS. Likvidace intracelulární infekce se kromě přirozené imunity účastní i buňky specifické imunity, konkrétně cytotoxické T buňky pomocí cytolytických a necytolytických mechanizmů. Mezi necytolytické mechanizmy patří právě produkce IFN-γ CD4 buňkami s Th1 fenotypem, které jsou predominantní subpopulací v MM během zánětlivého procesu v CNS[72]. Aktivace Th1 buněk může být inhibována protizánětlivými mediátory, např. IL-10 a kortizolem[73]. Pro tento mechanizmus svědčí i námi pozorovaný vztah mezi likvorovou koncentrací IFN-γ a kortizolu. Předpokládá se, že eliminace virů i intracelulárních bakterií v CNS je prováděna zejména pomocí necytolytických mechanizmů, podobně jako například při kontrole virové replikace u virové hepatitidy[74]. V naší studii byl IFN-γ detekován v MM u většiny pacientů s AM. Tento silně prozánětlivý cytokin je produkován hlavně Th1 CD4 buňkami. Tato subpopulace v MM převažuje nejen během aseptických neuroinfekcí, jak jsme rovněž dokumentovali v naší studii, ale i při dalších zánětlivých procesech v CNS[58,72]. Zvýšené koncentrace IFN-γ pozorované intratekálně v naší studii mohou rovněž odrážet migraci a aktivaci IFN-γ produkujících CD8 T buněk během AM. Bylo prokázáno, že tyto buňky zajišťují protekci u myší

s experimentální infekcí CNS *Toxoplasma gondii*[75]. V naší studii lymfocytárních subpopulací u AM jsme zjistili, že počty CD8 T buněk a NK buněk jsou významně vyšší u neuroborreliózy ve srovnání s KM. To je v souladu s dříve publikovaným zjištěním, že produkce IFN-γ je vyšší při akutní neuroborrelióze než při KM, nicméně v naší studii jsme tento rozdíl neprokázali[76]. Všechna tato pozorování jsou pravděpodobně důsledek vyšší kompartmentalizace imunitní odpovědi do CNS při neuroborrelióze. Celkově se dá říci, že naše data od pacientů s AM naznačují významné rozdíly v zastoupení lymfocytárních subpopulací, hladin cytokinů a kortizolu v závislosti na virové či borreliové etiologii. Tyto odlišnosti v intratekální imunitní odpovědi by mohly souviset s imunopatologickými projevy při AM. Pro tento fakt by mohla svědčit i námi nalezená nepřítomnost viru KM prokazovaného PCR v likvoru asociovaná s relativně vysokými zánětlivými parametry. Dlouhodobé důsledky změn imunitní a endokrinní odpovědi dokumentovaných v našich studiích je třeba dále studovat.

Souhrn

Infekční záněty CNS zůstávají onemocněními s vysokou morbiditou a mortalitou. Z tohoto důvodu je nutné zdokonalit současné diagnostické a terapeutické postupy či případně zavést nové metody diagnostiky a léčby. Tento vývoj je podmíněn dokonalejším poznáním patofyziologických mechanizmů, které provázejí tyto závažné infekce.

V disertační práci byly předloženy výsledky 4 klinických a 1 experimentální studie. Cílem provedených studií bylo prohloubení znalostí o imunopatofyziologii infekční meningitidy (IM) pomocí sledování změn parametrů buněčné imunity, koncentrací cytokinů i endogenní endokrinní odpovědi při infekčních zánětech CNS. Dalším záměrem této práce bylo posoudit možnost využití některého z vyšetřovaných parametrů jako biomarkeru v diferenciální diagnostice IM.

Výsledky provedených klinických studií potvrdily, že imunitní odpověď je při akutně probíhající bakteriální (BM) i aseptické (AM) meningitidě kompartmentalizovaná do CNS. Hlavní změny probíhají v intratekálním prostoru, nicméně i v periferní krvi byly dokumentovány významné alterace některých parametrů přirozené a adaptivní imunity.

Co se týče významných zjištění v případě imunitní odpovědi při IM, přinesly naše studie tyto výsledky:

- U pacientů s BM jsme kromě potvrzení očekávané převahy neutrofilů v likvoru prokázali přítomnost aktivovaných makrofágů, jejichž úroveň aktivace souvisí s příznivou prognózou onemocnění.
- Kompartmentalizace zánětlivé odpovědi v likvoru při BM charakterizovaná vysokými koncentracemi zánětlivých cytokinů a chemokinů, zejména IL-6, IL-8, TNF-α a IL-1β, překvapivě nekoreluje s tíží průběhu onemocnění.

- Pomocí srovnání koncentrací cytokinů v krvi od pacientů s meningokokovou meningitidou a výsledků studie v experimentálním *in vitro* modelu se nám podařilo prokázat, že na intenzitě cytokinové produkce při infekci jedním z nejčastějších bakteriálních původců BM, *N. meningitidis,* se kromě virulence patogenu významně podílí i hostitelské faktory.
- Na rozdíl od produkce cytokinů, endogenní endokrinní odpověď dokumentovaná zvýšenou hladinou sérového a zejména intratekálního kortizolu souvisí s tíží průběhu BM stanovené pomocí skóre APACHE II, SOFA a GCS.
- Koncentrace intratekálního kortizolu jsou při AM výrazně nižší než u pacientů s BM a podařilo se prokázat jeho vysokou senzitivitu i specificitu v odlišení obou typů infekčních zánětů CNS.
- Úroveň koncentrace kortizolu v likvoru souvisí i s etiologií AM, když nejvyšší koncentrace byly zaznamenány u pacientů s klíšťovou meningitidou.
- Uvedená prioritní zjištění týkající se kortizolu by v budoucnu mohla vést k využití tohoto biomarkeru v diagnostice neuroinfekcí a také k bližšímu objasnění patofyziologického významu kortizolu v CNS, což je důležité i s ohledem na přetrvávající diskuze o účinnosti adjuvantní terapie glukokortikoidy při IM.
- Významné rozdíly v zastoupení lymfocytárních subpopulací a zvýšené produkci IFN-γ v intratekálním kompartmentu závisejí na virové či borreliové etiologii AM.
- Oproti AM nejsou při akutním průběhu BM lymfocyty výrazněji zastoupeny v intratekálním prostoru, nicméně výrazné alterace lymfocytárních subpopulací byly prokázány v periferní krvi. K jejich úpravě dochází pomaleji u meningitid grampositivní etiologie při srovnání s gramnegativními meningitidami.

Summary

CNS infections continue to be associated with a high morbidity and mortality. Thus, it is neccessary to improve current diagnostic and therapeutical approaches. Better understanding to the pathophysiology of CNS infections is crucial for this process.

In this thesis, the results of 4 clinical studies and 1 experimental study were presented. The overall aim of the studies was to expand knowledge about the immunopathophysiology of infectious meningitis (IM). For this purpose, we analysed several parameters of cellular immunity, cytokine production and activation of endogenous endocrine response during IM. Also, a potential use of new biomarkers in differential diagnostics of IM was evaluated.

The results documented that the immune response during acute bacterial meningitis (BM) as well as aseptic meningitis (AM) is compartmentalized to the CNS. The most important changes take place in the subarachnoideal space; however, several alterations of the innate and adaptive immunity were found in peripheral blood as well.

Novel findings observed in our studies are as follows:

- The presense of activated macrophages (HLA-DR+) is associated with a favorable outcome of in patients with BM.
- In patients with BM, a high inflammatory response in the CNS which is associated with elevated cytokine and chemokine concentrations (especially IL-6, IL-8, TNF-α and IL-1β) does not correlate with disease severity.

- The comparison of the clinical data from patients with invasive meningococcal infection and the results from our experimental *in vitro* model with clinical isolates of *N. meningitidis* suggests that the inflammatory response is predominantly influenced by host factors and bacterial virulence plays an additional role.
- Unlike cytokines, elevated serum and intrathecal cortisol levels correlate with BM severity assessed by clinical scores, i.e., APACHE II, SOFA and GCS.
- Cortisol levels in AM are increased compared to healthy controls, but significantly lower compared to BM. Furthermore, we documented high sensitivity and specificity of intrathecal levels of cortisol in dicrimination of BM and AM.
- In patients with AM, we found the relationship between cortisol levels in the cerebrospinal fluid and the etiology of AM when the highest concentrations were observed in patients with tick-borne meningoencephalitis.
- Altogether, the findings related to cortisol levels could not only help in IM diagnosis, but also suggest the role of cortisol in the pathophysiology of IM.
- The changes in lymphocyte subsets and IFN-γ production in the intrathecal compartment depend on viral or spirochetal etiology of AM.
- Unlike in AM, lymphocytes present a minor population in the CNS during acute BM;.however, we observed severe changes of lymphocyte subsets in peripheral blood. Moreover, restitution of these alterations is prolonged in gram-positive meningitis compared to meningitis of gram-negative etiology.

Seznam zkratek

AM - aseptická meningitida

APACHE - Acute Physiologic and Chronic Health Evaluation (skóre pro posouzení tíže stavu kriticky nemocného)

APC – antigen-presenting cells (antigen-prezentující buňky)

BM - bakteriální meningitida

BMEC - brain microvascular endothelial cells (mozkové mikrovaskulární endotelové buňky)

CBA - cytokine bead array (metoda pro stanovení koncentrací s pomocí kalibračních kuliček a průtokové cytometrie)

CFU – colony-forming units (jednotky udávající bakteriální nálož)

CMV - Cytomegalovirus

CNS - centrální nervový systém

CRP - C-reaktivní protein

DC - dendritic cell (dendritická buňka)

EBV - Epstein-Barrová virus

G-CSF - granulocyty-stimulující faktor

GCS - Glasgow Coma Scale

HEB - hematoencefalická bariéra

HHA - hypothalamo-hypofýzo-adrenální osa

HHV - Human herpes virus

HSV - Herpes simplex virus

iNOS - inducible nitric oxid synthase (inducibilní syntáza oxidu dusnatého)

IM - infekční meningitida

IL - interleukin

IMO - invazivní meningokokové onemocnění

KM - klíšťová meningoencefalitida

LP - lumbální punkce

LPS - lipopolysacharid

LOS - lipooligosacharid

MM - mozkomíšní mok

Mϕ - makrofágy

MHC - major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)

MIP - macrophage inflammatory protein (chemoatraktant pro makrofágy)

NK - natural killer (přirozený zabíječ)

NO - oxid dusnatý

RIA - radioimmunoassay

ROS - reactive oxygen species (reaktivní kyslíkové radikály)

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

SAP - subarachnoideální prostor

SOFA - Sepsis Organ Failure Assessment (skóre pro posouzení orgánového selhání při sepsi

TNF - tumor necrosis factor (faktor nekrotizující tumory)

VZV - varicella-zoster virus (virus planých neštovic)

Literatura

1. Tunkel, A.R. et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* **39**, 1267-84 (2004).
2. Kleine, T.O., Zwerenz, P., Zofel, P. & Shiratori, K. New and old diagnostic markers of meningitis in cerebrospinal fluid (CSF). *Brain Res Bull* **61**, 287-97 (2003).
3. Simon, L., Gauvin, F., Amre, D.K., Saint-Louis, P. & Lacroix, J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* **39**, 206-17 (2004).
4. Viallon, A. et al. High sensitivity and specificity of serum procalcitonin levels in adults with bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* **28**, 1313-6 (1999).
5. Schwarz, S., Bertram, M., Schwab, S., Andrassy, K. & Hacke, W. Serum procalcitonin levels in bacterial and abacterial meningitis. *Crit Care Med* **28**, 1828-32 (2000).
6. Fauci, A.S. Infectious diseases: considerations for the 21st century. *Clin Infect Dis* **32**, 675-85 (2001).
7. Bishop, A. & Anderson, J.E. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology* **208**, 193-205 (2005).
8. Durand, M.L. et al. Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med* **328**, 21-8 (1993).
9. Saez-Llorens, X. & McCracken, G.H., Jr. Bacterial meningitis in children. *Lancet* **361**, 2139-48 (2003).
10. Roos, K.L. Bacterial Meningitis. *Curr Treat Options Neurol* **1**, 147-156 (1999).
11. Meyer, C.N., Samuelsson, I.S., Galle, M. & Bangsborg, J.M. Adult bacterial meningitis: aetiology, penicillin susceptibility, risk factors, prognostic factors and guidelines for empirical antibiotic treatment. *Clin Microbiol Infect* **10**, 709-17 (2004).
12. National Institute of Public Health. Cumulative incidence of selected infectious diseases in the Czech Republic. www.szu.cz/cem (16.1.2006).
13. Outbreaks of aseptic meningitis associated with echoviruses 9 and 30 and preliminary surveillance reports on enterovirus activity--United States, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **52**, 761-4 (2003).
14. Cassady, K. & Whitley, R. Pathogenesis and pathophysiology of viral central nervous infections. In: Scheld WM, Whitley RJ, Durack, DT, eds. *Infections of the central nervous system. Philadeplphia: Lippincott-Raven*, 7-22 (1997).
15. Kim, K.S. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* **4**, 376-85 (2003).
16. Drevets, D.A. Dissemination of Listeria monocytogenes by infected phagocytes. *Infect Immun* **67**, 3512-7 (1999).
17. Gloor, S.M. et al. Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. *Brain Res Brain Res Rev* **36**, 258-64 (2001).
18. Ransohoff, R.M., Kivisakk, P. & Kidd, G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* **3**, 569-81 (2003).
19. Zysk, G. et al. Anti-inflammatory treatment influences neuronal apoptotic cell death in the dentate gyrus in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**, 722-8 (1996).
20. Hickey, W.F. & Kimura, H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* **239**, 290-2 (1988).

21. Fedoroff, S., Zhai, R. & Novak, J.P. Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J Neurosci Res* **50**, 477-86 (1997).
22. Hickley, W. Leukocyte migration into the central nervous system. In: Peterson, PK, Renington, JS eds. In Defense of the Brain. Malden: Blackwell Science. 11-30 (1997).
23. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511 (2004).
24. Ishiguro, A. et al. Production of interleukin-10 in the cerebrospinal fluid in aseptic meningitis of children. *Pediatr Res* **40**, 610-4 (1996).
25. Lukes, A., Mun-Bryce, S., Lukes, M. & Rosenberg, G.A. Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases. *Mol Neurobiol* **19**, 267-84 (1999).
26. Yokoyama, T., Oda, M., Ogura, S., Horiuchi, T. & Seino, Y. Relationship of interleukin-8 and colony-stimulating factors to neutrophil migration in aseptic meningitis. *Acta Paediatr* **85**, 303-7 (1996).
27. Merelli, E. et al. Natural killer cells and lymphocyte subsets in active MS and acute inflammation of the CNS. *Acta Neurol Scand* **84**, 127-31 (1991).
28. Sriwanthana, B. et al. Lymphocyte subsets in human encephalitic and paralytic rabies. *Acta Neurol Scand* **80**, 287-9 (1989).
29. Cserr, H.F. & Knopf, P.M. Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today* **13**, 507-12 (1992).
30. Matsui, M., Mori, K.J. & Saida, T. Cellular immunoregulatory mechanisms in the central nervous system: characterization of noninflammatory and inflammatory cerebrospinal fluid lymphocytes. *Ann Neurol* **27**, 647-51 (1990).
31. Holub, M. et al. Lymphocytic sub-populations in serous meningitis in the cerebrospinal fluid and blood. *Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie* **63**, 255-260 (2000).
32. Keane-Myers, A. & Nickell, S.P. T cell subset-dependent modulation of immunity to Borrelia burgdorferi in mice. *J Immunol* **154**, 1770-6 (1995).
33. Scott, P. & Kaufmann, S.H. The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunol Today* **12**, 346-8 (1991).
34. Tomazic, J. & Ihan, A. Flow cytometric analysis of lymphocytes in cerebrospinal fluid in patients with tick-borne encephalitis. *Acta Neurol Scand* **95**, 29-33 (1997).
35. Lopez-Cortes, L.F. et al. Interleukin-8 in cerebrospinal fluid from patients with meningitis of different etiologies: its possible role as neutrophil chemotactic factor. *J Infect Dis* **172**, 581-4 (1995).
36. Tauber, M.G. & Moser, B. Cytokines and chemokines in meningeal inflammation: biology and clinical implications. *Clin Infect Dis* **28**, 1-11; quiz 12 (1999).
37. Liao, Y.C. et al. IL-19 induces production of IL-6 and TNF-alpha and results in cell apoptosis through TNF-alpha. *J Immunol* **169**, 4288-97 (2002).
38. Koedel, U. & Pfister, H.W. Oxidative stress in bacterial meningitis. *Brain Pathol* **9**, 57-67 (1999).
39. van Furth, A.M. et al. High levels of interleukin 10 and tumor necrosis factor alpha in cerebrospinal fluid during the onset of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* **21**, 220-2 (1995).
40. Chambers, T.J. & Diamond, M.S. Pathogenesis of flavivirus encephalitis. *Adv Virus Res* **60**, 273-342 (2003).
41. Webster, J.I., Tonelli, L. & Sternberg, E.M. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* **20**, 125-63 (2002).

42. Rivest, S. How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* **26**, 761-88 (2001).
43. Hoogendijk, W.J., Meynen, G., Endert, E., Hofman, M.A. & Swaab, D.F. Increased cerebrospinal fluid cortisol level in Alzheimer's disease is not related to depression. *Neurobiol Aging* **27**, 780 e1-780 e2 (2006).
44. Baker, D.G. et al. Higher levels of basal serial CSF cortisol in combat veterans with posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* **162**, 992-4 (2005).
45. Huitinga, I., Erkut, Z.A., van Beurden, D. & Swaab, D.F. The hypothalamo-pituitary-adrenal axis in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* **992**, 118-28 (2003).
46. Uhr, M., Holsboer, F. & Muller, M.B. Penetration of endogenous steroid hormones corticosterone, cortisol, aldosterone and progesterone into the brain is enhanced in mice deficient for both mdr1a and mdr1b P-glycoproteins. *J Neuroendocrinol* **14**, 753-9 (2002).
47. Rosenberg, G.A., Dencoff, J.E., Correa, N., Jr., Reiners, M. & Ford, C.C. Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation to blood-brain barrier injury. *Neurology* **46**, 1626-32 (1996).
48. Amano, Y., Lee, S.W. & Allison, A.C. Inhibition by glucocorticoids of the formation of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6: mediation by decreased mRNA stability. *Mol Pharmacol* **43**, 176-82 (1993).
49. Mier, J.W. et al. Inhibition of interleukin-2-induced tumor necrosis factor release by dexamethasone: prevention of an acquired neutrophil chemotaxis defect and differential suppression of interleukin-2-associated side effects. *Blood* **76**, 1933-40 (1990).
50. Chaudhuri, A. Adjunctive dexamethasone treatment in acute bacterial meningitis. *Lancet Neurol* **3**, 54-62 (2004).
51. McIntyre, P.B. et al. Dexamethasone as adjunctive therapy in bacterial meningitis. A meta-analysis of randomized clinical trials since 1988. *Jama* **278**, 925-31 (1997).
52. Thwaites, G.E. et al. Dexamethasone for the treatment of tuberculous meningitis in adolescents and adults. *N Engl J Med* **351**, 1741-51 (2004).
53. de Gans, J. & van de Beek, D. Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* **347**, 1549-56 (2002).
54. Beran, O. & Hobstova, J. Pathophysiology and therapy of bacterial meningitis. *Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie* **69**, 360-367 (2005).
55. Picha, D., Moravcova, L., Zdarsky, E. & Benes, J. Clinical comparison of immunoblot and antibody index for detection of intrathecal synthesis of specific antibodies in Lyme neuroborreliosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**, 805-6 (2000).
56. Holub, M., Beran, O., Lacinova, Z., Cinek, O. & Chalupa, P. Interferon-γ and Cortisol Levels in Cerebrospinal Fluid and its Relationship to the Etiology of Aseptic Meningoencephalitis. *Prague Med Rep* **107**, 343-353 (2006).
57. Holub, M. et al. Lymphocyte subset numbers depend on the bacterial origin of sepsis. *Clinical Microbiology and Infection* **9**, 202-211 (2003).
58. Holub, M., Kluckova, Z., Beran, O., Aster, V. & Lobovska, A. Lymphocyte subset numbers in cerebrospinal fluid: comparison of tick-borne encephalitis and neuroborreliosis. *Acta Neurol Scand* **106**, 302-8 (2002).
59. Schwarz, S. & Pohl, P. Steroid hormones and steroid hormone binding globulins in cerebrospinal fluid studied in individuals with intact and with disturbed blood-cerebrospinal fluid barrier. *Neuroendocrinology* **55**, 174-82 (1992).
60. Seckl, J.R. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action. *Curr Opin Pharmacol* **4**, 597-602 (2004).

61. Ho, J.T. et al. Septic shock and sepsis: A comparison of total and free plasma cortisol levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **91**, 105-114 (2006).
62. Kusnecov, A.W. & Goldfarb, Y. Neural and behavioral responses to systemic immunologic stimuli: a consideration of bacterial T cell superantigens. *Curr Pharm Des* **11**, 1039-46 (2005).
63. Hartlage-Rubsamen, M., Lemke, R. & Schliebs, R. Interleukin-1beta, inducible nitric oxide synthase, and nuclear factor-kappaB are induced in morphologically distinct microglia after rat hippocampal lipopolysaccharide/interferon-gamma injection. *J Neurosci Res* **57**, 388-98 (1999).
64. Mickiene, A. et al. Tickborne encephalitis in an area of high endemicity in lithuania: disease severity and long-term prognosis. *Clin Infect Dis* **35**, 650-8 (2002).
65. Drew, P.D. & Chavis, J.A. Inhibition of microglial cell activation by cortisol. *Brain Res Bull* **52**, 391-6 (2000).
66. Dandona, P. et al. Hydrocortisone-induced inhibition of reactive oxygen species by polymorphonuclear neutrophils. *Crit Care Med* **27**, 2442-4 (1999).
67. Waage, A. et al. Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *J Exp Med* **170**, 1859-67 (1989).
68. Simmons, C.P. et al. Pretreatment intracerebral and peripheral blood immune responses in Vietnamese adults with tuberculous meningitis: diagnostic value and relationship to disease severity and outcome. *J Immunol* **176**, 2007-14 (2006).
69. Low, P.S. et al. Inflammatory response in bacterial meningitis: cytokine levels in the cerebrospinal fluid. *Ann Trop Paediatr* **15**, 55-9 (1995).
70. Vermont, C.L., de Groot, R. & Hazelzet, J.A. Bench-to-bedside review: genetic influences on meningococcal disease. *Crit Care* **6**, 60-5 (2002).
71. Prins, J.M. et al. Endotoxin release and cytokine production in acute and chronic meningococcaemia. *Clin Exp Immunol* **114**, 215-9 (1998).
72. Giunti, D. et al. Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS. *J Leukoc Biol* **73**, 584-90 (2003).
73. Mistchenko, A.S., Fornari, M.C., Viegas, M., Barrero, P.R. & Diez, R.A. Detection of interleukin 10 in cerebrospinal fluid of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurovirol* **11**, 66-9 (2005).
74. Suri, D. et al. Non-cytolytic inhibition of hepatitis B virus replication in human hepatocytes. *J Hepatol* **35**, 790-7 (2001).
75. Wang, X., Claflin, J., Kang, H. & Suzuki, Y. Importance of CD8(+)Vbeta8(+) T cells in IFN-gamma-mediated prevention of toxoplasmic encephalitis in genetically resistant BALB/c mice. *J Interferon Cytokine Res* **25**, 338-44 (2005).
76. Glimaker, M., Olcen, P. & Andersson, B. Interferon-gamma in cerebrospinal fluid from patients with viral and bacterial meningitis. *Scand J Infect Dis* **26**, 141-7 (1994).

Přílohy

Příloha 1. Přehledový článek *Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie*

Beran O., Hobstová, J. **Patofyziologie a léčba bakteriální meningitidy**. *Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie* **(69)**, 360-367 (2005).

Příloha 2. Původní článek *Critical Care*

Holub M., Beran O., Džupová O., Hnyková J., Lacinová Z., Příhodová J., Procházka B., Helcl M. **Cortisol Levels in Cerebrospinal Fluid Correlate with Severity and Bacterial Origin of Meningitis**, *Critical Care* (v recenzním řízení).

Příloha 3. Původní článek *Prague Medical Report*

Holub M., Beran O., Lacinová Z., Cinek O. Chalupa P. **Interferon-γ and Cortisol Levels in Cerebrospinal Fluid and its Relationship to the Etiology of Aseptic Meningoencephalitis**. *Prague Medical Report* (**107**), 343-353 (2006).

Příloha 4. Původní článek *Folia Microbiologica*

Holub M., Scheinostová M., Fišerová A., Beran O., Kalmusová J., Musílek M., Křížová P. **Neisseria Meningitidis Strains from Patients with Invasive Meningococcal Disease Differ in Stimulation of Cytokine Production**, *Folia Microbiologica* (v recenzním řízení).

Příloha 5. Původní článek *Clinical Microbiology and Infection*

Holub M., Klučková Z., Helcl M., Příhodová J., Rokyta R., Beran O. **Lymphocyte subset numbers depend on the bacterial origin of sepsis**. *Clinical Microbiology and Infection* **(9)**, 202-211 (2003).

Příloha 6. Původní článek *Acta Neurologica Scandinavica*

Holub M., Klučková Z., Beran O., Aster V., Lobovská A. **Lymphocyte subset numbers in cerebrospinal fluid: comparison of tick-borne encephalitis and neuroborreliosis**. *Acta Neurologica Scandinavica* **(106)**, 302-8 (2002).

Ostatní publikace

Příloha 7. Původní článek *Acta Virologica*

Bartovská Z, Beran O, Rozsypal H, Holub M. **HIV-1-specific CD8+ T cells do not correlate with viral load in HIV-1-positive patients**. *Acta virologica*, v tisku.

Příloha 8. Původní článek *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*

Holub M., Helcl M., Beran O., Příhodová J., Hnyková J. **Kinetics of immune parameters in a patient with sepsis caused by streptococcus pyogenes treated with activated protein C.** *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*; **36** (6-7): 485-88 (2004).

Příloha 9. Původní článek *Acta Virologica*

Beran O., Holub M., Kalanin J., Špála J., Staňková M**. CD38 expression on CD8+ T cells in HIV-positive adults treated by HAART**. *Acta Virologica*; **47**(2):121-4 (2003).

Příloha 10. Seznam publikací, abstrakt a přednášek.

Původní články v tématu disertační práce

Holub M, Beran O, Džupová O, Hnyková J, Lacinová Z, Příhodová J, Procházka B, Helcl M. Cortisol Levels in Cerebrospinal Fluid Correlate with Severity and Bacterial Origin of Meningitis, *Critical Care,* v recenzním řízení (IF 2,93)

Holub M, Scheinostová M, Fišerová A, Beran O, Kalmusová J, Musílek M, Křížová P. Neisseria Meningitidis Strains from Patients with Invasive Meningococcal Disease Differ in Stimulation of Cytokine Production, *Folia Microbiologica,* v recenzním řízení (IF 0,92)

Holub M, Beran O, Lacinová Z, Cinek O, Chalupa P. Interferon-γ and Cortisol Levels in Cerebrospinal Fluid and its Relationship to the Etiology of Aseptic Meningoencephalitis. *Prague Medical Report* 2006; **107**(3), 343-53.

Beran O, Hobstová J. Patofyziologie a léčba bakteriální meningitidy. *Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie* 2005, **68/101** (6), 360–67 (IF 0,04)

Holub M, Klučková Z, Helcl M, Příhodová J, Rokyta R, Beran O. Lymphocyte subset numbers depend on the bacterial origin of sepsis. *Clinical Microbiology and Infection* 2003; **9**: 202-11. (IF 1,8)

Holub M, Klučková Z, Beran O, Aster V, Lobovská A. Lymphocyte subset numbers in cerebrospinal fluid: comparison of tick-borne encephalitis and neuroborreliosis. *Acta Neurologica Scandinavica* 2002; **106**: 302-8 (IF 1,4)

Ostatní původní články

Bartovská Z, Beran O, Rozsypal H, Holub M. HIV-1-specific CD8+ T cells do not correlate with viral load in HIV-1-positive patients. *Acta virologica,* v tisku (IF 0,7)

Holub M, Helcl M, Beran O, Příhodová J, Hnyková J. Kinetics of immune parameters in a patient with sepsis caused by streptococcus pyogenes treated with activated protein C. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2004; **36** (6-7): 485-88 (IF 1,7)

Holub M, Beran O, Kalanin J, Hnyková J, Špála J, Rozsypal H. Antigen CD38 jako ukazatel pro imunologické sledování HIV pozitivních osob. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lékařství* 2004; **10**(5):229-35

Beran O, Holub M, Kalanin J, Špála J, Staňková M. CD38 expression on CD8+ T cells in HIV-positive adults treated by HAART. *Acta Virologica* 2003; **47**(2):121-4 (IF 0,7)

Abstrakty z mezinárodních kongresů

Beran O, Kettnerová M, Džupová O, Herwald H, Janyšková Z, Holub M. Severe Course of Leptospirosis Associated with Elevated Heparin-binding Protein and Reduced TLR2 Expression. International Journal of Infectious Diseases, 2006, 12th ICID International Scientific Exchange Brochure, ISE.142: s.36.

Kettnerová M, Fišerová A, Beran O, Kalmusová J, Musílek M, Křížová P, Holub M. Neisseria meningitidis Isolates from Patients with Invasive Disease Differ in Activation of Monocytes. International Journal of Infectious Diseases, 2006, 12th ICID Abstract Book, 41.026: s.224.

Janyšková Z, Beran O, Kettnerová M, Rozsypal H, Holub M. Frequency of HIV-specific CD8+ T cells in HIV-infected Adults: Czech Prospective Study. International Journal of Infectious Diseases, 2006, 12th ICID Abstract Book, 34.024: s.173.

Beran O, Holub M, Hnyková J, Rozsypal H, Špála J. CD27+ (memory) B cell reduction as an independent marker of progression in HIV-1-infected patients *Clinical Microbiology and Infection* 2005; **11** (Suppl 2): 196.

Beran O, Lawrence DA. Maturation of Human Monocytes In Vitro: Role of Glucocorticoids. *Clinical and Investigative Medicine* 2004; **27**(4): p 90C.

Beran O, Lawrence DA. Drug modulation of Toll-like receptors expression by human macrophages stimulated with lipopolysaccharidde and bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* 2004; **10** (Suppl 3): 366.

Beran O, Holub M, Hnyková J, Rozsypal H, Špála J. Expression of CD38 Antigen on $CD8^+$ T Lymphocytes in HIV-1-Infected Adults: The Czech Prospective Study. *International Journal of Infectious Diseases* 2004; **8** (Suppl 1): 33.

Holub M, Beran O, Hnyková J, Lawrence DA, Džupová O, Lacinová Z. The importance of cytokine and cortisol levels in cerebrospinal fluid as clinical and biological markers of bacterial meningitis. *Clinical Microbiology and Infection* 2004; **10** (Suppl 3): p 370.

Holub M, Beran O, Lawrence DL, Hnyková J, Příhodová J. Activated macrophages in cerebrospinal fluid during acute bacterial meningitis. *Clinical Immunology* 2003; Suppl 1:p 81.

Beran O, Holub M, Kalanin J, Klučková Z, Špála J. Longitudinal study of density of expression of CD38 antigen on CD8+ cells in HIV/AIDS patients treated with HAART. *Clinical Microbiology and Infection* 2002; **8** (Suppl 1): p 217.

Přednášky

Beran O, Hnyková J, Džupová O, Příhodová J, Helcl M, Holub M. Zánětlivé poškození mozku při bakteriální meningitidě: role cytokinů a kortisolu. Sborník abstrakt, 2005, s. 7. Tomáškovy dny, 8.-10.6.2005, Brno, ČR.

Beran O. Imunopatogeneze bakteriálních meningitid. 4. Chebská neurologická konference, 19.-20.11.2004, Františkovy Lázně, ČR.

Beran O, Holub M, Hnyková J, Staňková M, Lobovská A. Role aktivovaných makrofágů v intratekální imunitní odpovědi u bakteriální meningitidy. In: Sborník abstrakt. ČR, Praha, 2003, s. 27-27. 4. studentská vědecká konference 1. LF UK. ČR, Praha, 19.05.2003. Galén.

Beran O, Holub M, Lobovská A, Klučková Z, Aster V. Analýza lymfocytárních subpopulací v mozkomíšním moku u neuroboreliózy a klíšťové meningoencefalitidy. Mezioborový kongres infekčních nemocí.7.-9.1.2002, Třeboň.

Beran O, Holub M, Lobovská A, Klučková Z. Lymfocytární subpopulace v mozkomíšním moku a periferní krvi u serózních meningitid. 1. Studentská vědecká konference 1. LF UK, 3.-4.10.2000, Praha.