

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta



**ROLE IMUNITNÍ ODPOVĚDI V PATOFYZIOLOGII
INFEKČNÍ MENINGITIDY**

Autoreferát disertační práce

MUDr. Ondřej Beran

Praha 2007

Disertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu v biomedicíně na III. klinice infekčních a tropických nemocí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Autor: MUDr. Ondřej Beran

Školitel: Doc. MUDr. Michal Holub, Ph.D.

Adresa: III. klinika infekčních a tropických nemocí 1.LF UK a FN Na Bulovce
Budínova 2
Praha 8, 180 81

Oborová rada: Fyziologie a patofyziologie člověka

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne.....

Obhajoba disertace se koná dne.....v.....hodin
před komisí pro obhajoby disertačních prací.

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 1. LF UK,
Kateřinská 32, Praha 2.

Předseda komise pro obhajobu
Prof. MUDr. Stanislav Trojan, DrSc.
Fyziologický ústav 1. LF UK
Albertov 5
Praha 2, 121 08

Obsah

1. ÚVOD	3
2. CÍLE PRÁCE	6
3. METODY	7
3.1. PŘIROZENÁ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ U PACIENTŮ S BAKTERIÁLNÍ MENINGITIDOU	7
3.2. STUDIE IMUNOSTIMULAČNÍHO POTENCIÁLU KMENŮ <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> ZÍSKANÝCH OD PACIENTŮ S INVAZIVNÍM MENINGOKOKOVÝM ONEMOCNĚNÍM.....	7
3.3. ADAPTIVNÍ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ U PACIENTŮ S BAKTERIÁLNÍ MENINGITIDOU	8
3.4. ADAPTIVNÍ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ U PACIENTŮ S ASEPTICKOU MENINGITIDOU	8
4. VÝSLEDKY	8
4.1. PŘIROZENÁ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ U PACIENTŮ S BAKTERIÁLNÍ MENINGITIDOU	8
4.2. STUDIE IMUNOSTIMULAČNÍHO POTENCIÁLU KMENŮ <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> ZÍSKANÝCH OD PACIENTŮ S INVAZIVNÍM MENINGOKOKOVÝM ONEMOCNĚNÍM.....	12
4.3. ADAPTIVNÍ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ U PACIENTŮ S BAKTERIÁLNÍ MENINGITIDOU	12
4.4. ADAPTIVNÍ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ U PACIENTŮ S ASEPTICKOU MENINGITIDOU	13
5. DISKUZE	16
SOUHRN	20
SUMMARY	21
PŘEHLED PUBLIKAČNÍ AKTIVITY	23
PŮVODNÍ ČLÁNKY V TÉMATU DISERTAČNÍ PRÁCE	23
OSTATNÍ PUBLIKACE.....	23
ABSTRAKTY Z MEZINÁRODNÍCH KONGRESŮ	23
GRANTOVÉ PROJEKTY	24
SEZNAM ZKRATEK	24
VYBRANÁ LITERATURA	25

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 spolehlivé¹. 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 časně fázi onemocnění²⁻⁵.

BM patří celosvětově mezi deset nejčastěji smrtících infekčních onemocnění⁶. Incidence BM v České republice se v posledním desetiletí pohybuje na přibližně stejné úrovni představující 2-3 případy na 100 000 obyvatel ročně⁷. 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 pacientů¹⁰. 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*. Rovněž je patrný postupný pokles incidence invazivních hemofilových onemocnění (včetně BM) po zavedení celoplošné vakcinace u dětí v r. 2001⁷.

Incidence AM je v České republice významně vyšší než v případě BM, nicméně její průběh je nejčastěji mírný, i bez léčby dochází většinou k uzdravě. Přesto mají tyto

infekce CNS velký zdravotnický význam vzhledem k jejich potenciálně fatálním následkům a dlouhodobým neurologickým i psychiatrickým komplikacím. Nejčastějším prokazovaným etiologickým agens vyvolávajícím AM je u nás virus klíšťové meningoencefalitidy (KM). K dalším častým agens patří *Borrelia burgdorferi*, 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 AM¹².

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 mechanismů, které provázejí tyto závažné infekce. Úroveň znalostí patogeneze a patofyziologie IM se během posledních několika desetiletí významně zvýšila. Lépe jsou známy například mechanismy, jakými patogeny kolonizují hostitele a pronikají do subarachnoideálního prostoru (SAP). Rovněž byla objevena řada nových faktorů virulence, které hrají roli v prolomení obranných mechanismů 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. 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 hematoencefalickou bariéru a intratekálně pak probíhá specifická a nespecifická imunitní reakce^{13,14}. 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. Prostor mezi arachnoideou a pia mater je vyplněn MM, který je vytvářen zejména choriodeálním plexem mozkových komor. 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.

2. Cíle práce

Cílem této disertační práce bylo objasnit úlohu některých důležitých aspektů přirozené i adaptivní imunity při IM. Celkem byly provedeny čtyři klinické studie u pacientů s IM, které byly doplněny experimentální *in vitro* studií.

Předpokládali jsme, že v průběhu IM dochází k výraznému nahromadění aktivovaných leukocytů v intratekálním prostoru 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 vplynuly následující cíle:

- Cíl 1.** Provést fenotypizaci M ϕ 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. Etiologická diagnóza byla provedena na základě pozitivního kultivačního nálezu v MM a/nebo krvi nebo pomocí PCR. V séru a MM byly kromě běžných laboratorních vyšetření stanoveny koncentrace kortizolu a zánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 a TNF- α . V likvoru byla rovněž vyšetřena povrchová exprese HLA-DR na M Φ pomocí průtokové cytometrie. 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

Použité kmeny *N. meningitidis* byly izolované od pacientů s různým klinickým průběhem invazivní meningokokového onemocnění (IMO) Charakteristiky kmenů *N. meningitidis* a klinické parametry příslušných pacientů jsou shrnuty v tab. 1. Před experimenty byly bakterie inaktivovány při 70 °C po dobu 40 minut a připravena suspenze v médiu RPMI 1640 v koncentraci 10⁶ CFU (colony-forming units)/ml. Vzorky plné krve od zdravých dárců aktivované kmeny *N. meningitidis* byly inkubovány 6 hodin při 37 °C. Následně byly ve vzorcích stanoveny koncentrace zánětlivých cytokinů a lipooligosacharidu (LOS).

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		Mozkomíšni mok			
	Věk roky	Sex	APACHE	SOFA body	GCS body	nástup	Klinická diagnóza	Výsledek	CRP mg/l	Leuko buňky/mm ³	Leuko buňky/mm ³	Protein g/l	Glukóza mmol/l
137/05 séro skupina 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 + sepsis	příznivý	271	20700	7253	2,68	1,86
285/05 séro skupina B (B:1:NST; ST-41/44/Lineage 3 complex) VR1: 7.II, VR2: 14, VR3: 35	19	M	10	4	11	8	meningitida + sepsis	příznivý	165	16700	3840	2,8	1,6
113/04 séro skupina B (B:22:P1.14; ST-18 HC) VR1: 22, VR2: 14, VR3: 36	14	Ž	25	12	14	9(10)	fulminantní meningokoková sepsis	úmrtí	102	2700	5	0,23	3,1

NM, *Neisseria meningitidis*; HC, hypervirulentní komplex; IMO, invazivní meningokokové onemocnění; Ž, žena; M, muž; APACHE, Acute Physiologic Health Evaluation; SOFA, Sepsis Organ Failure Assessment; 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 s diagnózou AM. Do skupiny pacientů s KM bylo zařazeno 42 pacientů, skupina pacientů s lymeskou borreliózou zahrnovala 9 pacientů. V likvoru byla provedena imunofenotypizace lymfocytárních subpopulací.

Do druhé prospektivní studie bylo zařazeno 37 pacientů s AM. Kromě základních diagnostických metod bylo využito metod PCR k průkazu RNA enterovirů, viru KM a herpetických virů¹⁵. V likvoru byly změřeny koncentrace kortizolu a cytokinů IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ a TNF- α .

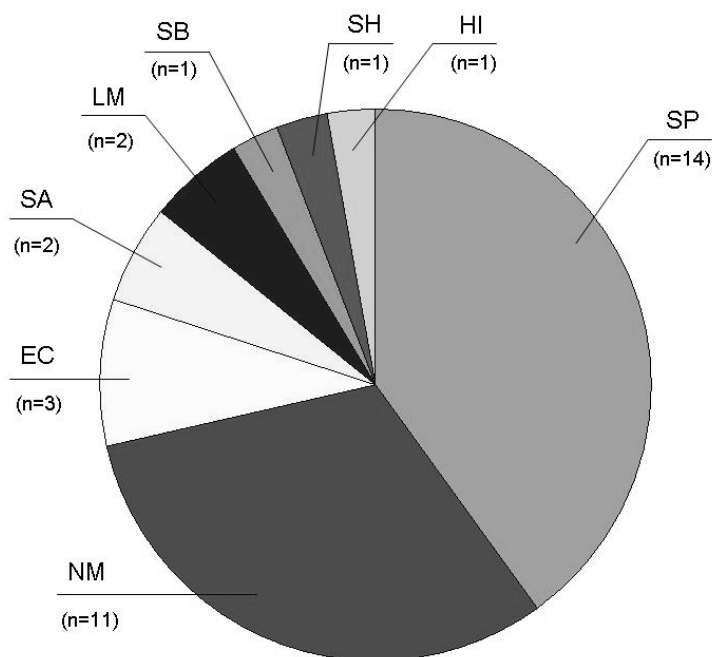
4. Výsledky

4.1. Přirozená imunitní odpověď u pacientů s bakteriální meningitidou

Ze sledované skupiny 47 pacientů s BM jich celkem 36 (77 %) přežilo BM bez následků, u 4 nemocných (8 %) BM zanechala trvalé následky a 7 pacientů (15 %) BM podlehl. 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. 1.

Výsledky rutinního cytologického a biochemického vyšetření v séru a likvoru u pacientů s BM jsou uvedeny v tab.2. V rámci studie bylo zjištěno, že v likvoru pacientů s BM jsou významně přítomny M ϕ , které byly definovány jako CD45+ buňky s charakteristickou granularitou. Dalším zjištěním bylo, že M ϕ v likvoru ve zvýšené míře exprimují na svém povrchu molekuly HLA-DR. Tato exprese negativně korelovala s tíží průběhu BM vyjádřené skórem SOFA ($r = -0,928$, $P < 0,02$).

Obr. 1. 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. 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)

Srovnání koncentrací kortizolu a cytokinů v likvoru u pacientů s AM a BM je uvedeno v tab. 3.

Tab. 3. 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-1 β (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

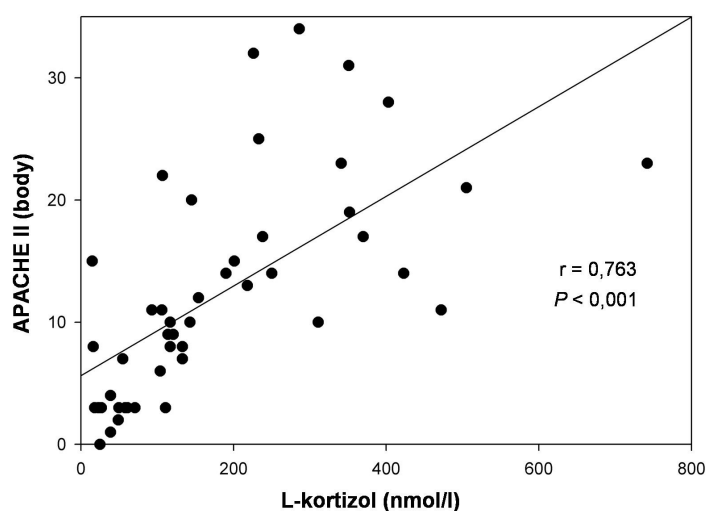
Data jsou prezentována jako median (dolní kvartil - horní kvartil)

*Bakteriální meningitida (BM) vs. aseptická meningitida (AM), Mann-Whitney *U* test

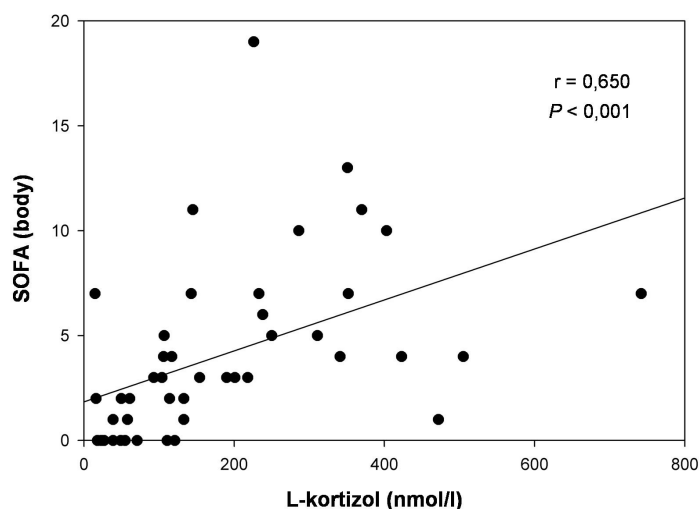
n.a., nebylo analyzováno

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-1 β , IL-6, IL-10 a TNF- α vykazaly významně vyšší koncentrace v MM oproti sérovým hodnotám. Z prokázaných korelací je zajímavý zejména vztah kortizolu v MM ke skóre APACHE II ($r = 0,763$, $p < 0,001$; obr. 2), SOFA ($r = 0,65$, $p < 0,001$; obr. 3) a GCS ($r = -0,547$, $p = 0,001$). V případě koncentrací cytokinů v séru a MM nebyla prokázána korelace s tíží průběhu.

Obr. 2. Vztah koncentrace kortizolu v likvoru (L) a tíže průběhu bakteriální meningitidy vyjádřené skórem APACHE II

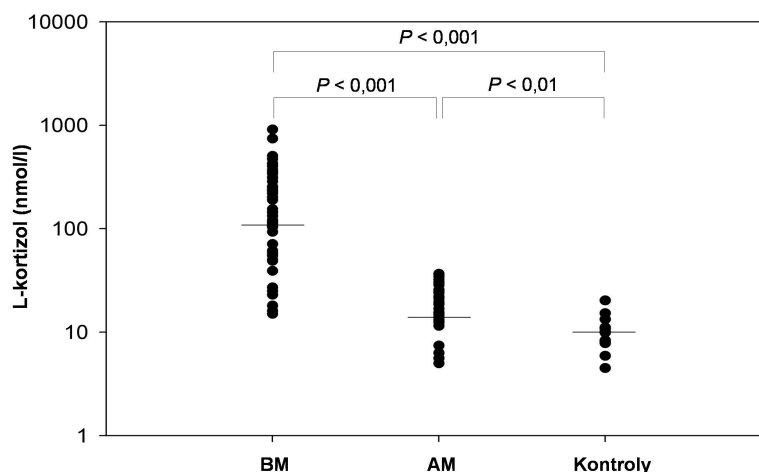


Obr. 3. Vztah koncentrace kortizolu v likvoru (L) a tíže průběhu bakteriální meningitidy vyjádřené skórem SOFA



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. 4).

Obr. 4. 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 %.

Uvedené výsledky byly zpracovány jako rukopis, který je v současné době v recenzním řízení v časopise *Critical Care*. Dále byly prezentovány na tuzemských i zahraničních konferencích. Data skupiny pacientů s AM byla publikována v časopise *Prague Medical Report*¹⁵.

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. 4. Mezi testovanými kmeny byly signifikantní rozdíly v indukcii IL-1 β , IL-6, IL-10 a TNF- α .

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.

Tab. 4. 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-1 β (pg/ml)		IL-6 (pg/ml)		IL-8 (pg/ml)		IL-10 (pg/ml)		TNF- α (pg/ml)		LOS (EU/ml)	
	IMO	<i>in vitro</i>	IMO	<i>in vitro</i>	IMO	<i>in vitro</i>	IMO	<i>in vitro</i>	IMO	<i>in vitro</i>	IMO	<i>in vitro</i>
285/05	0	8638 \pm 1280 ^{1,2}	3870	59579 \pm 20561 ^{1,2}	0	29822 \pm 14898	3105	1438 \pm 2145	0	11875 \pm 4217 ^{1,2}	0.5	80.6 \pm 17.5 ²
137/05	0	1518 \pm 1472 ³	3400	12105 \pm 10970 ³	154	28458 \pm 13576	113	33 \pm	0	2671 \pm 1332 ³	0.5	26.3 \pm 7.4 ³
113/04	5458	6046 \pm 931	810046	41233 \pm 14929	189105	26834 \pm 11618	26086	597 \pm 1428	0	7769 \pm 2499	125	65.1 \pm 17.5

NM, *Neisseria meningitidis*; IMO, invazivní meningokokové onemocnění; LOS, lipooligosacharid, EU, endotoxin unit

¹285/05 vs. 137/05, ²285/05 vs. 113/04, ³137/05 vs. 113/04, vše p < 0,01

Grampozitivní BM (n=10), která byla převážně vyvolána *S. 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*¹⁶.

4.4. Adaptivní imunitní odpověď u pacientů s aseptickou meningitidou

Klinická studie u pacientů s aseptickou meningitidou I

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

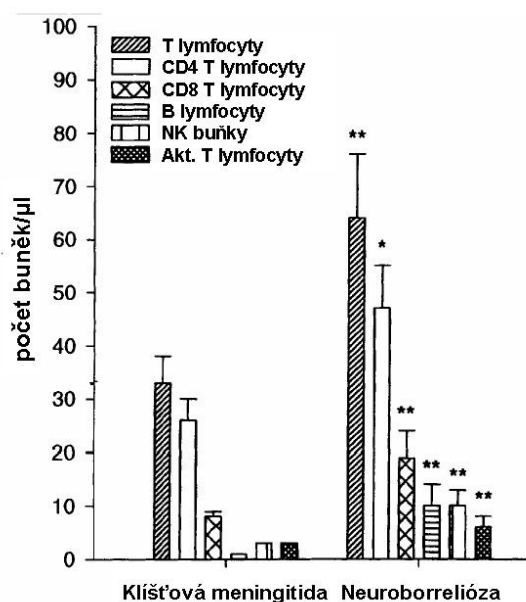
U pacientů s neuroborreliózou korelovala koncentrace bílkoviny v MM s absolutním počtem lymfocytů ($r = 0,87$, $p < 0,01$), T lymfocytů ($r = 0,78$, $p < 0,01$), CD4 T lymfocytů ($r = 0,81$, $p < 0,01$) a aktivovaných T lymfocytů ($r = 0,78$, $p < 0,01$) v MM. Podobně byla rovněž u pacientů s KM nalezena 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*¹⁷.

Klinická studie pacientů s aseptickou meningitidou II

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/HHV-7. RNA viru KM se nepodařilo prokázat v žádném vzorku MM.

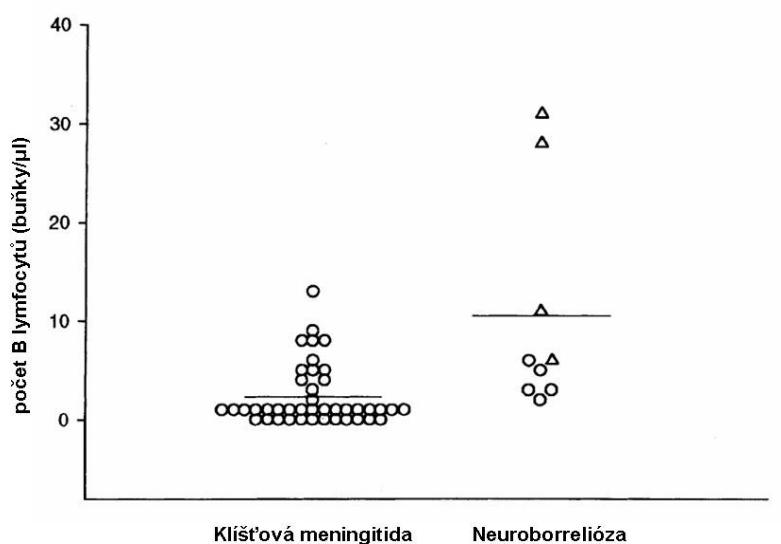
Obr. 5. Srovnání počtů lymfocytárních subpopulací u pacientů s klíšťovou meningoencefalitidou a neuroborreliózou



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

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 ($117,5 \pm 15,9$ vs. $226,4 \pm 59,5$ 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.

Obr. 6. Srovnání počtů B lymfocytů u pacientů s klíšťovou meningoencefalitidou a neuroborreliózou a vliv zvýšené produkce protilátek proti *B. burgdorferi*



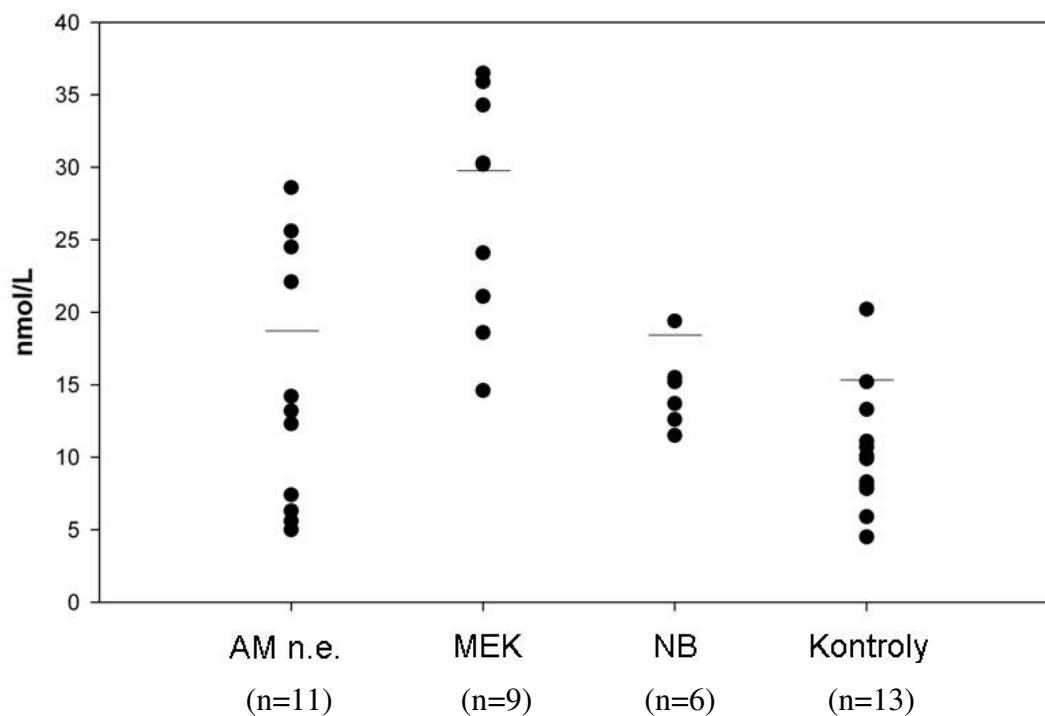
Trojúhelník označuje počty B lymfocytů u pacientů s pozitivitou IgG protilátek proti *B. burgdorferi* v mozkomíšním moku.

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 $18,6 \pm 1,5$ nmol/l. Jak je dokumentováno na obr. 7, intratekální hladina kortizolu u pacientů s KM byla $27,3 \pm 2,7$ nmol/l, což je koncentrace vyšší než u pacientů s AM neznámé etiologie ($14,9 \pm 2,7$ nmol/l; $p < 0,01$), pacientů s neuroborreliózou ($14,7 \pm 1,1$ nmol/l; $p < 0,01$) i kontrolní skupiny ($10,4 \pm 1,2$ 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 ($r = 0,65$, $p = 0,05$).

Tato data byla v r. 2006 publikována jako článek v časopise *Prague Medical Report*¹⁵ a byla rovněž prezentována v přednáškách na odborných konferencích.

Obr. 7. Porovnání koncentrací kortizolu v likvoru u klíš'ové meningo-encefalitidy (MEK), neuroborreliózy (NB), aseptické meningitidy nezjištěné etiologie (AM n.e.) a kontrolní skupiny



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 M ϕ 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 tíží průběhu

onemocnění, silnější než v případě jeho sérových koncentrací. Tento nálezn 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^{18,19}. 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 hematoencefalickou bariéru²⁰. 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 mechanismem, 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 mechanismus může být při zánětu narušen²¹. Další mechanismus, který by se mohl uplatňovat při zvýšení kortizolu v CNS, je *de novo* produkce kortizolu pomocí enzymu 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázy typu 1²². 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 %²³. 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 aktivoval²⁴. HHA osa je stimulována IL-1 β , který však může být produkován buňkami mikroglie po aktivaci IFN- γ ²⁵.

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 parietických komplikací při tomto onemocnění je negativně ovlivněn léčbou kortikosteroidy²⁶. V experimentální studii u králíků dexamethazon indukoval apoptózu neuronů v hipokampu²⁷. 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 mikroglie²⁸. Kortizol může rovněž snížit produkci ROS neutrofilů, které tvoří největší populaci zánětlivých buněk při BM²⁹.

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 neuroinfekci³⁰. 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 AM². 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 metabolismus 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 meningitidy³¹. Low et al. zjistili, že jediné cytokiny v MM asociované s klinickými komplikacemi BM jsou TNF- α a IL-1 β , podobně korelace s tíží onemocnění byla prokázána v případě IL-1 β u meningokokové meningitidy^{30,32}. 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 pacienta³³. Prins et al. dokumentovali nižší produkci IL-6 po stimulaci kmenem *N. meningitidis* od pacienta s lehčím IMO než kmenem od pacienta se septickým šokem³⁴. V naší experimentální studii byly naopak nejvyšší hladiny IL-1 β , 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 al., 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 mechanismů. Mezi necytolytické mechanismy patří právě produkce IFN- γ CD4 buňkami s Th1 fenotypem, které jsou predominantní subpopulací v MM během zánětlivého procesu v CNS³⁵. Aktivace Th1 buněk může být inhibována protizánětlivými mediátory, např. IL-10 a kortizolem³⁶. Pro tento mechanismus 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 mechanismů, podobně jako například při kontrole virové replikace u virové hepatitidy³⁷. 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^{17,35}. 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 myši s experimentální infekcí CNS *Toxoplasma gondii*³⁸. 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 neprokázali³⁹. 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 mechanismů, 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-1 β , 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 gram pozitivní etiologie při srovnání s gram negativními meningitidami.

Summary

CNS infections continue to be associated with a high morbidity and mortality. Thus, it is necessary 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-1 β) 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 discrimination 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.

Přehled publikační aktivity

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 publikace

- 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.142:36.
- 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, 41.026:224.
- 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, 34.024:173.

- 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 lipopolysaccharide 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: 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.

Grantové projekty

Hlavní řešitel

Vliv glukokortikoidů na intratekální imunitní odpověď u infekční meningitidy, GAUK

Spoluřešitel

Význam funkčních subtypů HIV-specifických CD8 T-lymfocytů v patogenezi HIV infekce, GAUK
 Role nadměrné zánětlivé odpovědi v poškození mozku při bakteriální meningitidě a možnosti její modulace, IGA MZ ČR

Analýza klinického stavu a imunitních funkcí u HIV+ pacientů bez dlouhodobé progresse a u pacientů nereagujících odpovídajícím způsobem na stávající léčbu, se snahou o stanovení korelátu imunity v evoluci HIV infekce, IGA MZ ČR

Dopad HAART na klinický a imunologický stav HIV+ jedincům, IGA MZ ČR

Klinické a laboratorní sledování imunitních funkcí u HIV/AIDS pacientů léčených HAART, IGA MZ ČR

Brain damage by macrophages during infectious meningitis, National Institutes of Health - Fogarty International Center, USA

Seznam zkratek

AM – aseptická meningitida

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

BM – bakteriální meningitida

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
EBV – Epstein-Barrová virus
GCS – Glasgow Coma Scale
HHA – hypothalamo-hypofýzo-adrenální osa
HHV – Human herpes virus
HSV – Herpes simplex virus
IFN – interferon
IM – infekční meningitida
IL – interleukin
IMO – invazivní meningokokové onemocnění
KM – klíšťová meningoencefalitida
LOS – lipooligosacharid
MM – mozkomíšní mok
M ϕ – makrofágy
NK – natural killer (přirozený zabíječ)
RIA – radioimmunoassay
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)

Vybraná 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. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) **14**, 54 (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. 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).
13. 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*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 7-22 (1997).
14. Kim, K.S. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* **4**, 376-85 (2003).
15. 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).
16. Holub, M. et al. Lymphocyte subset numbers depend on the bacterial origin of sepsis. *Clinical Microbiology and Infection* **9**, 202-211 (2003).
17. 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).
18. Huitinga, I., Erkut, Z.A., van Beurden, D. & Swaab, D.F. The hypothalamo-pituitary-adrenal axis in multiple sclerosis. *Ann NY Acad Sci* **992**, 118-28 (2003).
19. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511 (2004).
20. 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).
21. 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).
22. Seckl, J.R. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action. *Curr Opin Pharmacol* **4**, 597-602 (2004).
23. 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).
24. 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).
25. Hartlage-Rubsamen, M., Lemke, R. & Schliebs, R. Interleukin-1 β , 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).
26. 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).
27. 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).
28. Drew, P.D. & Chavis, J.A. Inhibition of microglial cell activation by cortisol. *Brain Res Bull* **52**, 391-6 (2000).
29. Dandona, P. et al. Hydrocortisone-induced inhibition of reactive oxygen species by polymorphonuclear neutrophils. *Crit Care Med* **27**, 2442-4 (1999).

30. 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).
31. 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).
32. Low, P.S. et al. Inflammatory response in bacterial meningitis: cytokine levels in the cerebrospinal fluid. *Ann Trop Paediatr* **15**, 55-9 (1995).
33. Vermont, C.L., de Groot, R. & Hazelzet, J.A. Bench-to-bedside review: genetic influences on meningococcal disease. *Crit Care* **6**, 60-5 (2002).
34. Prins, J.M. et al. Endotoxin release and cytokine production in acute and chronic meningococcaemia. *Clin Exp Immunol* **114**, 215-9 (1998).
35. 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).
36. 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).
37. Suri, D. et al. Non-cytolytic inhibition of hepatitis B virus replication in human hepatocytes. *J Hepatol* **35**, 790-7 (2001).
38. 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).
39. 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).