

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Anamarija Čavčić

**Kemokini CXCL10 i CXCL11 u patogenezi
enterovirusnoga meningitisa**

DISERTACIJA



Zagreb, 2015.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Anamarija Čavčić

**Kemokini CXCL10 i CXCL11 u patogenezi
enterovirusnoga meningitisa**

DISERTACIJA

Zagreb, 2015.

**UNIVERSITY OF ZAGREB
SCHOOL OF MEDICINE**

Anamarija Čavčić

**Chemokines CXCL10 and CXCL11 in the
pathogenesis of enteroviral meningitis**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015.

Disertacija je izrađena u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu

Voditelji rada: Izv. prof. dr. sc. Goran Tešović, dr.med.

Dr.sc. Snježana Židovec Lepej, dipl. ing., znanstveni savjetnik

Zahvaljujem voditeljima rada prof.dr.sc.Goranu Tešoviću i dr.sc.Snježani Židovec Lepej na stručnom vodstvu te profesionalnoj podršci tijekom izrade doktorske disertacije, kao i prof.dr.sc.Vladimiru Trkulji na uloženom trudu i znatnoj pomoći oko izrade dijela disertacije vezanog uz statističku analizu podataka i prikaz rezultata.

Također zahvaljujem prim.dr.sc. Ireni Ivković-Jureković na vrijednim savjetima, podršci i razumijevanju.

Doktorat s ljubavlju namjenjujem svojoj obitelji.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. ASEPTIČNI MENINGITIS UZROKOVAN NON POLIO ENTEROVIRUSIMA	1
1.2. OSOBITOSTI I PODJELA NPEV	1
1.3. BOLESTI UZROKOVANE ENTEROVIRUSIMA	5
1.3.1. Nespecifična febrilna bolest.....	5
1.3.2. Bolest šaka-stopala-usta (engl. Hand-foot-mouth disease; HFMD).....	5
1.3.3. Herpangina.....	6
1.3.4. Bolesti dišnog sustava.....	7
1.3.5. Akutni hemoragijski konjuktivitis	7
1.3.6. Miokarditis i perikarditis.....	8
1.3.7. Bolesti probavnog sustava	8
1.3.8. Generalizirana bolest novorođenčadi.....	9
1.4. BOLESTI SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA UZROKOVANE ENTEROVIRUSIMA.....	10
1.4.1. Aseptični meningitis	10
1.4.2. Encefalitis	12
1.4.3. Mlohava kljenut	13
1.4.4. Mikrobiološka dijagnostika enterovirusa.....	14
1.5. TERAPIJA ENTEROVIRUSNIH BOLESTI.....	15
1.6. IMUNOLOŠKO PREPOZNAVANJE.....	16
1.6.1. Citokini	16
1.6.2. Značajke i fiziološki tijek imunoreakcije.....	19
1.6.3. Osobitosti imunoloških reakcija u dječjoj dobi	25
1.6.4. Imunološki nadzor krvno moždane barijere	28
1.6.5. Uloga kemokina u upalnim bolestima središnjeg živčanog sustava.....	32
1.7. STUDIJE O EKSPRESIJI KEMOKINA U UPALNIM BOLESTIMA SŽS-a.....	39
2. HIPOTEZA	47
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	48

4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA.....	49
4.1. Ispitanici	49
4.2. Biološki uzorci.....	50
4.3. Popis reagensija i otopina.....	51
4.4. Instrumenti, računalni program i potrošni materijal	52
4.5. Metode istraživanja.....	53
4.5.1. Detekcija enterovirusne RNA metodom PCR-a u stvarnom vremenu	53
4.5.2. Kvantifikacija CXCL10 i CXCL11 u serumu i CSL-u.....	54
4.5.3. Imunofenotipizacija limfocitnih subpopulacija CSL-a.....	56
4.6. Statistička analiza podataka.....	60
5. REZULTATI.....	63
5.1. Svojstva ispitanika oboljelih od NPEV AM i kontrolnih ispitanika	63
5.1.1. Analiza demografskih podataka.....	63
5.1.2. Analiza kliničkih podataka	63
5.1.3. Analiza laboratorijskih podataka	65
5.1.3.1. Izabrani laboratorijski nalazi seruma i CSL-a u ispitanika oboljelih od NPEV AM i kontrolne skupine.....	65
5.1.3.2. Analiza koncentracije kemokina CXCL10 i CXCL11 u serumu i CSL-u ispitanika oboljelih od NPEV AM i kontrolne skupine	69
5.2. Usporedba ispitanika NPEV AM skupine i ispitanika kontrolne skupine u pogledu broja stanica u CSL-u te odnos likvorske koncentracije CXCL10 i CXCL 11 i broja stanica	71
5.3. Koncentracije kemokina CXCL10 i CXCL11 u serumu i CSL-u te CSL-serum gradijent kao prediktori trajanja hospitalizacije u skupini ispitanika oboljelih od NPEV AM (mjera tijeka/težine bolesti)	75
5.4. Analiza limfocitnih subpopulacija CSL-a metodom protočne citometrije.....	76
6. RASPRAVA.....	77
7. ZAKLJUČAK	93
8. SAŽETAK.....	95
9. SUMMARY	96

10. POPIS CITIRANE LITERATURE.....	97
11. ŽIVOTOPIS.....	106
12. POPIS KRATICA.....	108

1. UVOD

1. 1. ASEPTIČNI MENINGITIS UZROKOVAN NON POLIO ENTEROVIRUSIMA

Aseptični meningitis (AM) je upalni proces koji zahvaća moždane ovojnice, a najčešće je uzrokovan virusima.^{1, 2} Za postavljanje dijagnoze AM, potrebni su sljedeći dijagnostički kriteriji: (1) akutni početak bolesti s jasno prisutnim simptomima meningealnog podražaja; (2) pleocitoza u cerebrospinalnom likvoru (CSL-u); (3) negativna bakteriološka kultura CSL-a; (4) kratko trajanje i benigni tijek bolesti i (5) odsutnost lokalnih parameningealnih infekcija (otitis, sinusitis) ili generalizirane bolesti u kojoj se meningitis razvija kao sekundarna manifestacija.^{1, 2}

AM je najčešća klinička manifestacija enterovirusne (EV) infekcije središnjega živčanog sustava (SŽS-a).³ Iako je AM po prvi puta opisan tijekom epidemije poliomijelitisa, aktivna imunizacija (AI) protiv ove bolesti iskorijenila je poliomijelitis iz gotovo svih zemalja svijeta, tako da je AM danas posljedica infekcije tzv. non polio enterovirusima (NPEV).^{3, 4, 5}

Od svih AM u dječjoj dobi kojima se uspije utvrditi etiologija, 85% uzrokovano je NPEV.⁶

1.2. OSOBITOSTI I PODJELA NPEV

NPEV pripadaju porodici *Picornaviridae*.⁷ To su mali, inkapsulirani virusi, promjera oko 30 nm, kojima je genetski materijal jednostruka, pozitivno orijentirana RNA veličine oko 7500 baza koja je ujedno i informacijska RNA te uključuje tri genomska područja (P1-P3), od kojih se P1 smatra odgovornim za kodiranje strukturnih proteina kapside (VP1-VP4).⁸ Kapsida virusa je ikozaedarska i sastavljena je od četiri različita polipeptida VP1, VP2, VP3 i VP4.⁸ Proteini kapside (osobito V1) važni su u određivanju serotipne specifičnosti virusa. Svi polipeptidi osim polipeptida VP4 nalaze se na vanjskoj strani ovojnice. *Picornaviridae* nemaju vanjsku lipidnu ovojnicu te su otporni na organska otapala.⁹

Izvorno su enterovirusi (EV) bili podijeljeni u četiri grupe (Coxsackie A, Coxsackie B, Echoviruse i Polioviruse).¹⁰ Zbog značajnog filogenetskog preklapanja, ali i izolacije novih serotipova virusa, EV su reklasificirani, te su prema najnovijoj klasifikaciji Međunarodnog odbora za taksonomiju virusa (eng. International Committee on the Taxonomy of Viruses; ICTV) prihvaćenoj 2014.g. podijeljeni u devet grupa (EV A-J).^{11,12}

Za humanu patologiju važne su prve četiri grupe virusa (EV A-D):¹¹

EV A - 25 serotipova [coxsackievirus (CV A2, CV A3, CV A4, CV A5, CV A6, CV A7, CV A8, CV A10, CV A12, CV A14, CV A16), enterovirus (EV A71, EV A76, EV A89, EV A90, EV A91, EV A92, EV A114, EV A119, EV A120, EV A121), simian enterovirus SV19, SV43, SV46, majmunski enterovirus A13 (BA13)]

EV B - 63 serotipa [coxsackievirus (CV B1, CV B2, CV B3, CV B4, CV B5, CV B6, CV A9), echovirus (E 1, E 2, E 3, E 4, E 5, E 6, E 7, E 8, E 9, E 11, E 12, E 13, E 14, E 15, E 16, E 17, E 18, E 19, E 20, E 21, E 24, E 25, E 26, E 27, E 29, E 30, E 31, E 32, E 33), enterovirus (EV B69, EV B73, EV B74, EV B75, EV B77, EV B78, EV B79, EV B80, EV B81, EV B82, EV B83, EV B84, EV B85, EV B86, EV B87, EV B88, EV B93, EV B97, EV B98, EV B100, EV B101, EV B106, EV B107, EV B110, EV B111, EV B112, EV B113) majmunski (simian) enterovirus (S A5)]

EV C - 23 serotipa [poliovirus (PV 1, PV 2, PV 3), coxsackievirus (CV A1, CV A11, CV A13, CV A17, CV A19, CV A20, CV A21, CV A22, CV A24), enterovirus (EV C95, EV C96, EV C99, EV C102, EV C104, EV C105, EV C109, EV C113, EV C116, EV C117, EV C118)].

EV D - 5 serotipova EV D68 (prijašnji Rhinovirus 87), enterovirus (EV D70, EV D94, EV D111, EV D120).

Od porodice Picornaviridae, osim navedenih grupa enterovirusa, za čovjeka su važni i Parechovirusi (Parechovirus A – nekadašnji Echovirus 22 i 23, te Parechovirus B).^{11,12}

Neurovirulenciju pokazuju samo neki NPEV; echovirusi (E 4, E 5, E 6, E 7, E 9, E 11, E 13, E 18, E 30), coxsackievirusi (CV A9, CV B2, CV B4, CV B5).¹³

CV mogu uzrokovati težu bolest i mortalitet, osobito kod mlađe djece. Infekcija CV tijekom trudnoće povezuje se s povećanom incidencijom spontanih pobačaja i usporenim neurorazvojem novorođenčadi.¹⁴

Echovirusi (ECHO ili prema najnovijoj klasifikaciji E) su primarno izolirani iz fecesa asimptomatskih bolesnika, no kasnije su prepoznati kao virusi koji mogu uzrokovati različite bolesti, uključujući i AM. Iako visoko infektivni, od ovih virusa većinom obolijevaju dojenčad i mala djeca s kliničkom slikom blage, nespecifične bolesti.¹⁴

Od četiri novoizdvojena EV označena samo rednim brojem (68-71), tri su patogena za čovjeka (68, 70 i 71). EV 68 izoliran je iz orofarinksa djece koja su bolovala od pneumonije i bronhiolitisa. EV 70 izoliran je za vrijeme pandemije akutnog hemoragičnog konjuktivitisa u razdoblju od 1969.g. do 1971.g. EV 71 je prvi put izoliran iz mozga bolesnika umrlog od encefalitisa, a naknadno i kod osoba oboljelih od meningitisa te bolesti šaka-stopala-usta.¹⁴

NPEV su endemični u svim krajevima svijeta. U umjerenome klimatskom području, bolesti koje izazivaju NPEV pa tako i AM, najčešće se javljaju u toplijem dijelu godine, tijekom ljeta i rane jeseni.^{7,15} Bolest se može javiti sporadično ili u obliku manjih i većih epidemija. Za izdvojiti su EV epidemije uzrokovane EV 71 u Europi (Bugarska 1975.g., Mađarska 1978.g.) te u posljednjih desetak godina u zemljama Azije i Pacifika, obilježene brojnim kroničnim posljedicama i smrtnim ishodom.^{16,17}

Prema novijim istraživanjima, težina i učestalost infekcije ne ovise samo o socioekonomskom statusu, godišnjem dobu ili klimatskim uvjetima, već i o karakteristikama oboljele osobe (dob, spol, stanični membranski receptori), uključujući i imunološki status.^{15,17, 18}

NPEV se prenosi feko-oralnim putem, a značajno rjeđe kapljično.³ Inkubacija traje od dva dana do dva tjedna, najčešće tri do pet dana. Iako se dio replikacije virusa odvija u epitelu nazofarinksa i lokalnim limfnim čvorovima, najveći se dio infekcijskog inokuluma proguta. Kako su NPEV acidorezistentni mikroorganizmi, oni prolaze želučanu barijeru i dospijevaju u crijevo.^{14,15,17} Stanične površinske makromolekule uključujući receptor poliovirusa (PVR), unutarstaničnu adhezijsku molekulu-1 (eng. Intercellular adhesion molecule 1; ICAM-1) ili

CD55 (eng. Decay accelerating factor; DAF) omogućuju vezanje enterovirusa za površinu ciljane stanice.^{7,15,19} Pri tome se pokreću promjene u kapsidi virusa koje omogućuju ulazak virusa u stanicu domaćina, oslobađanje virusne RNA u citoplazmi i vjerojatnu početnu virusnu replikaciju bez neposrednog citopatskog učinka. Prešavši enterocitnu barijeru dolaze do Peyerovih ploča gdje počinje značajna virusna replikacija. Posljedica te replikacije je primarna viremija koja zasijava sekundarna sjela uključujući SŽS, srce, pluća i jetru. U tim organima nastaje daljnje lokalno umnažanje virusa praćeno intenzivnijom i dugotrajnijom sekundarnom viremijom, tijekom koje su u oboljeloga prisutni i klinički simptomi bolesti organa.^{7,20}

Imunost kod EV tipno je specifična. Kada je riječ o infekciji EV 71, protutijela se u serumu mogu pronaći već dan nakon pojave kliničkih simptoma bolesti. Većina studija nije pokazala povezanost razine protutijela s težinom bolesti,^{17,21} iako bolesnici s hipogamaglobulinemijom imaju viši rizik za nastanak kronične infekcije ili je ona barem težeg tijeka. Prema nekim seroepidemiološkim studijama provedenim na ljudskim ispitanicima, seroprevalencija EV 71 protutijela povećava se s dobi, što potvrđuje hipotezu kako neutralizirajuća protutijela u odrasloj dobi mogu zaštititi od ponovne EV 71 infekcije.^{17,21}

1.3. BOLESTI UZROKOVANE ENTEROVIRUSIMA

Infekcijama EV pridaje se epidemiološki i klinički značaj s obzirom da se mogu prezentirati čitavim nizom kliničkih manifestacija od blage febrilne bolesti, respiratorne infekcije, bolesti dlanova, stopala i usta, akutnog gastroenteritisa, hemoragijskog konjuktivitisa, miokarditisa, ali i ozbiljnih neuroloških bolesti.^{15,22-37}

1.3.1. Nespecifična febrilna bolest

Kao najčešća klinička manifestacija EV infekcije, nespecifična febrilna bolest počinje naglo vrućicom (38.5 °C do 40 °C) uz prisutne ostale nespecifične simptome u obliku mučnine, iritabilnosti, povraćanja, bolova u trbuhu ili simptoma infekcije gornjeg respiratornog sustava. Kod starije djece česta je glavobolja ili bolovi u mišićima. Neki serotipovi virusa (E 9, E 11, E 16, E 25; CV A2, CV A4, CV A9, CV A16 i CV B3-5) uzroci su febrilne bolesti s osipom.^{20,35}

1.3.2. Bolest šaka-stopala-usta (engl. Hand-foot-mouth disease; HFMD)

Vezikulozni stomatitis s egzantemom poznatiji kao bolest šaka, stopala i usta tipični je predstavnik EV bolesti s osipom. Najčešći uzročnici HFMD su CV A16 i EV 71.^{22,26}

CV A6 i CV A10 koji su većinom karakterizirani kao uzročnici herpangine, povremeno uzrokuju epidemije HFMD. Bolest je u većini slučajeva blagog tijeka.^{22,23,24}

Od kliničke i epidemiološke važnosti su infekcije uzrokovane EV 71. Prema novijem istraživanju provedenom u području s najvećom incidencijom epidemija EV (azijsko-pacifičke zemlje) komplikacije razvije oko 20% bolesnika.²² Povolje po dobnim skupinama može varirati ovisno o zemljama i serotipu virusa. Tako u zemljama Azije i Pacifika većinom povoljeva populacija djece mlađa od četiri ili pet godina života s najvećom učestalošću među dojenčadi, dok u SAD-u infekcije EV pogađaju dobnu skupinu do deset godina, a u najmanjem postotku povoljevaju dojenčad.²⁵

Samo u 2008. g. tijekom HFMD epidemije u nekoliko kineskih provincija, prijavljeno je 48876 oboljelih od kojih je 131 imalo ozbiljan tijek bolesti, dok je 21 bolesnik preminuo. Većina oboljelih su bila djeca do pet godina starosti. EV 71 izoliran je u 59% oboljelih, CV A16 u 26% oboljelih, dok je preostalih 15% HFMD uzrokovano ostalim EV.²⁶

U Europi su infekcije EV 71 i njene komplikacije vrlo rijetke.^{16, 27} U početku bolesti javlja se povišena temperatura u trajanju jednog do dva dana, grlobolja i odbijanje hrane, a mogu biti prisutni i respiratorni simptomi (npr. kašalj) i povraćanje.^{26,27}

Dva dana nakon pojave febriliteta nastaju različite kožne promjene - makule s papulama, vezikule pa čak i pustule promjera dva do pet mm prvenstveno na palmarnoj strani dlanova, dorzalnoj strani stopala i ekstenzornim stranama ekstremiteta. U usnoj šupljini, na bukalnoj sluznici i jeziku pojavljuju se vezikule koje cijele bez stvaranja kruste.^{28,29}

Iako je u većini slučajeva infekcija asimptomatska ili se prezentira kao blaga bolest bez posljedica, ponekad se javljaju ozbiljne neurološke komplikacije u obliku meningitisa, encefalitisa i mlohavice kljenuti, a u nekih i plućni edem uz srčanu dekompenzaciju s letalnim ishodom.²²⁻²⁵

1.3.3. Herpangina

Herpangina se javlja kod djece predškolske dobi. Uzročnici su CV A2, CV A5, CV A6, CV A10, CV A16; CV B1, CV B2, CV B5 i echo virusi.^{22,29}

Najčešći put prijenosa jest feko-oralni put, dodir sa sekretom ždrijela ili tekućinom iz vezikula. Bolest počinje naglim nastupom vrućice 37-40 °C, grloboljom i otežanim gutanjem. Ovi simptomi javljaju se neposredno prije izbijanja karakterističnog vezikuloznog enantema ždrijela i mekog nepca. Bolne orofaringealne lezije, promjera tri do četiri mm vide se na mekom nepcu, prednjim nepčanim lukovima, uvuli, tonzilama, stražnjem zidu farinksa ili bukalnoj sluznici. U 25% oboljelih mogući su glavobolja, povraćanje, bolovi u leđima i bolovi u trbuhu.

U većini slučajeva herpangina je bolest blagog tijeka i bez komplikacija koja zahtijeva samo simptomatsko liječenje. Vrućica traje jedan do četiri dana, a svi simptomi povlače se za tri do sedam dana.²⁹

U slučaju epidemija zabilježeni su i nepovoljni ishodi bolesti.³⁰

Za vrijeme epidemije EV 71 u Tajvanu 1998.g. od HFMD i herpangine prijavljeno je više od 129000 oboljelih od kojih je 405 imalo težak tijek bolesti, a 78 smrtni ishod. Većina umrlih bila su djeca predškolske dobi.³⁰

1.3.4. Bolesti dišnog sustava

Iako se respiratorne infekcije uzrokovane EV vrlo često prezentiraju kao obična prehlada, moguće su i kliničke slike poput opstruktivnog bronhitisa, bronhiolitisa, respiratorne insuficijencije, apneje, pneumonije, krupa, upale srednjeg uha, parotitisa ili tonzilofaringitisa.²⁹

Pleurodinija (Bornholmska bolest) manifestira se paroksizmalnim torakalnim bolovima, zbog miozitisa mišićne stijenke prsnog koša i trbuha, a najčešće je uzrokovana CV B1, B2, B3 i B5, kao i echovirusima 1 i 6. Bolest se može javiti sporadično ili u obliku epidemija, većinom kod djece i osoba mlađih od 30 godina. Prodromima poput malaksalosti, mijalgije i glavobolje, obično slijede vrućica i spastički bolovi u trajanju od nekoliko minuta do nekoliko sati, locirani u području prsnog koša ili gornjeg abdomena, praćeni kašljanjem, kihanjem i dubokim disanjem. Kod djece su češći intenzivni bolovi u truhu, karaktera kolika koji mogu oponašati kliničku sliku akutnog abdomena, u smislu intestinalne opstrukcije ili apendicitisa. Bolest obično traje tri do šest dana, iako može potrajati i tjednima, a može se javiti i u bifazičnom obliku. Pleurodiniji povremeno mogu biti pridruženi meningitis, orhitis, miokarditis ili perikarditis.²⁹

1.3.5. Akutni hemoragijski konjuktivitis

EV 70 i CV A24 glavni su uzrok akutnog hemoragijskog konjuktivitisa koji se većinom javlja u epidemijama ili pandemijama u svim dijelovima svijeta, osobito u tropskim klimatskim uvjetima. Bolest se prenosi prstima i suzama, većinom među populacijom između 20. i 50. godine života. Karakteristični simptomi su nagli početak s bolovima u oku, fotofobijom, suzenjem, zamućenim vidom, konjuktivalnom hiperemijom i mukopurulentnim sekretom iz oka uz edem vjeđe. Rijetki su sistemski simptomi u smislu febriliteta, iako se bolest može javiti u obliku faringokonjuktivalne vrućice. Bolest prolazi spontano s potpunim oporavkom za jedan do dva tjedna.³¹

1.3.6. Miokarditis i perikarditis

Prema podacima starijih studija, temeljenim na serologiji, adenovirusi i EV smatrani su glavnim uzročnicima miokarditisa. Većinom su izolirani CV B2-B5.³² Ostali mogući uzročnici su CV A4 i CV A16, E 9 i E 22.³³

Međutim, prema novijim studijama, koje su izabrale metodu lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (eng. Real time polymerase chain reaction; RT-PCR) kao metodu izbora za dokaz izolacije virusnog genoma u bioptatu tkiva, sada se kao glavni uzročnici miokarditisa smatraju Parvo B19 (PVB 19) i humani herpes virus 6 (HHV 6). Od ostalih uzročnika koji mogu uzrokovati miokarditis spominju se Epstein - Barr virus (EBV) i citomegalovirus (CMV).³⁵

Mioperikarditis uzrokovan EV javlja se u svim dobnim skupinama iako je stopa pobolijevanja veća kod adolescenata i mladih odraslih osoba. Bolest može početi naglo s dispnejom, cijanozom, bljedilom, povraćanjem i tahikardijom uz prekordijalnu bol.^{29, 34} Kardijalni simptomi mogu uslijediti i nekoliko dana (tjedana) nakon respiratorne infekcije u obliku palpitacija, dispneje i netipičnih prekordijalnih bolova.³⁴ Miokardijalni enzimi povišeni su kod oboljelih s rano otkrivenim akutnim miokarditisom, dok uredni miokardijalni enzimi mogu upućivati na kronični miokarditis. Od elektrokardiogramskih (EKG) abnormalnosti spominju se "idiopatska" ventrikularna aritmija, depresija PQ segmenta, te elevacija ST spojnice.³⁴

U većine oboljelih bolest je blaga i ne ostavlja posljedica (smrtni ishod zabilježen je u manje od 4% slučajeva),^{29, 33} osim ako se javlja u sklopu generalizirane bolesti novorođenčadi.^{35, 36}

1.3.7. Bolesti probavnog sustava

Gastrointestinalni simptomi uzrokovani EV infekcijama javljaju se najčešće u obliku povraćanja, proljeva i bolova u trbuhu.

EV infekcija u premturane novorođenčadi može uzrokovati i ozbiljniju kliničku sliku u obliku proljeva uz hematoheziju te nekrotizirajući enterokolitis.^{29,35}

1.3.8. Generalizirana bolest novorođenčadi

Mnogi serotipovi EV, osobito CV B2-5 i echovirusi 6, 9, 11 i 19 mogu izazvati tešku, ponekad i fatalnu bolest novorođenčeta. Način prijenosa infekcije je vertikalni s majke na dijete prije, tijekom ili neposredno po porodu, ali izvor infekcije može biti i član obitelji ili bolničko osoblje kada se bolest javlja u obliku nozokomijalne infekcije tijekom epidemija u novorođenačkim odjelima.^{29,35,36}

Većina zaražene novorođenčadi ima benigni tijek bolesti s nespecifičnim simptomima; nerijetko su prisutni i simptomi poput povišene temperature ili hipotermije, iritabilnosti, letargije, odbijanja hrane, osipa (makulopapulozni, vezikulozni, ili petehijalni), poteškoća disanja, apneje, žutice, hepatomegalije, abdominalne distenzije, povraćanja i proljeva.³⁵

Iako se bolest u većine oboljele novorođenčadi prezentira nespecifičnom febrilnom bolesti u prvom danu života, tijekom iduća dva tjedna klinička slika može progredirati do ozbiljne bolesti koja zahvaća više organa (meningoencefalitis, miokarditis, pneumonija, hepatitis) ili se manifestira kliničkom slikom sepse i/ili koagulopatije.^{29,35,36,37}

U manjem broju slučajeva bolest je bifazična tijeka.³⁵ Prva faza obilježena je nespecifičnim simptomima dok se u drugoj fazi koja nastupa s latencijom od jednog do sedam dana javljaju miokarditis, encefalitis i hepatitis. U tom slučaju ishod može biti fatalan, osobito ako je riječ o miokarditisu ili nekrozi jetre uz koagulopatiju.³⁶

Rizični čimbenici i kliničke značajke povezane s ozbiljnom bolesti uključuju odsustvo neutralizirajućih protutijela za određeni serotip virusa poput CV B i echovirusa 11, bolest majke prije ili tijekom poroda, prematuritet, zahvaćenost više organa, teži hepatitis i dugotrajnu viremiju.^{35,37}

1.4. BOLESTI SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA UZROKOVANE ENTEROVIRUSIMA

NPEV (CV B2-5; E 4, E 5, E 6, E 7, E 9, E 11, E 13, E 16, E 18, E 30; EV 70, EV 71) najčešći su (>90%) uzročnici AM,^{13,35} dok su ostale neurološke manifestacije u obliku meningoencefalomijelitisa, mlohave kljenuti, Guillain-Barrèova sindroma, transverzalnog mijelitisa i rombencefalitisa, ataksije i benigne kranijalne hipertenzije najčešće uzrokovane EV 71.³⁵

1.4.1. Aseptični meningitis

Od aseptičnog meningitisa uzrokovanog non polio enterovirusima (NPEV AM) oboljevaju najčešće dojenčad, osobito mlađa od tri mjeseca^{35,38} i djeca rane predškolske dobi.³⁹

Prema jednoj od novijih epidemioloških studija, u Hrvatskoj je tijekom desetgodišnjeg razdoblja (2000. - 2009.g.) u 21% predškolske i školske djece s kliničkom slikom EV infekcije dijagnoza potvrđena izolacijom virusa iz stanične kulture. Od EV serotipova prevladavali su echovirusi, CV B, CV A, te rijetko echovirus 22 ili parechovirus 1 i vrlo rijetko EV 71 (0,8% bolesnika). Većinom (59,4% bolesnika) radilo se o djeci s dijagnozom NPEV AM.⁴⁰

Infekcija SŽS-a uzrokovana NPEV može nastati tijekom primarne, ali i sekundarne viremije, filtracijom kroz kapilarni zid, ili prijelazom inficiranih mononukleara kroz krvno-likvorsku, odnosno krvno-moždanu barijeru.^{7, 41}

Podaci o patomorfološkim promjenama su oskudni i svode se na obdukcijske nalaze bolesnika umrlih od miokarditisa koji su uz to imali AM.⁷ Kod tih se bolesnika u SŽS-u nalazi limfocitna upalna infiltracija koroidnog pleksusa, moždanih ovojnica i perivaskularnih prostora bijele tvari, što dodatno sugerira da je upala SŽS-a posljedica viremije.⁷

AM uzrokovan NPEV u pravilu je blaga bolest.^{3, 42} Znaci afekcije SŽS-a mogu u mlađe djece, osobito dojenčadi, biti i posve odsutni pa se upala moždanih ovojnica otkrije slučajno tijekom kliničko-laboratorijske evaluacije djeteta s akutno nastalim febrilitetom bez vodećega simptoma ili u sklopu obrade febrilnoga djeteta s osipom.⁴³

Početak bolesti je nagao s umjereno povišenom tjelesnom temperaturom, a u čak 25% bolesnika vrućica ne mora biti prisutna.⁷ U tipičnome slučaju AM ima bifazični tijek. Bolest počne s blagim povišenjem temperature, malaksalošću, gubitkom apetita i grloboljom. To je prva faza bolesti (morbus minor) koja može trajati dan, dva ili nekoliko dana. Nakon slobodnog intervala (u trajanju jedan ili dva dana) u kojem se bolesnik osjeća dobro, nastupa druga faza bolesti (morbus major) u obliku jasnih simptoma meningitisa (povišena temperatura, glavobolja, povraćanje).^{42,43}

U oko četvrtine oboljelih javljaju se proljev ili osip,⁴² 15% oboljelih ima i respiratorne simptome (rinitis) a kod mlade dojenčadi može biti prisutna i upala srednjeg uha.^{42,43} Iritabilnost i odbijanje hrane, najčešći su simptomi AM kod dojenčadi i male djece, dok se starija djeca žale na glavobolju i fotofobiju. Zakočenost vrata javlja se kod djece starije od dvije godine.^{7,43} Klinički simptomi AM uzrokovanoga NPEV iščezavaju unutar tjedan dana od početka bolesti, s tim da većina bolesnika boluje i kraće.⁴⁴

Oko 10% djece oboljele od AM može razviti komplikacije bolesti u obliku složenih i jednostavnih konvulzivnih napada, povišenog intrakranijalnog tlaka (napeta i izbočena fontanela, povraćanje, somnolencija), sindroma neprikladne sekrecije antidiuretskog hormona ili kome.^{35,42} Neovisno o tijeku bolesti i mogućim komplikacijama, prognoza AM je povoljna te bolest izvan novorođenačke dobi ne ostavlja trajnih neuroloških posljedica.^{42,45,46}

Iznimku predstavlja rombencefalitis, bolest uzrokovana EV 71, koji može imati smrtni ishod.⁴⁶

Iako infekcija NPEV kod starije djece prolazi spontano kao blaga bolest, perinatalno i prenatalno stečena infekcija kod novorođenčadi može uzrokovati teške infekcije u obliku meningitisa, encefalitisa ili generalizirane bolesti novorođenčeta.⁴⁷

Klinička slika EV meningitisa kod novorođenčadi prezentira se febrilitetom, odbijanjem hrane, povraćanjem i osipom te ponekad znakovima infekcije gornjeg respiratornog sustava. Navedeni simptomi uvijek pobuđuju sumnju na neonatalnu sepsu kao diferencijalnu dijagnozu neonatalnog EV meningitisa. U slučaju razvoja meningoencefalitičkog oblika bolesti javljaju se poremećaj svijesti, konvulzije i žarišni neurološki ispadi.^{35,47}

Kod djece s prirođenim ili stečenim poremećajem funkcije limfocita B i s nasljednom X-vezanom agamaglobulinemijom, EV (echovirusi, CV A4, CV A11, CV A15, CV B2, CV B3) uzrokuju kronični meningoencefalitis i dermatomiozitisu sličan sindrom. Simptomi

zahvaćenosti SŽS-a mogu izostati ili se pojaviti u obliku intelektualnog propadanja, konvulzivnih napada, motoričke slabosti i povišenog intrakranijalnog tlaka. U većini slučajeva bolest završava fatalno.^{35, 48}

Dijagnoza AM uzrokovanoga NPEV postavlja se pretragom CSL-a.⁷ U više od polovice bolesnika u kojih se lumbalna punkcija učini unutar prvih 48 sati bolesti, u CSL-u postoji predominacija neutrofilnih granulocita.⁴⁹

Iako su u pojedinih bolesnika zabilježene pleocitoze i od nekoliko tisuća stanica, u oko 80% bolesnika pleocitoza ne prelazi 500 leukocita u mm³.^{7, 43}

Rutinski biokemijski nalazi CSL-a poput koncentracije bjelančevina i glukoze u većine su bolesnika normalni.⁴⁴

Rezultati ostalih pretraga, hematoloških i biokemijskih pretraga krvi, od male su vrijednosti za dijagnosticiranje NPEV AM.^{7, 53, 54}

1.4.2. Encefalitis

EV uzrokuju 10-20% svih slučajeva encefalitisa. Najčešći serotipovi su CV A9, CV B2, CV B4, CV B5, echo virusi 3, 4, 6, 9, 11³⁵ te EV 71 koji može uzrokovati fatalni encefalitis.⁵⁵

Akutni encefalitis obilježen je u veće djece i odraslih tipičnim kliničkim simptomima: vrućica, glavobolja i poremećaj svijesti u obliku dezorjentiranosti, poremećaja ponašanja i govora. U većini slučajeva prisutni su i neurološki simptomi kao ataksija, hemipareza, epileptički napadi ili oštećenja kranijalnih živaca. Te karakteristike razlikuju bolesnike s encefalitisom od bolesnika s AM koji se prezentiraju vrućicom, glavoboljom, povraćanjem i kočenjem vrata, ali bez fokalnih neuroloških znakova ili poremećaja svijesti.⁵⁶ Laboratorijski nalazi nemaju veću vrijednost u postavljanju dijagnoze budući su većinom u granicama normale, iako se povremeno bilježe leukocitoza ili leukopenija.⁵⁶

Za dijagnozu encefalitisa važan je nalaz CSL-a. Rano u početku bolesti prevladavaju polimorfonukleari te 8-12 sati kasnije mononukleari. Koncentracija proteina u CSL-u može biti normalna ili blago povišena, dok je koncentracija glukoze u većine bolesnika normalna.⁵⁶ Osim iz CSL-a, virus se može izolirati iz stolice, obriska ždrijela ili urina bolesnika.⁵⁶

Encefalitis se može javiti kao komplikacija EV bolesti, osobito tijekom epidemija. Primjer je velika EV epidemija 1998.g. na Tajvanu, uzrokovana EV 71.⁴⁶ Više od 60% bolesnika imalo

je kliničku sliku HFMD i herpangine. Većina oboljelih bila su djeca mlađa od tri godine. Za razliku od drugih epidemija uzrokovanih EV, tijekom te epidemije zabilježen je visoki postotak neuroloških komplikacija: AM, mlohava kljenut i kao najteža - rombencefalitis.^{46, 55} U 54% oboljelih bili su prisutni miokloni trzajevi s tremorom ili ataksijom, dok je 19% pacijenata razvilo tešku sliku bolesti s brzim razvojem plućnog edema i srčane dekompenzacije. Smrtnost od rombencefalitisa u toj epidemiji iznosila je 14%.⁴⁶

Infekcije SŽS-a, osobito ako je riječ o encefalitisu uzrokovanom CV i echo virusima u sklopu generalizirane bolesti novorođenčadi, mogu imati za posljedice oštećenja kognitivnih i govornih funkcija, spazam, hipotoniju, učestale konvulzivne napade, mikrocefaliju, iako se u osnovi većina preživjele djece potpuno oporavi i dalje razvija bez dugoročnih neuroloških oštećenja.^{35,46}

1.4.3. Mlohava kljenut

U najnovijoj studiji Messacar i sur. detaljno opisuju 12 pedijatrijskih bolesnika oboljelih od EV infekcije tijekom epidemije EV D68, u razdoblju od početka kolovoza do kraja listopada 2014.g. Riječ je o djeci od 6-15 godine života (medijan dobi 11,5 godina) koja su nakon sedmodnevne respiratorne infekcije razvila neurološke komplikacije bolesti. Osim oštećenja kranijalnih živaca bolesnici su imali i mlohavu kljenut, najčešće proksimalnu, asimetričnu, povezanu s hiporefleksijom i mijalgijom, no bez ispada osjeta. Za sada je studija Messacara i sur. prvo izvješće o pojavi mlohavog kljenuti u djece uzrokovane EV D68. U literaturi su studije o mlohavoj kljenuti kao komplikaciji virusne infekcije rijetke, te se većinom odnose na infekcije polio virusima i flavivirusima.¹¹⁹

1.4.4. Mikrobiološka dijagnostika enterovirusa

Etiološka dijagnoza NPEV AM može se postaviti izolacijom virusa iz CSL-a ili iz krvi bolesnika.^{40,43} Nakon postizanja citopatskog učinka virusa i izdvajanja virusa iz stanične kulture pristupa se tipizaciji virusa testom neutralizacije s poznatim laboratorijskim serumima ili imunofluorescentnim tehnikama.⁴⁰ Vjerojatnost izolacije virusa iz CSL-a direktno ovisi o visini pleocitoze.^{42,43} Osjetljivost metode je oko 65%, a bolji se rezultati postižu ako se uzorak inokulira na nekoliko različitih staničnih kultura.^{7, 42, 43, 50}

Osim relativno niske osjetljivosti, izolacija iz CSL-a je dugotrajan postupak i u slučaju pozitivnog rezultata traje od četiri do osam dana.⁴⁴

Metoda RT-PCR omogućava direktan dokaz virusnog genoma u CSL-u i danas se smatra zlatnim standardom kliničke dijagnostike enterovirusnih meningitisa. U kliničkim laboratorijima za potrebe rutinske dijagnostike koriste se pan-enterovirusni PCR-testovi koji se temelje na dokazivanju vrlo konzervirane regije 5'UTR zajedničke svim EV.^{44, 52}

PCR u realnom vremenu značajno je brža metoda u odnosu na metodu kultivacije pa je osobito pogodna za brzu dijagnostiku nejasnih upalnih bolesti SŽS-a.⁵¹ Osjetljivost metode kreće se od 86% do 100%, a specifičnost od 92% do 100%.^{44, 50, 52}

1.5. TERAPIJA ENTEROVIRUSNIH BOLESTI

U ekonomski razvijenim područjima EV većinom uzrokuju bolest blagog tijeka, stoga je dovoljna simptomatska terapija. Novorođenčad s težim tijekom bolesti, dojenčad i djeca s miokarditisom, ili neurološkim manifestacijama mogu zahtijevati mjere intenzivnog liječenja. Specifično liječenje infekcija uzrokovanih EV ne postoji.²⁰

Kod imunokompromitirane djece s perzistirajućim EV infekcijama dobri, ali ipak ograničeni rezultati uočeni su nakon primjene intravenskih imunoglobulina (IVIG), osobito ako je riječ o novorođenčadi (kraće trajanje viremije i virurije) ili bolesnicima s hipogamaglobulinemijom ili agamaglobulinemijom gdje je redovita primjena imunoglobulina povezana s manjom incidencijom kroničnih EV infekcija.³⁵

Novija istraživanja usmjerena su prema antivirusnim i imunomodulirajućim lijekovima koji su pokazali zadovoljavajuće *in vitro* djelovanje na EV.

Jedan od takvih lijekova je plekonaril koji onemogućava prijanjanje virusa za stanične receptore i stabilizira enterovirusnu kapsidu te nakon peroralne primjene smanjuje težinu i trajanje meningoencefalitisa uzrokovanog EV.^{14,57,58}

Plekonaril prolazi kroz krvno moždanu barijeru u SŽS, gdje ostaje u koncentracijama koje inhibiraju daljnju replikaciju EV.¹⁴ Prema nekim studijama na terapiju plekonarilom pozitivno je odgovorilo čak 78% oboljelih od kroničnog meningoencefalitisa.⁵⁹

Plekonaril pokazuje antivirusni učinak prema 90% poznatih NPEV, no pitanje je opravdanosti njegove primjene u nekomplikiranim AM, s obzirom da je u kontroliranim pokusima u kojima su sudjelovali odrasli bolesnici pokazano tek skraćanje trajanja kliničkih simptoma za jedan do dva dana, dok u djece mlađe od 12 mjeseci nije bilo učinka.⁵⁹

1.6. IMUNOLOŠKO PREPOZNAVANJE

1.6.1. Citokini

Citokini su proteini i glikoproteini koji posreduju u međustaničnim interakcijama i imaju važnu ulogu u procesu rasta, diferencijacije i sazrijevanja stanica imunološkog sustava, kao i u efektorskoj fazi imunoreakcije, posebice u kontekstu aktivacije i migracije stanica imunološkog sustava.^{60,61}

Citokini sudjeluju i u brojnim drugim fiziološkim i metaboličkim procesima. Svoj biološki učinak ostvaruju vezanjem na stanične citokinske receptore što omogućava prijenos citokinskog signala u stanicu i aktivaciju transkripcije citokinima-inducibilnih gena. Citokinima-inducibilni proteini moduliraju biološke procese u stanici koje u konačnici prepoznajemo kao biološki učinak određenog citokina. Biološko djelovanje citokina ostvaruje se kroz brojne interakcije s drugim citokinima koje mogu biti sinergističke, aditivne ili antagonističke. Važna obilježja bioloških učinaka citokina su pleiotropizam (jedan citokin djeluje na različite stanice) i redundancija (više citokina ima jednak učinak na određenu stanicu).⁶⁰

Citokini se mogu svrstati u pojedine skupine na klasičan način, prema funkciji, na temelju njihove građe ili građe njihovih receptora.

Klasično citokini se dijele na interleukine, interferone, citoksine i čimbenike rasta hematopoeznih kolonija.⁶⁰

Prema funkciji citokini se svrstavaju u četiri skupine:

1. Citokini urođene imunosti: TNF- α (eng. Tumor necrosis factor alpha)

IL (eng. Interleukin) IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IL-23,
IL-27

IFN- α (eng. Interferon alpha)

IFN- β (eng. Interferon beta)

2. Citokini stečene (specifične) imunosti: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13

IFN- γ (eng. Interferon gamma)

3. Čimbenici rasta hematopoeznih kolonija: GM-CSF, G-CSF, M-CSF

4. Imunosupresijski (inhibicijski) citokini: IL-10

TGF- β (eng. Transforming growth factor beta)

Citokine urođene imunosti proizvode prvenstveno makrofagi i druge akcesorne imunološke stanice kao odgovor na nespecifične upalne podražaje.

TNF- α je snažan proupalni citokin, koji djeluje kemotaktički na monocite i neutrofile te pojačava otpornost na unutarstanične uzročnike infekcija.

Interleukini IL-1 i IL-6 djeluju kao endogeni pirogeni, potiču aktivaciju, diferencijaciju i rast limfocita T, dok se **IL-12** u povišenim koncentracijama proizvodi za vrijeme infekcije unutarstaničnim mikroorganizmima, potiče nastajanje prirođenoubilačkih stanica (eng. Natural killer, NK) i pretvorbu pomagačkih limfocita T (CD4+) u efektore Th1.

Interferoni (IFN- α i IFN- β) su antivirusni proteini koje proizvode stanice kao odgovor na virusnu infekciju. Antivirusni učinak ostvaruju na nekoliko načina. Kod stanica koje nisu inficirane virusom, interferoni potiču njihovu otpornost na viralnu replikaciju, aktivirajući gene koji uzrokuju oštećenje mRNA i inhibiraju translaciju viralnih proteina. Kod stanica inficiranih virusom, interferoni potiču proizvodnju molekula MHC I razreda, te na taj način stanice postaju vidljive citotoksičnim (CD8+) limfocitima T. Isto tako interferoni aktiviraju NK stanice koje selektivno ubijaju virusom inficirane stanice.

Citokine stečene (specifične) imunosti stvaraju primarno limfociti.⁶⁰

IL-2 je važan za sazrijevanje citotoksičnih limfocita T (CD8+), te za pretvorbu NK stanica u aktivirane ubilačke stanice (eng. Lymphokine activated killer; LAK). IL-2 je i važan sučimbenik u sazrijevanju limfocita B.

IL-4, IL-5, IL-6 i IL-13 pomažu u reakcijama humoralne imunosti.

IFN- γ je jedan od glavnih citokina stanične imunosti. Aktivira makrofage i NK stanice, te potiče diferencijaciju Th0 u Th1. Ima antiproliferativni učinak na viruse i tumorske stanice.

Čimbenici rasta hematopoeznih kolonija (npr. GM-CSF) potiču rast i diferencijaciju hematopoeznih kolonija.

Imunosupresijski citokini:

IL-10 i TGF- β potiskuju funkciju makrofaga i sintezu pomagačkih limfocita T.

Od mnoštva do sada otkrivenih citokina, u slijedećem odlomku teksta, izdvojeni su oni čija je uloga osobito važna u obrani organizma od infektivnog patogena.⁶³

IL-16 djeluje kao kemoatraktant za pomagačke limfocite (CD4+), eozinofile i monocite.

IL-17 (IL-17A, IL-17F) proizvode limfociti T (Th17), NK stanice i citotoksični limfociti, te neutrofili.⁶³ Putem receptora lokalnih tkivnih stanica (stromalne stanice ili stanice epitela) IL-17 potiče stvaranje kemokina (npr. IL-8) održavajući tako upalni proces u smislu povećanja migracije neutrofila na mjesto upale.

IL-18 stimulira NK stanice i makrofage na proizvodnju IFN- γ . Blokada ovog citokina ili njegovog receptora (IL-1Rrp, eng. IL-1R related protein) može smanjiti aktivnost NK stanica, te oslabiti Th1 protektivni odgovor.

IL-21 povećava proliferaciju limfocita T, limfocita B i NK stanica.

IL-23 stimulira proizvodnju IFN- γ i proliferaciju Th17 limfocita.

IL-28 i IL-29 imaju antivirusni učinak, sličan IFN- γ .

IL-33 povećava proizvodnju Th2 citokina (IL-4, IL-5, IL-13).

Od citokina koji djeluju imunosupresijski za izdvojiti su **IL-35** koji luče regulacijski limfociti T i **IL-37** koji u suradnji s TGF- β potiskuje proizvodnju proupalnih citokina (IL-1, IL-6, IL-12).⁶³

1.6.2. Značajke i fiziološki tijek imunoreakcije

Pod pojmom imunosti podrazumijevamo široki spektar obrambenih reakcija na prisutni antigen u organizmu.

Kako bi organizam bio učinkovito zaštićen od patološkog antigena, imunološki sustav mora ispuniti nekoliko zadataka. Prvi zadatak podrazumijeva imunološko prepoznavanje antigena od strane stanica nespecifične imunosti ili limfocita adaptivne (stečene) imunosti. Idući korak jest generiranje imunološkog odgovora gdje glavnu ulogu imaju mehanizmi poput aktivacije sustava komplementa, limfocita efektora ili proizvodnje protutijela. Istodobno moraju biti aktivni mehanizmi regulacije imunološkog odgovora kako bi se spriječio razvoj autodestruktivnog oštećenja organizma. Naime, regulacija imunološkog odgovora važna je komponenta imunološke reakcije i njezin izostanak može pridonijeti razvoju autoimunih bolesti. Konačni učinak svih imunoloških reakcija jest zaštita organizma od moguće bolesti uzrokovane istim tj. ranije poznatim antigenom, što smatramo pod imunološkim pamćenjem, obzirom da će ponovno izlaganje organizma antigenu s kojim se već ranije susreo, uzrokovati brži i jači imunološki odgovor.^{59,61}

Nespecifična imunost (urođena) od rođenja djeluje kao primarni obrambeni mehanizam protiv svih antigena koji ulaze u organizam, a postoji i bez prethodnog dodira s antigenom. Pri prvom susretu organizma s infektivnim antigenom, prva linija obrane protiv infekcije su anatomske zapreke (koža i sluznica) i kemijske zapreke poput antimikrobnih proteina (defensini) i enzima (lizosomi) kako bi se spriječio daljnji prodor mikroba. U slučaju neučinkovitosti ovih zapreka dolazi do aktivacije fagocita ili sustava komplementa.

Fagociti (monociti, makrofagi, granulociti i dendritičke stanice) zbog mogućnosti fagocitoze s posljedičnom enzimskom razgradnjom upijениh tvari i liziranjem mikroorganizama zauzimaju važno mjesto u nespecifičnoj obrani organizma. Također se uključuju u reakcije specifične imunosti neovisno o tome da li u aferentnoj fazi djeluju kao stanice koje predočuju antigen limfocitima T ili pod utjecajem citokina i kemokina sudjeluju u eferentnoj fazi kao efektorske stanice pri razgradnji unutarstaničnih patogena.

Dendritičke stanice otpuštaju se iz koštane srži u krv u nezrelom obliku. Lutajući tkivima, pronalaze patogene, a mogu ih i razgraditi makropinocitozom. Nakon sazrijevanja djeluju samo kao stanice koje predočuju antigen naivnim limfocitima T.

Granulociti (neutrofili, bazofili, eozinofili) su polimorfonuklearni leukociti. U usporedbi s makrofagima, granulociti su kratkog životnog vijeka (svega nekoliko dana). Pojačano nastaju i sazrijevaju kao odgovor organizma na prisustvo infektivnog patogena, a procesom migracije odlaze iz krvi na mjesto upale. Fagocitni neutrofili su najbrojnije, ali i najvažnije stanice urođenog imunološkog odgovora. Zahvaljujući procesu fagocitoze, te antimikrobnim tvarima i enzimima pohranjenima u vlastitim citoplazmatskim granulama, mogu u potpunosti razgraditi patogen.

Makrofagi kao primarni fagociti „proždiru“ patogene te ih uništavaju u vlastitim unutarstaničnim vezikulama. Proizvode proupalne citokine (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, kemokine), prostaglandine, leukotriene, enzime poput lizozima i intermedijatore upale (npr. H₂O₂).⁶¹⁻⁶³ Makrofagi nemaju antigen specifične receptore, te prepoznaju patogene („uljeze“) izražavajući dvije velike skupine receptora – receptore za prepoznavanje obrazaca (eng. Pattern recognition receptors; PRR) i opsoninske receptore. PRR receptori prepoznaju molekularne obrasce patogenih mikroorganizama (eng. Pathogen associated molecular patterns; PAMP). Ovi receptori mogu imati funkciju vezanja stijenke mikroorganizma (lektinski tip receptora) ili pak njihova građa može nalikovati proteinu Toll-u (eng. Toll – like receptors; TLR). Receptori TLR mogu prepoznati izvanstanične produkte mikroorganizama (u slučaju da su smješteni na membrani) ili unutarstanične mikrobne produkte (ako su smješteni u citosolu). U nespecifičnoj imunosti TLR receptori imaju važnu ulogu obzirom da njihova rana aktivacija potiče proizvodnju antimikrobnih peptida i proteina, ali i lučenje već ranije navedenih proupalnih citokina IL-1 β , IL-6 i TNF- α (endogenih pirogena).^{59, 61, 62}

NK stanice su veliki granulirani limfociti koji se razvijaju u koštanoj srži iz iste progenitorne stanice kao i limfociti T ili limfociti B. Važna su komponenta urođene imunosti obzirom na sposobnost nespecifičnog prepoznavanja tumorskih stanica, stanica inficiranih virusima i vlastitih nezrelih hematopoeznih stanica. Ciljne stanice mogu ubiti izravnim dodiranjem (ispuštajući citotoksične granule s proteolitičkim enzimima - granzimi i perforini). Kako NK stanice imaju receptor za konstantnu regiju imunoglobulina (Fc receptori) vezanje protutijela za stanični receptor aktivira NK stanice i potiče ih na ispuštanje citotoksičnih granula. Ova reakcija poznata je kao citotoksična reakcija ovisna o protutijelima (eng. Antibody dependent cell mediated cytotoxicity; ADCC). Citokini IL-12 i IL-18 mogu potaknuti NK stanice na proizvodnju IFN- γ , važnog u ranoj kontroli infekcije. Također proizvodnja IFN- γ , od strane NK stanica potiče diferencijaciju pomagačkog limfocita (CD4+) u proupalne Th1 stanice koje imaju sposobnost aktivacije makrofaga. Fenotipski NK stanice izražavaju adhezijsku

molekulu CD56, te receptore CD16a i receptor za C3b ulomak komplementa (CR3/CD11b), kao i molekule CD57, CD7, CD2 i CD8.^{61,62,63,66}

Specifična imunost podrazumijeva imunološku reakciju usmjerenu na točno određeni antigen. U nizu događaja koje nazivamo primarnom reakcijom, stvaraju se specifični efektori imunosti, humoralni (protutijela) i stanični (limfociti). Stoga su humoralna i stanična imunost osnovni oblici specifične imunosti koje razlikujemo prema izvršnim mehanizmima.⁶²

Glavni posrednici u reakcijama humoralne imunosti su limfociti B, ali i sustav komplementa koji kaskadnim nizom aktivacije enzima (klasičnim, lektinskim ili alternativnim putem) omogućuje izravno ubijanje antigena.⁶²

Reakcije stanične imunosti djeluju najčešće u prisutnosti unutarstaničnih bakterija, virusa, stanica transplantata ili tumora. Izvršni mehanizmi stanične imunosti posredovani su stanicama: limfocitima T (pomagačkim CD4+ i citotoksičnim CD8+), makrofagima te stanicama koje obavljaju ADCC.^{62,63}

Molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti (eng. Major histocompatibility complex; MHC) su membranski biljezi, izraženi na površini stanica, prema kojima se razlikuju jedinke unutar iste vrste. Kodirane su glavnim kompleksom gena tkivne podudarnosti smještenih na kratkom kraku šestog kromosoma kod čovjeka.

Funkcija MHC molekula jest predočenje antigena limfocitima T.

MHC molekule razreda I nalazimo na svim stanicama, za razliku od MHC molekula razreda II koje su normalno izražene samo na profesionalnim predočnim stanicama i epitelnim stanicama timusa.⁵⁹⁻⁶¹

Citotoksični limfociti T (CD8+) prepoznaju antigene u sklopu molekula MHC I razreda, a ciljane stanice mogu ubiti u izravnom dodiru.⁶¹⁻⁶³ Osobito je važna njihova uloga pri uništavanju virusom inficiranih stanica, a pri tome ne oštećuju zdrave stanice. Učinak ostvaruju otpuštajući citotoksične proteine (granzime koji ubijaju ciljnu stanicu mehanizmom apoptoze, perforine koji potiču ulazak granzima u ciljnu stanicu i granulizine). Zahvaljujući ovim proteinima citotoksični limfociti mogu uništiti sve citosolne patogene. Citotoksični limfociti T luče IFN- γ te tako mogu inhibirati replikaciju virusa.

U sprezi s molekulama MHC II razreda, pomagački limfociti T (CD4+) usmjeravaju odgovor prema humoralnom (pomažu limfocitima B u proizvodnji protutijela) ili staničnom tipu (omogućuju sazrijevanje citotoksičnih limfocita CD8+ i aktivaciju makrofaga).⁶¹⁻⁶³

Pomagački limfociti T (slika 1) izražavaju karakterističan fenotip - TCR – $\alpha\beta$ +CD3+CD4+CD8-. To su središnje stanice imunskog odgovora, jer reguliraju imunski odgovor ovisno o vrsti prepoznatog antigena. Razlikujemo četiri podvrste pomagačkih limfocita T - Th1, Th2, Th17 i regulacijske limfocite T (Treg).

Od nedavno je u stručnu literaturu uveden i termin posebne podvrste pomagačkih limfocita. Riječ je o tzv. *T_{FH}* (eng. *T follicular helper cells*) koji unutar limfnog čvora luče citokine karakteristične i za Th1 i za Th2 limfocite, te na taj način pomažu limfocitima B u limfnim čvorovima u postupku proizvodnje visokoafinitetnih protutijela i izotipskog prekapčanja. Te stanice imaju receptor CXCR5.⁶³

Slijed događaja od ulaska antigena u organizam do njegova uklanjanja jest složeni proces u kojem se međusobno izmjenjuju i nadopunjuju usko vezane reakcije nespecifične i specifične imunosti. U početnoj fazi infekcije kao prva linija obrane, aktiviraju se različiti mehanizmi nespecifične imunosti kako bi odstranili infektivni antigen.

U slučaju daljnjeg napredovanja infekcije, razvijaju se mehanizmi specifične imunosti, uključujući proliferaciju i diferencijaciju limfocita u specifične izvršne stanice (efektore) uz pomoć citokina i kemokina.^{62,63}

Specifičnu imunoreakciju možemo podijeliti na aferentni, eferentni i središnji dio. Aferentni dio podrazumijeva hvatanje, preradbu i predočivanje antigena. U središnjem dijelu imunoreakcije odvija se međusobna interakcija imunskih stanica, dok se antigen izvršnim mehanizmima uklanja u eferentnom dijelu. Antigeni se prerađuju u antigen predočnim stanicama (eng. Antigen presenting cells; APC) te se u kompleksu s molekulama MHC I. (virusni peptidi i unutarstanične bakterije) ili MHC II. razreda (patogene bakterije i paraziti) predočuju naivnim limfocitima T koji prepoznaju kompleks odgovarajućim TCR receptorom (eng. T-cell receptor).⁶⁴

Prepoznavanje antigena i aktivacijski signal pretvara naivni CD45RA+ limfocit T u nezreli pomagački limfocit Th0 (eng. T helper). Nakon susreta s antigenom, ovisno o vrsti antigena koji je ušao u organizam, APC daje signal u obliku proizvodnje citokina ili ekspresije

staničnih proteina, te na taj način aktivira pomagačke limfocite T, potiče njihovu proliferaciju u jednu od funkcijskih subpopulacija i nastajanje memorijskih CD45RO⁺ limfocita T.

Limfociti Th1 diferenciraju se pri infekciji unutarstaničnim bakterijama (listerije i mikobakterije), nekim parazitima (lišmenije) i virusima te luče citokine IFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-2, razvijajući daljnje reakcije stanične imunosti u smislu aktivacije makrofaga i NK stanica, poticanja ADCC, kao i reakcije odgođene preosjetljivosti.^{63,64}

U međuvremenu se zahvaljujući lučenju citokina IL-2 odvija proces proliferacije i sazrijevanja citotoksičnih limfocita T tj. njegove pretvorbe iz precitotoksičnog u citotoksični limfocit T.

Limfociti Th2 direktno sudjeluju u reakcijama humoralne imunosti proizvodeći citokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13 koji aktiviraju limfocite B i potiču njihovu pretvorbu u plazma stanice čija je osnovna zadaća proizvodnja protutijela u svrhu uklanjanja antigena.⁶⁴ Kako nemaju sposobnost izravne destrukcije antigena, protutijela se u ovaj proces uključuju neizravno, vežući se Fab (varijabilna regija; eng. Fragment antigen binding) ulomkom specifično i reverzibilno za antigen tvoreći imunokomplekse, dok Fc (konstantna regija; eng. Fragment crystallizable) ulomkom aktiviraju ostale obrambene mehanizme (sustav komplementa, makrofage, NK stanice).⁶²

Nakon uklanjanja antigena imunoreakcija se obuzdava, a neki limfociti T koji luče male količine IL-2, preostaju kao dugovjeke memorijske stanice koje pamte dodir s antigenom pa pri ponovnom izlaganju antigenu razvijaju sekundarni tip imunoreakcije.^{63,64}







Limfociti Th17 imaju važnu ulogu u ranoj fazi stečenog imunološkog odgovora, a njihova glavna funkcija jest stimulacija neutrofila u svrhu zaštite organizma od infekcije izvanstaničnim bakterijama i gljivama.⁶³ Proizvode citokine grupe IL-17 (IL-17A i IL-17F), no ne proizvode IFN- γ ili IL-4. Te stanice imaju i receptor za IL-23 koji je ujedno potreban za njihov daljnji razvoj i proliferaciju. Th17 stanice također proizvode i citokin IL-22 koji djeluje na receptore stanica crijeva, kože i pluća te potiče lokalni urođeni imunološki odgovor obrane organizma od patogena.⁶³

Za razliku od efektor Th1, Th2, Th17 i T_{FH} koji sudjeluju u aktivaciji ciljnih stanica i potiču reakcije savladavanja infekcije, *regulacijski limfociti T* imaju funkciju supresije (regulacije) T staničnog odgovora kako bi se ograničio imunološki odgovor i tako spriječio razvoj autoimunih bolesti.⁶³

Razlikujemo dvije populacije regulacijskih T stanica – urođene i stečene.

Urođene T regulacijske stanice nastaju većinom u timusu i djeluju direktnim međustaničnim kontaktom. Njihova osnovna funkcija je neovisna o antigenu, a očituje se u supresiji autoreaktivnih efektorskih limfocita T. Obilježene su ekspresijom CD25, CD26L i transkripcijskog faktora FOXP3 (eng. forkhead box P3).

Stečene T regulacijske stanice Tr1 i Th3 nastaju na periferiji te izražavaju biljeg CD25. Luče supresijske citokine IL-10 i TGF- β te tako bez direktnog staničnog kontakta potiskuju aktivnost naivnih i memorijskih efektorskih stanica. Ts ili supresorski limfociti su posebna vrsta stečenih regulacijskih stanica koje se po ekspresiji površinskih biljega (CD57) razlikuju od citotoksičnih limfocita. Luče citokine IL-2, IL-4, IFN- γ i TGF- β suprimirajući tako proizvodnju pojedinih izotipova imunoglobulina.^{63,65,67}

	Citotoksični limfocit CD8+	Pomagački limfocit CD4+ (Th1)	Pomagački limfocit CD4+ (Th2)	Pomagački limfocit CD4+ (Th17)	Pomagački limfocit CD4+ (T _{H17})	Pomagački limfocit CD4+ (T _{reg})
Populacije efektorskih T stanica						
Glavna funkcija u stečenom imunološkom odgovoru	Ubijanje virusom inficiranih stanica	Aktivacija inficiranih makrofaga	Pomoć limfocitima B u proizvodnji protutijela	Poticanje migracije neutrofila	Pomoć limfocitima B (izotipsko prekapćanje; protutijela)	Supresija T staničnog odgovora
Ciljni antigeni	Virusi Neke unutar stanične bakterije	Intracelularni patogeni (Leishmania, P.jiroveci) Vanstanične bakterije	Paraziti	Klebsiella pneumoniae Gljive (Candida)	Svi tipovi	

Prema Katherine Calame i sur. T cell-mediated immunity. U: Murphy K.P. i sur, ur. Janeway's immunobiology, 8.izd. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2012, str.335-86

Slika 1. Uloga podvrsta efektorskih limfocita T u stanično i humoralno posredovanom stečenom imunološkom odgovoru

1.6.3. Osobitosti imunoloških reakcija u dječjoj dobi

Sve stanice imunološkog sustava potječu iz pluripotentne matične stanice koja u fetalnom razvoju nastaje u žumanjčanoj vreći između drugog i trećeg tjedna gestacije, a u petom tjednu gestacije migrira u fetalnu jetru. Po rođenju se daljnji razvoj hematopoeznih stanica odvija u koštanoj srži ili timusu.

Limfociti B u početku sazrijevaju u koštanoj srži (gdje se odvija preuredba gena za genski receptor), a potom u sekundarnim limfnim organima gdje se uz površinske stanične molekule pojavljuje i koreceptorski kompleks (CD21). Kao takav, zreli naivni limfocit B, sposoban je reagirati s antigenom. Pri susretu s antigenom u limfnom čvoru, dolazi do sekundarne diferencijacije limfocita B. Kako bi učinkovito reagirao na antigen, limfocitu B je potrebna pomoć limfocita T. Pod utjecajem pomagačkih limfocita i njihovih citokina zbiva se gensko prekapčanje razreda protutijela (umjesto proizvodnje imunoglobulina M, limfociti B skreću u smjeru proizvodnje drugih razreda imunoglobulina poput IgA, IgG, ili IgE). Istovremeno se događaju somatske hipermutacije genskog segmenta koji kodira varijabilnu regiju receptora. Na taj način stvorit će se receptor s afinitetom jačim za antigen u odnosu na izvorni receptor. Rezultat sekundarne diferencijacije je stvaranje zrelog limfocita B koji će biti sposoban diferencirati se u plazma stanice koje luče protutijela.⁶⁶

Limfociti T sazrijevaju u timusu (tada ih nazivamo timocitima) gdje se stvaraju zrele imunokompetentne stanice koje uče razlikovati "tuđe" od "vlastitog" zahvaljujući posebno razvijenom mehanizmu selekcije. U početku timociti ne izražavaju receptor ni za antigen (TCR) niti za signalnu molekulu CD3, te su dvostruko negativni (CD4-, CD8-), no ubrzo se počinje sintetizirati T receptor koji potiče daljnje stvaranje koreceptorskih molekula CD4 i CD8, pa molekule postaju dvostruko pozitivne (CD4+CD8+). Sada su limfociti spremni za odabir tj. selekciju. Pozitivna selekcija podrazumijeva preživljavanje onih limfocita koji imaju slabi afinitet za prepoznavanje vlastitog. Pri tome limfociti gube jedan od koreceptora (CD4 ili CD8) i postaju jednostruko pozitivne stanice; pomagački ili citotoksični limfociti T. Za vrijeme negativne selekcije, odumiru stanice s tendencijom jake reakcije na vlastito. Selekcija je iznimno važna kako se u perifernu krv ne bi otpustili autoreaktivni limfociti.^{59,61,66}

Kada je riječ o postnatalnoj limfopoezi, zdrava, donošena novorođenčad ima viši apsolutni broj limfocita uz viši omjer CD4/CD8 (3,5:4,1) u odnosu na djecu starije dobi. Citokini IL-4,

IL-5, IL-6 i IL-13 koje luče Th2 limfociti zastupljeni su u višim koncentracijama u novorođenčadi, dok limfociti Th1 proizvode male količine IL-2 i IFN- γ .⁶⁶

Citotoksični limfociti T (CD8+) stvaraju se tek sredinom trudnoće (18. - 23. tjedan), no sposobnost stvaranja citotoksičnih limfocita pri rođenju je oko 50% slabija nego kod odraslih, te je stoga novorođenče podložnije virusnim infekcijama.⁶⁶

U krvi pupkovine novorođenčeta postotak NK stanica većinom je niži u odnosu na perifernu krv djece i odraslih. Međutim, apsolutni broj NK stanica je otprilike podjednak, zahvaljujući višem broju limfocita.⁶⁶ Moguća je i smanjena citotoksičnost NK stanica.⁶⁷

Upravo zbog nedovoljno razvijene nespecifične imunosti (smanjena funkcija fagocita i neutrofila, snižene koncentracije komponenti komplementa – osobito C3b) novorođenčad je izložena većem riziku od težih bakterijskih i gljivičnih infekcija.^{66,67}

Za novorođenčad je posebno važna uredna funkcija dendritičkih stanica. Pri prvom susretu s antigenom, APC su sposobne proizvesti IL-12 i tako potaknuti Th1 reakcije.⁶⁷

Mnoge humoralne imunološke reakcije ne postižu punu zrelost tijekom intrauterinog razvoja, a neke ni u prvim mjesecima ili godinama života. Posljedica smanjene sposobnosti fetusnog imunostava u lučenju protutijela kao i nedostatak antigenske stimulacije jest niska razina imunoglobulina u serumu novorođenčeta - IgM se mjeri u koncentraciji od 10% koncentracije odraslih osoba, dok su koncentracije IgD, IgA i IgE niske ili nemjerljive.

Fetus stječe sposobnost stvaranja protutijela oko 10. tjedna gestacije, kada se prvi puta, u manjoj koncentraciji mogu ustanoviti IgM i IgE protutijela.

Proizvodnja vlastitih IgM protutijela značajno se povećava od šestog dana po rođenju, s tendencijom daljnjeg brzog porasta pa tako već u prvoj godini života doseže koncentraciju kao u odraslih. Vlastita IgG protutijela fetus počinje stvarati u 11. tjednu gestacije. Budući da se IgG protutijela podrazreda IgG1, IgG3 i IgG4 od 12. tjedna gestacije, a osobito u trećem tromjesječju prenose transplacentarno, novorođenče imunokompetentne majke najčešće je zaštićeno od infekcija virusima i gram pozitivnim bakterijama.

Nezrelost limfocitne funkcije, nedostatak prethodne antigenske stimulacije kao i nedostatak majčinih IgM protutijela, glavni su uzroci podložnosti novorođenčeta infekcijama uzrokovanim gram negativnim bakterijama. Naime, imunostni sustav zdravog djeteta nije u mogućnosti proizvesti protutijela na polisaharidne antigene sve do druge godine života.

Upravo iz tog razloga pri razvoju cjepiva protiv bakterija *Haemophilus influenzae* i *Streptococcus pneumoniae*, polisaharidni antigen mora biti vezan za proteinski nosač.

Majčini IgG postupno nestaju iz krvi dojenčeta oko šestog mjeseca života, a vlastita IgG protutijela dosegnu koncentracije kao u odraslih u dobi od osam do 12 godina života. Vlastita IgA protutijela detektabilna su tek po rođenju, oko 15. dana života, a plato dosežu u osmoj godini života.⁶⁶

1.6.4. Imunološki nadzor krvno moždane barijere

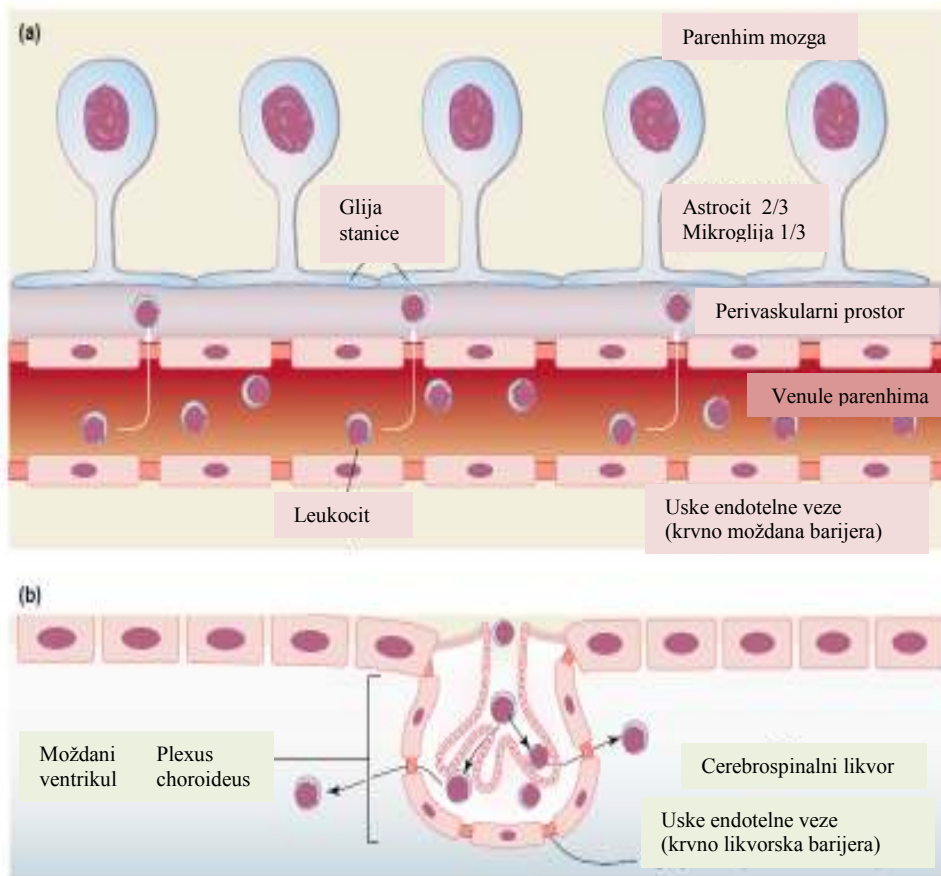
Pretpostavku o SŽS- u kao mjestu bez ikakvog imunološkog nadzora, promijenile su brojne novije studije dokazujući kako memorijske T stanice mogu migrirati kroz krvno moždanu barijeru (KMB), ali i krvno likvorsku barijeru (KLB).⁶⁸⁻⁷¹

Ulazak limfocita T u SŽS kroz KMB strogo je reguliran te se odnosi samo na aktivirane (memorijske limfocite) karakterističnog adhezijskog molekularnog fenotipa (CD4+).⁷⁰

Unutar zdravog organizma, ulazak limfocita u SŽS je zahvaljujući intaktnoj KMB primjereno kontroliran, no u slučaju upalnih zbivanja leukociti prolaze kroz oštećenu KMB i nakupljaju se u perivaskularnim prostorima. Ovdje encefalitogene (memorijske) T-stanice, koje su kao naivni limfociti u sekundarnim limfnim tkivima prethodno susrele specifični antigen te tako postale memorijske T stanice, mogu susresti i prepoznati specifični antigen predstavljen od strane APC. To je čas reaktivacije antigen-specifičnih T-stanica, potreban za početak upale i aktivacije KMB koja proizvodi specifične signale potrebne za ulazak upalnih stanica kroz perivaskularne prostore u parenhim SŽS-a.^{69,70}

Mirujuće T stanice s istom antigenskom specifičnošću ne mogu prolaziti kroz KMB.⁷⁰

Do sada su poznata tri različita puta ulaska leukocita u SŽS. Leukociti mogu migrirati iz krvi u CSL kroz koroidni pleksus ili meningealne krvne žile. Drugi način podrazumijeva prelazak leukocita iz krvi u perivaskularni i subarahnoidni prostor, dok trećim načinom leukociti direktno prelaze iz krvnih žila kroz KMB u SŽS.⁷¹



Prema: Ubogu EE, Cossoy MB, Ransohoff RM. The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. Trends Pharmacol Sci 2006;27:48-55

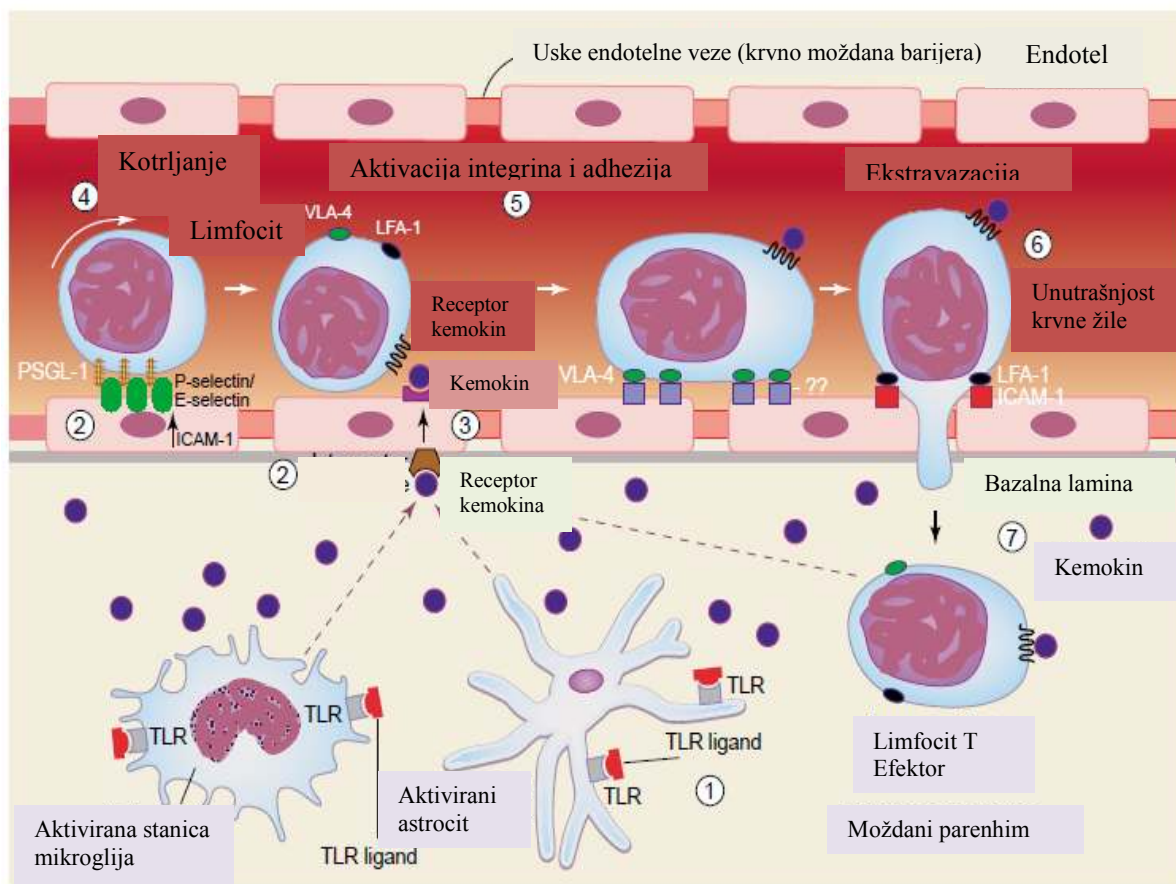
Slika 2. Putovi ulaska leukocita u SŽS

Slika prikazuje dva glavna načina ulaska leukocita u SŽS:

- KMB se sastoji od parenhimskih venula s usko povezanim vezama između endotelnih stanica (eng. tight junctions). Strelice prikazuju pomak leukocita iz parenhimskih venula u perivaskularni prostor, iz kojeg leukociti mogu ulaziti u parenhim mozga. Glija stanice su sastavljene od astrocitnih nastavaka (dvije trećine) i mikroglije (jedna trećina). Ekstravazacija leukocita može se odvijati kroz endotelne stanice KMB i kroz međustanične veze.
- KLB sastoji se od epitelnih stanica koroidnog plexusa, međusobno povezanim čvrstim vezama. Moždani ventrikuli su okruženi endotelnim stanicama koje ne sudjeluju u strukturi KLB. Strelice pokazuju pomak leukocita iz krvnih žila koroidnog plexusa prema epitelnim stanicama koroidnog plexusa i CSL-u.
- Ulazak leukocita u SŽS tijekom rutinskog imunološkog nadzora regulira KLB, dok je uloga KMB važna u patološkim stanjima.

Kratice: CSF- cerebrospinal fluid

Ulazak leukocita u SŽS odvija se u četiri koraka (u engleskoj literaturi označeni kao tethering, rolling, activation, diapedesis). Proces počinje inicijalnim kontaktom leukocita i površine endotelne stanice u kojem važnu ulogu posrednika imaju površinske stanične adhezijske molekule integrini (eng. Leukocyte function associated antigen 1; LFA-1 ili α -integrini) i selektini (eng. P-selectin glycoprotein ligand 1; PSGL-1). Zatim se leukociti kotrljaju po stijenci krvne žile i pomoću vlastitog G-proteinskog receptora vežu za kemokine smještene na membrani endotelnih stanica. Tim vezanjem nastaju konformacijske promjene u leukocitu i aktivacija integrina. Omogućeno je pozicioniranje leukocita na mjesto u endotelu najprikladnije za posljednji korak ekstravazacije leukocita - diapedezu koja rezultira infiltracijom tkiva upalnim stanicama.⁷¹



Prema Ubogu EE, Cossoy, Ransohoff RM. The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:48-55.

Slika 3. Prikaz upale u SŽS-u i potencijalni mehanizmi migracije limfocita kroz KMB

tijekom infekcije. Aktivacija Toll-like receptora (TLR) putem njihovih liganada potiče sekreciju proupalnih citokina (Tumor necrosis factor alfa; TNF- α) (1). U reakciji APC na antigen stvaraju se proupalni citokini koji potiču aktivaciju endotela i sekreciju kemokina označenih na slici plavim kružićima (2). Kemokini prolaze kroz aktivirani endotel (3), a limfociti se kotrljaju po tom endotelu (4). Zahvaljujući aktivaciji limfocitnih integrina limfociti se mogu pričvrstiti za endotel (5). Dijapedezom limfociti prolaze kroz aktivirani endotel i sudjeluju u eliminaciji patogena (6).

Kratice: GAG glikozaminoglikani; ICAM-1 – eng. Intercellular adhesion molecule 1; LFA-1 – eng. Leukocyte function associated antigen 1; PSGL-1 – eng. P-selectin glycoprotein ligand 1; VLA-4 – eng. Very late antigen 4

1.6.5. Uloga kemokina u upalnim bolestima središnjeg živčanog sustava

Migracija limfocita kroz KMB u CSL, kao odgovor na infekciju patogenima posredovana je kemokinima i njihovim odgovarajućim receptorima.

Kemokini (kemotaktični citokini) su strukturalno i funkcionalno heterogena grupa niskomolekularnih citokina (veličine 8-10 kDa). Luče ih imunosne i upalne stanice, u prvom redu makrofagi i dendritičke stanice nakon poticaja produktima mikroorganizma ili bilo kojeg upalnog podražaja tkiva, ali ih mogu lučiti i gotovo sve stanice u organizmu.

Već izlučeni proupalni citokini potiču stvaranje kemokina i ta međusobna interakcija (kaskada) ima važnu ulogu u nespecifičnoj otpornosti na mikroorganizme.⁶⁰

Biološki učinak ostvaruju vežući se na receptore ciljnih stanica, koji pripadaju grupi G-proteinskih receptora, a jedan receptor može ostvariti interakciju s više kemokina.^{60,62,73,74}

Kemokini posreduju u mnoštvu bioloških procesa uključujući neurološki razvoj, prijenose između sinapsa, diferencijaciju i aktivaciju limfocita T, apoptozu, angiogenezu i reakcijama odbacivanja transplantata, no njihova najvažnija uloga odražava se u upalnim procesima jer potiču aktivaciju i migraciju leukocita na mjesto upale što omogućava zaustavljanje invazije patogena.^{60,62,73-79}

Zahvaljujući kemokinima, kao i interakciji koju ostvaruju s upalnim stanicama imunološkog sustava, upalni odgovor usmjerit će se u smjeru reakcija stanične (Th1) ili humoralne imunosti (Th2) i time odrediti tijek i ishod infektivne bolesti.⁷²

Rana proizvodnja kemokina važna je za oblikovanje imunološkog odgovora prema dobro koordiniranom obrascu.

Kemokini sudjeluju u imunološkim reakcijama od samog početka, najprije kao regulatori primarnog susreta APC i limfocita u limfnom čvoru (pretvorba naivnog limfocita T u efektorsku stanicu) generirajući specifični imunološki odgovor, a zatim kao svojevrsni vodiči efektoru na mjesto upale.⁷⁵

U upali u SŽS-u izmjenjuje se složeni sustav potencijalnih mehanizama involviranih u migraciju limfocita kroz KMB. Sama reakcija predočavanja antigena od strane APC limfocitu T (efektoru) uzrokuje stvaranje proupalnih citokina IFN- γ i TNF- α , koji potiču stanice KMB i stanice parenhima mozga (astrociti, neuroni, glija) na proizvodnju kemokina. Kemokini se vežu na glukozaminoglikane koji se nalaze na površini endotelne stanice KMB te nastaje kemokinski gradijent i počinje migracija limfocita iz krvi u SŽS.⁷⁸⁻⁸⁰

U prostorima parenhima mozga limfociti pomažu u čišćenju celularnog debrisa, uništavaju patogene otpuštanjem enzima te počinje proces reparacije tkiva.⁷⁹

Na mjestu infekcije u parenhimu mozga, limfociti mogu i dalje proizvoditi citokine, stimulirajući tako mirujuće stanice na proizvodnju kemokina i posljedično poticanje daljnjeg vala migracije upalnih stanica u SŽS. Taj obrazac međusobne interakcije i kaskadne aktivacije kemokina i citokina, osnova je mnogih studija temeljenih na istraživanju autoimunih tj. kroničnih demijelinizacijskih bolesti SŽS-a.⁷⁸⁻⁸²

Danas je poznato 20 kemokinskih receptora i 50 kemokina koje klasificiramo u 4 različite grupe: CC, CXC, CX3C, i C ovisno o redosljedu aminokiselina nakon pojave prvog cisteina (C) (tablica 1).^{60,62,73,74}

Kemokini grupe CC privlače monocite-makrofage i limfocite, a u različitom stupnju i druge fagocitne stanice, NK stanice, bazofile i eozinofile.^{60,78,79} Najpoznatiji predstavnik je kemokin CCL5 (RANTES, eng. Regulated Upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted) kojeg sintetiziraju aktivirani limfociti T, a kemotaktični učinak iskazuje na limfocite T, makrofage, bazofile, eozinofile, granulocite i dendrite.^{60,78,79}

Kemokini grupe CXC podijeljeni su u dvije podskupine (ELR grupu koja sadrži karakteristični tripeptidni motiv glutamin-leucin-arginin i non-ELR grupu koja ne sadrži navedenu aminokiselinsku sekvencu). ELR grupa djeluje kemotaktički na neutrofilne leukocite i to primarno u smislu kemoatrakcije i aktivacije neutrofila, poticanja oslobađanja mijeloperoksidaze i drugih enzima.^{76,78}

Kemokini CXCL9 (eng. Monokine induced by interferon gamma; MIG), CXCL10 (eng. Interferon gamma inducible protein 10; IP-10), CXCL11 (eng. Interferon inducible T-cell chemoattractant; I-TAC) pripadaju grupi non-ELR CXC kemokina. Ovi kemokini nisu detektabilni u većini nelimfoidnih tkiva u fiziološkim uvjetima, međutim, njihovo stvaranje je u znatnoj mjeri potaknuto tijekom infekcije, ozljede ili upalnih zbivanja.⁷⁶

CXCL9, CXCL10 i CXCL11 su molekule najsličnije jedna drugoj u odnosu na ostale kemokine. Proizvode ih stanice poput monocita, neutrofila, endotelnih stanica, fibroblasta, dendrita ili astrocita nakon stimulacije citokinom IFN- γ , izlučenim od strane limfocita T ili

NK stanica kao odgovor na prisutnost antigena u organizmu. Stoga su ovi kemokini poznatiji pod imenom IFN- γ inducibilni kemokini.^{75,76}

Sva tri kemokina sudjeluju u reakcijama stanično posredovane imunosti (infekcije, reakcije odbacivanja transplantata, reakcije autoimunosti) zahvaljujući vezanju na CXCR3 receptor koji pripada obitelji G-proteinskih receptora, a nalazi se na aktiviranim Th1 limfocitima i NK stanicama,^{75,76} mikrogliji i dendritičkim stanicama.⁸²

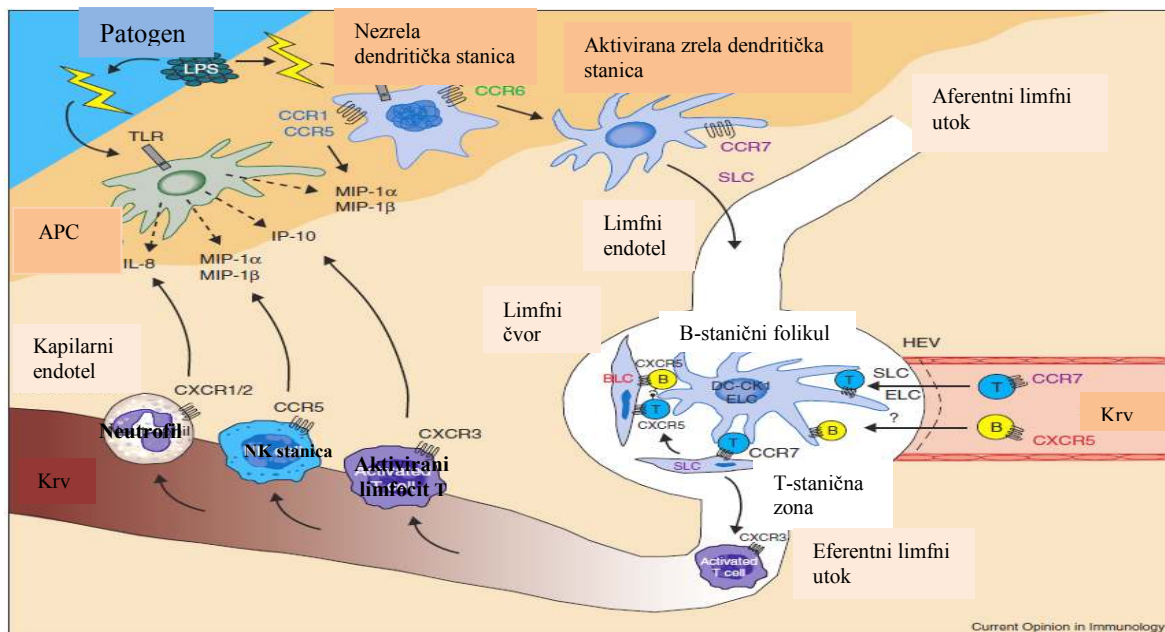
Vezanjem na CXCR3 receptor kemokini potiču migraciju aktiviranih memorijskih limfocita T (ali ne i naivnih limfocita T) i NK stanica na mjesto upale, te samim tim postaju važni čimbenici u razvoju i održavanju protektivnog Th1 odgovora u obrani domaćina od virusne infekcije SŽS-a.^{75,76,78,82}

Čini se da kemokinska aktivnost u određenoj fazi bolesti može regulirati ishod bolesti. Tijekom akutne faze virusno inducirane demijelinizacijske bolesti CXCL9 i CXCL10 potiču priljev upalnih imunih stanica u SŽS i tako svladavaju viralnu replikaciju, dok kronična ekspresija CXCL10 može uzrokovati neuronalnu smrt.^{76,80}

Osobito je važna uloga IFN- γ inducibilnih kemokina kao posrednika u imunološkim reakcijama u smislu povezivanja ili čak prevođenja urođenog imunološkog odgovora posredovanog NK stanicama u specifični imunološki odgovor za koji su ključni efektorski limfociti T.⁷⁵

Prema Lusterovoj studiji, nakon ulaska u organizam antigen je prepoznat od strane makrofaga pomoću TLR. Sama aktivacija TLR dovodi do ranog otpuštanja kemokina iz makrofaga i rezidualnih stanica tkiva, ali i potiče aktivaciju NK stanica urođene imunosti kao važnog izvora IFN- γ .⁷⁵

IFN- γ inducibilni kemokini privlače antigen specifične CD4+ i CD8+ limfocite na mjesto upale, te se nastavljaju reakcije specifične imunosti.⁷⁵



Prema Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2002;14:129-35

Slika 4. Aktivacija Toll-u sličnih receptora i dendrita

Kemokini usmjeravaju promet dendrita, T i B stanica potrebnih za početak imunološkog odgovora. Aktivacijom TLR, LPS na površini bakterijskih patogena stimulira lokalno otpuštanje kemokina MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4) i IP-10 (CXCL10). Nezreli dendriti privučeni su na mjesto upalnog zbivanja aktivacijom kemokinskih receptora CCR1, CCR5 i CCR6 koji se nalaze na njihovoj površini. Nezrele dendritičke stanice su učinkovite u hvatanju antigena, no moraju sazrijeti i diferencirati se u stanice koje imaju sposobnost aktivacije naivnih limfocita. Okoliš u koji su privučene nezrele dendritičke stanice sadrži molekularne čimbenike patogena (npr. LPS) koji su prepoznati od strane receptora PRR (npr. CD14 i TLR4) te potiču diferencijaciju i sazrijevanje limfocita. Kemokin SLC (proizvode ga stromalne stanice limfnih čvorova) izražen je na endotelu aferentnog limfnog sustava, a ima važnu ulogu u preusmjeravanju migracije zrelih dendritičkih stanica. Kemokini SLC i BLC sudjeluju u imunološkoj reakciji na način da dovode naivne limfocite T i B iz periferne krvi i pozicioniraju ih na određeno mjesto u limfnim čvorovima, ali pomažu i u interakciji limfocita i APC. Nakon susreta s APC u limfnom čvoru, aktivirani limfociti se vraćaju na mjesto upale slijedeći kemokinski gradijent stvoren lokalno na mjestima infekcije. Kemokini poput IP-10 (CXCL10), koje induciraju LPS i IFN- γ , a vežu se za CXCR3 receptor (izražen na aktiviranim T limfocitima) važni su u imunološkom odgovoru posredovanom Th1 stanicama.

Kratice:

APC - Antigen-predočna stanica (eng. Antigen presenting cell)

LPS - Lipopolisaharid (eng. Lipopolysaccharide)

PRR - Receptori za prepoznavanje molekularnih uzorka (eng. Pattern recognition receptor)

TLR - Toll-u sličan receptor (eng. Toll like receptor)

Osim navedenih uloga, non-ELR kemokini imaju i druge aktivnosti, poput stimulacije leukocita na proizvodnju IFN- γ , supresije angiogeneze, pa čak i antibakterijsku funkciju.⁷⁶

Predmet su mnogih istraživanja i to ne samo onih vezanih za akutne virusne infekcije, već i studija o kroničnim demijelinizacijskim bolestima SŽS-a, bakterijskih meningitisa, neuroborelioze, HIV-demencije, optičkog neuritisa, Beçhetove i Alzheimerove bolesti.⁷⁶

Prema najnovijoj kliničkoj studiji provedenoj na skupini pedijatrijskih bolesnika oboljelih od Kawasakijske bolesti, CXCL10 je tijekom akutne faze bolesti, detektiran u visokim koncentracijama u serumu oboljelih. Obzirom da su s oporavkom od bolesti zamijećene niže vrijednosti CXCL10, praćenje koncentracije ovog kemokina može biti dobar pokazatelj (biomarker) regresije bolesti.¹²⁰

Ekspresija CXCL10 je prvi puta opisana u kortikalnim neuronima laboratorijske životinje (štakora) nakon moždane ishemije. CXCL10 su proizveli ozlijeđeni neuroni vrlo brzo nakon ishemije (u roku 3-12 sati), no ekspresija je bila kratkotrajna i prolazna, dok je ekspresija CXCL10 od strane astrocita bila primjećena kasnije, no duže je trajala (15 dana).⁷⁴

CXC kemokini imaju i neuroprotektivnu ulogu. Nakon ozljede neuroni otpuštaju signale (kemokine CXCL10, CCL2) koji potiču mikrogliju na reparaciju oštećenih neurona.⁷⁴

CXCL11 veže se za CXCR3 receptor jačim afinitetom u odnosu na ostale IFN- γ inducibilne kemokine. Mogu ga proizvoditi astrociti, monociti, bronhalne i crijevne epitelne stanice, endotelne stanice, makrofagi i neutrofilii. Postoje dokazi da CXCL11 može utjecati na migraciju različitih podvrsta zrelih timocita tijekom limfopoeze u timusu. Često se opisuje u bolestima poput alergijskog kontaktnog dermatitisa, ateroskleroze, T staničnog limfoma, kao i imunološki posredovanih poremećaja SŽS-a poput multiple skleroze (MS).⁸⁸

Razlikujemo dva oblika CXCR3 receptora; CXCR3-A (potiče staničnu proliferaciju i migraciju) i CXCR3-B receptor (posreduje u aktivaciji signala potrebnih za inhibiciju staničnog rasta). Kemokini CXCL9, CXCL10 i CXCL11 vežu se na oba oblika CXCR3 receptora, no različitim afinitetom. Novija istraživanja opisuju važnu ulogu CXCR3-B receptora u inhibiciji staničnog rasta mehanizmom apoptoze. Obzirom da se ovaj receptor ne nalazi samo na stanicama koje sudjeluju u imunološkoj reakciji, već i na drugim stanicama (stanice raka), evidentna je njegova uloga u tzv. antitumorskoj imunosti. CXCR3-B receptor ima važnu ulogu u angiogenezi.⁷⁷

CXCL12 (eng. Stromal cell derived factor 1; SDF-1) tijekom upalnih zbivanja proizvode astrociti. Veže se na receptor CXCR4. Autokrinim signalima može stimulirati proliferaciju astrocita, te proizvodnju drugih kemokina i citokina (npr. TNF- α). Spominje se i njegova esencijalna funkcija u hematopoezi, organogenezi, embriogenezi te u fetalnom neuronalnom razvoju tj. adekvatnom formiranju neuronalne mreže.⁷⁸⁻⁷⁹

Fraktalkin s kemotaktičnim i adhezijskim djelovanjem na limfocite T, monocite i NK stanice jedini je poznati predstavnik grupe CX3C.^{78,79}

Kemokini grupe C (najpoznatiji predstavnik limfotaktin) privlači limfocite T i NK stanice.^{60,76,78,79}

Tablica 1. Klasifikacija kemokina

Podjela kemokina prema skupinama	Broj aminokiselina nakon pojave prvog cisteina	Populacija leukocita	Primjeri
CC	0	Mononukleari, eozinofili, bazofili, NK stanice	CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL20
CXC	1	Kemokini s ELR domenom: Neutrofili	CXCL5, CXCL8
		Kemokini bez ELR domene: Različiti tipovi stanica	CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13
CXC3C	3	Monociti, NK stanice	CX3CL1
C	1	T stanice, NK stanice	CXCL1, CXCL2

Prema Ubogu EE, Cossoy MB, Ransohoff RM. The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. Trends Pharmacol Sci 2006;27:48-55

Kratice:

ELR: Aminokiselinska sekvenca (tripeptidni motiv glutamin-leucin-arginin)

NK: Natural killer

Tablica 2. Osobitosti CXC kemokina

Naziv kemokina	Kromosom	Ciljna stanica	Specifični receptor
CXCL9	4	Aktivirani limfociti T (Th1>Th2), NK stanice, limfociti B, endotelne stanice, dendritičke stanice	CXCR3 A/ CXCR3B
CXCL10	4	Aktivirani limfociti T (Th1>Th2), NK stanice, limfociti B, endotelne stanice	CXCR3 A/ CXCR3B
CXCL11	4	Aktivirani limfociti T (Th1>Th2), NK stanice, limfociti B, endotelne stanice	CXCR3 A/ CXCR3B CXCR7
CXCL12	10	CD34+ stanice koštane srži, timociti, monociti, makrofagi, naivni aktivirani limfociti T, B limfociti, dendritičke stanice	CXCR4, CXCR7

Prema Bernard Malissen i sur. The induced responses of innate immunity. U: Murphy K.P. i sur, ur. Janeway's immunobiology, 8.izd. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2012, str.75-123.

Kratice: NK stanice (Natural killer stanice)

1.7. STUDIJE O EKSPRESIJI KEMOKINA U UPALNIM BOLESTIMA SŽS-a

Studije provedene na ljudima i eksperimentalnim životinjama, pokazuju složenost i varijabilnost obrazaca sinteze kemokina u upalnim bolestima SŽS-a.

Dosada objavljene studije mogu se podijeliti na kliničke i eksperimentalne studije. Iako kreirane s primarno različitim ciljem imaju zajedničku okosnicu temeljenu na proučavanju uloge kemokina u upalnim bolestima SŽS-a *in vivo*.^{80-87, 89-100}

Biološka važnost kemokina nedvojbeno je dokazana na ljudima i eksperimentalnim životinjama, neovisno o tome da li je riječ o poticanju migracije i aktivacije upalnih stanica u svrhu obrane domaćina od patogena ili o trajnoj ekspresiji kemokina te direktnom posredovanju u neurotoksičnosti i staničnoj smrti.

Za razliku od eksperimentalnih studija koje se provode na eksperimentalnim animalnim modelima, a kreirane su s izravnim ciljem proučavanja obrazaca ponašanja kemokina i kemokinskih receptora u odnosu na diferentnu imunopatologiju bolesti,⁸⁰⁻⁸⁷ novije kliničke studije provode se na skupini odabranih bolesnika, a baziraju se na povezanosti ekspresije kemokina u CSL-u i klinički relevantnih parametara u odnosu na progresiju bolesti.⁸⁹⁻¹⁰⁰

U eksperimentalnim studijama posebno je dobro proučena ekspresija kemokina (npr. CCL2, CCL3 i CXCL10, CXCL12) i njihovih receptora kao i već navedena, moguća uloga u imunopatogenezi autoimunog encefalitisa i MS.⁸⁹⁻⁹²

Eksperimentalni autoimuni (alergijski) encefalitis (EAE) kao najčešće korišten model, posredovan je autoantigen-specifičnim CD4⁺ T stanicama, Th1 fenotipa, koje u većim količinama proizvode citokine TNF- α , IFN- γ i IL-2. Ovi proinflammatorni citokini potiču daljnje stvaranje kemokina i posljedičnu infiltraciju tkiva nespecifičnim upalnim stanicama pridonoseći formiranju lezija i demijelinizaciji.⁸¹ Prema rezultatima najnovije eksperimentalne studije, razvoj EAE može biti potaknut i aktivacijom Th17 limfocita. Stoga se pojava EAE povezuje s povišenim koncentracijama citokina (IL-17A i IL-17F).⁸⁴

Za razliku od deskriptivnih studija koje naglašavaju važnu ulogu kemokina CXCL10 i njegovog receptora CXCR3 u stvaranju adekvatnog imunološkog odgovora u smislu kemoatrakcije encefalitogenih T stanica u mozak, funkcionalne studije imaju kontradiktorne rezultate iako su provedene na gotovo sličnim imunopatološkim modelima eksperimentalno uzrokovanih virusnih encefalitisa.

Istraživanje autora Hosking i Lane temeljeno je na neuropatologiji i razumijevanju funkcionalne i biološke uloge kemokina tijekom infekcije SŽS-a neurotrofnim virusima.⁸⁰

Iako prema rezultatima studije neutralizacija CXCL10 tijekom infekcije neurotrofnim virusima HSV (eng. Herpes simplex virus), JHMV (eng. JHM strain of mouse hepatitis virus i WNV (eng. West Nile virus) u velikoj mjeri smanjuje migraciju T stanica u SŽS, čime se sprječava adekvatna kontrola infekcije i pospješuje loš ishod bolesti, autori navode i primjer direktnog posredovanja kemokina u neurotoksičnosti i staničnoj smrti.⁸⁰

Arrimili i sur. su blokiranjem CXCR3 receptora kod eksperimentalnih miševa postigli vidljivu redukciju infiltrirajućih upalnih stanica te posljedično nižu incidenciju pojave EAE.⁸¹

Međutim, u studiji objavljenoj sedam godina kasnije, Müller i sur. upućuju na protektivnu ulogu CXCR3 u autoimuno posredovanim bolestima.⁸²

Naime autori razlikuju dvije vrste T limfocita - T stanice efektore i regulacijske T stanice. Prema rezultatima studije, glavna funkcija CXCR3 receptora u EAE ne očituje se u privlačenju T stanica u tkivo mozga, već u zadržavanju regulacijskih T stanica u perivaskularnom prostoru gdje se vrši interakcija između tih stanica i T stanica efektora, što zaustavlja oštećenje parenhima bijele tvari mozga.⁸²

Nadalje, autori navode kako je protektivna uloga CXCR3 receptora iznimno značajna u fazi oporavka od bolesti te smatraju da inaktivacija CXCR3 receptora može pridonijeti težem oporavku kao i razvoju kronične bolesti.⁸²

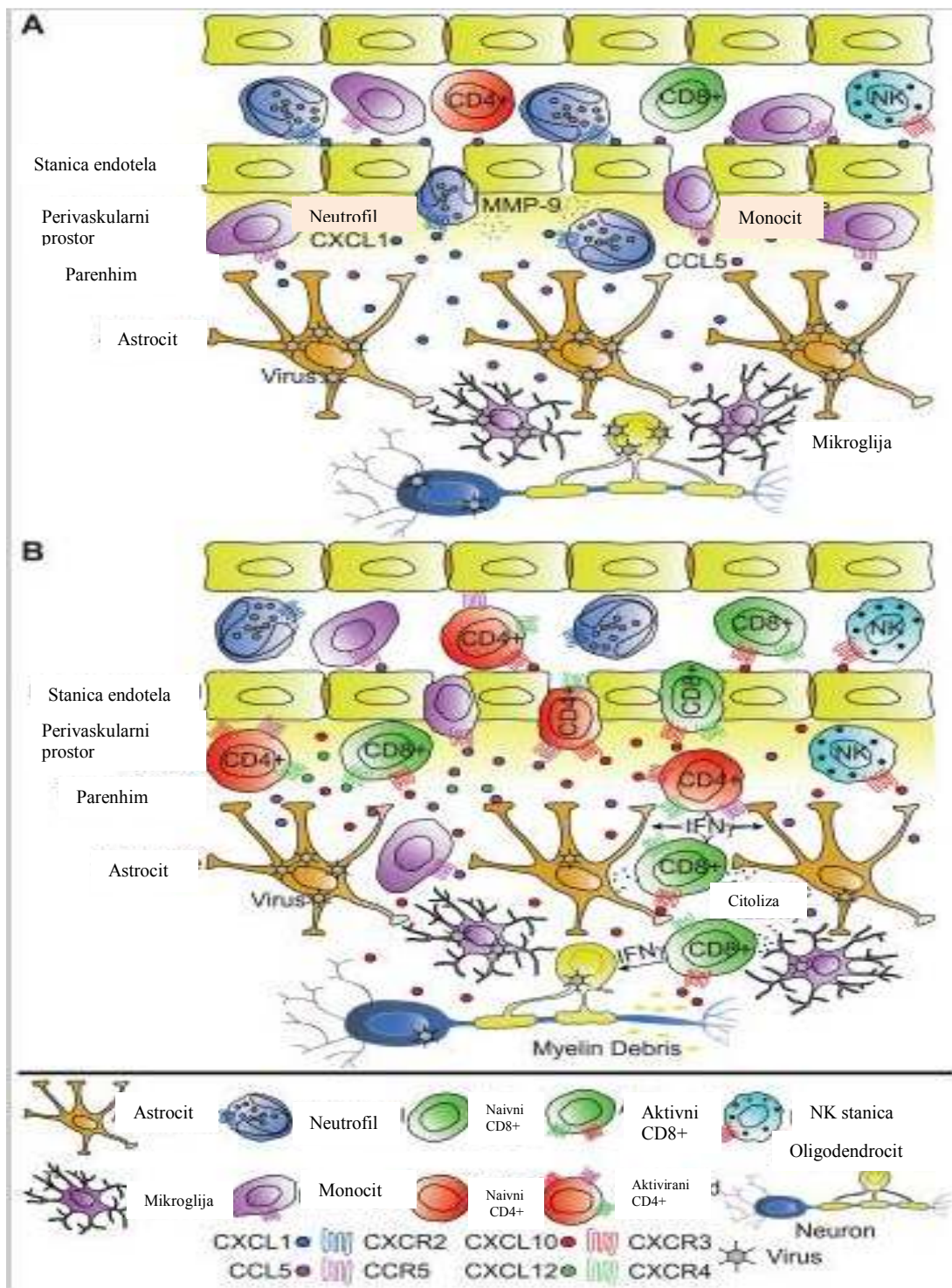
Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja uloga kemokinskog receptora CXCR3 u upalnim bolestima SŽS-a se čini složenom te vrlo vjerojatno ovisi o vrsti involviranih stanica kao i o imunopatologiji bolesti.

Iako je u neuroimunologiji uloga kemokina CXCL10 primarno tj. u razdoblju njegove rane ekspresije protektivna (zbog poticanja i održavanja odgovora Th1 limfocita te proizvodnje antivirusnog citokina IFN- γ), u slučaju trajne ekspresije CXCL10 može indukcijom migracije

limfocita potaknuti začarani krug pojačanog ulaska za mijelin specifičnih T stanica na mjesto infekcije u SŽS-u.⁸³

Upravo ta hipoteza potkrijepljena je u više relevantnih novijih eksperimentalnih studija, čiji bi rezultati mogli biti od kliničke važnosti i rasvijetliti izravnu povezanost između ekspresije kemokina i težine bolesti. Perzistirajuća infekcija virusom mišjeg hepatitisa, dovodi do trajne ekspresije kemokina CXCL10, koji će uzrokovati kontinuiranu infiltraciju mjesta infekcije imunim stanicama te posljedično lučenje novog kemokina CCL5 (RANTES). Ovaj proces znatno pridonosi imunološki posredovanoj demijelinizacijskoj bolesti. Neutralizacijom navedenih kemokina anti - CXCL10 serumom smanjuje se ekspresija citokina IFN- γ , kemokina CCL5, te infiltracija tkiva limfocitima T i makrofagima, a samim time se koči i demijelinizacijski proces, te dolazi do kliničkog oporavka.^{80,83,86}

Sličnu kliničku važnost imaju rezultati studije provedene na uzorcima miševa oboljelih od japanskog encefalitisa, gdje povišena koncentracija kemokina CXCL10 ne samo da pridonosi ozbiljnosti kliničkih manifestacija bolesti, već se i povezuje s povišenim koncentracijama IFN- γ te je IFN- γ karakteriziran kao biljeg progresije infekcije.⁸⁵



Prema Hosking MP, Lane TE. The role of chemokines during viral infection of the CNS. *PLoS Pathog* 2010;6:7

Slika 5. Moguća uloga kemokina u privlačenju stanica urođene imunosti (A) i limfocita (B) u SŽS tijekom eksperimentalne akutne infekcije neurotrofnim virusom. Jedan do tri

dana nakon virusne infekcije aktivirani i/ili virusom inficirani astrociti, mikroglia i endotelne stanice proizvode kemokine koji privlače imune stanice u SŽS. Među prvim stanicama koje ulaze u SŽS su neutrofil koji ulazak ostvaruju zahvaljujući kemokinima (npr. CXCL1 koji se veže na odgovarajući CXCR2 receptor). Kemokin CCL5 omogućuje ulazak monocita u SŽS, vežući se na njihov CCR5 receptor. Neutrofil i monociti sudjeluju u razgradnji KMB, dijelom oslobađanjem matrix metaloproteinaze MMP-9 i tako omogućuju uspješnu infiltraciju SŽS-a virus-specifičnim limfocitima. Tijekom akutne faze bolesti astrociti, mikroglia, neuroni i endotelne stanice nastavljaju izlučivati kemokine koji privlače aktivirane limfocite T, NK stanice i monocite u SŽS.

Limfociti CD8⁺ i CD4⁺ vežu se vlastitim staničnim receptorom (CXCR3 i/ili CCR5) za kemokine CXCL10 i CCL5 te ostvarujući direktnu citolitičku aktivnost i/ili sekreciju citokina posreduju u kontroli virusa. CXCL12 koji se veže na CXCR4 receptor može zadržati limfocite T unutar perivaskularnog prostora i tako regulirati prolazak limfocita T u parenhim mozga, ali i spriječiti učinkovito čišćenje parenhima mozga od virusa.

Kada je riječ o encefalitisu uzrokovanom virusom Zapadnog Nila (WNV), gubitak funkcije CXCL10 ili njegovog receptora CXCR3 imunodeplecijom ili genetičkom inaktivacijom, rezultira smanjenim nakupljanjem CD4⁺ ili CD8⁺ T stanica u SŽS-u s pojačanom aktivacijom virusa i staničnom smrću.⁸⁷ Stoga je evidentno važno postojanje adekvatnog protuupalnog odgovora, u smislu proizvodnje kemokina CXCL10 od strane virusom zahvaćenih neurona, posljedica čega je kemoatrakcija CD8⁺ T stanica koje svladavaju infekciju efektivnim čišćenjem neurona od WNV, što pridonosi smanjenju stope letaliteta.^{76,87}

Druga skupina studija bavi se bolesnicima oboljelima od akutnih upalnih bolesti SŽS-a gdje je posebna pažnja usmjerena na kemokine kao važne imunomodulatore i pokretače specifičnog obrambenog upalnog odgovora. Literaturni podaci o ekspresiji kemokina u CSL-u bolesnika s infektivnim bolestima su oskudni i uglavnom se temelje na istraživanju kemokina CXCL10⁹³ i CXCL13⁹⁴ kao mogućeg ranog dijagnostičkog biljega neuroborelioze ili biološke uloge kemokina CCL3, CCL5, CXCL10, CXCL11 i CXCL13 u bolesnika s krpeljnim meningoencefalitisom (KME) te ne obuhvaćaju pedijatrijsku populaciju.^{95,96}

Prema rezultatima studije Lepej i sur. dobivenih kod bolesnika oboljelih od neuroborelioze, povišena koncentracija kemokina CXCL10 i CXCL11 u CSL-u u odnosu na serum, stvara kemokinski gradijent koji uzrokuje migraciju memorijskih CXCR3+CD4⁺ T limfocita

(pretežno Th1 fenotipa) u CSL. Studija je temeljena na metodama imunološke dijagnostike, a protočna citometrija je korištena u analizi ekspresije CXCR3 receptora na T stanicama CSL-a, dok je metodom enzimskog imunoeseja mjerena koncentracija CXCL10 i CXCL11 u CSL-u i serumu oboljelih od neuroborelioze kao i kontrolne skupine.⁹³

Zajkowska i sur. objavljuju rezultate studije gdje su između ostalih kemokini CXCL10 i CXCL13 izdvojeni kao biomarkeri KME s obzirom da su u oboljelih u povišenim koncentracijama izolirani u CSL-u i serumu. Iako se pad koncentracije CXCL10 u CSL-u i CXCL13 u serumu uzima kao faktor rekonvalescencije, zanimljiva je činjenica da se i nakon razdoblja kliničkog oporavka ovi kemokini još uvijek mogu detektirati u povišenoj koncentraciji u serumu i CSL-u ispitanika.⁹⁶

Prema rezultatima većine studija, kemokini u CSL-u mogu se kvantitativno detektirati u višim koncentracijama u bakterijskom meningitisu u odnosu na virusni meningitis. Ne samo kemokini već i neki citokini (TNF α , IL-1, IL-6 ili G-CSF) izolirani su u visokim koncentracijama u CSL-u oboljelih od bakterijskog meningitisa, što može biti uzrokovano jačom indukcijom citokina kao odgovorom na komponente stanične stijenke bakterije i bakterijske toksine.⁹⁷

Kada je riječ o identifikaciji određenog kemokina kao biljega bakterijskog ili virusnog meningitisa, postoji tek manji broj istraživanja koja kao dodatnu karakteristiku provode i paralelnu usporedbu koncentracije kemokina i kemokinske aktivnosti s uobičajenim laboratorijskim parametrima.^{97,98,99} Jedna od takvih studija je studija Lahrtza i sur. prema kojoj se kod oboljelih od bakterijskog meningitisa IL-8 u CSL-u nalazi u vrlo visokim koncentracijama, no bez korelacije između broja neutrofila i razine IL-8, iako u CSL-u postoji pleocitoza.⁹⁷ Suprotno tome kod oboljelih od virusnog meningitisa, IL-8 može biti dominantni kemokin samo u inicijalnoj fazi bolesti i tada broj neutrofila u CSL-u korelira s njegovom ekspresijom.^{97,99} U jednoj od najnovijih studija, Pinto i sur. potvrđuju ulogu IL-6 i IL-8 u etiologiji akutnog bakterijskog meningitisa (ABM) te izdvajaju kako bi se povišena koncentracija IL-8 u CSL-u ($> 1,685$ ng/dL) mogla smatrati ne samo biljekom ABM-a, već korisnim i pouzdanim parametrom u diferencijalnoj dijagnostici virusnih i bakterijskih meningitisa, dok je IL-6 shvaćen kao nespecifični marker upale jer je zamijećen u podjednako povišenim koncentracijama u virusnom i bakterijskom meningitisu.¹⁰⁰

Prema studiji Fujimori i sur. iz 2013.g. kemokin CXCL13, koji u dosadašnjim studijama nije spominjan u kontekstu markera virusnog meningoencefalitisa, pronađen je u povišenim

koncentracijama kod odraslih bolesnika oboljelih od virusne upalne bolesti SŽS-a, tj. AM, koji imaju tendenciju progresije bolesti u smislu razvoja meningoencefalitisa. Stoga autori studije smatraju kako CXCL13 može biti koristan marker u razmatranju rane progresije bolesti.¹¹⁸

Za sada je u literaturi, kada je riječ o pedijatrijskoj populaciji, dostupan tek manji broj longitudinalnih studija koje prate tijek i ishod virusnih meningitisa te objavljuju podatke od kliničkog ili dijagnostičkog značaja.^{1, 101,104}

Za izdvojiti je prospektivna studija Tešovića i sur. provedena tijekom osmogodišnjeg razdoblja koja ne samo da točno prikazuje više različitih kliničkih i laboratorijskih parametara s primarnim ciljem dokazivanja postojanja postvaccinalnog aseptičnog meningitisa (PAM) u djece nakon cijepljenja cjepivom protiv morbila, mumpsa i rubeole (MMR) koje sadrži soj virusa mumpsa Lenjingrad–Zagreb (L-Z), već zahvaljujući dobrom odabiru oboljelih od NPEV AM kao kontrolne skupine, ima karakter i poredbene studije te prezentira i podatke od kliničke važnosti za usporedbu težine akutnog morbiditeta i eventualnih posljedica u ispitanika oboljelih od PAM-a.¹ Imajući u vidu kako je, iako bez trajnih posljedica, PAM nedvojbeno znatno teža bolest od NPEV AM, analizom usporedbe kliničkih i laboratorijskih podataka (citološke pretrage CSL-a bolesnika), autor studije razvija vlastiti model logističke regresije koji s visokom točnošću i specifičnošću pridonosi razlikovanju PAM od NPEV AM i prije postavljanja etiološke dijagnoze. Uzimajući u obzir rezultate ranije objavljenih studija prema kojima u CSL-u oboljelih od NPEV AM postoji znatna zastupljenost neutrofila,^{97,99,101} za brzo postavljanje dijagnoze je vrijedna i činjenica da kod PAM-a u CSL-u dominiraju limfociti^{1,101,102,103} i to pretežno atipični limfociti tip I (iako se u manjoj mjeri ovi limfociti mogu pronaći i u CSL-u odraslih oboljelih od EV meningitisa i japanskog encefalitisa).^{1,105} Prema rezultatima novije studije provedene u Japanu, Asano i sur. su kod djece oboljele od meningitisa uzrokovanim virusom mumpsa pronašli više koncentracije IL-8, IL-10, IL-12, IL-13 i IFN- γ u odnosu na kontrolnu skupinu (AM bez neuroloških komplikacija).¹⁰⁶

Literaturni podaci o ulozi kemokina i drugih citokina u imunopatogenezi EV encefalitisa vrlo su oskudni u pogledu pedijatrijskih bolesnika. Dostupna su samo dva istraživanja s Tajvana koja se bave proučavanjem uloge citokina odnosno kemokina u imunopatogenezi EV encefalitisa uzrokovanog EV 71.^{107,108}

Wang i sur. u studiji objavljenoj 2007.g. usporedili su obrazac ekspresije citokina IL-1 β , IL-6 i IFN- γ u CSL-u bolesnika s EV 71 encefalitisom (n=57) i bolesnika s nekompliciranim ehovirusnim meningitisom (n=15).¹⁰⁷ Rezultati ove studije pokazali su da postoje statistički značajne razlike u koncentraciji IL-1 β i IFN- γ u CSL-u bolesnika s EV 71 encefalitisom u odnosu na bolesnike s ehovirusnim meningitisom. Posebno je značajno istaknuti da je u ovoj studiji dokazana razlika u ekspresiji istraživanih kemokina s obzirom na klinički tijek EV 71 encefalitisa. Primjerice, koncentracija IL-1 β u CSL-u djece s neurogenim plućnim edemom bila je značajno veća u usporedbi s bolesnicima s nekompliciranim EV 71 encefalitisom.¹⁰⁷

Povezanost između koncentracije kemokina u CSL-u i krvi s težinom kliničke slike (plućni edem) ili pojavom neuroloških komplikacija (disregulacija SŽS-a) u djece oboljele od EV 71 encefalitisa dokazana je i u drugoj studiji Wang i sur. (2008.g.) koja je također provedena na Tajvanu.¹⁰⁸ U studiju je bilo uključeno 31 dijete, od kojih 12 s nekompliciranim encefalitisom, 9 s disregulacijom autonomnog živčanog sustava te 10 s plućnim edemom, uz kontrolnu skupinu od 13 zdravih ispitanika. Koncentracije kemokina CXCL9, CXCL10, CCL2 i IL-8 u plazmi bile su značajnije više u bolesnika s plućnim edemom u odnosu na bolesnike s nekompliciranim EV 71 encefalitisom. Koncentracija kemokina CXCL9 u CSL-u bila je značajnije viša u bolesnika s plućnim edemom u odnosu na bolesnike s disregulacijom autonomnog živčanog sustava kao i na bolesnike s nekompliciranim kliničkim tijekom bolesti.¹⁰⁸ Omjeri koncentracije CCL2 te IL-8 u CSL-u i plazmi bili su najveći u bolesnika s nekompliciranim EV 71 encefalitisom i smanjivali su se s tijekom progresije bolesti. Rezultati ove studije pokazali su važnost intratekalne sinteze CXCL9, CCL2 i IL-8 u imunopatogenezi encefalitisa uzrokovanog EV 71.¹⁰⁸

2. HIPOTEZA

Izradi doktorske disertacije pristupilo se s početnom hipotezom da se koncentracije kemokina CXCL10 i CXCL11 u CSL-u i serumu bolesnika s NPEV AM u odnosu na bolesnike iz kontrolne skupine statistički značajno razlikuju.

Obzirom da su tada u literaturi bili dostupni tek oskudni podaci o ulozi spomenutih kemokina u imunopatogenezi NPEV AM u pedijatrijskih bolesnika, smatrali smo kako bi rezultati našega istraživanja nedvojbeno rasvijetlili njihovu doprinosnu ulogu u patogenezi ovoga sindroma i tako kompletirali postojeća znanja o ulozi CXCL10 i CXCL11 u imunopatogenezi akutnih nebakterijskih upala SŽS-a. I negativan bi rezultat istraživanja bio značajan i znanstveno prihvatljiv, jer bi u tom slučaju daljnja istraživanja imunopatogeneze EV meningitisa usmjerio u drugome smjeru.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

GLAVNI CILJ ISTRAŽIVANJA:

Definirati ulogu kemokina CXCL10 i CXCL11 u imunopatogenezi NPEV AM.

SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

1. Istražiti kliničke i laboratorijske osobitosti u bolesnika oboljelih od NPEV AM i usporediti ih s istim u bolesnika bez neurološkog poremećaja
2. Utvrditi direktnu povezanost kemokinskog odgovora u krvi i CSL-u u djece oboljele od NPEV AM
3. Analizirati postojeći kemokinski gradijent u krvi i CSL-u oboljelih od NPEV AM te ga usporediti s onim u bolesnika iz kontrolne skupine.

4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Ispitanici

Radi se o longitudinalnoj presječnoj (eng. cross-sectional) studiji koja obuhvaća analizu anamnestičkih, kliničkih i laboratorijskih karakteristika bolesnika s AM uzrokovanim NPEV.

Istraživanje je provedeno kao dio znanstvenog projekta “Nove metode u dijagnostici akutnih nebakterijskih upala SŽS-a u djece” (voditelj: prof.dr.sc.Goran Tešović). Provođenje studije odobreno je od strane Etičkog povjerenstva.

U studiju je bilo uključeno 84 bolesnika, u razdoblju od 01.01.2008. do 01.01.2010.g.

U 55 bolesnika dokazan je NPEV AM, dok kontrolnu skupinu (29 bolesnika) čine bolesnici kod kojih je lumbalna punkcija učinjena u sklopu dijagnostičke obrade, pod kliničkom sumnjom na upalnu bolest SŽS-a, ali je ista isključena na osnovu urednog citološkog i biokemijskog nalaza CSL-a.

Podaci o pridruženim dijagnozama i etiologiji infektivnih bolesti prikupljeni su iz dostupne medicinske dokumentacije (povijesti bolesti). Etiološke dijagnoze postavljene su temeljem kliničkog pregleda bolesnika, te laboratorijske i mikrobiološke dijagnostičke obrade.

Svi su bolesnici dječje dobi, a liječeni su u Zavodu za infektivne bolesti djece Klinike za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević” (KZIB) u Zagrebu

Kriteriji za uključivanje u studiju bili su:

Za bolesnike s aseptičnim meningitisom:

- Nedvojbeno dokazana etiologija AM uzrokovnog NPEV
- Bolesnici s navršenim jednim mjesecom života do 18. godine života
- Uredna perinatalna anamneza i psihomotorni razvoj prije aktualne bolesti

Za bolesnike iz kontrolne skupine:

- Uredan citološki i biokemijski nalaz CSL-a
- Bolesnici s navršenih dva mjeseca života do 15.godine života
- Uredna perinatalna anamneza i psihomotorni razvoj prije aktualne bolesti
- Provjereno negativan nalaz PCR-a na NPEV u CSL-u

Specifični kriterij za isključenje iz istraživanja:

- Teška kronična bolest nastala tijekom perioda praćenja bolesnika

Dijagnoza AM postavljena je na temelju sljedećih dijagnostičkih kriterija: (1) akutni početak bolesti s jasno prisutnim simptomima meningealnog podražaja; (2) pleocitoza u CSL-u; (3) negativna bakteriološka kultura CSL-a; (4) kratko trajanje i benigni tijek bolesti i (5) odsutnost lokalnih parameningealnih infekcija (otitis, sinusitis) ili generalizirane bolesti u kojoj se meningitis razvija kao sekundarna manifestacija.

Pleocitoza je definirana kao prisutnost > 5 leukocita u mm^3 lumbalnog CSL-a.

4.2. Biološki uzorci

Tijekom ovog istraživanja prikupljeni su uzorci seruma i CSL-a svih ispitanika. Uzorci venske krvi prikupljeni su u epruvete Greiner Vacuette System (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austrija) volumena 6 mL s crvenim čepom bez dodatka antikoagulansa i centrifugirani na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta na 1500 g. Alikvoti seruma volumena 500 μL pohranjeni su na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ do testiranja enzimskim imunotestovima.

Svim bolesnicima je unutar 24 sata od prijema u bolnicu učinjena lumbalna punkcija. Punkcijom je oduzeto oko 5 mL CSL-a koji je podijeljen u četiri alikvota za potrebe citološke, biokemijske i etiološke analize (detekcija enterovirusne RNA) kao i za imunološku analizu (kvantifikaciju kemokina za sve ispitanike i analizu distribucije limfocitnih subpopulacija CSL-a za dio ispitanika). Alikvoti CSL-a za detekciju enterovirusne RNA pohranjeni su na $-20\text{ }^\circ\text{C}$ do analize dok su alikvoti za kvantifikaciju kemokina pohranjeni na $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Uzorci CSL-a u kojima je analizirana distribucija limfocitnih subpopulacija metodom protočne citometrije analizirani su unutar 30 minuta od punkcije.

4.3. Popis reagencija i otopina

Za reakciju lančane polimeraze koristili smo komercijalno dostupne testove Cepheid Enterovirus ASR Real-time PCR assay (Cepheid, Sunnyvale, SAD) i QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden, Njemačka). Mjerenje kemokina u serumu i CSL-u učinjeno je enzimskim imunotestovima Quantikine Human CXCL11/I-TAC ELISA test i Quantikine Human CXCL10/IP-10 ELISA test (R&D Systems, Minneapolis, SAD).

Postavljanje ograde oko limfocitne subpopulacije kao i vrsta limfocita (pomagački ili citotoksički) određena je na protočnom citometru korištenjem komercijalno dostupne kombinacije četiri monoklonska protutijela konjugirana s fluorokromima CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD-1/CD8-ECD/CD-3PC-5 Monoclonal Antibody Reagents i analizirana posebnim programom tetraONE SYSTEM software (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, SAD). Osim toga koristili smo i monoklonska protutijela CD4-FITC i CD45RO-RPE (Dako, Glostrup, Danska) te CD3-PC5 (Beckman Coulter Inc.). Za sva protutijela koristili smo i odgovarajuće izotipske kontrole.

Za provjeru i kalibraciju optičkog i protočnog dijela citometra koristili smo Flow-Check™ Fluospheres, Flow Cytometer Alignment Verification (Beckman Coulter, Inc.) koji sadrži fluorescentne mikrosfere (promjer 10 μm , koncentracija 1×10^6 fluoresfera/ml, emisijski spektar 525-700 nm).

4.4. Instrumenti, računalni program i potrošni materijal

- Aparat za pripremu uzoraka za protočnu citometriju Coulter TQ-Prep (Beckman Coulter, Inc.)
- Protočni citometar CYTOMICS FC 500 (Beckman Coulter, Inc.) uz CXP softver za obradu podataka (Beckman Coulter, Inc.)
- Captia™ Reader, optički čitač mikrotitracijskih pločica (Trinity Biotech Plc, Bray, Co Wicklow, Irska)
- Vortex Vibromix, miješalica za epruvete (Domel, d.o.o., Železniki, Slovenija)
- Polistirenske epruvete 12x75 mm (Beckman Coulter Inc.)
- Automatske mikropipete različitih volumena (Finnpipette, SigmaAldrich, St.Louis, SAD)
- Polipropilenske i polistirenske epruvete za PCR, različitih volumena (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka)

4.5. Metode istraživanja

Za izradu studije prikupljeni su anamnestički, relevantni klinički i laboratorijski podaci o dobi, spolu, perinatalnom razdoblju, socijalnoj anamnezi ispitanika, tjelesnoj masi izraženoj u gramima i centilima, visini i trajanju febriliteta te kliničkim znacima afekcije SŽS-a.

Također su prikupljeni i analizirani izabrani laboratorijski nalazi kao što su sedimentacija eritrocita, koncentracija C-reaktivnog proteina, kompletna krvna slika, citološki nalazi sedimenta CSL-a. Sve pretrage učinjene tijekom akutne bolesti su dio uobičajene laboratorijske obrade bolesnika s AM. U CSL-u i serumu kemokini su kvantificirani enzimskim imunotestom.

Sve hematološke, citološke i biokemijske analize čiji su rezultati korišteni u studiji učinjene su u Odjelu za medicinsku biokemiju, hematologiju i koagulaciju (s citologijom) KZIB. Biokemijske su pretrage učinjene standardnim enzimatskim metodama, a hematološke pretrage na automatskom brojaču ACT 8 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, SAD). Citološka obrada CSL- a obuhvaćala je brojenje stanica u Fuchs-Rosenthalovoj komorici i citološki pregled sedimenta CSL-a obojanog po metodi May-Grünwald-Giemsa. Opisani podaci o bolesnicima prikupljeni tijekom hospitalizacije upisani su u bazu podataka u kompjutorskom programu Microsoft Access®.

4.5.1. Detekcija enterovirusne RNA metodom PCR-a u stvarnom vremenu

Enterovirusna RNA u CSL-u svih ispitanika detektirana je primjenom standardiziranog PCR testa u stvarnom vremenu Cepheid Enterovirus ASR (Cepheid, Sunnyvale, SAD) u Odjelu za molekularnu dijagnostiku i protočnu citometriju KZIB prema uputama proizvođača. Ciljne strukture ovog molekularnog testa su dvije sekvence u konzerviranoj netranslatirajućoj sekvenci genoma enterovirusa. Test sadrži početnice i probe (obilježene s bojama FAM i Alexa 532) koje omogućuju detekciju regije veličine 115 parova baza 5'UTR regije genoma enterovirusa uz primjenu instrumenta Cepheid SmartCycler System (Cepheid). RNA iz uzoraka CSL-a izolirana je primjenom standardiziranog kompleta reagensa QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen), također prema uputama proizvođača.

4.5.2. Kvantifikacija CXCL10 i CXCL11 u serumu i CSL-u

Koncentracija kemokina u CSL-u i serumu određena je primjenom kvantitativnih enzimskih imunotestova Quantikine Human CXCL11/I-TAC ELISA test i Quantikine Human CXCL10/IP-10 ELISA test (R&D Systems, Minneapolis, SAD) u Odjelu za molekularnu dijagnostiku i protočnu citometriju KZIB, prema uputama proizvođača (kitovi sadrže sve potrebne reagensije za izvođenje enzimskih imunotestova).

Obzirom na to da je postupak tehničke izvedbe testa vrlo sličan, detaljnije je opisan postupak izvođenja Quantikine Human I-TAC ELISA testa.

Test sadrži mikrotitracijsku pločicu. Na dnu jažica mikrotitracijske pločice vezana su monoklonska protutijela specifična za I-TAC. Standardni pripravci i biološki uzorci (serum i CSL svih bolesnika) pipetiraju se u zdence mikrotitracijske pločice, te u slučaju da u traženom uzorku postoji I-TAC, molekula tog kemokina vezat će se na imobilizirano protutijelo. Nakon ispiranja nevezanih supstanci, u jažice mikrotitracijske pločice dodaje se poliklonsko protutijelo specifično za I-TAC konjugirano s enzimom. Potom se ispiru reagens te se u jažice dodaje otopina supstrata. Enzimskom reakcijom dolazi do stvaranja obojenog produkta, a reakcija se zaustavlja dodavanjem tzv. stop otopine. Izmjereni intenzitet obojenosti (apsorbancija) proporcionalan je koncentraciji kemokina (I-TAC) koji se vezao na imobilizirano protutijelo.

Prije upotrebe, svi reagensi i uzorci za enzimski imunotest trebaju biti na sobnoj temperaturi.

1. Svi reagensi, standardi i uzorci bili su pripremljeni prema uputama proizvođača
2. U sve jažice mikrotitarske pločice dodaje se 100 μL Diluenta RD1-68
3. U sve jažice dodaje se 100 μL Standarda, kontrole ili uzorka.

Mikrotitarska pločica prekriva se adhezivnom trakom i inkubira 2 sata na sobnoj temperaturi.

4. Sadržaj svake jažice aspirira se i ispiri s 400 μL otopine za ispiranje, ponavljajući postupak 3 puta, tako da se ispiranje izvrši ukupno 4 puta. Potpuno uklanjanje tekućine u svakom koraku od iznimne je važnosti za uspjeh enzimskog imunotesta. Nakon posljednjeg ispiranja, aspiriranjem se otklanja preostali dio otopine za ispiranje.
5. U sve jažice dodaje se 200 μL I-TAC konjugata, pločica se prekriva novom adhesivnom trakom i inkubira na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata.
6. Ponavlja se ispiranje/aspiriranje kao u koraku 5
7. Dodaje se 200 μL otopine supstrata u svaku jažicu mikrotitarske pločice i inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku.
8. U svaku se jažicu dodaje 50 μL stop otopine te slijedom enzimske reakcije dolazi do promjene boje otopine u jažicama.
9. Optička gustoća (apsorbanciju) se očitava unutar 30 minuta, uz upotrebu optičkog čitača na valnoj duljini od 450 nm s korekcijom valne duljine od 540 do 570 nm kako bi se korigirale optičke nesavršenosti mikrotitarske pločice.

Rezultati enzimskog imunotesta očitani su primjenom optičkog čitača mikrotitracijskih pločica CaptiaTM Reader, (Trinity Biotech Plc).

4.5.3. Imunofenotipizacija limfocitnih subpopulacija CSL-a

Metodom protočne citometrije, na protočnom citometru prema Kivisäkk i sur.¹¹⁰ analizirane su subpopulacije limfocita CSL-a kod 13 bolesnika oboljelih od NPEV AM. Protočna citometrija je metoda multiparametarske analize čestica (najčešće stanica) u homogenom uzorku primjenom monoklonskih protutijela obilježenim fluorokromima. Za razliku od klasičnih analitičkih metoda koje ispitivano svojstvo analiziraju kao prosječnu vrijednost određene komponente u uzorku, protočna citometrija omogućuje istovremenu analizu svih odabranih parametara u svim česticama uzorka. Imunofenotipizacija limfocita u različitim biološkim uzorcima jedna je od najvažnijih metoda kliničke imunološke dijagnostike, koja omogućuje analizu postotaka i apsolutnih brojeva različitih staničnih subpopulacija u određenim uzorcima, kao i analizu razine ekspresije različitih staničnih molekula. Stoga je rezultat analize protočne citometrije važan u postavljanju dijagnoze bolesti, klasifikaciji bolesnika u različite kliničke kategorije i praćenju ishoda liječenja.¹²²

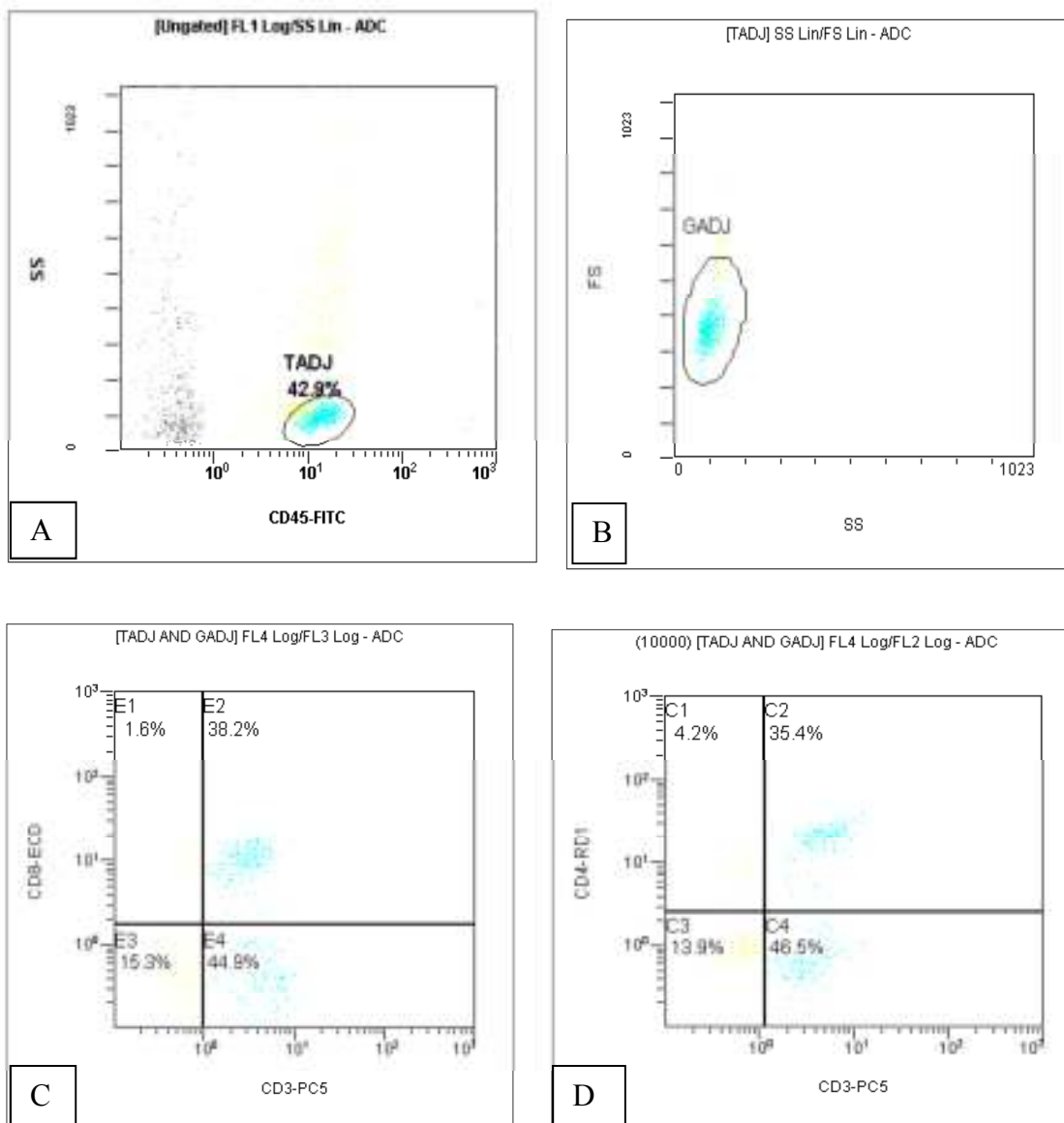
Pri analizi protočnim citometrom stanice prolaze u obliku monostanične suspenzije kroz izotoničnu tekućinu, te na njih pada laserska zraka, čime dobivamo informaciju o veličini i zrnatosti stanica, a istovremeno se aktivira fluorokrom kojim su obilježena monoklonska protutijela, specifična za pojedine stanične antigene. U elektroničnom dijelu citometra integriraju se podaci o emisiji fluorescencije i fizikalnim svojstvima stanica.¹²²

Za analizu CSL-a pripravljene su dvije epruvete. U prvu je epruvetu pipetirano 100 μ L CSL-a i 10 μ L CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD-1/CD8-ECD/CD3-PC5 protutijela. U drugu epruvetu pipetirano je 100 μ L CSL-a i po 10 μ L reagensa CD4-FITC, CD45RO-RPE i CD3-PC5. U svrhu eliminacije nespecifičnog vezanja protutijela u testu su korištene i odgovarajuće izotipske kontrole. Nakon inkubacije 10 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, dodano je 300 μ L izotonične otopine (IsoFlow Sheath fluid) u svaku epruvetu, a uzorci su analizirani na protočnom citometru.

Pri analizi na protočnom citometru, stanice su stavljene u prvu ogradu (TADJ) na osnovu zrnatosti (eng. Sideward scatter; SSC) i ekspresije zajedničkog leukocitnog biljega (CD45), a u drugu ogradu (GADJ) na osnovu veličine stanica (eng. Forward scatter; FSC). Istovremenom aktivacijom obje ograde u uzorcima CSL-a su se analizirale stanice koje su bile omeđene s obje ograde. Analizom stanica u obje ograde strukturiran je dvoparametarski

histogram, pri kojem je na osi X analizirana ekspresija biljega CD3, a na osi Y ekspresija biljega CD4. Nakon postavljanja ograde unutar dvoparametarskog histograma, broj CD4+ limfocita T, tj. CD3+CD4+ stanica očitao je iz segmenta C2. Po istom principu konstruiran je i dvoparametarski histogram u kojem je analizirana ekspresija molekule CD3 (određivanjem fluorescencije na osi X) i CD8 (os Y). Postotak CD8+ limfocita T određen je nakon postavljanja ograde unutar dvoparametarskog histograma u segmentu E2.

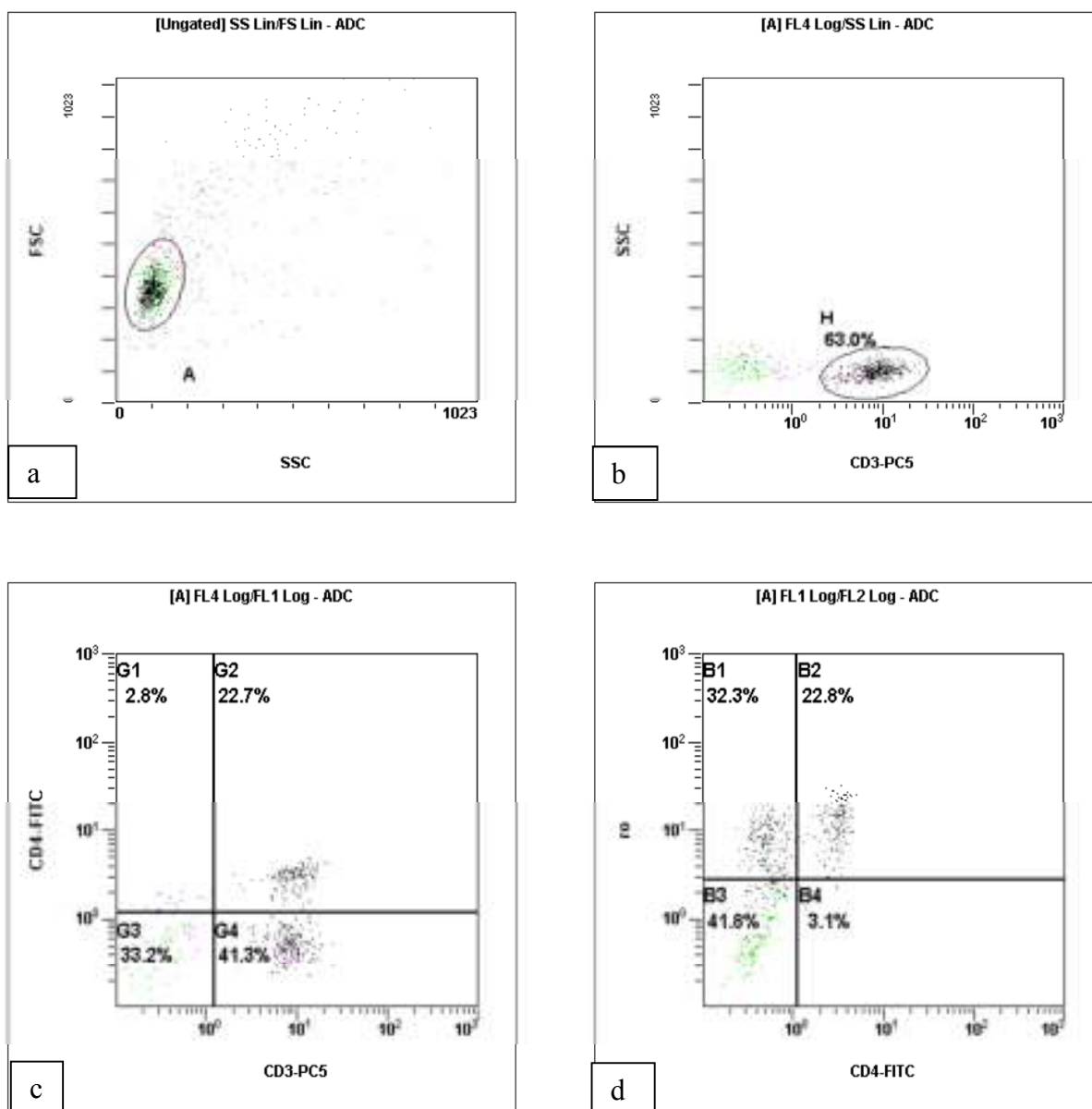
Tijekom analize memorijskih CD4+ limfocita T u CSL-u stanice su također stavljene u prvu ogradu (A) na osnovu zrnatosti (SSC) i veličine stanica (FSC). Stanice omeđene ogralom A analizirane su temeljem ekspresije molekule CD3 i zrnatosti (SSC) i omeđene ogralom H. Aktivacijom ograde A učinjena je dodatna analiza stanica primjenom dvoparametarskog histograma u kojem je analizirana ekspresija biljega CD3 i CD4 te je u segmentu G2 određen postotak CD3+CD4+ stanica, tj. CD4+ limfocita T. Identičnim postupkom u dvoparametarskom histogramu analizirana je ekspresija CD3 i biljega memorijskog fenotipa CD45RO+ te je u segmentu B2 određen postotak CD4+CD45RO+ stanica tj. memorijskih CD4+ limfocita T.



Slika 6. Dvoparametarski histogram analize stanica CSL-a

Histogram A prikazuje postavljanje ograde na osnovu ekspresije biljega CD45 (x-os) i znatosti stanice SS (y-os). Histogram B prikazuje parametre znatosti stanice SS (x-os) i veličine stanice FS (y-os). Histogram C prikazuje ekspresiju biljega CD3 (x-os) i CD8 (y-os). U kvadrantu E2 prikazani su CD8+ limfociti T. Histogram D prikazuje ekspresiju biljega CD3 (X-os) i CD4 (y-os). U kvadrantu C2 prikazani su CD4+ limfociti T.

Stanice su analizirane prema ogradama TADJ i GADJ.



Slika 7. Analiza limfocitnih subpopulacija CSL-a

Histogram (a) prikazuje postavljanje prve ograde za analizu limfocitnih subpopulacija na osnovu parametara zrnatosti stanica na x-osi (eng. Sideward scatter; SSC) i veličine na y-osi (eng. Forward scatter; FSC). Histogram (b) prikazuje postavljanje druge ograde na osnovu ekspresije biljega CD3 na x-osi i parametra SSC na y-osi prema limfocitnog ogradi A s histograma (a). Histogram (c) prikazuje ekspresiju biljega CD3 na x-osi i CD4 na y-osi, a histogram (d) ekspresiju biljega CD4 na x-osi i CD45RO na y-osi (memorijski CD45RO+CD4+ limfociti T su u kvadrantu B2).

4.6. Statistička analiza podataka

Svi izmjereni parametri sažeti su prikladnim metodama deskriptivne statistike (medijani, rasponi, proporcije) za svaku od skupina (ispitanici oboljeli od NPEV-AM i kontrolni ispitanici).

U pogledu temeljnih svojstava (demografski, povijest bolesti, kliničke manifestacije bolesti), dvije skupine nisu uspoređivane u formalnim univarijatnim statističkim testovima budući da studija nije dizajnirana s tom svrhom niti je broj ispitanika određen s tom namjerom. Stoga sama prisutnost „statistički značajne razlike“ nema nekog posebnog značenja, a njen izostanak može biti jednostavna posljedica nedostatka snage testa. Serija univarijatnih testova povećava rizik greške tipa 1, pa neka „statistička značajnost“ može biti posljedica čistog slučaja.

Glavna analiza osmišljena je kako bi odgovorila na dva pitanja:

1. Razlikuju li se ispitanici oboljeli od NPEV AM od kontrolnih ispitanika u jednom ili više od sljedećih pokazatelja:

- koncentracija CXCL10 u serumu
- koncentracija CXCL10 u CSL-u
- gradijent (omjer) koncentracije CXCL10 CSL/serum
- koncentracija CXCL11 u serumu
- koncentracija CXCL11 u CSL-u
- gradijent (omjer) koncentracije CXCL11 CSL/serum.

Budući da se radi o šest zavisnih varijabli koje su moguće međusobno povezane (odnosi CSL-serum, dva srodna kemokina), kako bi se izbjegla greška tipa I (zaključak o razlici između skupina koji je „slučajan“), podaci su analizirani multivarijatnom multiplom regresijom (svih šest zavisnih varijabli odjednom). Usporedba dviju skupina podešena je za utjecaj varijabli za koje je razumno pretpostaviti da bi mogle utjecati na mjerene parametre: dijagnoza, dob, spol i vrijeme trajanja bolesti prije prijema u bolnicu (kao i uzimanja uzoraka krvi i CSL-a). Nakon provedbe testa „sveukupne razlike“, provedena je daljnja usporedba za svaku od zavisnih varijabli. Budući da su izmjerene vrijednosti bile iskrivljene udesno (*skewed*) za analizu su korišteni logaritmi (baza e) izmjerenih koncentracija. Razlike između skupina prikazane su kao eksponenti razlika aritmetičkih sredina logaritama, tj. kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR): $GMR = \exp[\frac{1}{n} \ln(A) - \frac{1}{n} \ln(B)]$.

2. Postoji li združenost između likvorskih ili serumskih koncentracija CXCL10 odnosno CXCL11 ili gradijenta (omjera) koncentracija CSL/serum za bilo koji od dva kemokina i broja stanica u CSL-u.

Zavisna varijabla (broj stanica u CSL-u) također je logaritimirana (baza e) zbog iskrivljene distribucije.

Podaci su analizirani stupnjevito, u pet generalnih linearnih modela (tj. korelacija pokazatelja), koji je svaki kao **obavezne** nezavisne varijable uključivao **dob, spol i vrijeme trajanja bolesti prije prijema u bolnicu**, a ostale nezavisne varijable (dijagnoza, koncentracije dvaju kemokina, gradijenti CSL/serum za svaki od kemokina, te interakcije između dijagnoze i koncentracija/gradijenta kemokina) uključivane su sukcesivno:

- *Model 1* – uz obavezne, uključio je i nezavisnu varijablu *dijagnoza*. Svrha je bila procijeniti razliku između oboljelih od NPEV AM i kontrolne skupine u broju stanica u CSL-u, tj. procijeniti združenost dijagnoze i broja stanica u CSL-u (podešeno za dob, spol i trajanje bolesti prije prijema u bolnicu);
- *Model 2* – uz obavezne, uključio je i nezavisne varijable *koncentracija CXCL10 u CSL-u* i *koncentracija CXCL11 u CSL-u*. Svrha je bila procijeniti združenost koncentracija dvaju kemokina i broja stanica u CSL-u (podešeno za dob, spol i vrijeme trajanja bolesti prije prijema u bolnicu);
- *Model 3* – uz obavezne, uključio je i nezavisne varijable *gradijent CSL/serum za CXCL10* i *gradijent CSL/serum za CXCL11*. Svrha je bila procijeniti združenost gradijenata CSL/serum dvaju kemokina i broja stanica u CSL-u (podešeno za dob, spol i vrijeme trajanja bolesti prije prijema u bolnicu).

Budući da u prethodnim modelima nije uočena združenost između koncentracije CXCL11 u CSL-u ili gradijenta CSL/serum za CXCL11 i broja stanica u CSL-u, a jest za CXCL10, to su u daljnja dva modela uključivani samo indikatori vezani uz CXCL10.

- *Model 4* – uz obavezne, uključio je i nezavisne varijable *dijagnoza, koncentracija CXCL10 u CSL-u* i *koncentracija CXCL10 u CSL-u*dijagnoza interakcija*. Svrha je bila istodobno procijeniti združenost koncentracije CXCL10 u CSL-u i dijagnoze s brojem stranica u CSL-u, te združenost koncentracije CXCL10 u CSL-u i broja stanica

u CSL-u posebno u skupini oboljelih od NPEV AM i posebno u kontrolnoj skupini (sve podešeno za dob, spol i vrijeme trajanja bolesti prije prijema u bolnicu);

- *Model 5* – uz obavezne, uključio je i nezavisne varijable *dijagnoza*, *gradijent CSL/serum za CXCL10* i *gradijent*dijagnoza interakcija*. Svrha je bila istodobno procijeniti združenost i gradijenta CSL/serum za CXCL10 i dijagnoze s brojem stanica u CSL-u, te združenost gradijenta CSL/serum za CXCL10 i broja stanica u CSL-u posebno u skupini oboljelih od NPEV AM i posebno u kontrolnoj skupini (sve podešeno za dob, spol i vrijeme trajanja bolesti prije prijema u bolnicu).

Združenost dijagnoze (razlika *oboljeli od NPEV AM – kontrole*) i broja stanica u CSL-u prikazana je kao omjer geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR), a združenost koncentracija ili gradijenata kemokina i broja stanica u CSL-u kao regresijski koeficijenti.

Korišten je statistički program SAS for Windows 9.3 (SAS Inc., Cary, SAD) licenciran na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

5. REZULTATI

U ovu longitudinalnu presječnu (eng. cross sectional) studiju, uključena su 84 ispitanika, od kojih 55 ispitanika pripada skupini oboljelih od NPEV AM, a 29 kontrolnoj skupini.

5.1. Svojstva ispitanika oboljelih od NPEV AM i kontrolnih ispitanika

Analizirani su odabrani demografski, klinički i laboratorijski podaci ispitanika.

5.1.1. Analiza demografskih podataka

Prikupljeni su i obrađeni demografski podaci o dobi, spolu, trajanju bolesti pri prijemu (tablica 3).

Medijan dobi ispitanika u NPEV AM grupi bio je 101 mjesec, a raspon dobi 1-216 mjeseci, dok je medijan dobi kontrolne skupine bio 30 i raspon 2-174 mjeseca.

U obje skupine prevladavaju bolesnici muškog spola - u skupini oboljelih od NPEV AM 40 (40/55) bolesnika je bilo muškog spola, a u kontrolnoj skupini 18 (18/29).

Medijan trajanja bolesti prije prijema u Kliniku bio je dva dana (raspon 1-5 dana) za oboljele od NPEV AM, te za kontrolnu skupinu također dva dana (s rasponom 1-28 dana).

5.1.2. Analiza kliničkih podataka

Prikupljeni su i obrađeni klinički podaci koji uključuju prisustvo vrućice pri prijemu te visinu i trajanje vrućice. Također su analizirani i podaci o pojavljivanju cerebralnih napada, kao i stanju svijesti kod prijema u bolnicu (tablica 3).

Kod prijema u Kliniku, u skupini ispitanika oboljelih od NPEV AM, 54 bolesnika (54/55) bilo je febrilno, dok je u kontrolnoj skupini povišenu temperaturu imalo 24 bolesnika (24/29).

Kada je riječ o visini febriliteta, srednja vrijednost tjelesne temperature za ispitanike skupine oboljelih od NPEV AM iznosi 38,8 °C (raspon 37,0 – 40,4 °C), a za ispitanike kontrolne skupine 39,6 °C (raspon 37,2 – 40,6 °C).

Analiza trajanja vrućice učinjena je u svih ispitanika. U skupini oboljelih od NPEV AM raspon trajanja vrućice iznosio je 0-5 dana, a medijan 2 dana. U kontrolnoj skupini raspon trajanja vrućice bio je 0-21 dan, a medijan isti kao u bolesnika s NPEV AM, dakle dva dana.

Podatak o cerebralnim napadima u febrilitetu, u akutnoj fazi bolesti imala su dva bolesnika u skupini oboljelih od NPEV AM i 12 bolesnika iz kontrolne skupine.

Svaki je ispitanik pregledan kod prijema u Kliniku (učinjen je klinički i neurološki status) uz procjenu stanja svijesti.

Pri analizi podataka o stanju svijesti, kod svih bolesnika, korištena je procjena (bodovanje) prema GCS (eng. Glasgow Coma Scale/Score). U obje skupine, srednja vrijednost GCS iznosila je 15. Za skupinu oboljelih od NPEV AM raspon GCS je iznosio 13-15 a za kontrolnu skupinu 12-15.

U skupini ispitanika oboljelih od NPEV AM nije bilo zabilježenih značajnih poremećaja svijesti.

Analizirajući komorbiditete, tj. pridružene dijagnoze, u skupini oboljelih od NPEV AM bakterijska infekcija gornjih dišnih putova bila je najčešća pridružena dijagnoza, a spominje se u pet ispitanika.

U skupini kontrolnih ispitanika najveći broj ispitanika (za koje je bila poznata pridružena dijagnoza) pripada oboljelima od virusne infekcije (4 ispitanika) od kojih je jedan ispitanik u tijeku virusne infekcije imao i cerebralne napade u febrilitetu (tablica 3).

Zasebnu skupinu čine preostale dijagnoze poput vodenih kozica (jedan ispitanik), borelioze (dva ispitanika), encefalopatije (jedan ispitanik), Kawasakijske bolesti (dva ispitanika), anaplazmoze (jedan ispitanik), dakle ukupno sedam ispitanika.

5.1.3. Analiza laboratorijskih podataka

5.1.3.1. Izabrani laboratorijski nalazi seruma i CSL-a u ispitanika oboljelih od NPEV AM i kontrolne skupine

Analizirajući nalaz CSL-a među skupinama ispitanika primjećene su razlike i to ne samo u broju i vrsti stanica ili koncentraciji proteina, već i u koncentraciji, kao i gradijentima (omjerima koncentracija) kemokina.

Bolesnici oboljeli od NPEV AM imali su veći broj stanica (medijan $600/\text{mm}^3$, raspon 42-6400), za razliku od ispitanika kontrolne skupine gdje je medijan broja stanica iznosio $5/\text{mm}^3$ (raspon 1-16). Koncentracija proteina u CSL-u oboljelih od NPEV AM bila je za gotovo 50% viša, dok je omjer glukoze u CSL-u i serumu bio podjednak u obje skupine ispitanika (0,61). Svi ispitanici NPEV AM skupine imali su povoljan ishod tj. potpuni oporavak, dok se u kontrolnoj skupini oporavilo 28 od 29 ispitanika.

Multivarijatna analiza za usporedbu dviju skupina u pogledu serumskih i likvorskih koncentracija istraživanih kemokina detaljno je prikazana u sljedećem poglavlju.

Tablica 3. Svojstva ispitanika, oboljelih od NPEV AM i kontrola [medijan (raspon) ili broj]

	NPEV AM skupina		Kontrolna skupina	
	N	Vrijednost (raspon)	N	Vrijednost (raspon)
Dob (mjeseci)	55	101 (1-216)	29	30 (2-174)
Muški spol	55	40	29	18
Trajanje bolesti prije prijema (dani)	54	2 (1-5)	28	2 (1-28)
Febrilni pri prijemu	55	54	29	24
Najviša temperatura (°C)	55	38,8 (37,0-40,4)	26	39,6 (37,2-40,6)
Trajanje febriliteta (dani)	55	2 (0-5)	25	2 (0-21)
Konvulzije	55	2	29	12
GCS na prijemu	55	15 (13-15)	29	15 (12-15)
Najniži GCS	55	15 (13-15)	29	15 (12-15)
Dijagnoze (ostale; glavne u kontrolnoj skupini)	55		29	
Bakterijske infekcije gornjih dišnih putova		5		1
Cerebralni napadi u febrilitetu		1		3
Sepsa		1		1
Asimptomatska bakteriurija		1		---
Virusna infekcija (1 s cerebralnim napadima u febrilitetu)		---		4
Bakterijemija		---		3
BHS-A infekcija		---		2
Akutni bronhiolitis/pneumonija		---		3
CMV/EBV infekcije		---		2
Nespecificirana akutna respiratorna infekcija		---		3
Ostalo		---		7
Broj eritrocita (x10 ¹² /L)	55	4,6 (3,4-5,6)	29	4,3 (3,2-19,4)
Hemoglobin (g/L)	55	132 (98-168)	29	119 (89-145)
Broj trombocita (x10 ⁹ /L)	55	278 (110-597)	29	227 (92-653)
Broj leukocita (x10 ⁹ /L)	55	12,4 (4,1-27,9)	29	10,4 (3,1-37,0)
CRP (mg/L)	55	7,4 (0,2-35)	29	12,2 (0,2-145)
Broj stanica u CSL-u (n/mm ³)	55	600 (42-6400)	29	5 (1-16)
Mononukleara (%)	54	56 (5-100)	29	7 (1-100)
Polimorfonukleara (%)	51	47 (5-94)	14	0 (0-99)
Proteini u CSL-u (ng/mL)	53	0,43 (0,2-1,0)	29	0,24 (0,15-0,73)
Glukoza CSL /glukoza serum	52	0,61 (0,43-0,84)	28	0,61 (0,43-1,1)
CXCL10 u CSL-u (ng/mL)	55	21,3 (0,11-130)	29	0,26 (0-2,4)
CXCL10 u serumu (ng/mL)	55	0,27 (0,03-5,19)	29	0,21 (0,03-34,2)
CXCL10 gradijent (CSL-serum)	55	60,9 (2,1-561)	29	0,75 (0-12,8)
CXCL 11 u CSL-u (ng/mL)	55	0,24 (0-6,1)	29	0,07 (0-0,13)
CXCL 11 u serumu (ng/mL)	55	0,02 (0-0,73)	29	0,12 (0-1,9)
CXCL 11 gradijent CSL-serum	55	10,1 (0-56,7)	29	0,12 (0-0,97)
Ishod potpuni oporavak	55	55	29	28

Legenda:

GCS – Glasgow Coma Scale/Score, BHS-A – beta hemolitički streptokok serološke grupe A

CMV infekcije - infekcije uzrokovane citomegalovirusom

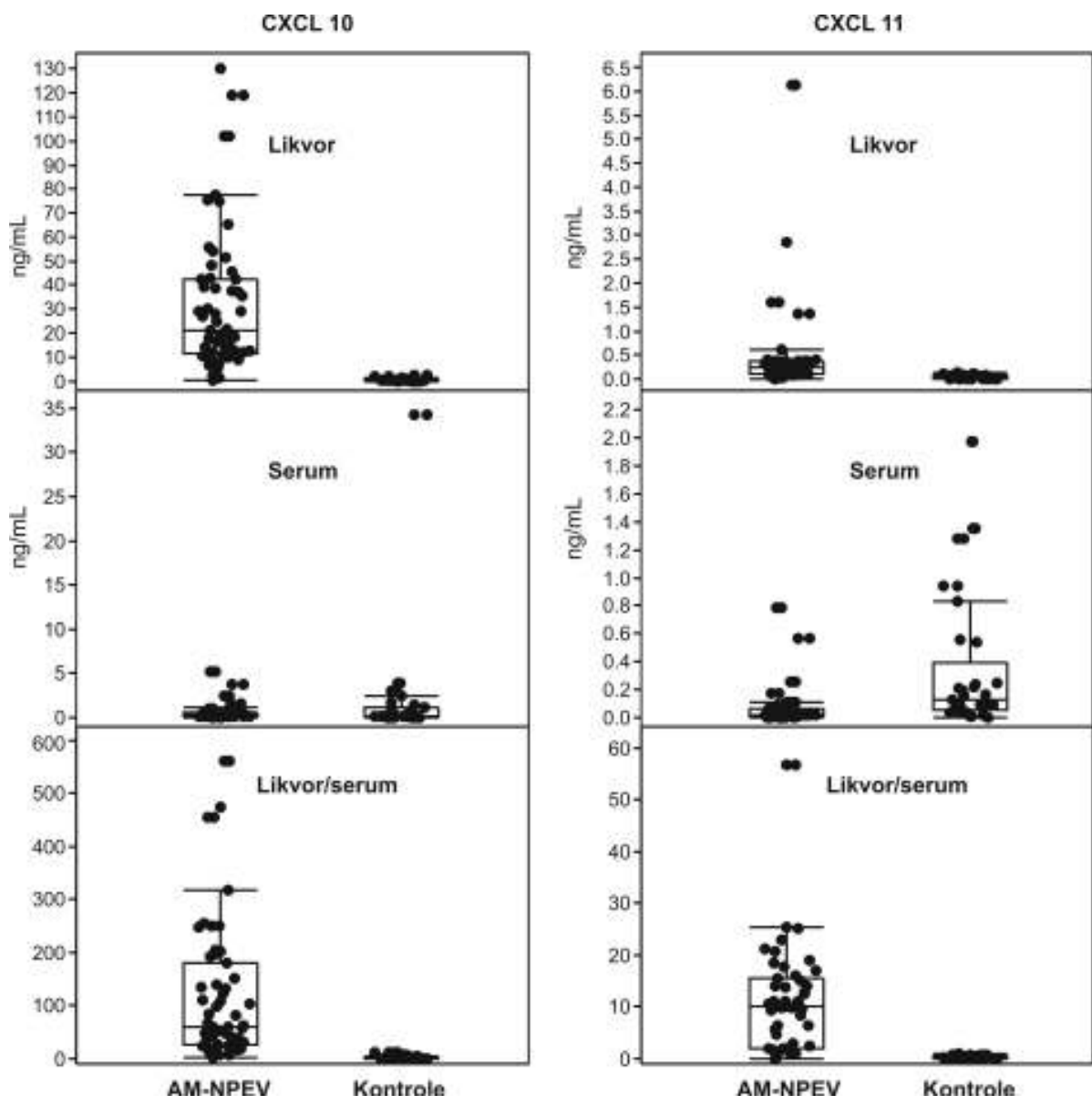
EBV infekcije – infekcije uzrokovane Epstein – Barr virusom

Mb. Kawasaki – Kawasakijska bolest

CRP - C- reaktivni protein,

SIRS – Systemic Inflammatory Response Syndrome (Sindrom sustava upalnog odgovora)

Numeričke vrijednosti izmjerenih koncentracija kemokina prikazane su u tablici 3, a slika 8 prikazuje individualne vrijednosti kemokina.



Slika 8. Individualne koncentracije (točke) kemokina CXCL10 i CXCL11 (ng/mL) u CSL-u i serumu, te gradijenti CSL/serum u ispitanika oboljelih od NPEV AM i kontrolne skupine.

5.1.3.2. Analiza koncentracije kemokina CXCL10 i CXCL11 u serumu i CSL-u ispitanika oboljelih od NPEV AM i kontrolne skupine

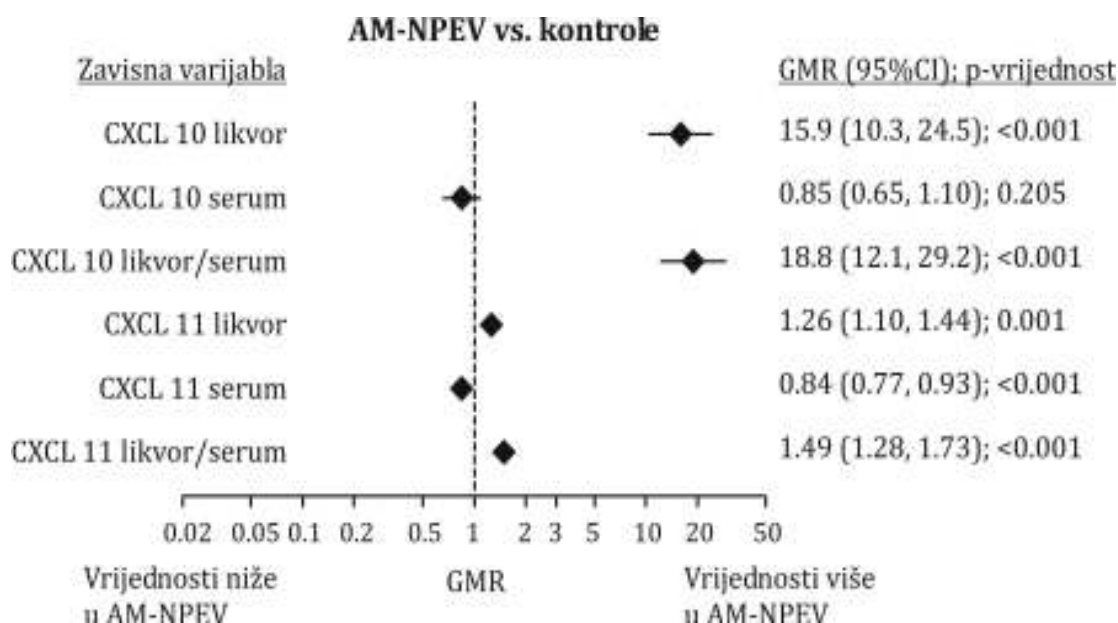
Međusobno su uspoređene dvije skupine ispitanika (oboljeli od NPEV AM i kontrolna skupina) za šest zavisnih varijabli (koncentracije ispitivanih kemokina u serumu, CSL-u te za svaki kemokin omjer tj. gradijent). S obzirom na izvjesnu povezanost nekih varijabli (npr. koncentracija pojedinog kemokina u CSL-u i serumu, koncentracije kemokina u CSL-u i serumu i omjer), svih šest varijabli je simultano analizirano u multivarijatnoj multiploj regresiji (s ciljem izbjegavanja gomilanja pojedinačnih testova i grešaka tipa I).

Tablica 4. Šest zavisnih varijabli (koncentracija CXCL10 u CSL-u, koncentracija CXCL10 u serumu, CXCL10 gradijent CSL/serum, koncentracija CXCL11 u CSL-u, koncentracija CXCL11 u serumu, CXCL11 gradijent CSL/serum) analizirano je multivarijatnom multiplom regresijskom analizom u svrhu njihove usporedbe između dvije ispitivane skupine (NPEV AM i kontrola) koje su bile podešene za spol, dob i dan trajanja bolesti na dan prijema kada su uzimani uzorci za analizu CSL i seruma

Učinak	Wilk lambda	p
Bolest: NPEV AM vs. kontrole	0,261	<0,001
Dob (mjeseci)	0,935	0,275
Spol: dječaci vs. djevojčice	0,948	0,401
Trajanje bolesti na dan prijema (dani)	0,980	0,820

Kako prikazuje tablica 4 postoji sveukupna razlika (u pogledu šest zavisnih varijabli) između skupine ispitanika oboljelih od NPEV AM i kontrolne skupine. Nema združenosti između dobi, spola i dana trajanja bolesti u vrijeme prijema (uzimanja uzoraka) i analiziranih zavisnih varijabli.

Wilk lambda je test statistika za multivarijatni multipli regresijski model.



Slika 9. Razlike između ispitanika NPEV AM skupine i ispitanika kontrolne skupine u koncentraciji kemokina CXCL10 i CXCL11 u CSL-u, serumu i razlike gradijenata CSL/serum. Razlike su iz multivarijatnog regresijskog modela (tablica 4) i podešene su za dob, spol i dan trajanja bolesti pri prijemu (dan uzimanja uzoraka). Analizirani su prirodni logaritmi izmjerenih vrijednosti (zbog nepravilne distribucije), a rezultati su prikazani kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR) s 95% granicama pouzdanosti i p-vrijednost (podešena za multiple usporedbe). $GMR = \exp[\square \ln(A) - \square \ln(B)]$.

Uz podešenje za dob, spol i dan trajanja bolesti u vrijeme prijema (uzimanja uzoraka), ispitanici NPEV AM skupine imali su oko 15,9 puta više koncentracije CXCL10 u CSL-u od ispitanika kontrolne skupine, te podjednake koncentracije CXCL10 u serumu. Shodno tome, CXCL10 gradijent CSL-serum bio je oko 19 puta viši u ispitanika NPEV AM skupine. Također, ispitanici NPEV AM skupine imali su oko 26% više koncentracije CXCL11 u CSL-u ($p=0,001$), te oko 16% niže koncentracije u serumu ($p<0,001$). Shodno tome, CXCL11 gradijent CSL-serum bio je u tih ispitanika oko 50% viši no u ispitanika kontrolne skupine ($p<0,001$).

5.2. Usporedba ispitanika NPEV AM skupine i ispitanika kontrolne skupine u pogledu broja stanica u CSL-u te odnos likvorske koncentracije CXCL10 i CXCL11 i broja stanica

Već je iz podataka sažetih u tablici 3 jasno da su oboljeli od NPEV AM imali veći broj stanica u CSL-u nego kontrolni ispitanici. Međutim, oboljeli od NPEV AM su imali i **više** koncentracije kemokina u CSL-u, a i veći gradijent CSL/serum. Kako bismo pokušali ustanoviti je li broj stanica u CSL-u združen prvenstveno s dijagnozom (tj. NPEV AM) ili prvenstveno s koncentracijom kemokina u CSL-u, ili pak s gradijentom CSL/serum, broj stanica u CSL-u (zavisna varijabla) analiziran je stupnjevito, u pet modela koji su sukcesivno testirali združenost zavisne varijable s pojedinim nezavisnim varijablama, tj. dijagnozom, koncentracijama dvaju kemokina u CSL-u i gradijentima CSL/serum za dva kemokina. Rezultati su prikazani u tablici 5 i slici 10.

Tablica 5. Združenost dijagnoze, likvorske koncentracije CXCL10, CXCL11 i gradijenata CSL/serum za dva kemokina i broja stanica u CSL-u (broj/mm³). Analiziran je ln (broj) zbog iskrivljene distribucije. Sve procjene združenosti podešene su za dob, spol i trajanje bolesti (u danima) u vrijeme prijema (i uzimanja uzoraka krvi/CSL-a). Procjena združenosti dijagnoze i broja stanica u CSL-u iskazana je kao omjer geometrijski srednjih vrijednosti (razlika NPEV AM ispitanici u odnosu na kontrolne ispitanike), a procjena združenosti koncentracija ili gradijenata kemokina kao regresijski koeficijent. Sve su procjene iskazane s 95% granicama pouzdanosti.

Modeli/nezavisne varijable	Procjena	p
<i>Model 1</i>		
Dijagnoza: NPEV AM vs. kontrole	134 (82,8-217)	<0,001
<i>Model 2</i>		
Ln (CXCL10 u CSL-u)	1,35 (1,09; 1,61)	<0,001
Ln (CXCL11 u CSL-u)	-1,27 (-2,62; 0,08)	0,065
<i>Model 3</i>		
Ln (CXCL10 gradijent CSL-serum)	1,19 (0,93; 1,45)	<0,001
Ln (CXCL11 gradijent CSL-serum)	-0,13 (-1,29; 1,04)	0,829
<i>Model 4</i>		
Dijagnoza: NPEV AM vs. kontrole	92,6 (9,44-908)	<0,001
Ln (CXCL10 u CSL-u)	0,12 (-0,51; 0,75)	0,707
Ln (CXCL10 u CSL-u) u NPEV AM	0,07 (-0,19; 0,34)	0,577
Ln (CXCL10 u CSL-u) u kontrola	0,17 (-1,07; 1,40)	0,790
<i>Model 5</i>		
Dijagnoza: NPEV AM vs. kontrole	140 (39,4-499)	<0,001
Ln (CXCL10 gradijent CSL-serum)	0,01 (-0,32; 0,33)	0,966
Ln (CXCL10 gradijent CSL-serum) u NPEV AM	-0,06 (-0,65; 0,52)	0,834
Ln (CXCL10 gradijent CSL-serum) u kontrola	0,08 (-0,20; 0,35)	0,589

U svim su modelima dob, spol i trajanje bolesti na dan prijema bile obavezne nezavisne varijable, no niti u jednom modelu nezavisne varijable nisu imale statistički značajan učinak.

Model 1= dodatno još samo dijagnoza; *Model 2*= dodatno još samo Ln (CXCL10) i Ln (CXCL11) u CSL-u; *Model 3*= dodatno još samo Ln (CXCL10 gradijent) i Ln (CXCL11 gradijent); *Model 4*= dodatno dijagnoza + Ln (CXCL10 u CSL-u) i dijagnoza*Ln (CXCL10 u CSL-u) interakcija; *Model 5*= dodatno dijagnoza + Ln (CXCL10 CSL-serum gradijent) i dijagnoza*Ln (CXCL10 CSL-serum gradijent) interakcija.

U svim modelima sažetim u tablici 5 sve testirane združenosti testirane su uz podešenje za dob, spol i vrijeme trajanja bolesti prije prijema.

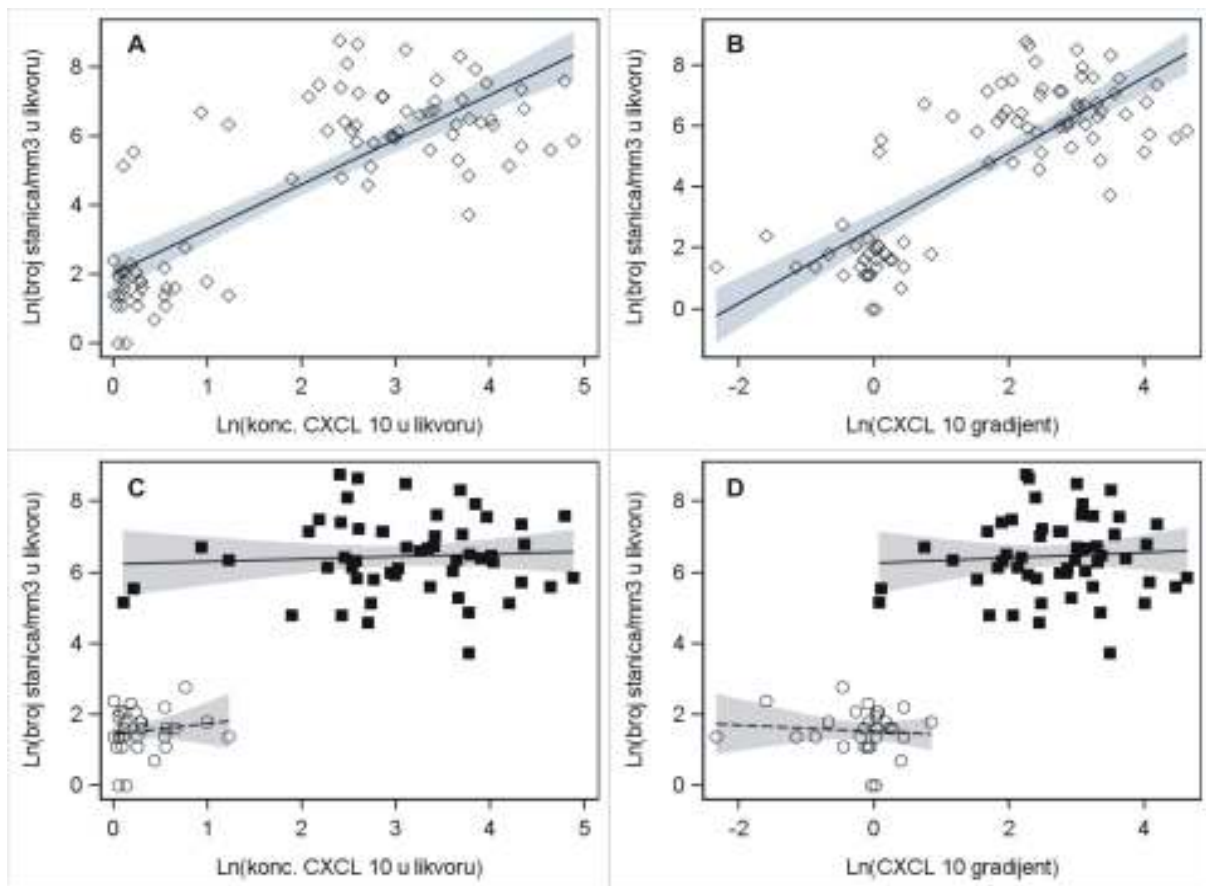
Prvi je model (*Model 1*, tablica 5) testirao združenost dijagnoze i broja stanica u CSL-u. Ispitanici NPEV AM skupine imali su oko 134 puta veći broj stanica u CSL-u od kontrolne skupine.

Drugi je model (*Model 2*, tablica 5), istodobno testirao združenost likvorskih koncentracija CXCL10 i CXCL11 i broja stanica u CSL-u. Više razine CXCL10 bile su združene s višim brojem stanica, dok nije uočena združenost likvorske koncentracije CXCL11 i broja stanica u CSL-u ($p=0.065$).

Treći je model (*Model 3*, tablica 5), istodobno testirao združenost gradijenta CSL/serum za CXCL10 i CXCL11 i broja stanica u CSL-u. Veći gradijent CXCL10 bio je združen s višim brojem stanica, dok za gradijent CXCL11 nije uočena združenost.

Budući da u prethodnim modelima nije uočena združenost između koncentracije CXCL11 u CSL-u ili gradijenta CSL/serum za CXCL11 i broja stanica u CSL-u, a jest za CXCL10, to su u daljnja dva modela (*Model 4* i *Model 5*, tablica 5) uključivani samo indikatori vezani uz CXCL10.

Četvrti model (*Model 4*) istodobno je testirao združenost dijagnoze i likvorske koncentracije CXCL10 i broja stanica u CSL-u, a peti model (*Model 5*) istodobno je testirao združenost dijagnoze i CXCL10 gradijenta CSL/serum i broja stanica u CSL-u. U oba je modela združenost dijagnoze i broja stanica u CSL-u (tj. značajna razlika između ispitanika NPEV AM i ispitanika kontrolne skupine) i dalje prisutna, ali je združenost likvorske koncentracije CXCL10 i broja stanica, odnosno CXCL10 gradijenta CSL/serum i broja stanica znatno oslabljena, gotovo nepostojeća – i nije statistički značajna. Također, navedeni modeli ukazuju na izostanak združenosti između CXCL10 koncentracija u CSL-u i broja stanica, odnosno između gradijenta CSL/serum i broja stanica kada se analiziraju zasebno za ispitanike NPEV AM skupine i zasebno za ispitanike kontrolne skupine. Ti su odnosi grafički prikazani na slici 11.



Slika 10. Odnos broja stanica/mm³ CSL-a (logaritma) (zavisna varijabla) i koncentracije CXCL10 u CSL-u (logaritma) za sve ispitanike (A), te posebno za ispitanike NPEV AM skupine (#) i ispitanike kontrolne skupine (") (C) te odnos zavisne varijable s CXCL10 CSL-serum gradijentom (logaritma) za sve ispitanike (B) i posebno za ispitanike NPEV AM skupine (#) i ispitanike kontrolne skupine (") (D). **A.** Pojedinačne vrijednosti i crta regresije s 95% granicama pouzdanosti (plavo zasjenjenje) iz *Modela 2*, tablica 5. **B.** Pojedinačne vrijednosti i crta regresije s 95% granicama pouzdanosti (plavo zasjenjenje) iz *Modela 3*, tablica 5. **C.** Pojedinačne vrijednosti i crta regresije s 95% granicama pouzdanosti (sivo zasjenjenje) iz *Modela 4*, tablica 5. **D.** Pojedinačne vrijednosti i crta regresije s 95% granicama pouzdanosti (sivo zasjenjenje) iz *Modela 5*, tablica 5.

Porast broja stanica u CSL-u inherentan je dijagnozi NPEV AM (tablica 5, slika 10) te ukazuje da je taj porast barem dijelom (vjerojatno – budući da je studija presječna, ne može odrediti vremenski slijed i uzročno-posljedičnu vezu opaženih fenomena) posljedica povišene razine kemokina CXCL10 u CSL-u. Međutim, pleocitoza u NPEV AM bolesnika *nije*

posljedica *samo* toga, odnosno, povišen broj stanica ne može se objasniti samo povišenom likvorskom razinom CXCL10 (ili povišenim gradijentom CSL/serum).

5.3. Koncentracije kemokina CXCL10 i CXCL11 u serumu i CSL-u te CSL-serum gradijent kao prediktori trajanja hospitalizacije u skupini ispitanika oboljelih od NPEV AM (mjera tijeka/težine bolesti)

Za ispitanike oboljele od NPEV AM (n=55) analizirano je postoji li povezanost između trajanja hospitalizacije (zavisna varijabla) i:

- a) CXCL10 u serumu; u CSL-u i gradijenta
- b) CXCL11 u serumu; u CSL-u i gradijenta.

Sve je ispitano u univarijantnim testovima i u multivarijantnim testovima s podešenjem za dob, spol, dan trajanja bolesti u vrijeme prijema, CRP, broj leukocita, broj stanica u CSL-u, te ostalih varijabli.

Nije uočena niti univarijantna niti nezavisna združenost s vrijednostima koncentracija kemokina (bilo kojeg i bilo gdje) i vremena trajanja hospitalizacije.

5.4. Analiza limfocitnih subpopulacija CSL-a metodom protočne citometrije

Većina limfocita u CSL-u su limfociti T dok su limfociti B u svih ispitanika bili zastupljeni s manje od 5%. U populaciji limfocita T dominiraju CD4+ limfociti T (medijan 56.8%) koji su većinom memorijskog fenotipa (medijan 95% od ukupne populacije CD4+ limfocita T), (tablica 6).

Tablica 6. Subpopulacije limfocita CSL-a kod bolesnika oboljelih od NPEV AM

Limfocitna subpopulacija CSL-a	Ispitanici NPEV AM (% , medijan, raspon)	Referentne vrijednosti* (%)
Limfociti T	84,2 (73,8-97,6)	80-100
CD4+ limfociti T	56,8 (50,0-79,9)	50-80
CD8+ limfociti T	20,7 (11,8-24,8)	10-40
Memorijski CD45RO+CD4+ limfociti T (% od ukupne populacije CD4+ limfocita T)	95,0 (85,0-96,0)	>50% ukupne populacije CD4 limfocita T

* referentne vrijednosti prema Odjelu za molekularnu dijagnostiku i protočnu citometriju Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb

6. RASPRAVA

Enterovirusi (EV) uzrokuju široki spektar bolesti, od kojih se neke lako prepoznaju na temelju kliničke slike, a druge se dijagnosticiraju kao nespecifični febrilni sindromi. O infektivnosti i rasprostranjenosti EV govori podatak kako samo u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) simptomatsku infekciju godišnje razvije 10-15 milijuna ljudi.^{20,115}

Zahvaljujući uvođenju aktivne imunizacije (AI) protiv poliomijelitisa, ova bolest je danas gotovo iskorijenjena te su EV infekcije danas uzrokovane non-polio enterovirusima (NPEV). Neovisno o tome prezentiraju li se samo vrućicom ili u sklopu kliničkih sindroma (npr. HFMD, herpangina, pleurodinija ili nespecifična febrilna bolest), infekcije uzrokovane NPEV su većinom blage i ne ostavljaju trajnih posljedica, iako se povremeno mogu manifestirati kao ozbiljnije i potencijalno ugrožavajuće, poput miokarditisa, hepatitisa, kronične infekcije imunokompromitirane djece, generalizirane bolesti novorođenčadi ili neuroloških manifestacija.^{20,35}

Najčešća klinička manifestacija NPEV infekcije SŽS-a je aseptični meningitis. NPEV AM je bolest blagog karaktera, koja ne ostavlja trajnih posljedica.^{42,45,46}

Iako se u literaturi može pronaći mnoštvo studija koje se bave proučavanjem upalnih bolesti SŽS-a, tek nekolicina kliničkih studija ide korak dalje, uzimajući u obzir laboratorijsku dijagnostiku kao važan parametar u procjeni težine, pa i ishoda bolesti.^{80,86,87,89,90-100,104-108}

Primjena novih metoda laboratorijske dijagnostike dovela je do značajnih postignuća na polju istraživanja neuroinflamatornih bolesti. Kao primjer možemo izdvojiti uvođenje PCR metode, osobito pogodne za brzu dijagnostiku nejasnih upalnih bolesti SŽS-a, ili kvantitativnih enzimskih imunotestova kojima se određuje koncentracija kemokina u CSL-u i serumu.

Zahvaljujući brojnim (prije svega eksperimentalnim) studijama, otkriveni su različiti imunološki obrasci, od presudne važnosti za razumijevanje događaja koji se odvijaju za vrijeme postojanja aktivnog upalnog zbivanja.^{69-72,76,79}

Prva znanstvena istraživanja započeta su s pretpostavkom o SŽS-u kao potpunom izoliranom i zaštićenom mjestu, u kojem interakcija stanica nije moguća. Međutim, ova pretpostavka nije se pokazala točnom. Uvođenje nove metode - intravitalne fluorescentne videomikroskopije,

omogućilo je „in vivo“ vizualizaciju prometa leukocita, direktno dokazujući kako je interakcija cirkulirajućih leukocita s endotelnim stanicama oštećene KMB i njihov prolaz u parenhim mozga najvažniji korak u patogenezi upalnih bolesti SŽS-a.^{69,70} Interakcija leukocita i endotelnih stanica posredovana je staničnim adhezijskim molekulama, kemokinima i kemokinskim receptorima.^{69,70,71,78,79}

Iako su primarno kemokini prema učinkovitosti bili podijeljeni u homeostatske i upalne, novije studije ovu podjelu zanemaruju, bazirajući se više na istraživanju njihovog biološkog značaja.^{75-78,80} Kemokini su predstavljeni kao “molekule stražari”⁸³ te im je dodijeljeno mnoštvo funkcija poput sudjelovanja u stvaranju adekvatnog imunološkog odgovora organizma na infekciju, koordiniranja i usmjeravanja imunih stanica na mjesto upale, kao i održavanje upalnog odgovora bez kojeg obrana organizma ne bi bila moguća. Svoj učinak kemokini ostvaruju vežući se na stanične receptore koji pripadaju obitelji G-proteinskih receptora.⁷³⁻⁸³

Ekspresija i aktivacija kemokina i kemokinskih receptora važna je poveznica urođene i stečene imunosti, s obzirom da upravo genski uvjetovana regulacija kemokinskih receptora u smislu aktivacije ili mirovanja prema posebnom obrascu koordinira tijekom imunoreakcije - bilo da se radi o aferentnom, eferentnom ili središnjem dijelu tj. od samog ulaska antigena u organizam, predočavanja antigena od strane APC naivnim limfocitima T i B u limfnom čvoru, do inicijacije adaptivnog imunološkog odgovora.⁷⁵

Nakon spoznaje o kemokinima kao imunomodulatorima i glavnim sudionicima svih bioloških zbivanja, daljnja istraživanja nastoje na molekularnoj i staničnoj razini ispitati aktivnost i udio kemokina u uvjetima infekcije neurotrofnim virusom.^{76,78-80,85-87}

Većinom je riječ o eksperimentalnim studijama provedenim na animalnim modelima inficiranim virusima poput JHMV, LCMC, WNV ili HSV1.

Iako su rezultati istraživanja povremeno kontradiktorni, u većini slučajeva autori se slažu kako su stanice mozga poput astrocita, neurona, pa i mikroglije glavni izvor kemokina te kako trajna ekspresija odabranih kemokina dovodi do progresije bolesti, od kojih neke mogu rezultirati i fatalnim završetkom. Najčešće se spominju CXCL9 i CXCL10 kao non ELR kemokini grupe CXC koji se vežu na CXCR3 stanične receptore na limfocitima T i NK stanicama.^{76,78,80,82-87}

Tek manji broj znanstvenih istraživanja, kreiranih s ciljem proučavanja povezanosti koncentracije kemokina u CSL-u i krvi s težinom kliničke slike^{104,106-108} proveden je na pedijatrijskoj populaciji i većinom se radi o kompliciranom tijeku EV encefalitisa.^{107,108}

Kada je riječ o nekomplikiranim virusnim upalnim bolestima SŽS-a (npr. AM) kod djece, za sada je u literaturi dostupna tek jedna studija koja je nastala kao rezultat istraživanja koja se prikazuju u ovoj disertaciji. Ta studija pokazala je korelaciju ekspresije kemokina CXCL10 i CXCL11 s kliničkim osobitostima NPEV AM te je ujedno i prvi eksperimentalni dokaz kako koncentracijski kemokinski gradijent (CSL-serum) može utjecati na migraciju upalnih stanica u SŽS.¹⁰⁴

S obzirom na oskudne literaturne podatke o ekspresiji kemokina u razvoju NPEV AM, smatrali smo kako bi bilo značajno provesti studiju u kojoj bi se istražila uloga kemokina CXCL10 i CXCL11 u imunopatogenezi ovoga sindroma u djece te time ujedno i upotpunila postojeća znanja o ekspresiji kemokina u akutnim nebakterijskim upalama SŽS-a.

Pri odabiru kontrolne skupine smatrali smo kako je za usporedbu najprikladnije izabrati bolesnike u kojih je upalna bolest SŽS-a isključena. S obzirom na potrebu razmatranja diferencijalne dijagnostike zbog učestalog preklapanja simptoma i znakova bolesti te imajući u vidu da se upalna bolest SŽS-a ne može isključiti bez citološkog i biokemijskog nalaza CSL-a, u ovoj studiji primjena laboratorijske dijagnostike ima posebnu važnost, osobito kada je riječ o dokazu virusnog genoma ili definiranju aktivnosti kemokina koji su važna okosnica studije.

Tipovi enterovirusa izolirani metodom molekularne dijagnostike u ovom istraživanju, nisu dalje tipizirani. U slučaju da je tipizirano svih 55 bolesnika oboljelih od NPEV AM, istraživanje bi moglo pojasniti odnos bioloških svojstava enterovirusa i kliničke slike.

Uspoređujući obje skupine ispitanika prema dobi, vidljivo je kako su ispitanici oboljeli od NPEV AM bili stariji (medijan dobi - 101 mjesec) od ispitanika kontrolne skupine. Raspon dobi naših NPEV AM ispitanika (1-216 mjeseci), korelira s podacima drugih istraživanja,^{35,38} od kojih je jedno provedeno i u Hrvatskoj,⁴⁰ a gdje se NPEV AM najčešće pojavljuje u djece dojenačke do rane školske dobi. Prema podacima drugih istraživanja koja su grupirala i

uspoređivala oboljele od NPEV AM prema dobi, većina oboljele djece pripadala je grupi bolesnika mlađih od 24 mjeseca života.^{20,39} Ovakvu veću podložnost male djece EV infekcijama autori pripisuju nedovoljno razvijenom imunološkom sustavu. Isto tako smatraju kako rijetka izloženost infekcijama nedostatno pobuđuje imunološki sustav u smislu oslabljenog stvaranja tipno specifičnih protutijela.^{20,39}

Sukladno podacima kako kod virusnih upalnih bolesti SŽS-a u dječjoj dobi većinom obolijevaju muška djeca^{1,20,104} i naša je studija pokazala predominaciju muškog spola. Iako su muška djeca u većem broju bila zastupljena u obje skupine uključene u istraživanje, među oboljelima od NPEV AM muški ispitanici značajno dominiraju (40/55). U većini objavljenih studija među oboljelima od NPEV AM navodi se tek diskretna prevaga bolesnika muškog spola, no postoje i radovi u kojima su više od 60% oboljelih upravo dječaci.^{42,43,53} Znanstvena istraživanja, do sada provedena, ne nude objašnjenja za ovakvu spolnu distribuciju.

Trajanje bolesti prije prijema u bolnicu razlikuje se među skupinama ispitanika. Ispitanici s NPEV AM zaprimljeni su u bolnicu između prvog i petog dana bolesti, dok su ispitanici kontrolne skupine bili zaprimljeni između prvog i dvadeset osmog dana bolesti. Smatramo kako je raniji prijem NPEV bolesnika u bolnicu vrlo vjerovatno uvjetovan razvijenijom svjesnosti ili bojazni o mogućem postojanju upalne bolesti SŽS-a, kao i dobroj dostupnosti zdravstvene zaštite u sredini u kojoj je studija provedena.

Analizirali smo i kliničke podatke u ispitanika kod prijema u bolnicu, obraćajući pozornost na podatke koji bi vjerodostojno mogli prezentirati težinu akutnog morbiditeta u smislu procjene intenziteta upalne bolesti SŽS-a.

Analizirani su stoga febrilitet i trajanje febriliteta, postojanje cerebralnih napada, kao i stanje svijesti.

Vrućica je kod prijema prisutna kod gotovo svih ispitanika oboljelih od NPEV AM (54/55) dok je 24/29 ispitanika kontrolne skupine bilo febrilno. Također je opažena i razlika u trajanju febriliteta koji je u oboljelih od NPEV AM trajao najduže pet dana (medijan 2 dana), dok je među ispitanicima kontrolne skupine zabilježeno trajanje febriliteta i do 21 dan. U NPEV AM ispitanika zabilježene su niže prosječne vrijednosti povišene tjelesne temperature (medijan 38,8°C) nasuprot ispitanicima kontrolne skupine gdje je medijan bio 39,6°C.

Za razliku od naše studije, značajan broj bolesnika u dosadašnjim istraživanjima koja se bave AM uzrokovanim NPEV nema vrućicu (12 do 49%).^{1,42,43,53} Vrućica je gotovo uvijek prisutna kod dojenčadi mlađe od tri mjeseca života, a u djece starije od 12 mjeseci izostaje i u više od

polovice oboljelih.^{1,43,53} Činjenicu kako većina naših ispitanika ima vrućicu, možemo, između ostalog, tumačiti i dobnom distribucijom, obzirom da je u skupinu NPEV ispitanika uključen i veći broj mlade dojenčadi pa i djece s tek navršениh mjesec dana života.

U bolesnika s upalnom bolesti SŽS-a važno je procijeniti težinu akutne bolesti, ali i obratiti pažnju na moguće postojanje simptoma koji ukazuju na ekstenzivniju upalnu reakciju koja ne zahvaća samo moždane ovojnice već i mozgovni parenhim. Stoga su u studiji analizirani i podaci o pojavi cerebralnih napada te eventualnoj prisutnosti kvantitativnoga poremećaja svijesti.

Cerebralni napadi su prema definiciji paroksizmalne, ali vremenski ograničene promjene u motornoj aktivnosti i/ili ponašanju koje rezultiraju abnormalnom električnom aktivnošću u mozgu. Mogu se očitovati naglim, ali i prolaznim gubitkom svijesti, promjenama afektivnosti, pojavom nevoljnih kloničkih ili toničkih grčeva skeletne muskulature (konvulzija), atoničkim napadima ili pojavom vegetativnih simptoma. Prema patogenezi dijele se na epileptičke napade, hipoksične, metaboličke, toksične i psihogene cerebralne napade, te neepileptičke napade u spavanju.¹²¹

Konvulzije u febrilitetu su cerebralni napadi koji se javljaju u febrilitetu (najčešće između 14. i 18. mjeseca života, te rijetko prije devetog mjeseca ili pete godine života). Iako većinom benignog tijeka, mogu se javiti u sklopu akutne upalne bolesti SŽS-a (bakterijski meningitis) ili sepse. Dijele se na jednostavne i složene.¹²¹

Cerebralni napadi u skupini oboljelih od NPEV AM, zabilježeni su tek kod manjeg broja bolesnika (2/55) u odnosu na ispitanike kontrolne skupine gdje je veći dio njih doživio febrilne konvulzije; (čak 12/29). Rezultati naše studije sukladni su s podacima ostalih studija, koje navode kako se kod djece oboljele od NPEV AM, cerebralni napadi javljaju u manje od 3% bolesnika i to uglavnom kod male dojenčadi mlađe od 3 mjeseca.^{3,42,43,53}

Pri procjeni stanja svijesti korištena je bodovna ljestvica; Glasgow Koma Skala. Prema zbrojenim bodovima niti jedan ispitanik u grupi oboljelih od NPEV AM nije imao ozbiljniji poremećaj svijesti (medijan 15, raspon 13-15). Svi oboljeli od NPEV AM potpuno su se oporavili, dok su u samo jednog bolesnika kontrolne skupine zabilježene trajne komplikacije, u smislu neuroloških sekvela.

S obzirom na mogućnost komorbidnih infekcija te potrebu jasnog razlučivanja preklapajućih simptoma infekcija, za svakog ispitanika kontrolne skupine je navedena dijagnoza te za ispitanike oboljele od NPEV AM i pridružena dijagnoza.

U skupini oboljelih od NPEV AM, bakterijska infekcija gornjih dišnih putova bila je najčešća pridružena dijagnoza te se spominje u pet (5/55) bolesnika. Slijede ostale dijagnoze: konvulzije u febrilitetu, sepsa, te asimptomatska bakteriurija (po jedan ispitanik svih oboljelih od NPEV AM).

Analizom podataka pridruženih dijagnoza u kontrolnoj skupini, proizlazi kako su četiri ispitanika imala virusnu infekciju (4/29) od kojih je jedan bolesnik imao konvulzije u febrilitetu. Po troje bolesnika imalo je dijagnozu bakterijemije, akutnog bronhiolitisa s pneumonijom te nespecificirane respiratorne infekcije (3/29). Po dvoje bolesnika imalo je CMV/EBV infekciju, kao i BHS-A infekciju (2/29).

Na osnovu dobivenih rezultata (niže prosječne vrijednosti febriliteta, relativno kratko trajanje febrilnih epizoda, podatak o niskoj incidenciji cerebralnih napada, činjenica da niti jedan ispitanik s NPEV AM nije imao teži poremećaj svijesti te podatak o potpunom oporavku svih bolesnika), možemo se složiti sa zaključkom ranije provedenih studija, kako je NPEV AM u djece, blaga, nekomplikirana bolest kratkog tijeka.^{1,20,42,45,46,104}

Analiza laboratorijskih pretraga, krvi i CSL-a provedena je u obje skupine ispitanika s ciljem izdvajanja i definiranja laboratorijskih parametara koji bi mogli imati utjecaja na lakše i brže postavljanje dijagnoze AM.

Usporedbom dobivenih vrijednosti laboratorijskih pretraga krvi može se vidjeti kako ne postoje značajnije razlike u broju eritrocita, trombocita i leukocita te koncentraciji hemoglobina u obje skupine, no koncentracija CRP-a značajno je viša u ispitanika kontrolne skupine. Naime, kod oboljelih od NPEV AM koncentracija CRP-a u serumu nije prelazila koncentraciju od 35 mg/L (medijan 7,4 mg/L), dok su kod ispitanika kontrolne skupine pronađene više koncentracije (maksimum - 145 mg/L; medijan 12,2 mg/L).

Iako razlike u spomenutim nalazima postoje, vrijednosti se pojedinih pretraga značajno preklapaju, tako da se niti jedna pretraga ne može iskoristiti kao nespecifični biljeg koji omogućuje brzo razlikovanje oboljelih od NPEV AM u odnosu na kontrolnu skupinu.

Za sada u literaturi nema slično koncipiranih istraživanja koje bi izdvojile tzv. rutinske laboratorijske parametre specifične za brzu detekciju virusnog meningitisa.

Analizirajući nalaze CSL-a, među skupinama ispitanika primjećene su razlike i to ne samo u broju i vrsti stanica ili koncentraciji proteina, već i u koncentraciji, kao i omjeru kemokina.

U bolesnika oboljelih od NPEV AM medijan broja stanica bio je viši, te je iznosio $600/\text{mm}^3$ (raspon 42-6400), za razliku od ispitanika kontrolne skupine gdje je medijan broja stanica iznosio $5/\text{mm}^3$ (raspon 1-16). Mononukleari, kao i polimorfonukleari pronađeni su u višim postotcima kod skupine ispitanika oboljelih od NPEV AM.

Razlika u broju stanica, kao i u diferencijalnoj citologiji CSL-a, očekivana je s obzirom da je upravo pleocitoza CSL-a jedan od kriterija za postavljanje dijagnoze AM, dok je, s druge strane, pleocitoza bila ekskluzijski kriterij pri odabiru ispitanika kontrolne skupine.

Prema do sada objavljenim rezultatima, pleocitoza u CSL-u bolesnika s AM uzrokovanim NPEV ne bi trebala prelaziti $300-500$ stanica/ mm^3 .^{7,20,43} Ako se uzme u obzir podatak da u više od polovice bolesnika u kojih se lumbalna punkcija učini unutar prvih 48 sati bolesti, u CSL-u postoji predominacija neutrofilnih granulocita, a broj stanica može biti i veći od 1000 stanica/ mm^3 , tada naši rezultati potvrđuju one objavljene u dosadašnjim studijama.^{1,20,46,49,116}

Niti u jednog bolesnika kontrolne skupine ne postoji pleocitoza, niti predominacija neutrofila u CSL-u.

Razlike među grupama ispitanika ne postoje samo u citološkoj pretrazi, već i u biokemijskim nalazima CSL-a. Koncentracija proteina značajno je viša u ispitanika oboljelih od NPEV AM (za gotovo 50%). Rezultat odgovara podatku kako koncentracija proteina u bolesnika s virusnim upalnim bolestima SŽS-a u pravilu korelira s intenzitetom upalne reakcije, odnosno s oštećenjem KLB. Omjer koncentracije glukoze likvor/serum (GUL/GUK) bio je podjednako snižen u obje grupe ispitanika (0,61). Ovaj rezultat u NPEV AM ispitanika nije nas iznenadio, jer sniženi omjer GUL/GUK, iako se često navodi kao tipičan laboratorijski biljeg ABM, ponekad može biti prisutan i u virusnom meningitisu, a također korelira s intenzitetom upalne reakcije.⁴⁴

U literaturi je dostupno tek nekoliko multicentričnih studija, kreiranih u svrhu stvaranja dijagnostičkog postupnika kao pomoćnog sredstva za brzo i jednostavno razvrstavanje bolesnika oboljelih od akutnog meningitisa različitih etiologija i odnose se na razlike između virusnog i bakterijskog meningitisa.^{113,114,117}

Za izdvojiti je studija koju su proveli Nigrovic i sur. Uzimajući u obzir kliničke i laboratorijske kriterije, autori su razvili vlastiti model procjene (eng. Bacterial Meningitis Score; BMS) prema kojem su bolesnici svrstani u grupu visokog ili niskog rizika za razvoj bakterijskog meningitisa. BMS je zamišljen kao svojevrsna poveznica između prediktivnih kriterija i mogućeg ishoda bolesti. Varijable BMS-a koje podrazumijevaju visoki rizik razvoja bakterijskog meningitisa su pozitivni bakterioskopski nalaz sedimenta CSL-a, apsolutni broj neutrofila u CSL-u ≥ 1000 stanica/ μL , proteinorahija (≥ 80 mg/dL), apsolutni broj neutrofila u perifernoj krvi $\geq 10\,000$ stanica/ μL te pojava konvulzija u ranom tijeku bolesti. Vrijednost BMS-a izražava se u bodovima, podrazumijevajući da broj bodova 0 isključuje postojanje akutnog bakterijskog meningitisa (ABM), dok broj bodova ≥ 2 predviđa ABM s osjetljivošću 87%.^{113,114}

Jedina studija koja se bavi usporedbom dviju upalnih bolesti SŽS-a virusne etiologije, a provedena je na većem broju pedijatrijskih ispitanika u dovoljno dugom vremenskom razdoblju jest studija koju je proveo Tešović u sklopu svoje doktorske disertacije.¹ Riječ je o usporedbi dviju skupina bolesnika (oboljeli od PAM nastalog kao posljedica cijepljenja protiv mumpsa i NPEV AM kao kontrolne skupine). Uz detaljan opis kliničkih i laboratorijskih parametara, studija longitudinalno prati bolesnike nakon otpusta iz bolnice.

Osim već spomenutih radova koji opisuju kliničke i laboratorijske parametre važne u razlikovanju virusnog i bakterijskog meningitisa, u literaturi do tada nisu bila dostupna istraživanja koja bi izdvojila parametre ili biljege specifične za trenutno razlikovanje virusnih upalnih bolesti SŽS-a. Stoga je posebnost studije u uspješnoj primjeni multivarijatne analize, te razvijanju modela logističke regresije s ciljem brzog razvrstavanje bolesnika oboljelih od PAM od onih koji boluju od NPEV AM prije etiološkog dokaza infekcije. Metoda multivarijatne analize obuhvaćala je tri varijable; jednu kliničku (visinu vrućice kod prijema u bolnicu) i dvije laboratorijske (postotak atipičnih limfocita tip II i postotak limfocita u CSL-u). Navedeni model ispravno dijagnosticira 89,9% bolesnika s PAM, uz specifičnost od 90,2% te je vrlo lako primjenjiv u praksi, s obzirom da su navedene varijable potrebne pri odlučivanju dostupne odmah po potvrdi kliničke dijagnoze AM.¹

Rezultate ove disertacije vezane za kliničke i laboratorijske osobitosti bolesnika oboljelih od NPEV AM može se izravno usporediti s rezultatima kontrolnih ispitanika Tešovićeve studije, s obzirom da je riječ o skupini bolesnika s istom dijagnozom te približno istim brojem

ispitanika (51 bolesnik s postavljenom dijagnozom NPEV AM u Tešovićevom istraživanju, te 55 NPEV AM bolesnika u našem).

Promatrajući demografske podatke (spol i dob) u obje studije među oboljelima od NPEV AM dominiraju ispitanici muškoga spola. Gledajući dobnu raspodjelu, ispitanici grupe NPEV AM su stariji od ispitanika kontrolnih skupina, iako uz manje razlike u dobnoj granici uključivanja u istraživanje (u našoj studiji uključeni su i ispitanici s navršениh mjesec dana života dok je u Tešovićevoj studiji donja granica dobi za uključenje u studiju definirana dob od devet mjeseci). Pri analizi anamnestičkih podataka, kod Tešovićevih ispitanika bolest prije prijema u Kliniku prosječno traje jedan dan, dok su naši bolesnici u Kliniku primljeni nakon dva dana od nastupa simptoma. Međutim, raspon trajanja bolesti u NPEV AM ispitanika obje studije je isti (1-5 dana). Kad je o prigodnim cerebralnim napadima riječ, niti u jednog Tešovićevog ispitanika nisu zabilježeni cerebralni napadi, dok je dvoje (2/55) naših ispitanika razvilo konvulzije u febrilitetu, što zapravo ne predstavlja nikakvu razliku.

Vrijednosti povišene tjelesne temperature u ispitanika s NPEV AM iz obje studije su gotovo jednake uz srednju vrijednost tjelesne temperature 38,6°C u Tešovićevih bolesnika i 38,8°C kod naših bolesnika. Trajanje vrućice u bolesnika iz obje studije je jednako (medijan trajanja vrućice dva dana.)

U obje studije, niti jedan bolesnik s postavljenom dijagnozom NPEV AM nije imao kvantitativni poremećaj svijesti, a svi bolesnici su se potpuno oporavili od bolesti bez neuroloških posljedica.

Uspoređujući laboratorijske vrijednosti NPEV AM ispitanika u obje studije, pronašli smo sljedeće razlike koje se odnose na analizu CSL-a. Pleocitoza i proteinorahija u naših bolesnika više su u odnosu na Tešovićeve bolesnike, uz približno jednak omjer glukoze u CSL-u i serumu. U svojoj studiji Tešović navodi proporcionalnu korelaciju pleocitoze s proteinorahijom i hipoglikorahijom u oboljelih od PAM-a, no ne i kod ispitanika s NPEV AM, što govori u prilog postojanju pozitivne korelacije između pleocitoze, proteinorahije i težine bolesti. Ovu razliku među rezultatima može se pripisati činjenici da je u skupini naših NPEV AM ispitanika bilo bolesnika koji su pripadali mlađoj dojenačkoj dobi, a koji mogu imati ekstenzivniju i jaču upalnu reakciju SŽS-a. Ostali laboratorijski nalazi poput rutinskih laboratorijskih pretraga krvi, zastupljenosti neutrofila u CSL-u, približno su jednaki u NPEV AM ispitanika obje studije.

Kako nam je za potrebe istraživanja bila dostupna laboratorijska dijagnostika, smatrali smo značajnim u studiji ispitati ulogu kemokina i analizirati postojeći kemokinski gradijent u krvi i CSL-u oboljelih od NPEV AM te ga usporediti s onim u bolesnika iz kontrolne skupine.

Prema dobivenim rezultatima, ispitanici oboljeli od NPEV AM imali su višu koncentraciju kemokina CXCL10 u CSL-u (medijan 21,3 ng/ml, za razliku od kontrolnih ispitanika s medijanom 0,26 ng/mL), kao i viši CXCL10 gradijent tj. omjer koncentracija između CSL-a i seruma (medijan 60,9 ng/ml, a kod kontrolnih ispitanika 0,75 ng/mL), no bez značajnije razlike u koncentraciji navedenog kemokina u serumima obje skupine.

Koncentracije kemokina CXCL11 u CSL-u i serumu također su se razlikovale u obje skupine ispitanika, iako, ako se izuzme gradijent (omjer CXCL11 CSL-serum), razlika nije bila toliko značajna kao kod kemokina CXCL10.

Više koncentracije kemokina CXCL11 pronađene su u CSL-u (medijan 0,24 ng/mL) kod skupine ispitanika oboljelih od NPEV AM, za razliku od kontrolnih ispitanika (medijan 0,07 ng/mL). Isto tako gradijent CXCL11 u CSL-u i serumu oboljelih od NPEV AM bio je viši u odnosu na kontrolnu skupinu (medijan za oboljele od NPEV AM 10,1 ng/mL te kod kontrolne skupine 0,12 ng/mL).

Koncentracije CXCL11 u serumu su bile više u ispitanika kontrolne skupine (medijan 0,12 ng/mL) u odnosu na NPEV AM ispitanike (medijan 0,02 ng/mL).

Prema rezultatima studije, provedene na skupini pedijatrijskih bolesnika oboljelih od NPEV AM, objavljene 2011.g. a koja je prethodila ovom istraživanju, kemokini CXCL10 i CXCL11 pronađeni su u CSL-u oboljelih u višim koncentracijama u odnosu na koncentracije u serumu.¹⁰⁴ Kod kontrolne skupine CXCL10 nije bio značajno povišen niti u CSL-u niti u serumu, dok je CXCL11 pokazivao drukčiji obrazac ekspresije (niže koncentracije u CSL-u u odnosu na serum).¹⁰⁴

U daljnjem tijeku našeg istraživanja, zanimalo nas je da li zavisne varijable poput dobi, spola ili vremena trajanja bolesti do prijema u bolnicu mogu utjecati na koncentracije CXCL10 i CXCL11 u CSL-u i serumu te na gradijente CSL/serum.

U cilju postizanja točnih rezultata, korištena je metoda multivarijatne multiple regresije.

Međusobno su uspoređene dvije skupine ispitanika (oboljeli od NPEV AM i kontrolna skupina) za šest zavisnih varijabli (koncentracije dva kemokina u serumu, CSL-u te za svaki kemokinski omjer tj. gradijent).

Uzimajući u obzir dob, spol i dan trajanja bolesti u vrijeme prijema (uzimanja uzoraka), dolazimo do istog zaključka kao i kada smo ispitivali samo postojanje koncentracija kemokina CXCL10 i CXCL11 i kemokinskih gradijenata u CSL-u i serumu uspoređujući dvije skupine međusobno. Ispitanici NPEV AM skupine imali su više koncentracije CXCL10 u CSL-u (15,9 puta) od kontrolnih ispitanika, uz viši CXCL10 gradijent CSL-serum (19 puta) te podjednake koncentracije CXCL10 u serumu. Serumska koncentracija CXCL11 bila je nešto niža (16%), a likvorska koncentracija CXCL11 nešto viša (26%) kod ispitanika NPEV AM skupine, pa je i CXCL11 gradijent CSL-serum bio viši (50%).

Stoga možemo zaključiti kako dob, spol i dani trajanja bolesti u vrijeme prijema (uzimanja uzoraka) nemaju utjecaja ni na koncentracije kemokina, niti na kemokinske gradijente u CSL-u obje skupine ispitanika.

Pretražujući dostupnu literaturu, kada je o pedijatrijskoj populaciji riječ, do sada nisu objavljena istraživanja koja bi uspoređivala postojanje ovisnosti kemokinskih koncentracija s dobi, spolom ili vremenom trajanja bolesti prije prijema u bolnicu. Postoje tek studije koje uspoređuju koncentracije kemokina s težinom bolesti poput studije Wanga i sur. objavljene 2008.g. koja obuhvaća pedijatrijske bolesnike oboljele od encefalitisa, kao ozbiljne neurološke komplikacije infekcije EV 71.¹⁰⁸

Wangova studija utvrdila je visoke koncentracije kemokina CXCL9, CXCL10, CCL2 i IL-8 u CSL-u i plazmi djece kod kojih je bolest komplicirana plućnim edemom, jednom od potencijalno letalnih komplikacija infekcije EV 71.¹⁰⁸ Ovakvi rezultati povezuju se s težim kliničkim tijekom i lošijim ishodom bolesti. Iako je riječ o slično koncipiranim istraživanjima, rezultati studije Wanga i sur. ne mogu se direktno uspoređivati s našim rezultatima, s obzirom da je riječ o dvjema neurološkim manifestacijama EV infekcije koje se ne mogu usporediti prema težini bolesti (AM nasuprot ozbiljnijeg encefalitisa). Osim toga studija provedena na oboljelima od NPEV AM nije ograničena samo na EV 71, već se radi o AM uzrokovanom različitim serotipovima EV. Također postoji i razlika kada je riječ o kemokinskom gradijentu. Naime, u Wangovoj studiji nije zabilježen koncentracijski gradijent CXCL10 između CSL-a i plazme, neovisno o tome da li se radilo o nekompliciranom encefalitisu, disregulaciji SŽS-a ili kompliciranom PE.

Već na temelju podataka sažetih u tablici 3, vidljivo je kako su ispitanici NPEV AM skupine imali veći broj stanica u CSL-u u odnosu na ispitanike kontrolne skupine (što i jest jedan od ključnih dijagnostičkih kriterija AM). Izrada disertacije započeta je s hipotezom da kemokini CXCL10 i/ili CXCL11, potiču migraciju imunih stanica u CSL kao odgovor na virusnu infekciju. S obzirom da se rezultati istraživanja obje skupine ispitanika u smislu koncentracija kemokina razlikuju tj. da su zamijećene više koncentracije kemokina CXCL10 i CXCL11, kao i njihovih gradijenata u CSL-u oboljelih od NPEV AM, hipotezu smo potvrdili. Međutim, kako bismo ustanovili odnos između same bolesti (NPEV AM), koncentracije kemokina CXCL10 i CXCL11 u CSL-u i gradijenta CSL/serum i broja stanica u CSL-u, broj stanica u CSL-u (kao zavisna varijabla) analiziran je u nizu sukcesivnih regresijskih modela (tablica 5).

U prvom modelu usporedili smo NPEV AM ispitanike i kontrolne ispitanike ovisno o broju stanica u CSL-u.

Uz podešenje za dob, spol i trajanje bolesti u vrijeme prijema (i uzimanja uzoraka), NPEV AM ispitanici imali su veći broj stanica po mm^3 CSL-a od kontrolnih ispitanika. Ovi rezultati očekivani su, jer upravo pleocitoza razlikuje ove dvije skupine bolesnika te će u slučaju upalne bolesti SŽS-a biti prisutna neovisno o dobi, spolu, ili vremenu uzimanja uzorka. Kako je već spomenuto visina pleocitoze jedan je od odlučujućih faktora u razlikovanju virusnog od bakterijskog meningitisa, no kako je u našoj studiji riječ o dokazanom virusnom meningitisu (PCR) nije bilo potrebno koristiti druge varijable, inače potrebne za razlikovanje AM od ABM. Zasigurno postoje razlike u visini pleocitoze ovisno o dobi ispitanika, no nisu analizirane u ovoj studiji.

U drugom modelu ispitali smo postoji li korelacija između likvorske koncentracije CXCL10 i CXCL11 i broja stanica u CSL-u.

Uz podešenje za dob, spol, trajanje bolesti i likvorsku koncentraciju CXCL10, više vrijednosti CXCL10 u CSL-u bile su združene s većim brojem stanica, dok nije uočena značajna povezanost između likvorske koncentracije CXCL11 i broja stanica.

Više studija pokazalo je pozitivnu povezanost koncentracije CXCL10 i pleocitoze u virusnim upalnim bolestima SŽS-a, no niti jedna ne obuhvaća pedijatrijsku populaciju.^{85,97,99,116,118} Jedna od tih studija je provedena u odraslih bolesnika s neurološkim komplikacijama HIV-1 infekcije. Autori studije povezuju pojačanu ekspresiju CXCL10, ne samo s mononuklearnom pleocitozom, već i s pojavom inducirane stanične smrti neurona.¹¹⁶

Istraživanje slično našem proveli su Lopes-Cortes,⁹⁹ a nekoliko godina kasnije i Lahrtz,⁹⁷ analizirajući koncentracije IL-8 u AM i ABM, ovisno o fazi bolesti. Autori studija slažu se kako u virusnom meningitisu IL-8 može biti predominantni kemokin samo u inicijalnoj fazi bolesti i tada broj neutrofila u CSL-u korelira s njegovom ekspresijom.

Kada je riječ o detekciji određenih kemokina kao biljega intratekalne sinteze i progresije upalne bolesti SŽS-a, zanimljivo je najnovije istraživanje japanskih autora, objavljeno 2014.g.¹¹⁸

Studija se s našom može usporediti u pogledu usporedbe varijabli (dob, spol, vrijeme uzimanja uzoraka CSL-a, broj stanica i koncentracija proteina u CSL-u, te koncentracije određenih kemokina i citokina u CSL-u) među skupinama oboljelih od AM, akutnog diseminiranog encefalomijelitisa (ADEM) te kontrolne skupine. Slično našim rezultatima i u ovoj studiji je uočena pozitivna korelacija između pleocitoze i koncentracije CXCL13 u CSL-u oboljelih od AM i ADEM-a. Autori smatraju kako praćenje porasta likvorske koncentracije CXCL13 u akutnoj bolesti može biti koristan prediktivni marker u prognozi AM tj. može pomoći u detekciji progresije AM u ADEM.¹¹⁸

Studije provedene na odraslim bolesnicima oboljelima od MS također opisuju korelaciju pleocitoze s povišenom koncentracijom određenih kemokina. U ovom slučaju kemokini su izolirani kao glavni prediktori relapsa i remisije bolesti.^{89,90,92} Za izdvojiti je studija Mahada i sur. po strukturi vrlo slična našoj, koja definira profil kemokina u CSL-u oboljelih od MS s učestalim relapsima i remisijama te uspoređuje rezultate s kontrolnom skupinom (bolesnicima kod kojih je isključena upalna bolest SŽS-a). CXCL10 je izoliran u povišenim, a CCL2 u sniženim koncentracijama u CSL-u bolesnika s relapsom bolesti. Koncentracije CXCL10 pozitivno su korelirale ne samo s pleocitozom, već i s ekspresijom CXCR3 receptora na CD4+ T stanicama u CSL-u te je tako još jednom dokazana važna uloga CXCR3 receptora u kemoatrakciji stanica u CSL.⁹²

Literaturni podaci o aktivnosti CXCL11 u upalnim bolestima SŽS-a su oskudni. Većinom su to studije provedene na odraslim bolesnicima oboljelima od neuroborelioze ili KME.^{93,95,117} U studiji koju je proveo Rupprecht i sur. CXCL11 je pronađen u visokim koncentracijama u CSL-u oboljelih od neuroborelioze, no za razliku od naših rezultata u ovoj studiji je postojala značajna pozitivna korelacija između koncentracija CXCL11 i broja stanica u CSL-u.¹¹⁷

U studiji Lepej i sur. koja analizira oboljele od KME, osim dokaza povišenih koncentracija kemokina CXCL10 i CXCL11, u CSL-u oboljelih i dokaza CXCL10 gradijenta dodatno je učinjena analiza limfocitnih subpopulacija CSL-a te je zastupljenost limfocita T (CD4+) u CSL-u procijenjena na 71%. Nije vršena daljnja usporedba pleocitoze u odnosu na kemokinsku koncentraciju ili kemokinski gradijent, iako se iz rezultata istraživanja može uočiti pozitivna korelacija ovih varijabli.⁹⁵

Rezultati naše studije također obuhvaćaju analizu limfocitnih subpopulacija CSL-a. Većina limfocita u CSL-u su limfociti T dok su limfociti B u svih ispitanika bili zastupljeni s manje od 5%. U populaciji limfocita T dominiraju CD4+ limfociti T (medijan 56,8%) koji su većinom memorijskog fenotipa (CD45RO+) (medijan 95% od ukupne populacije CD4+ limfocita T).

U trećem modelu naše studije, testiran je učinak gradijenta CSL/serum za oba kemokina. Veći gradijent za CXCL10 bio je združen s većim brojem stanica u CSL-u, dok za CXCL11 nije uočena takva združenost. U odnosu na opisane činjenice o pozitivnoj korelaciji pleocitoze i CXCL10, isti rezultati očekivani su i dobiveni za CXCL10 gradijent. Rezultate ne možemo uspoređivati obzirom da u literaturi nisu objavljena istraživanja koja bi opisivala korelaciju gradijenta oba kemokina i pleocitoze.

Smatrali smo zanimljivim istražiti važnost učinka kemokina CXCL10, kao izoliranog faktora u samom procesu poticanja migracije upalnih stanica u SŽS te koliko je značajna njegova uloga u razvoju NPEV AM. Stoga je četvrti model istodobno testirao združenost dijagnoze i likvorske koncentracije CXCL10 i broja stanica u CSL-u, a peti model je istodobno testirao združenost dijagnoze i gradijenta CSL/serum i broja stanica u CSL-u.

Navedeni modeli ukazuju na izostanak združenosti CXCL10 koncentracija u CSL-u i broja stanica kada se analiziraju zasebno za NPEV AM skupinu i zasebno za kontrolnu skupinu ispitanika.

Na osnovu dobivenih rezultata, možemo zaključiti kako za vrijeme razvoja NPEV AM, kemokin CXCL10 potiče migraciju upalnih stanica u SŽS, no pri tome procesu nije jedini, a niti odlučujući faktor, već samo jedan od mehanizama uključenih u povećanje broja stanica u CSL-u oboljelih. Možemo se složiti s rezultatima dosadašnjih studija o važnoj ulozi CXCL10

u razvoju protektivnog imunološkog odgovora. Međutim kada su CXCL10 i CXCL10 gradijent CSL/serum analizirani u modelu u kojem je uzeta u obzir i bolest, nije pronađeno združenosti između pleocitoze i kemokina CXCL10 ili CXCL10 gradijenta. Ova činjenica jasno govori kako je uloga CXCL10 u cjelokupnom razvoju, tijeku i ishodu nekomplikirane upalne bolesti SŽS-a, više sinergistička nego odlučujuća.

Druge mehanizme koji utječu na pleocitozu nismo ispitivali u ovoj studiji.

U literaturi nije objavljena studija koja bi istraživala učinak kemokina CXCL10 ili njegovog gradijenta na razvoj bolesti. Upravo rezultat da CXCL10, kao i njegov gradijent postoje u visokim koncentracijama kod pedijatrijskih ispitanika oboljelih od NPEV AM, ali su tek jedan od mnoštva faktora koji utječu na migraciju upalnih stanica u SŽS tijekom virusno inducirane bolesti SŽS-a, čini ovu studiju posebnom i jedinim eksperimentalnim dokazom o aktualnom udjelu kemokina CXCL10 i CXCL11 u patogenezi NPEV AM kod djece.

U literaturi su dostupne tek eksperimentalne studije provedene na animalnim modelima, u kojima je stvoren model EAE s namjerom proučavanja patogeneze akutnih i kroničnih upalnih demijelinizacijskih bolesti. Posebna pažnja poklonjena je non ELR kemokinima, tj. IFN- γ inducibilnim kemokinima CXCL9, CXCL10 i CXCL11. Koristeći metode imunološke dijagnostike autori su potvrdili diferentnu ulogu kemokina ovisno o tijeku i fazi bolesti. U akutnoj fazi infekcije CXCL10 ne samo da inhibira replikaciju virusa, već potiče i održava protektivni imunološki Th1 odgovor u smislu generiranja proizvodnje visokih koncentracija antivirusnog Th1 citokina IFN- γ . Međutim u slučaju kroničnog perzistiranja virusa u tkivu mozga kontinuirana ekspresija kemokina potiče trajno stvaranje i infiltraciju parenhima mozga stanicama imunološkog sustava (efektorima), direktno posredujući u neurotoksičnosti, demijelinizaciji i staničnoj smrti. Trajna ekspresija kemokina jedan je od najvažnijih čimbenika u razvoju autoimunih i kroničnih upalnih bolesti, osobito ako je riječ o demijelinizacijskim bolestima SŽS-a.^{76,78,79,80,83,86}

Međutim, kada je riječ o razvoju eksperimentalne terapije u smislu neutralizirajućeg monoklonskog protutijela za CXCL10, rezultati istraživanja su kontradiktorni. Dok prema nekim izvješćima primjena monoklonskog protutijela intenzivira manifestacije bolesti, prema drugim rezultatima upravo je inhibicija interakcije ligand-receptor putem anti-CXCL10 protutijela uzrok kliničkom i histološkom poboljšanju EAE.^{83,86} Konačno rješenje ponudili su Müller i sur. u studiji provedenoj 2010.g. gdje se navodi kako primjena monoklonskih

CXCL9 i CXCL10 protutijela u ranom, akutnom tijeku bolesti štetno djeluje na konačni ishod bolesti uzrokujući višu stopu mortaliteta zbog izostanka protektivnog Th1 odgovora (važnog za svladavanje viralne replikacije), no blokiranje CXCL10 specifičnim protutijelom u kroničnoj fazi demijelinizacijske bolesti pokazalo se iznimno korisnim te je rezultiralo značajnim kliničkim poboljšanjem.⁷⁶ Primjena anti CXCL9 protutijela u kroničnoj fazi bolesti nije se pokazala uspješnom.

Kemokin CXCL11 u literaturi nije toliko zastupljen u virusno induciranim bolestima SŽS-a, poput CXCL10. U povišenim koncentracijama izoliran je u astrocitima laboratorijskih životinja s EAE. Prisutan je u akutnoj fazi bolesti, njegova ekspresija korelira sa simptomima bolesti, no nema podataka o njegovoj funkciji u kroničnoj bolesti.⁷⁶

Stoga, podaci dosadašnjih istraživanja vezanih za CXCL11^{93,94,95,117} samo djelomično koreliraju s našima (CXCL11 je pronađen u povišenim koncentracijama u CSL- u oboljelih), međutim nije uočena značajna povezanost između likvorske koncentracije CXCL11 (a niti njegovog gradijenta) i broja stanica.

Uz pretpostavku da kraća hospitalizacija podrazumijeva brže ozdravljenje, u našoj studiji je ispitana povezanost između trajanja hospitalizacije i koncentracije kemokina CXCL10 i CXCL11 u serumu i CSL-u.

Sve je ispitano u univarijatnim i u multivarijatnim testovima s podešenjem za dob, spol, dan trajanja bolesti u vrijeme prijema, CRP, broj leukocita, broj stanica u CSL-u te ostalih varijabli. Nije uočena niti univarijatna niti nezavisna združena povezanost koncentracija kemokina CXCL10 i CXCL11 i vremena trajanja hospitalizacije.

Na osnovu dobivenih rezultata, možemo zaključiti kako koncentracija kemokina ne bi trebala imati znatnog utjecaja na sam proces oporavka od bolesti. Ove rezultate možemo smatrati prihvatljivima, pa i očekivanim s obzirom da je u ovoj studiji riječ o blagoj i spontano izlječivoj EV infekciji koja zahvaća moždane ovojnice i ne zadire u moždani parenhim te se posljedično tome ne očekuje kronična perzistencija virusa, koja bi mogla biti uzrokom kontinuirane kemokinske ekspresije.

7. ZAKLJUČAK

1. AM uzrokovan NPEV kod djece blaga je bolest nekompliciranog i kratkog tijeka, koja ne ostavlja trajnih posljedica na daljnji neurološki razvoj
2. Hematološke i biokemijske pretrage krvi od male su vrijednosti za postavljanje dijagnoze NPEV AM te se dijagnoza postavlja analizom CSL-a
3. Kod skupine pedijatrijskih bolesnika oboljelih od NPEV AM ustanovljene su više koncentracije kemokina CXCL10 u CSL-u u usporedbi s kontrolnom skupinom bolesnika te podjednake koncentracije kemokina CXCL10 u serumu. CXCL10 gradijent CSL-serum (omjer koncentracija) značajno je viši u NPEV AM skupini
4. CSL pedijatrijskih bolesnika oboljelih od NPEV AM sadrži više koncentracije kemokina CXCL11 u odnosu na CSL kontrolne skupine pedijatrijskih bolesnika. Serumske koncentracije kemokina CXCL11 u pedijatrijskih bolesnika oboljelih od NPEV AM bile su podjednake ili nešto niže u odnosu na ispitanike kontrolne skupine. CXCL11 gradijent CSL-serum (omjer koncentracija) viši je u skupine ispitanika oboljelih od NPEV AM
5. Stupnjevitom analizom nije ustanovljena združenost koncentracija kemokina CXCL10 ili CXCL11 u CSL-u ili serumu te gradijenta CSL-serum s dobi, spolom ili duljinom trajanja bolesti u vrijeme prijema
6. Više vrijednosti kemokina CXCL10 u CSL-u, kao i CXCL10 gradijenta združene su s većim brojem stanica u CSL-u, dok nije uočena takva združenost između pleocitoze i likvorske koncentracije kemokina CXCL11 ili CXCL11 gradijenta CSL-serum
7. Ukupno, podaci ukazuju da tijekom razvoja NPEV AM, kemokin CXCL10 potiče migraciju upalnih stanica u SŽS, no u tom procesu nije ni jedini, a niti odlučujući faktor, već samo jedan od mehanizama. Ti ostali mehanizmi u ovoj studiji nisu ispitivani

8. Ova studija nije oblikovana kako bi procjenila prediktivne vrijednosti likvorskih koncentracija kemokina CXCL10 ili CXCL11 u ishodu NPEV AM. U mjeri u kojoj se duljina hospitalizacije može smatrati indikatorom brzine rezolucije simptoma, studija ne sugerira združenost između likvorske koncentracije kemokina CXCL10 i tijeka bolesti.

9. Prema analizi limfocitnih subpopulacija CSL-a metodom protočne citometrije većina limfocita u CSL-u su limfociti T dok su limfociti B u svih ispitanika bili zastupljeni s manje od 5%. U populaciji limfocita T dominiraju CD4+ limfociti T koji su većinom memorijskog fenotipa CD45RO.

8. SAŽETAK

KEMOKINI CXCL10 I CXCL11 U PATOGENEZI ENTEROVIRUSNOGA MENINGITISA

Cilj istraživanja:

Utvrđiti profil kemokina CXCL10 i CXCL11 u krvi i CSL-u u djece oboljele od NPEV AM i analizirati postojeći kemokinski gradijent te ga usporediti s onim u bolesnika iz kontrolne skupine.

Ispitanici i metode:

U studiju je uključeno 84 bolesnika; 55 bolesnika s dokazanim NPEV AM i 29 bolesnika u kontrolnoj skupini u kojih je upalna bolest SŽS-a isključena na temelju urednog citološkog i biokemijskog nalaza CSL-a. Etiološka dijagnoza NPEV AM dokazana je detekcijom enterovirusne RNA u CSL-u PCR metodom. Koncentracija kemokina određena je standardiziranim kvantitativnim enzimskim imunotestovima.

Rezultati:

Analizirajući CSL obje skupine ispitanika, kod ispitanika s NPEV AM kemokini CXCL10 (median 21,3 ng/mL) i CXCL11 (median 0,24 ng/mL) su detektirani u višim koncentracijama u odnosu na kontrolne ispitanike (CXCL10 medijan 0,26 ng/mL), (CXCL11 medijan 0,21 ng/mL). Serumske koncentracije CXCL10 u NPEV AM ispitanika (medijan 0,27 ng/mL) i kontrolnih ispitanika (CXCL10 medijan 0,21 ng/mL) nisu se značajnije razlikovale. Serumske koncentracije CXCL11 bile su u obje skupine jednake ili nešto niže u NPEV AM skupini. Kod NPEV AM bolesnika utvrđena je pozitivna korelacija između likvorskih koncentracija CXCL10, te CXCL10 gradijenta i pleocitoze u CSL-u.

Zaključak:

Za NPEV AM karakteristične su povišene vrijednosti kemokina CXCL10 i CXCL11 u CSL-u. Stvaranje CXCL10 koncentracijskog gradijenta između CSL-a i plazme samo je jedan od mnoštva faktora koji, u obliku lokalnog imunološkog odgovora na NPEV infekciju, utječe na migraciju upalnih stanica u SŽS.

Ključne riječi: aseptični meningitis, non polio enterovirusi, kemokini CXCL10, CXCL11

9. SUMMARY

Aim: To define the role of chemokines CXCL10 and CXCL11 and chemokine concentration gradient between the peripheral blood and CNS in immunopathogenesis of non polio enteroviral aseptic meningitis (NPEV AM).

Patients and methods: The study included 84 pediatric patients; 55 with NPEV AM and 29 controls in whom CNS infection has been excluded by negative CSF examination. The NPEV etiology has been proven by detection of enteroviral RNA using real-time PCR method. Chemokines were quantified by using standardized enzyme immunoassay.

Results:

Concentrations of CXCL10 (median 21.3 ng/mL) and CXCL11 (median 0.24 ng/mL) in CSF samples of children with NPEV AM (0.27 ng/mL) were higher in comparison to control group (CXCL10 median 0.26 ng/mL, CXCL11 median 0.21 ng/mL).

CXCL10 concentrations in the sera of NPEV AM group (median 0.27 ng/mL) and controls (CXCL10 median 0.21 ng/mL) did not differ significantly. CXCL11 sera concentrations were equal or slightly lower within NPEV AM group. Positive correlation between CSF CXCL10 concentrations or CXCL10 CSF-plasma gradient (median 60.9 ng/mL) and CSF pleocytosis in patients with NPEV AM was determined as well.

Conclusion: CXCL10 and CXCL11 concentration gradient between the CSF and plasma in children with NPEV AM suggests an important role of these chemokines in the T-cells recruitment into the CNS and local immunoreaction.

Key words: aseptic meningitis, non polio enteroviruses, chemokine CXCL10, CXCL11

Title of the thesis: CHEMOKINES CXCL10 AND CXCL11 IN THE PATHOGENESIS OF ENTEROVIRAL MENINGITIS

Anamarija Čavčić

Zagreb, 2015

10. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Tešović G. Prospektivna studija neurovirulencije cjepnog soja mumpsa L-Zagreb (disertacija). Zagreb: Medicinski fakultet; 2006, str. 32-35
2. Cherry JD, Nielsen KA. Aseptic meningitis and viral meningitis. U: Feigin RD, Cherry JD, Demmler GJ, Kaplan SL, ur. Textbook of Pediatric Infectious Diseases. 5. izd. Philadelphia: Saunders; 2004, str. 497-505
3. Rotbart HA. Enteroviral infections of the central nervous system. Clin Infect Dis 1995;20:971-81
4. Borčić B, Dobrovšak-Šourek V. Utjecaj obveznog cijepljenja na pobol od određenih zaraznih bolesti. Paediatr Croat 1998;42:1-3
5. Tešović G. Virusna cjepiva - stanje u Hrvatskoj početkom 2005. godine. Paediatr Croat 2005;49:171-8
6. Trallero G, Casas I, Avellon A, Perez C, Tenorio A, De La Roma A. First epidemic of aseptic meningitis due to echovirus type 13 among Spanish children. Epidemiol Infect 2003;130:251-6
7. Sawyer MH, Rotbart HA. Viral meningitis and aseptic meningitis syndrome. U: Scheld WM, Whitley RJ, Marra CM, ur. Infections of the Central Nervous System. 3. izd. Philadelphia:Lippincott; 2004, str.75-93
8. Huang YP, Lin TL, Hsu LC, i sur. Genetic diversity and C2-like subgenogroup strains of enterovirus 71, Taiwan, 2008. Virol J 2010;7:277
9. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. J Virol 1999;73:1941-1948
10. Harris KG, Coyne CB. Enter at your own risk: how enteroviruses navigate the dangerous world of pattern recognition receptor signaling. Cytokine 2013;63:230-6
11. Enterovirus update page. <http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>
12. ICTV update page. <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>
13. Fowlkes AL, Honarmand S, Glaser C i sur. Enterovirus-associated encephalitis in the California encephalitis project, 1998-2005. J Infect Dis 2008;198:1685-91
14. Rhoades RE, Tabor-Godwin JM, Tsueng G, Feuer R. Enterovirus infections of the central nervous system. Virology 2011;411:288-305

15. Lo CW, Wu KG, Lin MC i sur. Application of a molecular method for the classification of human enteroviruses and its correlation with clinical manifestations. *J Microbiol Immunol Infect* 2010;43:354-9
16. Ooi MH, Wong CS, Lewthwaite P, Cardoso MJ, Solomon T. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *Lancet Neurol* 2010;11:1097-105
17. Yang C, Deng C, Wan J, Zhu L, Leng Q. Neutralizing antibody response in the patients with hand, foot and mouth disease to enterovirus 71 and its clinical implications. *Virol J* 2011;8:306
18. Kargar M, Sadeghipour S, Nategh R. Environmental surveillance of Non-Polio Enteroviruses in Iran. *Virol J* 2009;6:149
19. Shafren DR. Viral cell entry induced by cross-linked decay-accelerating factor. *J Virol* 1998;72:9407-12
20. Sawyer MH. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002;13:40-7
21. Rabenau HF, Richter M, Doerr HW. Hand, foot and mouth disease: seroprevalence of Coxsackie A16 and Enterovirus 71 in Germany. *Med Microbiol Immunol* 2010;199:45-51
22. Chatproedprai S, Theanboonlers A, Korkong S, Thongmee C, Wananukul S, Poovorawan Y. Clinical and molecular characterization of hand-foot-and-mouth disease in Thailand, 2008-2009. *J Infect Dis* 2010;63:229-33
23. Cho HK, Lee NY, Lee H i sur. Enterovirus 71-associated hand, foot and mouth diseases with neurologic symptoms, a university hospital experience in Korea, 2009. *Korean J Pediatr* 2010;53:639-43
24. Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T i sur. Human SCARB2-dependent infection by coxsackievirus A7, A14, and A16 and enterovirus 71. *J Virol* 2012;86:5686-96
25. Chen KT, Chang HL, Wang ST, Cheng YT, Yang JY. Epidemiologic features of hand-foot-mouth disease and herpangina caused by enterovirus 71 in Taiwan, 1998-2005. *Pediatrics* 2007;120:244-52
26. Sun LM, Zheng HY, Zheng HZ i sur. An enterovirus 71 epidemic in Guangdong Province of China, 2008: epidemiological, clinical, and virogenic manifestations. *Jpn J Infect Dis* 2011;64:13-8
27. Kehle J, Roth B, Metzger C, Pfitzner A, Enders G. Molecular characterization of an Enterovirus 71 causing neurological disease in Germany. *J Neurovirol* 2003;9:126-8

28. Kobayashi M, Makino T, Hanaoka N i sur. Clinical manifestations of coxsackievirus a6 infection associated with a major outbreak of hand, foot, and mouth disease in Japan. *Jpn J Infect Dis* 2013;66:260-1
29. Abzug MJ. Nonpolio Enteroviruses. U: Behrman R, Kliegman RM, Jenson HB, ur. Nelson Textbook of Pediatrics, 17 izd. Philadelphia: Saunders; 2004, str. 1042-8
30. Ho M, Chen ER, Hsu KH, Twu SJ, Chen KT, Tsai SF. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *N Engl J Med* 1999;341:929–35
31. Tavares FN, Costa EV, Oliveira SS, Nicolai CC, Baran M, da Silva EE. Acute hemorrhagic conjunctivitis and coxsackievirus A24v, Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Emerg Infect Dis* 2006;12:495-7
32. Martino TA, Liu P, Petric M, Sole MJ. Enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy: a review of clinical and experimental studies. U: Rotbart HA, ur. Human enterovirus infections. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 1995, str. 291-351
33. May LJ, Patton DJ, Fruitman DS. The evolving approach to paediatric myocarditis: a review of the current literature. *Cardiol Young* 2011;28:1-11
34. Deenert R, Crijns HR, Heymans S. Acute viral myocarditis. *Eur Heart J* 2008;29:2073-82
35. Abzug MJ. Nonpolio Enteroviruses. U: Kliegman RM, Behrman R, Jenson HB, Stanton BF. Ur. Nelson Textbook of Pediatrics, 18. izd. Philadelphia: Saunders; 2007, str. 1350-6
36. Hawkes MT, Vaudry W. Nonpolio enterovirus infection in the neonate and young infant. *Paediatr Child Health* 2005;10:383-8
37. Abzug MJ. Presentation, diagnosis, and management of enterovirus infections in neonates. *Paediatr Drugs* 2004;6:1-10
38. Rittichier KR, Bryan PA, Bassett KE i sur. Diagnosis and outcomes of enterovirus infections in young infants. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:546-50
39. Dalwai A, Ahmad S, Al-Nakib W. Echoviruses are a major cause of aseptic meningitis in infants and young children in Kuwait. *Virol J* 2010;7:236
40. Ljubin-Sternak S, Vilibić-Cavlek T, Kaić B i sur. Virologic and epidemiological characteristics of non-polio infection in Croatia over a ten-year period (2000-2009). *Acta Med Croatica* 2011;65:237-42
41. Prather SL, Dagan R, Jenista JA, Menegus M. The isolation of enteroviruses from blood: a comparison of four processing methods. *J Med Virol* 1984;14:221-7
42. Rorabaugh ML, Berlin LE, Heldrich F i sur. Aseptic meningitis in infants younger than 2 years of age. Acute illness and neurologic complications. *Pediatrics* 1993;92:206-11

43. Dagan R, Jenista JA, Menegus MA. Association of clinical presentation, laboratory findings and virus serotypes with the presence of meningitis in hospitalized infants with enterovirus infection. *J Pediatr* 1988;113:975-8
44. Tunkel AR, Scheld WM. Acute meningitis. U: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, ur. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6. izd. Philadelphia: Elsevier; 2005, str.1083-126
45. Bergman I, Painter MJ, Wald ER, Chiponis D, Holland AL, Taylor HG. Outcome in children with enteroviral meningitis during the first year of life. *J Pediatr* 1987;110:705-9
46. Huang CC, Liu CC, Chang UC, i sur. Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection in Taiwan. *N Eng J Med* 1999;341:936-42
47. Groneck P, Jahn P, Schuler-Lüttmann S, Beyrer K. Neonatal enterovirus meningitis: transmission via parents during rooming-in and current epidemiology in Germany. *Z Geburtshilfe Neonatol* 2011;215:1-5
48. Quartier P, Foray S, Casanova JL, Hau-Rainsard I, Blanche S, Fischer A. Enteroviral meningoencephalitis in X-linked agammaglobulinemia: intensive immunoglobulin therapy and sequential viral detection in cerebrospinal fluid by polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J* 2000;11:1106-8
49. Negrini B, Kelleher KJ, Wald ER. Cerebrospinal fluid findings in aseptic versus bacterial meningitis. *Pediatrics* 2000;105:316-9
50. Hosoya M, Sato M, Honzumi K, i sur. Application of polymerase chain reaction and subsequent phylogenetic analysis to the diagnosis of enteroviral infection in the central nervous system. *J Clin Virol* 2002;25:27-38
51. Stellrecht KA, Harding I, Woron AM, Lepow ML, Venezia RA. The impact of an enteroviral RT-PCR assay on the diagnosis of aseptic meningitis and patient management. *J Clin Virol* 2002;25:19-26
52. Seme K, Mocilnik T, Komlos KF, i sur. GeneXpert enterovirus assay: one-year experience in a routine laboratory setting and evaluation on three proficiency panels. *J Clin Microbiol* 2008;46:1510-3
53. Somekh E, Cesar K, Handsher R, i sur. An outbreak of echovirus 13 meningitis in central Israel. *Epidemiol Infect* 2003;130:257-62
54. Pollak L, Klein C, Schiffer J, Flechter S, Rabey JM. Electroencephalographic abnormalities in aseptic meningitis and noninfectious headache: a comparative study. *Headache* 2001;41:79-83

55. Yan JJ, Wang JR, Liu CC, Yang HB, Su IJ. An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan 1998: a comprehensive pathological, virological, and molecular study on a case of fulminant encephalitis. *J Clin Virol* 2000;17:13-22
56. Prober GC. Central Nervous system infections. U: Kliegman RM, Behrman R, Jenson HB, Stanton BF, ur. *Nelson Textbook of Pediatric*, 18.izd. Philadelphia: Saunders, 2007, str. 2512-23
57. Steiner I, Budka H, Chaudhuri A i sur. Viral meningoencephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management. *Eur J Neurol* 2010;17:999-57
58. Rotbart HA, Webster AD. Pleconaril Treatment Registry Group. Treatment of potentially life threatening enterovirus infections with pleconaril. *Clin Infect Dis* 2001;32:228-35
59. Hans Acha Orbea i sur. Basic concepts in immunology. U: Murphy K.P. i sur, ur. *Janeway's immunobiology*, 8.izd. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2012, str.1-36
60. Čulo F. Citokini i kemokini. U Andreis I. i sur, ur. *Imunologija*. 7.izd. Medicinska naklada Zagreb; 2010, str.122-141
61. Čulo F, Batinić D. Stanice, tkiva i organi imunosnog sustava. U Andreis I. i sur, ur. *Imunologija*, 7. Izd. Medicinska naklada Zagreb; 2010, str.18-57
62. Bernard Malissen i sur. The induced responses of innate immunity. U: Murphy K.P. i sur, ur. *Janeway's immunobiology*, 8.izd. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2012, str.75-123
63. Katherine Calame i sur. T cell-mediated immunity. U: Murphy K.P. i sur, ur. *Janeway's immunobiology*, 8.izd. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2012, str.335-386
64. Marušić M, Grčević D. Međudjelovanje imunosnih stanica. U Andreis I. i sur, ur. *Imunologija*, 7 izd. Medicinska naklada Zagreb; 2010, str.190-207
65. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y i sur. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 2009;21:1105-11
66. Buckley R.H. T lymphocytes, B lymphocytes and NK cells U: Kliegman RM, Behrman R, Jenson HB, Stanton BF, ur. *Nelson Textbook of Pediatric*, 17. izd. Philadelphia: Saunders; 2004, str.683-689
67. Gagro A. Mehanizmi imunosupresije u djece. *Paediatr Croat* 2005;49:48-55
68. Giunti D, Borsellino G, Benelli R. Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS. *J Leukoc Biol* 2003;73:584-90
69. Lyck R, Engelhardt B. Going against the tide--how encephalitogenic T cells breach the blood-brain barrier. *J Vasc Res* 2012;49:497-509

70. Engelhardt B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm* 2006;113:477-485
71. Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2003;3:569-81
72. Schluger NW, Rom WN. Early responses to infection: chemokines as mediators of inflammation. *Cur Opin Immunol* 1997;9:504-8
73. Bonecchi R, Galliera E, Borroni EM, et al. Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Front Biosci* 2009;14:540-51
74. De Haas AH, van Weering HR, de Jong EK, Boddeke HW, Biber KP. Neuronal chemokines: versatile messengers in central nervous system cell interaction. *Mol Neurobiol* 2007;36:137-51
75. Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2002;14:129-135
76. Müller M, Carter S, Hofer MJ, Campbell IL. Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity--a tale of conflict and conundrum. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2010;36:368-87
77. Balan M, Pal S. A novel CXCR3-B chemokine receptor-induced growth-inhibitory signal in cancer cells is mediated through the regulation of Bach-1 protein and Nrf2 protein nuclear translocation. *J Biol Chem* 2014;289:3126-37
78. Ubogu EE, Cossoy MB, Ransohoff RM. The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:48-55
79. Hesselgesser J, Horuk R. Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *J Neurovirol* 1999;5:13-26
80. Hosking MP, Lane TE. The role of chemokines during viral infection of the CNS. *PLoS Pathog* 2010;6:7
81. Arimilli S, Ferlin W, Solvason N, Deshpande S, Howard M, Mocci S. Chemokines in autoimmune diseases. *Immunol Rev* 2000;177:43-51
82. Müller M, Carter SL, Hofer MJ et al. CXCR3 signaling reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the parenchymal distribution of effector and regulatory T cells in the central nervous system. *J Immunol* 2007;179:2774-86
83. Liu MT, Chen BP, Oertel P et al. Cutting edge: The T cell chemoattractant IFN-inducible protein 10 is essential in host defense against viral-induced neurologic disease. *J Immunol* 2000;165:2327-30

84. Hernandez JB i sur. The CREB/CRTC2 pathway modulates autoimmune disease by promoting Th17 differentiation. *Nat Commun* 2015;6:7216
85. Bhowmick S, Duseja R, Das S, Appaiahgiri MB, Vrati S, Basu A. Induction of IP-10 (CXCL10) in astrocytes following Japanese encephalitis. *Neurosci Lett* 2007;414:45-50
86. Liu MT, Keirstead HS, Lane TE. Neutralization of the chemokine CXCL10 reduces inflammatory cell invasion and demyelination and improves neurological function in a viral model of multiple sclerosis. *J Immunol* 2001;167:4091-7
87. Lim JK, Murphy PM. Chemokine control of West Nile virus infection. *Exp Cell Res* 2011;317:569-74
88. Tools for Cell Biology Research. R&D Systems, Quantikine ELISA, Human CXCL11/I-TAC Immunassay, Catalog Number DCX110
89. Szczuciński A, Losy J. Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies. *Acta Neurol Scand* 2007;115:137-46
90. Krumbholz M, Theil D, Cepok S i sur. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain* 2006;129:200-1
91. Luque FA, Jaffe SL. Cerebrospinal fluid analysis in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 2007;79:341-56
92. Mahad DJ, Howell SJ, Woodroffe MN. Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72:498-502
93. Lepej SZ, Rode OD, Jeren T, Vince A, Remenar A, Barsic B. Increased expression of CXCR3 and CCR5 on memory CD4+ T-cells migrating into the cerebrospinal fluid of patients with neuroborreliosis: the role of CXCL10 and CXCL11. *J Neuroimmunol* 2005;163:128-34
94. Ljostad U, Mygland A. CSF B-lymphocyte chemoattractant (CXCL13) in the early diagnosis of acute Lyme neuroborreliosis. *J Neurol* 2008;255:732-95
95. Lepej SŽ, Mišić-Majerus L, Jeren T, i sur. Chemokines CXCL10 and CXCL11 in the cerebrospinal fluid of patients with tick-borne encephalitis. *Acta Neurol Scand* 2007;115:109-14
96. Zajkowska J, Moniuszko-Malinowska A, Pancewicz SA i sur. Evaluation of CXCL10, CXCL11, CXCL12 and CXCL13 chemokines in serum and cerebrospinal fluid in patients with tick borne encephalitis (TBE). *Adv Med Sci* 2011;56:311-7
97. Lahrtz F, Piali L, Spanaus KS, Seebach J, Fontana A. Chemokines and chemotaxis of leukocytes in infectious meningitis. *J Neuroimmunol* 1998;85:33-43

98. Sprenger H, Rosler A, Tonn P, Braune HJ, Huffmann G, Gemsa D. Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80:155-61
99. López-Cortés LF, Cruz-Ruiz M, Gómez-Mateos J, Viciano-Fernandez P, Martinez-Marcos FJ, Pachón J. Interleukin-8 in cerebrospinal fluid from patients with meningitis of different etiologies: its possible role as neutrophil chemotactic factor. *J Infect Dis* 1995;172:581-4
100. Pinto Junior VL, Rebelo MC, Gomes RN, Assis EF, Castro-Faria-Neto HC, Bóia MN. IL-6 and IL-8 in cerebrospinal fluid from patients with aseptic meningitis and bacterial meningitis: their potential role as a marker for differential diagnosis. *Braz J Infect Dis* 2011;15:156-8
101. Litman N, Baum SG. Mumps virus. U: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, ur. *Principles and Practise of Infectious Disease*, 6.izd. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2005, str. 2003-7
102. McDonald RJ, Moore DL, Quennec P. Clinical and epidemiologic features of mumps meningoencephalitis and possible vaccine-related disease. *Pediatr Infect Dis J* 1989;8:751-5
103. Tešović G, Begovac J, Baće A. Aseptic meningitis after measles, mumps and rubella vaccine. *Lancet* 1993;341:1541
104. Čavčić A, Tešović G, Gorenec L, Grgić I, Benić B, Lepej SŽ. Concentration gradient of CXCL10 and CXCL11 between the cerebrospinal fluid and plasma in children with enteroviral aseptic meningitis. *Eur J Paediatr Neurol* 2011;15:502-7
105. Sato Y, Ohta Y, Honda Y, Kaji M, Oizumi K. Diagnostic value of atypical lymphocytes in cerebrospinal fluid from adults with enteroviral meningitis. *Neurol* 1998;245:598-602
106. Asano T, Ichiki K, Koizumi S i sur. Enhanced expression of cytokines/chemokines in cerebrospinal fluids in mumps meningitis in children. *Pediatr Int* 2011;53:143-6
107. Wang SM, Lei HY, Su LY i sur. Cerebrospinal fluid cytokines in enterovirus 71 brainstem encephalitis and echovirus meningitis infections of varying severity. *Clin Microbiol Dis* 2007;13:677-82
108. Wang SM, Lei HY, Yu CK i sur. Acute chemokine response in the blood and cerebrospinal fluid of children with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis. *J Infect Dis* 2008;198:1002-6
109. Chambon, Archimbaud C, Bailly JL i sur. Circulation of enteroviruses and persistence of meningitis cases in the winter of 1999-2000. *J Med Virol* 2001;65:340-7
110. Kivissäk P, Trebst C, Liu Z i sur. T-cells in the cerebrospinal fluid express a similar repertoire of inflammatory chemokine receptors in the absence of CNS inflammation: implication for CNS trafficking. *Clin Exp Immunol* 2002;129:510-8

111. Narumi S et.al. Neutralization of IFN γ inducible protein 10/CXCL10 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 2002;32:1784-91
112. Wildbaum G, et al. Plasmid DNA encoding IFN- γ inducible protein 10 redirects antigen specific T-cell polarization and supresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2002;168:5885-92
113. Nigrovic LE, Kuppermann N, Malley R. Development and validation of a multivariable predictive model to distinguish bacterial from aseptic meningitis in children in the post-Haemophilus influenzae era. *Pediatrics* 2002;110:712-9
114. Nigrovic LE, Kuppermann N et al. Clinical prediction rule for identifying children with cerebrospinal fluid pleocytosis at very low risk of bacterial meningitis. *JAMA* 2007;297:52-60
115. <http://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/outbreaks/> United States Centers for Disease Control and Prevention Government Agency
116. Kolb SA, Sporer B, Lahrtz F, Koedel U, Pfister HW, Fontana A. Identification of a T cell chemotactic factor in the cerebrospinal fluid of HIV-1-infected individuals as interferon-gamma inducible protein 10. *J Neuroimmunol* 1999;93:172-81
117. Rupprecht TA, Koedel U, Muhlberger B, Wilske B, Fontana A, Pfister HW. CXCL11 is involved in leucocyte recruitment to the central nervous system in neuroborreliosis. *J Neurol* 2005;252:820-3
118. Fujimori J, Nakashima I, Kuroda H, Fujihara K, Aoki M. Cerebrospinal fluid CXCL13 is a prognostic marker for aseptic meningitis. *J Neuroimmunol* 2014;273:77-84
119. Messacar K, Schreiner TL, Maloney JA i sur. A cluster of acute flaccid paralysis and cranial nerve dysfunction temporally associated with an outbreak of enterovirus D68 in children in Colorado, USA. *Lancet*. 2015;385:1662-71
120. Ko TM, Kuo HC, Chang JS i sur. CXCL10/IP-10 is a biomarker and mediator for Kawasaki disease. *Circ Res* 2015;116:876-83
121. Johnston M.V. Seizures in childhood. U: Kliegman RM, Behrman R, Jenson HB, Stanton BF, ur. *Nelson Textbook of Pediatric*, 17.izd. Philadelphia: Saunders; 2004, str.1993-2009
122. Carter N.P, Ormerod M.G. Introduction to the principles of flow cytometry. U: Ormerod M.G, ur. *Flow Cytometry*, 3.izd. New York. Oxford University Press Inc, 2003, str. 1-22

11. ŽIVOTOPIS

Anamarija Čavčić, dr.med. specijalist pedijatar

Datum i mjesto rođenja: 21.08.1979. Zagreb, Hrvatska

Obrazovanje:

1993-1997. Srednjoškolsko obrazovanje; IV. jezična gimnazija u Zagrebu

1997-2003. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2003-2004. Pripravnički staž u KBC Zagreb

2004-2007. Polaznik poslijediplomskog doktorskog studija „Biomedicina i zdravstvo“ Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Radno iskustvo:

2005-2009. Specijalizacija iz pedijatrije u Klinici za pedijatriju, KBC Zagreb

2009-2014. Liječnik specijalist pedijatar u Klinici za pedijatriju, KBC Zagreb

Od travnja 2014. u tijeku obavljanja uže specijalizacije iz pedijatrijske alergologije i kliničke imunologije

Publikacije:

Pet znanstvenih radova objavljenih u CC časopisima:

1. Čavčić A, Tešović G, Gorenc L, Grgić I, Benić B, Lepej SŽ. Concentration gradient of CXCL10 and CXCL11 between the cerebrospinal fluid and plasma in children with enteroviral aseptic meningitis. Eur J Paediatr Neurol 2011;15:502-7.
2. Pezerović-Panijan R, Grbeša D, Mederal P, Ježek D, Čavčić A, Gorsić I. Do parathyroid glands from individuals of different age and gender contain lymph vessels? Coll Antropol 2006;30:369-73.
3. Jelinčić Z, Jakić-Razumović J, Petrović I, Čavčić A, Unušić J, Trotić R. Primary malignant melanoma of the stomach. Tumori 2005;91:201-3.
4. Grbeša D, Pezerović-Panijan R, Kalaya MN, Gorsić I, Čavčić A, Zura N, Berberović B. Craniofacial characteristics of Croatian and Syrian populations. Coll Antropol 2007;31:1121-5.
5. Meštrović T, Čavčić J, Martinac P, Turčić J, Župančić B, Čavčić A, Jelinčić Z. Reconstruction of skin defects after radical excision of anorectal giant condyloma acuminatum: 6 cases. J Eur Acad Dermatol Venereol 2003;17:541-5.

Tri rada u obliku kongresnih sažetaka.

Znanstvena aktivnost:

2004-2005. suradnik na znanstvenom projektu prof. dr. Davora Ježeka, Zavod za histologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Od 2008. u postupku izrade doktorata u Klinici za infektivne bolesti „Dr.Fran Mihaljević“ u Zagrebu pod nazivom: „Kemokini CXCL10 i CXCL11 u patogenezi enterovirusnog meningitisa“

Profesionalni interesi:

Daljnja edukacija, znanstveno i kliničko usavršavanje u području pedijatrijske alergologije i kliničke imunologije

Strani jezici: Engleski i njemački jezik

12. POPIS KRATICA

ABM	Akutni bakterijski meningitis
ADCC	Stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima eng. Antibody dependent cell mediated cytotoxicity
ADEM	Akutni diseminirani encefalomijelitis
AI	Aktivna imunizacija
AM	Aseptični meningitis
APC	Antigen predočna stanica eng. Antigen presenting cell
BHS-A	Beta hemolitički streptokok serološke grupe A
BMS	eng. Bacterial Meningitis Score
CD4+	Pomagački limfocit
CD45RO+CD4+	Memorijski limfociti T
CD8+	Citotoksični limfocit
CMV	Citomegalovirus
CRP	C- reaktivni protein
CSL	Cerebrospinalni likvor
CV	Coxsackie virusi
CV A	Coxsackie virusi grupe A
CV B	Coxsackie virusi grupe B

DAF	Glikoprotein stanične membrane; eng. Decay accelerating factor
E	Echovirusi
EAE	Eksperimentalni autoimuni encefalitis
EBV	Epstein Barr virus
ELISA	Enzimski imunotest eng. Enzyme-linked immunosorbent assay
ELR	Tripeptidni motiv glutamin-leucin-arginin
EV	Enterovirusi
Fab	eng. Fragment antigen binding
Fc	eng. Fragment crystallizable
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FS	eng. Forward scatter
g	Gram
GAG	Glikozaminoglikani
GCS	Glasgow Coma Scale/Score
GM-CSF	Čimbenik rasta hematopoeznih kolonija eng. Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GMR	Geometrijska srednja vrijednost
GUK	Glukoza u krvi
GUL	Glukoza u likvoru

H₂O₂	Vodikov peroksid
HFMD	Bolest šaka-stopala-usta eng. Hand foot mouth disease
HHV 6	Humani herpes virus 6
HIV	eng. Human immunodeficiency virus
HSV	Herpes simplex virus
ICAM- 1	Unutarstanične adhezijske molekule-1 eng. Intercellular Adhesion Molecule-1
ICTV	Međunarodni odbor za taksonomiju virusa; eng. International Committee on the Taxonomy of Viruses
IFN - α	Interferon alfa
IFN - β	Interferon beta
IFN - γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulin A
IgD	Imunoglobulin D
IgE	Imunoglobulin E
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
IL	Interleukini
IP-10	eng. Interferon gamma inducible protein 10
I-TAC	eng. Interferon inducible T-cell chemoattractant

IVIG	Intravenski imunoglobulini
JHMV	Virus mišjeg hepatitisa eng. JHM strain of mouse hepatitis virus
kDa	kiloDalton
KLB	Krvno likvorska barijera
KMB	Krvno moždana barijera
KME	Krpeljni meningoencefalitis
KZIB	Klinika za infektivne bolesti „Dr.Fran Mihaljević“
LCMV	Virus limfocitnog koriomeningitisa eng. Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LFA-1	Stanične adhezijske molekule; integrini eng. Lymphocyte function-associated antigen 1
LPS	Lipopolisaharid
L-Z	Lenjingrad- Zagreb
MHC	Molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti eng. Major histocompatibility complex
MIG	eng. Monokine induced by interferon gamma
mL	Mililitar
MMR	Ospice, parotitis, rubela eng. Measles Mumps Rubella
μL	Mikrolitar

μm	Mikrometar
MS	Multipla skleroza
NK	eng. Natural killer
nm	Nanometar
NPEV	Non polio enterovirusi
PAM	Postvakcinalni aseptični meningitis
PRR	eng. Pattern recognition receptor
PSGL 1	Stanične adhezijske molekule; selektini eng. P-selectin glycoprotein ligand-1
PV	Poliovirusi
PV B19	Parvo virus B19
PVR	Poliovirus receptor
RANTES	eng. Regulated Upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted
RT-PCR	Lančana reakcija polimerazom u realnom vremenu eng. Real time polymerase chain reaction
SDF-1	eng. Stromal cell derived factor 1
SIRS	eng. Systemic Inflammatory Response Syndrome; Sindrom sustavnog upalnog odgovora
SS	eng. Side scatter
SŽS	Središnji živčani sustav

TCR	T stanični receptor eng. T cell receptor
TGF-β	eng. Transforming growth factor beta Transformirajući faktor rasta beta
Th	Pomagački limfocit
TNF-α	Čimbenik tumorske nekroze alfa eng. Tumor necrosis factor alpha
UHID	eng. University Hospital for Infectious Diseases „Dr. Fran Mihaljević;
VLA 4	eng. Very late antigen 4
WNV	eng. West Nile Virus Virus zapadnog Nila