

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Lorna Stemberger Marić

**Kemokini CXCL10, CXCL11 i CXCL13 u
aseptičnom meningitisu, neuroboreliozi i
akutnom diseminiranom
encefalomijelitisu u djece**

DISERTACIJA



Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Lorna Stemberger Marić

**Kemokini CXCL10, CXCL11 i CXCL13 u
aseptičnom meningitisu, neuroboreliozi i
akutnom diseminiranom
encefalomijelitisu u djece**

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

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

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

Doc.dr.sc. Snježana Židovec Lepej, dipl. ing.

Zahvala: Prvenstveno zahvaljujem mentorima prof.dr.sc. Goranu Tešoviću i doc.dr.sc. Snježani Židovec Lepej na stručnom vodstvu, a prof.dr.sc. Vladimiru Trkulji na velikoj pomoći oko izrade dijela disertacije vezanog uz statističku obradu i prikaz podataka. Mojoj obitelji na podršci u svakom obliku. Marjanu na ljubavi, a mojim malim dečkima B i F na veselju i novom smislu koji su unijeli u sve.

SADRŽAJ

1. UVOD	1-30
1.1. ASEPTIČNI MENINGITIS	1-5
1.1.1. Aseptični meningitis uzrokovan non-polio enterovirusima	1-5
1.2. LYME NEUROBORELIOZA	5-10
1.3. AKUTNI DISEMINIRANI ENCEFALOMIJELITIS	11-15
1.4. IMUNOLOŠKO PREPOZNAVANJE	16-30
1.4.1. Citokini	16-25
1.4.1.1. Kemokini	17-25
1.4.1.1.1. CXCL10	20-22
1.4.1.1.2. CXCL11	23-24
1.4.1.1.3. CXCL13	24-25
1.4.2. Značajke i fiziološki tijek imunoreakcije	26-28
1.4.3. Imunološki nadzor krvno-moždane barijere	28-29
1.4.4. Kemokini u upalnim bolestima središnjeg živčanog sustava	29-30
2. HIPOTEZA	31
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	32
4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA	33-43
4.1. Ispitanici	33-35
4.2. Biološki uzorci	35
4.3. Metode	35-39
4.3.1. Citološka analiza likvora	36
4.3.2. Biokemijske i hematološke pretrage u serumu	36
4.3.3. Mikrobiološka analiza likvora	37
4.3.4. Serologija na <i>Borrelia burgdorferi</i>	37
4.3.5. Molekularna dijagnostika	38
4.3.6. Kvantifikacija kemokina u cerebrospinalnom likvoru i plazmi	38-39
4.4. Statistička obrada	39-43

5. REZULTATI	44-60
5.1. Svojstva ispitanika oboljelih od ADEM-a, NPEV AM, NB i kontrolnih Ispitanika	44-46
5.1.1. Analiza demografskih podataka	45-46
5.1.2. Analiza kliničkih podataka	45
5.1.3. Analiza laboratorijskih podataka	45-46
5.2. Analiza koncentracije kemokina CXCL10, CXCL11 i CXCL13 u CSL-u i serumu ispitanika oboljelih od ADEM-a, NPEV AM, NB i kontrolne skupine	47-60
5.2.1. Likvorske koncentracije kemokina – razlike između skupina	48
5.2.2. Serumske koncentracije kemokina – razlike između skupina	49-50
5.2.3. Likvor-serum kemokinski gradijenti po skupinama	50-51
5.2.4. Združenost likvorskih koncentracija kemokina i broja stanica u likvoru i razlike među skupinama	51-52
5.2.5. Združenost kemokinskog gradijenta likvor-serum i broja stanica u likvoru i razlike među skupinama	52-54
5.2.6. Mogu li likvorske koncentracije kemokina CXCL10, CXCL11 i/ili CXCL13 pomoći u ranoj diferencijalnoj dijagnozi ADEM, NPEV AM i NB – „razlikuju“ li te bolesti međusobno?	54-60
6. RASPRAVA	61-80
7. ZAKLJUČCI	81-82
8. SAŽETAK	83-85
9. SUMMARY	86-87
10. LITERATURA	88-101
11. ŽIVOTOPIS	102
PRILOZI - POPIS TABLICA I SLIKA	103-104
- POPIS KRATICA	105-108

1. UVOD

1. 1. ASEPTIČNI MENINGITIS

Aseptični meningitis (AM) je definiran kao febrilna bolest s kliničkim znakovima iritacije leptomeningi, a iako je najčešće uzrokovan virusima, uključuje sve tipove meningitisa s negativnim bakteriološkim kulturama cerebrospinalnog likvora (CSL) u bolesnika koji nisu prethodno primali antibiotike i koji nemaju pridruženi neurološki deficit.^{1,2,3,4} Wallgren je još 1925. godine opisao sindrom AM i tada postavio dijagnostičke kriterije: (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, sinuitis) ili generalizirane bolesti u kojoj se meningitis razvija kao sekundarna manifestacija.^{2,5} Iako može biti uzrokovan brojnim virusima, AM je danas najčešće posljedica infekcije tzv. non-polio enterovirusima (NPEV).^{1,6,7}

1.1.1. Aseptični meningitis uzrokovan non-polio enterovirusima

NPEV su mali, neinkapsulirani virusi promjera oko 30 nm, kojima je genetski materijal jednostruka, pozitivno orijentirana ribonukleinska kiselina (RNK), a pripadaju porodici *Picornaviridae*.^{8,9} Izvorno su podijeljeni u 4 podgrupe: Coxsackie A (serotipovi 1-24), Coxsackie B (serotipovi 1-6), Echovirusi (1-34) i tzv. ostale Enteroviruse (Enterovirusi A-J, te Rhinovirusi A-C).^{4,10} Prema najnovijoj klasifikaciji (iz 2013.g.) prijašnji naziv Humani enterovirusi (HeV) je promijenjen u Enterovirusi (EV) te su podijeljeni u 4 grupe; EV A (25 serotipa), EV B (61 serotip), EV C (23 serotipa), EV D (5 serotipova).⁴ Neurovirulenciju pokazuju samo neki NPEV; echovirusi (E 4, E 5, E 6, E 7, E 9, E 11, E 13, E 18, E 30) i coxsackievirusi (CV A9, CV B2, CV B4, CV B5).^{4,11} Od svih AM u dječjoj dobi kojima se uspije utvrditi etiologija, 85-95% uzrokovano je NPEV, i to najčešće serotipovima Coxackie A9, B5 i B1 te echovirusima 6, 9, 13, 18 i 30.¹¹ NPEV su endemični u svim krajevima svijeta. U umjerenom klimatskom području, bolesti koje izazivaju NPEV, pa tako i AM, najčešće se javljaju u toplijem

dijelu godine, tijekom ljeta i rane jeseni (od srpnja do listopada) i to sporadično ili u obliku manjih i većih epidemija. U početku epidemija kliničke slike bolesti su teže, no s vremenom se stvara kolektivni imunitet populacije te se bolest prezentira lakšim tijekom.¹² Za izdvojiti su enterovirusne epidemije uzrokovane enterovirusom 71 (EV71) u Europi (Bugarska 1975., Mađarska 1978.) te u posljednjih desetak godina u zemljama Azije i Pacifika, obilježene brojnim kroničnim sekvelama i smrtnim ishodom.^{13,14} 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 osobe.^{12,14,15} Ljudi su jedini poznati rezervoari EV, a prijenos je uglavnom fekooralnim te, značajno rjeđe, kapljičnim putem. Inkubacija bolesti traje od dva dana do dva tjedna, najčešće 3 do 5 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.¹ Prešavši enterocitnu barijeru dolaze do Peyerovih ploča gdje se počinje odvijati značajna virusna replikacija. Posljedica replikacije je primarna viremija kojom virus dolazi u sekundarna sjela uključujući središnji živčani sustav (SŽS), srce, pluća i jetru. Slijedi lokalno umnažanje virusa praćeno intenzivnijom i dugotrajnijom sekundarnom viremijom, tijekom koje su kod oboljeloga prisutni i klinički simptomi bolesti organa.^{1,8,16} Infekcija SŽS-a uzrokovana NPEV može nastati tijekom primarne, ali i tijekom sekundarne viremije, filtracijom kroz kapilarni zid, ali i prijelazom inficiranih mononukleara kroz krvno-likvorsku barijeru (KLB), odnosno krvno-moždanu barijeru (KMB).^{8,17} Imunost kod EV je tipno specifična. Specifična se protutijela u serumu bolesnika mogu detektirati već dan nakon pojave kliničkih simptoma bolesti, a koncentracija protutijela nije povezana s težinom bolesti.^{14,17} AM je najčešća klinička manifestacija EV infekcije SŽS-a.^{1,6,7} Od AM uzrokovanog NPEV obolijevaju najčešće dojenčad, osobito mlađa od 3 mjeseca i djeca predškolske dobi i rane školske dobi (5-10 godina).^{18,19} 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) su najčešći (>90%) uzročnici AM, dok su ostale neurološke manifestacije u obliku meningoencefalomijelitisa, mlohave klijenuti, Guillain-Barrèova sindroma, transverzalnog mijelitisa i rombencefalitisa, ataksije i benigne kranijalne hipertenzije najčešće uzrokovane EV 71.^{1,4} AM uzrokovan NPEV u pravilu je blaga bolest.^{1,20} Znaci afekcije SŽS-a mogu u mlađe djece, osobito dojenčadi, biti i posve odsutni pa

se upala leptomeningi otkrije slučajno tijekom kliničko-laboratorijske evaluacije djeteta s akutno nastalim febrilitetom bez vodećega simptoma, ili pak u sklopu obrade febrilnoga djeteta s osipom.²¹ Početak je bolesti nagao s umjereno povišenom tjelesnom temperaturom, a u čak 25% bolesnika vrućica nije prisutna.⁸ U tipičnom slučaju AM, temperaturna krivulja ima bifazični obrazac, tj. AM, prethodi kratkotrajna, tzv. «mala bolest» u kojoj također postoji blago povišenje tjelesne temperature praćeno nespecifičnim simptomima.^{1,22} U 25% oboljelih javljaju se proljev ili osip, dok su kod 15% oboljelih prisutni i respiratorni simptomi (rinitis, konjuktivitis, a u mlađe dojenčadi i upala srednjeg uha).²⁰ Iritabilnost i odbijanje hrane najčešći su simptomi AM u dojenčadi i male djece, dok se starija djeca žale na glavobolju i fotofobiju. Zakočenost vrata kao klinički znak javlja se u djece starije od 2 godine.^{8,21} Klinički simptomi AM uzrokovanoga NPEV iščezavaju unutar tjedan dana od početka bolesti, s tim da većina bolesnika boluje i znatno kraće.²³ Oko 10% djece oboljele od AM može razviti komplikacije bolesti u obliku složenih i jednostavnih konvulzivnih napada, povišenog intrakranijskog tlaka (napeta i izbočena fontanela, povraćanje, somnolencija), sindroma neprikladne sekrecije antidiuretskog hormona ili kome.^{20,24} Neovisno o tijeku bolesti i mogućim komplikacijama, prognoza AM je povoljna, te bolest izvan novorođenačke dobi ne ostavlja trajnih neuroloških sekvela.^{25,26} Čak i bolesnici koji obolijevaju od fokalnog encefalitisa ozdrave bez posljedica. Iznimku predstavlja rombencefalitis, bolest uzrokovana EV71, koja može završiti letalno.²⁶ Iako infekcija NPEV kod starije djece uglavnom prolazi spontano kao blaga bolest, perinatalno stečena infekcija kod novorođenčadi može uzrokovati teške infekcije u obliku meningitisa, encefalitisa ili generalizirane bolesti novorođenčeta.²⁷ Klinička slika enterovirusnog meningitisa se kod novorođenčadi prezentira simptomima koji nalikuju na simptome neonatalne sepse te je EV infekcija u toj dobi jedan od diferencijalnodijagnostičkih izazova. U slučaju razvoja meningoencefalitičkog oblika bolesti javljaju se poremećaj svijesti, konvulzije i žarišni neurološki ispadi.^{24,27}

Dijagnostički pristup kod sindroma AM fokusira se na identifikaciji stanja ili patogena koji zahtijevaju specifičnu terapiju. Dijagnoza AM uzrokovanoga NPEV postavlja se pretragom CSL-a.⁸ U više od polovice bolesnika u kojih se lumbalna punkcija (LP) učini unutar prvih 48 sati bolesti, u CSL-u postoji predominacija neutrofilnih granulocita.²⁸ Iako su u pojedinih bolesnika zabilježene pleocitoze i od nekoliko tisuća stanica, u oko 80% bolesnika pleocitoza ne prelazi 500 leukocita u jednom mm³.^{8,21} Rutinski biokemijski nalazi likvora, tj. koncentracija bjelancevina i

glukoze u većine su bolesnika uredni. Kod bolesnika s virusnim meningitisom, lumbalna punkcija često uzrokuje olakšanje simptoma.²³ Etiološka dijagnoza NPEV AM može se postaviti izolacijom virusa iz CSL-a bolesnika.^{8,21} Osim iz likvora, virus se može izolirati iz stolice, obriska ždrijela ili urina bolesnika. Vjerojatnost izolacije virusa iz likvora direktno ovisi o visini pleocitoze.^{4,20-21} Osjetljivost je metode oko 65%, a bolji se rezultati postižu ukoliko se uzorak inokulira na nekoliko različitih staničnih kultura.^{8,20-21,29} Osim relativno niske osjetljivosti, izolacija iz CSL-a je dugotrajan postupak i u slučaju pozitivnog rezultata traje od 4 do 8 dana.²³ Metoda lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (engl. real time polymerase chain reaction, RT-PCR) omogućava direktan dokaz virusnog genoma u CSL-u i danas se smatra zlatnim standardom kliničke dijagnostike EV meningitisa. U kliničkim laboratorijima za potrebe rutinske dijagnostike koriste se pan-enterovirusni PCR testovi koji se temelje na dokazivanju vrlo konzervirane regije 5'UTR koja je zajednička svim enterovirusima.^{23,30-31} RT-PCR je značajno brža metoda u odnosu na metodu kultivacije pa je osobito pogodna za brzu dijagnostiku nejasnih upalnih bolesti SŽS-a.³² Osjetljivost metode kreće se od 86% do 100%, a specifičnost od 92% do 100%.^{23,29,31} Rezultati ostalih pretraga, kako hematoloških i biokemijskih pretraga krvi, tako i aparaturnih, od male su vrijednosti za dijagnosticiranje NPEV AM.^{8,33-34}

Što se tiče liječenja, a obzirom da EV najčešće uzrokuju bolest blagog tijeka, u većini je slučajeva dovoljna simptomatska terapija koja uključuje mirovanje u zatamnjenoj prostoriji, analgetike i intravensku nadoknadu tekućine ukoliko je potrebno. 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.¹⁶ Kod imunokompromitirane djece s perzistirajućim enterovirusnim infekcijama, dobri, ali ipak ograničeni rezultati uočeni su nakon intravenske primjene imunoglobulina (IVIg), osobito ako je riječ o skupini novorođenčadi (u smislu kraćeg trajanja viremije i virurije) ili bolesnicima s hipogamaglobulinemijom ili agamaglobulinemijom, gdje je redovita primjena imunoglobulina povezana s manjom incidencijom kroničnih enterovirusnih infekcija.²⁴ Unatoč mnoštvu epidemija, nije pronađen učinkoviti antivirusni lijek. Novija istraživanja usmjerena su prema antivirusnim i imunomodulirajućim lijekovima koji su pokazali zadovoljavajuće *in vitro* djelovanje na EV. Jedan od takvih lijekova je plekonaril (kod EV meningoencefalitisa) koji stabilizira enterovirusnu kapsidu te

nakon peroralne primjene smanjuje težinu i trajanje bolesti.³⁵⁻³⁶ Prema nekim studijama na terapiju plekonarilom pozitivno je odgovorilo čak 78% oboljelih od kroničnog meningoencefalitisa.³⁷

Plekonaril pokazuje antivirusni učinak prema 90% poznatih NPEV, no pitanje je opravdanosti njegove primjene u nekomplikiranom AM, s obzirom da je u kontroliranim pokusima u kojima su sudjelovali odrasli bolesnici pokazano tek skraćanje trajanja kliničkih simptoma za 1 do 2 dana, dok u djece mlađe od 12 mjeseci nije bilo učinka.^{2,8} U ovom trenu ne postoji mogućnost učinkovite aktivne imunoprofilakse za infekcije uzorkovane EV, osim za EV 71 za koji se intenzivno provode istraživanja u svrhu razvoja adekvatnog cjepiva. Neka od njih su u visokim stadijima kliničkih ispitivanja u Azijsko-Pacifičkim zemljama, gdje su poboljšane posljedice uzrokovane infekcijom EV 71 najteže.³⁸

1.2. LYME NEUROBORELIOZA

Lyme boreliozu ili lajmska bolest (LB) je najčešća krpeljom prenosiva zoonoza na sjevernoj hemisferi, a uzrokuju je gram-negativne, mikroaerofilne bakterije iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato.³⁹ Ovaj kompleks čini 15 genospecijesa od čega su najmanje 3 patogena za čovjeka: *B. burgdorferi* sensu stricto (najčešći humani patogen u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), prisutan i u Europi), *B. afzelii* i *B. garinii* (Europa, Azija).³⁹ Posljednjih godina u Europi se opisuju i slučajevi bolesti izazvani s *B. spielmanii* te pojedinačna izvješća o *B. bissettii* i *B. lusitanae* kao uzročnicima bolesti u ljudi, a nedavno otkriven specijes A14S može također imati ulogu u kožnim manifestacijama.³⁹⁻⁴⁴ Genospecijesi se razlikuju i po sklonosti za izazivanje određenih kliničkih manifestacija bolesti (*B. burgdorferi* sensu stricto - reumatske, *B. afzelii* - kožne, *B. garinii* – neurološke). Bolest se endemski javlja na prostorima sjeverne Amerike, Europe, Azije, što je uvjetovano rasprostranjenošću vektora, no opisuju se neimportirani slučajevi i iz Južne Amerike i Afrike.⁴⁵⁻⁴⁶ Na području Europe je najučestalija u Centralnoj Europi i Skandinaviji (incidencija čak do 155 slučajeva na 100 000 stanovnika).³⁹ LB u Europi na čovjeka prenosi šumski krpelj (*Ixodes ricinus*) za vrijeme krvnog obroka. Životni ciklus navedenog vektora traje 2-3 (1-6) godine, a odvija se preko 3 razvojna oblika (larva, nimfa, odrasli krpelj) i 3 domaćina (ptice, mali šumski glodavci, veliki sisavci) na kojima se krpelj, u

prosijeku, jednom godišnje hrani.⁴⁷ Čovjek može postati slučajni domaćin za sva 3 razvojna oblika, no bolest ipak najčešće prenose nimfe koje su brojnije tijekom toplijih mjeseci kad je i boravak ljudi u prirodi češći. One zbog svoje veličine dulje ostaju neprimijećene (čime se povećava vjerojatnost za prijenos putem sline), a vrijeme potrebno za prijenos bakterije s nimfe je u prosjeku 12-24 h kraće nego kod odraslog krpelja.⁴⁸⁻⁴⁹ Istraživanje provedeno na području sjeverozapadne Hrvatske dokazalo je da je 45% krpelja zaraženo ovom spirohetom.⁵⁰ Usprkos visokom postotku zaraženih krpelja, transmisija bolesti prilično je rijetka; svega oko 1-2% uočenih ugriza rezultira LB, pa antibiotska profilaksa nije opravdana.⁵¹⁻⁵² Prema jednoj američkoj studiji dokazano je 87% smanjenje incidencije *erythema migrans* (EM) kod bolesnika ujedanih od *Ixodes scapularis*-a koji su unutar 3 dana dobili jednokratno 200 mg doksiciklina.⁵³ Za djecu i odrasle u drugim endemskim područjima takva istraživanja nisu provođena. Prema podacima mreže European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCALB), posljednjih je godina pojavnost i učestalost LB u europskim zemljama u porastu. Stručnjaci smatraju da je ta bolest na svojevrsan način podregistrirana te da se na svakih deset prepozna i prijavi jedan slučaj. Osobito visok porast obolijevanja posljednjih je godina zabilježen u Belgiji, Norveškoj, Finskoj i Bugarskoj. Razlog bi mogao ležati u češćem i duljem kontaktu ljudi i vektora ili u globalnom zatopljenju.⁵⁴ U krpelju tijekom krvnog obroka *Borrelia burgdorferi* migrira iz crijeva u žlijezde slinovnice. Tamo dolazi do promjena u genskoj ekspresiji određenih lipoproteina na površini bakterije, od kojih je najvažniji "outer surface protein C (OspC)" koji u suradnji sa Salp15, tvari iz sline krpelja, pomaže bakteriji u inhibiciji prirodene kožne imunosti na mjestu inokulacije, čime se stvaraju povoljne okolnosti za inicijalno preživljenje borelije.⁵⁵⁻⁵⁶ Lokalno se širenje bakterije u ekstracelularnom matriksu na mjestu inokulacije (potpomognuto vezanjem borelije na plazminogen, koji aktiviran djeluje kao humana proteaza) može (ali i ne mora) klinički manifestirati kao EM, koji čini najčešću manifestaciju LB u djece i odraslih.^{39,57} Ulaskom spirohete u krv započinje druga faza bolesti. Mjesta hematogene diseminacije uvjetovana su organotropizmom *B. burgdorferi* za tkiva kože, zglobova, živčanog sustava, srca, oka.⁵⁸ Usprkos razvoju adekvatnog T-staničnog (na početku) i humoralnog (kasnije) odgovora unutar nekoliko tjedana od inokulacije, borelije u ljudskom organizmu uspijevaju preživjeti godinama. Preživljavanje se događa zbog smanjene produkcije površinskih proteina na koje djeluju protutijela (tzv. antigenske varijacije), skrivanja u membranskim nišama u ekstracelularnom matriksu i stvaranja

za komplement neutralizirajućih proteina.⁵⁶ U SŽS borelije mogu dospjeti hematogeno ili širenjem duž perifernog živca.⁵⁹ Ulaskom u SŽS, bakteriju prepoznaju monociti, koji proizvode B-stanične kemokine, od kojih je jedan (CXCL13) u ispitivanjima kao potencijalni dijagnostički marker neuroborelioze (NB).⁶⁰⁻⁶¹ Kemokinski gradijent u SŽS privlači B-limfocite koji potom sazrijevaju u plazma stanice odgovorne za produkciju specifičnih intratekalnih protutijela. Tri osnovna mehanizma dovode do oštećenja neurona u NB: sekrecija citotoksičnih tvari od strane leukocita i glija stanica, direktna citotoksičnost i autoimuno potaknuti procesi (molekularna mimikrija).⁵⁶ LB se dijeli u dvije faze infekcije: ranu (trajanja kraćeg od 6 mjeseci) i kasnu (trajanja duljeg od 6 mjeseci). Rana faza obuhvaća dva stadija: lokalizirani EM koji u oko 30% europske djece nastaje 1-32 dana nakon inokulacije borelije te drugi stadij tj. stadij diseminirane infekcije u sklopu kojeg se može u slučaju zahvaćanja središnjeg ili perifernog živčanog sustava nakon nekoliko dana, tjedana ili mjeseci razviti lajmska NB.⁶² Pojam NB obuhvaća i neurološke simptome kasne infekcije tj. trećeg stadija (mononeuropatiju, radikulopatiju, polineuropatiju, *acrodermatitis chronica atrophicans*, cerebralni vaskulitis, kronični progresivni lajmski encefalitis ili encefalomijelitis s tetraspastičkim sindromom, spastičko-ataksički poremećaj ili poremećaj mokrenja). Unutar NB također postoji podjela na ranu (simptomi koji traju manje od 6 mjeseci, a mogu obuhvaćati simptome od strane središnjeg i perifernog živčanog sustava) koja čini 95% kliničke kazuistike i kasnu (neurološki simptomi traju više od 6 mjeseci, a također se može prezentirati u obliku poremećaja središnjeg i perifernog živčanog sustava), koja čini 5% slučajeva. Neurološki se simptomi većinom javljaju 1-12 (najčešće 4-6) tjedana nakon ujeda krpelja, a većinom pokazuju sezonsku raspodjelu od srpnja do prosinca. Samo 40-50% bolesnika s NB zna za prethodni ujed krpelja, a 20-30% zna za prethodno postojanje lokalne kožne infekcije (EM). Najčešća manifestacija NB u europske djece je akutna paraliza ličnog živca (55-71%) koju slijedi limfocitni meningitis (u 27-75%).^{39,62-65} NB je po nekim studijama uzrok čak svake druge akutne periferne pareze facijalisa za vrijeme ljetnih i jesenskih mjeseci te treći najčešći uzročnik limfocitnog meningitisa u djece.⁶⁶ U drugim su studijama najčešći simptomi bili slabost, glavobolja, umor, vrućica i bolovi u vratu. Slične podatke o kliničkim prezentacijama NB kod djece objavljuju i ostali europski autori, s varijacijama u postocima pojedine kliničke prezentacije. U male djece bolest se može prezentirati nespecifičnim simptomima poput gubitka apetita i umora. S obzirom da je periferna

pareza (jednostrana ili dipareza) ličnog živca toliko patognomonična za NB, u svakog bi djeteta iz endemskog područja s ovom simptomatologijom trebalo potvrditi ili isključiti infekciju s *B.burgdorferi*, posebice ako se pareza javi za vrijeme ljeta ili jeseni⁶⁶⁻⁶⁹ Iako rijetko, rana NB se u djece može prezentirati i slikom akutnog mijelitisa, akutne hemipareze, sindromom opsoklonusa-mioklonusa ili ataksijom. Rjeđe manifestacije bolesti uključuju pareze ostalih kranijalnih živaca, edem papile optičkog živca povezan s povišenim intrakranijskim tlakom (eng. pseudotumor cerebri like syndrome - znatno češći u SAD-u), periferne neuropatije, Bannwarthov sindrom (najčešća klinička manifestacija kod odraslih koju čini trijas limfocitnog meningitisa, bolne radikulopatije i pareze kranijalnog živca-najčešće ličnog živca), konvulzije, cerebelitis, apraksija, ekstrapiramidni simptomi, encefalopatija (poremećaj sna, kognitivni poremećaji (u SAD-u), depresija, ostali psihijatrijski poremećaji), kronična hemipareza koja se obično javlja u trećem stadiju bolesti te brojni drugi o kojima postoje posebna izvješća. Simptomi druge faze bolesti su, za razliku od onih u trećoj fazi, reverzibilni neovisno o terapiji, iako mogu i rekurirati.⁶⁶⁻⁶⁹ Usprkos visokoj incidenciji NB u dječjoj populaciji, klinički tijek bolesti u većini slučajeva je blaži i kraći nego kod odraslih.^{65,70} 11-22% (u većini studija oko 12%) djece ima neurološke sekvele nakon antibiotske terapije (uglavnom perzistenciju periferne pareze ličnog živca, no i poremećaj finih motoričkih funkcija, poremećaj ravnoteže, perzistentnu bol), a one su češće kod bolesnika s manifestacijama od strane SŽS-a ili duljim trajanjem simptoma prije započinjanja liječenja.⁷¹ Povremeno i nakon standardno provedenog antimikrobnog liječenja perzistiraju mialgije, artralgije, radikularni bolovi, parestezije ili neurokognitivni simptomi praćeni kroničnim umorom, no u nekim su radovima bili prisutni u istom opsegu kao i kod kontrola.⁷² Ako navedeni simptomi traju dulje od 6 mjeseci - govori se o "post-Lyme disease syndrome" (PLDS) kod kojeg daljnja antibiotska terapija nije opravdana. "Srećom", PLDS se uglavnom viđa kod odraslih. Učinkovito cjepivo protiv LB aktualno ne postoji. Dok se ne proizvede adekvatno cjepivo, temeljiti pregledi i pravilno uklanjanje vektora unutar 24h ostaju najvažnije metode prevencije bolesti.⁷¹⁻⁷² NB-u u većini slučajeva prati pleocitoza u CSL-u, tipično 10-1000 leukocita/mm³, kojih većinu čine limfociti i plazma stanice. Određeni broj bolesnika ima povišenu koncentraciju proteina te detektabilne oligoklonske zone u CSL-u. Treba istaknuti da pleocitoza ponekad ne mora biti prisutna (u ranoj fazi bolesti, kod imunosuprimiranih te u pojedinačnim slučajevima infekcije s *Borrelia afzelii* gdje je dijagnoza definitivno potvrđena izolacijom bakterije iz likvora ili

pozitivnim PCR-om).⁶⁵ Izolacija uzročnika je dugotrajna i rijetko rabljena metoda za dokaz bolesti, slično kao i PCR kojemu je osjetljivost niska (10-30% u ranoj NB, u kasnoj izuzetno niska). PCR iz CSL-a može biti koristan u vrlo ranim stadijima NB s negativnim serološkim nalazom ili u pacijenata s imunodeficijencijom.^{65,72-73} Danas je serologija standardna laboratorijska metoda za potvrdu dijagnoze NB (upotrebom engl. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)) s dokazom intratekalne sinteze IgM i/ili IgG protutijela. Treba imati na umu da istovremeno analizirana serumska protutijela na *Borrelia burgdorferi* mogu biti i negativna.⁷²⁻⁷³ U mnogim se laboratorijima koristi pristup u dva koraka kada se nakon reaktivne prve ELISA-e učini Western-blot (WB) IgM i IgG potvrdni test. Osjetljivost ovog testa je 70-90% za ranu NB i >90-100% za kasnu NB (tada je samo IgG pozitivan). Osjetljivost samo serumskih protutijela u dijagnostici je niska s obzirom da je seropozitivnost populacije od 5% do čak više od 20%. Da bi se dokazala intratekalna produkcija *B.burgdorferi* specifičnih protutijela, potrebno je učiniti indeks protutijela (engl. antibody index (AI)) na temelju *B.burgdorferi* protutijela u CSL-u i serumu. IgM može biti lažno pozitivan kao rezultat oligoklonalne stimulacije, križne reaktivnosti s nekim drugim patogenima (treponema, Epstein-Barr virus (EBV), citomegalovirus (CMV)), zbog prisutnosti pozitivnog reumatoidnog faktora ili anti-nuklearnih protutijela u serumu, a IgG i IgM, kao i pozitivan AI mogu perzistirati godinama nakon uspješnog liječenja. Intratekalna produkcija IgM pokazuje visoku osjetljivost za NB kratkog trajanja, posebno u djece. Dijagnostička osjetljivost AI je oko 80% za NB kratkog trajanja (<6 tjedana) i gotovo 100% za NB duljeg trajanja. Specifičnost je oko 63%.^{65,73-74}

Dijagnostički kriteriji za NB (**Tablica 1**): ⁶⁵

Definitivna NB ^a

Sva tri kriterija ispunjena

Moguća NB ^b

Dva kriterija ispunjena

1. Neurološki simptomi sugestivni za NB bez drugog očitog razloga
2. Pleocitoza u CSL-u
3. Intratekalna produkcija *B.burgdorferi* protutijela

^a Ovi se kriteriji odnose na sve podrazrede NB osim na kasnu NB s polineuropatijom kada sljedeće mora biti ispunjeno za definitivnu dijagnozu:

(I) periferna neuropatija (II) *acrodermatitis chronic atrophicans* (III) Bb-specifična protutijela u serumu

^b Ako nedostaje kriterij III; nakon 6 tjedana trajanja bolesti moraju biti prisutna Bb-specifična IgG protutijela u serumu

Liječenje bolesnika sa sigurnom ili mogućom dijagnozom rane NB bi se trebalo sastojati od 14-dnevne kure s nekim od nabrojanih antibiotika: doksiciklinom za starije od 8 godina (2×100 mg/dan, tj. 2×2.2 mg/kg za lakše od 45 kg, maksimalno 200 mg/dan); parenteralno penicilinom (300000 jed./kg/dan u 4 doze, maksimalno 20 mil. jed./dan); ceftriaksonom (2 g/dan; 75-100 mg/kg/dan) ili cefotaksimom (3×50 mg/kg/dan, max 6 g/dan). Nema razlike u uspješnosti u odnosu na način primjene. Antibiotik izbora za bolesnike s encefalitisom, mijelitisom, vaskulitisom trebao bi biti ceftriakson u gore navedenoj dozi, također kroz 2 tjedna. Nema komparativne kontrolirane studije u liječenju europskih bolesnika od kasne NB (osobito ne kod djece) te se za sada prema američkim smjernicama preporučuje liječenje ceftriaksonom u trajanju od 2-4 tjedna. ^{65,74-75}

1.3. AKUTNI DISEMINIRANI ENCEFALOMIJELITIS

Akutni diseminirani encefalomijelitis (ADEM) je upalna demijelinizirajuća bolest SŽS-a kojoj većinom prethodi infekcija, a predominantno zahvaća bijelu tvar mozga i/ili kralješničke moždine.⁷⁶ Uglavnom se smatra monofazičnom, iako je prepoznata i relapsirajuća varijanta različita od multiple skleroze (MS) - multifazični diseminirani encefalomijelitis (MDEM). Postinfekcijski i postimunizacijski encefalomijelitis čine oko ¾ slučajeva. Iako se može pojaviti u svakoj životnoj dobi, ADEM je najčešći u djece. Incidencija je procijenjena na oko 0.4-0.8 na 100 000 djece godišnje u prosječnoj dobi od 5 do 8 godina (6.5 godina). Iako se čini da podjednako zahvaća oba spola, dvije pedijatrijske kohorte su ukazale na blagu predominaciju muškog spola, što je u suprotnosti s predominacijom ženskog spola kod MS. Najčešće se javlja u zimi i proljeće.⁷⁶ Pretpostavljena patogeneza je imunološki posredovana demijelinizacija, iako se pretpostavlja kako i vaskulopatija posredovana imunokompleksima može biti patogenetski mehanizam nastanka.⁷⁷

U oko 70 do 77% bolesnika razvoju ADEM-a prethodi klinički evidentna infekcija ili pak postoji podatak o cijepljenju unutar nekoliko tjedana prije pojave bolesti.⁷⁶⁻⁷⁷ Postvakcinalni ADEM čini manje od 5% svih slučajeva ADEM-a, a povezuje se sa cijepljenjem protiv bjesnoće, difterije-tetanus-hripavca, vodenih kozica, morbila, mumpsa, rubele, Japanskog B encefalitisa, hepatitisa B i svinjske gripe. Za većinu cjepiva je incidencija postvakcinalnog ADEM-a niska (0.1 do 0.2 na 100 000 cijepljenih). Postvakcinalni se ADEM češće javlja nakon primovakcinacije nego nakon revakcinacije. Incidencija postvakcinalnog ADEM-a je smanjena nakon što je reducirana primjena cjepiva razvijenih na neuralnim tkivima. Najčešće cjepivo povezivano s ADEM-om je cjepivo protiv morbila-parotitisa-rubele s incidencijom 1-2 na milijun za živo cjepivo. Sama infekcija morbilima trigerira ADEM u 1 na 1000 oboljelih od ospica, što ukazuje kako je cijepljenje protiv ospica značajno smanjilo incidenciju ADEM-a, a isto vrijedi i za druga cjepiva. Postinfekcijski ADEM povezan je s prethodnom ili konkomitantnom infekcijom, većinom virusne etiologije (morbili, mumps, rubela, varicela-zoster virus (VZV), EBV, CMV, herpes-simplex virus (HSV), hepatitis A ili B, Coxackie A, influenza A i B, virus humane imunodeficijencije (HIV), humani T-limfotropni virus tip 1 (HTLV-1), humani herpes virus 6 (HHV-6), virus

pegave groznice Stjenjaka i ljudski virus corona). Bakterijski patogeni su također povezivani s nastankom ADEM-a, naročito *Mycoplasma pneumoniae*, no i borelija, kampilobakter, leptospira, legionela i β -hemolitički streptokok skupine A (BHS-A).⁷⁶⁻⁷⁷ Najčešća teorija o patogenezi ADEM-a je teorija molekularne mimikrije. Patogen/cjepivo dijele antigenske epitope s proteinima SŽS-a, pa nastaju autoreaktivne imunološke stanice što rezultira destruktivnim autoimunim procesom u SŽS-u. Druga teorija je teorija re-infekcije po kojoj je demijelinizacija rezultat direktne neurotoksičnosti neurotrofnih virusa, a cijepljenje s atenuiranim virusom može uzrokovati bolest samo ukoliko je primijenjeno za vrijeme prethodne infekcije te tako uzrokovati reaktivaciju virus-specifičnih T-limfocita. Post-infekcijska etiologija ukazuje na poremećaj KMB nakon infekcije SŽS-a neurotrofnim virusima i to uzrokuje "curenje" autoantigena SŽS-a u sistemsku cirkulaciju. Te antigene prerađuju sistemski limfni organi s posljedičnim slomom imunotolerancije i nastankom auto-destruktivnog encefalitogenog T-staničnog odgovora. Imuno-inflamatorni model navodi "dva udarca" potrebna za nastanak autoimunosti; primoinfekciju s nekim virusom koji ima antigene pogodne za nastanak molekularne mimikrije s proteinima SŽS-a; druga infekcija s nepovezanim virusom rezultira reaktivacijom autoreaktivnih T-limfocita koji sudjeluju u demijelinizaciji SŽS-a. Nedavno su u 40% djece s akutnom demijelinizacijom SŽS-a pronađena cirkulirajuća protutijela na nativni mijelinski oligodendrocitni protein. Histopatološki je u ADEM-u jasno vidljiva perivenska upala oko malih krvnih žila u sivoj i bijeloj tvari s infiltracijom limfocita, makrofaga te, u manjoj mjeri, neutrofila.⁷⁷⁻⁷⁸ Klinički se ADEM očituje u vremenskom intervalu ovisnom o poticajnom čimbeniku, najčešće nakon perioda latencije od 2 do 30 dana, a opisivani su i dulji intervali. Simptomi imaju brzu progresiju s postizanjem maksimuma za nekoliko dana (prosječno 4.5 dana). Nema karakteristične kliničke slike, no kombinacija poremećaja svijesti ili ponašanja i multifokalni neurološki deficiti, posebice u bliskom vremenskom intervalu s prethodnom infekcijom/imunizacijom, moraju pobuditi sumnju na ADEM kao moguću dijagnozu. Često prisutni neurološki simptomi uključuju unilateralne ili bilateralne piramidalne znakove (60-95%), akutnu hemiplegiju (76%), ataksiju (18-65%), paralizu kranijalnih živaca (22-45%), gubitak vida zbog optičkog neuritisa (7-23%), epileptičke napadaje (13-35%), zahvaćenost kralješničke moždine (24%), poremećaj govora (5-21%), hemiparesteziju (2-3%) te kvantitativni poremećaj svijesti.⁷⁶⁻⁷⁸ U nekim je studijama pokazano kako su poremećaji od strane kralješničke moždine češći u odraslih

pacijenata s ADEM-om u kod djece. Epileptički napadi su češći u post-infekcijskom nego post-vakcinalnom ADEM-u, a mogu biti od fokalnih motornih do epileptičkog statusa. Encefalopatija, vrućica i epileptički napadi iznimno su rijetki kod MS koja je, kod bolesnika s ADEM-om, najčešća diferencijalnodijagnostička dvojba. Fokalna prezentacija u ADEM-u je heterogena i ovisi o lokalizaciji i stupnju demijelinizirajućih promjena u SŽS-u. Respiratorno zatajenje zbog zahvaćenosti produžene moždine ili teškog poremećaja svijesti prisutno je u 11-16% bolesnika.^{76,78} Potpuni je oporavak očekivan u većini slučajeva (50-75%, čak i između 70 i 90% ako su minimalni rezidualni deficiti smatrani izlječenjem), a nije rijetko ni spontano poboljšanje neovisno o liječenju. Prosječno vrijeme oporavka varira od 1 do 6 mjeseci. Prediktori lošeg ishoda su starija dob, ženski spol, teža klinička slika kod nastupa bolesti, viša proteinorahija, zahvaćenost kralješničke moždine i perifernog živčanog sustava (PŽS) te loš odgovor na kortikosteroide. Rizik za nastanak MS nakon ADEM-a je procijenjen na 0%, 9.5%, 27% te 28% u različitim studijama.^{76,79-83} Dijagnoza ADEM-a postavlja se na temelju isključenja drugih mogućih uzročnika akutnog encefalitisa, uz prisutnost karakterističnih kliničko-laboratorijskih pokazatelja, a može se postaviti s određenom razinom dijagnostičke sigurnosti.

Dijagnostički kriteriji za ADEM (**Tablica 2**): ⁸⁴

Razina 1 dijagnostičke sigurnosti:

Difuzni ili multifokalni areali demijelinizacije detektirani histopatološki

ili

Fokalni ili multifokalni nalaz u SŽS-u koji uključuje:

Encefalopatiju

Fokalne kortikalne znakove (uključivo ali ne isključivo afazija, aleksija, agrafija, kortikalna sljepoća)

Abnormalnosti kranijalnih živaca

Ispadi u vidnom polju

Prisutnost primitivnih refleksa (Babinski, glabelarni, refleks sisanja)

Motorna slabost (difuzna ili fokalna; većinom fokalna)

Senzorni poremećaji (pojačani/sniženi)

Poremećeni duboki refleksi (hipo ili hiperrefleksija, asimetrija refleksa) ili

Cereberalna disfunkcija

i

Nalaz magnetske rezonance (MR) – difuzne ili multifokalne lezije bijele tvari na T2 DWI ili FLAIR sekvencama (s/bez pojačanja gadolinija na T1 sekvencama) I
Monofazični tijek bolesti (bez pojave relapsa unutar najmanje 3 mjeseca od nestanka simptoma)

Stupanj 2 dijagnostičke sigurnosti:

Fokalni ili multifokalni znakovi SŽS-a

i

MR nalaz karakterističan za bolest

i

Nedovoljno dugo vrijeme praćenja kako bi se dokumentirao nedostatak relapsa unutar 3 mjeseca nakon nestanka simptoma.

Kriteriji za isključenje:

Prisutnost jasne druge akutne infekcije ili dijagnoze bolesti

ili

Recidiv unutar 3 mjeseca od nestanka simptoma bolesti

ili

MR/histopatološki nalaz proturječan ADEM-u

Nalaz CSL-a je u bolesnika s ADEM-om nespecifičan, a u većine se nalazi limfocitna pleocitoza, proteitorahija i normalna razina glukoze. Oligoklonske zone u CSL-u su rjeđe nego u MS, a kada su prisutne (u 0-58%), većinom su prolaznog karaktera.^{76,78} Kompjutorizirana tomografija (CT) mozga je većinom uredna ili pokazuje nespecifične lezije subkortikalne bijele tvari. MR se smatra radiološkom metodom izbora. Inicijalno može biti uredna i ponekad je potrebno 5 do 14 dana od nastupa simptoma do radiološki vidljivih promjena na MR. Cerebralne lezije su većinom diseminirane, no solitarne se lezije pojavljuju u 10 do 30% slučajeva. Lezije su najčešće multifokalne, ekstenzivne u bijeloj tvari (većinom zahvaćaju više od 50% cjelokupne bijele tvari), tipično u subkortikalnoj regiji i na spojevima sa sivom tvari u obje hemisfere, malom mozgu, moždanom deblu i kralješničkoj moždini te u periventrikularnom području (30 do 60%). Duboka siva tvar (talamus i bazalni gangliji) je također često zahvaćena, većinom simetrično. Varijante ADEM-a s

hemoragijama unutar lezija bijele tvari i hiperakutnim, brzoprogresivnim tijekom se nazivaju akutni hemoragijski encefalomijelitis (AHEM) i akutni nekrotizirajući hemoragijski leukoencefalitis (ANHLE), a čine 2% ADEM-a i većinom su trigerirani infekcijom gornjeg respiratornog trakta (često virusom influence).^{76,78} Kontrolna MR-a nakon proteka najmanje 6 mjeseci od akutne bolesti je preporučljiva za potvrdu dijagnoze ADEM-a, jer bi se u tom vremenskom periodu trebala vidjeti parcijalna ili totalna rezolucija lezija bez nastanka novih.⁸⁵

S obzirom na nedostatak kontroliranih kliničkih studija, u ovom trenutku nema standardiziranog protokola liječenja ADEM-a. Suvremeno je liječenje usmjereno na imunosupresiju i imunomodulaciju. Opcije uključuju kortikosteroide, plazmaferezu (PF) i IVIg. Kortikosteroidi su prihvaćeni kao prva linija liječenja ADEM-a. Preporučeni protokol liječenja uključuje intravenski metilprednizolon (20-30 mg/kg/dan; maksimala doza 1g dnevno) kroz 3 do 5 dana uz nastavak oralnog prednizolona (počevši od 1-2 mg/kg/dan) uz postupno smanjivanje doze kroz 1-2 mjeseca. PF se preporučuje za bolesnike s nezadovoljavajućim terapijskim odgovorom na kortikosteroide. Uobičajeni protokol se sastoji od 7 PF kroz 14 dana, a poboljšanje se uglavnom vidi već nakon prvog postupka. IVIg (2g/kg u podijeljenim dozama kroz 3-5 dana) su rezervirani za slučajeve koji ne odgovore na kortikosteroidnu terapiju, a kod kojih je PF kontraindicirana ili nemoguća za izvođenje. Neke studije navode bolje rezultate nakon upotrebe IVIg-a u odnosu na PF kod postvakcinalnih ADEM-a. Drugi autori smatraju da kod bolesnika sa zahvaćenošću PŽS-a i poliradikulopatijom IVIg trebaju biti prva linija liječenja. Kod neuspjeha svih do sada navedenih modaliteta liječenja, primijenjivana je terapija ciklofosfamidom i mitoksantronom s anegdotalnim uspjehom. Više od polovice liječenih bolesnika ima dobar oporavak bez ili s minimalnim neurološkim deficitima. Najčešće sekvele nakon ADEM-a uključuju fokalne motoričke deficite.^{76, 78-82, 84}

1.4. IMUNOLOŠKO PREPOZNAVANJE

1.4.1. Citokini

Citokini su niskomolekularni glikoproteini molekularne mase od 15 do 25 kD koji posreduju međustaničnu komunikaciju. Luče ih mnogobrojne stanice u organizmu, a 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.⁸⁶⁻⁸⁷ Citokini djeluju na hematopoetske stanice, ali i različite druge poput fibroblasta, hepatocita, keratinocita (parakrino djelovanje), a katkad djeluju i na iste stanice koje ih luče (autokrino djelovanje). Djeluju lokalno na mjestu lučenja, a učinak im brzo nestaje (poluvijek im je nekoliko minuta), pa ih mnogi smatraju lokalnim hormonima. Međutim, manji se broj citokina luči u krv i djeluje na udaljena tkiva, neki u fiziološkim, a neki u patološkim stanjima (poput sepse). Ipak, većina se luči tek nakon podražaja, a samo rijetki konstitutivno. Da bi citokin djelovao na neku stanicu, ona mora izražavati odgovarajući receptor. Receptor na stanici može biti izložen *a priori* ili tek nakon podražaja antigenom, mitogenom ili nekim drugim citokinom, a može se pojaviti i spontano tijekom staničnog ciklusa. Nakon interakcije citokina i receptora prenosi se unutarstanični signal preko drugih glasnika, nakon čega dolazi do aktivacije gena u ciljnim stanicama. 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).⁸⁶ Citokini se mogu svrstati u pojedine skupine na klasičan način, na temelju njihove građe ili na temelju građe njihovih receptora. Citokini se najčešće dijele na interleukine (IL), interferone (IFN), citoksine i čimbenike rasta hematopoetskih kolonija.⁸⁶ Interleukine proizvode leukociti i makrofagi, dok interferoni imaju antivirusni učinak. Citoksini mogu ubiti ciljne stanice, dok čimbenici stimulacije kolonija (engl. colony stimulating factors (CSF)) potiču rast i diferencijaciju kolonija hematopoetskih stanica.^{61,86-87} Po funkciji se citokini svrstavaju u četiri skupine:

citokini urođene imunosti (proupalni citokini), citokini stečene (specifične) imunosti, čimbenici rasta kolonija te imunosupresijski (inhibicijski) citokini. Citokine urođene imunosti proizvode prvenstveno makrofagi i druge akcesorne imunološke stanice kao odgovor na nespecifične upalne podražaje. Citokine specifične (adaptivne) imunosti koji djeluju u različitim reakcijama specifične imunosti, stvaraju primarno limfociti.⁸⁶

1.4.1.1. Kemokini

Kemokini (kemotaktični citokini) su strukturalno i funkcionalno heterogena grupa niskomolekularnih citokina (veličine 8-10 kDa) koji djeluju kemotaktički na upalne stanice i uzrokuju njihovu migraciju u upalom zahvaćena tkiva. Osim privlačenja upalnih stanica, često uzrokuju i aktivaciju tih stanica, potiču sekreciju proupalnih citokina i njihovo vezanje za endotelne stanice. Luče ih upalne i imunosne stanice, u prvom redu makrofagi i dendritičke stanice nakon poticaja produktima mikroorganizama, ili bilo kojeg upalnog podražaja tkiva, ali ih mogu lučiti gotovo sve stanice u organizmu. Već izlučeni proupalni citokini potiču stvaranje kemokina i ta međusobna interakcija (kaskada) ima važnu ulogu u nespecifičnoj otpornosti organizma na mikroorganizme. Kemokini posreduju u mnoštvu bioloških procesa uključujući neurološki razvoj, prijenose između sinapsi, diferencijaciju i aktivaciju T-limfocita, apoptozu, angiogenezu, u reakcijama odbacivanja transplantata, no njihova najvažnija uloga odražava se u upalnim procesima jer potiču aktivaciju i migraciju leukocita (u smjeru gradijenta kemokina) na mjesto upale što omogućava zaustavljanje invazije patogena.^{86,88-90} Kemokini iskazuju kemotaktičnu aktivnost na različite vrste stanica, ovisno o distribuciji ekspresije njihovih receptora. Otkriveno je da se neki kemokini luče konstitutivno u limfnim organima (luče ih stromalne ili endotelne stanice) i reguliraju limfocitnu cirkulaciju i usmjerenu migraciju limfocita i dendritičkih stanica u limfne organe, tj. važni su za naseljavanje tih stanica na njihovo pravo odredište. Ovisno o njihovoj regulaciji i produkciji, kemokini se mogu podijeliti na „homeostatske“, koji reguliraju recirkulaciju leukocita u normalnim uvjetima, i „inflamatorne“ kemokine koji se produciraju kao odgovor na upalne podražaje. Kemokini se vežu na specifične receptore koji pripadaju kemokinskoj porodici, a za koje je svojstveno da je glavnina receptora smještena u membrani kroz koju prolazi 7 puta u obliku petlje. Ti se receptori vežu za velike proteine G koji vrlo brzo (u nekoliko sekundi) potiču prijenos signala putem sekundarnih glasnika (ciklički adenzin-

monofosfat (cAMP), inozitol-fosfat, Ca^{2+}). To potiče kemotaksiju leukocita prema upalom zahvaćenom području te njihovu aktivaciju.^{91,92} Dobro je poznato 20 kemokinskih receptora (CR) koje, prema kemokinima koje vežu, razvrstavamo u 4 skupine: CXCR1-CXCR6, CCR1-CCR10, CR1 i CXXXCR1. Sličnost u građi je velika pa je pleotropizam u djelovanju posljedica prisutnosti različitih receptora na istoj stanici i sposobnosti pojedinog receptora da veže više kemokina. Vjeruje se da kemokini, odnosno njihovi receptori privlače različite podvrste T-limocita na mjesto ulaska antigena i time sudjeluju u usmjeravanju (polarizaciji) imunskog odgovora u smislu stanične (Th1), odnosno humoralne (Th2) imunosti. Prema slijedu aminokiselina nakon pojave prvog cisteina (C) kemokini se dijele u četiri skupine: CXC, CX3C, CC i C (X je bilo koja aminokiselina). Jedini poznati predstavnik grupe CX3C je fraktalkin s kemotaktičkim i adhezijskim djelovanjem na T-limfocite i NK-stanice (engl. natural killer) stanice.⁸⁶⁻⁹⁹ Kemokini CXC djeluju kemotaktički na neutrofilne leukocite. Najpoznatiji predstavnik i prvi otkriveni kemokin, CXCL8, sintetizira se u makrofagima i endotelnim stanicama. Kemokini CXCL9 (engl. monokine induced by interferon gamma, MIG), CXCL10 (engl. interferon-gamma inducible protein, IP-10), CXCL11 (engl. interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant, I-TAC) i CXCL12 (engl. stromal cell-derived factor 1, SDF-1,) su non-ELR CXC kemokini (nemaju tripeptidni motiv Glu-Leu-Arg), a proizvode ih stanice poput monocita, neutrofila, endotelnih stanica, fibroblasta, dendrita ili astrocita nakon stimulacije gama interferonom (IFN- γ). Sva četiri kemokina sudjeluju u reakcijama stanične imunosti, zahvaljujući kemokinskom receptoru CXCR3, koji pripada obitelji G proteinskih receptora, a eksprimiran je na aktiviranim Th1 limfocitima te u manjem broju na podrazredima B-limfocita i NK-stanicama. Vezanjem na CXCR3 receptor kemokini potiču migraciju aktiviranih memorijskih (ali ne i naivnih) T-limfocita te samim time postaju važni čimbenici u razvoju i održavanju protektivnog Th1 odgovora u obrani domaćina od virusne infekcije SŽS-a.^{86,90} CXCL13 (engl. B-lymphocyte chemoattractant, BLC) je konstitutivno eksprimiran u sekundarnim limfnim organima (slezena, limfni čvorovi, Peyeroove ploče) od strane folikularnih dendritičkih stanica i makrofaga. Selektivno je kemotaktičan za B-limfocite i sudjeluje u kontroli organizacije B-limfocita unutar folikula u limfnim tkivima. CXCL13 primarno djeluje preko receptora CXCR5 većinom izraženog na zrelim B-limfocitima, a u manjoj mjeri i na pomoćničkim i citotoksičnim T-limfocitima.^{86,90-91} Kemokini C (najpoznatiji predstavnik limfotaktin) privlače T-limfocite i NK-stanice.

Kemokini CC privlače monocite-makrofage i limfocite, a u različitom stupnju i druge fagocitne stanice, NK-stanice i bazofile.⁸⁶ Najpoznatiji predstavnik je CCL5 (Regulated Upon Activation Normal T Cell Expressed and Secreted, RANTES) kojeg sintetiziraju aktivirani T-limfociti, a kemotaktični učinak iskazuje na T-limfocite, makrofage, bazofilne granulocite i dendritičke stanice.⁹²⁻⁹³

Family	Chemokine	Receptor	Main leukocyte targets
CXC	CXCL8	CXCR1	PMN
	CXCL6		
	CXCL7		
	CXCL5	CXCR2	PMN
	CXCL1		
	CXCL2		
	CXCL3	CXCR3B	Th1, NK
	CXCL4		
	CXCL10		
	CXCL9	CXCR3A	
	CXCL11		
	CXCL12	CXCR4	Widespread B T act Mo
	CXCL13	CXCR5	
	CXCL16	CXCR6	
CXCL14	Unknown		
CC	CCL2	CCR2	Mo, NK, Ba, iDC, T act, B
	CCL13		
	CCL7		
	CCL8	CCR5	Mo, Mø, Th1, T act, NK
	CCL4		
	CCL3		
	CCL3LI		
	CCL5	CCR1	Mo, Mø, iDC, NK
	CCL23		
	CCL14		
	CCL15		
	CCL16	CCR3	Eo, Ba, Th2
	CCL11		
	CCL24		
	CCL26		
	CCL17	CCR4	iDC, Th2, NK, T skin,
	CCL22		
	CCL20	CCR6	iDC, T act, B
	CCL19	CCR7	mDC, Mø, T naive, T act
	CCL21	CCR8	Mo, iDC, th2, T req
CCL1	CCR9	T, T muc	
CCL25			
CCL27	CCR10	T act, T muc, T skin	
CCL28			
CCL18	Unknown	mDC, T naive	
XC	XCL1	XCR1	T, NK
	XCL2		
CX ₃ C	CX3CL1	CX3CR1	Mo, iDC, NK, Tc1, Th1

Slika 1. Kemokini i njihovi receptori – modificirano prema: ⁹³ Proudfoot AE. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. Nat Rev Immunol. 2002;2:106-15.

1.4.1.1.1. CXCL10

IP-10, poznat i kao CXCL10, luče različite stanice, uključujući monocite, endotelne stanice i fibroblaste kao odgovor na stimulaciju IFN i lipopolisaharidom (LPS) u različitim proinflamatornim stanjima. Član je porodice α -kemokina, inhibira stvaranje kolonija u koštanoj srži, ima *in vivo* antitumorsku aktivnost, kemoatraktant je za monocite i T-limfocite i potiče adheziju T-limfocita za endotelne stanice. Također, moguće je da sudjeluje u regulaciji angiogeneze za vrijeme upale ili tumorogeneze. CXCL10 pripada CXC porodici kemokina koja sadrži jednu, varijabilnu aminokiselinu između prvog od četiri visoko konzerviranih cisteinskih ostataka. Gen za CXCL10 je lokaliziran na kromosomu 4q21, a po prvi puta su ga opisali 1985. *Luster et al.* CXCL10 cDNA nastaje od 4 egzona koji kodiraju 12 kDa veliki protein. Transkripcija CXCL10 je inducirana od mnoštva podražaja urođene i stečene imunosti koji induciraju produkciju IFN tipa 1 i 2. Upalni stimulusi poput engl. *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) također induciraju ekspresiju ovog kemokina. CXCL10 mRNA je stabilizirana sa S100b proteinom na 3-UTR regijama. Sekvence gena koji kodiraju CXCL10 svinja, ljudi, miševa, koza i ovaca iskazuju homologiju od 86, 74, 72, 82 i 83%. Primarni translacijski produkt je protein od 12kDa koji se kasnije parcijalno cijepa na protein od 98 aminokiselina i 10kDa nakon otpuštanja signalnog peptida. Aktivnost mu je vezana uz strukturu i čišćenje putem matriks-metaloproteinaza i peptidaza. Redukcijom N-terminalnog dijela molekule nastaje negativni antagonist molekule. CXCL10 sintetiziraju T-limfociti, neutrofili, monociti, splenociti, endotelne stanice, fibroblasti, keratinociti, osteoblasti, astrociti i glatke mišićne stanice. CXCL10 je protein koji se nalazi u tkivnim tekućinama i tkivima. To je pleiotropna molekula koja iskazuje nekoliko funkcija ovisno o staničnom tipu i izoformi receptora koji stanice ekspimiraju. Svoju funkciju ostvaruje preko vezanja na receptor CXCR3, 7-transmembranski receptor vezan na G-proteine. Upotrebom nuklearne magnetne rezonantne spektroskopije, pokazano je kako CXCL10 reagira sa N-terminalnim krajem CXCR3 preko hidrofobne veze koju formira N-petlja i 40s-petlja regije CXCL10. Veže se s višim afinitetom za CXCR3A nego CXCR3B izoformu CXCR3 receptora. Ovisno o vrsti stanice i izoformi receptora, nekoliko signalnih puteva može biti aktivirano (CXCR3A aktivira puteve izvanstaničnim signalom-regulirane kinaze 1/2 (Erk1/2), c-JUN amini-terminalnu kinazu (JNK) i fosfaditilinozitol 3-kinazu/serin/treonin kinazu (PI3K/AKT), dok CXCR3B stimulira

adenilat-ciklazu i p38/MAPK). CXCL10 je strukturno i funkcionalno povezan s monokinom induciranim s IFN- γ (CXCL9) i IFN-inducibilnim T-staničnim kemoatraktantom (I-TAC, CXCL11). Ova tri kemokina usmjeravaju migraciju i stimuliraju adheziju aktiviranih T-limfocita i NK-stanica vezanjem na CXCR3. CXCR3 je izražen na aktiviranim T-limfocitima, poglavito onima Th1 fenotipa, na NK-stanicama i na značajnom postotku cirkulirajućih CD4+ i CD8+ T-limfocita (cca 20-40%). Većina perifernih CXCR3+ T-limfocita izražava CD45RO (memorijski T-limfociti) kao i β 1-integrine, koji su uključeni u vezanje limfocita na endotelne stanice i ekstracelularni matriks. CXCR3 je također izražen na plazmacitoidnim i mijeloidnim dendritičkim stanicama, leukemijskim B-limfocitima, eozinofilima, mikrovaskularnim endotelnim stanicama, timocitima i granulocitno-makrofagnim faktorom stimulacije kolonija (GM-CSF) tretiranim CD34+ stanicama krvi iz pupkovine. Među CXC kemokinima, IP-10, Mig i I-TAC su jedinstveni po tome što ih inducira IFN- γ u velikom broju staničnih vrsta, a djeluju preko kemokinskog receptora CXCR3. Iako aktiviraju isti receptor, imaju različitu ekspresiju *in vivo*, a eksperimenti koji upotrebljavaju neutralizirajuća protutijela i "knock-out" miševe potvrđuju da imaju neredundantne funkcije *in vivo*. U usporedbi s CXCL9 i CXCL11, ekspresija CXCL10 se javlja ranije u infekciji s različitim patogenima i kod odgovora na injekciju LPS. Neutralizacijska monoklonska protutijela su pokazala kako je CXCL10 neophodan za preživljavanje nakon infekcije miša s *Toxoplasma gondii* i ne može se zamijeniti s ostalim CXCR3 ligandima. Neutralizacija CXCL10 putem monoklonskim protutijela blokira regrutaciju efektorskih T-limfocita u SŽS-u u modelu eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE), a povećava i mortalitet u akutnoj fazi modela. U kroničnoj fazi EAE liječenje s anti-CXCL10 inhibira progresiju demijelinizacije, povećava remijelinizaciju i poboljšava neurološku funkciju. CXCL10 pojačava otpuštanje IFN- γ iz polimorfonukleara nakon stimulacije antigenima. Također ima i ulogu u generaciji efektorskih T-limfocita u zaštitnoj imunosti protiv tumora. Miševi s deficijencijom CXCL10 imaju slabiji odgovor na stimulaciju aloantigenom i smanjeni T-stanični odgovor nakon primoimunizacije. CXCL10 može stimulirati migraciju NK-stanica i T-limfocita, regulirati sazrijevanje T-limfocita i modulirati ekspresiju adhezijskih molekula. CXCL10 je konstitutivno eksprimiran u niskim razinama u timusnoj, spleničnoj i stromi limfnog čvora. Ekspresija može biti inducirana u endotelnim stanicama, keratinocitima, fibroblastnim mezangijskim stanicama, astrocitima, monocitima i neutrofilima preko stimulacije s IFN- α , IFN- β , IFN- γ ili LPS. CXCL10 je

također eksprimiran u mnogim Th1-humanim upalnim bolestima uključujući kožne (npr. psorijaza), MS, ateroskleroza, reumatoidni artritis (RA), kod odbacivanja transplantata i u upalnim bolestima crijeva. Povišene razine CXCL10 su nađene u CSL-u pacijenata s virusnim meningitisima i MS, u bronhoalveolarnom lavatu pacijenata s plućnom sarkoidozom i odbacivanjem plućnog transplantata te u serumu u virusnim bolestima jetre. U tim tkivima, razina CXCL10 korelira s tkivnom infiltracijom T-limfocita, što sugerira da CXCL10 ima važnu ulogu u usmjeravanju T-limfocita na mjesto upale. U pokusima s CXCL10-deficijentnim mišem koji je bio zaražen s neurotrofnim sojem virusa mišjeg hepatitisa je pokazano kako nedostatak ovog citokina onemogućuje kontrolu virusne replikacije u mozgu, te je zaključeno kako CXCL10 ima važnu ulogu u efektorskom T-staničnom odgovoru. Na temelju pokusa na β -Langerhansovim stanicama gušterače, *Rhode i sur.* (2005.) su uočili kako ekspresija CXCL10 ubrzava autoimuni proces putem pojačanja migracije antigen-specifičnih limfocita na ciljno mjesto, dok su *Wuest i Carr* (2008.) zaključili kako su antigen-specifični CD8+ T limfociti, regrutirani putem CXCL10, važni u antivirusnom odgovoru u moždanom deblu. Uočena je i njegova uloga u patogenezi cerebralnog glioma, karcinoma dojke, kolorektalnog karcinoma, hepatocelularnog karcinoma, karcinoma pluća i mezotelioma, limfoma, melanoma, tumora jajnika i prostate itd. Visoke razine CXCL10 u plazmi mogu biti marker imunološkog odgovora domaćina, posebice Th1 limfocita, što je povezano s boljom prognozom za mnoge tumore (mozga, jetre, debelog crijeva, melanom). Povećana ekspresija CXCL10 na mjestu ozljede može potaknuti usmjeravanje imunoloških stanica koje eksprimiraju CXCR3 receptor. Regrutirane Th1 stanice mogu pojačati produkciju IFN- γ i TNF- α što opet stimulira sekreciju CXCL10 i stvara pozitivnu povratnu spregu. Iako takav imunološki odgovor može pogodovati smanjenju progresije tumora, može voditi i u autoimunost. CXCL10 izražava angiostatičke efekte vezanjem na CXCR3B receptor preko inhibicije proliferacije i indukcije apoptoze endotelnih stanica. Ekspresija CXCL10 može sudjelovati i u akumulaciji aktiviranih T-limfocita u CSL-u u HIV-pozitivnih osoba. Ekspresija CXCL10 je također povećana u mozgovima pacijenata s Alzheimerovom bolešću; astrociti koji izražavaju CXCL10 su povezani sa senilnim plakovima. Receptor za CXCL10, CXCR3, može biti konstitutivno izražen na neuronima i neuronskim nastavcima u različitim kortikalnim i subkortikalnim regijama mozga.^{86,91-95}

1.4.1.1.2. CXCL11

Interferonom-inducibilni T-stanični kemoatraktant (I-TAC ili CXCL11) je CXC kemokin čija je ekspresija značajno povećana u odgovoru na IFN- β ili IFN- γ , a pretpostavlja se da je uključen u patologiju karakteriziranu prisutnošću aktiviranih T-limfocita. Sekvenciranjem gena za CXCL11 dokazana su 4 egzona, a nalazi se na kromosomu 4q21.2. CXCL11 je ne-ELR CXC citokin koji sadrži 954 aminokiselina uz signalni peptid od 21 aminokiselinu. Njegov 1.4kb SCYB11 transkript je u visokim razinama eksprimiran u leukocitima periferne krvi, pankreasu i jetri; srednje je eksprimiran u timusu, slezeni i plućima, a nisku ekspresiju pokazuje u tankom crijevu, prostati i placenti. Primarna struktura I-TAC identična je s 36% i 37% primarne strukture drugih-ELR CXC kemokinima poput CXCL9 i CXCL10. Genska ekspresija CXCL11 može se potaknuti s IFN- γ i IFN- β , a slabije s IFN- α . Ovaj kemokin ostvaruje svoje učinke na ciljne stanice preko receptora CXCR3, s višim afinitetom za ovaj receptor od njegovih drugih liganda (CXCL9 i CXCL10). CXCL11 inducira kemotaktički odgovor u aktiviranim T-limfocitima, ali ne i u naivnim T-limfocitima, monocitima ili granulocitima. IFN- γ , zajedno s IL-1 pojačava ekspresiju CXCL11 u astrocitima, monocitima i mikrogliji. Ovaj je kemokin potentniji od CXCL9 i CXCL10 u induciranju povećanja intracelularne razine kalcija. I-TAC koristi isključivo CXCR3, receptor povezan s G-proteinom koji je izražen primarno na aktiviranim T-limfocitima, a pronađen je i na endotelnim stanicama. Među aktiviranim T-limfocitima CXCR3 je jače eksprimiran na Th1 stanicama. CXCL9 i CXCL10 također vežu CXCR3, ali s manjim afinitetom. CXCL11 mRNA može biti inducirana i u astrocitima, monocitima, stanicama bronhalnog epitela, crijevnog epitela, endotelnim stanicama, keratinocitima, makrofagima i neutrofilima. Ekspresija CXCL11 je suprimirana s Th2 citokinima IL-4 i IL-10. CXCL11 regrutira aktivirane Th1 limfocite na mjesto upale. Antagonist je CC kemokinskog receptora 3 (CCR3), kemokinskog receptora eksprimiranog na eozinofilima i Th2 limfocitima, što upućuje na to da CXCL11 može polarizirati T-stanični odgovor na mjestu ekspresije. Također postoje dokazi kako CXCL11 može sudjelovati u migraciji različitih podtipova zrelih timocita za vrijeme timusne limfopoeze. Također izražava angiostatski efekt, najvjerojatnije također preko CXCR3 eksprimiranog na endotelnim stanicama. RT-PCR analiza je detektirala ekspresiju CXCL11 u tkivu mozga pacijenata s AIDS demencijom i MS. S obzirom da je pronađeno kako inhibira diferencijaciju osteoklasta, smatra se kako bi

mogao imati važnosti i u prevenciji osteolize. CXCL11 sudjeluje u patogenezi alergijskog kontaktnog dermatitisa, ateroskleroze, mycosis fungoides (tip T-staničnog limfoma) i imunološki-posredovanim poremećajima SŽS-a poput MS.^{86,91-94,96}

1.4.1.1.3. CXCL13

B-limfocitni kemoatraktant (BLC), poznat kao BCA-1 (engl. B-Cell Attracting chemokine 1) ili CXCL13 je član CXC subtipa kemokinske superporodice. BCA-1 peptid ima 109 aminokiselina i sadrži 22 aminokiselinska ostatka na argininskom kraju prije prva 4 cisteinska ostatka, što potvrđuje da je to CXC kemokin. Northern blot i RNK dot blot analizom je detektirana konstitutivna ekspresija 1.4kb BCA-1 transkripta s najvišom razinom ekspresije u jetri, zatim u slezeni, limfnim čvorovima, crvuljku i želucu. Niža ekspresija je verificirana u slinovnicama i dojka, dok u drugim tkivima nije dokazana ekspresija. Ljudski BLC dijeli 64% aminokiselinske sličnosti s mišjim Blc-om. Gen za CXCL13 se nalazi na 4q21, blizu gena za većinu ostalih CXC kemokina. Primarni receptor za CXCL13 je 7-transmembranski receptor povezan s G-proteinom, CXCR5, poznat kao i receptor Burkittovog limfoma 1 (engl. Burkitt's lymphoma receptor 1, BLR-1). Stanice koje izražavaju CXCR5 i odgovaraju na CXCL13 uključuju B-limfocite, folikularne pomoćničke T-limfocite (Tfh), osteoblaste, podocyte, kao i kožne dendritičke stanice. Područje funkcije CXCL13 stalno raste od otkrića 1998. Inicijalno se vidjelo da mu je glavna uloga u stvaranju i održavanju mikroarhitekture limfnog tkiva, pa tako CXCL13 deficijentni miševi nisu razvijali limfne čvorove. CXCL13 je kemoatraktant za B-limfocite *in vitro*. Kasnije je otkriveno kako ovaj kemokin ima i ulogu u formiranju ektopičnog limfnog tkiva u uvjetima kronične upale poput one u MS ili RA. Dokaz ekspresije CXCL13 u *H.pylori* gastritisu, plućnoj tuberkulozi ili infekciji s *Bartonellom henselae* je ukazao na njegovu potencijalnu ulogu u kroničnim bakterijskim infekcijama. CXCL13 je važan za razvoj sekundarnog limfnog tkiva i usmjeravanje limfocita unutar mikroodjeljaka tih tkiva. Konstitutivno je izražen na B staničnim folikulima sekundarnih limfnih organa, a njegova ekspresija u tim tkivima je ovisna o aktivnosti limfotoksina α/β . CXCL13 ima kompleksnu ulogu u antigenima induciranoj migraciji B-limfocita u sekundarna limfna tkiva. Nakon vezanja antigena, B-limfociti migriraju iz folikula na granicu T zone gdje ulaze u međudjelovanje s pomoćničkim T-limfocitima. Osim privlačenja B-limfocita, ovaj kemokin inducira i B-limfocite na poticanje stvaranja membranskog limfotoksin-

α 1- β 2, citokina koji potiče razvoj folikularnih dendritičkih stanica i ekspresiju CXCL13, što stvara pozitivnu povratnu spregu. Folikularne pomoćničke CD4+ T stanice (Tfh), kao i tonzilarnе memorijske T-limfocite, također izražavaju CXCR5 i migriraju na stimulaciju CXCL13. CXCL13 -/- i CXCR5 -/- “knock-out” miševi izražavaju slične abnormalnosti uključujući deficijencije u razvoju većine perifernih limfnih organa. Obje vrste miševa imaju smanjen broj perifernih limfnih čvorova i Peyerovih ploča, kao i poremećaj u polarizaciji B i T-staničnih folikula u slezeni i Peyerovim pločama. Upotrebom protočne citometrije i imunohistokemije, pronađeno je kako bolesnici s HIV-1 bolešću, posebice oni s niskim CD4+ T-limfocitima imaju smanjenu ekspresiju CCR5 na B-limfocitima dok je ekspresija CXCL13 u takvih pacijenata povišena zbog aktivacije B-limfocita. CXCL13-pozitivni B-limfociti prisutni su u limfnim čvorovima pacijenata s HIV-infekcijom/bolešću, što bi moglo biti povezano s B-staničnom disfunkcijom za vrijeme HIV-1 infekcije. CXCL13 je također eksprimiran u pleuralnoj i peritonejskoj šupljini. *Ansel i sur.* (2002.) su pokazali kako miševi koji nemaju CXCL13 ne mogu regrutirati B1 podtip B-limfocita koji služe za stvaranje niskoafinitetnih IgM protutijela u peritoneumu i pleuri. Mnogi su radovi uočili jaki poticaj ekspresije CXCL13 u NB. Intratekalna akumulacija limfocita, poglavito B-limfocita i plazma stanica potaknuta je ovim kemokinom čiju su povećanu koncentraciju uočili u mnogim radovima koji su istraživali tu problematiku, čak i prije produkcije Bb specifičnih protutijela. Eksperimenti na staničnim kulturama su pokazali kako polimorfonukleari produciraju CXCL13 nakon inkubacije s *B.burgdorferi* preko interakcije s TLR2 receptorima urođene imunosti s proteinom vanjske membrane borelije. Na temelju ovih istraživanja se spekulira kako *in vivo*, visoke intratekalne koncentracije CXCL13 u NB usmjeravaju B-limfocite u CSL, stvarajući pleocitozu bogatu B-limfocitima. ^{86,91-94,97}

1.4.2. Značajke i fiziološki tijek imunoreakcije

Pod pojmom imunosti podrazumijevamo široki spektar obrambenih reakcija na prisutnost antigena u organizmu. Nespecifična (urođena) imunost od rođenja djeluje kao primarni obrambeni mehanizam protiv svih antigena koji ulaze u organizam, a postoji i bez prethodnog dodira s antigenom. Čimbenici koji sudjeluju u reakcijama nespecifične imunosti su zapreke poput anatomskih (koža i sluznica), fizioloških (vrućica, pH ili sadržaj kisika u tkivima, kemijske tvari-lizozim, interferon, komplement, β -lizin), upalnih i staničnih. Kad je riječ o imunološkom odgovoru na infektivni antigen, važna uloga pripada stanicama nespecifične imunosti (fagociti, NK-stanice).⁸⁶⁻⁸⁷ Fagociti (monociti, makrofagi i stanice mononuklearnog fagocitnog sustava) zbog mogućnosti fagocitoze s posljedičnom enzimskom razgradnjom i liziranjem mikroorganizama zauzimaju važno mjesto u temeljnoj nespecifičnoj obrani organizma. Također se uključuju u reakcije specifične imunosti neovisno o tome da li u aferentnoj fazi djeluju kao stanice koje predočuju antigen T-limfocitima, ili pod utjecajem citokina i kemokina sudjeluju u eferentnoj fazi kao efektorske stanice pri razgradnji unutarstaničnih patogena.^{86-87,98} NK-stanice su limfociti koji mogu nespecifično prepoznati i vrlo brzo lizirati tumorske stanice ili stanice zaražene virusima, neovisno o tome radi li se o razaranju ciljane stanice izravnim dodiranjem ili o staničnoj citotoksičnosti ovisnoj o protutijelima (engl. Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC)). Pri tome luče citokine kojima reguliraju upalni odgovor na infekciju.⁸⁶⁻⁸⁷ Specifična imunost (adaptivna, stečena) 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.⁸⁷ Glavni posrednici u reakcijama humoralne imunosti su B-limfociti, ali i sustav komplementa koji kaskadnim nizom aktivacije enzima (klasičnim, lektinskim ili alternativnim putem) omogućuje izravno ubijanje antigena.⁸⁷ Reakcije stanične imunosti djeluju najčešće u prisutnosti unutarstaničnih bakterija, virusa, stanica transplantata ili tumora. Izvršni mehanizmi stanične imunosti posredovani su stanicama: T-limfocitima (pomagačkim CD4+ i citotoksičnim CD8+), makrofagima te stanicama koje obavljaju citotoksičnost ovisnu o protutijelima.⁹⁸ Pomagački T-limfociti (CD4+) usmjeravaju odgovor prema

humoralnom (pomažu B-limfocitima u proizvodnji protutijela) ili staničnom tipu (omogućuju sazrijevanje citotoksičnih limfocita CD8+ i aktivaciju makrofaga). Citotoksični T-limfociti (CD8+) ciljane stanice mogu ubiti u izravnom dodiru.^{86-87,98} 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.^{87, 98} 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 prezentirajućim stanicama (APC) te se predočuju naivnim T-limfocitima koji prepoznaju kompleks odgovarajućim (engl. T-cell receptor (TCR)) receptorom.⁹⁹ Prepoznavanje antigena i aktivacijski signal pretvara naivni T-limfocit u nezreli pomagački limfocit T_{H0}. U daljnjem tijeku T_{H0} se pod utjecajem citokina nastalih u reakciji limfnih stanica na antigen, može diferencirati u dvije podvrste T_{H1} ili T_{H2}, ovisno o vrsti antigena. Limfociti T_{H1} 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 citotoksičnosti posredovane protutijelima, kao i reakcije odgođene preosjetljivosti.⁹⁸⁻⁹⁹ U međuvremenu se zahvaljujući lučenju citokina IL-2 odvija proces proliferacije i sazrijevanja citotoksičnih limfocita i njegove pretvorbe iz naivnog u efektorski. Limfociti T_{H2} direktno sudjeluju u reakcijama humoralne imunosti proizvodeći citokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i IL-13 koji aktiviraju B-limfocite i potiču njihovu pretvorbu u plazma stanice čija je osnovna zadaća proizvodnja protutijela u svrhu uklanjanja antigena.⁹⁹ Iako nemaju sposobnost izravne destrukcije antigena, protutijela se u ovaj proces uključuju neizravno. Naime, vežu se Fab ulomkom specifično i reverzibilno za antigen tvoreći imunokomplekse, dok Fc ulomkom aktiviraju obrambene mehanizme (sustav komplementa, makrofage, NK-stanice).⁸⁷ Nakon uklanjanja antigena imunoreakcija se obuzdava, a neki T-limfociti koji luče male količine IL-2, preostaju kao dugovječne

memorijske stanice koje pamte dodir s antigenom, pa pri ponovnom izlaganju razvijaju sekundarni tip imunoreakcije.⁹⁹

1.4.3. Imunološki nadzor krvno moždane barijere

Pretpostavku o SŽS-u kao mjestu bez ikakvog imunološkog nadzora promijenile su brojne novije studije dokazujući kako memorijski T-limfociti mogu migrirati kroz KMB.^{101,103-104} Unutar zdravog organizma, ulazak limfocita u SŽS je zahvaljujući intaktnoj KMB primjereno kontroliran, no u slučaju upalnih zbivanja leukociti prolaze kroz oštećenu KMB, nakupljaju se u perivaskularnim prostorima te kroz glija stanice prolaze u parenhim mozga uništavajući moždano tkivo s posljedičnim edemom, upalom i demijelinizacijom.¹⁰⁰⁻¹⁰²

Do sada su poznata tri različita puta ulaska leukocita u SŽS.

(1) Leukociti mogu migrirati iz krvi u CSL kroz koroidni pleksus ili meningealne krvne žile u subarahnoidni prostor, a to je put ulaska u fiziološkim uvjetima. Leukociti prisutni u CSL-u su uglavnom T-limfociti koje čine 80% stanica CSL-a (ali ne više od 45% krvnih). Omjer CD4+T-limfocita i CD8+T-limfocita je povišen. Monociti čine 5%, a manje od 1% su B-limfociti. CD4+T-limfociti su većinom centralni memorijski T-limfociti (CD27 i CD45RO). Te stanice eksprimiraju više razine CXCR3 receptora u odnosu na krvne, a odgovorne su za stvaranje lokalnog imunog odgovora kod bolesnika s upalnim bolestima SŽS-a.^{101,103} Nakon prolaska kroz KMB ili KLB, memorijski CD4+ T-limfociti mogu sresti i prepoznati specifični antigen predstavljen od strane APC. Tada se T-limfocit aktivira i započinje upalni odgovor i aktivaciju KMB koja proizvodi specifične signale potrebne za ulazak upalnih stanica kroz perivaskularne prostore u parenhim mozga.¹⁰⁴ Aktivirani CD4+T-limfociti diferenciraju se u 2 različita fenotipa. Th1 produciraju visoke razine IFN- γ , TNF i limfotoksina i povezani su sa staničnom imunošću, dok Th2 limfociti produciraju visoke razine IL-4, IL-5 i IL-13 i povezane su s humoralnom imunošću.

(2) Drugi put ulaska leukocita u SŽS je iz krvi u subarahnoidalni prostor (tzv. Virchow-Robinove prostore) gdje leukociti reagiraju s APC.¹⁰³

(3) Treći način podrazumijeva prelazak leukocita iz krvi u parenhimni perivaskularni prostor mozga i/ili leđne moždine kroz postkapilarne venule.¹⁰³

Ulazak leukocita u SŽS odvija se u četiri koraka (u literaturi na engleskom jeziku označeni kao “tethering, rolling, activation, diapedesis”). Proces počinje inicijalnim kontaktom leukocita i površine endotelne stanice. Zatim se leukociti kotrljaju po stijenci krvne žile i, pomoću vlastitog G-proteinskog receptora, vežu za kemokine smještene na membrani endotelnih stanica, što omogućava pozicioniranje leukocita na mjesto u endotelu najprikladnije za posljednji korak ekstravazacije leukocita - diapedezu koja rezultira infiltracijom tkiva upalnim stanicama.^{101, 103}

1.4.4. Uloga kemokina u upalnim bolestima središnjeg živčanog sustava

Upalne reakcije u SŽS-u se događaju u jedinstvenom anatomskom prostoru odijeljenom KMB-om i nedostatkom potpuno razvijenih limfatičkih antigen-prezentirajućih mjesta. Rekrutacija upalnih stanica u SŽS je kritični moment u razvoju patološkog procesa kao i obrane od različitih noksi poput traume, vaskularnog incidenta, encefalitisa, MS. Migracija limfocita kroz KMB u CSL kao odgovor na infekciju, posredovana je kemokinima i njihovim odgovarajućim receptorima. Kemokini također reverzibilno aktiviraju leukocitne integrine čime moduliraju leukocitno-endotelnu interakciju.¹⁰⁵ U SŽS-u su kemokini konstitutivno eksprimirani od strane mikroglije, astrocita i neurona, a njihova ekspresija može biti povećana nakon indukcije pomoću medijatora upale. Konstitutivna ekspresija je prepoznata u odraslom i u mozgu u razvoju. Kemokini su uključeni u razvoj i u održavanje homeostaze mozga; imaju ulogu u migraciji, diferencijaciji i proliferaciji glije i neurona te modulaciji sinaptičke aktivnosti u mozgu, no njihova najvažnija uloga odražava se u upalnim procesima jer potiču aktivaciju i migraciju leukocita na mjesto upale što omogućava zaustavljanje invazije patogena. Pretjerana ekspresija je povezana s raznim neurološkim bolestima poput MS, Alzheimerove demencije, HIV demencije, progresije tumora i sl. ^{86,88-90,106} Kemokini imaju neka djelovanja poput hormona, posebice regulirajući patofiziologiju vrućice i apetita. Funkcija im nije ograničena samo na upalu, već su važni regulatori stanične komunikacije u fiziološkim i razvojnim procesima.¹⁰⁵ Sinteza kemokina u endotelnim stanicama KMB važna je komponenta imunoreakcije na različite patogene u SŽS. Vežanje kemokina na glikozaminoglikane koji se nalaze na membrani endotelnih stanica omogućuje

stvaranje kemotaktičnog gradijenta koji omogućava migraciju efektorskih stanica imunološkog sustava kroz endotel u SŽS.^{92,102,107-108} U SŽS-u su specifični kemokinski receptori pronađeni na mikrogliji, astrocitima, oligodendrocitima, neuronima i mikrovaskulaturi mozga.¹⁰⁶ CXCR3 je konstitutivno eksprimiran na subpopulaciji neurona u različitim kortikalnim i subkortikalnim regijama, a jedan od liganda, CXCL10, detektiran je u zdravih ljudi i onih oboljelih od Alzheimerove bolesti. CXCR4 je eksprimiran u visokim razinama na vaskularnom endotelu, mikrogliji, astrocitima i neuronima centralnog i perifernog živčanog sustava. Ekspresija CC kemokinskih receptora je zamijećena u normalnim mozgovima kao i u nekoliko upalnih i neurodegenerativnih bolesti. Suprotno tome, B-stanični kemokini slabo su eksprimirani u normalnom mozgu, dok je njihova produkcija povišena u upaljenom i aktiviranom mozgovnom tkivu. Fraktalkin, najčešći citokin u SŽS-u je jedini citokin eksprimiran u SŽS-u u većem udjelu nego u perifernim tkivima.^{102-103,106,108}

2. HIPOTEZA

Koncentracije kemokina CXCL10, CXCL11 i CXCL13 značajno se međusobno razlikuju u CSL-u i serumu bolesnika s NPEV AM, NB i ADEM-om, kao i u odnosu na bolesnike bez upalne bolesti SŽS-a, a njihov koncentracijski gradijent potiče migraciju efektorskih stanica imunskog sustava u SŽS.

Određena koncentracija jednog ili više kemokina u CSL-u i/ili serumu ili neki drugi laboratorijski biljeg može poslužiti u brzom razvrstavanju ovih bolesnika i prije postavljanja etiološke/konačne dijagnoze.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

OPĆI CILJ: Istražiti ulogu kemokina CXCL10, CXCL11 i CXCL13 u NPEV AM, NB i ADEM-u u bolesnika dječje dobi.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Istražiti kliničke i laboratorijske osobitosti u bolesnika oboljelih od NPEV AM, NB i ADEM-a te ih usporediti međusobno i s istim u bolesnika bez upalne bolesti središnjeg živčanog sustava (kontrolna skupina).
2. Utvrditi direktnu povezanost selektivnog kemokinskog odgovora u krvi i CSL-u djece oboljele od NPEV AM, NB i ADEM-a.
3. Utvrditi profil kemokina i analizirati postojeći kemokinski gradijent u krvi i CSL-u oboljelih od NPEV AM, NB i ADEM-a te ga usporediti međusobno i s onim u bolesnika iz kontrolne skupine kod kojih je upala SŽS-a isključena.
4. Utvrditi koncentraciju kemokina ili neki drugi laboratorijski biljeg koji bi služio za inicijalno razvrstavanje i brzo postavljanje dijagnoze navedenih bolesti.

4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Ispitanici

Ova presječna („cross-sectional“) studija obuhvaća analizu anamnestičkih, kliničkih i laboratorijskih podataka bolesnika s NPEV AM, NB i ADEM-om. U studiju smo uključili 84 bolesnika mlađa od 18 godina koji su u razdoblju od 1. siječnja 2009. do 31. prosinca 2014. liječeni u Zavodu za infektivne bolesti djece Klinike za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević” (KZIB) u Zagrebu. Skupini oboljelih od NPEV AM pripada 20 ispitanika, dok 21 ispitanik pripada skupini oboljelih od NB, a 23 ispitanika skupini oboljelih od ADEM-a. Kontrolnu skupinu čini 20 bolesnika u kojih je LP učinjena zbog opravdane kliničke sumnje na upalnu bolest SŽS-a, ali je ista isključena na temelju urednog citološkog i biokemijskog te negativnog mikrobiološkog nalaza CSL-a i negativnih nalaza ostalih pretraga koje se smatraju pouzdanima kod postavljanja dijagnoze bolesti od kojih boluju bolesnici uključeni u skupinu ispitanika.

Kriteriji za uključivanje u studiju su:

- dob mlađa od 18 godina
- uredna perinatalna anamneza i psihomotorni razvoj prije aktualne bolesti
- nedvojbeno klinička/laboratorijska/radiološka dijagnoza NPEV AM, NB i ADEM

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.^{1-2,5} Pleocitoza je definirana kao prisutnost > 5 leukocita u 1 mm³ lumbalnog CSL-a. Etiološka dijagnoza NPEV AM temelji se na detekciji enterovirusne RNK u CSL-u primjenom standardiziranog RT-PCR (Cepheid Enterovirus ASR (Cepheid, SAD)). Svi bolesnici uključeni u skupinu s NPEV AM imali su na taj način nedvojbeno dokazanu etiologiju AM (pozitivan PCR na NPEV iz CSL-a).

U skupinu ispitanika s NB uključili smo bolesnike koji prema smjernicama *European Federation of Neurological Societies (EFNS)* iz 2009. godine zadovoljavaju kriterije za sigurnu, odnosno vjerojatnu dijagnozu NB. Navedeni kriteriji su: neurološki simptom(i), pleocitoza likvora i intratekalna produkcija specifičnih protutijela na *B.burgdorferi*. Sigurnom dijagnozom označava se ispunjenje sva 3 kriterija, a vjerojatnom ispunjenje bilo koja 2 od navedenih.⁶⁵ U našu smo studiju uključili 17 bolesnika sa sigurnom i 4 s vjerojatnom NB. Kao pozitivitet neuroloških simptoma uzeli smo u obzir anamnestičke podatke bolesnika i/ili neurološke ispade utvrđene ispitivanjem neurološkog statusa tijekom hospitalizacije. Pleocitoza (>5 stanica/mm³) je dokazana citološkom analizom CSL - brojenjem stanica u Fuchs-Rosenthalovoj komorici. U svih je bolesnika rabljena serološka metoda kemiluminiscencije za dokaz serumskih i likvorskih protutijela na *B. burgdorferi*, a svi reaktivni rezultati u serumu provjereni su/potvrđeni WB-om. Likvori s reaktivnim protutijelima dodatno su testirani s istovremeno uzetim serumima ELISA metodom kod koje se uz pomoć hvatanja specifičnih protutijela, određivanja njihove optičke gustoće i kasnijeg preračunavanja dokazuje specifični indeks protutijela (od engl. "Antibody Index", AI), tj. neuroboreliozna-intratekalno proizvedena protutijela IgM i IgG. Svi bolesnici oboljeli od NB imali su negativan PCR na NPEV iz CSL-a.

Dijagnoza ADEM-a je postavljena prema međunarodnom konsenzusu iz 2007. koji ADEM definira kao prvu epizodu upalne demijelinizacije s polifokalnim neurološkim deficitima praćenu encefalopatijom (poremećaj svijesti/ponašanja) uz isključenje mogućih infektivnih uzročnika bolesti. Nalaz MR mozga u FLAIR (engl. Fluid-attenuated inversion recovery) i T2 mjernoj sekvenci je sugestivan, ali ne i presudan za dijagnozu a pokazuje rjeđe fokalne, a većinom multifokalne lezije (uglavnom >1 do 2 cm u promjeru) koje su hiperintenzivne, bilateralne, asimetrične i lokalizirane uglavnom u supratentorijalnoj ili infratentorijalnoj bijeloj tvari ili u sivoj tvari bazalnih ganglija ili talamusa.⁷⁸ Svi bolesnici s ADEM-om uključeni u istraživanje imali su nalaz MR sugestivan za ADEM, negativan nalaz PCR-a na NPEV iz CSL-a i negativnu serologiju na NB u CSL-u. Bolesnike s ADEM-om pratili smo i radiološki obradili (MR mozga i vratne kralješničke moždine) minimalno 6 mjeseci nakon otpusta iz bolnice, i u svih se verificirala regresija prethodno opisanih radioloških promjena. Također, nitko od pacijenata nije imao recidiv ADEM-a niti je kasnije dijagnosticiran kao MS.

Kriteriji za uključivanje u studiju za bolesnike iz kontrolne skupine:

- Uredan citološki, biokemijski i mikrobiološki nalaz CSL-a
- Dob mlađa od 18 godina
- Uredna perinatalna anamneza i psihomotorni razvoj prije aktualne bolesti
- Provjereno negativan nalaz PCR-a na NPEV i serologije na NB u CSL-u

Specifični kriterij za isključenje iz istraživanja:

- Teška kronična bolest nastala tijekom perioda praćenja bolesnika

4.2. Biološki uzorci

U ovom su istraživanju korišteni biološki uzorci CSL-a i seruma ispitanika. Svi biološki uzorci prikupljeni su za potrebe uobičajene dijagnostičke obrade bolesnika sa sumnjom na upalnu bolest CNS-a. Za potrebe kvantifikacije kemokina korišteni su ostatni uzorci CSL-a i seruma. Lumbalna punkcija učinjena je unutar 24 h od početka hospitalizacije bolesnika. CSL je alikvotiran u tri uzorka za potrebe citološke, biokemijske i mikrobiološke dijagnostičke obrade dok je ostatak CSL-a korišten za kvantifikaciju kemokina pohranjen na -80°C do analize. Venska krv bolesnika prikupljena je u Greiner Vacuette System epruvete (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmunster, Austrija) volumena 6 mL bez antikoagulansa. Epruvete su centrifugirane na sobnoj temperaturi tijekom 15 min. na 1000 g. Uzorci seruma korišteni su za potrebe rutinske biokemijske i serološke dijagnostike a ostatni uzorci su podijeljeni u alikvote volumena $400\mu\text{L}$ te pohranjeni na -80°C do kvantifikacije kemokina.

4.3. Metode istraživanja

Tijekom ovog istraživanja iz medicinske dokumentacije KZIB prikupljeni su anamnestički i klinički podaci o dobi, spolu, perinatalnom razdoblju, socijalnoj anamnezi ispitanika, trajanju febriliteta te kliničkim znacima afekcije SŽS-a kao i rezultati rutinskih citoloških, biokemijskih i mikrobioloških pretraga.

4.3.1. Citološka analiza likvora

Citološka analiza likvora je jednostavna, brza i jeftina pretraga visoke osjetljivosti i senzitivnosti. Citološkom analizom procjenjujemo imamo li u CSL-u normalan broj i morfologiju stanica te tako odjeljujemo patološke od normalnih CSL-a. Normalan broj stanica u CSL definiran je s manje od 15 stanica u 3 mm^3 uzorka, brojenih nativno u Fuchs-Rosenthalovoj komorici. U sedimentima likvora obojenim po May-Grünwald-Giemsa bojenju morfologija stanica treba biti uredna, a prisutne stanice su pretežno mononuklearni leukociti. Treba uzeti u obzir manje razlike kod novorođenčadi i male djece. Patološki broj stanica u CSL-u kao i abnormalna morfologija ovise o patološkom procesu u CSL-u. Također su analizirani koncentracija proteina i glukoze u CSL-u.

4.3.2. Biokemijske i hematološke pretrage u serumu

Biokemijske i hematološke pretrage uključivale su broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina, broj leukocita i koncentraciju C-reaktivnog proteina (CRP) u serumu. Kompletna krvna slika u Klinici za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević" radi se na hematološkim analizatorima LH-750 i DxH 800 proizvođača Beckman Coulter®. Analizator određuje 22 hematološka parametra pri čemu se broj leukocita, broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, broj trombocita, srednji volumen eritrocita i srednji volumen trombocita direktno mjere, dok se ostali parametri izračunavaju iz podataka o izmjerenim parametrima. Metoda po Coulteru, na kojoj se temelji rad Beckman-Coulter analizatora, omogućuje brojanje stanica po veličini metodom impedancije i diferenciranje populacije leukocita VCS (engl. Volume, Conductivity, Scattering) tehnologijom. Brojanje metodom impedancije provodi se tako da svaka stanica suspendirana u vodljivoj tekućini (diluent) prolazi između dviju elektroda i izaziva porast otpora, što se bilježi kao električni impuls. Broj impulsa odgovara broju stanica, a veličina impulsa proporcionalna je volumenu stanica. Za brojanje eritrocita i leukocita postoje dvije posebne komorice. Regulirani vakuum kontrolira ulaz razrijeđenog i liziranog uzorka u svaku od komorica. U svakoj komorici broji se po tri puta i DMS (engl. Data Management System) obrađuje rezultate izdajući srednju vrijednost. U komorici za eritrocite kao eritrociti se klasificiraju stanice volumena 36-360 fL. u istoj komorici se broje i trombociti koji se klasificiraju kao stanice manje od

20 fL. U drugoj komorici se nakon liziranja eritrocita broje leukociti i istovremeno se određuje koncentracija hemoglobina cijanmenthemoglobinskom metodom. Određivanje CRP-a vrši se na biokemijskom analizatoru Beckman Coulter AU 680, metodom munoturbidimetrije (Beckman Coulter System Reagent CRP Turbidimetric Fixed Time Method). Načelo mjerenja: Nakon miješanja uzorka s puferom R1 i s otopinom antiseruma R2, CRP specifično reagira s anti-humanim CRP antitijelima i nastaju netopivi agregati. Apsorbancija tih netopivih agregata proporcionalna je koncentraciji CRP-a u uzorku.

4.3.3. Mikrobiološka analiza likvora

Mikrobiološka analiza je uključivala kultivaciju likvora u aerobnim i mikroaerofilnim uvjetima (prisutnost 4-6% CO₂) na temperaturi 37±1°C u trajanju od 4 dana (96 sati). U ispitivanim uzorcima tražena je prisutnost bakterija i/ili gljiva. Svi ispitivani uzorci bili su negativni na prisutnost traženih mikroorganizama.

4.3.4. Serologija na *Borrelia burgdorferi*

Protutijela na *B.burgdorferi* razreda IgM i IgG određena su u serumu i likvoru metodom kemiluminiscencije (CLIA; Liaison Borrelia IgM and IgG, DiaSorin, Italija). Svi serumi s reaktivnim rezultatima dodatno su testirani metodom imunoblota (Borrelia Europe LINE/plus TpN17 LINE, Sekisui, Njemačka). Uzorci likvora s nalazom reaktivnih protutijela u probirnom testu CLIA dodatno su testirani zajedno s usporednim serumom imunoenzimskim testom za procjenu intratekalne sinteze protutijela (IDEIATM Lyme Neuroborreliosis IgM and IgG, Oxoid, Velika Britanija). Svi testovi rađeni su prema uputama proizvođača. Prema zadanoj formuli iz protokola izračunat je koeficijent intratekalne sinteze protutijela, tzv. indeks protutijela (AI; antibody index). Vrijednosti indeksa 0.3 i veće ukazivale su na pozitivnu sintezu likvorskih protutijela. Značajnost nalaza reaktivnih protutijela na borelije u serumu i likvoru interpretirana je u skladu s kliničkim simptomima te nalazima citološke i biokemijske analize likvora.

4.3.5. Molekularna dijagnostika

Virusna RNK izolirana je iz uzoraka CSL-a primjenom standardiziranog reagensa QIAamp Viral RNK mini kit (Qiagen, Hilden, Njemačka) sukladno uputama proizvođača. Enterovirusna RNK u uzorcima CSL-a detektirana je standardiziranim kvalitativnim PCR testom u stvarnom vremenu Cepheid Enterovirus ASR (Cepheid, Sunnyvale, SAD) uz primjenu instrumenta Cepheid SmartCycler System (Cepheid) prema uputama proizvođača. Ovaj kvalitativni test sadrži početnice i probe koje detektiraju regiju veličine 115 parova baza u 5'UTR netranslatirajuće regije genoma enterovirusa. Analitička osjetljivost Cepheid Enterovirus ASR testa iznosi 11.4 Tissue Culture Infectious Dose ili TCID(50)/ml za Enterovirus A; 0.207 TCID(50)/ml za Enterovirus B; 0.602 TCID(50)/ml za Enterovirus C i 0.970 TCID(50)/ml za Enterovirus D. Test detektira različite serotipove enterovirusa uključujući Enteroviruse (68, 69, 70, 71), Coxsackieviruse (A2, A3, A5, A6, A7, A9, A10, A11, A12, A13, A14, A17, A18, A19, A20, A21, A22, A24, B1, B3, B4, B5, B6) i Echoviruse (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33).

4.3.6. Kvantifikacija kemokina u CSL-u i plazmi

Koncentracija kemokina u biološkim uzorcima ispitanika određena je standardiziranim kvantitativnim enzimskim imunotestovima Quantikine Human CXCL10/IP-10 ELISA test, Quantikine Human CXCL11/I-TAC ELISA test i Quantikine Human CXCL13/ BLC/BCA-1 ELISA test (R&D Systems, Minneapolis, SAD) prema uputama proizvođača. Rezultati testova očitani su primjenom optičkog čitača mikrotitracijskih pločica Captia Reader (Trinity Biotech, Wicklow, Irska). Testovi se temelje na principu kvantitativnog enzimskog imunotesta u kojem su na jažice mikrotitracijske pločice vezana monoklonska protutijela specifična za kemokin. Ukoliko biološki uzorci sadrže molekule određenog kemokina, one će se vezati za imobilizirana monoklonska protutijela. Nakon ispiranja nevezanih substanci, u jažice mikrotitracijske pločice dodaje se poliklonsko protutijela specifično za kemokin koje je konjugirano s enzimom (peroksidaza iz hrena). Nakon ispiranja, dodaje se substrat te enzimskom reakcijom nastaje obojeni produkt. Reakcija se zaustavlja kemijskim putem a izmjerena optička gustoća (apsorbancija) proporcionalna je koncentraciji

kemokina u uzorku koja se računa putem standardne krivulje. Medijan minimalne mjerljive koncentracije (minimum detectable dose, MDD) humanog CXCL10 primjenom Quantikine testa iznosila je 1.67 pg/mL (raspon 0.41 – 4.46 pg/mL). Medijan MMD humanog CXCL11 primjenom Quantikine testa iznosila je 13.9 pg/mL (raspon 3.4 – 39.7 pg/mL). Medijan MMD humanog CXCL12 primjenom Quantikine testa iznosio je 1.64 pg/mL (raspon 0.43 – 3.97 pg/mL).

4.4. Statistička obrada

Svi izmjereni parametri sažeti su prikladnim metodama deskriptivne statistike (medijani, rasponi; proporcije) za svaku od skupina (ispitanici oboljeli od ADEM-a, NPEV AM i NB te kontrolni ispitanici). U pogledu temeljnih svojstava (demografski, povijest bolesti, kliničke manifestacije bolesti), inicijalno skupine nisu uspoređivane u formalnim univarijatnim statističkim testovima iz razloga jer ispitanici nisu randomizirani pa su sve usporedbe iz multivarijatnih modela.

Prikazane su:

1. Likvorske koncentracije kemokina – razlike između skupina

- A) Koncentracija kemokina te „gradijenta“ (odnosno omjera) likvor/serum po skupinama je prikazana u logaritmima (baza e) izmjerenih koncentracija zbog izrazite interindividualne varijabilnosti. Kako su mnoge likvorske ali i serumske koncentracije bile ispod granica detekcije (vrijednost=0), transformacija je učinjena na način: $\ln(1 + \text{izmjerena vrijednost})$, čime se postiže da logaritam izmjerene vrijednosti 0 iznosi 0. „Gradijent“ odnosno omjer likvor /serum određen je kao eksponent razlike logaritama:
$$\text{Omjer } \frac{\text{likvor}}{\text{serum}} = \exp[\ln(1 + \text{konc. likvor}) - \ln(1 + \text{konc. serum})]$$
 Za CXCL10 vrijednosti omjera su na logaritamskoj skali zbog izrazite varijabilnosti. Za druga dva kemokina, skala je linearna. Točke su individualne vrijednosti, poprečne crte su medijani, kvadrati označuju donju i gornju kvartil, a okomite crte označuju unutarnju ogradu (medijan 1.5 x interkvartilni raspon).

B) Razlike likvorskih koncentracija triju kemokina između djece s ADEM-om, NPEV AM ili NB i kontrola. Za svaki od kemokina, podaci su analizirani u generalnom linearnom modelu uz podešenje za dob, spol i dan trajanja bolesti na dan prijema (zbog neujednačenosti tih varijabli između skupina s različitom dijagnozom, kao i zbog univarijatne združenosti nekih od tih varijabli s koncentracijama pojedinih citokina). Zbog iskrivljene distribucije, analizirane su logaritmirane vrijednosti (baza e), a razlike su prikazane kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (engl. Geometric mean ratio, GMR) s 95% granicama pouzdanosti (engl. Confidence interval, CI). $GMR = \exp\{\bar{x}[\ln(konc. A)] - \bar{x}[\ln(konc. B)]\}$. P-vrijednosti i granice pouzdanosti podešene su za višestruke usporedbe simulacijskom metodom.

2. Serumske koncentracije kemokina – razlike između skupina

A) Razlike serumskih koncentracija triju kemokina između djece s ADEM-om, NPEV AM i NB i kontrola. Za svaki od kemokina, podaci su analizirani u generalnom linearnom modelu uz podešenje za dob, spol i dan trajanja bolesti na dan prijema (zbog neujednačenosti tih varijabli između skupina s različitom dijagnozom, kao i zbog univarijatne združenosti nekih od tih varijabli s koncentracijama pojedinih citokina). Zbog iskrivljene distribucije, analizirane su logaritmirane vrijednosti (baza e), a razlike su prikazane kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR) s 95% granicama pouzdanosti (CI). $GMR = \exp\{\bar{x}[\ln(konc. A)] - \bar{x}[\ln(konc. B)]\}$. P-vrijednosti i granice pouzdanosti podešene su za višestruke usporedbe simulacijskom metodom.

3. Likvor-serum kemokinski gradijenti po skupinama

Omjer likvorskih i serumskih koncentracija kemokina („likvor-serum gradijent“) u djece s ADEM-om, NPEV AM, NB i kontrolne djece.

Omjeri koji su zajedno s 95% intervalom pouzdanosti (CI) >1.0 kazuju da je, prosječno, likvorska koncentracija viša nego serumska, odnosno da postoji „gradijent likvor-serum“. To ujedno znači da je razlika likvor-serum statistički značajna s $p < 0.05$. Gdje granice pouzdanosti oko omjera obuhvaćaju 1.0,

razlika likvor-serum nije statistički značajna. Gdje su omjeri granicama pouzdanosti posve <1.0 , znači da su serumske koncentracije više od likvorskih uz $p < 0.05$. Omjeri likvor/serum su omjeri geometrijskih srednjih vrijednost (GMR), a određeni su u generalnom linearnom modelu s mješovitim efektima (dva biološka uzorka [serum, likvor] u istog ispitanika) kao $GMR = \exp\{x \bar{[\ln(\text{konc.likvor})]} - x \bar{[\ln(\text{konc.serum})]}\}$.

4. Zduženost likvorskih koncentracija kemokina i broja stanica u likvoru i razlike među skupinama

A) Multivarijatna analiza zduženosti broja stanica u likvoru (u 3 mm^3) i likvorske koncentracije triju kemokina. Koeficijenti su prikazani s 95% granicama pouzdanosti. Zbog iskrivljenosti distribucije broja stanica u likvoru, analizirane su logaritmizirane vrijednosti (baza e). Najbolji fit imali su modeli u kojima su i likvorske koncentracije kemokina logaritmizirane. Testirana su tri odvojena (po jedan za svaki kemokin) generalna linearna modela u kojima su nezavisne varijable uvijek bile dob, spol i dan trajanja bolesti na dan prijema, dijagnoza, $\ln(\text{koncentracija kemokina})$ i dijagnoza* $\ln(\text{koncentracija kemokina})$ interakcija kako bi se zduženost kemokinskih koncentracija i broja stanice testirala u svakoj skupini bolesnika zasebno.

B) Nezavisna zduženost $\ln(\text{broja stanica u likvoru})$ i $\ln(\text{likvorske koncentracije CXCL10})$ odnosno $\ln(\text{likvorske koncentracije CXCL13})$ ovisno o dijagnozi. Regresijski pravci dobiveni su u multivarijatnom Modelu 1 i Modelu 3 u tablici 3: zavisna varijabla je $\ln(\text{broj stanica u likvoru})$ a nezavisne varijable su dob, spol, trajanje bolesti u vrijeme prijema, dijagnoza, likvorska koncentracija CXCL10 (ili CXCL13) i dijagnoza*likvorska koncentracija interakcija. Prikazani su podešeni regresijski pravci prema dijagnozi (iz interakcije) za djecu s ADEM-om, NPEV AM, NB i djecu iz kontrolne skupine.

C) Multivarijatna analiza zduženosti broja stanica u likvoru (n/mm^3) i gradijenta likvor-serume triju kemokina. Koeficijenti su prikazani s 95% granicama pouzdanosti. Zbog iskrivljenosti distribucije broja stanica u likvoru, analizirane

su logaritmirane vrijednosti (baza e). Najbolji fit imali su modeli u kojima su i vrijednost gradijenata likvor-serum logaritmirane. Testirana su tri odvojena (po jedan za svaki kemokin) generalna linearna modela u kojima su nezavisne varijable uvijek bile dob, spol i dan trajanja bolesti na dan prijema, dijagnoza, $\ln(\text{likvor-serum gradijent})$ i $\text{dijagnoza} * \ln(\text{gradijent})$ interakcija kako bi se združenost kemokinskih gradijenata i broja stanice testirala u svakoj skupini bolesnika zasebno.

D) Nezavisna združenost $\ln(\text{broja stanica u likvoru})$ i $\ln(\text{likvor-serum gradijent})$ za CXCL10, odnosno $\ln(\text{likvor-serum gradijent})$ za CXCL11 ovisno o dijagnozi. Regresijski pravci dobiveni su u multivarijatnom Modelu 1 i Modelu 2 u tablici 4: zavisna varijabla je $\ln(\text{broj stanica u likvoru})$ a nezavisne varijable su dob, spol, trajanje bolesti u vrijeme prijema, dijagnoza, likvor-serum gradijent CXCL10 (ili 11) i $\text{dijagnoza} * \text{gradijent}$ interakcija. Prikazani su podešeni regresijski pravci prema dijagnozi (iz interakcije) za djecu s ADEM-om, NPEV AM, NB i djecu iz kontrolne skupine.

5. Pokušali smo odgovoriti na pitanje mogu li likvorske koncentracije kemokina CXCL10, CXCL11 i/ili CXCL13 pomoći u ranoj diferencijalnoj dijagnozi ADEM, NPEV AM i NB – „razlikuju“ li te bolesti međusobno?

A) Svojstva ispitanika s ADEM-om, NPEV AM, NB i ispitanika iz kontrolne skupine u kojih su serumske i likvorske koncentracije kemokina određene do 8. dana (uključno) od početka simptoma bolesti. Vrijednosti su brojevi ili medijani (najniža-najviša vrijednost).

B) Individualne vrijednosti likvorskih nalaza – broja stanica, udjela polimorfonukleara (PMNL), koncentracije CXCL10, CXCL11 i CXCL13. Za broj stanica i koncentracije kemokina, prikazani su logaritmi izmjerenih vrijednosti zbog izrazite inter-individualne varijabilnosti. Točke=individualne vrijednosti, poprečne crte=medijani, kvadrati=donja i gornju kvartilu, a

okomite crte=unutarnja ogradu (medijan \square 1.5 x interkvartilni raspon). Izvan ograda su odstojeće vrijednosti.

- C) Razlike likvorskog nalaza određenog do 8. dana od početka simptoma bolesti – broja stanica, udjela polimorfonukleara i koncentracija triju kemokina – između djece s ADEM-om, NPEV AM i NB. Podaci za svaki parametar analizirani su u zasebnom generalnom linearnom modelu uz podešenje za dob, spol i duljinu trajanja simptoma prije uzimanja uzorka (1-8 dana). Zbog iskrivljene distribucije, analizirane su logaritmirane vrijednosti (baza e), a razlike su prikazane kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR) s 95% granicama pouzdanosti (CI). $GMR = \exp\{x \bar{\ln}(\text{konc.A}) - x \bar{\ln}(\text{konc.B})\}$. P-vrijednosti i granice pouzdanosti podešene su za višestruke usporedbe simulacijskom metodom.
- D) Univarijatna i nezavisna združenost viših likvorskih koncentracija CXCL10 i dijagnoze „NPEV AM“ (nasuprot ADEM ili NB, kumulativno). Združenost je prikazana kao omjer šanse (OR) s 95% granicama pouzdanosti (CI). Prikazane su i površine ispod ROC krivulje (AU-ROC) za multivarijatni model i samo za koncentracije CXCL10.
- E) Univarijatni odnos likvorske koncentracije CXCL10 i dijagnoze non-polio enterovirusnog aseptičnog meningitisa (NPEV AM) – ROC (*receiver-operating characteristics*) krivulja i vjerojatnost dijagnoze u odnosu na vrijednosti CXCL10.
- F) Svojstva likvorske koncentracije CXCL10 kao dijagnostičkog testa za non-polio enterovirusni aseptični meningitis (NPEV AM) (nasuprot ADEM/NB).

Razina statističke značajnosti definirana je s vrijednosti $p \leq 0.05$. Korišten je statistički program SAS for Windows 9.3 (SAS Inc., Cary, NC) licenciran na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

5. REZULTATI

U ovu su studiju uključena 84 ispitanika, od kojih 23 ispitanika pripada skupini oboljelih od ADEM-a, 20 ispitanika pripada skupini oboljelih od NPEV AM, 21 ispitanik skupini oboljelih od NB i 20 kontrolnoj skupini. Među oboljelima od NB, 17 pacijenata (80.95%) je po kriterijima ušlo u skupinu definitivnih, a 4 (19.04%) u skupinu vjerojatnih NB. Kontrolnu skupinu su sačinjavali ispitanici kod kojih je u sklopu inicijalne obrade učinjena LP kojom je upalna bolest SŽS-a isključena (urednim citološkim, biokemijskim i mikrobiološkim nalazom likvora). Njihove dijagnoze su bile: infekcija donjih dišnih putova (5 bolesnika), infekcija gornjih dišnih putova (5 bolesnika), nejasno febrilno stanje (4 bolesnika), sepsa/bakterijemija (2 bolesnika), enteroviroza bez afekcije SŽS-a (2 bolesnika), poremećaj ponašanja (1 bolesnik) te humana granulocitna anaplazmoza (1 bolesnik).

5.1. Svojstva ispitanika oboljelih od ADEM-a, NPEV AM, NB i kontrolnih ispitanika

Analizirani su odabrani demografski, klinički i laboratorijski podaci ispitanika u navedenim skupinama.

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 ADEM grupi bio je 58 mjeseci (raspon 10-198 mjesec), u NPEV AM grupi bio je 128 mjeseci (raspon 3-188 mjeseci), u NB skupini 127 mjeseci (raspon 48-215 mjeseci) dok je medijan dobi kontrolne skupine bio 21 mjesec (raspon 1-184 mjeseci). U skupinama NPEV AM, NB i kontrolnoj skupini prevladavaju bolesnici muškog spola - u skupini oboljelih od NPEV AM 15 (75%), kod NB 12 (57.1%) bolesnika je muškog spola, a u kontrolnoj su skupini 12 (60%) ispitanika dječaci. Za razliku od navedenog, ispitanici iz skupine ADEM-a su većinom ženskog spola (14 djevojčica ili 60.9%). Medijan trajanja bolesti prije prijema u Kliniku bio je 6 dana (raspon 1-23 dana) za oboljele od ADEM-a i NB (raspon 1-30

dana) te 2 dana (raspon 1-3 dana) za oboljele od NPEV AM i za kontrolnu skupinu (s rasponom 1-28 dana).

5.1.2. Analiza kliničkih podataka

Prikupljeni su i obrađeni klinički podaci koji uključuju prisustvo vrućice, GCS (engl. Glasgow Coma Scale/Score) pri prijemu, postojanju cerebralnih napada u toku bolesti, kao i ishod liječenja. Kod prijema u Kliniku, u skupini ispitanika oboljelih od ADEM-a, 17 bolesnika (73.9%) bilo je febrilno. U skupini NPEV AM je čak 19 bolesnika imalo zabilježen febrilitet (95%), isto kao i u kontrolnoj skupini (19/20 ili 95%), dok je u skupini NB samo 4 bolesnika imalo povišenu tjelesnu temperaturu (19%). Konvulzije u akutnoj bolesti je imalo 12 bolesnika iz skupine ADEM-a (52.2%) i 6 iz kontrolne skupine (30%). Pacijenti iz skupine oboljelih od NPEV AM i NB nisu imali zabilježene konvulzije tijekom bolesti. Pri analizi podataka o stanju svijesti, kod svih je bolesnika korištena procjena (bodovanje) prema pedijatrijskoj GCS. U skupinama oboljelih od NPEV AM i NB je srednja vrijednost, kao i najniža vrijednost GCS iznosila 15, dok su bolesnici iz kontrolne skupine imali srednju vrijednost 15, no najnižu 12. Ispitanici iz skupine oboljele od ADEM-a su imali u prosjeku niže vrijednosti GCS; kod njih je srednja vrijednost iznosila 14, a raspon 8-15. Iz ovih je podataka vidljivo da su bolesnici s NPEV AM kao i oni iz kontrolne skupine češće bili febrilni u odnosu na one s ADEM-om, dok su bolesnici s NB većinom bili afebrilni kod prijema. Konvulzije su gotovo isključivo karakterizirale bolesnike s ADEM-om, kao i poremećaj svijesti karakteriziran nižim vrijednostima GCS-a.

5.1.3. Analiza laboratorijskih podataka

Izabrani laboratorijski nalazi seruma i CSL-a u ispitanika oboljelih od ADEM-a, NPEV AM, NB i kontrolne skupine su prikazani u **Tablici 3**. Bolesnici oboljeli od upalnih bolesti SŽS-a su imali povišen broj stanica u CSL-u (medijan 189 u 3 mm³ kod ADEM-a, 703 u 3 mm³ kod NPEV AM, 672 u 3 mm³ kod NB) što ih je razlikovalo od onih bez upalne bolesti SŽS-a (medijan 6 u 3 mm³). Medijan koncentracije proteina u CSL-u je bio nešto povišen u skupini NB (0.75 mg/L). Može se primijetiti kako je potpuni oporavak postignut u svih pacijenata s

NPEV AM, dok su neurološke sekvele zaostale kod 9 bolesnika s ADEM-om (39.1%) i 7 bolesnika s NB (35%).

Tablica 3. Svojstva ispitanika s ADEM-om, NPEV AM-om, NB-om i ispitanika iz kontrolne skupine. Vrijednosti su brojevi ili medijani (najniža-najviša vrijednost).

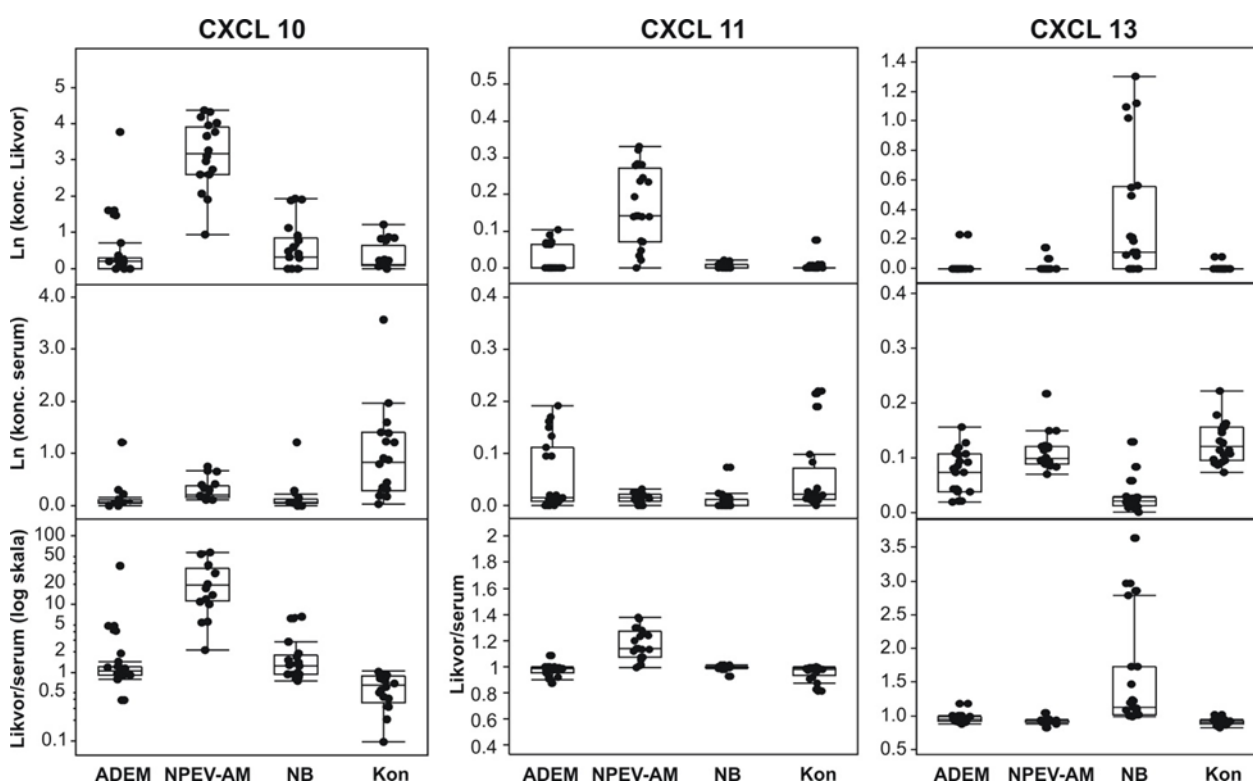
	ADEM	NPEV-AM	NB	Kontrole ¹
<i>Klinička svojstva</i>				
N (M / Ž)	23 (9/14)	20 (15/5)	21 (12/9)	20 (12/8)
Dob (mjeseci)	58 (10-198)	128 (3-188)	127 (48-215)	21 (1-184)
Dani od početka bolesti	6 (1-23)	2 (1-3)	6 (1-30)	2 (1-28)
Febrilni na prijemu	17	19	4	19
GCS na prijemu	14 (8-15)	15 (15-15)	15 (15-15)	15 (12-15)
Konvulzije (bilo kada)	12	0	0	6
Ishod (kraj intenzivne)				
Potpuni oporavak	14	20	14	18
Nepromijenjeno	0	0	0	2
Sekvele	9	0	7	0
<i>Krvna slika (prijem)</i>				
Eritrociti (x10 ⁹ /L)	4.5 (3.7-5.9)	4.7 (3.4-5.6)	4.7 (4.4-5.6)	4.3 (3.1-5.2)
Hemoglobin (g/L)	123 (101-172)	132 (98-158)	140 (106-160)	118 (89-169)
Leukociti (x10 ⁹ /L)	12.4 (5.8-29.7)	11.5 (8.0-19.9)	7.2 (3.5-17.5)	9.9 (3.1-19.2)
Trombociti (x10 ⁹ /L)	376 (249-835)	274 (194-407)	281 (40-577)	249 (92-555)
CRP (mg/L)	5.6 (0.2-102)	5.7 (1.4-22.1)	0.5 (0.2-6.2)	18.3 (0.2-133)
<i>Likvor (prijem)</i>				
Broj stanica/3mm ³	189 (3-1056)	703 (120-5760)	672 (33-5599)	6 (1-15)
% polimorfonukleara	4 (0-91)	59 (8-94)	2 (0-24)	0 (0-27)
% monocita	96 (9-100)	41 (6-92)	98 (76-100)	100 (73-100)
Proteini (mg/L)	0.40 (0.14-2.41)	0.41 (0.2-0.89)	0.75 (0.23-2.19)	0.31 (0.17-0.73)
Glukoza likvor/serum	0.65 (0.52-0.89)	0.61 (0.54-0.76)	0.57 (0.31-0.77)	0.63 (0.41-0.93)
<i>Kemokini (prijem)</i>				
CXCL 10 likvor (µg/L)	0.22 (0-42.0)	23.0 (1.55-73.9)	0.36 (0-5.78)	0.12 (0-2.39)
CXCL 10 serum (µg/L)	0.07 (0-2.35)	0.23 (0.11-1.11)	0.07 (0-2.34)	1.30 (0.03-34.2)
CXCL 11 likvor (µg/L)	0 (0-0.11)	0.15 (0-0.39)	0 (0-0.02)	0 (0-0.08)
CXCL 11 serum (µg/L)	0.02 (0-0.21)	0.02 (0-0.03)	0 (0-0.08)	0.02 (0-0.25)
CXCL 13 likvor (µg/L)	0 (0-0.27)	0 (0-0.17)	0.1 (0-2.72)	0 (0-0.09)
CXCL 13 serum (µg/L)	0.08 (0.02-0.17)	0.1 (0.07-0.24)	0.02 (0-0.14)	0.13 (0.07-2.47)

¹ Infekcije donjih dišnih putova (5), infekcije gornjih dišnih putova (5), nejasno febrilno stanje (4), sepsa/bakterijemija (2), enteroviroza (2), poremećaj ponašanja (1), humana granulocitna anaplazmoza (1).

CRP – C-reaktivni protein

5.2. Analiza koncentracije kemokina CXCL10, CXCL11 i CXCL13 u CSL-u i serumu ispitanika oboljelih od ADEM-a, NPEV AM, NB i kontrolne skupine

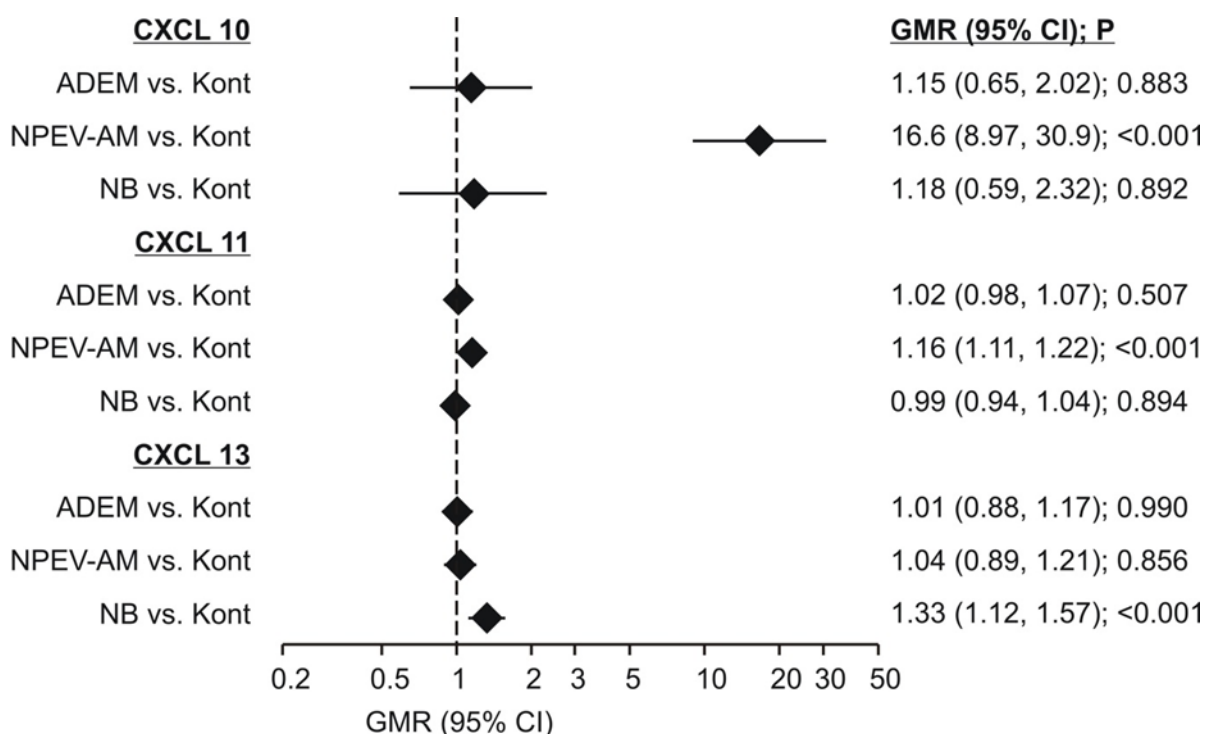
Slika 2 dodatno prikazuje pojedinačne izmjerene vrijednosti svih triju kemokina u likvoru i serumu po dijagnozi kako bi ocrtała izrazitu interindividualnu varijabilnost. Likvorske koncentracija CXCL13 u većine su ispitanika bile ispod granice detekcije (vrijednost=0), osim u djece s NB. Više razine CXCL10 u likvoru nego u serumu opažene su samo za oboljele s NPEV AM (omjeri likvor/serum >1.0) i to u svih ispitanika (**Slika 2**). Tendencija viših likvorskih od serumskih koncentracija opažena je i za CXCL11 i to samo u djece s NPEV AM (većine) (**Slika 2**). Više razine CXCL13 u likvoru nego u serumu opažene su samo u djece s NB, i to u većine (**Slika 2**).



Slika 2. Individualne vrijednosti likvorskih (gornji panel) i serumskih (srednji panel) koncentracija triju kemokina, te „gradijenta“ (odnosno omjera) likvor / serum (donji panel).

5.2.1. Likvorske koncentracije kemokina – razlike između skupina

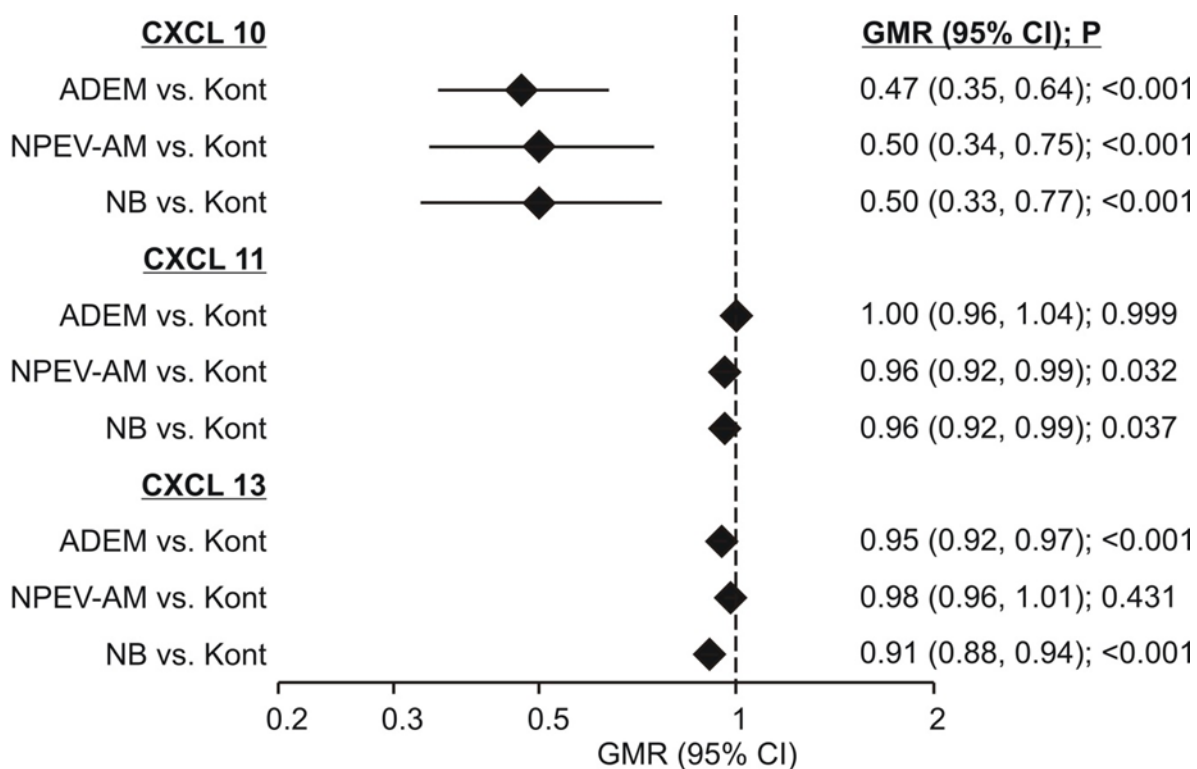
U odnosu na kontrolnu skupinu (djeca s akutnom infektivnom bolešću, koja međutim ne zahvaća SŽS) te uz podešenje za dob, spol i dan trajanja bolesti na dan prijema, više likvorske koncentracije CXCL10 opažene su samo u djece NPEV AM – bile su 16.6 puta više (**Slika 3**). Djeca s ADEM-om ili NB nisu se u tom pogledu razlikovala od kontrolne djece (**Slika 3**). Više likvorske koncentracije CXCL11 (u odnosu na kontrole), uočene su samo u djece s NPEV AM, i to samo blago više (16%) (**Slika 3**). Koncentracija CXCL13, pak, bila je blago viša od kontrolnih vrijednosti samo u djece oboljele od neuroborelioze – 33% viša (**Slika 3**). Dakle, NPEV AM karakterizira izrazito povišenje (u odnosu na kontrole) likvorskih koncentracija CXCL10 i blago povišenje CXCL11, a NB karakterizira blago povišenje CXCL13. ADEM nije združen sa relevantnim povišenjem likvorskih koncentracija niti jednog od navedenih citokina.



Slika 3. Razlike likvorskih koncentracija triju kemokina između djece s ADEM-om ili NPEV AM-om ili NB-om i kontrola.

5.2.2. Serumske koncentracije kemokina – razlike između skupina

Uz podešenje za dob, spol i trajanje bolesti na dan prijema, sva djeca s akutnim bolestima SŽS-a imala su u odnosu na kontrole niže (dvostruko) serumske koncentracije CXCL10 (**Slika 4**). Serumske koncentracije CXCL11 bile su blago niže u djece s NPEV AM ili NB nego u kontrolne djece, dok se djeca s ADEM-om u tom pogledu nisu razlikovala od kontrolne djece (**Slika 4**). Serumske koncentracije CXCL13 u djece s ADEM-om i djece s NB bile su blago niže nego u kontrolne djece, dok se djeca s NPEV AM nisu u tom pogledu razlikovala od kontrola (**Slika 4**). Dakle, ADEM karakteriziraju snižene serumske koncentracije CXCL10 i CXCL13, NPEV AM karakteriziraju snižene serumske koncentracije CXCL10 i CXCL11, dok su u NB snižene serumske koncentracije svih triju kemokina.



Slika 4. Razlike serumskih koncentracija triju kemokina između djece s ADEM-om ili NPEV AM-om ili NB-om i kontrola.

5.2.3. Likvor-serum kemokinski gradijenti po skupinama

Kako je sažeto u **Tablici 4**, jasan kemokinski gradijent „likvor-serum“ opažen je samo u djece s NPEV AM i to u pogledu CXCL10 (oko 18 puta više koncentracije u likvoru nego u serumu, svi ispitanici s omjerima >1.0) i CXCL11 (oko 12 puta više koncentracije u likvoru nego u serumu, 19/20 ispitanika s omjerima >1.0). U djece s NB, uočene su nešto više koncentracije CXCL10 (1.49 puta više, 11/21 s omjerom >1.0) i CXCL13 (3 puta više, 14/21 s omjerom >1.0) u likvoru nego u serumu ukazujući na „blagi gradijent“.

Tablica 4. Omjer likvorskih i serumskih koncentracija kemokina („likvor-serum gradijent“) u djece s ADEM-om, NPEV AM-om, NB-om i u djece iz kontrolne skupine.

	ADEM	NPEV AM	NB	Kontrole
<i>CXCL 10</i>				
Likvor/ serum (95%CI)	1.35 (0.98-1.86)	17.8 (12.7-25.2)	1.49 (1.06-2.08)	0.54 (0.38-0.76)
Djeca s omjerom >1.0	13/23	20/20	11/21	2/20
<i>CXCL 11</i>				
Likvor/ serum (95%CI)	0.23 (0.12-0.43)	11.6 (5.8-22.9)	0.79 (0.41-1.55)	0.06 (0.03-0.11)
Djeca s omjerom >1.0	1/23	19/20	5/21	0/20
<i>CXCL 13</i>				
Likvor/ serum (95%CI)	0.02 (0.01-0.04)	0.01 (0.01-0.03)	3.0 (1.39-6.48)	0.01 (0.01-0.02)
Djeca s omjerom >1.0	1/23	1/20	14/21	0/20

5.2.4. Zduženost likvorskih koncentracija kemokina i broja stanica u likvoru i razlike među skupinama

Kako je sažeto u **Tablici 5**, uz podešenje za dob, spol i trajanje bolesti u vrijeme prijema, više likvorske koncentracije CXCL10 bile su nezavisno združene s većim brojem stanica u likvoru u bolesnika s ADEM-om i u bolesnika s NB ali ne i u bolesnika s NPEV AM ili u djece iz kontrolne skupine (**Tablica 5**, Model 1). Za likvorske koncentracije CXCL11 nije opažena nezavisna združenost s brojem stanica u likvoru niti u jednoj skupini djece (**Tablica 5**, Model 2). Više likvorske koncentracije CXCL13 bile su združene s višim brojem stanica u djece s NB, ali ne i u drugih skupina (**Tablica 5**, Model 3). Zanimljivo, muški je spol konzistentno bio združen s višim likvorskim koncentracijama kemokina a dulje vrijeme od početka bolesti do prijema s nižim koncentracijama (**Tablica 5**). **Slika 5** prikazuje podešene regresijske pravce (iz Modela 1, **Tablica 5**) između likvorskih koncentracija CXCL10 i broja stanica u likvoru, te između likvorskih koncentracija CXCL13 i broja stanica u likvoru (iz Modela 3, **Tablica 5**) prema dijagnozi.

Tablica 5. Multivarijatna analiza združenosti broja stanica u likvoru (u 3 mm³) i likvorske koncentracije triju kemokina. Koeficijenti su prikazani s 95% granicama pouzdanosti.

	Koeficijent (95% CI)	P
<i>Model 1 – likvorska koncentracija CXCL 10</i>		
Dob (za 1 godinu)	-0.001 (-0.006, 0.004)	0.618
Dječaci (vs. djevojčice)	0.553 (-0.044, 1.153)	0.069
Dan trajanja bolesti na dan prijema (za 1 dan)	-0.053 (-0.099, -0.007)	0.026
Ln(CXCL 10 u likvoru) u ADEM	0.763 (0.149, 1.377)	0.016
Ln(CXCL 10 u likvoru) u NPEV AM	-0.094 (-0.707, 0.519)	0.760
Ln(CXCL 10 u likvoru) u NB	1.193 (0.245, 2.141)	0.014
Ln(CXCL 10 u likvoru) u Kontrola	0.095 (-1.457, 1.646)	0.904
<i>Model 2 – likvorska koncentracija CXCL 11</i>		
Dob (za 1 godinu)	-0.001 (-0.006, 0.004)	0.705
Dječaci (vs. djevojčice)	0.696 (0.092, 1.300)	0.025
Dan trajanja bolesti na dan prijema (za 1 dan)	-0.049 (-0.097, -0.001)	0.047
Ln(CXCL 11 u likvoru) u ADEM	12.2 (-2.001, 26.4)	0.091
Ln(CXCL 11 u likvoru) u NPEV AM	-0.327 (-0.590, 5.245)	0.907
Ln(CXCL 11 u likvoru) u NB	73.5 (-0.147, 161.7)	0.101
Ln(CXCL 11 u likvoru) u Kontrola	-12.56 (-45.92, 20.81)	0.455
<i>Model 3 – likvorska koncentracija CXCL 13</i>		
Dob (za 1 godinu)	0.001 (-0.005, 0.005)	0.997
Dječaci (vs. djevojčice)	0.702 (0.078, 1.325)	0.028
Dan trajanja bolesti na dan prijema (za 1 dan)	-0.060 (-0.108, -0.012)	0.015
Ln(CXCL 13 u likvoru) u ADEM	-8.65 (-19.4, 2.08)	0.112
Ln(CXCL 13 u likvoru) u NPEV AM	-2.85 (-18.7, 13.0)	0.721
Ln(CXCL 13 u likvoru) u NB	1.801 (0.209, 3.394)	0.027
Ln(CXCL 13 u likvoru) u Kontrola	12.4 (-17.8, 42.5)	0.416

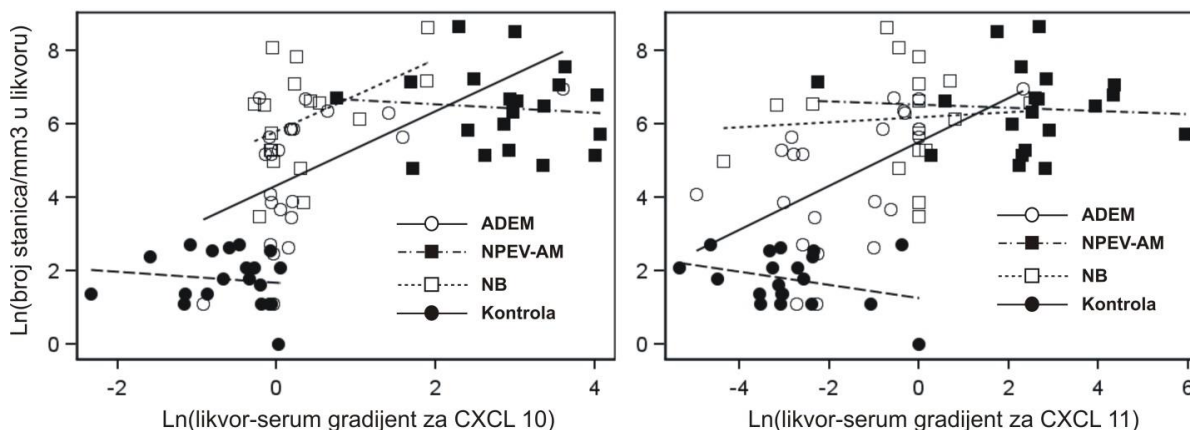
5.2.5. Zdrženost kemokinskog gradijenta likvor-serum i broja stanica u likvoru i razlike među skupinama

Kako je sažeto u **Tablici 6**, uz podešenje za dob, spol i trajanje bolesti u vrijeme prijema, viši gradijent likvor-serum za CXCL10 bio je nezavisno združen s većim brojem stanica u likvoru u bolesnika s ADEM-om i u bolesnika s NB-om ali ne i u bolesnika s NPEV AM-om ili u djece iz kontrolne skupine (**Tablica 6**, Model 1). Viši

gradijent za CXCL11 bio je združen s većim brojem stanica u djece s ADEM-om, ali ne i djece iz drugih skupina (**Tablica 6**, Model 2). Broj stanica u likvoru i gradijent za CXCL13 nisu bili združeni niti u jedne skupine djece (**Tablica 6**, Model 3). Muški je spol konzistentno bio združen s višim gradijentom kemokina likvor-serum, a dulje vrijeme od početka bolesti do prijema s nižim gradijentom (**Tablica 6**). **Slika 6** prikazuje podešene regresijske pravce iz Modela 1 i 2, **Tablica 6**, između likvor-serum gradijenata CXCL10 i CXCL11 i broja stanica u likvoru prema dijagnozi.

Tablica 6. Multivarijatna analiza združenosti broja stanica u likvoru (u 3 mm³) i gradijenta likvor-serume triju kemokina. Koeficijenti su prikazani s 95% granicama pouzdanosti.

	Koeficijent (95% CI)	P
<i>Model 1 – likvor-serum gradijent CXCL 10</i>		
Dob (za 1 godinu)	-0.001 (-0.007, 0.003)	0.440
Dječaci (vs. djevojčice)	0.470 (-0.107, 1.047)	0.109
Dan trajanja bolesti na dan prijema (za 1 dan)	-0.058 (-0.104, -0.012)	0.014
Ln(gradijent CXCL10) u ADEM	0.936 (0.358, 1.514)	0.002
Ln(gradijent CXCL10) u NPEV AM	-0.072 (-0.708, 0.563)	0.821
Ln(gradijent CXCL10) u NB	1.107 (0.228, 1.985)	0.014
Ln(gradijent CXCL10) u Kontrola	0.448 (-0.721, 1.067)	0.701
<i>Model 2 – likvor-serum gradijent CXCL 11</i>		
Dob (za 1 godinu)	-0.001 (-0.006, 0.004)	0.678
Dječaci (vs. djevojčice)	0.448 (-0.161, 1.056)	0.147
Dan trajanja bolesti na dan prijema (za 1 dan)	-0.050 (-0.097, -0.003)	0.037
Ln(gradijent CXCL11) u ADEM	0.527 (0.187, 0.867)	0.003
Ln(gradijent CXCL11) u NPEV AM	0.166 (-0.396, 0.267)	0.698
Ln(gradijent CXCL11) u NB	0.140 (-0.249, 0.528)	0.476
Ln(gradijent CXCL11) u Kontrola	-0.091 (-0.542, 0.342)	0.676
<i>Model 3 – likvor-serum gradijent CXCL 13</i>		
Dob (za 1 godinu)	0.000 (-0.005, 0.005)	0.977
Dječaci (vs. djevojčice)	0.734 (0.111, 1.356)	0.022
Dan trajanja bolesti na dan prijema (za 1 dan)	-0.049 (-0.099, 0.000)	0.048
Ln(gradijent CXCL13) u ADEM	-0.121 (-0.553, 0.310)	0.577
Ln(gradijent CXCL13) u NPEV AM	-0.026 (-0.456, 0.404)	0.906
Ln(gradijent CXCL13) u NB	0.136 (-0.097, 0.367)	0.246
Ln(gradijent CXCL13) u Kontrola	0.207 (-0.320, 0.734)	0.456



Slika 6. Nezavisna združenost $\ln(\text{broja stanica u likvoru})$ i $\ln(\text{likvor-serum gradijent})$ za CXCL10 (lijevo), odnosno $\ln(\text{likvor-serum gradijent})$ za CXCL11 (desno) ovisno o dijagnozi.

5.2.6. Mogu li likvorske koncentracije kemokina CXCL10, CXCL11 i/ili CXCL13 pomoći u ranoj diferencijalnoj dijagnozi ADEM, NPEV AM i NB – „razlikuju“ li te bolesti međusobno?

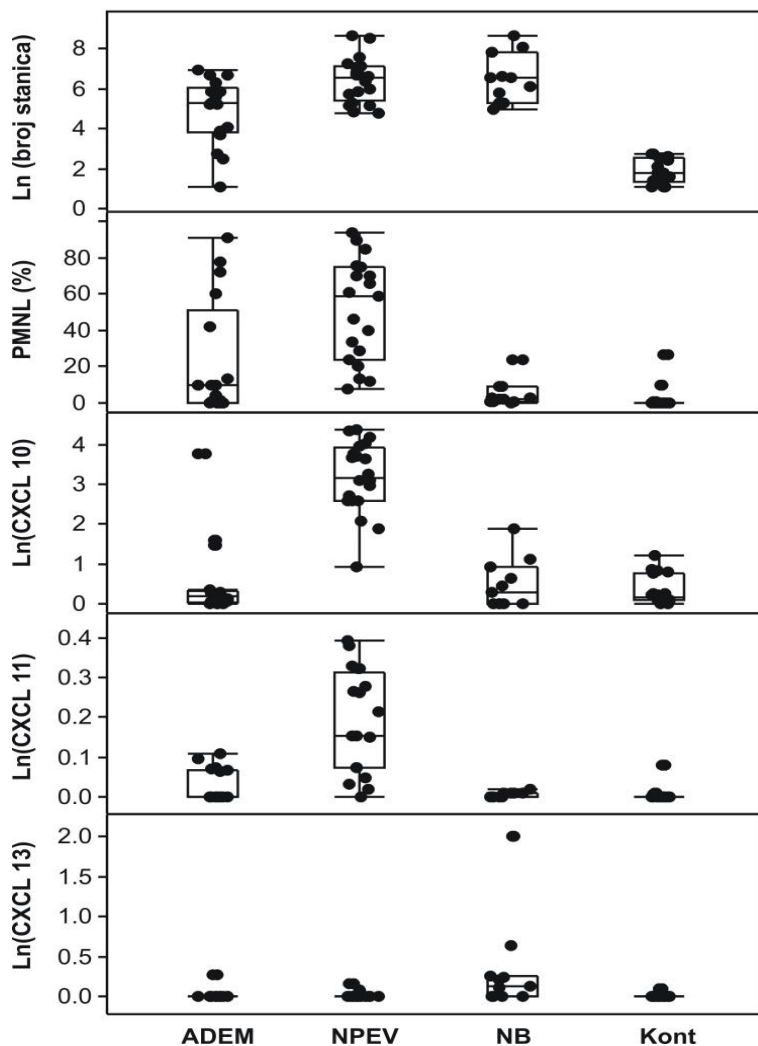
Obzirom na sličnost standardnih likvorskih nalaza ADEM-a, NPEV AM i NB u ranim fazama bolesti, djeca koja su zaprimljena do 8. dana (uključno) od početka simptoma bolesti uzeta su u obzir za analizu dijagnostičkih svojstava likvorskih koncentracija citokina u smislu njihovog razlikovanja. **Tablica 7** sažima njihova temeljna svojstva. Jasno je da se standardni likvorski nalazi u sve tri bolesti središnjeg živčanog sustava razlikuju od onih u kontrolne djece, prvenstveno po broju stanica. **Slika 7** preglednije prikazuje individualne vrijednosti ta dva standardna nalaza i likvorskih koncentracija kemokina za skupinu djece u koje su uzorci uzeti do 8. dana od početka simptoma bolesti. Izvjesno je da se likvorski nalaz u djece s NB razlikuje od likvorskog nalaza kontrolne djece brojem stanica, a postoji naznaka nešto viših koncentracija CXCL13 (**Slika 7**). U djece s NPEV AM, likvorski se nalaz razlikuje od kontrolnog i brojem stanica i višim koncentracijama CXCL10 i CXCL11 (**Slika 7**), dok se u djece s ADEM-om, likvorski nalaz razlikuje od kontrolnog većim brojem stanica i naznakom nešto viših koncentracija CXCL10 i CXCL11 (**Slika 7**).

Multivarijatna analiza razlika likvorskih nalaza u djece s ADEM, NPEV AM i NB međusobno sažeta je u **Slici 8**.

Tablica 7. Svojstva ispitanika s ADEM, NPEV AM, NB i kontrolnih ispitanika u kojih su serumske i likvorske koncentracije kemokina određene do 8. dana (uključno) od početka simptoma bolesti. Vrijednosti su brojevi ili medijani (najniža-najviša vrijednost).

	ADEM	NPEV AM	NB	Kontrole ¹
<i>Klinička svojstva</i>				
N (M / Ž)	17 (7/10)	20 (15/5)	11 (7/4)	18 (12/6)
Dob (mjeseci)	58 (10-198)	128 (3-188)	127 (48-215)	21 (1-184)
Dani od početka bolesti	4 (1-8)	2 (1-3)	4 (1-7)	2 (1-8)
<i>Likvor (prijem)</i>				
Broj stanica/3mm ³	200 (3-1056)	703 (120-5760)	690 (148-5632)	6 (3-15)
% polimorfonukleara	10 (0-91)	59 (8-94)	2 (0-24)	0 (0-27)
% monocita	90 (9-100)	41 (6-92)	98 (76-100)	100 (73-100)
Proteini (mg/L)	0.48 (0.14-2.41)	0.41 (0.2-0.89)	0.60 (0.26-2.19)	0.32 (0.17-0.73)
Glukoza likvor/serum	0.67 (0.52-0.89)	0.61 (0.54-0.76)	0.57 (0.31-0.70)	0.63 (0.42-0.93)
<i>Kemokini (prijem)</i>				
CXCL 10 likvor (µg/L)	0.23 (0-41.9)	23.0 (1.55-73.9)	0.36 (0-5.66)	0.18 (0-2.39)
CXCL 10 serum (µg/L)	0.07 (0-2.35)	0.23 (0.11-1.11)	0.07 (0-2.34)	1.44 (0.19-34.1)
CXCL 11 likvor (µg/L)	0 (0-0.11)	0.15 (0-0.39)	0 (0-0.02)	0 (0-0.08)
CXCL 11 serum (µg/L)	0.01 (0-0.21)	0.02 (0-0.03)	0.01 (0-0.08)	0.02 (0.01-0.25)
CXCL 13 likvor (µg/L)	0 (0-0.26)	0 (0-0.16)	0.12 (0-2.01)	0 (0-0.09)
CXCL 13 serum (µg/L)	0.08 (0.02-0.17)	0.1 (0.07-0.24)	0.02 (0.0-0.14)	0.13 (0.09-0.25)

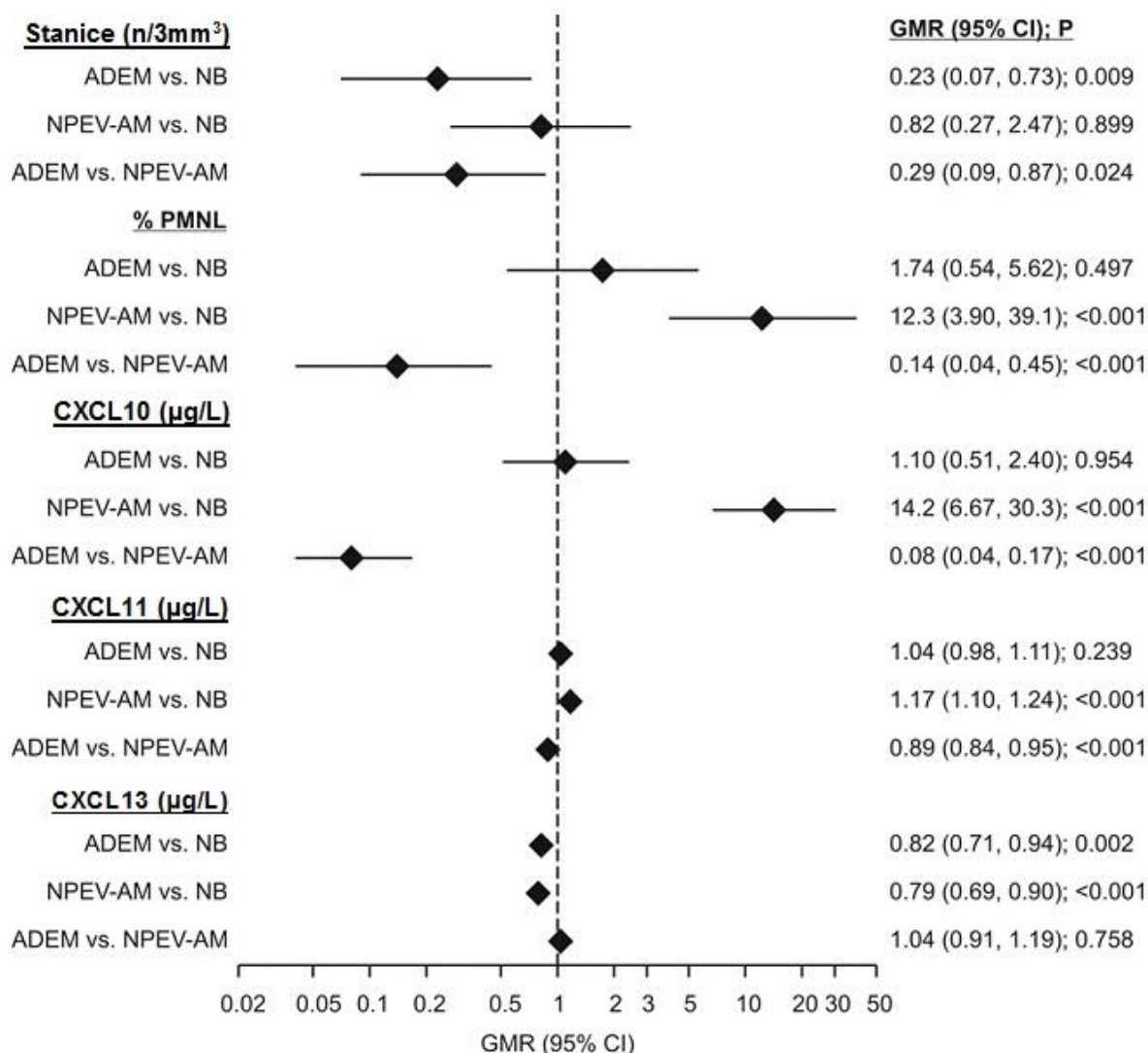
¹ Infekcije donjih dišnih putova (4), infekcije gornjih dišnih putova (5), febrilni status (3), enteroviroza (2), bakterijemija/sepsa (2) poremećaj ponašanja (1), humana granulocitna anaplazmoza (1).



Slika 7. Individualne vrijednosti likvorskih nalaza (odozgo prema dolje) – broja stanica, udjela polimorfonukleara, koncentracije CXCL10, 11 i 13.

Likovorski nalaz u djece oboljele od ADEM-a razlikuje se od onog u djece s NB po značajno nižem broju stanica (oko 4 puta nižem) (**Slika 8**), te nešto nižoj koncentraciji CXCL13 (oko 18% nižoj) (**Slika 8**). Likvorski nalaz djece s NPEV AM razlikuje se od onog u djece s NB po znatno većem udjelu polimorfonukleara među stanicama (oko 12 puta većem) (**Slika 8**), te po izrazito višoj koncentraciji CXCL10 (oko 14 puta višoj), te nešto višoj koncentraciji CXCL11 (oko 17% višoj) i nešto nižoj koncentraciji CXCL13 (oko 21% nižoj) (**Slika 8**). Likvorski nalaz u djece s ADEM-om razlikuje se od onog u djece s NPEV AM po izrazito nižem broju stanica (oko 4 puta nižem) (**Slika 8**), po izrazito nižem udjelu polimorfonukleara (oko 7 puta nižem)

(Slika 8), po izrazito nižoj koncentraciji CXCL10 (oko 12 puta nižoj) (Slika 8), te blago nižoj (za 11%) koncentraciji CXCL11 (Slika 8).



Slika 8. Razlike likvorskog nalaza određenog do 8. dana od početka simptoma bolesti – broja stanica, udjela polimorfonukleara i koncentracija triju kemokina između djece s ADEM-om, NPEV AM i NB.

Shodno navedenom, za niti jedan od citokina nije vjerojatno da njegove likvorske koncentracije mogu poslužiti u smislu dijagnostičkog razlikovanja ADEM od NB, već se kao izgledna pomoć u diferencijalnoj dijagnozi čini broj stanica u likvoru.

Sukladno rezultatima na **Slici 8**, za “razlikovanje” NPEV AM od NB kao koristan dijagnostički test čini se udio polimorfonukleara i likvorska koncentracija CXCL10.

Konačno, za razlikovanje ADEM od NPEV AM, kao korisni dijagnostički testovi čine se broj stanica u likvoru, udio polimorfonukleara i likvorska koncentracija CXCL10.

Dakle, od likvorskih koncentracija citokina, jedino je koncentracija CXCL10 potencijalno dijagnostički zanimljiva u smislu „razlikovanja“ NPEV AM od NB ili od ADEM-a, a kako su likvorske koncentracije CXCL10 u djece s ADEM i djece s NB praktično iste (**Slika 8**), to se likvorska koncentracija CXCL10 čini potencijalno korisnom u razlikovanju NPEV AM od druge dvije bolesti „kumulativno“.

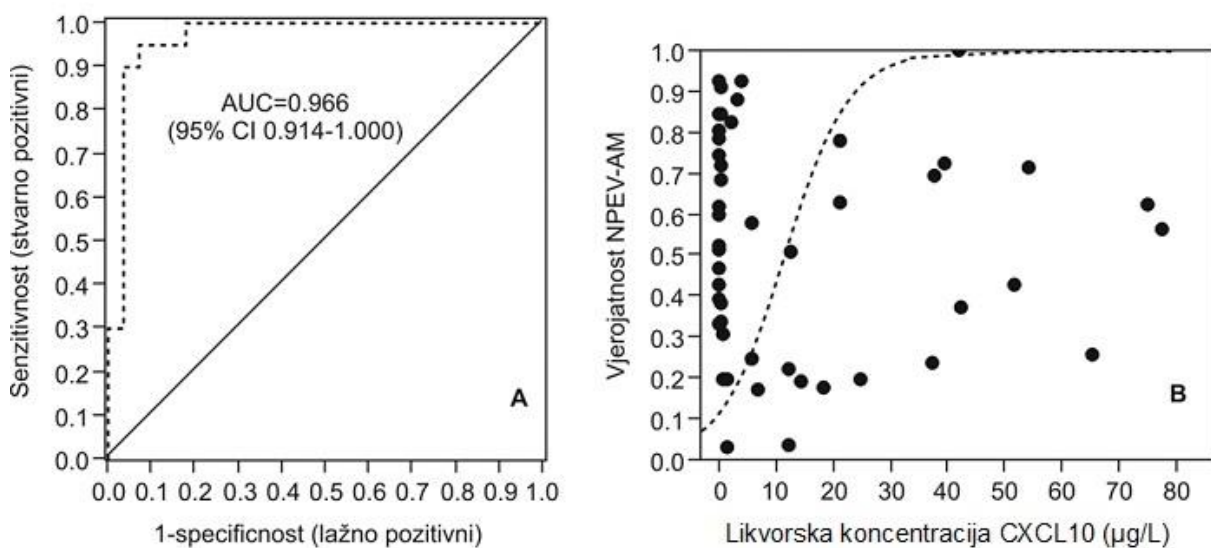
U **Tablici 8** sažeti su rezultati logističke regresije u kojoj je zavisna varijabla „dijagnoza“ (NPEV AM ili „ostalo“, tj. kumulativno ADEM ili NB) i koja pokazuje u kojoj je mjeri likvorska koncentracija CXCL10 prediktivna za dijagnozu „NPEV AM“.

Tablica 8. Univarijatna i nezavisna združenost viših likvorskih koncentracija CXCL10 i dijagnoze „NPEV AM“ (nasuprot ADEM ili NB, kumulativno).

	Univarijatni OR (95%CI)	Podrešeni OR (95%CI)	Multivarijatna P-vrijednost
CXCL 10 (za 1 µg/L)	1.19 (1.09-1.38)	1.13 (1.05-1.28)	<0.001
Dob (za 1 mjesec)	---	1.02 (0.99-1.05)	0.263
Dječaci (vs. djevojčice)	---	2.67 (0.26-26.9)	0.399
Dan bolesti (za 1 dan)	---	0.28 (0.05-0.76)	0.005
AU-ROC (%) (95% CI)	0.966 (0.914-1.000)	0.964 (0.916-1.000)	

U univarijatnoj analizi (**Tablica 8**), za svaki porast likvorske koncentracije za jednu jedinicu, šansa da se radi o NPEV AM raste za 19% (OR=1.19). Uz podešenje za dob, spol i vrijeme trajanja bolesti u vrijeme uzimanja uzorka, više likvorske razine CXCL10 i dalje su značajno združene s većom šansom da se radi o NPEV AM – OR=1.13, p<0.001. Unatoč činjenici da se radi o djeci zaprimljenoj do 8. dana od početka bolesti, dulje vrijeme proteklo od početka simptoma do uzimanja uzorka likvora združeno je s manjom šansom da se radi o NPEV AM. Površina ispod ROC

krivulje za sami CXCL10 veća je nešto od površine za cijeli model (sa svim varijablama) (**Tablica 8**). Shodno tome, sama vrijednost likvorske koncentracije odlično „razlikuje“ NPEV AM od ADEM/NB (površina ispod krivulje u cijelosti >0.900). **Slika 9** prikazuje ROC krivulju za CXCL10 (**Slika 9 A**) i odnos likvorskih koncentracija CXCL10 i vjerojatnosti da se radi o NPEV AM (a ne o ADEM/NB) (**Slika 9 B**).



Slika 9. Univarijatni odnos likvorske koncentracije CXCL10 i dijagnoze NPEV AM – ROC krivulja (A) i vjerojatnost dijagnoze u odnosu na vrijednosti CXCL10 (B).

U ROC analizi detektirana je „granična vrijednost“ likvorske koncentracije CXCL10 s optimalnim odnosom senzitivnost i specifičnost u iznosu od 5.64 µg/L. Karakteristike likvorske koncentracije CXCL10 kao dijagnostičkog testa uz navedenu graničnu vrijednost, sažete su u **Tablici 9**.

Tablica 9. Svojstva likvorske koncentracije CXCL10 kao dijagnostičkog testa za NPEV AM (nasuprot ADEM/NB).

Ukupno djece	48
Prevalencija NPEV AM [n (%)]	20 (41.7)
Optimalna granična vrijednost ($\mu\text{g/L}$) ^a	5.64
Senzitivnost (stvarno pozitivni) (%)	95.0 (78.4-99.7)
Specifičnost (stvarno negativni) (%)	92.8 (79.2-98.7)
1-specifičnost (lažno pozitivni) (%)	7.2 (1.3-20.8)
1-senzitivnost (lažno negativni) (%)	5.0 (0.3-21.6)
Pozitivna prediktivna vrijednost (%)	90.5 (72.9-98.3)
Negativna prediktivna vrijednost (%)	96.3 (83.6-99.8)
Vjerojatnost NPEV AM uz negativan test (%)	3.7 (0.2-16.4)

^a Optimalna je vrijednost s optimalnim odnosom specifičnosti i senzitivnosti

Uz navedenu graničnu vrijednost, i senzitivnost (95%) i specifičnost (92.8%) bile su visoke pa su posljedično bile visoke i pozitivna i negativna prediktivna vrijednost: pozitivna prediktivna vrijednost od 90.5% govori da je uz vrijednost likvorske koncentracije CXCL10 $\geq 5.64 \mu\text{g/L}$ vjerojatnost da se radi o NPEV AM (a ne ADEM/NB) – 90.5%, odnosno, ostaje 9.5% vjerojatnosti da se ipak ne radi o NPEV AM. Negativna prediktivna vrijednost od 96.3% kazuje da je uz vrijednosti CXCL10 $< 5.64 \mu\text{g/L}$, vjerojatnost da se radi o NPEV AM svega 3.7% (**Tablica 9**).

Sveukupno, u smislu „razlikovanja“ NPEV AM od ADEM/NB, likvorske koncentracije CXCL10 pokazuju odlična dijagnostička svojstva.

6. RASPRAVA

Nebakterijske upale najčešće su akutne infekcijske bolesti SŽS-a u djece. Iako je etiološka dijagnostika, naročito u posljednjem desetljeću, značajno napredovala, i dalje se malo zna o imunološkoj podlozi i procesima koji dovode do nastanka i kontrole ovih bolesti. Zahvaljujući brojnim, većinom eksperimentalnim, studijama, otkriveni su različiti imunološki obrasci, od presudne važnosti za razumijevanje događaja koji se odvijaju za vrijeme postojanja aktivnog upalnog zbivanja. Primjena novih metoda laboratorijske dijagnostike, dovela je do značajnih postignuća na polju istraživanja upalnih bolesti SŽS-a.^{90,100-104} Dugo se smatralo kako je SŽS imunoprivilegirano mjesto u kojem interakcija stanica nije moguća, prvenstveno zbog nedostatka limfne drenaže i rezidentnih dendritičkih stanica.¹⁰⁹ Specifičnost imunološkog odgovora je i u KMB koja, uz čimbenike producirane od strane rezidentnih neuroepitelnih stanica, uređuje promet, preživljenje i funkcije efektorskih leukocita za vrijeme upale.¹¹⁰ Međutim, ova se pretpostavka nije pokazala točnom. Preko intravitalne fluorescentne videomikroskopije, omogućena je *in vivo* vizualizacija prometa leukocita te direktno dokazano kako je interakcija cirkulirajućih leukocita s endotelnim stanicama oštećene KMB i njihov prolaz u parenhim mozga najvažniji korak u patogenezi upalnih bolesti SŽS-a.¹⁰⁰⁻¹⁰¹ Interakcija leukocita i endotelnih stanica posredovana je staničnim adhezijskim molekulama, kemokinima i kemokinskim receptorima.^{100-103,105,107-108} Svoj učinak kemokini ostvaruju vežući se na stanične receptore koji pripadaju obitelji G-proteinskih receptora.¹⁰⁰⁻¹⁰⁸ Citokini i kemokini se produciraju od strane raznih stanica u fiziološkim i patološkim stanjima. U SŽS-u im je funkcija neuromodulatorna; reguliraju neurorazvoj, upalu i sinaptičku transmisiju. Važni su za imunološko praćenje, transfer leukocita i regrutaciju ostalih upalnih faktora. Studije su pokazale kako su glavni izvor kemokina u upalnim bolestima upravo rezidentne stanice SŽS-a. Nakon stimulusa od strane promijenjene stanice ili nakon prepoznavanja virusnih nukleinskih kiselina, Toll-like receptori aktiviraju intracelularnu signalnu kaskadu što inducira gene za sintezu raznih citokina od strane stanica SŽS-a poput mikroglije, astrocita, oligodendrocita, mijelinizirajućih stanica, endotelnih stanica te čak i neurona koji mogu oslobađati citokine ili odgovarati na njih pomoću receptora.¹¹¹⁻¹¹² Nakon što su inducirani, tvore kemokinski gradijent koji privlači imunosne stanice koje se onda kotrljaju i adheriraju na endotel

te dijapedezom kroz endotel ulaze u tkiva.¹⁰² Ranije studije pokazale su kako su stanice koje se prenose u SŽS memorijski CD4+T-limfociti iz krvi. Ti rezultati podupiru hipotezu kako su aktivirani memorijski CD4+T-limfociti glavna stanična subpopulacija odgovorna za imunološki odgovor u upalnim bolestima SŽS-a. Nakon što pređu KMB, memorijski CD4+-limfociti mogu prepoznati specifični antigen i potaknuti lokalni upalni odgovor. Ukoliko ne prepoznaju antigen, vratit će se natrag u cirkulaciju. Ta limfocitna migracija preko KMB u CSL kao odgovor na infekciju neurotrofnim virusima je posredovana kemokinima i njihovim receptorima.¹¹²⁻¹¹³ Što se tiče virusnih infekcija SŽS-a uzrokovanih neurotrofnim virusima (većinom ispitivano na infekcijama s virusom mišjeg hepatitisa (engl. JHM strain of mouse hepatitis virus; JHMV), virusom limfocitnog koriomeningitisa (engl. Lymphocytic Choriomeningitis Virus; LCMV), HSV-1, HIV-a) pokazalo se kako su astrociti i mikroglija glavni izvori citokina. Neuron i endotelne stanice u određenim slučajevima također mogu producirati citokine. Kemokini su direktni medijatori neuropatologije u virusnim infekcijama SŽS-a; privlačeći upalne stanice generiraju odgovor domaćina ili, paradoksalno, posreduju neurotoksičnost i staničnu smrt te tako sudjeluju u nastanku autoimune bolesti.^{102,108} Osim što povećavaju propusnost KMB privlačeći neutrofile i monocite u SŽS, kemokini mogu biti i regulatori ulaska leukocita u parenhim mozga. Ekspresija kemokina rano u toku bolesti kao odgovor na infekciju virusima poboljšava odgovor na infekciju promicanjem vaskularne permeabilnosti i regulacijom limfocitne infiltracije.¹⁰⁸ 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.^{101-102,107-111}

S obzirom na oskudne literaturne podatke o ekspresiji kemokina u razvoju ADEM-a, NPEV AM i NB smatrala sam kako bi bilo značajno provesti studiju u kojoj bi se na dovoljno velikom broju ispitanika istražila uloga kemokina CXCL10, CXCL11 i CXCL13 u ovim bolestima u djece te time ujedno i upotpunila postojeća znanja o ekspresiji kemokina u akutnim nebakterijskim upalama SŽS-a. Pri odabiru kontrolne skupine smatrala sam kako je za usporedbu najprikladnije izabrati bolesnike u kojih je upalna bolest SŽS-a isključena urednim citološkim, biokemijskim i mikrobiološkim nalazom CSL-a. Također sam smatrala značajnim usporediti ove skupine oboljele djece iz razloga što im se često rezultati kliničke i laboratorijske (uključujući citološki i

biokemijski nalaz likvora) dijagnostike preklapaju te su često inicijalno teško ili nemoguće etiološki razlučive.

Uspoređujući navedene skupine ispitanika prema dobi, vidljivo je kako su ispitanici oboljeli od NPEV AM i NB nešto stariji (medijan dobi 128 i 127 mjesec) od ispitanika oboljelih od ADEM-a i kontrolne skupine (medijan dobi 58 mjeseci i 21 mjesec).

ADEM obuhvaća 10-15% slučajeva akutnih encefalitisa u djece u SAD-u, a dijagnoza se većinom postavlja na temelju isključenja drugih mogućih etioloških faktora bolesti. U većini studija je dob bolesnika oboljelih od ADEM-a usporediva s onima iz naše kohorte (5-8 godina).^{77-78,114-116} U jednoj od najvećih studija na pedijatrijskoj populaciji oboljeloj od ADEM-a (provedena na 45 djece) je medijan dobi bio 6.5 godina (raspon: 10 mjeseci do 18 godina, 64% u dobi od 2-10 godina), a u toj je studiji i ukazano na porast incidencije ove bolesti. Smatra se kako se oko 80% slučajeva javlja u djece mlađe od 10 godina.¹¹⁷

Najčešća klinička manifestacija NPEV infekcije SŽS-a je AM.^{20,25-26} Raspon dobi naših NPEV AM ispitanika (3-188 mjeseci) korelira s podacima drugih istraživanja, od kojih je jedno provedeno i u Hrvatskoj.^{2,6,35,38} S druge strane, neka su istraživanja pokazala kako većina djece oboljele od NPEV AM pripada grupi bolesnika mlađih od 24 mjeseca života.^{8,16,19}

Što se tiče djece oboljele od NB, i oni su bili nešto stariji od kontrola (medijan 127 mjeseci, raspon 48-215 mjeseci), što je također u suglasju s prethodnim studijama te sa studijom iz Hrvatske (medijan 11 godina i 8 mjeseci, raspon od 4 godine i 2 mjeseca do 14 godina i 2 mjeseca), a može se objasniti s dobi u kojoj djeca najčešće borave u prirodi, a još ne provode mjere samozaštite i preglede u svrhu pravovremenog otklanjanja krpelja.^{72,74,118}

Djeca uključena u kontrolnu skupinu bila su prosječno stara 21 mjesec (raspon 1-184 mjeseci).

Sukladno podacima kako u upalnim bolestima SŽS-a u dječjoj dobi većinom obolijevaju muška djeca^{2,8,112} i naša je studija pokazala predominaciju muškog spola u skupini oboljelih od NPEV AM (75%) i NB (57.1%).

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.^{20-21,33} Znanstvena istraživanja do sada provedena, ne nude objašnjenja za ovakvu spolnu distribuciju.

I u djece oboljele od NB uočili smo blagu predominaciju muškog spola, a ako rezultate o omjeru spolova usporedimo sa studijom iz Hrvatske (u kojoj je izviješteno o čak i većem postotku dječaka, 71.43%) i drugih europskih zemalja, vidimo kako nema bitne razlike (1:1 - 2:1 u korist dječaka)^{67,74}, a ima i studija kod kojih su oba spola bila jednako zastupljena.^{72,119}

Zanimljivo, u našoj smo studiji uočili blagu predominaciju ženskog spola kod djece oboljele od ADEM-a (60.9%), dok većina ostalih studija navodi blagu predominaciju muškog spola (u oko 60% slučajeva) s omjerom od 1.3:1 u korist dječaka, suprotno od ženske predominantnosti kod MS.^{76,78,82,116}

Trajanje bolesti prije prijema u bolnicu razlikuje se među skupinama ispitanika. Ispitanici s NPEV AM zaprimljeni su u bolnicu između 1. i 3. dana bolesti (medijan 2 dana), isto kao i oni iz kontrolne skupine, koji su prosječno zaprimljeni također 2. dan bolesti (raspon 1-28 dana). Iako je medijan vremena do prijema u bolnicu bio nešto veći za pacijente s ADEM-om i NB (6 dana za obje), ipak se stječe dojam o ukupno dobro razvijenoj „svijesti“ ili bojazni o mogućem postojanju upalne bolesti SŽS-a, kao i dobroj dostupnosti zdravstvene zaštite u sredini u kojoj je studija provedena. Ovi su podaci slični onima iz drugih studija, posebno za NB gdje je medijan kratak (čak i kraći od nekih studija iz europskih zemalja), kao i raspon od 1.-30. dana bolesti^{62,71,120}, a nešto dulji od onog u studiji *Wutte i sur.*¹²¹ U većini studija postoji veliki raspon trajanja bolesti do prijema u bolnicu, vjerojatno iz razloga širokog spektra kliničkih manifestacija NB i ponekad nespecifične kliničke slike. Mi smo u našu studiju uključili bolesnike sa sindromom aseptičnog meningitisa koji je “prominentnija” simptomatologija.

Analizirala sam 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 postojanje febriliteta kod prijema, postojanje cerebralnih napada tijekom bolesti, kao i stanje svijesti.

U bolesnika s ADEM-om je kod prijema u bolnicu vrućica, iako nije dijagnostički presudna i često prethodi kliničke znakove zahvaćanja SŽS-a, bila prisutna u čak 73.9% pacijenata. To je nešto više, ali usporedivo s do sada opisivanim u literaturi.¹¹⁶⁻¹¹⁷

Vrućica je kod prijema prisutna u velike većine ispitanika oboljelih od NPEV AM (95%), isto kao i kod kontrolne skupine. Za razliku od naše studije, značajan broj

bolesnika u dosadašnjim istraživanjima koja se bave AM uzrokovanim NPEV nema vrućicu (12 do 49%).^{2,20-21,33} Vrućica je gotovo uvijek prisutna u dojenčadi mlađe od 3 mjeseca života, a u djece starije od 12 mjeseci izostaje i u više od polovice oboljelih.^{2,21,33} Činjenicu kako većina naših ispitanika ima vrućicu, možemo, između ostalog, tumačiti i činjenicom da je u skupinu NPEV ispitanika uključen i veći broj male dojenčadi.

Naši bolesnici s NB su bili febrilni u samo 19% slučajeva, što se podudara s drugim objavljenim rezultatima.⁶² Iako vrućica nije često prisutan simptom, neke studije ipak opisuju nešto veću pojavnost (41-50%).^{70,74,119} *Skogman* je u svojoj disertaciji čak predvidjela prisutnost vrućice kao dijela „zbroja za predviđanje NB“ (uz parezu ličnog živca, umor, migratorni eritem i pleocitozu u CSL-u).¹¹⁹

Poseban je problem (iako rijedak) u literaturi opisan sindrom progresije AM u ADEM (što mi u našem ispitivanju nismo zamijetili). Kad se uspoređuje AM s AM koji kasnije progredira u ADEM, glavobolja i vrućica su bili najčešći klinički znaci u obje skupine, ali su bolesnici s progresijom u ADEM imali značajno dulje trajanje vrućice. Bolesnici s ADEM-om su u laboratorijskim parametrima imali statistički značajno nižu koncentraciju natrija i klora kod prijema u usporedbi s AM, ali nije bilo razlike u broju leukocita, CRP-u ili nalazima CSL-a među grupama.¹²²

U bolesnika s upalnom bolešću 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 leptomeninge već i parenhim mozga. Stoga su u studiji analizirani i podaci o pojavi cerebralnih napada te prisutnosti poremećaja svijesti.

Konvulzije se većinom pojavljuju u bolesnika s ADEM-om koji su mlađi od 5 godina, a u odraslih se viđaju rijetko (u 4 do 30%). Neke su studije izvijestile o produljenim fokalnim motornim napadajima u čak do 70% bolesnika, od kojih se u čak 82% slučajeva razvio epileptički status.^{76,123} U naših bolesnika oboljelih od ADEM-a cerebralni su napadaji primijećeni u 52.2%, što je nešto češće nego u većini od studija (učestalost od 21-34%).^{78,114-116}

Cerebralni napadi nisu zabilježeni u skupinama oboljelih od NPEV AM kao ni NB. Rezultati naše studije sukladni su s podacima ostalih studija, koje navode kako se u djece oboljele od NPEV AM, cerebralni napadi javljaju u manje od 3% bolesnika i to uglavnom u male dojenčadi mlađe od 3 mjeseca.^{20-21,33} U oboljelih od NB su cerebralni napadaji rijetkost. Mogu se pojaviti u do 4% bolesnika s lajmskim

encefalitisom, koji obuhvaća 0.5-8% NB u Europi.¹²⁴ U kontrolnoj skupini je 30% bolesnika imalo cerebralne napadaje, od kojih većinom febrilne konvulzije, što je u skladu i s nižom dobi bolesnika.

Pri procjeni stanja svijesti korištena je bodovna ljestvica - pedijatrijska GCS. Bolesnici s ADEM-om su imali niže vrijednosti GCS-a (medijan 14, raspon 8-15), što ukazuje da se ovi bolesnici prezentiraju težom kliničkom slikom. Ovi su podaci u suglasju i s literaturnim podacima koji govore u prilog tome kako je ADEM samo iznimno blaga bolest, a češće se prezentira brzoprogresivnim tijekom s neurološkom deterioracijom. *Leake* je u svojoj studiji na 42 djece s ADEM-om izvijestio kako je čak 83% imalo poremećen neurološki status kod prijema (nije određen GCS-om), a ostali u toku hospitalizacije, dok je 66% imalo poremećaj svijesti. ^{115,117} Encefalopatija i poremećaj svijesti su prisutni kod ovih bolesnika u različitom postotku (21-100%), ovisno o studiji.^{78,82,114-116}

Prema zbrojenim bodovima niti jedan ispitanik u grupama oboljelih od NPEV AM, NB i kontrolnoj grupi nije imao ozbiljniji poremećaj svijesti (medijan GCS-a je 15).

Svi oboljeli od NPEV AM, kao i oni iz kontrolne skupine su se potpuno oporavili, dok su u 9 bolesnika iz skupine ADEM (39.1%) i 7 iz NB (33.3%) zabilježene komplikacije u smislu neuroloških sekvela prisutnima i nakon otpusta iz bolnice.

Na osnovi dobivenih rezultata za NPEV AM, možemo se složiti sa zaključkom ranije provedenih studija, kako je NPEV AM u djece blaga, nekomplicirana bolest kratkog tijeka.^{2,8-9,20-21,112}

Postoje izvještaji o tome kako se čak 2/3 bolesnika s ADEM-om u potpunosti oporavi čak i bez specifičnog liječenja, iako su za oporavak potrebni tjedni. Preko polovice liječenih ima dobar oporavak s minimalnim deficitom ili bez deficita. Većinom zaostaju fokalni motorički deficiti, od blage nespretnosti i ataksije do hemipareze ili sljepoće.¹¹⁵ U literaturi se mogu pronaći podaci kako 17-29% djece s ADEM-om ima rezidualne simptome nakon terapije ili dugotrajne neurološke sekvele.⁸² U studiji *Leake i sur.* je 36 od 42 bolesnika preživjelo bez sekvela (vrijeme praćenja 1-5 godina, iako je 50% trebalo terapiju govora ili fizikalnu terapiju).¹¹⁷ Naši podaci pokazuju malo veću incidenciju sekvela vjerojatno iz razloga jer su analizirani podaci kod otpusta iz bolnice, a ne nakon duljeg praćenja ovih bolesnika. Preporuča se da djeca s ADEM-om budu uključena u dugotrajni proces praćenja kako bi se

pravovremeno uočili i riješili mogući kognitivni nedostaci i emocionalne poteškoće.¹¹⁵ U našoj studiji nije bilo smrtnih ishoda.

Za razliku od odraslih bolesnika, dugotrajnim praćenjem pedijatrijskih bolesnika oboljelih od NB je potvrđeno kako ispravno liječena djeca imaju izvrsnu prognozu za uredno kognitivno funkcioniranje i kako je ishod isti kao i u onih koji nisu imali NB.¹²⁵⁻¹²⁶ Potpuni oporavak je zamijećen u 66.6% naših bolesnika s NB, a rezidualni simptomi (7/21, 33.3%), iako nešto češći nego u nekima od studija (većinom od 11-22%), su karakterizirani kao blagi, što je u skladu s literaturnim podacima.^{62,71-72,74} Razlog nešto višoj incidenciji sekvela je vjerojatno sličan kao i u pacijenata s ADEM-om, a to je što su naši bolesnici evaluirani za postojanje sekvela samo kod otpusta iz bolnice, a ne nakon duljeg praćenja.

Analiza laboratorijskih pretraga krvi i CSL-a provedena je s ciljem izdvajanja i definiranja laboratorijskih parametara koji bi mogli imati utjecaja na lakše i brže inicijalno razvrstavanje navedenih sindroma i postavljanja dijagnoze ADEM-a, AM i NB.

Usporedbom dobivenih vrijednosti laboratorijskih pretraga krvi, iako skupine nisu randomizirane pa se ne mogu provesti adekvatni statistički testovi, može se vidjeti kako ne postoje značajnije razlike u broju leukocita, eritrocita, trombocita, koncentraciji hemoglobina i CRP-a i drugim laboratorijskim parametrima među ispitivanim skupinama. Pripadnici kontrolne skupine su imali inicijalno nešto viši broj leukocita i CRP-a, no ne značajno. Vrijednosti pojedinih pretraga se značajno preklapaju među grupama, tako da se niti jedna pretraga ne može iskoristiti kao nespecifični biljeg koji omogućuje brzo razlikovanje oboljelih od upalnih bolesti SŽS-a međusobno i u odnosu na kontrolnu skupinu.

Za sada u literaturi postoji samo jedna slično koncipirana studija koja je pokušala izdvojiti „tzv. rutinske laboratorijske parametre“ specifične za brzu detekciju i diferenciranje etiologije u sindromu aseptičnog meningitisa, no nije pronašla adekvatan parameter za diferencijaciju.¹²⁷

Razlika u broju stanica, kao i u diferencijalnoj citologiji CSL-a u kontrolne skupine (medijan broja stanica u CSL-u 6, raspon 1-15 u 3 mm³) je očekivana s obzirom da je upravo pleocitoza CSL-a jedan od kriterija za postavljanje dijagnoze upalne bolesti SŽS-a. S druge strane, pleocitoza je bila isključni kriterij pri odabiru ispitanika kontrolne skupine pa je očekivano da ni u jednog bolesnika kontrolne skupine nije verificirana. U bolesnika oboljelih od ADEM-a broj stanica u 3 mm³ CSL-a je bio

nešto niži (medijan 189 stanica, raspon 3-1056) nego u skupinama NPEV AM i NB (medijan 703 stanice, raspon 120-5760 i medijan 672 stanice, raspon 33-5599).

Pretraga CSL-a u pacijenata s ADEM-om je većinom nespecifična i uključuje limfocitnu pleocitozu od nekoliko desetaka do stotina stanica u mm^3 , no isto tako broj stanica u likvoru može biti uredan u do čak trećine pacijenata, o čemu je izvijestio i *Jayakrishnan* u svojoj studiji gdje ni jedan pacijent nije imao pleocitozu u likvoru.^{116,128} Naši su bolesnici s ADEM-om imali pleocitozu u 78.3% slučajeva (medijan 189, raspon 3-1056) koja je u 96% bila mononuklearna. To je nešto više, ali usporedivo s rezultatima ostalih studija gdje se pleocitoza opisuje u 28-65% slučajeva.^{78,82,114-115}

Prema do sada objavljenim rezultatima raznih studija, pleocitoza u CSL-u bolesnika s AM uzrokovanim NPEV ne bi trebala prelaziti 300-500 stanica u 1 mm^3 .^{8,16,21} Ako se uzme u obzir podatak da u više od polovice bolesnika u kojih se LP učini unutar prvih 48 sati bolesti, u CSL-u postoji predominacija neutrofilnih granulocita, a broj stanica može biti i veći od 1000 stanica u 1 mm^3 , tada naši rezultati (prosječno mononukleara 41%, polinukleara 59%) potvrđuju one objavljene u dosadašnjim studijama.^{2,8-9}

U svih naših bolesnika s NB je zabilježena limfocitna pleocitoza (mononukleara 98%) od nekoliko stotina stanica (medijan 672, raspon 33-5599) što je također usporedivo s drugim studijama, uključivo i studiju provedenu u Republici Hrvatskoj.^{62,74,129}

Što se tiče biokemijskih nalaza CSL-a, koncentracija proteina je nešto viša u ispitanika oboljelih od NB (0.75 mg/L) nego u ostalim skupinama, a što je u skladu sa prethodnom studijom provedenoj na djeci oboljeloj od NB u Hrvatskoj.⁷⁴

U literaturi je dostupno tek nekoliko studija kreiranih u svrhu stvaranja dijagnostičkog algoritma 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, a samo jedna na diferenciranje među različitim uzrocima sindroma AM.^{127,130} Ukoliko se uspoređuju laboratorijski parametri u djece s bakterijskim meningitisom u odnosu na one s AM i bez upalne bolesti SŽS-a, serumski CRP je bio viši u skupini bakterijskih meningitisa nego AM i onih bez upale SŽS-a.¹³¹ Druga je studija pokazala kako serumski PCT (0.5 ng/mL) i likvorska koncentracija proteina (0.5 g/L) imaju najbolju neovisnu prediktivnu vrijednost za bakterijski meningitis.¹³² Našu studiju djelomično možemo konceptualno usporediti sa studijom *Asano i sur.* koja je usporedila podatke bolesnika oboljelih od mumps meningitisa i ostalih virusnih meningitisa (nedefinirani) u djece međusobno te s kontrolnom skupinom djece s vrućicom bez neuroloških manifestacija. U ovoj studiji

nije pronađena razlika u skupinama među dobi, spolu i broju stanica, proteinima i glukozi u CSL-u.¹²⁷ Mi smo usporedili nalaze CSL-a kod naših bolesnika primljenih u prvih 8 dana bolesti, te pokazali da se likvorski nalaz u djece oboljele od ADEM-a razlikuje od onog u djece s NB-om po značajno nižem broju stanica (oko 4 puta nižem), a CSL nalaz djece s NPEV AM se od onog u djece s NB-om razlikuje po znatno većem udjelu polimorfonukleara među stanicama (oko 12 puta većem). Likvorski nalaz u djece s ADEM razlikuje se od onog u djece s NPEV AM po izrazito nižem broju stanica (oko 4 puta nižem) i po izrazito nižem udjelu polimorfonukleara (oko 7 puta nižem).

U cilju definiranja pojedinih imunoloških parametara kao potencijalnih biomarkera upalne bolesti SŽS-a, smatrali smo značajnim u studiji ispitati profil kemokina i analizirati postojeći kemokinski gradijent u krvi i CSL-u oboljelih od ADEM-a, NPEV AM i NB te ga usporediti međusobno i s onim u bolesnika u kojih je upalna bolest SŽS-a isključena.

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 demijelinizirajućih bolesti (posebice MS i ADEM-a). 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 demijelinizirajućim bolestima SŽS-a.^{90,102,107-108,133-136}

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}

Müller i sur. su u studiji provedenoj 2010.g. naveli kako primjena monoklonskog anti-CXCL10 protutijela u ranoj, akutnoj fazi bolesti štetno djeluje na konačni ishod bolesti uzrokujući višu stopu mortaliteta zbog izostanka protektivnog Th1 odgovora (važnog za savladavanje viralne replikacije), no blokiranje CXCL10 specifičnim protutijelom u kroničnoj fazi demijelinizirajuće bolesti pokazalo se iznimno korisnim te je rezultiralo značajnim kliničkim poboljšanjem.⁹⁰

Za CXCL11 je pokazano kako je eksprimiran u SŽS-u u akutnoj fazi EAE, dok su neke studije pokazale kako je pojačano eksprimiran i u mozgu CXCL10 deficitarnog miša i kako nije esencijalan za inicijalnu migraciju CXCR3 pozitivnih stanica u SŽS.^{134,137}

Kemokin CXCL13 je još od prvog opisa 1998. godine najviše od svih kemokina povezan s MS.¹³⁸⁻¹⁴⁰ *Khademi i sur.* su pokazali da bolesnici s MS imaju statistički značajno povišene razine CXCL13 u odnosu na kontrolnu skupinu i bolesnike s klinički izoliranim sindromom (engl. clinically isolated syndrome (CIS)), a pokazana je i korelacija sa stopom relapsa, prisutnosti oligoklonalnih vrpca i brojem lezija na MR, kao i vjerojatnošću konverzije CIS-a u MS.¹⁴⁰⁻¹⁴¹ No, CXCL13 nije specifičan za MS jer i pacijenti s virusnim/bakterijskim infekcijama imaju čak i više koncentracije tog kemokina, a njegova povišena koncentracija je zamijećena i u različitim malignim, autoimunim i kroničnim upalnim bolestima.^{122,138-139,142} Na studijama s MS i EAE je pokazano kako su CXCL13 deficitarni miševi eksprimirali blažu formu MS sa smanjenim brojem relapsa, a blokiranje CXCL13 s anti-CXCL13 protutijelima je uzrokovalo smanjenje EAE, pa je zaključeno kako ovo protutijelo ima potencijal za liječenje autoimunih poremećaja poput MS i RA.¹⁴²⁻¹⁴⁴

U našoj su studiji više razine CXCL10 u likvoru (23.0 (1.55-73.9) µg/L) nego u serumu (0.23 (0.11-1.11) µg/L) opažene samo za oboljele s NPEV AM (omjeri likvor/serum >1.0) i to u svih ispitanika. Tendencija viših likvorskih (0.15 (0-0.39) µg/L) od serumskih (0.02 (0-0.03) µg/L) koncentracija opažena je i za CXCL11 i to samo u djece s NPEV AM (većine njih). Likvorske koncentracije CXCL13 u većine su ispitanika bile ispod granice detekcije (vrijednost=0), osim u djece s NB. Više razine CXCL 13 u likvoru (0.1 (0-2.72) µg/L) nego u serumu (0.02 (0-0.14) µg/L) opažene su samo u djece s NB, i to u većine.

Malo je studija koje analiziraju kemokinski profil u ADEM-u.^{78,145-147} *Ichiyama i sur.* su ukazali na IL-6 i TNF-α kao posrednike upale SŽS-a u ADEM-u.¹⁴⁸ Studija *Franciotta i sur.* je pokazala kako i Th1 i Th2 citokini sudjeluju u imunopatogenezi ove bolesti, a

kemokini koji aktiviraju neutrofile i Th2 stanice razlikuju ADEM od MS.¹⁴⁹ *Kadhim i sur.* su potvrdili koncept da je T-stanično posredovana autoimunost bar djelomično odgovorna za ADEM.^{148,150} Studija je pokazala kako su citokini koji aktiviraju makrofage/mikrogliju (IL-1 β , IL-6, MIP-1 α), kao i oni koji djeluju na eozinofile (IL-5) i granulocite (IL-8, G-CSF) povišeni u ADEM-u.¹⁴⁷ Naši pacijenti s ADEM-om nisu imali relevantno povišenje ni jednog kemokina u CSL-u, uz tek blagu naznaku povišenja CXCL10 i CXCL11 u odnosu na kontrole. Također je primijećeno kako su serumske koncentracije CXCL10 i CXCL13 snižene u odnosu na kontrolnu skupinu, tj. one bez upale SŽS-a. Pronađena je i korelacija povišene CSL koncentracije CXCL10 u odnosu na broj stanica u CSL-u te gradijenta CSL/serum za CXCL10 i CXCL11 s brojem stanica u likvoru. Naša je studija (što se tiče pacijenata s ADEM-om) djelomično usporediva sa studijom na odraslim bolesnicima s ADEM-om (17 pacijenata) u kojoj su ispitivane i koncentracije CXCL10 i CXCL11. Razina CXCL11 u CSL-u se nije značajno razlikovala od zdravih (kao i u našoj studiji), dok su više razine CXCL10 u likvoru bile prisutne u pacijenata oboljelih od ADEM-a u usporedbi sa zdravim kontrolama, što je u našoj studiji naznačeno ali nije postiglo statističku značajnost.¹⁴⁹ Pleocitoza je u ovoj studiji korelirala s likvorskom koncentracijom kemokina koji privlače neutrofile i T-limfocite (između ostalih i CXCL10), što se poklapa i s našim rezultatima, no u spomenutoj studiji nije ispitivan gradijent koncentracija kemokina.¹⁴⁹ U literaturi su pozitivno s brojem stanica u ADEM-u korelirali i IL-6 i IFN- γ , a IL-8 s koncentracijom proteina. Dob, spol i dani od nastupa simptoma do LP nisu korelirali s koncentracijom citokina.¹⁴⁷ Za razliku od naših rezultata, ovi autori nisu pronašli razlike u serumskim koncentracijama kemokina među grupama.^{147,149} *Van Burgel i sur* su pokazali da pacijenti s ADEM-om i Henoch-Shonleinovom purpustom (HSP) nakon enterovirusne infekcije mogu imati visoke vrijednosti kemokina CXCL13 u CSL-u. Unatoč tome što je u ovu studiju uključen mali broj ispitanika s navedenim bolestima i nije određivan koncentracijski gradijent kemokina između CSL-a i seruma, ovaj podatak, zajedno s ranijim saznanjima o povišenim vrijednostima kod MS i sistemskog eritematoznog lupusa (SLE) vodi do zaključka da koncentracija CXCL13 može biti povišena u bolesnika s autoimunim bolestima.¹⁵¹ Za razliku od nas, *Bagaeva i sur.* su u svojoj studiji pokazali kako CSL CXCL13 može biti povišen z ADEM-u (na samo 1 pacijentu!), a isto su pokazali i *Fujimori i sur.* na 5 pacijenata s ADEM-om.^{122,144}

Djelomično usporediva s našom je studija koja je istraživala ulogu CXCL13 i uspoređivala je bolesnike s NB-om, ADEM-om i meningitisom/meningoencefalitisom. U usporedbi s NB, bolesnici s ADEM-om nisu imali povišen CXCL13 u CSL-u (CSL CXCL13 razine 0–574 pg/mL (medijan 61 pg/mL) i 0–2,030 pg/mL (medijan 207 pg/mL) što je u skladu i s našim rezultatima. U spomenutoj se studiji koncentracija CXCL13 u serumu nije razlikovala među grupama, dok je u našoj snižena serumska koncentracija CXCL13 (i CXCL10) verificirana u bolesnika s ADEM-om i NB.¹³⁸

Fujimori i sur. su u studiji na odraslim bolesnicima (5 AM koji su razvili ADEM, 8 AM i 8 ne-upalnih neuroloških bolesti (kontrola)) htjeli pronaći faktore za diskriminaciju AM i AM koji se razvije u ADEM u ranoj fazi bolesti. Istražili su 10 Th1/Th2 citokina (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A i IFN- γ) u CSL-u te kemokine IL-8 i CXCL13. Između ostalog su pronašli kako je likvorska koncentracija CXCL13 bila značajno viša u grupi ADEM nego u kontrola, ali ne i u AM u odnosu na kontrole te značajno povišena u grupi ADEM-a odnosu na AM. Odredili su čak i cut-off za CXCL13 koji bi diskriminirao AM od ADEM-a u ranoj fazi (za vrijednost 197.84 pg/ml ima 100% osjetljivost i specifičnost). Naši rezultati nisu potvrdili prethodne studije u kojima je koncentracija CXCL13 korelirala s brojem stanica i koncentracijom proteina u AM grupi te s koncentracijom proteina ali ne i brojem stanica u ADEM grupi. U našoj je studiji likvorska razina CXCL13 u AM i ADEM-u bila nedektabilna. U ovoj studiji nisu ispitivane serumske razine CXCL13 kao ni gradijent. Ovi su autori zaključili kako odrasli bolesnici koji imaju povišene koncentracije CXCL13 (i IL-12) u CSL-u mogu razviti ADEM, iako su se inicijalno prezentirali kao AM, te kako određivanje koncentracije CXCL13 može biti pogodno za prognozu ishoda AM.¹²²

Mi smo pokazali kako je u ispitanika oboljelih od NPEV AM koncentracija kemokina CXCL10 i CXCL11 viša u CSL-u nego u serumu, te kako oboljeli imaju mnogostruko viši CXCL10 u likvoru od kontrola (bez upalne bolesti SŽS-a) te malo viši CXCL11 u likvoru u odnosu na kontrole (za 16%). Također smo dokazali postojeći koncentracijski gradijent CSL/serum za oba kemokina (CXCL10 i CXCL11), no nismo uspjeli naći korelaciju između koncentracije kemokina ili koncentracijskog gradijenta i broja stanica u CSL-u oboljelih. Usporedili smo i serumske koncentracije navedenih kemokina i pokazali kako su u bolesnika s NPEV AM snižene serumske koncentracije CXCL10 i CXCL11 u odnosu na kontrole. Studija na bolesnicima dječje dobi koju su proveli *Asano i sur.* pokušala je dokazati da se profil citokina razlikuje u različitim virusnim meningitisima ovisno o uzročnom virusu te u odnosu na kontrole.

Pokazali su kako su IL-8, IL-10, IL-12, IL-13 i INF- γ bili statistički značajno viši kod bolesnika s meningitisom uzrokovanim virusom mumpsa te kako je povišen IFN- γ uočen u meningitisu uzrokovanim virusom mumpsa u odnosu na meningitis uzrokovan Echovirusom 30.¹²⁷ Povišena likvorska koncentracija CXCL10 utvrđena je u više studija koje su ispitivale kemokinski profil kod sindroma AM (Parvovirusni, EV, KME).^{112-113,152} Studija na bolesnicima s krpeljnim meningoencefalitisom (KME) utvrdila je da su CSL koncentracije CXCL10,11,12 i 13 bile malo više nego u serumu, a samo je koncentracija CXCL10 bila značajno viša. I u ovoj je studiji CXCL10, kao i u našoj, verificiran kao glavni kemokin uključen u patogenezu virusne infekcije SŽS-a. U istom su istraživanju pokazali i kako se koncentracije CXCL10 u CSL-u, CXCL13 u serumu i CXCL11 u CSL-u statistički značajno razlikuju u akutnoj i rekonvalescentnoj fazi KME. Koncentracije svih ispitivanih kemokina (CXCL10,11,12,13) su u CSL-u oboljelih bile više nego u kontrola, što djelomično potvrđuje naše rezultate (povišen samo CXCL10 i CXCL11 dok za CXCL13 nismo pronašli povišene vrijednosti kod NPEV AM u odnosu na kontrolnu skupinu). Zaključak studije je kako koncentracije CXCL10, CXCL11, CXCL12 i CXCL13 u CSL-u i CXCL10 i CXCL13 u serumu mogu biti dobri biomarkeri upale SŽS-a uzrokovane s virusom KME i jasno diskriminiraju pacijente oboljele od KME od kontrola te kako bi se likvorska vrijednost CXCL10 i serumska CXCL13 mogla upotrijebiti za monitoriranje oporavka.¹⁵³ U naših je bolesnika s AM koncentracija CXCL13 bila niska odnosno gotovo nemjerljiva i usporediva s koncentracijom u kontrola, kao i u studiji *Fujimori i sur.*¹²² Što se tiče bolesnika s NPEV AM, rezultati slični našima (iako nije ispitivana koncentracija CXCL13) dobiveni su u studiji provedenoj na skupini pedijatrijskih bolesnika oboljelih od NPEV AM.¹¹² Prema rezultatima ove studije, CXCL10 i CXCL11 pronađeni su u CSL-u oboljelih u višim koncentracijama u odnosu na koncentracije u serumu, što je sukladno našim rezultatima. U kontrolnoj skupini CXCL10 nije bio značajno povišen ni u CSL-u ni u serumu, dok je CXCL11 pokazivao drukčiji obrazac ekspresije (niže koncentracije u CSL-u u odnosu na serum).¹¹² Ovo je bila i prva studija koja je otkrila kako CSL djece s AM sadrži CXCL10 i CXCL11 te njihov koncentracijski gradijent prema plazmi. Taj gradijent je potreban za migraciju CXCR3 pozitivnih T-limfocita, a mi smo ga u našoj studiji potvrdili.¹¹² Rezultati slični našima mogu se pronaći i u studiji *Lepej i sur.* u oboljelih od KME.¹¹³ I u ovoj se studiji kemokini CXCL10 i CXCL11 detektiraju u povišenim koncentracijama u CSL-u oboljelih, a postojanje CXCR3 staničnog receptora i

kemokinskog gradijenta autori smatraju odgovornim za migraciju upalnih stanica u CSL.^{113,154} U studiji *Wang i sur.* u djece oboljele od EV71 encefalitisa je također pronađena viša koncentracija CXCL10 u CSL-u u odnosu na serumske koncentracije, kao i u našoj studiji.¹⁵⁵ Oni su ispitali koncentraciju CXCL10 i u usporedbi s težinom bolesti te pokazali kako serumske i likvorske koncentracije nekih citokina rastu s progresijom bolesti, za razliku od nekih drugih studija (na odraslim pacijentima s virusnim encefalitisom) koje to nisu uspjele dokazati.¹⁵⁶ No, suprotno nekim^{112-113,154} i našoj studiji, *Wang i sur.* nisu uočili koncentracijski gradijent CXCL10. S obzirom da EV71 uzrokuje multisistemsku bolest i nije ograničen na SŽS, moguće je da je to razlog nedostatka CSL/serum gradijenta i povišene serumske vrijednosti ovog kemokina u pacijenata s plućnim edemom kao komplikacijom EV71 infekcije.¹⁵⁵

Što se tiče serumskih koncentracija, suprotno našim rezultatima, studija koja je uključila bolesnike oboljele od KME-a je ukazala na značajno povišene serumske koncentracije CXCL10 i CXCL13 u usporedbi s kontrolama.¹⁵³

Više je studija pokazalo pozitivnu povezanost koncentracije CXCL10 i pleocitoze u virusnim upalnim bolestima SŽS-a, no osim one *Čavčić i sur.* niti jedna ne obuhvaća pedijatrijsku populaciju.^{122,157} Istraživanje slično našem proveli su *Lopes-Cortes*,¹⁵⁷ a nekoliko godina kasnije i *Lahrtz*,¹⁵² analizirajući koncentracije IL-8 u AM-u i akutnom bakterijskom meningitisu (ABM), ovisno o fazi bolesti. Autori studija slažu se kako u virusnom meningitisu IL-8 može biti dominantni kemokin samo u inicijalnoj fazi bolesti i tada broj neutrofila u CSL-u korelira s njegovom ekspresijom.¹¹² U našoj studiji, kao ni kod *Čavčić i sur.*, pleocitoza nije korelirala s koncentracijom CXCL10 ni CXCL11 pa je zaključeno kako težina lokalne upale i stupanj poremećaja KMB vjerojatno nemaju utjecaj na gradijent.¹¹²

Studije provedene u odraslih bolesnika oboljelih od MS također opisuju korelaciju pleocitoze s povišenom koncentracijom određenih kemokina. U ovom slučaju kemokini su izolirani kao glavni prediktori relapsa i remisije bolesti.^{141,158} U studiji *Mahada i sur.* CXCL10 je izoliran u višim, a CCL2 u nižim koncentracijama u CSL-u bolesnika s relapsom bolesti. Koncentracija CXCL10 je pozitivno korelirala ne samo s pleocitozom, već i s ekspresijom CXCR3 receptora na CD4+ T-limfocitima u CSL-u, te je tako još jednom dokazana važna uloga CXCR3 receptora u privlačenju stanica u CSL.¹⁵⁸ *Khademi i sur.* su dokazali korelaciju i koncentracije CXCL13 s brojem stanica u likvoru, aktivnošću bolesti i stupnjem progresije MS i stupnjem relapsa te

brojem lezija na MR-u, a isto je pronađeno i za NB, EBV encefalitis i HSV encefalitis.¹⁴⁰ Suprotno našim rezultatima, u studiji *Fujimori i sur.* je koncentracija CXCL13 korelirala s brojem stanica i koncentracijom proteina u odraslih bolesnika oboljelih od AM,¹²² dok je u drugim studijama (sukladnima našoj) koncentracija CXCL13 u CSL-u bila zanemarivo mala kod AM.¹²¹

NB je bolest s najvećim postotkom B-limfocita u CSL-u. Mnoge retrospektivne studije su ukazale na povišenu razinu CXCL13 u akutnoj NB u usporedbi sa drugim neurološkim bolestima.^{56, 61,138,159-161} Nije pronađena korelacija između koncentracije CXCL13 u CSL i serumu i mjera poremećaja KMB, što upućuje da je kemokin proizveden intratekalno.^{61,162} Spirohete invadiraju SŽS i induciraju produkciju CXCL13 u monocitima/makrofagima i dendritičkim stanicama što privlači aktivirane B-limfocite u CSL koje zatim potiču intratekalnu sintezu protutijela specifičnih za *B.burgdorferi*. Ovaj mehanizam objašnjava rani porast koncentracije CXCL13 u CSL-u u pacijenata kojima specifični AI još nije pozitivan.^{138,140}

Neke su studije čak pokazale kako je povišena koncentracija CXCL13 specifičniji marker za dijagnozu NB od AI.^{56,61} Druge su, pak, studije pokazale kako je CXCL13 povišen i u CSL-u nekih virusnih meningitisa i encefalitisa (EBV encefalitisu, HSV encefalitisu), kao i u neupalnim bolestima poput B-staničnog limfoma SŽS-a.^{140,163} Drugi su pronašli kako je CXCL13 u virusnih i bakterijskih meningitisa većinom ispod cut-offa (kao i mi u našoj studiji), dok maligni tumori SŽS-a, kriptokokni meningitis i kongenitalna toksoplazmoza mogu uzrokovati povišenje vrijednosti ovog kemokina u CSL-u.¹⁶⁴ CXCL13 je pronađen i u aktivnim MS lezijama, kao i u likvoru (ali ne i u serumu) bolesnika s CIS-om i MS-om, a korelira s aktivnošću bolesti, stupnjem progresije i relapsa MS te s brojem lezija na MR.¹⁵⁸ Koncentracija CXCL13 u CSL-u u NB brzo opada tijekom antibiotske terapije što ukazuje na eliminaciju stimulusa intratekalne proizvodnje ovog kemokina.⁵⁶ Najvjerojatnije nije slučajno da su dvije bolesti koje su najviše povezivane s CXCL13 (MS i NB) karakterizirane intratekalnom produkcijom protutijela.¹⁶⁵

Što se tiče naših pacijenata s NB, mi smo pokazali kako ovi pacijenti imaju nešto viši CXCL10 u CSL-u nego u serumu, kako imaju tek blago (za 33%) povišen CXCL13 u likvoru u odnosu na kontrole, te kako postoji blagi gradijent CSL/serum za CXCL10 i CXCL13. Serumske koncentracije CXCL10, CXCL11 i CXCL13 su bile snižene u odnosu na one u kontrolnoj skupini ispitanika. Povišene koncentracije CXCL10 i

CXCL13 u CSL-u su korelirale s pleocitozom u likvoru oboljelih pacijenata, kao i gradijent CSL/serum za CXCL10, ali ne i CXCL13. Iako je i u našoj studiji pronađena povišena koncentracija CXCL13 u CSL-u pacijenata s NB, moramo primijetiti kako nije tako impresivna kao u većini ostalih studija.^{120-122,129,138-139,160-161,164} Nema puno studija koje ispituju kemokine kod oboljelih od NB u pedijatrijskoj populaciji,^{121,129} ali sve izvještavaju o povišenoj vrijednosti CXCL13 u likvoru. *Sillanpää i sur.* su čak odredili prijelomnu (engl. „cut-off”) likvorsku koncentraciju ovog kemokina s visokom osjetljivosti i specifičnosti za postavljanje dijagnoze definitivne i moguće NB u dječjoj dobi.¹²⁹ Kada bismo ovu vrijednost CXCL13 upotrijebili za dijagnostiku naših bolesnika, u čak se osam bolesnika s NB (40% djece iz naše kohorte!) ne bi postavila ispravna dijagnoza na temelju navedene prijelomne vrijednosti. Rijetke su studije pokušale utvrditi koncentraciju drugih kemokina (osim CXCL13) u CSL-u u NB.^{154,166} Za razliku od naše studije, studija *Moniuszko i sur.* koja je ispitala koncentraciju CXCL8, CXCL10, CXCL11, CXCL12 i CXCL13 u serumu i likvoru odraslih bolesnika s NB je pokazala kako je CXCL10 u serumu ali ne i u likvoru bio viši u bolesnika s NB u odnosu na kontrole. Također je, suprotno našim zapažanjima, u ovoj studiji koncentracija CXCL11 u CSL-u u NB je bila cca 35x viša nego u kontrola i značajno je pala nakon liječenja. S našom se studijom podudara u rezultatima likvorske koncentracije CXCL13 koja je prije liječenja bila viša u oboljelih od NB u usporedbi s kontrolama gdje je bila nedektabilna. Mi nismo ispitali koncentracije nakon liječenja, a spomenuti autori nisu određivali gradijent CSL/serum ispitivanih citokina kao ni korelaciju s pleocitozom u likvoru.¹⁶⁶ *Lepej i sur.* su po prvi puta u svojoj studiji u odraslih bolesnika pokazali kako je CXCL10 bio statistički značajno viši u CSL-u bolesnika s NB (medijan 733.3 pg/ml) u odnosu na serumsku koncentraciju (medijan 155.4 pg/ml), što smo i mi u svojoj studiji potvrdili. U ovoj su studiji likvorske koncentracije CXCL10 bile statistički značajno više u NB u odnosu na kontrole. I razina CXCL11 je značajno povišena u CSL-u (medijan 17.3 pg/ml) u odnosu na serumsku koncentraciju (medijan 6.8 pg/ml) u NB, što mi nismo dokazali.¹⁵⁴ Dok su neke studije, poput naše, ukazale na korelaciju razine CXCL13 u likvoru i pleocitoze,¹⁶⁶ druge nisu uspjele dokazati tu povezanost.^{129,161} Studija *Lepej i sur.* nije, za razliku od naše, uspjela pokazati povezanost razine likvorskog CXCL10 i pleocitoze.¹⁵⁴ Što se tiče serumskih koncentracija, u našoj je studiji pronađena snižena koncentracija CXCL13, kao i u nekim studijama,¹⁶⁷ za razliku od većine drugih koje navode povišenu serumsku vrijednost CXCL13 u NB.^{121,159,166} Unatoč

tome se većina autora slaže kako serumska razina nije indikativna za aktivnu infekciju SŽS-a s borelijom poput likvorske razine CXCL13, a navodi se i da je serumska koncentracija CXCL13 moguće povišena u autoimunim bolestima poput lupusa i dermatomiozitisa i ne može biti upotrebljena kao marker NB.^{121,169} U studiji u odraslih bolesnika, serumske koncentracije citokina CXCL11 se nisu razlikovale među grupama (NB i kontrole), dok je serumski CXCL10 bio viši u bolesnika s NB, za razliku od naših rezultata koji su pokazali snižene serumske koncentracije oba citokina u bolesnika s NB.¹⁵⁴ U većini studija koje su ga ispitivale, pronađen je gradijent CSL/serum za CXCL13 (čak i do vrijednosti 143!) te je zaključeno kako je CXCL13 glavni kandidat za funkcionalnu ulogu privlačenja B-stanica u CSL u NB.^{160,170} Postojanje gradijenta CSL/serum za CXCL13 je potvrđen i u našoj studiji, iako u značajno manjoj mjeri, a mi smo, uz CXCL13, uočili i gradijent za CXCL10 koji je pokazan do sada samo u jednoj studiji i to na odraslim ispitanicima oboljelima od NB.¹⁵⁴ Za CXCL13 su u literaturi predloženi mnoge prijelomne vrijednosti koje bi s visokom osjetljivošću i specifičnošću diferencirali NB od ostalih bolesti SŽS-a. Predložene vrijednosti variraju od 15.6 pg/ml do 1,229 pg/mL.^{138,151,168} Razlike u koncentracijama između studija su objašnjene razlikama u analitičkom kitu koji je upotrebljen za analizu.¹⁵⁹⁻¹⁶⁰

Na tragu toga je studija *Hytönen i sur.*¹⁶¹ zaključila kako je CXCL13 izvrstan biomarker za diskriminaciju NB od virusnih infekcija SŽS-a i ostalih neuroupalnih zbivanja kad se upotrebljavaju lokalni "cut-offovi" – za razliku od naših rezultata koji nisu pokazali tako „impresivnu“ prevagu CXCL13 u bolesnika dječje dobi s NB u usporedbi s onima koji boluju od ADEM-a i AM.

Pretražujući opsežnu literaturu, kada je o pedijatrijskoj populaciji riječ, nisam pronašla studiju koja bi uspoređivala postojanje ovisnosti kemokinskih koncentracija sa spolom ili vremenom trajanja bolesti prije prijema u bolnicu. Mi smo primijetili kako je muški spol povezan s povišenom koncentracijom svih kemokina kao i povišenim gradijentom CSL/serum, što nije do sada opisano ni u jednoj studiji.¹⁴⁷ Dulje razdoblje od početka bolesti do hospitalizacije je u studiji u naših bolesnika bilo povezano s nižom koncentracijom svih kemokina kao i njihovim gradijentom, dok koncentracija kemokina nije bila povezana s trajanjem simptoma prije prijema u bolnicu u drugim radovima,^{140,163} osim u studiji *Senel i sur.*¹²⁰ u kojoj je kraće trajanje bolesti prije dijagnoze (manje od 8 dana) bilo povezano s višim vrijednostima CXCL13 u odnosu na one s duljim trajanjem bolesti. Ovaj podatak se može pokušati

objasniti činjenicom da se glavni upalni odgovor i ograničenje infekcije (privlačenje stanica u CSL) događa rano tijekom infekcije, a to je uzročno povezano i s višom koncentracijom kemokina koji sudjeluju u tim procesima. Također, Th1 citokini imaju kratki poluvijek pa ih je često teško dokazati, čime se možda djelomično mogu objasniti snižene koncentracije kemokina kod duljeg vremena proteklog do prijema, odnosno LP. Iako su potrebna daljnja istraživanja, s obzirom na navedeno, razina kemokina bi mogla poslužiti i kao marker trajanja bolesti.

U daljnjim smo analizama pokušali pronaći najbolji parametar za inicijalnu diskriminaciju djece oboljele od ADEM-a, NPEV AM i NB. Pokazali smo kako se ADEM od NB razlikuje po 4x manjem broju stanica u CSL-u kod inicijalne LP te minimalno nižoj likvorskoj koncentraciji CXCL13. NPEV AM se od NB može najbolje diskriminirati po čak 12x većem broju polimorfonukleara u citološkom nalazu CSL-a, 14x višoj koncentraciji CXCL10 i nešto višoj CXCL11 (17%) u CSL-u. U odnosu na NPEV AM, ADEM se razlikuje po 4x manjem broju stanica, 7x manjem broju polimorfonukleara, 12x nižoj koncentraciji CXCL10 i nešto nižoj (11%) koncentraciji CXCL11 u CSL-u. Logistička regresija je utvrdila kako je likvorska koncentracija CXCL10 najbolja za diskriminiranje NPEV AM u odnosu na ADEM i NB.

Utvrđena je granična vrijednost likvorske koncentracije CXCL10 od 5.64 µg/L koja uz osjetljivost od 95%, specifičnost 92.8%, PPV od 90.5% i NPV 96.3% pokazuje odlična dijagnostička svojstva u smislu „razlikovanja“ NPEV AM od ADEM/NB.

Ovo je, po našim saznanjima, prvi put da je netko opisao prijelomnu vrijednost citokina CXCL10 za razlikovanje ovih triju bolesti.

Kod ADEM-a, na osnovi dobivenih rezultata možemo zaključiti kako za vrijeme razvoja bolesti kemokin CXCL10 i vjerojatno (iako u manjoj mjeri) CXCL11 potiče migraciju upalnih stanica u SŽS (korelacija CXCL10 i CXCL11 gradijenta s brojem stanica). No, s obzirom na njihovu relativno malu koncentraciju u CSL-u oboljelih (u odnosu na kontrole), zasigurno pri tome procesu nisu jedini, a niti odlučujući čimbenik, već samo jedan od mehanizama uključenih u povećanje broja stanica u CSL-u oboljelih (druge mehanizme nismo ispitali). Također, podaci ukazuju da u patogenezi ADEM-a prevladava T-stanični odgovor, a velika varijabilnost koncentracija među ispitanicima iz ove skupine govori u prilog tome da je ADEM vjerojatno patogenetski heterogena bolest.

Na osnovi dobivenih rezultata možemo zaključiti kako CXCL10 i (u manjoj mjeri) CXCL11 sudjeluju u patogenezi NPEV AM (više koncentracije u odnosu na kontrole), a s obzirom na višu koncentraciju u CSL-u u odnosu na serum, pretpostavljamo da je većina kemokina sintetizirana intratekalno. Zanimljivo je što je kod NPEV AM bio izuzetno velik kemokinski gradijent CSL/serum za CXCL10 (i nešto manji za CXCL11), a nije pronađena korelacija s brojem stanica u CSL-u, pa uloga ovih citokina kao odlučujućih u migraciji stanica u CSL nije sa sigurnošću potvrđena. Također, s obzirom na navedeno, težina lokalne upale i stupanj poremećaja KMB vjerojatno nemaju utjecaj na gradijent.

U bolesnika s NB možemo zaključiti da kemokini CXCL10 i CXCL13 sudjeluju u patogenezi bolesti (CXCL10 viši u CSL-u nego u serumu oboljelih; CXCL13 viši u CSL-u nego kontrola, blagi gradijent CSL/serum za oba kemokina). Pretpostavljamo kako za vrijeme razvoja NB kemokini CXCL10 i CXCL13 potiču migraciju i akumulaciju T-(CXCL10) i B-(CXCL13) limfocita u SŽS (korelacija CXCL10 i CXCL13 kao i njihovog gradijenta CSL/serum s brojem stanica). Ovi podaci sugeriraju kako u patogenezi NB sudjeluju i Th1 i Th2 stanični citokini.

Varijabilnost koncentracije kemokina u CSL-u može biti rezultat različite sposobnosti zaraženog domaćina u stvaranju dostatnog imunološkog odgovora i/ili trajanja tog odgovora. Ako uzmemo u obzir kako je uloga kemokina u upalnim bolestima SŽS-a usmjeravanje stanica u CSL i eliminacija antigena, više koncentracije kemokina u likvoru možda mogu biti prediktor boljeg ishoda bolesti (što mi u ovoj studiji nismo ispitivali). Također, obzirom na dobivene rezultate, možemo zaključiti kako je funkcija ispitivanih kemokina u cjelokupnom razvoju i tijeku upalne bolesti SŽS-a više sinergistička nego odlučujuća.

Izrada disertacije započeta je s hipotezom da kemokini CXCL10 i/ili CXCL11 i/ili CXCL13, potiču migraciju imunoloških stanica u CSL kao odgovor na infekciju. S obzirom da se rezultati istraživanja u smislu koncentracija kemokina razlikuju u odnosu na kontrolnu skupinu, tj. da su zamijećene više koncentracije kemokina CXCL10 i CXCL11, kao i njihovih gradijenata u CSL-u oboljelih od NPEV AM te CXCL13 i gradijenta CXCL10 u oboljelih od NB, možemo pretpostaviti da ispitivani kemokini mogu utjecati na kemotaksiju, migraciju i akumulaciju upalnih stanica. Iako je kod ADEM-a postojala naznaka povišenih koncentracija CXCL10 i CXCL11 u

odnosu na kontrole, rezultati nisu postigli statističku značajnost, što potvrđuje da je etiologija ADEM-a heterogena i da patogenetski mehanizmi i uzroci nastanka tek moraju biti utvrđeni.

Ostaje nejasna činjenica zašto su koncentracije kemokina bile snižene u serumu svih bolesnika oboljelih od upalnih bolesti SŽS-a u odnosu na kontrolnu skupinu, te ovi rezultati zahtijevaju daljnja istraživanja.

7. ZAKLJUČCI

1. Upalne bolesti SŽS-a ispitivane u našoj studiji (ADEM, NPEV AM, NB) su često inicijalno nerazlučive na temelju kliničkih i laboratorijskih pretraga krvi i CSL-a.
2. CXCL10 i (u manjoj mjeri) CXCL11 sudjeluju u patogenezi NPEV AM (više koncentracije u likvoru u odnosu na kontrole), a s obzirom na višu koncentraciju u CSL u odnosu na serum, pretpostavljamo da je većina kemokina sintetizirana intratekalno. Ipak, unatoč izuzetno velikom kemokinskom gradijentu CSL/serum za CXCL10 (i nešto manjem za CXCL11), nije pronađena korelacija s brojem stanica u CSL-u, pa uloga ovih citokina kao odlučujućih u migraciji stanica u CSL nije sa sigurnošću utvrđena, a težina lokalne upale i stupanj poremećaja KMB vjerojatno nemaju značajan utjecaj na gradijent.
3. Podaci ukazuju da je tijekom razvoja ADEM-a moguće da kemokinski gradijent CXCL10 i CXCL11 sudjeluje u poticanju migracije upalnih stanica u SŽS (korelacija CSL koncentracije CXCL10 i gradijenta CSL/serum kemokina CXCL10 i CXCL11 s pleocitozom), no u tom procesu svakako nisu ni jedini, ni odlučujući čimbenik (razine kemokina u likvoru nisu značajno više nego u kontrola), već samo jedan od mehanizama. Ti „ostali“ mehanizmi u ovoj studiji nisu ispitivani. Velika varijabilnost koncentracija ispitivanih kemokina među ispitanicima iz ove skupine govori u prilog tome da je ADEM patogenetski heterogena bolest.
4. Kemokini CXCL10 i CXCL13 sudjeluju u patogenezi NB (CXCL10 viši u CSL-u nego u serumu oboljelih; CXCL13 viši u CSL-u nego kontrola, blagi CSL/serum gradijent za oba kemokina). Možemo zaključiti kako za vrijeme razvoja NB kemokini CXCL10 i CXCL13 sudjeluju u poticanju migracije i akumulacije upalnih stanica u SŽS (korelacija CXCL10 i CXCL13 kao i gradijenta s brojem stanica). Ovi podaci sugeriraju kako u patogenezi NB sudjeluju i Th1 i Th2 stanični citokini.

5. Serumska koncentracija kemokina bila je značajno snižena u grupama djece s upalnom bolesti SŽS-a u odnosu na kontrolnu skupinu koja nema upalnu bolest SŽS-a.
6. Ustanovljena je združenost povišene koncentracije svih triju ispitivanih kemokina i njihovog gradijenta CSL/serum s muškim spolom, što do sada nije opisano u literaturi.
7. Dulje trajanje bolesti do hospitalizacije je bilo združeno sa sniženom koncentracijom svih ispitivanih kemokina i njihovog gradijenta CSL/serum, što može poslužiti za buduća istraživanja koncentracije kemokina kao markera trajanja bolesti.
8. Citokini CXCL10, CXCL11 i CXCL13 sudjeluju u razvoju i tijeku upalnih bolesti SŽS-a.
9. Skupine djece s ispitivanim upalnim bolestima SŽS-a (ADEM, NPEV AM, NB) možemo međusobno razlikovati po navedenim laboratorijskim parametrima:
 - broju stanica u CSL-u: ADEM ima manji broj stanica od NPEV AM/NB
 - postotku polimorfonukleara u CSL-u: NPEV AM ima puno viši postotak u odnosu na ADEM/NB
 - koncentraciji CXCL10 i CXCL11 u CSL-u: NPEV AM ima višu u odnosu na ADEM/NB
10. Koncentracija CXCL10 u CSL-u pokazuje odlična dijagnostička svojstva u smislu „razlikovanja“ NPEV AM od ADEM/NB - cut-off CXCL10 od 5.64 µg/L ima osjetljivost od 95%, specifičnost 92.8%, PPV od 90.5% i NPV 96.3%

8. SAŽETAK

KEMOKINI CXCL10, CXCL11 i CXCL13 U ASEPTIČNOM MENINGITISU, NEUROBORELIOZI I AKUTNOM DISEMINIRANOM ENCEFALOMIJELITISU U DJECE

Cilj istraživanja: Glavni cilj studije je bio istražiti ulogu kemokina CXCL10, CXCL11 i CXCL13 u AM, NB i ADEM-u djece. Ispitali smo kliničke i laboratorijske osobitosti u bolesnika iz ovih skupina te ih usporedili međusobno i s istim u bolesnika bez upalne bolesti SŽS-a koji čine kontrolnu skupinu. Također smo pokušali utvrditi povezanost kemokinskog odgovora u krvi i likvoru, odredili smo profil kemokina i analizirali postojeći kemokinski gradijent te ga usporedili među grupama ispitanika. Pokušali smo utvrditi laboratorijski parametar i/ili koncentraciju kemokina koja je najbolji laboratorijski biljeg za inicijalno razlikovanje i postavljanje dijagnoze navedenih bolesti, s obzirom da su ovi bolesnici često inicijalno nerazlučivi na temelju kliničkih te laboratorijskih pretraga krvi i CSL-a.

Ispitanici i metode:

Istraživanje je kreirano kao presječna („cross-sectional“) studija koja obuhvaća analizu anamnestičkih, kliničkih i laboratorijskih karakteristika bolesnika s ADEM-om, AM uzrokovanim NPEV i NB-om te kontrolne skupine (upalna bolest SŽS-a isključena na temelju urednog citološkog, biokemijskog i mikrobiološkog nalaza CSL-a). U studiju je uključeno 84 bolesnika: 23 iz skupine ADEM, 20 bolesnika s dokazanim NPEV AM, 21 oboljelih od NB te 20 kontrolnih bolesnika. Svi su bolesnici dječje dobi, a liječeni su u Klinici za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević” u Zagrebu u razdoblju od 1.1.2009.-31.12.2014. god. Etiološka dijagnoza NPEV AM dokazana je detekcijom enterovirusne RNK u CSL-u PCR metodom. U skupinu oboljelih od NB smo uključili pacijente koji prema smjernicama *European Federation of Neurological Societies* zadovoljavaju kriterije za sigurnu, odnosno vjerojatnu dijagnozu NB. U svih je bolesnika rabljena serološka metoda kemiluminiscencije za dokaz serumskih i likvorskih protutijela na *Borrelia burgdorferi*; svi reaktivni rezultati u serumu potvrđeni su Western blot-om. Dijagnoza ADEM-a je postavljena prema međunarodnom konsenzusu iz 2007. uz

isključenje mogućih infektivnih uzročnika bolesti. Koncentracija kemokina u CSL-u i serumu određena je standardiziranim kvantitativnim enzimskim imunotestovima. U statističkoj analizi korištene su uobičajene statističke metode, a učinjeni su univarijatni i multivarijatni testovi s podešenjima varijabli.

Rezultati: Utvrđeno je da bolesnici s NPEV AM i NB imaju višu likvorsku koncentraciju CXCL10 u odnosu na koncentraciju u serumu. Kod NPEV AM je i koncentracija CXCL11 bila nešto viša nego u serumu, dok kod ADEM-a nije pronađeno značajno povišenje koncentracije ni jednog likvorskog kemokina. U usporedbi s kontrolama (bez upalne bolesti SŽS-a), bolesnici s NPEV AM su imali mnogostruko viši CXCL10 i nešto viši CXCL11, a bolesnici s NB nešto višu likvorsku koncentraciju CXCL13. Gradijent CSL/serum za CXCL10 i CXCL11 je utvrđen u bolesnika s NPEV AM, dok je u bolesnika s NB uočen blagi gradijent za CXCL10 i CXCL13. Korelacija povišene koncentracije kemokina i pleocitoze u likvoru je uočena u bolesnika s ADEM-om (za CXCL10) i NB-om (za CXCL10 i CXCL13). Kod istih je dijagnoza uočena korelacija i pleocitoze s gradijentom CSL/serum, i to za CXCL10 i CXCL11 u ADEM-u i CXCL10 u NB. U bolesnika s NPEV AM nije uočena združenost koncentracije kemokina kao ni koncentracijskog gradijenta s brojem stanica. Serumske koncentracije svih ispitivanih kemokina su bile snižene u skupini bolesnika u odnosu na kontrole (CXCL10 i CXCL13 kod ADEM-a, CXCL10 i CXCL11 kod NPEV AM, CXCL10, CXCL11 i CXCL13 kod NB).

Koncentracije svih kemokina kao i njihov gradijent su bili povišeni u ispitanika muškog spola. Također, dulje trajanje bolesti do hospitalizacije je koreliralo sa sniženom koncentracijom svih kemokina i njihovim gradijentom.

Uspoređujući skupine bolesnika međusobno, pokazali smo kako se ADEM od NB razlikuje po 4x manjem broju stanica u CSL-u kod inicijalne LP te vrlo blago sniženoj koncentraciji CXCL13. NPEV AM se od NB može najbolje diskriminirati po čak 12x većem broju polimorfonukleara, 14x višoj koncentraciji CXCL10 i malo višoj CXCL11 (17%) u CSL-u.

U odnosu na NPEV AM se ADEM razlikuje po 4x manjem broju stanica, 7x manjem broju polimorfonukleara, 12x nižoj koncentraciji CXCL10 i nešto nižoj (11%) koncentraciji CXCL11.

Logistička regresija je utvrdila kako je likvorska koncentracija CXCL10 najbolja za diskriminiranje NPEV AM u odnosu na ADEM i NB. Utvrđena je i granična vrijednost

ovog kemokina od 5.64 µg/L koja uz osjetljivost od 95%, specifičnost 92.8%, PPV od 90.5% i NPV 96.3% pokazuje odlična dijagnostička diskriminativna svojstva u smislu „razlikovanja“ NPEV AM od ADEM/NB.

Zaključak: Upalne bolesti SŽS-a inicijalno se često prezentiraju preklapajućom simptomatologijom i usporedivim laboratorijskim parametrima te je od izrazitog značaja njihovo brzo etiološko razvrstavanje. Za vrijeme razvoja ADEM-a kemokin CXCL10 i vjerojatno (iako u manjoj mjeri) CXCL11 potiče migraciju upalnih stanica u SŽS. No, zasigurno pri tome procesu nije ni jedini ni odlučujući faktor, već samo jedan od mehanizama uključenih u povećanje broja stanica u CSL-u oboljelih. Možemo zaključiti kako CXCL10 i (u manjoj mjeri) CXCL11 sudjeluju u patogenezi NPEV AM, a pretpostavljamo da je većina kemokina sintetizirana intratekalno. Uloga ovih citokina kao odlučujućih u migraciji stanica u CSL nije sa sigurnošću potvrđena, a težina lokalne upale i stupanj poremećaja KMB vjerojatno nemaju utjecaj na gradijent. Kod bolesnika s NB možemo pretpostaviti kako u patogenezi sudjeluju i Th1 i Th2 stanični citokini (CXCL10 i CXCL13), vjerojatno potičući migraciju i akumulaciju T i B-limfocita u SŽS. Ispitivani kemokini su samo jedan od mnoštva faktora koji, u obliku lokalnog imunološkog odgovora, utječu na migraciju upalnih stanica u SŽS I tako sudjeluju u povećanju broja stanica u CSL-u oboljelih.

9. SUMMARY

CHEMOKINES CXCL10, CXCL11 AND CXCL13 IN ASEPTIC MENINGITIS, NEUROBORRELIOSIS AND ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN CHILDREN

Lorna Stemberger Marić

PhD Thesis 2017.

Aim: To define the role of CXCL10, CXCL11 and CXCL13 and CSF/serum chemokine concentration gradient in NPEV AM, NB and ADEM in children and to find laboratory marker or a cut-off concentration of specific chemokine to differentiate between these groups.

Patients and methods: Study included 84 pediatric patients; 23 with ADEM, 20 with NPEV AM, 21 with NB and 20 controls (CNS infection excluded).

Results: CXCL10 and CXCL11 concentrations in CSF of children with NPEV AM were higher from serum values and when compared to control group. CSF CXCL10 and CXCL13 were higher in patients with NB. CSF/serum gradient of CXCL10 and CXCL11 in NPEV AM and CXCL10 and CXCL13 in NB was determined. Positive correlation was found between CSF CXCL10 and CXCL13 concentration and CXCL10 CSF/plasma gradient and CSF pleocytosis in NB, as well as CSF CXCL10 concentration and CXCL10 and CXCL11 CSF/plasma gradient in ADEM. Serum concentrations of chemokines were lower in patients with CNS involvement. Males were shown to had higher concentrations and CSF/serum gradient of all chemokines. Longer preadmission period was associated with lower chemokines level. ADEM patients had lower CSF cell count number. Higher amount of polymorphonuclears and elevated level of CXCL10 and CXCL11 was found in CSF of NPEV AM patients. CSF CXCL10 cut-off level of 5.64 µg/L was determined as excellent in discrimination between these groups of patients.

Conclusion: Chemokines CXCL10, CXCL11 and CXCL13 participate in pathogenesis of NPEV AM, NB and ADEM in children. Most prominent correlation was found between CXCL10 and NPEV AM. The existence of chemokine CSF/plasma gradient is one of many factors involved in the recruitment of T and B-cells into the CNS.

10. LITERATURA

1. 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.
2. Tešović G. Prospektivna studija neurovirulencije cjepnog soja mumpsa L-Zagreb (disertacija). Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu: 2006. str. 32-35.
3. Kumar R. Aseptic meningitis: Diagnosis and management. *Indian J Pediatr* 2005;72:57-63.
4. The Pirbright Institute, UK. The Picornavirus pages. Enterovirus. <http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>
5. Rotbart HA. Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis* 1995;20:971-81.
6. Borčić B, Dobrovšak-Šourek V. Utjecaj obveznog cijepljenja na pobol od određenih zaraznih bolesti. *Paediatr Croat* 1998;42:1-3.
7. Tešović G. Virusna cjepiva - stanje u Hrvatskoj početkom 2005. godine. *Paediatr Croat* 2005;49:171-8.
8. 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.
9. Huang YP, Lin TL, Hsu LC, i sur. Genetic diversity and C2-like subgenogroup strains of enterovirus 71, Taiwan, 2008. *Virology* 2010;7:277.
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. Rhoades RE, Tabor-Godwin JM, Tsueng G, Feuer R. Enterovirus infections of the central nervous system. *Virology* 2011;411:288-305.
12. Lo CW, Wu KG, Lin MC, Chen CJ, Ho DM, Tang RB, 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.
13. Ooi MH, Wong CS, Lewthwaite P, Cardosa MJ, Solomon T. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *Lancet Neurol* 2010;11:1097-105.

14. 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. *Viol J* 2011;8:306.
15. Kargar M, Sadeghipour S, Nategh R. Environmental surveillance of Non-Polio Enteroviruses in Iran. *Viol J* 2009;6:149.
16. Sawyer MH. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002;13:40-7.
17. 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.
18. Rittichier KR, Bryan PA, Bassett KE, Taggart EW, Enriquez FR, Hillyard DR, i sur. Diagnosis and outcomes of enterovirus infections in young infants. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:546-50.
19. Dalwai A, Ahmad S, Al-Nakib W. Echoviruses are a major cause of aseptic meningitis in infants and young children in Kuwait. *Viol J* 2010;7:236.
20. Rorabaugh ML, Berlin LE, Heldrich F, Roberts K, Rosenberg LA, Doran T, i sur. Aseptic meningitis in infants younger than 2 years of age. Acute illness and neurologic complications. *Pediatrics* 1993;92:206-11.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Abzug MJ. Nonpolio Enteroviruses. U: Kliegman RM, Behrman R, Jenson HB, Stanton BF. Nelson Textbook of Pediatric, 18. izd. Philadelphia: Saunders; 2007. str. 1350-6.
25. 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.

26. Huang CC, Liu CC, Chang YC, Chen CY, Wang ST, Yeh TF. Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection. *N Engl J Med* 1999;341:936-42.
27. 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.
28. Negrini B, Kelleher KJ, Wald ER. Cerebrospinal fluid findings in aseptic versus bacterial meningitis. *Pediatrics* 2000;105:316-9.
29. Hosoya M, Sato M, Honzumi K, Katayose M, Sakuma H, Ishiko H, 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:S27-38.
30. 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.
31. Seme K, Mocilnik T, Komlos KF, Dopljhar A, Persing DH, Poljak M. GeneXpert enterovirus assay: one-year experience in a routine laboratory setting and evaluation on three proficiency panels. *J Clin Microbiol* 2008;46:1510-3.
32. 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.
33. Somekh E, Cesar K, Handsher R, Hanukoglu A, Dalal I, Ballin A, i sur. An outbreak of echovirus 13 meningitis in central Israel. *Epidemiol Infect* 2003;130:257-62.
34. 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.
35. Steiner I, Budka H, Chaudhuri A, Koskiniemi M, Sainio K, Salonen O, Kennedy PG. Viral meningoencephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management. *Eur J Neurol* 2010;17:999-57.
36. Lee MS, Chang LY. Development of enterovirus 71 vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2010;9:149-56.
37. Rotbart HA, Webster AD. Pleconaril Treatment Registry Group. Treatment of potentially life threatening enterovirus infections with pleconaril. *Clin Infect Dis* 2001;32:228-35.

38. Kung YA, Hung CT, Liu YC, Shih SR. Update on the development of enterovirus 71 vaccines. *Expert Opin Biol Ther* 2014;14:1455-64.
39. Wilske B. Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. *Ann Med* 2005;37:568-79.
40. Földvári G, Farkas R, Lakos A. *Borrelia spielmanii* erythema migrans, Hungary. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1794-5.
41. Richter D, Schlee DB, Allgöwer R, Matuschka FR. Relationships of a Novel Lyme Disease Spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with Its Hosts in Central Europe. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:6414-9.
42. Rudenko N, Golovchenko M, Ruzek D, Piskunova N, Mallatova N, Grubhoffer L. Molecular detection of *Borrelia bissettii* DNA in serum samples from patients in the Czech Republic with suspected borreliosis. *FEMS Microbiol Lett* 2009;292:274-81.
43. Rudenko N, Golovchenko M, Mokráček A, Piskunová N, Ružek D, Mallatová N, i sur. Detection of *Borrelia bissettii* in Cardiac Valve Tissue of a Patient with Endocarditis and Aortic Valve Stenosis in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 2008;46:3540-3.
44. Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schäfer SM, Vitorino L, i sur. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol* 2004;42:1316-8.
45. Yoshinari NH, Oyafuso LK, Monteiro FG, de Barros PJ, da Cruz FC, Ferreira LG, i sur. Lyme disease. Report of a case observed in Brazil. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1993;48:170-4.
46. Jowi JO, Gathua SN. Lyme disease: report of two cases. *East Afr Med J* 2005;82:267-9.
47. Lindgren L, Tälleklint L, Polfeldt T. Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ Health Perspect* 2000;108:119-23.
48. Piesman J. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* transmission by nymphal *Ixodes dammini* ticks. *J Infect Dis* 1993;167:1082-5.
49. Sood SK, Salzman MB, Johnson BJ, Happ CM, Feig K, Carmody L, i sur. Duration of tick attachment as a predictor of the risk of Lyme disease in an area in which Lyme disease is endemic. *J Infect Dis* 1997;175:996-9.

50. Golubić D. Epidemiološke, ekološke i kliničke karakteristike Lyme borelioze u sjeverozapadnoj Hrvatskoj (disertacija). Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 1997. str. 130.
51. Nahimana I, Gern L, Blanc DS, Praz G, Francioli P, Péter O. Risk of *Borrelia burgdorferi* infection in western Switzerland following a tick bite. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:603-8.
52. Patey O. Lyme disease: prophylaxis after tick bite. *Med Mal Infect* 2007;37:446-55.
53. Nadelman RB, Nowakowski J, Fish D, Falco RC, Freeman K, McKenna D, i sur. Prophylaxis with Single-Dose Doxycycline for the Prevention of Lyme Disease after an *Ixodes scapularis* Tick Bite. *N Engl J Med* 2001;345:79-84.
54. Khasnis AA, Nettleman MD. Global warming and infectious disease. *Arch Med Res* 2005;36:689-96.
55. Stewart PE, Wang X, Bueschel DM, Clifton DR, Grimm D, Tilly K, i sur. Delineating the Requirement for the *Borrelia burgdorferi* Virulence Factor OspC in the Mammalian Host. *Infect Immun* 2006;74:3547-53.
56. Rupprecht TA, Koedel U, Fingerle V, Pfister HW. The Pathogenesis of Lyme Neuroborreliosis: From Infection to Inflammation. *Mol Med* 2008;14:205-12.
57. Hallstrom T, Haupt K, Kraiczy P, Hortschansky P, Wallich R, Skerka C, i sur. Complement regulator-acquiring surface protein 1 of *Borrelia burgdorferi* binds to human bone morphogenic protein 2, several extracellular matrix proteins, and plasminogen. *J Infect Dis* 2010;202:490-8.
58. Coburn J. Adhesion mechanisms of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2001;1:171-9.
59. Christen HJ, Bartlau N, Hanefeld F, Eiffert H, Thomssen R. Peripheral facial palsy in childhood-Lyme borreliosis to be suspected unless proven otherwise. *Acta Paediatr Scand* 1990;79:1219-24.
60. Rupprecht TA, Koedel U, Angele B, Fingerle V, Pfister HW. Cytokine CXCL13- a possible early CSF marker for neuroborreliosis. *Nervenarzt* 2006;77:470-3.
61. Ljøstad U, Mygland A. CSF B-lymphocyte chemoattractant (CXCL13) in the early diagnosis of acute Lyme neuroborreliosis. *J Neurol* 2008;255:732-7.
62. Øymar K, Tveitnes D. Clinical characteristics of childhood Lyme neuroborreliosis in an endemic area of northern Europe. *Scand J Infect Dis* 2009;41:88-94.

63. Broekhuijsen-van Henten DM, Braun KP, Wolfs TF. Clinical presentation of childhood neuroborreliosis; neurological examination may be normal. *Arch Dis Child* 2010;95:910-4.
64. Christen HJ, Hanefeld F, Eiffert H, Thomssen R. Epidemiology and clinical manifestations of Lyme borreliosis in childhood. A prospective multicentre study with special regard to neuroborreliosis. *Acta Paediatr Suppl* 1993;386:1-75.
65. Mygland A, Ljøstad U, Fingerle V, Rupprecht T, Schmutzhard E, Steiner I; European Federation of Neurological Societies. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *Eur J Neurol* 2010;17:8-16.
66. Christen HJ. Lyme neuroborreliosis in children. *Ann Med* 1996;28:235-40.
67. Kaciński M, Zajac A, Skowronek-Bała B, Krocza S, Gergont A, Kubik A. CNS Lyme disease manifestation in children. *Przegl Lek* 2007;64:38-40.
68. Tuerlinckx D, Glupczynski Y. Lyme neuroborreliosis in children. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010;8:455-63.
69. Engervall K, Carlsson-Nordlander B, Hederstedt B, Berggren D, Bjerkhoel A, Carlborg A, i sur. Borreliosis as a cause of peripheral facial palsy: a multi-center study. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1995;57:202-6.
70. López-Alberola RF. Neuroborreliosis and the pediatric population: a review. *Rev Neurol* 2006;42:91-6.
71. Skogman BH, Croner S, Nordwall M, Eknefelt M, Ernerudh J, Forsberg P. Lyme neuroborreliosis in children: a prospective study of clinical features, prognosis, and outcome. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:1089-94.
72. Skogman BH, Glimåker K, Nordwall M, Vrethem M, Ödkvist L, Forsberg P. Long-term clinical outcome after Lyme neuroborreliosis in childhood. *Pediatrics* 2012;130:262-9.
73. Đaković-Rode O, Židovec-Lepej S, Maretić T. Poteškoće u dijagnostici neuroborelioze. *Infektol Glas* 2006;26:55-60.
74. Vladošić Lucić I, Benić B. Neuroborelioza. *Paediatr Croat* 2011;55:67-74.
75. American Academy of Pediatrics. Lyme disease. U: Pickering LK, Baker CJ, Long SS i sur., ur. *Red Book: 2006 Report of the Committee on Infectious Diseases*. 27. izd. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2006. str. 428-33.
76. Tenenbaum S, Chitnis T, Ness J, Hahn JS. International Pediatric MS Study Group. Acute disseminated encephalomyelitis. *Neurology* 2007;68:23-36.

77. Huynh W, Cordato DJ, Kehdi E, Masters LT, Dedousis C. Post-vaccination encephalomyelitis: Literature review and illustrative case. *J Clin Neurosci* 2008;15:1315-22.
78. Dale RC, Brilot F, Banwell B. Pediatric central nervous system inflammatory demyelination: acute disseminated encephalomyelitis, clinically isolated syndromes, neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2009;22:233-240.
79. Krupp LB, Banwell B, Tenenbaum S; International Pediatric MS Study Group. Consensus definitions proposed for pediatric multiple sclerosis and related disorders. *Neurology* 2007;68:7-12.
80. Noorbaksh F, Johnson RT, Emery D, Power C. Acute Disseminated Encephalomyelitis: Clinical and Pathogenesis features. *Neurol Clin* 2008;26:759–80.
81. Francis GS, Deguet P, Antel JP. Inflammatory demyelinating disease of the central nervous system. U: Bradely WG, Daroff RB, Fenichel GM, ur. *Neurology in Clinical Practice*. 3.izd. Boston: Butterworth Heinemann; 1995. str. 1307–43.
82. Murthy SK, Faden HS, Cohen ME, Bakshi R. Acute disseminated encephalomyelitis in children. *Pediatrics* 2002;110:e21.
83. Sakakibara R, Hattori T, Yasuda K, Yamanishi T. Micturitional disturbance in acute disseminated encephalomyelitis (ADEM). *J Auton Nerv Syst* 1996;60:200–5.
84. Sejvar JJ, Kohl KS, Bilynsky R, Blumberg D, Cvetkovich T, Galama J, i sur. Encephalitis, myelitis, and acute disseminated encephalomyelitis (ADEM): case definitions and guide-lines for collection, analysis, and presentation of immunisation safety data. *Vaccine* 2007;25:5771–92.
85. CHAMPS Study Group. MRI predictors of early conversion to clinically definite MS in the CHAMPS placebo group. *Neurology* 2002;59:998–1005.
86. Čulo F. Citokini i kemokini. U: Andreis I. i sur. *Imunologija*. 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 122-141.
87. Taradi M. Pregled imunosti. U: Andreis I. i sur. *Imunologija*, 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 2-17.
88. 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.
89. Luster AD. The role of chemokines in linking innate and addaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2002;14:129-135.

90. 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.
91. Bonecchi R, Galliera E, Borroni EM, Corsi MM, Locati M, Mantovani A. Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Front Biosci* 2009;14:540-51.
92. Sallusto F, Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nat Immunol* 2008;9:949-52.
93. Proudfoot AE. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2002;2:106-15.
94. Mantovani A, Bonecchi R, Locati M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol* 2006;6:907-18.
95. R&D Systems, Inc. Quantikine®ELISA. Human CXCL10/IP-10 Immunoassay: Catalog Number DIP100, SIP100, PDIP100, 2012. https://www.rndsystems.com/products/human-cxcl10-ip-10-quantikine-elisa-kit_dip100
96. R&D Systems, Inc. Quantikine®ELISA. Human CXCL11/I-TAC Immunoassay: Catalog Number DCX110,2016. <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dcx110.pdf>
97. R&D Systems, Inc. Quantikine®ELISA. Human CXCL13/BLC/BCA-1 Immunoassay: Catalog Number DCX130, 2016. <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dcx130.pdf>
98. Čulo F, Višnjić D. Stanična imunost. U: Andreis i sur. *Imunologija*, 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 224-237.
99. Marušić M, Grčević D. Međudjelovanje imunskih stanica. U: Andreis i sur. *Imunologija*. 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 190-207.
100. Lyck R, Engelhardt B. Going against the tide--how encephalitogenic T cells breach the blood-brain barrier. *J Vasc Res* 2012;49:497-509.
101. Engelhardt B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm* 2006;113:477-485.
102. Hesselgesser J, Horuk R. Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *J Neurovirol* 1999;5:13-26.
103. 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.

104. Schluger NW, Rom WN. Early responses to infection: chemokines as mediators of inflammation. *Cur Opin Immunol* 1997;9:504-8.
105. Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Schettini G. Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *J Neurochem* 2002;82:1311-29.
106. Cardona SM, Garcia JA, Cardona AE. The fine balance of chemokines during disease: trafficking, inflammation, and homeostasis. *Methods Mol Biol* 2013;1013:1-16.
107. Ubogu EE, Cossoy MB, Ransohoff RM. The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:48-55.
108. Hosking MP, Lane TE. The role of chemokines during viral infection of the CNS. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000937.
109. Savarin C, Bergmann CC. Neuroimmunology of central nervous system viral infections: the cells, molecules and mechanisms involved. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:472-9.
110. Man S, Ubogu EE, Ransohoff RM. Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. *Brain Pathol* 2007;17:243-50.
111. Ramesh G, MacLean AG, Philipp MT. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators Inflamm* 2013;2013:480739.
112. 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.
113. Lepej SŽ, Mišić-Majerus L, Jeren T, Rode OD, Remenar A, Šporec V, i sur. Chemokines CXCL10 and CXCL11 in the cerebrospinal fluid of patients with tick-borne encephalitis. *Acta Neurol Scand* 2007;115:109-14.
114. Mikaeloff Y, Suissa S, Vallée L, Lubetzki C, Ponsot G, Confavreux C, i sur. First episode of acute CNS inflammatory demyelination in childhood: prognostic factors for multiple sclerosis and disability. *J Pediatr* 2004;144:246-52.
115. Tenenbaum SN. Acute disseminated encephalomyelitis. *Handb Clin Neurol* 2013;112:1253-62.
116. Jayakrishnan MP, Krishnakumar P. Clinical profile of acute disseminated encephalomyelitis in children. *J Pediatr Neurosci* 2010;5:111-4.

117. Leake JA, Albani S, Kao AS, Senac MO, Billman GF, Nespeca MP, i sur. Acute disseminated encephalomyelitis in childhood: epidemiologic, clinical and laboratory features. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:756-64.
118. Hamlen RA, Kliman DS. Lyme Disease: Etiology, Neuropsychological Sequelae and Educational Impact. *Newspaper of the National Association of School Psychologists*, 2007, 34-36.
119. Skogman B. Neuroborreliosis in Childhood: Clinical, Immunological and Diagnostic Aspects. *Linköping University Medical Dissertations No. 1048*.
120. Senel M, Rupprecht TA, Tumani H, Pfister HW, Ludolph AC, Brettschneider J. The chemokine CXCL13 in acute neuroborreliosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:929-33.
121. Wutte N, Berghold A, Löffler S, Zenz W, Daghofer E, Krainberger I, i sur. CXCL13 chemokine in pediatric and adult neuroborreliosis. *Acta Neurol Scand*. 2011;124:321-8.
122. Fujimori J, Nakashima I, Kuroda H, Fujihara K, Aoki M. Cerebrospinal fluid CXCL13 is a prognostic marker for aseptic meningitis. *J Neuroimmunol* 2014;15;273:77-84.
123. Sonnevile R, Klein IF, Wolff M. Update on investigation and management of postinfectious encephalitis. *Curr Opin Neurol* 2010;23:300-4.
124. Calin R, Hristea A, Tanasescu R. Central Nervous System Involvement in Lyme Disease – Making the Diagnosis and Choosing the Correct Treatment. U: Tanasescu R, ur. *Miscellanea on Encephalopathies*. InTech, 2012. <http://www.intechopen.com/books/miscellanea-on-encephalopathies/central-nervous-system-involvement-in-lyme-disease-making-the-diagnosis-and-choosing-the-correct-tre>
125. Adams WV, Rose CD, Eppes SC, Klein JD. Long-term cognitive effects of Lyme disease in children. *Appl Neuropsychol* 1999;6:39-45.
126. Vázquez M, Sparrow SS, Shapiro ED. Long-term neuropsychologic and health outcomes of children with facial nerve palsy attributable to Lyme disease. *Pediatrics* 2003;112:e93-7.
127. Asano T, Ichiki K, Koizumi S, Kaizu K, Hatori T, Fujino O, i sur. Enhanced expression of cytokines/chemokines in cerebrospinal fluids in mumps meningitis in children. *Pediatr Int* 2011;53:143-6.

128. Sonnevile R, Klein IF, Wolff M. Update on investigation and management of postinfectious encephalitis. *Curr Opin Neurol* 2010, 23:300–304.
129. Sillanpää H, Skogman BH, Sarvas H, Seppälä IJ, Lahdenne P. Cerebrospinal fluid chemokine CXCL13 in the diagnosis of neuroborreliosis in children. *Scand J Infect Dis* 2013;45:526-30.
130. 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.
131. Tsai ML, Chen WC, Wang YC, Hung KL. Cerebrospinal fluid interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor- α in children with central nervous system infections. *Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi*. 1996;37:16-21.
132. Dubos F, Moulin F, Gendrel D, Bréart G, Chalumeau M. Distinguishing between bacterial and aseptic meningitis in children in the emergency department. *Arch Pediatr* 2008;15:724-5.
133. Szczuciński A, Losy J. Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies. *Acta Neurol Scand* 2007;115:137-46.
134. Christensen JE, de Lemos C, Moos T, Christensen JP, Thomsen AR. CXCL10 is the key ligand for CXCR3 on CD8+ effector T cells involved in immune surveillance of the lymphocytic choriomeningitis virus-infected central nervous system. *J Immunol* 2006;176:4235-43.
135. Klein RS, Izikson L, Means T, Gibson HD, Lin E, Sobel RA, i sur. IFN-inducible protein 10/CXC chemokine ligand 10-independent induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2004;172:550-9.
136. Li F, Wang Y, Yu L, Cao S, Wang K, Yuan J, i sur. Viral Infection of the Central Nervous System and Neuroinflammation Precede Blood-Brain Barrier Disruption during Japanese Encephalitis Virus Infection. *J Virol* 2015;89:5602-14.
137. McColl SR, Mahalingam S, Staykova M, Tylaska LA, Fisher KE, Strick CA, i sur. Expression of rat I-TAC/CXCL11/SCYA11 during central nervous system inflammation: comparison with other CXCR3 ligands. *Lab Invest* 2004;84:1418-29.
138. Schmidt C, Plate A, Angele B, Pfister HW, Wick M, Koedel U, i sur. A prospective study on the role of CXCL13 in Lyme neuroborreliosis. *Neurology* 2011;76:1051-8.

139. Sellebjerg F, Bornsen L, Khademi M, Krakauer M, Olsson T, Frederiksen JL, i sur. Increased cerebrospinal fluid concentrations of the chemokine CXCL13 in active MS. *Neurology* 2009;73:2003-10.
140. Khademi M, Kockum I, Andersson ML, Iacobaeus E, Brundin L, Sellebjerg F, i sur. Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course. *Mult Scler* 2011;17:335-43.
141. Krumbholz M, Theil D, Cepok S, Hemmer B, Kivisakk P, Ransohoff RM i sur. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain* 2006;129:200-11.
142. Klimatcheva E, Pandina T, Reilly C, Torno S, Bussler H, Scrivens M, i sur. CXCL13 antibody for the treatment of autoimmune disorders. *BMC Immunol.* 2015;12;16:6.
143. Aloisi F, Columba-Cabezas S, Franciotta D, Rosicarelli B, Magliozzi R, Reynolds R, i sur. Lymphoid chemokines in chronic neuroinflammation. *J Neuroimmunol* 2008;198:106-12.
144. Bagaeva LV, Rao P, Powers JM, Segal BM. CXC chemokine ligand 13 plays a role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006;176:7676-85.
145. Garg RK. Acute disseminated encephalomyelitis. *Postgrad Med J* 2003;79:11-7.
146. Dale RC, Morovat A. Interleukin-6 and oligoclonal IgG synthesis in children with acute disseminated encephalomyelitis. *Neuropediatrics* 2003;34:141-5.
147. Ishizu T, Minohara M, Ichiyama T, Kira R, Tanaka M, Osoegawa M, Hara T, Furukawa S, Kira J. CSF cytokine and chemokine profiles in acute disseminated encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2006;175:52-8.
148. Ichiyama T, Shoji H, Kato M, Sawaishi Y, Ozawa H, Matsubara T, i sur. Cerebrospinal fluid levels of cytokines and soluble tumour necrosis factor receptor in acute disseminated encephalomyelitis. *Eur J Pediatr* 2002;161:133-7.
149. Franciotta D, Zardini E, Ravaglia S, Piccolo G, Andreoni L, Bergamaschi R, i sur. Cytokines and chemokines in cerebrospinal fluid and serum of adult patients with acute disseminated encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 2006;247:202-7.
150. Kadhim H, De Prez C, Gazagnes MD, Sébire G. In situ cytokine immune responses in acute disseminated encephalomyelitis: insights into pathophysiologic mechanisms. *Hum Pathol* 2003;34:293-7.

151. Van Burgel ND, Bakels F, Kroes AACM, Van Dam AP. Discriminating Lyme Neuroborreliosis from Other Neuroinflammatory Diseases by Levels of CXCL13 in Cerebrospinal Fluid. *J Clin Microbiol* 2011;49:2027–30.
152. Lahrtz F, Piali L, Spanaus KS, Seebach J, Fontana A. Chemokines and chemotaxis of leukocytes in infectious meningitis. *J Neuroimmunol* 1998;85:33-43.
153. Zajkowska J, Moniuszko-Malinowska A, Pancewicz SA, Muszyńska-Mazur A, Kondrusik M, Grygorczuk S, 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.
154. Lepej SŽ, Rode OD, Jeren T, Vince A, Remenar A, Baršić 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.
155. Wang SM, Lei HY, Yu CK, Wang JR, Su IJ, Liu CC. Acute chemokine response in the blood and cerebrospinal fluid of children with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis. *J Infect Dis* 2008;198:1002-6.
156. Kalita J, Srivastava R, Mishra MK, Basu A, Misra UK. Cytokines and chemokines in viral encephalitis: a clinicoradiological correlation. *Neurosci Lett* 2010;473:48-51.
157. 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.
158. 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.
159. Cerar T, Ogrinc K, Lotrič-Furlan S, Kopal J, Levičnik-Stežinar S, Strle F, i sur. Diagnostic value of cytokines and chemokines in lyme neuroborreliosis. *Clin Vaccine Immunol* 2013;20:1578-84.
160. Bremell D, Mattsson N, Edsbagge M, Blennow K, Andreasson U, Wikkelso C, i sur. Cerebrospinal fluid CXCL13 in Lyme neuroborreliosis and asymptomatic HIV infection. *BMC Neurol* 2013;13:2.

161. Hytönen J, Kortela E, Waris M, Puustinen J, Salo J, Oksi J. CXCL13 and neopterin concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Lyme neuroborreliosis and other diseases that cause neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 2014;11:103.
162. Lalor SJ, Segal BM. Lymphoid chemokines in the CNS. *J Neuroimmunol* 2010;224:56–61.
163. Brettschneider J, Czerwoniak A, Senel M, Fang L, Kassubek J, Pinkhardt E, i sur. The chemokine CXCL13 is a prognostic marker in clinically isolated syndrome (CIS). *PLoS One* 2010;5:e11986.
164. Borde JP, Meier S, Fingerle V, Klier C, Hübner J, Kern WV. CXCL13 may improve diagnosis in early neuroborreliosis with atypical laboratory findings. *BMC Infect Dis* 2012;12:344.
165. Segal BM, Logigian EL. Sublime diagnosis of Lyme neuroborreliosis. *Neurology* 2005;65:351-2.
166. Moniuszko A, Czupryna P, Pancewicz S, Rutkowski K, Zajkowska O, Swierzbńska R, i sur. Evaluation of CXCL8, CXCL10, CXCL11, CXCL12 and CXCL13 in serum and cerebrospinal fluid of patients with neuroborreliosis. *Immunol Lett* 2014;157:45-50.
167. Rupprecht TA, Pfister HW, Angele B, Kastenbauer S, Wilske B, Koedel U. The chemokine CXCL13 (BLC): a putative diagnostic marker for neuroborreliosis. *Neurology* 2005;65:448-50.
168. Tjernberg I, Henningsson AJ, Eliasson I, Forsberg P, Ernerudh J. Diagnostic performance of cerebrospinal fluid chemokine CXCL13 and antibodies to the C6-peptide in Lyme neuroborreliosis. *J Infect.* 2011;62:149-58.
169. Wutte N, Berghold A, Krainberger I, Aberer E. Serum CXCL13 chemokine is not a marker for active Lyme borreliosis. *Acta Derm Venereol* 2011;91:724-5.
170. Rupprecht TA, Plate A, Adam M, Wick M, Kastenbauer S, Schmidt C, i sur. The chemokine CXCL13 is a key regulator of B cell recruitment to the cerebrospinal fluid in acute Lyme neuroborreliosis. *J Neuroinflammation* 2009;30;6:42.

11. ŽIVOTOPIS

Lorna Stemberger Marić je rođena 19.06.1985. u Puli. Nakon diplome Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu među 5% najboljih studenata u generaciji s prosjekom ocjena 4.83, nastavila je prvo stažistički, a zatim i specijalizantski staž na Klinici za infektivne bolesti "dr. Fran Mihaljević" u Zagrebu. Godine 2011. je započela specijalizaciju iz Infektologije, da bi 2014. godine nastavila rad u istoj ustanovi kao prvi specijalizant Pedijatrijske infektologije. Koautor je u 11 stručnih i znanstvenih radova, 7 kongresnih priopćenja s međunarodnih skupova i 3 s domaćih skupova. Kao sudionik i izlagač je učestvovala na nekoliko međunarodnih kongresa. Područja njenog stručnog i znanstvenog interesa su infekcije u imunokompromitiranih, neuroinfektologija i intenzivna medicina. Udana je i majka dva sina.

12. PRILOZI

POPIS TABLICA I SLIKA

Tablica 1. Dijagnostički kriteriji za NB - preuzeto iz: Mygland A, Ljøstad U, Fingerle V, Rupprecht T, Schmutzhard E, Steiner I; European Federation of Neurological Societies. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. Eur J Neurol 2010; 17:8-16.⁶⁵

Tablica 2. Dijagnostički kriteriji za ADEM - preuzeto iz: Sejvar JJ, Kohl KS, Bilynsky R, Blumberg D, Cvetkovich T, Galama J i sur. Encephalitis, myelitis, and acute disseminated encephalomyelitis (ADEM): case definitions and guide-lines for collection, analysis, and presentation of immunisation safety data. Vaccine 2007; 25:5771–92.⁸⁴

Slika 1. Kemokini i njihovi receptori – modificirano prema: Proudfoot AE. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. Nat Rev Immunol. 2002; 2: 106-15.⁹³

Tablica 3. Svojstva ispitanika s ADEM-om, NPEV AM ili NB i ispitanika iz kontrolne skupine.

Slika 2. Individualne vrijednosti likvorskih (gornji panel) i serumskih (srednji panel) koncentracija triju kemokina, te „gradijenta“ (odnosno omjera) likvor / serum (donji panel) u ispitivanim skupinama.

Slika 3. Razlike likvorskih koncentracija triju kemokina između djece ADEM-om ili NPEV AM ili NB i djece iz kontrolne skupine.

Slika 4. Razlike serumskih koncentracija ispitivanih kemokina između djece s ADEM-om ili NPEV AM ili NB i djece iz kontrolne skupine.

Tablica 4. Omjer likvorskih i serumskih koncentracija kemokina („likvor-serum gradijent“) u djece s ADEM-om, NPEV AM, NB i u djece iz kontrolne skupine.

Tablica 5. Multivarijatna analiza združenosti broja stanica u likvoru (u 3 mm³) i likvorske koncentracije triju kemokina u ispitivanim skupinama djece.

Slika 5. Nezavisna združenost ln(broja stanica u likvoru) i ln(likvorske koncentracije CXCL10) ovisno o dijagnozi.

Tablica 6. Multivarijatna analiza združenosti broja stanica u likvoru (u 3mm³) i gradijenta likvor-serum triju ispitivanih kemokina.

Slika 6. Nezavisna združenost ln(broja stanica u likvoru) i ln(likvor-serum gradijent) za CXCL10 (lijevo), odnosno ln(likvor-serum gradijent) za CXCL11 (desno) ovisno o dijagnozi.

Tablica 7. Svojstva ispitanika s ADEM, NPEV AM, NB i kontrolnih ispitanika u kojih su serumske i likvorske koncentracije kemokina određene do 8. dana (uključno) od početka simptoma bolesti.

Slika 7. Individualne vrijednosti likvorskih nalaza – broja stanica, udjela polimorfonukleara, koncentracije CXCL10, 11 i 13.

Slika 8. Razlike likvorskog nalaza određenog do 8. dana od početka simptoma bolesti – broja stanica, udjela polimorfonukleara i koncentracija triju kemokina između djece s ADEM-om, NPEV AM i NB.

Tablica 8. Univarijatna i nezavisna združenost viših likvorskih koncentracija CXCL10 i dijagnoze „NPEV AM“ (nasuprot ADEM ili NB, kumulativno).

Slika 9. Univarijatni odnos likvorske koncentracije CXCL10 i dijagnoze NPEV AM – ROC krivulja (A) i vjerojatnost dijagnoze u odnosu na vrijednosti CXCL10 (B).

Tablica 9. Svojstva likvorske koncentracije CXCL10 kao dijagnostičkog testa za NPEV AM (nasuprot ADEM/NB).

POPIS KRATICA

ABM	Akutni bakterijski meningitis
ADCC	Stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima engl. Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity
ADEM	Akutni diseminirani encefalomijelitis
AHEM	Akutni hemoragični encefalomijelitis
AI	Indeks protutijela engl. Antibody index
AM	Aseptični meningitis
ANHLE	Akutni nekrotizirajući hemoragijski leukoencefalitis
APC	Antigen-prezentirajuće stanice engl. Antigen-presenting cells
BCA-1	engl. B-Cell Attracting chemokine 1 (B-stanični kemoatraktant 1)
BHS-A	β -hemolitički streptokok skupine A
BLC	B-limfocitni kemoatraktant
BLR-1	receptor Burkittovog limfoma 1 engl. Burkitt`s lymphoma receptor 1
C	Cistein
cAMP	Ciklički adenzin-monofosfat
CIS	Klinički izolirani sindrom engl. Clinically isolated syndrome
CMV	Citomegalovirus
CR	Kemokinski receptor engl. Chemokine receptor
CRP	C-reaktivni protein
CSF	Čimbenik stimulacije kolonija engl. Colony stimulating factor
CSL	Cerebrospinalni likvor
CT	Kompjutorizirana tomografija engl. Computed tomography
CV	Coxsackie virus
DWI	engl. Diffusion weighted imaging

E	Echovirus
EAE	Eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis
EBV	Epstein-Barr virus
EFNS	Europsko društvo neuroloških znanosti engl. European Federation of Neurological Societies
ELISA	Enzimski imunotest engl. Enzyme-linked immunosorbent assay
EM	Migratorni eritem engl. Erythema migrans
EUCALB	engl. European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis
EV	Enterovirus
FLAIR	engl. Fluid-attenuated inversion recovery
GCS	Glasgowska skala kome engl. Glasgow Coma Scale/Score
HeV	Humani enterovirusi
HHV-6	Humani herpes virus tip 6
HIV	Virus humane imunodeficijencije engl. Human Immunodeficiency Virus
HSP	Henoch-Schonlein purpura
HSV	Herpes simplex virus
HTLV-1	Humani T-limfotropni virus tip 1 engl. Human T-Lymphotropic Virus type I
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP-10	Kemokin CXCL10 engl. Interferon-gamma inducible protein (za interferon gama inducibilni protein)
I-TAC	Kemokin CXCL11 engl. Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant (interferonom inducibilni alfa kemoatraktant za T-stanice)
IVIg	Intravenski imunoglobulini
JHMV	Virus mišjeg hepatitisa engl. JHM strain of mouse hepatitis virus
KLB	Krvno-likvorska barijera

KMB	Krvno-moždana barijera
KZIB	Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“
LB	Lajmska bolest/borelioza
LCMV	Virus limfocitnog koriomeningitisa engl. Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LP	Lumbalna punkcija
LPS	Lipopolisaharid
MIG	Kemokin CXCL9 engl. Monokine induced by interferon gamma (monokin induciran intereferonom gama)
MS	Multipla skleroza
MDEM	Multifazični diseminirani encefalomijelitis
MR	Magnetska rezonanca
NB	Neuroborelioza
NK	engl. Natural killer (prirodne ubilačke stanice)
NPEV	Non-polio enterovirusi
OspC	Outer-surface protein C (površinski protein C)
PF	Plazmafereza
PLDS	engl. Post-Lyme disease syndrome (postlajmski sindrom)
PŽS	Periferni živčani sustav
RA	Reumatoidni artritis
RANTES	Kemokin CCL5 engl. Regulated Upon Activation Normal T Cell Expressed and Secreted
RNK	Ribonukleinska kiselina
RT-PCR	Lančana reakcija polimerazom u realnom vremenu engl. Real time polymerase chain reaction
SAD	Sjedinjene Američke Države
SDF-1	Kemokin CXCL12 engl. Stromal cell-derived factor 1 (stanični stromalni faktor 1)
SLE	Sistemska eritematozni lupus engl. Systemic lupus erythematosus
SŽS	Središnji živčani sustav
TCR	T-stanični receptor

TNF	engl. T-cell receptor Čimbenik nekroze tumora engl. Tumor necrosis factor
VZV	Varicela-zoster virus
WB	Western-blot