

Lucjan Kępa, Barbara Oczko-Grzesik, Barbara Sobala-Szczygieł, Anna Boroń-Kaczmarek

STĘŻENIE CHEMOKINY CXCL13 W PŁYNIE MÓZGOWO-RDZENIOWYM CHORYCH Z NEUROBORELIOZĄ – OBSERWACJE WŁASNE

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,
Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze,
Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Zakaźnych w Bytomiu

STRESZCZENIE

CELEM pracy była ocena przydatności stężenia chemokiny CXCL13 w płynie mózgowo-rdzeniowym (pmr) w diagnostyce neuroboreliozy u dorosłych.

MATERIAŁ I METODA. Badania przeprowadzono u 22 chorych leczonych w Oddziale Chorób Zakaźnych Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Bytomiu w latach 2011-2013 z rozpoznaniem neuroboreliozy przebiegającej pod postacią limfocytarnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. W oparciu o obecność w pmr swoistych przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* chorzy w dniu przyjęcia do Oddziału zostali podzieleni na dwie grupy: I – chorzy z obecnością przeciwciał w pmr (pewne rozpoznanie neuroboreliozy) II – chorzy bez przeciwciał w pmr (prawdopodobne rozpoznanie neuroboreliozy).

U wszystkich oznaczano w pierwszej dobie hospitalizacji stężenie chemokiny CXCL13 w płynie mózgowo-rdzeniowym. W obu grupach chorych kontrolne badania pmr wykonywano po 14 dniach antybiotykoterapii.

WYNIKI. W I grupie chorych średnie stężenie CXCL13 w dniu przyjęcia do Oddziału wynosiło 4123 pg/mL, a u chorych w grupie II – 3422 pg/mL. Różnice średnich stężeń tej chemokiny w pmr między grupami chorych nie były statystycznie znamienne. Nie wykazano korelacji między stężeniami CXCL13 a innymi parametrami zapalnymi płynu mózgowo-rdzeniowego. Badania kontrolne wykazały wyraźny spadek stężenia CXCL13 w obu grupach chorych. U chorych grupy II w pmr pojawiły się przeciwciała przeciwko *Borrelia burgdorferi*. W grupie I kontrolne miana przeciwciał były zbliżone do wartości stwierdzanych przed rozpoczęciem leczenia.

WNIOSKI. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na pewną przydatność oznaczania stężeń chemokiny CXCL13 w płynie mózgowo-rdzeniowym w diagnostyce wczesnej, ostrej neuroboreliozy przebiegającej pod postacią limfocytarnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, szczególnie w przypadku nieobecności przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* w pmr. Zmiany stężenia tej chemokiny w przebiegu antybiotykoterapii mogą mieć, w przeciwieństwie do mian przeciwciał w pmr, pewne znaczenie prognostyczne w ostrej, wczesnej neuroboreliozy.

Słowa kluczowe: neuroborelioza z Lyme, chemokina CXCL13, płyn mózgowo-rdzeniowy

WSTĘP

Borelioza, zwana też chorobą z Lyme, jest najczęstszą chorobą odkleszczową rozpoznawaną na świecie i w Polsce. Proces chorobowy obejmuje wiele narządów i układów, w tym także ośrodkowy i obwodowy układ nerwowy (neuroborelioza). Rozpoznanie neuroboreliozy jest oparte na wywiadzie, obrazie klinicznym i wynikach badania płynu mózgowo-rdzeniowego (pmr) oraz wynikach badań serologicznych (obecność przeciwciał

przeciwko *Borrelia burgdorferi* w płynie z potwierdzeniem ich wewnątrzoponowej syntezy) (1,2).

W wielu przypadkach chorzy nie podają w wywiadzie faktu ukąszenia przez kleszcza ani występowania zmiany skórnej o typie rumienia wędrującego (EM, *erythema migrans*). Obraz kliniczny wczesnej neuroboreliozy może wykazywać podobieństwo do innych chorób neurologicznych, między innymi wirusowych, limfocytarnych zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych. Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego we wczesnej

neuroborelioze wykazuje w przeważającej liczbie przypadków zwiększoną pleocytozę z przewagą limfocytów i podwyższone stężenie białka, natomiast często w płynie może jeszcze nie być obecnych przeciwciał swoistych dla *Borrelia burgdorferi*. Rutynowo oznaczane parametry pmr (pleocytoza i cytogram, stężenie białka, glukozy i kwasu mlekowego) w wielu przypadkach nie pozwalają zatem na pewne rozpoznanie neuroboreliozy we wczesnym stadium choroby. Dlatego poszukuje się dodatkowych parametrów płynu mózgowo-rdzeniowego, których oznaczanie mogłoby być przydatne w diagnostyce wczesnej neuroboreliozy, przebiegającej pod postacią limfocytarnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych (2,3).

Celem pracy była ocena stężenia chemokiny CXCL13 w pmr u chorych z ostrą, wczesną neuroboreliozą i ewentualnej przydatności oznaczania tego parametru we wczesnej diagnostyce i monitorowaniu przebiegu tej choroby.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono u 22 chorych leczonych w Oddziale Chorób Zakaźnych Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Bytomiu w latach 2011–2013. W grupie tej było 14 mężczyzn (63,6%) i 8 kobiet (36,4%). Najmłodszy chory miał 19 lat, najstarszy – 69; średnia wieku wynosiła 38,6 lat.

Wszyscy chorzy byli przyjmowani do Oddziału z podejrzeniem neuroboreliozy. Każdy pacjent zgłaszał w wywiadzie fakt ukąszenia przez kleszcza, nierzadko wielokrotne, w ciągu ostatnich 1–3 miesięcy. Rumień wędrujący występował u 10 chorych (45,45%). W chwili przyjęcia wszyscy chorzy zgłaszali bóle głowy, nudności, wymioty, światłowstręt, stany pod- lub gorączkowe. Niektórzy chorzy zgłaszali ponadto bóle korzonkowe w odcinku lędźwiowo-krzyżowym (7 osób). W badaniu przedmiotowym u każdego chorego stwierdzano obecność objawów oponowych, a w 5 przypadkach (22,73%) – objawy jedno- lub obustronnego obwodowego porażenia nerwu twarzowego (n. VII).

W dniu przyjęcia do Oddziału u każdego chorego wykonywano nakłucie lędźwiowe i badanie płynu mózgowo-rdzeniowego (pmr), które obejmowało oznaczenie pleocytozy i cytogramu, stężenia białka, glukozy i kwasu mlekowego oraz chemokiny CXCL13. Do pomiaru stężenia CXCL13 metodą immunoenzymatyczną stosowano zestawy *Quantikine human CXCL13/BLC/BCA-1* (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Jednocześnie oznaczano także stężenie przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* w surowicy i w pmr metodą ELISA oraz wykonywano, w przypadku wyników dodatnich lub wątpliwych, test potwierdzenia metodą Western blot (zestawy firmy BIOMEDICA, Poland).

W przypadku obecności przeciwciał w płynie mózgowo-rdzeniowym, w celu potwierdzenia ich wewnątrzoponowej syntezy, obliczano tzw. indeks przeciwciał płyn mózgowo-rdzeniowy/surowica.

W oparciu o kryteria EFNS (2) chorzy zostali podzieleni na dwie grupy:

- grupa I – pacjenci z pewnym rozpoznaniem neuroboreliozy (obecne przeciwciała przeciwko *Borrelia burgdorferi* w pmr) – 14 osób (63,64%),
- grupa II – chorzy z prawdopodobnym rozpoznaniem neuroboreliozy (brak przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* w pmr) – 8 osób (36,36%)

U wszystkich chorych rozpoczęto leczenie dożylnie antybiotykami; ceftriaksonem (20 chorych; 90,91%) lub doksycyliną (2 chorych; 9,09%) oraz leczenie objawowe. Żaden z badanych chorych nie otrzymał antybiotyku w okresie poprzedzającym hospitalizację.

W 14. dobie leczenia u każdego chorego wykonywano kontrolne badanie płynu mózgowo-rdzeniowego, w którym oznaczano wszystkie wyżej wymienione parametry.

Porównanie średnich wartości wielkości pleocytozy, stężeń białka, glukozy, kwasu mlekowego i chemokiny CXCL13 między badanymi grupami chorych przeprowadzono za pomocą testu t Studenta. Oceniano także korelacje między parametrami płynu mózgowo-rdzeniowego w obu grupach chorych stosując współczynnik korelacji Pearsona.

W każdym przypadku na wykonanie wszystkich badań uzyskiwano pisemną zgodę chorego. Praca i jej założenia zostały zaakceptowane przez Komisję Bioetyczną Śląskiej Akademii Medycznej (obecnie: Śląskiego Uniwersytetu Medycznego) w Katowicach (NN-6501-126/06).

WYNIKI

Wyniki badania płynu mózgowo-rdzeniowego uzyskane w dniu przyjęcia do Oddziału przedstawiono w tabeli I.

W grupie I średnia pleocytoza wynosiła 114 komórek w 1 mm³, w cytogramie przeważały limfocyty (56–92%), średnie stężenie białka – 0,9 g/L, glukozy – 2,5 mmol/L, kwasu mlekowego – 2,9 mmol/L, a stężenie cytokiny CXCL13 – 4123 pg/mL.

W tej grupie stwierdzano obecność przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* w surowicy w klasie IgM u wszystkich chorych w średnim mianie 132 RU/mL, a w klasie IgG u 4 chorych w średnim mianie 88 RU/mL. Przeciwciała przeciwko *Borrelia burgdorferi* były także obecne w pmr: IgM w średnim mianie 69 RU/mL u 14 chorych, IgG w średnim mianie 54 RU/mL u 4 chorych. We wszystkich przypadkach obliczo-

ny wskaźnik przeciwciał płyn mózgowo-rdzeniowy/surowica potwierdził ich wewnątrzoponową syntezę.

W grupie II średnia pleocytoza wynosiła 99 komórek w 1 mm³, w cytogramie limfocyty stanowiły od 65 do 94%, średnie stężenie pozostałych parametrów pmr kształtowały się następująco: białko 0,8 g/L, glukoza 2,7 mmol/L, kwas mlekowy 2,6 mmol/L, a średnie stężenie CXCL13 – 3422 pg/mL. Średnie stężenia przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* w surowicy wynosiły około 180 RU/mL w klasie IgM oraz około 74 RU/mL w klasie IgG; były one obecne u wszystkich chorych. Natomiast u żadnego z pacjentów nie stwierdzono obecności przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Tabela II przedstawia wyniki kontrolnego badania pmr wykonane po 14 dniach antybiotykoterapii.

W grupie I średnia pleocytoza wynosiła 39 komórek w 1 mm³, w cytogramie limfocyty, średnie stężenie białka 0,7 g/L, glukozy – 2,6 mmol/L, kwasu mlekowego – 2,2 mmol/L, a stężenie cytokiny CXCL13 – 741 pg/mL. Średnie stężenia przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* kształtowały się następująco: w surowicy IgM – 108 RU/mL, IgG – 110 RU/mL; natomiast w płynie mózgowo-rdzeniowym : IgM – 56 RU/mL, IgG – 65 RU/mL. Przeciwciała przeciwko *Borrelia burgdorferi* w surowicy były obecne u wszystkich badanych chorych w obu klasach.

W grupie II średnia pleocytoza wynosiła 53 komórek w 1 mm³, w cytogramie limfocyty, średnie stężenia pozostałych parametrów pmr kształtowały się następująco: białko 0,6 g/L, glukoza 2,4 mmol/L, kwas mlekowy 2,1 mmol/L, a średnie stężenie CXCL13 – 531 pg/mL. Średnie stężenia przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* kształtowały się następująco: w surowicy IgM – 160 RU/mL, IgG – 134 RU/mL; w płynie mózgowo-rdzeniowym IgM – 41 RU/mL, IgG – 72 RU/mL. Przeciwciała były obecne u wszystkich chorych, zarówno w surowicy, jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Różnice średnich wielkości pleocytozy, stężeń białka, glukozy, kwasu mlekowego i chemokiny CXCL13 w płynie mózgowo-rdzeniowym między badanymi grupami chorych nie były statystycznie istotne.

OMÓWIENIE

Neuroborelioza określana jest jako postać boreliozy z Lyme, w której obecne są objawy ze strony ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Proces chorobowy może lokalizować się w każdym miejscu układu nerwowego, co wyjaśnia bogatą i złożoną symptomatologię neuroboreliozy. Zażycie układu nerwowego może nastąpić tuż po zakażeniu krętkiem *Borrelia burgdorferi*, a także po kilku miesiącach lub latach od momentu zakażenia. U niektórych chorych objawy neurologiczne

mogą nie być poprzedzane innymi objawami boreliozy (np.: rumieniem wędrującym), co powoduje nierzadko istotne problemy diagnostyczne (1-3).

Większość autorów dzieli neuroboreliozę na wczesną (ostrą) i późną (przewlekłą). Do neuroboreliozy wczesnej zalicza się między innymi limfocytarne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, neuropatie czaszkowe i ostre, bolesne neuropatie korzeniowe.

Limfocytarne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych występujące we wczesnej neuroboreliozie może powodować pewne trudności diagnostyczne, wymaga bowiem różnicowania z wirusowymi zapaleniami opon. Dotyczy to w szczególności chorych bez ewidentnego ukąszenia przez kleszcze w wywiadzie, bez rumienia wędrującego poprzedzającego objawy neurologiczne i, przede wszystkim, chorych, u których nie stwierdza się jeszcze obecności przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* w płynie mózgowo-rdzeniowym (1-3).

Patogeneza neuroboreliozy jest procesem złożonym i, mimo wielu badań, nie do końca poznanym. Inwazja krętków *Borrelia burgdorferi* do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) następuje we wczesnym okresie zakażenia. Do uszkodzenia układu nerwowego może dochodzić w wyniku bezpośredniej inwazji krętka, wykazującego potwierdzony w badaniach doświadczalnych, neurotropizm. Interakcja krętków z komórkami nerwowymi prowadzi do ich uszkodzenia i wzbudzenia odpowiedzi immunologicznej przeciwko tym bakteriom. Po wnikięciu do OUN krętki indukują produkcję mediatorów zapalnych (cytokin i chemokin), które są odpowiedzialne za wywołanie stanu zapalnego w obrębie OUN. Dopiero w późniejszym czasie dochodzi do wewnątrzoponowej syntezy swoistych przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* (4-8).

Spośród wielu chemokin uczestniczących w procesach zapalnych toczących się w obrębie ośrodkowego układu nerwowego jest chemokina CXCL13. Należy ona do rodziny chemokin CXC i jest wybiórczym chemoatraktantem dla limfocytów B i komórek T helper B, działającym poprzez ich specyficzny receptor CXCR5. Odpowiada ona za migrację komórek B przez komórki śródbłonka mózgowego. CXCL13 uczestniczy w procesach odporności wrodzonej. Stanowi pierwszą linię obrony immunologicznej, wcześniejszą niż odporność nabyta charakteryzująca się syntezą przeciwciał (9-13).

Liczne prace wykazały udział chemokiny CXCL13 w różnych chorobach neurologicznych. Chemokina ta odgrywa rolę w patogenezie stwardnienia rozsianego (14-16), w pierwotnych chłoniakach OUN (17), a także – w kleszczowym zapaleniu mózgu (18).

Badania doświadczalne wykazały udział chemokiny CXCL13 w patogenezie boreliozy, a w szczególności neuroboreliozy. Chemokina ta jest produkowana w płynie mózgowo-rdzeniowym przez monocyty/makrofagi i komórki dendrytyczne. Proces ten jest wynikiem in-

dukowania przez lipoproteiny błony komórkowej *Borrelia burgdorferi* ekspresji CXCL13 w tych komórkach drogą sygnalizacji przez TLR-2 (*Toll-like receptor-2*). CXCL13 odpowiada za przyciąganie komórek B (typowe leukocyty dla ostrej, wczesnej neuroboreliozy) do płynu mózgowo-rdzeniowego. Proces ten poprzedza rozwijającą się następnie humoralną odpowiedź immunologiczną w OUN, polegającą na syntezie swoistych przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* (19-21).

W każdym przypadku podejrzenia neuroboreliozy istotnym elementem diagnostyki jest badanie płynu mózgowo-rdzeniowego. W ostrej (wczesnej) neuroboreliozy przebiegającej pod postacią limfocyтарnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych w pmr stwierdza się podwyższoną pleocytozę z przewagą limfocytów w cytogramie oraz podwyższone stężenie białka, jako odzwierciedlenie dysfunkcji bariery krew-płyn mózgowo-rdzeniowy (22-24). Wielu autorów zwraca uwagę na nieobecność w płynie swoistych przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* we wczesnym okresie choroby (25,26).

U naszych chorych również stwierdzono w badaniach pmr pleocytozę z przewagą limfocytów w cytogramie, podwyższone stężenie białka, prawidłowe stężenie glukozy i, u niektórych chorych, miernie podwyższone stężenie kwasu mlekowego. Obecność przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* w płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdzano u 63,64% chorych (grupa I). Byli to pacjenci, u których ukąszenie przez kleszcze miało miejsce w bardziej odległym czasie w stosunku do dnia przyjęcia do szpitala w porównaniu z chorymi grupy II.

Brak przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* w pmr może utrudniać, a czasem wręcz uniemożliwiać postawienie pewnego rozpoznania ostrej, wczesnej neuroboreliozy. Objawy neurologiczne występujące w tym stadium neuroboreliozy mogą być trudne do jednoznacznej interpretacji; w wielu przypadkach mogą być podobne do objawów limfocyтарnych zapaleń opon o innej etiologii, na przykład wirusowej. W związku z tym wiele ośrodków poszukuje dodatkowych parametrów płynu mózgowo-rdzeniowych, których oznaczanie mogłoby być przydatne w diagnostyce wczesnej neuroboreliozy. Badania doświadczalne wykazały udział chemokiny CXCL13 w patogenezie tej choroby (20-21). *Rupprecht* i wsp. potwierdzili wewnątrzoponową syntezę tej chemokiny u chorych z neuroboreliozą (27).

Badania kliniczne wykazały obecność wysokich stężeń CXCL13 w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z ostrą, wczesną neuroboreliozą, zarówno u dzieci, jak i u dorosłych (27-33).

Większość autorów zwraca uwagę na przydatność oznaczania tej chemokiny w płynie mózgowo-rdzeniowym w diagnostyce ostrej (wczesnej) neuroboreliozy przebiegającej pod postacią limfocyтарnego zapalenia

opon, uznając CXCL13 za wczesny marker pmr dla ostrej neuroboreliozy, szczególnie przy nieobecności przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* w płynie (28-30,32,33).

Van Burgel i wsp. wykazali istnienie korelacji między poziomem CXCL13 a wielkością pleocytozy limfocyтарnej (34), natomiast inni badacze nie stwierdzili korelacji między stężeniem tej chemokiny ani z wielkością pleocytozy ani z mianem przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* w pmr (33).

Wśród naszych chorych stwierdzano wysokie stężenia chemokiny CXCL13 2 płynie mózgowo-rdzeniowym, zarówno w grupie I, jak i II. Nie wykazano natomiast korelacji między jej stężeniem a wielkością pleocytozy w obu grupach chorych, ani z mianem przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* u chorych wchodzących w skład grupy I.

Interesującym zjawiskiem jest obserwowany przez wielu autorów szybki spadek stężenia chemokiny CXCL13 w płynie mózgowo-rdzeniowym będący rezultatem wdrożonej adekwatnej, skutecznej antybiotykoterapii (27-29,31,34,35).

W naszych badaniach również stwierdzono wyraźne obniżenie stężenia tej chemokiny w badaniu pmr wykonywanym po 14 dniach antybiotykoterapii w obu grupach chorych. Natomiast u chorych wchodzących w skład grupy I nie obserwowano wyraźnego wpływu leczenia na miana przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* w kontrolnym badaniu płynu mózgowo-rdzeniowego w porównaniu z badaniem wstępnym.

Wyniki badań wydają się wskazywać na szczególną przydatność oznaczania chemokiny CXCL13 w pmr szczególnie w nietypowych klinicznie przypadkach ostrej, wczesnej neuroboreliozy, we wczesnych stadiach tej choroby, kiedy badania wewnątrzoponowych przeciwciał swoistych dla *Borrelia burgdorferi* są jeszcze negatywne oraz w różnicowaniu zakażenia aktywnego od przebytego, a także jako elementu różnicującego neuroboreliozę od innych chorób neurologicznych (34,35).

PODSUMOWANIE

Chemokina CXCL13 stanowi istotny element patogenezy neuroboreliozy. Wzrost stężenia tej chemokiny w płynie mózgowo-rdzeniowym występuje we wczesnej, ostrej neuroboreliozy, przebiegającej pod postacią limfocyтарnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, a w rezultacie wdrożonego leczenia przyczynowego (antybiotykoterapii) dochodzi do szybkiego spadku jej stężenia w płynie. Istnieją zatem przesłanki, aby uznać chemokinę CXCL13 za możliwy marker diagnostyczny i marker odpowiedzi na leczenie w ostrej neuroboreliozy. Stosunkowo nieliczna liczba badanych chorych

utrudnia wyciągnięcie dalej idących wniosków, niemniej uzyskane wyniki wydają się uzasadniać celowość kontynuowania tych badań obejmujących większą liczbę chorych. Warto przypomnieć, że wytyczne EFNS dotyczące rozpoznawania i leczenia neuroboreliozy w Europie uznają dotychczasowe dane za niewystarczające dla zalecania oznaczania chemokiny CXCL13 w pnr jako rutynowego testu diagnostycznego lub metody monitorowania skuteczności leczenia, jednakże, według tych wytycznych, rosnąca liczba doniesień wskazuje na celowość dalszych badań w tym zakresie (2).

Otrzymano: 14.01.2015 r.

Zaakceptowano do publikacji: 4.05.2015 r.

Adres do korespondencji:

Dr n. med. Lucjan Kępa

Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Zakaźnych

Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Aleja Legionów 49

Bytom

Tel. (32) 281-92-41

Adres e-mail: kepalucjan@onet.pl

