

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Maciej Pastuszczyk

Wybrane parametry aktywacji odpowiedzi komórkowej
w kile, ze szczególnym uwzględnieniem
kiły układu nerwowego

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. med. Anna Wojas-Pelc

Pracę wykonano w Katedrze Dermatologii UJ CM w Krakowie

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. med. Anna Wojas-Pelc

Kraków 2013

Lues - łac. luere - pokutować

*„Rzecz dziwna: ta choroba wprowadzona do ciała,
Czasem powoli zdradza się na zewnątrz,
A często nie daje żadnego jawnego znaku.
Księżyc czterokrotnie kształtuje swoją niebiańską pełnię:
Kryje się, waha, dojrzewa skrycie
I wydaje się karmić naszą piersią.
Tymczasem chory trapiiony jej ciosami
czuje swe słabnące siły:
Przygniata go ołów odrętwienia.
Snuje się z przykrością wokół codziennych zajęć.
Wstrętne objawy nie czekają z pojawieniem się,
Oko traci swój blask, czoło blednie.
Ohydna zgnilizna czyniąc swe postępy
Atakuje cichaczem sekretne narządy.
Toczy sąsiednie miejsca i rozprzestrzenia się aż do pachwin.
Choroba nie ulega wątpliwości, jej oznaki są pewne”.*

Giorlamo Fracastoro, Syphilis sive morbus gallicus, Verona 1530
(tłum. Z. Podgórska-Klawe)

Dziękuję,

*Pani Profesor Annie Wojas-Pelc
za zaufanie oraz pomoc i opiekę merytoryczną nad realizacją tego projektu,*

*Moim Przyjaciołom,
Bogusiowi Jakiele i Ewie Wypasek
za nieocenioną pomoc i równie nieocenione wsparcie,*

*Zespołowi Oddziału Klinicznego Dermatologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie,
w szczególności Pani Doktor Dorocie Wielowieyskiej-Szybińskiej,
Panu Doktorowi Andrzejowi Jaworkowi i Paniom: Jolancie Starzec, Zofii Kuglin i Alicji Stanko
za pomoc w realizacji projektu.*

Spis treści

1. WPROWADZENIE	7
1.1 <i>Kiła - aktualny problem epidemiologiczny</i>	7
1.2 <i>Etiologia kiły i mechanizm zakażenia</i>	7
1.3 <i>Przebieg i obraz kliniczny kiły</i>	8
1.4 <i>Odpowiedź humoralna w kile</i>	10
1.5 <i>Diagnostyka serologiczna kiły</i>	10
2. KIŁA UKŁADU NERWOWEGO	12
2.1 <i>Wtargnięcie krętków białych do układu nerwowego i samoistna eliminacja patogenu</i>	12
2.2 <i>Obraz kliniczny</i>	14
2.3 <i>Diagnostyka</i>	17
2.4 <i>Kiła układu nerwowego u chorych HIV-pozytywnych</i>	20
3. ODPOWIEDŹ KOMÓRKOWA W KILE	20
4. CEL PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE	24
4.1 <i>Hipotezy badawcze</i>	24
4.2 <i>Cele pracy</i>	24
5. MATERIAŁ I METODY	25
5.1 <i>Charakterystyka grup i kryteria włączenia do badania</i>	25
5.2 <i>Plan badania</i>	26
5.3 <i>Oznaczenie stężeń cytokin</i>	27
5.4 <i>Analiza statystyczna</i>	28
6. WYNIKI	28
6.1 <i>Charakterystyka kliniczna osób biorących udział w badaniu</i>	28
6.1.1 <i>Nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych płynu mózgowo-rdzeniowego</i>	29
6.1.2 <i>Obraz kliniczny kiły</i>	30
6.1.3 <i>Wyniki podstawowych badań laboratoryjnych krwi i wybrane parametry demograficzne</i>	31
6.1.4 <i>Wyniki badań serologicznych krwi</i>	32

6.2	<i>Stężenia cytokin w surowicy krwi</i>	34
6.3	<i>Stężenia cytokin w płynie mózgowo-rdzeniowym</i>	38
6.4	<i>Proporcje stężeń cytokin pro – i przeciwzapalnych w płynie mózgowo-rdzeniowym (współczynniki)</i>	43
6.5	<i>Stężenia cytokin w surowicy krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym i inne parametry laboratoryjne w grupach wyodrębnionych zgodnie ze statusem w zakresie zakażenia HIV</i>	45
6.6	<i>Korelacje stężeń cytokin z wybranymi parametrami laboratoryjnymi</i>	47
6.6.1	<i>Korelacje stężeń cytokin w surowicy krwi ze stężeniami w płynie mózgowo-rdzeniowym</i>	47
6.6.2	<i>Wzajemne korelacje stężeń poszczególnych cytokin w płynie mózgowo-rdzeniowym</i>	48
6.6.3	<i>Korelacje stężeń analizowanych w płynie mózgowo-rdzeniowym cytokin z innymi parametrami laboratoryjnymi oznaczonymi w płynie mózgowo-rdzeniowym</i>	49
7.	<i>DYSKUSJA</i>	50
7.1	<i>Kontrowersje wokół rozpoznania bezobjawowej kiły układu nerwowego</i>	51
7.2	<i>Intratekalna produkcja cytokin</i>	54
7.3	<i>Wyższe stężenie TNF-α, IL-10 i TGF-β w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z kiłą układu nerwowego i prawdopodobną kiłą układu nerwowego</i>	54
7.4	<i>Wyższe stężenie IFN-γ i IL-17A w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z kiłą układu nerwowego i prawdopodobną kiłą układu nerwowego</i>	59
7.5	<i>Kiła u chorych HIV-pozytywnych</i>	61
7.6	<i>Poszukiwanie nowych markerów diagnostycznych zająćcia układu nerwowego w kile na wczesnym etapie zakażenia</i>	62
8.	<i>WNIOSKI</i>	64
9.	<i>STRESZCZENIE</i>	65
10.	<i>PIŚMIENNICTWO</i>	69

Skróty i objaśnienia

	język angielski	język polski
ALT	Alanine transaminase	Aminotransferaza alaninowa
AST	Aspartate transaminase	Aminotransferaza asparaginianowa
CDC	Center for disease control and prevention (USA)	Centrum zwalczania i zapobiegania chorobom (Stany Zjednoczone)
CRP	C-reactive protein	Białko C-reaktywne
EIA	Enzyme immunoassay	Test immunoenzymatyczny
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Test immunoenzymosorbcyjny
FTA	Fluorescent treponemal antibody test	Odczyn immunofluorescencji pośredniej
FTA-ABS	Fluorescent treponemal antibody absorbent test	Odczyn immunofluorescencji pośredniej w modyfikacji absorbcyjnej
HBV	Hepatitis B virus	Wirus zapalenia wątroby typu B
HCV	Hepatitis C virus	Wirus zapalenia wątroby typu C
HIV	Human immunodeficiency virus	Ludzki wirus niedoboru odporności
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1	Cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1
IFN- γ	Interferon γ	Interferon γ
IL-1 β	Interleukin 1	Interleukina 1
IL-2	Interleukin 2	Interleukina 2
IL-4	Interleukin 4	Interleukina 4
IL-10	Interleukin 10	Interleukina 10
IL-17A	Interleukin 17A	Interleukina 17A
IUSTI	International Union Against Sexually Transmitted Infections	Międzynarodowa Liga Przeciwweneryczna
MHC	Major histocompatibility complex	Główny układ zgodności tkankowej
PMR	-	Płyn mózgowo-rdzeniowy
RPR	Rapid plasma reagin test	Szybki test reaginowy
TGF- β	Transforming growth factor β	Transformujący czynnik wzrostu β
TLR	Toll-like receptor	Receptory Toll-podobne
TNF- α	Tumor necrosis factor α	Czynnik martwicy nowotworu α
TPHA	Treponema pallidum haemagglutination assay	Odczyn biernej hemaglutynacji
TPI	Treponema pallidum immobilization test	Odczyn unieruchamiania krętków w obecności dopełniacza
USR	Unheated serum reagin test	Test kłaczkowania nieogrzewaną surowicą
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1	Cząsteczka adhezji komórkowej naczyń
VDRL	Venereal Disease Research Laboratory	Odczyn kłaczkujący
WHO	World Health Organization	Światowa Organizacja Zdrowia

1. Wprowadzenie

1.1 Kiła - aktualny problem epidemiologiczny

Kiła jest układową chorobą zakaźną przenoszoną głównie drogą kontaktów seksualnych, która występuje wyłącznie u ludzi. Stanowi poważny problem epidemiologiczny w krajach rozwijających się, głównie w Afryce Subsaharyjskiej i południowo-wschodniej Azji. W 2005 roku Światowa Organizacja Zdrowia (*World Health Organization*; WHO) odnotowała niemal 11 milionów nowych zachorowań na kiłę.¹ W połowie lat 90-tych w Europie i Ameryce Północnej liczba przypadków kiły była najniższa w historii.^{2, 3} Od 2000 roku zaczęto jednak raportować istotny wzrost zachorowań na kiłę zarówno w krajach europejskich jak i Ameryce Północnej. Zwrócono ponadto uwagę, że choroba szerzy się szczególnie w środowiskach homoseksualnych oraz wśród osób zakażonych ludzkim wirusem niedoboru odporności (ang. *Human Immunodeficiency Virus*; HIV).^{2, 3, 4}

Pod koniec lat 60-tych współczynnik zapadalności na kiłę w Polsce wynosił 52 przypadki na 100 tys. ludności, co uznano za epidemię choroby. W latach 90-tych współczynnik ten zmniejszył się niemal 15-krotnie.⁵ Od 2006 roku współczynnik zapadalności na kiłę utrzymuje się na względnie stałym poziomie i wynosi ok. 2-3 przypadki na 100 tys. ludności.^{6, 7}

1.2 Etiologia kiły i mechanizm zakażenia

Czynnikiem etiologicznym kiły jest krętek blady (*Treponema pallidum subspecies pallidum*), Gram-ujemna bakteria spiralnego kształtu, należąca do rzędu *Spirochaetales*, rodziny *Spirochaetaceae*, rodzaju *Treponema* i gatunku *Treponema pallidum*. W obrębie gatunku *Treponema pallidum* wyróżnia się trzy podgatunki: (1) *T. pallidum subspecies pallidum* – wywołujący kiłę, (2) *T. pallidum subspecies pertenue* – czynnik etiologiczny frambezji, i (3) *T. pallidum subspecies endemicum* – czynnik etiologiczny kiły endemicznej.⁸ *T. pallidum subsp. pallidum* zwany dalej *T. pallidum* ma bardzo ubogi metabolizm, wyrażający się m. in.

wydłużonym czasem podziału, który może wynosić nawet 33 godziny. Bakteria do przeżycia wymaga odpowiedniej wilgotności i poza organizmem gospodarza ginie w ciągu kilku godzin. Jest również bardzo wrażliwa na wysoką temperaturę oraz środki antyseptyczne i detergenty. Między innymi z tego powodu nie udało się dotychczas opracować metody hodowli krętków białych *in vitro*. Jedynym znanym naturalnym gospodarzem *T. pallidum* jest człowiek.⁸

Zakażenie kiłą następuje przez wniknięcie krętków białych, obecnych w zakaźnych zmianach skórnych i/lub śluzówkowych chorego, do uszkodzonej skóry, niezmiętej błony śluzowej lub bezpośrednio do krwiobiegu osoby narażonej. Do zakażenia w ten sposób najczęściej dochodzi podczas kontaktu seksualnego. Innymi drogami zakażenia są: (1) przeniesienie krętków białych obecnych we krwi kobiety ciężarnej przez łożysko do płodu, (2) zakażenie drogą pozapłciową, w czasie kontaktu powłok ciała z zakażonym materiałem biologicznym, (3) transfuzja zakażonej krwi lub przeszczep narządów (obecnie bardzo rzadko).⁹

1.3 Przebieg i obraz kliniczny kiły

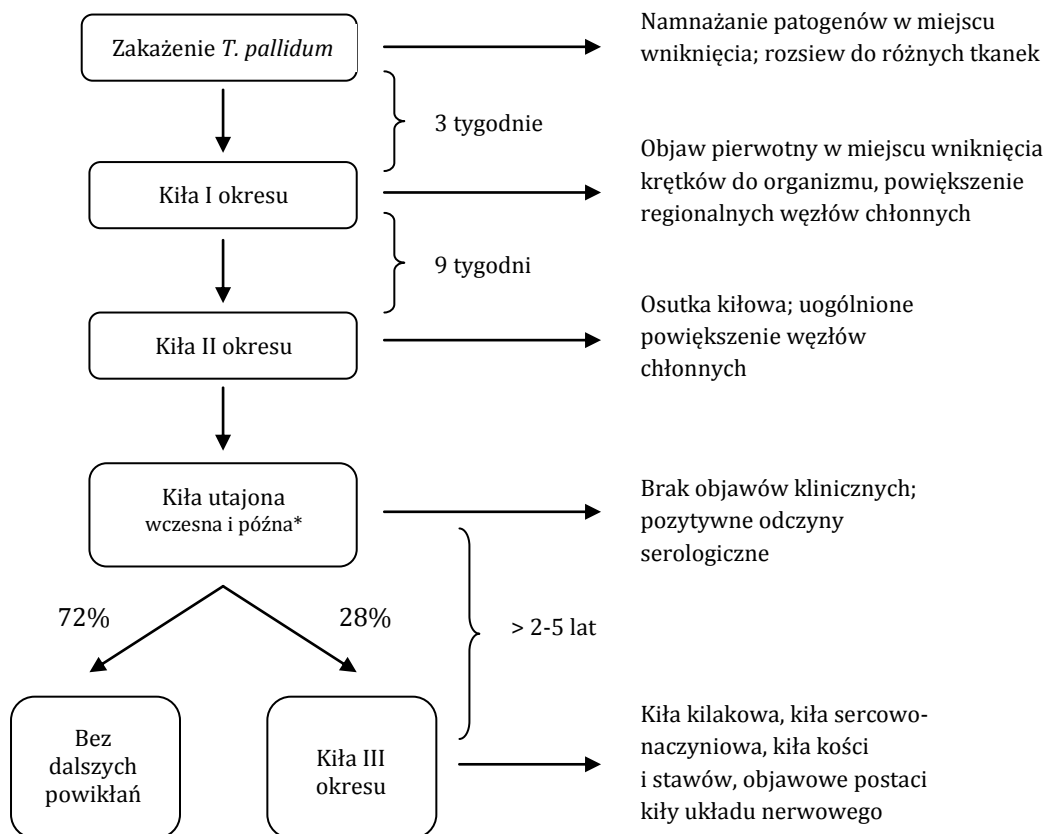
Zakażenie krętkiem białym może cechować się wieloletnim przebiegiem z następującymi po sobie okresami objawowymi i bezobjawowymi. Może postępować, prowadząc do poważanych zmian narządowych, ale może także podlegać samowyleczeniu.

W oparciu o kryteria kliniczne i immunologiczne, kiłę podzielono na: (1) wczesną – trwającą nie dłużej niż rok (wg CDC; Centers for Disease Control and Prevention) lub nie dłużej niż dwa lata (wg IUSTI; International Union Against Sexually Transmitted Infections) i (2) późną – trwającą dłużej niż rok (wg CDC) lub dłużej niż dwa lata (IUSTI). Kiła wczesna obejmuje tzw. pierwszy i drugi okres choroby oraz kiłę utajoną wczesną. Do kiły późnej zalicza się z kolei kiłę utajoną późną i kiłę objawową dotyczącą różnych narządów.⁸

Na Rycinie 1 (w oparciu o Gjestland¹⁰) przedstawiono schematycznie naturalny przebieg zakażenia krętkiem białym z najczęstszymi objawami klinicznymi występującymi w poszczególnych okresach choroby. We wczesnych stadiach zakażenia dominują objawy ze strony skóry i błon śluzowych. W późniejszych okresach przewagę zyskuje manifestacja narządowa.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że kiła jest chorobą o bardzo bogatej symptomatologii. Szczególnie bogate spektrum objawów klinicznych występuje w kile II okresu, co wynika z bakteriemii, wnikania krętków do wielu narządów i tkanek, a także odpowiedzi immunologicznej gospodarza na patogen. Najczęściej spotykanymi zmianami skórными w tym okresie są osutki plamiste i plamisto-grudkowe. Rzadziej stwierdza się osutki lichenoidalne, łuszczycopodobne, o układzie obrączkowatym, z dominacją pęcherzyków, wykwity o typie guzków, czy pokrzywki. W kile II okresu można także czasem odnotować bielactwo kiłowe, anginę kiłową, łysienie kiłowe, czy nawet kiłowe zapalenie wątroby i kłębuszkowe zapalenie nerek.

Rycina 1. Schemat naturalnego przebiegu zakażenia krętkiem bladym.



*wczesna – zakażenie trwające <1 rok (CDC) lub < 2 lata (IUSTI); późna – zakażenie trwające >1 rok (CDC) lub > 2 lata (IUSTI)

1.4 Odpowiedź humoralna w kile

Odpowiedź humoralna w kile rozwija się podobnie jak w innych chorobach zakaźnych. Produkowane przeciwciała są skierowane przeciwko licznym antygenom lipidowym i białkowym *T. pallidum*.^{11, 12, 13}

Swoiste (przeciwkłętkowe) przeciwciała w klasie IgM można wykryć w surowicy chorych już pod koniec drugiego tygodnia zakażenia. Miano tych przeciwciał zmniejsza się podczas naturalnego przebiegu zakażenia, ale także po leczeniu. Przeciwciała przeciwkłętkowe w klasie IgG pojawiają się w 4. lub 5. tygodniu kiły. Pomimo eliminacji antygeny synteza tych przeciwciał przez komórki pamięci utrzymuje się na niskim poziomie przez wiele lat (nierzadko do końca życia – tzw. „blizna serologiczna”).^{14, 15}

Wydaje się, że najważniejszą rolą swoistych przeciwciał jest opsonizacja bakterii. Sprawia to, że patogen jest rozpoznawany przez komórki uczestniczące w odpowiedzi immunologicznej (głównie makrofagi) i może zostać wyeliminowany na drodze fagocytozy.^{16,17} Ponadto przeciwciała przeciwkłętkowe uczestniczą w (1) blokowaniu adhezji krętków białych do komórek gospodarza i (2) unieruchamianiu krętków białych.¹⁸

W modelu zwierzęcym zakażenia *T. pallidum* wykazano, że immunizacja bierna niedawno zakażonych królików za pomocą surowicy lub przeciwciał w klasie IgG pochodzących od zwierząt z dłuższym czasem trwania zakażenia *T. pallidum*, istotnie opóźniała rozwój zmian skórnych i śluzówkowych w miejscu inokulacji krętków. Jednak w przeciągu kilku dni od zaprzestania podawania surowicy lub przeciwciał, dochodziło do pojawienia się zmian skórnych i śluzówkowych.^{19, 20} Sugeruje to, że swoiste przeciwciała przeciwkłętkowe nie są wystarczające do eliminacji patogenów i nie zapobiegają rozwojowi kiły.

1.5 Diagnostyka serologiczna kiły

Diagnostyka kiły opiera się przede wszystkim na wykrywaniu przeciwciał produkowanych w przebiegu zakażenia. Dotychczas w diagnostyce zakażenia krętkiem białym nie dowiedziono przewagi innych metod diagnostycznych nad badaniami serologicznymi i to zarówno w odniesieniu do testów przesiewowych jak i potwierdzających.

Odczyny kiłowe dzielą się na niekrętkowe (tzw. reaginowe, klasyczne, nieswoiste) i krętkowe (swoiste) (Tabela 1). Test Wassermana był pierwszym odczynem kiłowym zastosowanym w diagnostyce kiły na początku XX wieku. Za antygen posłużyła mieszanina lecytyny, cholesterolu i kardiolipiny. Test ten określono wówczas jako niekrętkowy (nieswoisty). Mimo, że kardiolipina wykazuje podobieństwo strukturalne i immunogenne z lipidami krętka bladego, nie jest swoista dla tej bakterii. Z czasem test Wassermana został zastąpiony łatwiejszymi technicznie i stosowanymi powszechnie do dziś odczynami VDRL i RPR.⁹

Tabela 1. Odczyny kiłowe stosowane w diagnostyce serologicznej zakażenia *T. pallidum*.

Odczyny niekrętkowe (reaginowe, klasyczne, nieswoiste)	Odczyny krętkowe (swoiste)
VDRL (<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>)	TPHA (<i>Treponema pallidum haemagglutination assay</i>)
RPR (<i>Rapid Plasma Reagin</i>)	FTA-ABS (<i>Fluorescent Treponemal Antibody Absorbent test</i>)
USR (<i>Unheated Serum Reagin test</i>)	IgM-FTA-ABS (<i>IgM - Fluorescent Treponemal Antibody Absorbent test</i>)
	EIA, ELISA (<i>Enzyme Immunoassay, Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>)
	INNO-LIA™ Syphilis (<i>Immunoblotting</i>)
	FTA (<i>Fluorescent Treponemal Antibody test</i>)
	TPI (<i>Treponema pallidum Immobilization test</i>)

Z kolei w odczynach krętkowych stosuje się jako antygeny inaktywowane krętki blade, ich fragmenty lub antygeny rekombinowane. Wykrywane są wówczas swoiste przeciwciała zarówno w klasie IgM jak i IgG.⁸ Natomiast test IgM-FTA-ABS służy wyłącznie do detekcji przeciwciał w klasie IgM.

Według aktualnych wytycznych diagnostycznych, do rozpoznania kiły niezbędne jest stwierdzenie pozytywnego wyniku co najmniej jednego odczynu niekrętkowego i pozytywnego wyniku co najmniej jednego odczynu krętkowego w surowicy krwi. Odczyny krętkowe, mogą być dodatnie przez wiele lat, nawet po

skutecznym leczeniu, dlatego też do kontroli po leczeniu wykorzystuje się oznaczenia miana odczynów niekrętkowych. Ich zmniejszenie się oznacza prawidłową odpowiedź na leczenie. Z kolei utrzymywanie się miana odczynu niekrętkowego na poziomie podobnym do tego przed leczeniem uznawane jest za niepowodzenie lecznicze i może wiązać się przede wszystkim z zajęciem układu nerwowego przez *T. pallidum* oraz progresją zakażenia do późniejszych okresów choroby.^{21, 22}

2. Kiła układu nerwowego

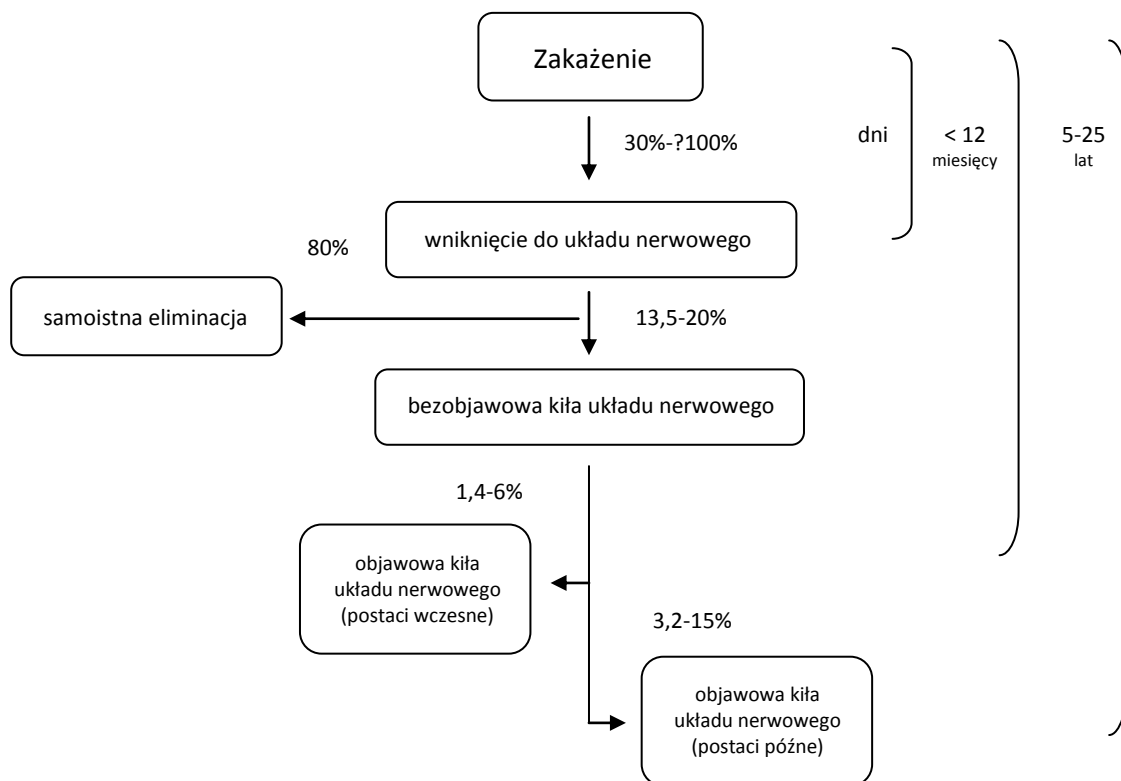
2.1 Wtargnięcie krętków białych do układu nerwowego i samoistna eliminacja patogenu

T. pallidum wnika do układu nerwowego już na wczesnych etapach zakażenia. W modelach króliczych choroby, identyfikowano krętka białego w płynie mózgowo-rdzeniowym w pierwszych godzinach od wniknięcia przez skórę, czy błony śluzowe.^{23,24} Podstawą teorii samoistnej eliminacji patogenu z układu nerwowego (ang. clearance) są obserwacje sprzed odkrycia penicyliny. Wyniki te zostały potwierdzone także współcześnie. U ok. ¼ nieleczonych chorych z kiłą wczesną można stwierdzić obecność krętków białych w płynie mózgowo-rdzeniowym (za pomocą inokulacji królików w teście biologicznym lub przy pomocy metod biologii molekularnej). W znacznie mniejszym odsetku (ok. 7%) identyfikuje się *T. pallidum* w płynie mózgowo-rdzeniowym pobranym od nieleczonych chorych z kiłą późną.^{25,26,27} W oparciu o te obserwacje stwierdzono, że u chorego z kiłą u którego doszło do wniknięcia krętków białych do układu nerwowego możliwe są trzy scenariusze: (1) samoistne usunięcie bakterii z układu nerwowego bez odpowiedzi zapalnej, (2) przejściowa odpowiedź zapalna (manifestująca się m.in. pleocytozą w płynie mózgowo-rdzeniowym) z następczym samoistnym usunięciem bakterii z układu nerwowego, i (3) odpowiedź zapalna z następczym przetrwaniem bakterii w układzie nerwowym i rozwojem powikłań neurologicznych. Uważa się, że odpowiedź immunologiczna gospodarza może odgrywać rolę w spontanicznym usuwaniu patogenów z obszaru układu nerwowego.²⁸

Na Rycinie 2 przedstawiono naturalny przebieg zajęcia układu nerwowego w kile z uwzględnieniem czasu rozwoju poszczególnych etapów (za Ghanem ²⁹). Szacuje się, że samoistna eliminacja bakterii z układu nerwowego następuje u większości chorych (80%). U pozostałych zakażonych może rozwinąć się bezobjawowa kiła układu nerwowego, która nieleczona lub leczona niewłaściwie może postępować do postaci objawowych. Jak dotychczas nie został poznany mechanizm wyjaśniający samoistną eliminację *T. pallidum* z układu nerwowego.

Bezobjawowa kiła układu nerwowego (bezobjawowe zajęcie układu nerwowego) u chorego z kiłą definiowana jest jako obecność nieprawidłowości w płynie mózgowo-rdzeniowym (np. pleocytoza, podwyższone stężenie białka, dodatnie kiłowe odczyny nieswoiste) przy braku objawów neurologicznych. ²⁹ Bezobjawowe zajęcie układu nerwowego może wystąpić zarówno w kile wczesnej i późnej. Jednak częstość bezobjawowej kiły układu nerwowego zmniejsza się wraz z czasem trwania zakażenia krętkiem bladym, na korzyść postaci objawowych.

Rycina 2. Naturalny przebieg zajęcia układu nerwowego w kile, z uwzględnieniem czasu rozwoju poszczególnych etapów choroby.



W erze przed odkryciem penicyliny dowiedziono, że chorzy z bezobjawową kiłą układu nerwowego mają istotnie wyższe ryzyko rozwoju późnych, objawowych postaci kiły układu nerwowego. Ryzyko to było wprost proporcjonalne do liczby stwierdzanych nieprawidłowości w płynie mózgowo-rdzeniowym.³⁰ Warto jednak i tu podkreślić, że także nie u wszystkich chorych z bezobjawową kiłą układu nerwowego w naturalnym przebiegu zakażenia dochodzi do rozwoju późnych postaci objawowej kiły układu nerwowego. U części chorych także na tym etapie może następować samoistna eliminacja bakterii z układu nerwowego.²⁹

Od lat 40-tych, kiedy wprowadzono penicylinę, antybiotyk ten nadal pozostaje lekiem pierwszego rzutu w leczeniu kiły. Iniekcje domięśniowe penicyliny rekomendowane są w przypadkach kiły bez zajęcia układu nerwowego. Z kolei w kile układu nerwowego konieczne jest leczenie dożylnie, wysokimi dawkami, tak aby zapewnić krętkobójcze stężenie antybiotyku w płynie mózgowo-rdzeniowym.^{21,22}

Mimo iż podawanie domięśniowe penicyliny nie powala na uzyskanie odpowiedniego stężenia leku w płynie mózgowo-rdzeniowym, w wyniku powszechnego stosowania takiego schematu leczenia kiły, odnotowano istotne zmniejszenie liczby przypadków objawowej kiły układu nerwowego. Nie rozstrzygnięto jednak ostatecznie, jakie jest ryzyko rozwoju późnej, objawowej kiły układu nerwowego, jeżeli zastosuje się standardowe leczenie (tj. penicyliną w iniekcjach domięśniowych) u chorego z kiłą wczesną i stwierdzoną bezobjawową kiłą układu nerwowego. Problem ryzyka zajęcia układu nerwowego w przebiegu kiły wczesnej powrócił wraz z epidemią HIV. Pojawiły się wówczas liczne opisy przypadków kiły układu nerwowego u chorych po standardowym leczeniu kiły wczesnej i doniesienia o zmianie dominującego typowego obrazu klinicznego kiły układu nerwowego.^{31,32,33,34}

2.2 Obraz kliniczny

Objawowa kiła układu nerwowego może występować w postaci wczesnej lub późnej. We wczesnych postaciach zakażenie dotyczy przede wszystkim opon mózgowo-rdzeniowych, płynu mózgowo-rdzeniowego, naczyń mózgu i rdzenia kręgowego. W postaciach późnych proces chorobowy dotyczy tkanki nerwowej

mózgu i rdzenia kręgowego. Klasyfikacja objawowej kiły układu nerwowego jest złożona, ze względu na różnorodność obrazu klinicznego, wynikającego z zajęcia poszczególnych struktur anatomicznych. Tradycyjnie wyróżnia się: (1) kiłowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, (2) kiłę oponowo-naczyniową, (3) kiłę mięszową i (4) kiłę kilakową. Warto podkreślić, że nierzadko wymienione postacie współistnieją ze sobą jako nakładające się zespoły objawów.⁸

Kiłowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych jest wczesną manifestacją kiły układu nerwowego, które najczęściej diagnozowane jest w pierwszych 12 miesiącach od zakażenia. Na spektrum kliniczne składają się głównie niespecyficzne objawy neurologiczne takie jak: bóle głowy, światłowstręt, nudności, wymioty, porażenia nerwów czaszkowych, rzadziej drgawki.³⁵ Szczególnie często zaczęto raportować przypadki kiłowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych po nieskutecznym leczeniu kiły wczesnej, tj. po zastosowaniu schematów leczniczych niezapewniających krętkobójczego stężenia penicyliny w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych HIV-pozytywnych.^{36,37} Jeszcze raz zwrócono uwagę, że prawidłowe działanie układu immunologicznego może być kluczowe dla procesu samoistnej eliminacji bakterii z układu nerwowego.³⁸

Kiła oponowo-naczyniowa układu nerwowego rozwija się po 5-12 latach trwającego zakażenia krętkiem bladym. Histologicznie proces ten charakteryzuje się zapaleniem błony wewnętrznej naczyń krwionośnych. Skutkuje to powstawaniem zakrzepów, z następczym niedokrwieniem obszaru zaopatrywanego przez objęte procesem chorobowym naczynia. Wczesnymi, zwiastującymi objawami, mogą być bóle głowy, zawroty głowy i bezsenność. Zwykle jednak początek jest nagły, a towarzyszące objawy neurologiczne zależą od umiejscowienia zakrzepu. Najczęściej zmiany chorobowe obejmują tętnicę środkową mózgu i jej odgałęzienia. Z tego też powodu najczęstszymi objawami są niedowład połowiczny, znieczulenie połowicze, niedowidzenie połowicze i afazja. Rzadziej kiła oponowo-naczyniowa może dotyczyć naczyń rdzenia kręgowego, manifestując się wzmożonym napięciem mięśniowym kończyn typu spastycznego, zaburzeniami funkcji zwieraczy, czy zaburzeniami czucia.²⁹ W „erze antybiotykowej” częstość kiły oponowo-naczyniowej układu nerwowego

zmniejszyła się. Szacuje się, że stanowi ona ok. 10% wszystkich stwierdzanych aktualnie przypadków kiły układu nerwowego.³⁹

W kile miąższowej układu nerwowego wyróżnia się (1) porażenie postępujące (łac. *paralysis progressiva*) i (2) wiąd rdzenia (łac. *tabes dorsalis*). Do rozwoju porażenia postępującego dochodzi po ok. 15-20 latach trwającego zakażenia krętkiem bladym. Na obraz kliniczny tej postaci kiły układu nerwowego składa się zespół objawów psychiatrycznych i neurologicznych przypominających wiele innych schorzeń. Dominują jednak objawy psychiatryczne, co można uzasadnić stwierdzanym zanikiem korowym płatów czołowych i skroniowych. Nie rozstrzygnięto ostatecznie, czy te zmiany histopatologiczne są efektem bezpośredniego oddziaływania bakterii na tkankę mózgową, czy skutkiem zmian w naczyniach krwionośnych. W oparciu o wyniki badania przeprowadzonego w Wielkiej Brytanii w 1969⁴⁰ stwierdzono, że najczęstszą manifestacją kliniczną porażenia postępującego są epizody depresyjne i zaburzenia psychotyczne (30%). Często odnotowuje się także zespoły otępienne (ok. 20%) i epizody maniakalne (11%). Warto podkreślić, że ta postać kiły układu nerwowego niemal w 20% przypadków może prowadzić do zgonu.

Średni czas konieczny do rozwoju wiądu rdzenia wynosi 20-25 lat od pierwotnego zakażenia *T. pallidum*. U podstaw zmian leży uszkodzenie korzeni tylnych i sznurów tylnych rdzenia kręgowego. Skutkuje to zespołem objawów, na który może składać się (wymieniono objawy najczęstsze): chód na szerokiej podstawie, parestezje, osłabienie odruchów głębokich, zaburzenia czucia głębokiego i wibracji, neurogenna dysfunkcja pęcherza moczowego, źrenice Argylla-Robertsona (brak reakcji źrenic na światło, z zachowaną reakcją na akomodację) i ślepotą wynikłą z zaniku nerwu wzrokowego. W naturalnym przebiegu choroby, kiła układu nerwowego pod postacią wiądu rdzenia dotyka ok. 3-9% chorych.²⁹

Kiła kilakowa mózgu i rdzenia (kilaki mózgu i rdzenia) to bardzo rzadka postać objawowej, późnej kiły układu nerwowego. Duże kilaki przebiegają z objawami klinicznymi guza mózgu, mniejsze – z objawami ogniskowymi uzależnionymi od umiejscowienia i wielkości guzów.⁸ W ostatnich latach opisanych zostało kilka przypadków tej postaci kiły u chorych HIV-pozytywnych.⁴¹

W oparciu o praktykę kliniczną i dane literaturowe stwierdzić można, że aktualnie ogromna większość chorych z kiłą układu nerwowego prezentuje objawy uprawniające do postawienia rozpoznania wczesnych postaci objawowych. Obecnie bardzo rzadko spotyka się, dobrze opisane, znane od dawna, późne postaci objawowe. Tylko w przeciągu ostatnich 10 lat opisano kilka przypadków kiły układu nerwowego „imitującej” herpetyczne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych.^{42,43,44} Istnieją ponadto doniesienia o przypadkach stanów padaczkowych^{45,46} czy postępujących zaburzeń otępiennych⁴⁷ u bardzo młodych osób, które ostatecznie zostały rozpoznane jako kiła układu nerwowego. Doniesienia te uświadamiają, że kiła układu nerwowego jest schorzeniem poważnym i wymaga czujności diagnostycznej. Niezmiernie rzadko spotyka się postaci kiły układu nerwowego o typowym, znanym powszechnie obrazie klinicznym. Choroba coraz częściej manifestuje się niecharakterystycznymi i często skąpyimi objawami neurologicznymi. A co również istotne, coraz częściej dotyczy młodych osób. Konieczne jest więc szybkie rozpoznanie i leczenie, aby zapobiec rozwojowi późnych powikłań.

2.3 Diagnostyka

Aktualnie nie ma jednego testu diagnostycznego umożliwiającego postawienie rozpoznania kiły układu nerwowego. Rozpoznanie opiera się na obrazie klinicznym i wynikach badań laboratoryjnych płynu mózgowo-rdzeniowego. CDC zdefiniowało dla celów epidemiologicznych następujące rozpoznania: „potwierdzona” kiła układu nerwowego i „prawdopodobna” kiła układu nerwowego.²² Definicje te wydają się być jednak pomocne także w praktyce klinicznej. Za „potwierdzoną” kiłę układu nerwowego należy uznać sytuację, gdy u pacjenta z kiłą (niezależnie od okresu zakażenia) stwierdza się pozytywny wynik VDRL w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR). Z kolei „prawdopodobną” kiłę układu nerwowego definiuje się jako: (1) jakikolwiek okres zakażenia kiłą, (2) negatywny wynik VDRL w płynie mózgowo-rdzeniowym, (3) pleocytoza w PMR lub podwyższone stężenia białka w PMR i (4) kliniczne objawy, mieszczące się w spektrum obrazu klinicznego kiły układu nerwowego, a które nie mogą zostać wyjaśnione w inny sposób.⁴⁸

Według europejskiej IUSTI (International Union Against Sexually Transmitted Infections) aby postawić rozpoznanie kiły układu nerwowego (zarówno objawowej jak i bezobjawowej) stwierdzić należy: (1) pozytywny wynik TPHA i/lub FTA-ABS w PMR i (2) pleocytozę w PMR i co najmniej jeden z trzech kolejnych warunków: (a) pozytywny VDRL w PMR i/lub (b) indeks IgG ≥ 70 w PMR i/lub (c) TPHA index Vienna 2000 ≥ 70 .⁴⁹

VDRL w PMR w diagnostyce kiły układu nerwowego charakteryzuje się wysoką, sięgającą 100% czułością.²² Swoistość tego testu jest jednak mniejsza i szacuje się ją na ok. 80%. Jednak niektóre dane literaturowe podają, że może ona wynosić nawet 30%.^{50, 51, 52} Oznacza to, że dodatni wynik potwierdza rozpoznanie kiły układu nerwowego, jednak ujemny go nie wyklucza. Warto podkreślić, że inny odczyn nieswoisty – RPR, równocenny z VDRL w przypadku diagnostyki serologicznej krwi, nie jest rekomendowany do płynu mózgowo-rdzeniowego.

Odczyny krętkowe, takie jak TPHA i FTA-ABS wykonywane w płynie mózgowo-rdzeniowym charakteryzują się z kolei wysoką swoistością, ale niezadowalającą czułością. Pozytywny wynik w płynie mózgowo-rdzeniowym nie potwierdza rozpoznania kiły układu nerwowego, ale ujemny z dużym prawdopodobieństwem ją wyklucza.^{53,54}

W oparciu o dostępne piśmiennictwo, liczba leukocytów w PMR (wyrażona jako liczba komórek w 1 μl) wydaje się być najlepszym parametrem dodatkowym, pomocnym w diagnostyce kiły układu nerwowego.²⁹ W rozmazie dominują limfocyty. Za punkt odcięcia powszechnie przyjmuje się 5 i więcej komórek w μl , co wiąże się z 82% czułością.⁵⁵ Ta wartość pleocytozy ma nieco mniejszą swoistość w diagnostyce kiły układu nerwowego u chorych HIV-pozytywnych. Dowiedziono bowiem, że u tych chorych liczba leukocytów w PMR może być podwyższona i związana wyłącznie z infekcją HIV.⁵⁶ Dane sugerujące, że punkt odcięcia dla pleocytozy 10 komórek/ μl u chorych HIV-pozytywnych poddawanych leczeniu antyretrowirusowemu i 20 komórek/ μl u chorych HIV-pozytywnych bez leczenia antyretrowirusowego może polepszyć swoistość diagnostyczną kiły układu nerwowego, są ograniczone.²⁹ Warto zaznaczyć, że w kile wczesnej nieznaczna pleocytoza może być jedynym parametrem sugerującym zajęcie układu nerwowego. Znaczne zwiększenie liczby

leukocytów w płynie mózgowo-rdzeniowym (do 2000 komórek/ μ l) obserwowane jest w ostrym kiłowym zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych. W późnych, objawowych postaciach kiły układu nerwowego (tj. porażeniu postępującym, czy wiądzie rdzenia) pleocytoza zwykle waha się w granicach 25-75 komórek/ μ l. Jednak u ok. 10% chorych z taką manifestacją kliniczną kiły układu nerwowego liczba leukocytów w PMR może być w granicach normy.²⁹ Podkreślić należy, że zmniejszenie liczby leukocytów w badaniu płynu mózgowo-rdzeniowego wykonanym po leczeniu kiły układu nerwowego jest głównym markerem prawidłowej odpowiedzi na leczenie.^{21,22}

Białka wykrywane w płynie mózgowo-rdzeniowym składają się głównie z dwóch frakcji: albumin i globulin. Podczas procesu zapalnego toczącego się w obszarze układu nerwowego można stwierdzić zwiększone stężenie białka w PMR zazwyczaj ≥ 45 mg/dl. Częstość tej nieprawidłowości w kile układu nerwowego zależy od obrazu klinicznego. Po prawidłowym leczeniu kiły układu nerwowego stężenie białka w PMR normalizuje się powoli.²¹

Indeks IgG i TPHA Index Vienna 2000 są parametrami rekomendowanymi w diagnostyce kiły układu nerwowego wyłącznie przez IUSTI. Indeks IgG jest ilorazem stężenia IgG w PMR do stężenia IgG w surowicy krwi, pomnożonym przez iloraz stężenia albumin w PMR do stężenia albumin w surowicy krwi (tzw. współczynnik albuminowy). Eksperci z krajów Ameryki Północnej uznali z kolei badania oceniające wartość diagnostyczną indeksu IgG za niewystarczająco jednoznaczne i nie rekomendują go w codziennej praktyce klinicznej.²⁹ TPHA Index Vienna 2000 jest ilorazem miana TPHA w PMR do współczynnika albuminowego (iloraz stężenia albumin w PMR do stężenia albumin w surowicy krwi) pomnożonym przez 1000. Czułość metody w diagnostyce kiły układu nerwowego porównywalna jest do czułości VDRL w PMR. Szacuje się, że swoistość testu jest znamienne wyższa. Sami autorzy doniesienia podkreślają jednak, że użyteczność diagnostyczna TPHA Index Vienna 2000 powinna być potwierdzona przez drugi, niezależny zespół.⁴⁹

Podsumowując, nie ma aktualnie „złotego standardu” diagnostycznego dla kiły układu nerwowego. Rozpoznanie wymaga bezwzględnie uwzględnienia obrazu klinicznego i wyników co najmniej kilku badań laboratoryjnych płynu mózgowo-rdzeniowego. VDRL w PMR jest niezmiernie pomocny dla postawienia

rozpoznania. Należy jednak pamiętać o tym, że wynik ujemny nie wyklucza choroby.

2.4 Kiła układu nerwowego u chorych HIV-pozytywnych

Aktualne dane dostępne z piśmiennictwa sugerują, że wnikanie krętków białych do układu nerwowego na wczesnym etapie kiły jest niezależne od współistnienia zakażenia HIV.^{57, 58} Nie mniej jednak dowiedziono, że ryzyko bezobjawowej kiły układu nerwowego, definiowanej restrykcyjnie jako pozytywny VDRL w płynie mózgowo-rdzeniowym, jest istotnie większe u chorych HIV-pozytywnych jeśli liczba komórek CD4⁺ we krwi jest mniejsza niż 350/ μ l.²⁷

Zauważono, że u HIV-pozytywnych chorych z kiłą coraz częściej dochodzi do nawrotu choroby pod postacią objawów neuro-psychiatrycznych i/lub nieprawidłowości w badaniu płynu mózgowo-rdzeniowego (ang. neurorelapse). Nawrót objawów neurologicznych (ang. neurorelapse) definiowany jest jako kiła układu nerwowego (objawowa lub bezobjawowa), która rozwija się w różnie długim okresie po standardowym (tj. penicylina domięśniowo) leczeniu kiły I, II okresu lub kiły utajonej wczesnej. Choć sytuacja taka możliwa jest u chorych immunokompetentnych^{59, 60}, doniesienia literaturowe sugerują, że jest częstsza u osób HIV-pozytywnych.^{31,32,33,34}

3. Odpowiedź komórkowa w kile

Na podstawie badań sprzed wielu lat sugerowano, że odpowiedź komórkowa w kile ulega supresji.^{61,62} Nowsze dane wskazują jednak, że odpowiedź komórkowa, która rozwija się w kile wczesnej, skutkuje eliminacją bakterii z miejsca ich wniknięcia, co klinicznie manifestuje się samoistnym ustępowaniem objawów. Niewyjaśnione jednak pozostają mechanizmy, dlaczego u części chorych po ustąpieniu objawów dochodzi do samowyleczenia, a u innych choroba postępuje.

Znaczenie swoistej odpowiedzi immunologicznej w kile udokumentowano po raz pierwszy w latach 70-tych i 80-tych w oparciu o badania na króliczym modelu kiły. Stwierdzono, że w miejscu inokulacji krętków białych w niedługim czasie

rozwija się nasiloną odpowiedź zapalna o charakterze nadwrażliwości typu późnego.^{63,64} Uwzględniając, że *T. pallidum* nie produkuje cytotoksyn oraz jak do tej pory nie są znane inne czynniki wirulentne tej bakterii, wydaje się prawdopodobne, że za zmiany narządowe i tkankowe obserwowane w przebiegu kiły, odpowiada wyłącznie ostra, nieswoista odpowiedź zapalna i kolejno indukowana odpowiedź swoista.

Krętek blady po wtargnięciu przez skórę lub błony śluzowe szybko dostaje się do głębiej położonych tkanek i krwi.⁹ Jednym z elementów odpowiedzi nieswoistej związanej z miejscowym zakażeniem *T. pallidum* jest stymulacja komórek skóry do produkcji metaloproteinazy 1, która rozkłada kolagen, co ułatwia penetrację bakterii do głębszych warstw tkanek.⁶⁵ *T. pallidum* indukuje ponadto ekspresję cząsteczek adhezyjnych (ICAM-1, VCAM-1) na powierzchni komórek śródbłonna, dzięki czemu możliwa staje się migracja komórek zapalnych z krwiobiegu do zakażonych tkanek.⁶⁶

Komórki dendrytyczne, a zwłaszcza ich wyspecjalizowana subpopulacja występująca przede wszystkim w skórze i błonach śluzowych – komórki Langerhansa, wydają się być pierwszym istotnym ogniwem w komórkowej odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zakażenia *T. pallidum*. Udowodniono, że lipoproteiny krętka bladego za pośrednictwem receptorów toll-podobnych typu 2 (ang. TLR – toll-like receptors) pobudzają komórki dendrytyczne. Patogeny są następnie fagocytowane przez te komórki, które kolejno migrują do węzłów chłonnych, gdzie prezentują antygeny bakteryjne swoistym limfocytom T.⁶⁷ Co interesujące, lipoproteiny krętka bladego, stymulujące komórki dendrytyczne nie są zlokalizowane powierzchniowo. Oznacza to, że aby zapoczątkować odpowiedź nieswoistą komórek dendrytycznych, bakteria musi ulec przynajmniej częściowej degradacji. W modelach doświadczalnych kiły dowiedziono, że czas potrzebny do pobudzenia komórek dendrytycznych przez *T. pallidum* jest dłuższy niż w innych zakażeniach bakteryjnych. Opóźnienie w pobudzeniu, dojrzewaniu i migracji komórek dendrytycznych do węzłów chłonnych częściowo tłumaczy obserwowany wczesny rozsiew bakterii z miejsca wniknięcia do różnych tkanek i narządów.⁶⁸

Komórki dendrytyczne w kile pełną funkcję pomostu między nieswoistą i swoistą odpowiedzią immunologiczną, głównie poprzez prezentację antygenów

krętkowych limfocytom T w węzłach chłonnych oraz kolejno stymulację limfocytów T do różnicowania i migracji w miejsce wniknięcia bakterii. W modelu króliczym kiły stwierdzono obecność limfocytów T w miejscu wniknięcia bakterii do organizmu już w 3 dniu po zakażeniu. Największa ich liczba w tkankach odnotowana została między 10-13 dniem od zakażenia i ściśle korelowała z liczbą namnażających się w miejscu inokulacji krętków białych. Między 6-10 dniem od zakażenia stwierdzono istotny wzrost liczby makrofagów w nacieku komórkowym, przy czym największą liczbę tych komórek zaobserwowano między 13-17 dniem. W tym czasie obserwowano także znamienne obniżanie liczby krętków białych w badanej tkance.^{69,70}

W materiałach tkankowych pochodzących ze zmian skórnych i śluzówkowych kiły I i II okresu u ludzi stwierdza się zwiększoną ekspresję Interferonu γ (IFN- γ), Interleukiny 2 (IL-2) (cytokiny typowe dla odpowiedzi komórkowej typu Th1) i Interleukiny 10 (IL-10).⁷¹ W zmianach skórnych i śluzówkowych w kile I okresu dominują makrofagi i limfocyty CD4⁺.⁷² W nacieku zapalnym w zmianach skórnych typowych dla kiły II okresu obok makrofagów przeważają z kolei limfocyty CD8⁺.⁷³ Z obecnością limfocytów T CD8⁺ w zmianach skórnych kiły II okresu wiąże się także obecność markerów aktywacji tych komórek - granzymu b i perforyny.⁷² Warto jednak podkreślić, że krętek biały jest patogenem niemal wyłącznie zewnątrzkomórkowym. Natomiast limfocyty T CD8⁺ odpowiadają głównie na antygeny prezentowane w kontekście MHC klasy I (szlak prezentacji peptydów endogennych). Dlatego, rola tych komórek w odpowiedzi na zakażenie krętkiem białym pozostaje niejasna. Wydaje się jednak, że mediatory produkowane przez limfocyty T CD8⁺ obecne w miejscu zakażenia, istotnie przyczyniają się do destrukcji tkanek, co znajduje odzwierciedlenie w obrazie klinicznym.

Rola makrofagów w eliminacji krętków została zasugerowana po raz pierwszy, gdy zidentyfikowano całe lub częściowo zdegradowane patogeny w wakuolach fagocytarnych makrofagów.⁷⁴ Kolejno dowiedziono, że w odpowiedzi na cytokiny produkowane przez limfocyty T (głównie IFN- γ), makrofagi migrują w miejsce zakażenia, fagocytują i zabijają krętki białe.⁷⁵ Fagocytoza jest bardziej efektywna jeśli patogen jest dodatkowo opłaszczony białkami układu dopełniacza, immunoglobulinami czy też przeciwciałami skierowanymi

przeciwko antygenom lipidowym.⁷⁶ Co interesujące, z nieznanym dotychczas przyczyn, część krętków białych jest oporna na opsonizację, tym samym może nie być fagocytowana przez makrofagi. Zasugerowano, że ta subpopulacja bakterii może przetrwać w miejscu zakażenia i w sytuacji gdy chory nie jest leczony, odpowiada za progresję choroby.⁷⁷

W zmianach typowych dla kiły I i II okresu stwierdza się podwyższoną ekspresję IL-10. Cytokina ta może być produkowana zarówno przez limfocyty T CD4⁺ CD25⁺ (tzw. limfocyty regulatorowe) jak i makrofagi. IL-10 wykazuje głównie działanie hamujące odpowiedź zapalną. Wydaje się, że cytokiny przeciwzapalne mogą odgrywać ważną rolę w odpowiedzi na zakażenie. Z jednej strony podkreśla się, że osłabiona aktywacja komórek produkujących cytokiny przeciwzapalne na wczesnym etapie zakażenia może doprowadzić do nadmiernej, niekontrolowanej odpowiedzi prozapalnej. Może to skutkować nadmiernym uszkodzeniem tkanek i narządów. Z drugiej strony nadmierna odpowiedź przeciwzapalna może prowadzić do osłabienia odpowiedzi prozapalnej, i tym samym utrudnić eliminację patogenu, predysponując do przewlekłego lub nawrotowego zakażenia.⁷⁸ Dotychczas nie wyjaśniono jednoznacznie które komórki układu immunologicznego są głównym źródłem IL-10 w poszczególnych okresach zakażenia oraz czy cytokiny przeciwzapalne mogą odgrywać rolę w progresji zakażenia krętkiem białym.

W ostatnim czasie odkrytą nową subpopulację limfocytów T – określaną jako komórki Th17, które charakteryzują się produkcją Interleukiny 17 (IL-17). Przypuszcza się, że odkrywają one ważną rolę w zwalczaniu zakażeń wywołanych przez bakterie zewnątrzkomórkowe, odpowiedzi immunologicznej w chorobach nowotworowych i patogenezie chorób z autoagresji.⁷⁹ Najnowsze badania Stary i in. wykazały, że spośród limfocytów T CD8⁺ dominujących w nacieku zapalnym w zmianach skórnych typowych dla kiły II okresu, większość stanowią komórki produkujące równocześnie IFN- γ i IL-17.⁸⁰ Rola limfocytów T CD8⁺ IFN- γ ⁺ IL17⁺ w odpowiedzi immunologicznej w kile nie jest znana. Przedmiotem dyskusji pozostaje, czy komórki te zaangażowane są w eliminację bakterii, czy w większym stopniu odpowiadają za uszkodzenie tkanek i narządów.

Charakter odpowiedzi immunologicznej w kile układu nerwowego jest jeszcze mniej poznany. Dotychczas jedynie w oparciu o doświadczalny model kiły układu nerwowego u makaków i królików stwierdzono, że komórkami zaangażowanym w eliminację krętków białych z układu nerwowego są limfocyty CD4⁺ i makrofagi.⁸¹ W płynie mózgowo-rdzeniowym badanych zwierząt ujawniono podwyższone stężenia IFN- γ , IL-2 i IL-10. Wydaje się zatem, że odpowiedź komórkowa na zakażenie układu nerwowego we wczesnym stadium kiły jest podobna do obserwowanej w przypadku kiły I okresu. Należy jednak podkreślić, że w cytowanym badaniu, u wszystkich zwierząt w toku naturalnego przebiegu choroby nastąpiła samoistna eliminacja krętków białych z układu nerwowego.

4. Cel pracy i hipotezy badawcze

4.1 Hipotezy badawcze

- a. W płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z wczesną bezobjawową kiłą układu nerwowego, w porównaniu do chorych z kiłą wczesną bez zajęcia układu nerwowego, obserwuje się wyższe stężenia cytokin typowych dla odpowiedzi prozapalnej typu Th1 i Th17.
- b. Markery aktywacji odpowiedzi komórkowej typu Th1 i Th17 w płynie mózgowo-rdzeniowym korelują ze standardowo oznaczonymi parametrami stanu zapalnego (tj. pleocytoza, stężenie białka, stężenie glukozy).
- c. W płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z kiłą wczesną bez zajęcia układu nerwowego, w porównaniu do chorych z wczesną bezobjawową kiłą układu nerwowego obserwuje się wyższe stężenia cytokin o właściwościach hamujących odpowiedź zapalną.

4.2 Cele pracy

- a. Ocena stężenia cytokin typowych dla odpowiedzi komórkowej typu Th1 (IFN- γ), Th2 (Interleukiny 4 - IL-4) i Th17 (IL-17A) oraz cytokin o właściwościach hamujących odpowiedź zapalną (Transformującego czynnika wzrostu β , ang. Transforming growth factor β -TGF- β i IL-10)

w płynie mózgowo-rdzeniowym i we krwi chorych z kiłą wczesną bez i z zajęciem układu nerwowego.

- b. Ocena stężenia cytokin typowych dla nieswoistej odpowiedzi zapalnej (Czynnika martwicy nowotworu α , ang. Tumor necrosis factor α – TNF α ; Interleukiny 1 β - IL-1 β) w płynie mózgowo-rdzeniowym i we krwi chorych z kiłą wczesną bez i z zajęciem układu nerwowego.
- c. Analiza korelacji między stężeniami analizowanych cytokin a wybranymi parametrami laboratoryjnymi w płynie mózgowo-rdzeniowym i parametrami klinicznymi.

5. Materiał i metody

5.1 Charakterystyka grup i kryteria włączenia do badania

Do badania włączono 33 chorych z kiłą wczesną (II okresu lub utajoną), zrekrutowanych spośród chorych hospitalizowanych w Oddziale Klinicznym Kliniki Dermatologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych ochotników dobranych pod względem płci i wieku. Wszystkie osoby wyraziły świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniu, na przeprowadzenie którego uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Rozpoznanie kiły zostało oparte na obrazie klinicznym, wynikach badań serologicznych krwi i wywiadzie chorobowym wg kryteriów CDC.²² Za kiłę wczesną przyjęto okres zakażenia nie przekraczający roku (za CDC). Kryteria uprawniające do rozpoznania kiły utajonej wczesnej przyjęto za CDC (Tabela 2). Za kryteria wykluczenia przyjęto: (1) przewlekłe choroby zapalne, w tym autoimmunologiczne, (2) przyjmowanie w przeciągu ostatniego roku antybiotyków z jakiegokolwiek powodu, (3) kiła w wywiadzie.

Bezobjawową kiłę układu nerwowego (dalej nazywaną kiłą układu nerwowego) zdefiniowano jako: (1) brak objawów neurologicznych i (2) pozytywny wynik VDRL w PMR. Za bezobjawową prawdopodobną kiłę układu nerwowego (dalej nazywaną prawdopodobną kiłą układu nerwowego) przyjęto: (1) brak objawów neurologicznych, (2) negatywny wynik VDRL w PMR, (3) pleocytozę w PMR ≥ 5 komórek/mm³.

Tabela 2. Kryteria niezbędne do postawienia rozpoznania kiły utajonej wczesnej

Pozytywne wyniki badania serologicznego krwi w kierunku kiły i brak objawów klinicznych	
i	
w przeciągu minionego roku	u pacjenta nastąpiła udokumentowana serokonwersja odczynów kiłowych z ujemnych na dodatnie
	lub
	u pacjenta nastąpił co najmniej 4-krotny wzrost miana odczynu niekrętkowego w porównaniu do wyników wcześniejszych badań
	lub
	w oparciu o wywiad stwierdzono, że pacjent mógł mieć objawy odpowiadające kile I lub II okresu
	lub
	partner seksualny chorego na kiłę był leczony z powodu kiły I, II okresu lub utajonej wczesnej
	lub
w oparciu o wywiad stwierdzono, że pacjent miał kontak(-ty) seksualne podczas których mogło dojść do zakażenia	

5.2 Plan badania

U wszystkich chorych w dniu przyjęcia do szpitala przeprowadzone zostało badanie podmiotowe i przedmiotowe, ze szczególnym zwróceniem uwagi na występowanie zmian skórnych i/lub śluzówkowych. Kolejno została zabezpieczona krew żylna do: (1) podstawowych badań analitycznych (tj. morfologia krwi, CRP, próby wątrobowe, parametry nerkowe i inne standardowe parametry biochemiczne), (2) badań w kierunku innych niż kiła chorób przenoszonych drogą płciową (HIV, HBV, HCV), (3) badań immunologicznych (patrz poniżej). Wszyscy chorzy przyjęci do szpitala mieli wykonane w warunkach ambulatoryjnych pełne badanie serologiczne krwi w kierunku kiły (tj. VDRL - miano, TPHA – wynik jakościowy, FTA - miano i FTA-ABS – wynik jakościowy). Badania te po przyjęciu do szpitala nie były powtarzane. W żadnym z przypadków odstęp czasowy między wykonaniem badań serologicznych krwi w kierunku kiły, a przyjęciem do szpitala nie przekraczał 2 tygodni.

Kolejno chorzy byli badani przez specjalistę neurologa. Badanie to uwzględniało szczegółowy wywiad, dotyczący występujących w przeciągu minionego roku dolegliwości takich jak: bóle głowy, bóle i parestezje kończyn

dolnych, zawroty głowy, zaburzenia świadomości, drgawki, zaburzenia widzenia, niedowład kończyn, zaburzenia chodu, zaburzenia w oddawaniu moczu i stolca, zaburzenia snu. Następnie przeprowadzone zostało badanie fizykalne uwzględniające: obecność objawów oponowych, funkcję nerwów czaszkowych, funkcję układu ruchu, badanie czucia, badanie mowy, badanie praktyki i ocenę stanu psychicznego.

Następnie u chorych wykonywano nakłucie lędźwiowe w pozycji siedzącej z dostępu między wyrostkami kolczystymi kręgów L₃ i L₄ lub L₄ i L₅. W każdym przypadku uzyskano płyn mózgowo-rdzeniowy bez makroskopowych cech zanieczyszczenia krwią, który zabezpieczono do: (1) podstawowych badań analitycznych (tj. liczba leukocytów, stężenie białka, stężenie glukozy), (2) badań serologicznych w kierunku kiły (tj. VDRL i TPHA), (3) badań immunologicznych (patrz niżej).

W grupie kontrolnej pobierano wyłącznie krew żylną do: (1) badań serologicznych krwi w kierunku kiły i (2) badań immunologicznych.

Celem weryfikacji postawionych hipotez w zabezpieczonych próbkach krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego oznaczono stężenia cytokin typowych dla odpowiedzi immunologicznej nieswoistej – TNF- α i IL-1 β , oraz swoistej: IFN- γ , IL-4, IL-17A i (4) hamującej odpowiedź zapalną – TGF- β i IL-10.

5.3 Oznaczenie stężeń cytokin

Stężenia badanych cytokin oznaczono w surowicy krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na kiłę i wyłącznie w surowicy krwi osób z grupy kontrolnej metodą immunoenzymatyczną (ELISA). Wykorzystano komercyjnie dostępne zestawy o wysokiej czułości firmy R&D Systems, Minneapolis, USA. Procedurę laboratoryjną przeprowadzono zgodnie z zaleceniem producenta. Limity detekcji cytokin wynosiły odpowiednio IFN- γ – 0,08 pg/ml, IL-17A – 0,12 pg/ml, IL-4 – 0,13 pg/ml, TNF- α – 0,13 pg/ml, IL-1 β – 0,14 pg/ml, IL-10 – 0,05 pg/ml, TGF- β – 15,4 pg/ml i były takie same dla surowicy krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego.

5.4 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem programu GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). W pierwszej fazie testowano dane pod względem zgodności z rozkładem normalnym (test Kolmogorova-Smirnova). Do oceny różnic między analizowanymi grupami, w tym w charakterystyce wyjściowej grup zastosowano test χ^2 (zmienne kategoryczne) i Kruskal'a-Wallisa (zmienne ciągłe). W analizie *post-hoc* wykorzystano test Dunnett'a. Korelacje pomiędzy zmiennymi ciągłymi zostały przedstawione jako wartości współczynnika rang Spermana'a. W każdej z analiz przyjęto poziom istotności $\alpha < 0,05$.

6. Wyniki

6.1 Charakterystyka kliniczna osób biorących udział w badaniu

Do badania włączono 33 chorych z kiłą wczesną w wieku od 19-56 lat. Wszyscy byli mężczyznami. 75,8% chorych (n=25) zadeklarowało kontakty homoseksualne. Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych ochotników – mężczyzn w wieku od 20-53 lat. Podmiotowe i przedmiotowe badanie neurologiczne nie ujawniło odchyleń u żadnego z chorych na kiłę. Czas trwania zakażenia w badanej grupie wynosił od 2 do 12 miesięcy i określany był na podstawie wywiadu i obrazu klinicznego zmian skórnych i śluzówkowych. Współwystępowanie zakażenia HIV stwierdzono u 8 chorych. Czerech spośród nich było w trakcie leczenia antyretrowirusowego. U dwóch chorych zdiagnozowano infekcję HIV po raz pierwszy podczas hospitalizacji związanej z kiłą. Pozostali dwaj pozostawali w opiece Poradni Nabytych Niedoborów Odporności Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. U wszystkich HIV-pozytywnych chorych liczba komórek CD4⁺ we krwi przekraczała 350/ μ l.

W analizowanej grupie u żadnego chorego nie wykryto zakażenia wirusami zapalenia wątroby typu B i C.

6.1.1 Nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych płynu mózgowo-rdzeniowego

W oparciu o wyniki badania płynu mózgowo-rdzeniowego (patrz „Materiał i metody”) wśród badanych wyodrębniono trzy grupy kliniczne: (1) kiła układu nerwowego, (2) prawdopodobna kiła układu nerwowego i (3) kiła bez zajęcia układu nerwowego. U pięciu chorych na kiłę stwierdzono pozytywny wynik VDRL w płynie mózgowo-rdzeniowym. Chorych tych zakwalifikowano do grupy „kiła układu nerwowego”. Wszyscy chorzy z tak zdefiniowaną kiłą układu nerwowego mieli także pozytywny wynik TPHA w PMR. U 6 chorych stwierdzono pleocytozę ≥ 5 leukocytów/ mm^3 przy równocześnie negatywnym wyniku VDRL w PMR (grupa „prawdopodobna kiła układu nerwowego”). W tej grupie tylko jeden chory miał pozytywny odczyn TPHA w płynie mózgowo-rdzeniowym. U pozostałych chorych ($n=22$; grupa „kiła bez zajęcia układu nerwowego”) nie stwierdzono powyższych nieprawidłowości, ale 13 osób miało podwyższone stężenie białka w płynie mózgowo-rdzeniowym (tj. ≥ 45 mg/dl). Żaden chory z grupy „kiła bez zajęcia układu nerwowego” nie miał pozytywnego odczynu TPHA w PMR.

W Tabeli 3 podsumowano wyniki badania płynu mózgowo-rdzeniowego we wszystkich trzech grupach klinicznych wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania.

Znamiennie statystycznie większą liczbę leukocytów w PMR, wyższe stężenie białka w PMR i niższe stężenie glukozy w PMR odnotowano w grupie chorych z kiłą układu nerwowego w porównaniu do pozostałych grup.

W grupie z kiłą układu nerwowego (pozytywny VDRL w PMR) było 2 chorych, którzy dodatkowo mieli infekcję HIV. W grupie z prawdopodobną kiłą układu nerwowego (negatywny VDRL w PMR, ale pleocytoza w PMR) chorych z współistniejącą infekcją HIV było czterech. Dwóch chorych HIV-pozytywnych w związku z niespełnieniem kryteriów zakwalifikowano do grupy „kiła bez zajęcia układu nerwowego” (Tabela 4). Tym samym, w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy w liczbie chorych ze współistniejącą infekcją HIV.

Tabela 3. Wyniki badania płynu mózgowo-rdzeniowego w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania.

	Kiła układu nerwowego n=5	Prawdopodobna kiła układu nerwowego n=6	Kiła bez zajęcia układu nerwowego n=22	p
VDRL w PMR; n (%)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	-
TPHA w PMR; n (%)	5 (100)	1 (16,7)	0 (0)	-
Leukocyty w PMR; komórki/ μ l	30 (9-130)*,##	7 (5-26)	1 (0-3)	0,0001
Stężenie białka w PMR; mg/dl	80 (72-132)##	53 (36-82)	44 (23-71)	0,006
Stężenie glukozy w PMR; mmol/l	2,45 (1,8-2,8)#	3 (2,6-2,9)	2,9 (2,5-3,4)	0,04

Wartości zostały podane jako mediany (min-max) lub w inny zdefiniowany sposób.

PMR – płyn mózgowo-rdzeniowy.

Wartości p w ostatniej kolumnie podane są dla analizy statystycznej testem Kruskala-Wallisa obejmującej trzy grupy chorych.

Różnice znamienne statystycznie w porównaniu do grupy prawdopodobna kiła układu nerwowego; *p<0,05; **p<0,01

Różnice znamienne statystycznie w porównaniu do grupy kiła bez zajęcia układu nerwowego; #p<0,05; ##p<0,01

Tabela 4. Częstość pleocytozy w PMR i podwyższonego stężenia białka w PMR w grupach wyodrębnionych zgodnie ze statusem w zakresie zakażenia HIV i wynikiem odczynu VDRL w PMR.

	HIV-negatywni (n=25)		HIV-pozytywni (n=8)	
	pozytywny VDRL w PMR (n=3)	negatywny VDRL w PMR (n=22)	pozytywny VDRL w PMR (n=2)	negatywny VDRL w PMR (n=6)
Leukocyty \geq 5 komórek/ μ l w PMR; n	3	2	2	4
Stężenie białka \geq 45 mg/dl w PMR; n	3	7	2	4
Zarówno leukocyty \geq 5 komórek/ μ l w PMR i stężenie białka \geq 45 mg/dl w PMR; n	3	1	2	2

6.1.2 Obraz kliniczny kiły

W oparciu o wywiad uwzględniający czas ryzykownego kontaktu seksualnego i występujące objawy kliniczne, które chory sam zauważył oszacowano czas trwania zakażenia, który nie różnił się w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania (Tabela 5). Częstość poszczególnych objawów klinicznych nie różniła się istotnie między

analizowanymi grupami, za wyjątkiem łysienia kiłowego. Objaw ten znamienne częściej został odnotowany w grupie chorych z kiłą układu nerwowego w porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego (Tabela 5).

Tabela 5. Szacowany czas trwania zakażenia i częstość poszczególnych objawów klinicznych kiły wczesnej w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania.

	Kiła układu nerwowego n=5	Prawdopodobna kiła układu nerwowego n=6	Kiła bez zajęcia układu nerwowego n=22
Szacowany czas trwania zakażenia, mediana miesięcy (min-max)	7 (5-12)	4 (3-7)	5 (2-12)
Brak objawów skórnych i śluzówkowych; n (%)	2 (40)	1 (16,7)	8 (36,4)
Osutka plamista głównie na tułowiu; n (%)	0 (0)	2 (33,3)	6 (27,3)
Osutka plamisto-grudkowa na podszewkach i dłoniach; n (%)	1 (20)	4 (66,7)	6 (27,3)
Kiłowe zapalenie gardła; n (%)	1 (20)	3 (50)	7 (31,8)
Łysienie kiłowe; n (%)	2 (40)#	0 (0)	1 (4,5)

Różnice znamienne statystycznie w porównaniu do grupy kiła bez zajęcia układu nerwowego; #p<0,05; ##p<0,01

6.1.3 Wyniki podstawowych badań laboratoryjnych krwi i wybrane parametry demograficzne

Analizowane grupy różniły się istotnie statystycznie wiekiem, liczbą monocytów i stężeniem białka C-reaktywnego (Tabela 6). Statystyczna analiza *post hoc* wykazała, że w odniesieniu do wieku i liczby monocytów wyrażonej jako procent całkowitej liczby leukocytów, istotna różnica dotyczyła grupy chorych z prawdopodobną kiłą układu nerwowego i kiłą bez zajęcia układu nerwowego (p<0,05). W odniesieniu do stężenia białka C-reaktywnego w teście *post hoc* stwierdzono istotną różnicę między grupą chorych z kiłą układu nerwowego a prawdopodobną kiłą układu nerwowego (p<0,05).

Tabela 6. Wyniki podstawowych badań laboratoryjnych krwi i mediany wieku w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania.

	Kiła układu nerwowego n=5	Prawdopodobna kiła układu nerwowego n=6	Kiła bez zajęcia układu nerwowego n=22	p
Wiek; lata (min-max)	33 (21-46)	37,5 (33-40) [#]	29 (19-53)	0,04
Leukocyty; x10 ³ /mm ³	6,7 (1,4)	5,65 (1,4)	5,4 (1,6)	0,67
Limfocyty; x10 ³ /mm ³	1,9 (0,3)	1,5 (0,15)	2,1 (0,7)	0,09
Limfocyty; (%)	29,3 (7,6)	28,75 (9,9)	29,7 (13,2)	0,54
Neutrofile; x10 ³ /mm ³	3,7 (0,6)	3,85 (1,7)	3,5 (1,7)	0,88
Neutrofile; (%)	57,1 (4,4)	66,5 (14,9)	59 (19,1)	0,22
Eozynofile; (%)	3,5 (1)	2 (0,5)	1,5 (1)	0,12
Monocyty; (%)	8 (1)	4,5 (1,75) [#]	8 (0)	0,02
ALT; U/l	31 (10)	32 (32)	33 (19)	0,66
AST; U/l	20 (4)	29 (22)	25 (9,3)	0,08
Bilirubina całkowita; mmol/l	17 (3)	14 (5)	17 (6,3)	0,16
Kreatynina; mmol/l	74 (13)	75 (2)	76 (13,3)	0,66
Glukoza; mmol/l	4,4 (0,2)	4,8 (1,1)	4,7 (0,5)	0,18
CRP; mg/dl	5 (0) [*]	14,1 (4)	5,5 (8,1)	0,03

Dane są przedstawione jako mediany i rozstęp międzykwartyłowy lub min-max lub w inny zdefiniowany sposób.

Wartości p w ostatniej kolumnie podane są dla analizy statystycznej testem Kruskala-Wallisa obejmującej trzy grupy chorych.

ALT – aminotransferaza alaninowa, AST – aminotransferaza asparaginianowa, CRP – białko C-reaktywne.

Różnice znamienne statystycznie w porównaniu do grupy prawdopodobna kiła układu nerwowego; *p<0,05; **p<0,01

Różnice znamienne statystycznie w porównaniu do grupy kiła bez zajęcia układu nerwowego; #p<0,05; ##p<0,01

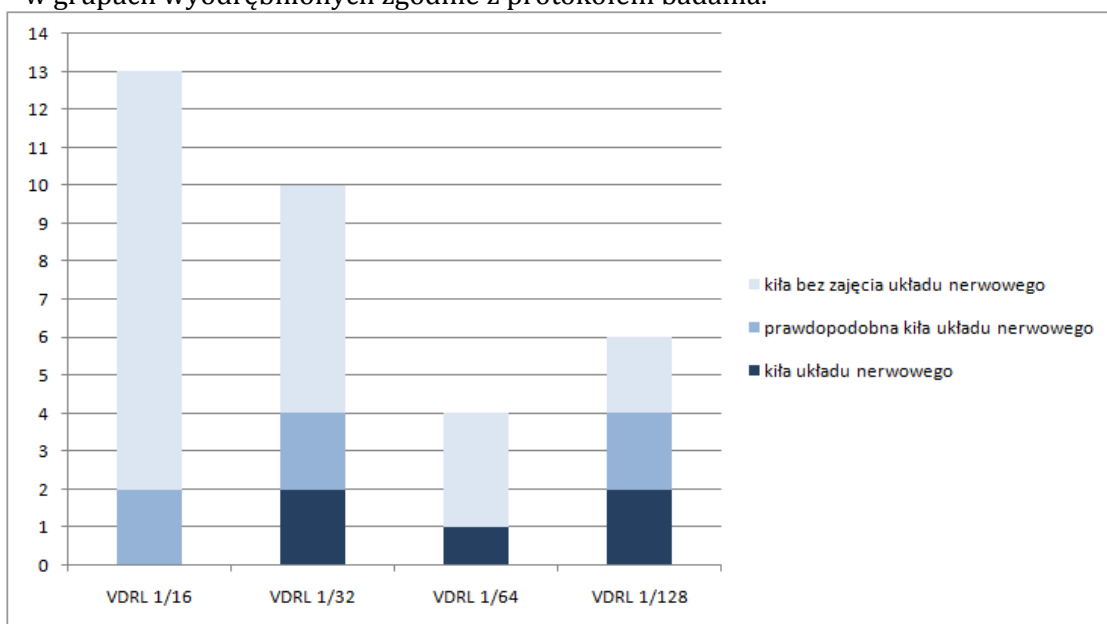
6.1.4 Wyniki badań serologicznych krwi

U wszystkich uczestników badania wykonano odczyny kiłowe w surowicy krwi. U wszystkich uczestników z grupy kontrolnej uzyskano negatywne wyniki wszystkich wykonanych odczynów kiłowych. W grupie chorych, wszystkie badane odczyny były pozytywne. Wyniki badań TPHA i FTA-ABS podano jakościowo, a wyniki badań VDRL i FTA podano ilościowo w postaci miana.

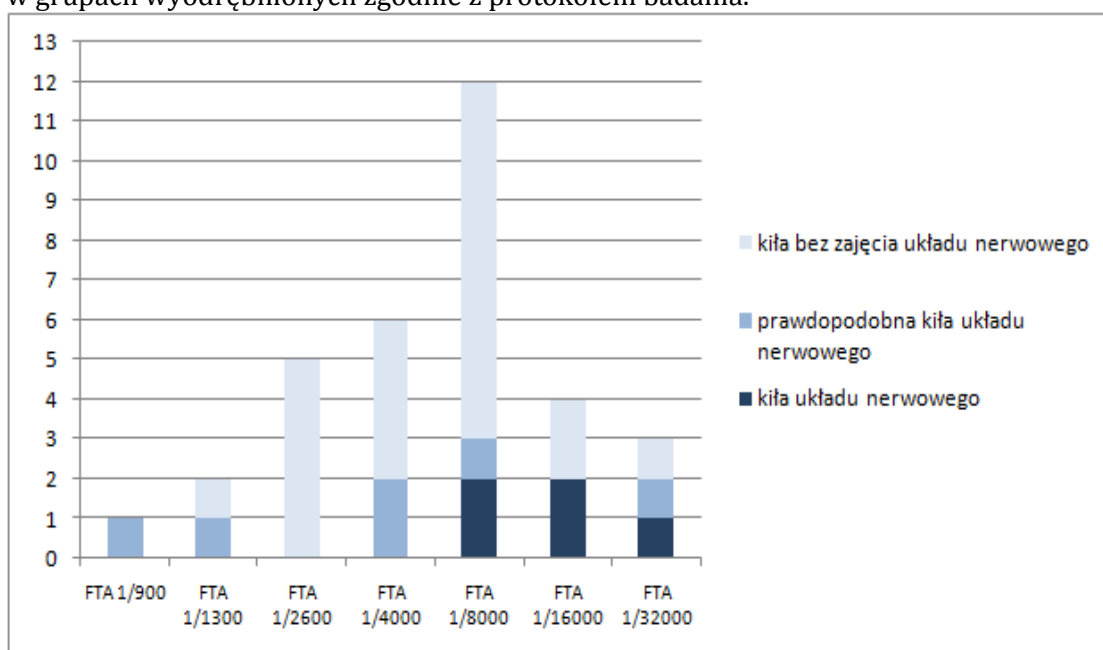
Na rycinie 3 przedstawiono liczbę chorych z poszczególnymi mianami odczynu VDRL w surowicy krwi w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania. Różnice w częstości poszczególnych mian odczynu VDRL w surowicy krwi między analizowanymi grupami nie były istotne statystycznie.

Na Rycinie 4 przedstawiono liczbę chorych z poszczególnymi mianami odczynu FTA w surowicy krwi w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania. Różnice w częstości poszczególnych mian odczynu FTA w surowicy krwi między analizowanymi grupami nie były istotne statystycznie.

Rycina 3. Liczba chorych z poszczególnymi mianami odczynu VDRL w surowicy krwi w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania.



Rycina 4. Liczba chorych z poszczególnymi mianami odczynu FTA w surowicy krwi w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania.



6.2 Stężenia cytokin w surowicy krwi

Między stężeniami analizowanych cytokin w surowicy krwi w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania i w grupie kontrolnej nie odnotowano istotnych statystycznie różnic (Tabela 7).

Tabela 7. Stężenia analizowanych cytokin w surowicy krwi chorych i grupie kontrolnej.

	Kiła układu nerwowego (n=5)	Prawdopodobna kiła układu nerwowego (n=6)	Kiła bez zajęcia układu nerwowego (n=22)	Grupa kontrolna (n=15)	p
IFN- γ ; pg/ml	0,08 (0)	0,7 (2,96)	0,08 (0,45)	0,08 (1,37)	0,43
IL-17A; pg/ml	0,42 (0,81)	4,62 (5,36)	0,12 (0,4)	0,12 (0,4)	0,09
IL-4; pg/ml	0,13 (0)	0,13 (0)	0,13 (0)	0,13 (0)	-
TNF- α ; pg/ml	0,13 (0)	0,13 (0,02)	0,13 (0)	0,13 (0)	0,12
IL-1 β ; pg/ml	0,14 (0)	0,14 (0)	0,14 (0)	0,14 (0)	-
IL-10; pg/ml	3,07 (1,85)	18,96 (9,81)	5,35 (10,29)	4,25 (8,64)	0,1
TGF- β ; pg/ml	23046,5 (9995,7)	20214,3 (10807,9)	20214,3 (7621,8)	22213,5 (7153,2)	0,79

Dane są przedstawione jako mediany i rozstęp międzykwartyłowy.

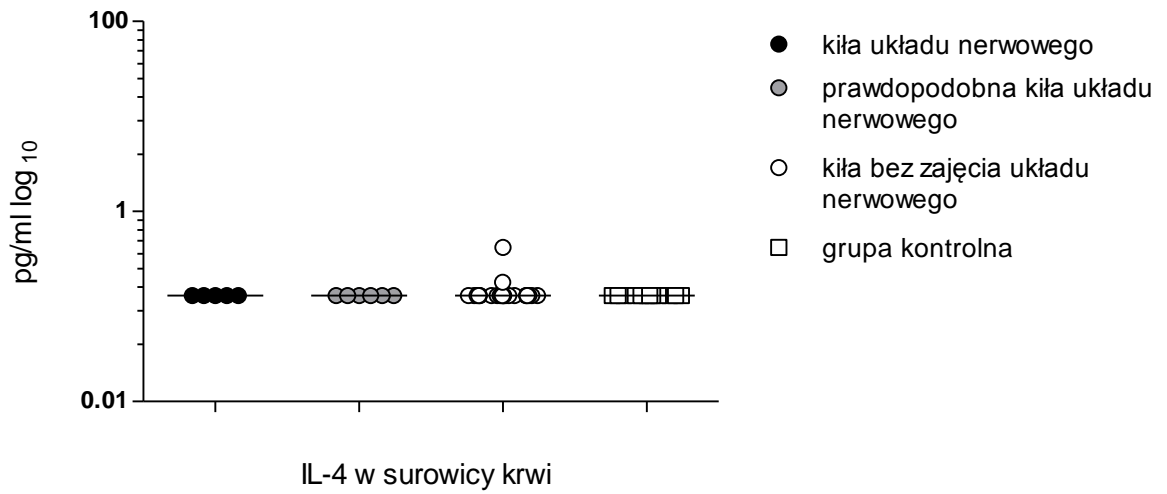
Większość wyników oznaczeń stężenia IL-4 i IL-1 β mieściła się poniżej limitu detekcji.

Wartości p w ostatniej kolumnie podane są dla analizy statystycznej testem Kruskala-Wallisa obejmującej cztery grupy.

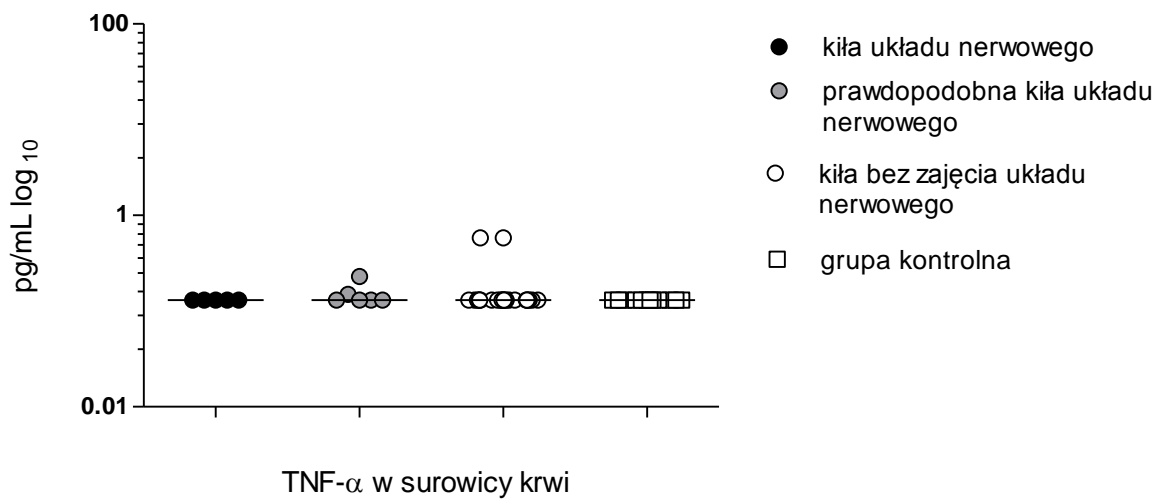
IFN- γ – Interferon gamma, IL-17A – Interleukina 17A, IL-4 – Interleukina 4, TNF- α – czynnik martwicy nowotworu α (ang. Tumor Necrosis Factor α), IL-1 β – Interleukina 1 β , IL-10 – Interleukina 10, TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β (ang. Transforming Growth Factor β).

Na Rycinach 5-11 przedstawiono graficznie stężenia analizowanych cytokin w surowicy krwi chorych i grupie kontrolnej.

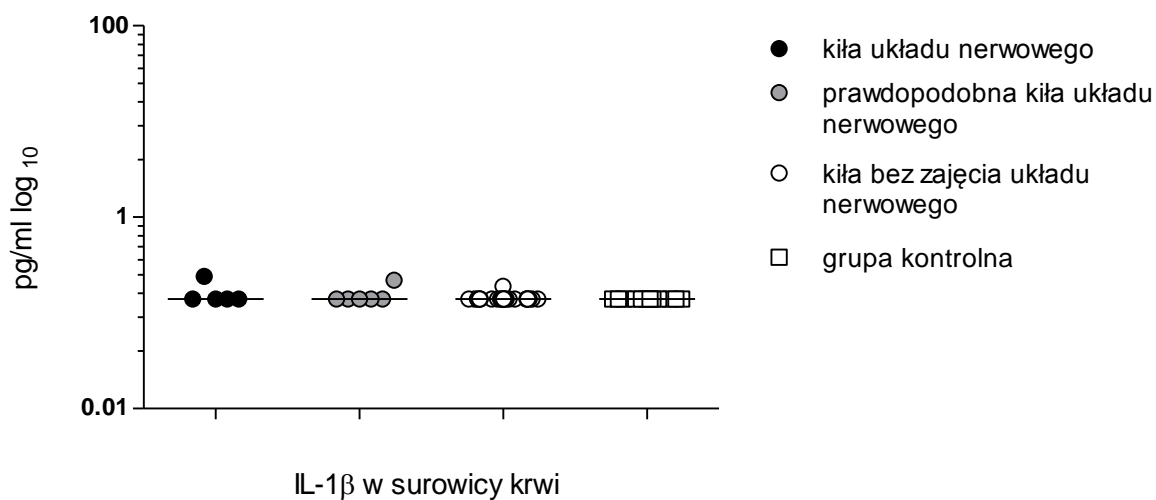
Rycina 7. Stężenie Interleukiny 4 (IL-4) w surowicy krwi badanych (pozioma linia oznacza medianę stężenia dla poszczególnych badanych grup).



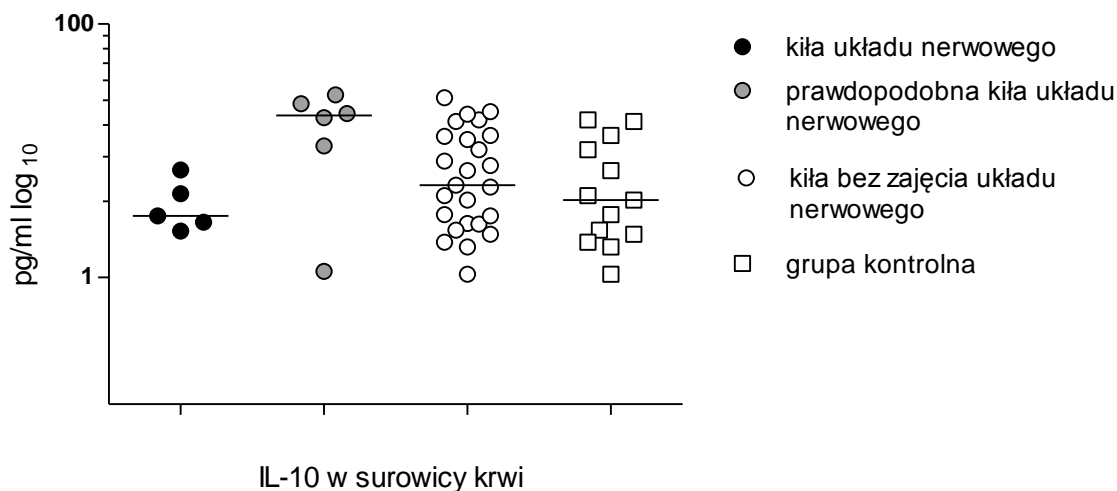
Rycina 8. Stężenie czynnika martwicy guza α (TNF- α) w surowicy krwi badanych (pozioma linia oznacza medianę stężenia dla poszczególnych badanych grup).



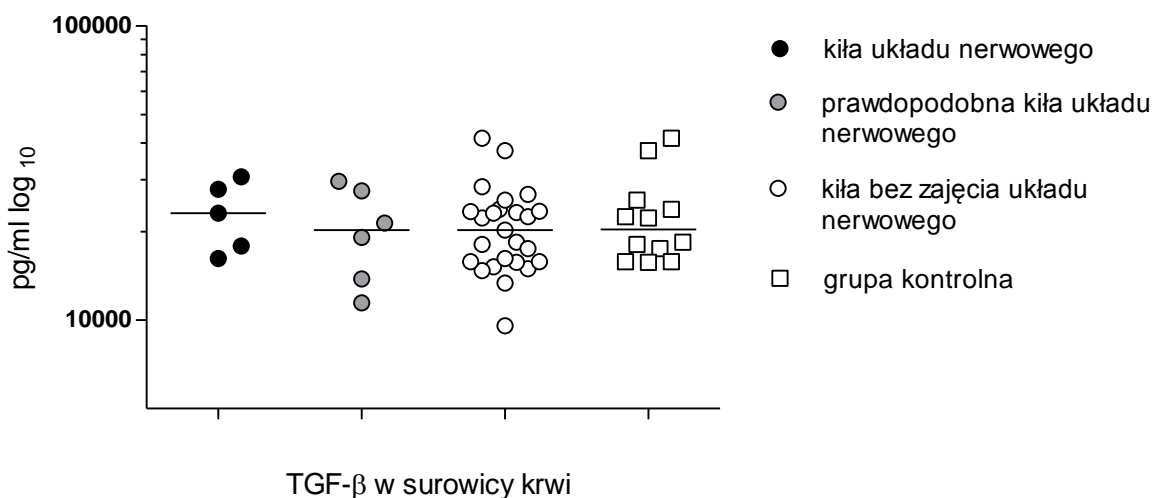
Rycina 9. Stężenie Interleukiny 1 β (IL-1 β) w surowicy krwi badanych (pozioma linia oznacza medianę stężenia dla poszczególnych badanych grup).



Rycina 10. Stężenie Interleukiny 10 (IL-10) w surowicy krwi badanych (pozioma linia oznacza medianę stężenia dla poszczególnych badanych grup).



Rycina 11. Stężenie transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β) w surowicy krwi badanych (pozioma linia oznacza medianę stężenia dla poszczególnych badanych grup).



6.3 Stężenia cytokin w płynie mózgowo-rdzeniowym

U wszystkich chorych na kiłę włączonych do badania wykonano pomiary stężeń cytokin w płynie mózgowo-rdzeniowym. W Tabeli 8 przedstawiono wyniki pomiarów stężeń cytokin w płynie mózgowo-rdzeniowym w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania.

Stężenie IFN- γ w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z kiłą układu nerwowego było istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do stężenia u chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego ($p=0,0015$). Niemal 9-krotnie wyższe stężenie IFN- γ w porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego odnotowano w grupie chorych z prawdopodobną kiłą układu nerwowego ($p=0,0004$) (Rycina 12). Mimo, że średnie stężenie IFN- γ w płynie mózgowo-rdzeniowym było 2-krotnie wyższe u chorych z kiłą układu nerwowego w porównaniu do chorych z prawdopodobną kiłą układu nerwowego, różnica nie była istotna statystycznie.

Stężenie IL-17A w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z kiłą układu nerwowego było istotnie statystycznie wyższe, nieco ponad 5-krotnie, w porównaniu do stężenia u chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego ($p=0,002$) (Rycina 13). Średnie stężenie IL-17A u chorych z prawdopodobną kiłą układu nerwowego było porównywalne do tego stwierdzonego u chorych z kiłą układu nerwowego. Jednak różnica między stężeniem IL-17A w PMR u chorych

z prawdopodobną kiłą układu nerwowego, a kiłą bez zajęcia układu nerwowego nie spełniła kryteriów istotności statystycznej.

Tabela 8. Stężenia analizowanych cytokin w płynie mózgowo-rdzeniowym w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania.

	Kiła układu nerwowego (n=5)	Prawdopodobna kiła układu nerwowego (n=6)	Kiła bez zajęcia układu nerwowego (n=22)	p
IFN- γ ; pg/ml	1,92 (0,75)	0,94 (0,63)	0,11 (0,12)	0,0001
IL-17A; pg/ml	1,31 (2,29)	1,31 (2,03)	0,25 (0,25)	0,002
IL-4; pg/ml	0,13 (0)	0,13 (0)	0,13 (0)	-
TNF- α ; pg/ml	1,94 (0,77)	1,67 (0,46)	0,82 (0,63)	0,001
IL-1 β ; pg/ml	0,34 (1,18)	0,27 (0,19)	0,14 (0,15)	0,28
IL-10; pg/ml	15,42 (8,16)	4,76 (4,38)	0,68 (0,4)	0,0001
TGF- β ; pg/ml	235,1 (97,8)	196,8 (36,9)	176,6 (58,5)	0,015

Dane są przedstawione jako mediany i rozstęp międzykwartylowy.

Wartości p w ostatniej kolumnie podane są dla analizy statystycznej testem Kruskala-Wallisa obejmującej trzy grupy chorych.

IFN- γ – Interferon gamma, IL-17A – Interleukina 17A, IL-4 – Interleukina 4, TNF- α – czynnik martwicy nowotowru α (ang. Tumor Necrosis Factor α), IL-1 β – Interleukina 1 β , IL-10 – Interleukina 10, TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β (ang. Transforming Growth Factor β).

Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w stężeniach IL-4 w płynie mózgowo-rdzeniowym w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania (Rycina 14). Oznaczone wartości stężenia tej cytokiny w wielu przypadkach znajdowały się poniżej limitu detekcji.

Chorzy z kiłą układu nerwowego i prawdopodobną kiłą układu nerwowego charakteryzowali się istotnie statystycznie wyższym stężeniem TNF- α w płynie mózgowo-rdzeniowym w porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego (odpowiednio p=0,007 i p=0,004) (Rycina 15).

W zakresie średnich stężeń IL-1 β w płynie mózgowo-rdzeniowym nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania (Rycina 16).

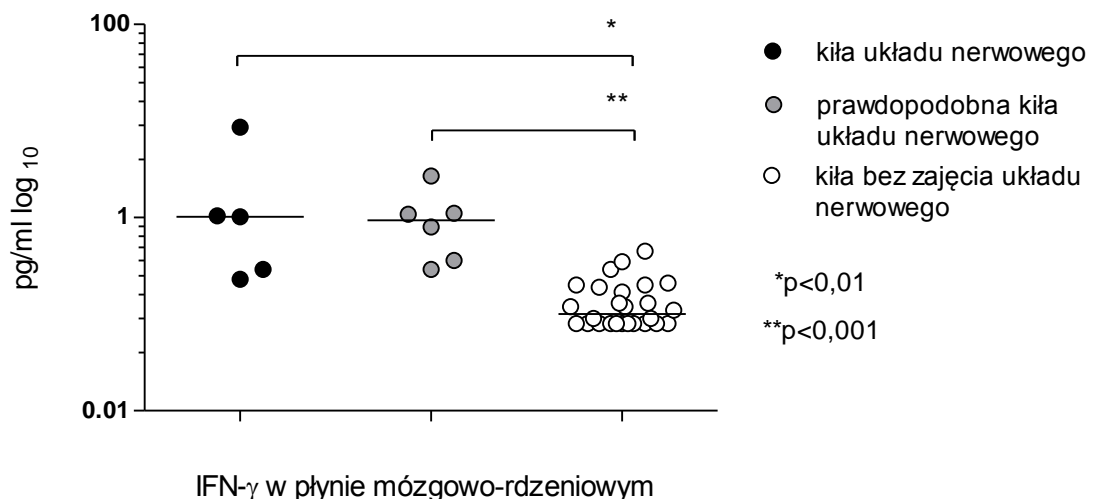
Stężenie Interleukiny 10 w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z kiłą układu nerwowego było niemal 23-krotnie wyższe w porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego (p=0,0006). Także istotnie statystycznie

wyższe było stężenie IL-10 u chorych z prawdopodobną kiłą układu nerwowego w porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego ($p=0,0003$) (Rycina 17). Chorzy z kiłą układu nerwowego w porównaniu do chorych z prawdopodobną kiłą charakteryzowali się nieco ponad 3-krotnie wyższym stężeniem IL-10 w płynie mózgowo-rdzeniowym. Różnica ta nie była jednak istotna statystycznie.

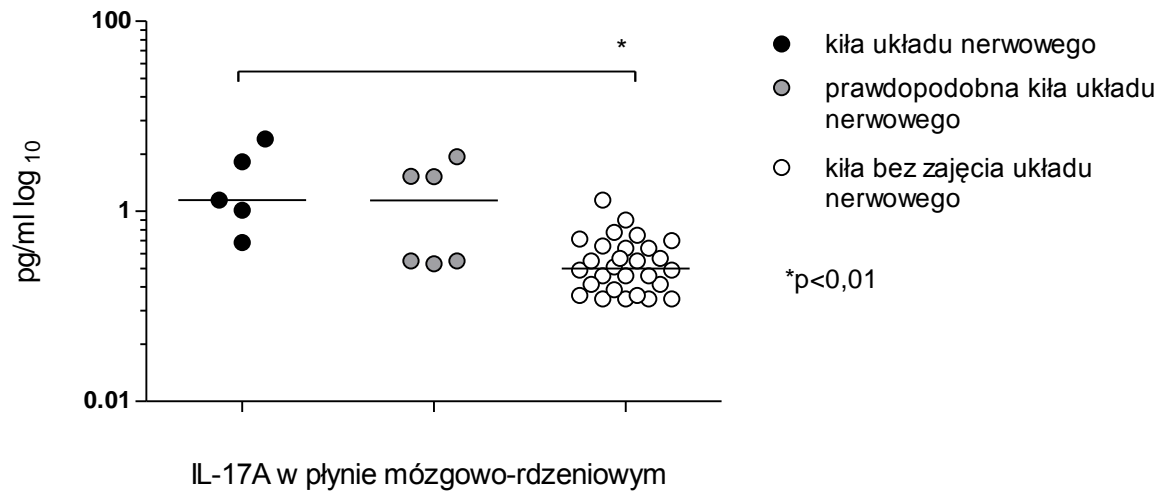
Średnie stężenie TGF- β w płynie mózgowo-rdzeniowym było istotnie statystycznie wyższe u chorych z kiłą układu nerwowego w porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego ($p=0,006$). Stężenie TGF- β w PMR u chorych z prawdopodobną kiłą układu nerwowego było porównywalne do tego stwierdzanego u chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego (Rycina 18).

Podsumowując stwierdzić należy, że chorzy z kiłą układu nerwowego i prawdopodobną kiłą układu nerwowego w porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego charakteryzują się istotnie wyższymi stężeniami w płynie mózgowo-rdzeniowym cytokin typowych zarówno dla odpowiedzi zapalnej (tj. IFN- γ , IL-17A, TNF- α) jak i odpowiedzi przeciwzapalnej (tj. IL-10 i TGF- β).

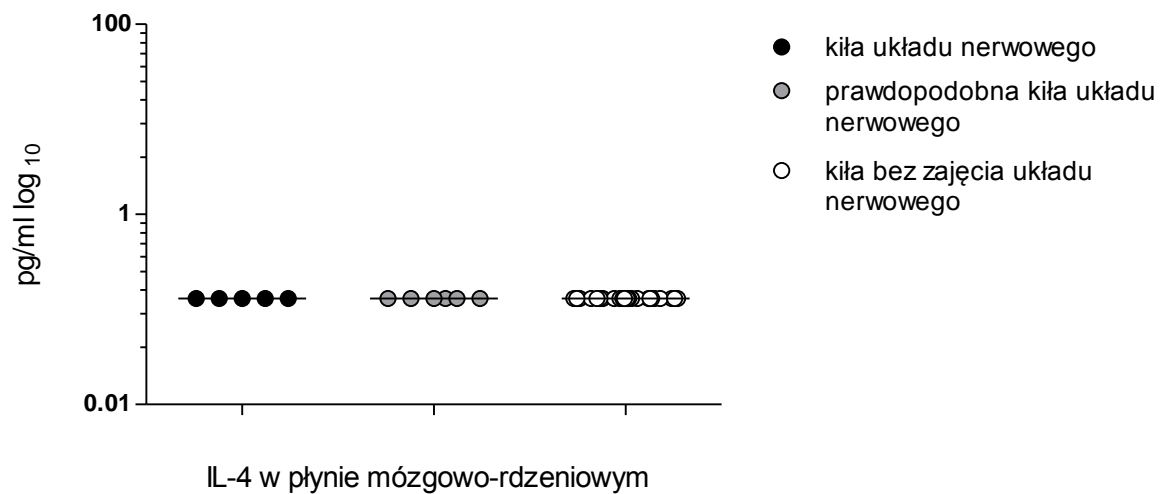
Rycina 12. Stężenie Interferonu γ (IFN- γ) w płynie mózgowo-rdzeniowym w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania (pozioma linia oznacza medianę stężenia dla poszczególnych badanych grup).



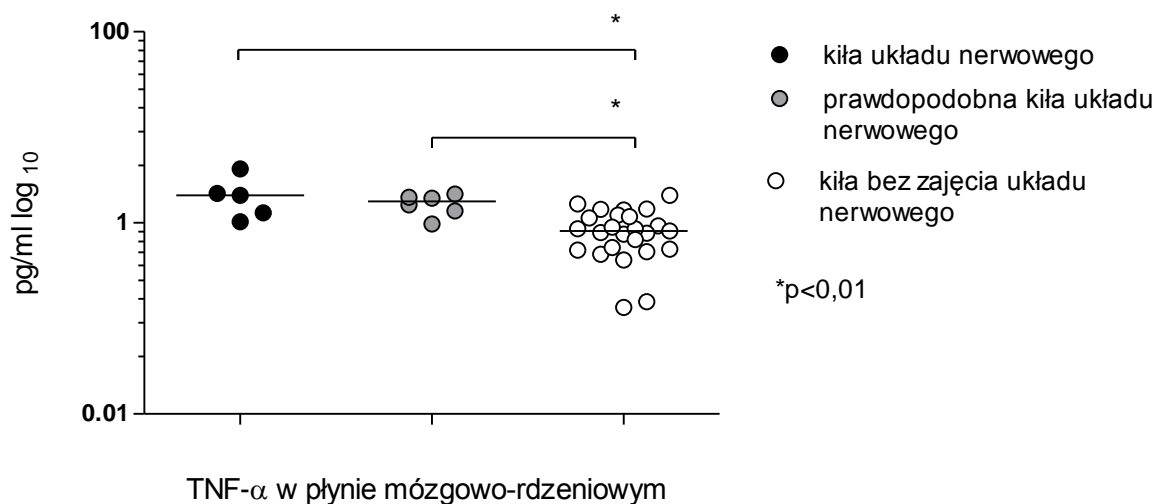
Rycina 13. Stężenie Interleukiny 17A (IL-17A) w płynie mózgowo-rdzeniowym w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania (pozioma linia oznacza medianę stężenia dla poszczególnych badanych grup).



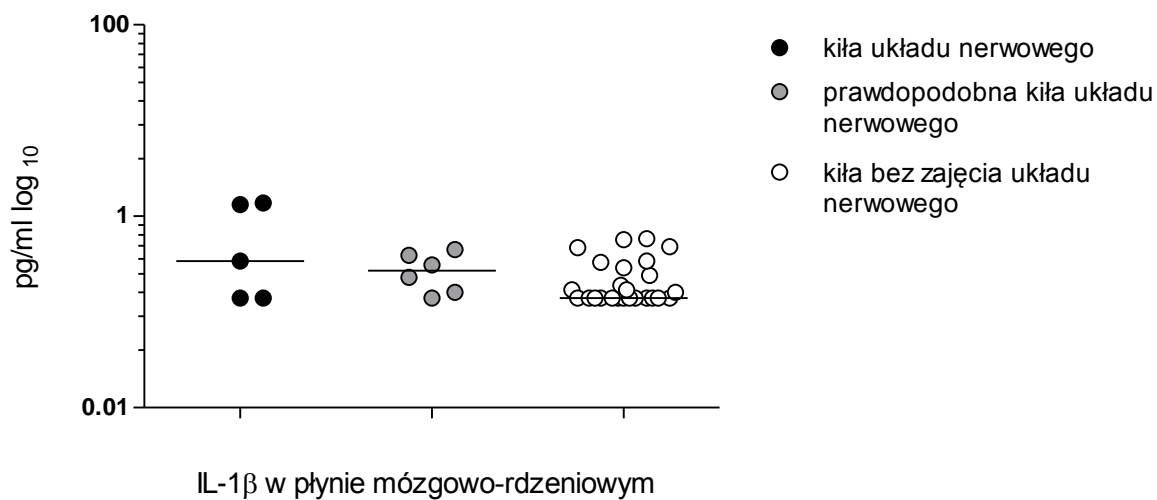
Rycina 14. Stężenie Interleukiny 4 (IL-4) w płynie mózgowo-rdzeniowym w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania (pozioma linia oznacza medianę stężenia dla poszczególnych badanych grup).



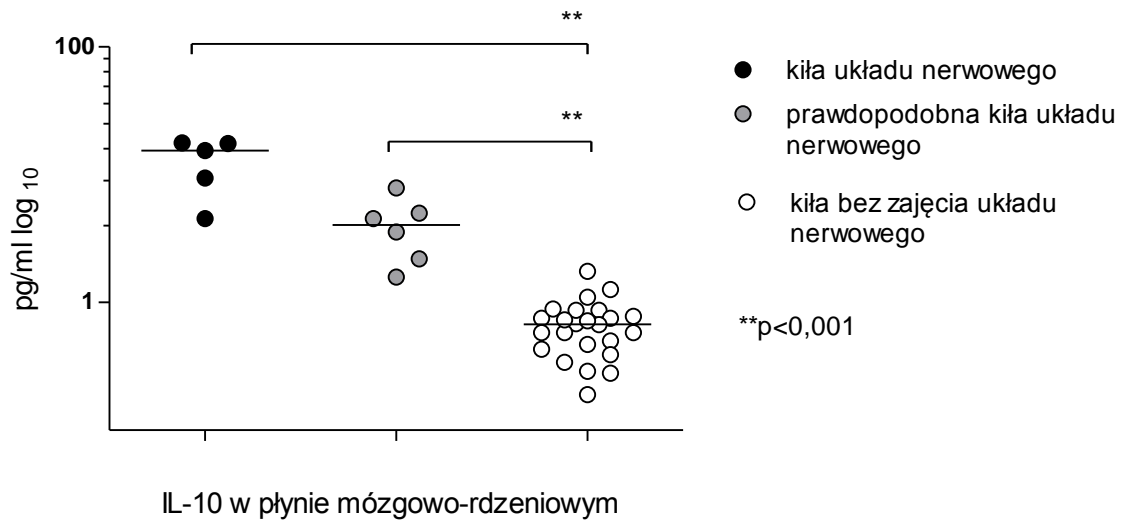
Rycina 15. Stężenie czynnika martwicy guza α (TNF- α) w płynie mózgowo-rdzeniowym w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania (pozioma linia oznacza medianę stężenia dla poszczególnych badanych grup).



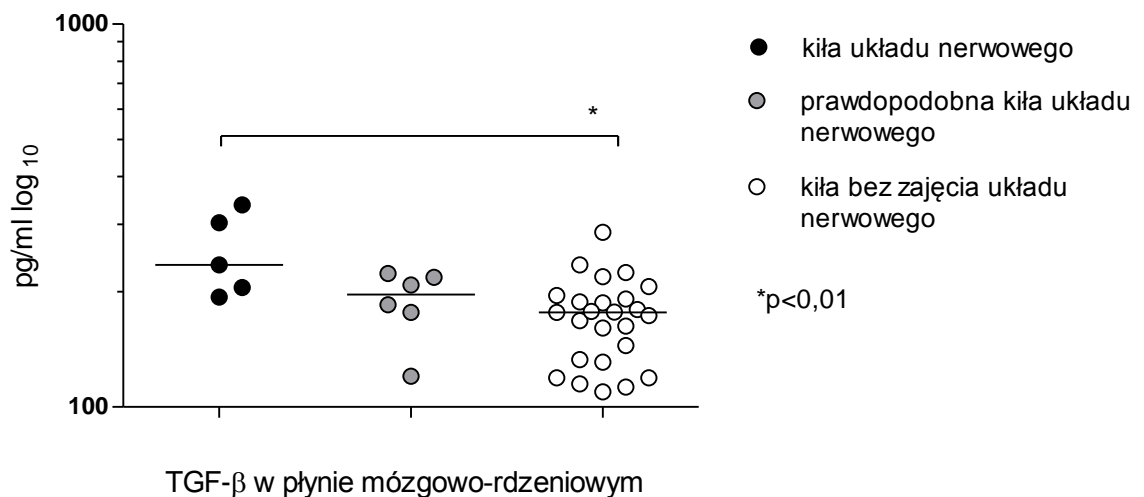
Rycina 16. Stężenie Interleukiny 1 β (IL-1 β) w płynie mózgowo-rdzeniowym w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania (pozioma linia oznacza medianę stężenia dla poszczególnych badanych grup).



Rycina 17. Stężenie Interleukiny 10 (IL-10) w płynie mózgowo-rdzeniowym w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania (pozioma linia oznacza medianę stężenia dla poszczególnych badanych grup).



Rycina 18. Stężenie transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β) w płynie mózgowo-rdzeniowym w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania (pozioma linia oznacza medianę stężenia dla poszczególnych badanych grup).



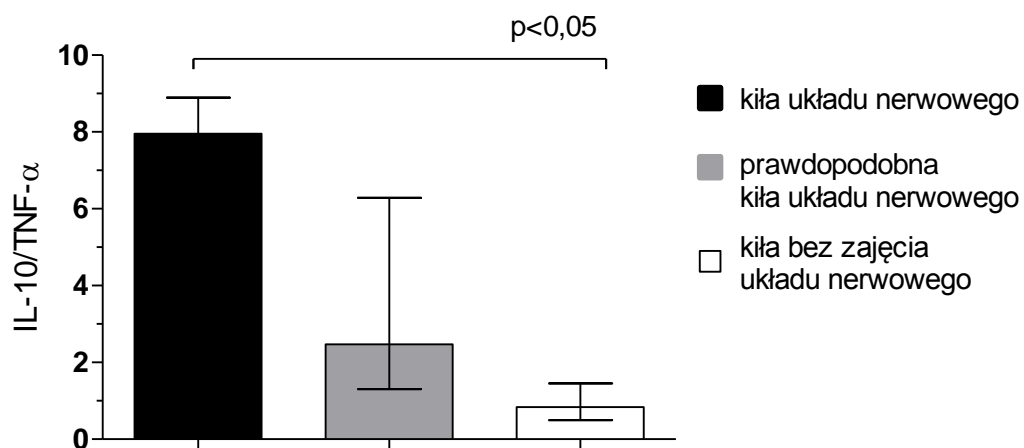
6.4 Proporcje stężeń cytokin pro - i przeciwzapalnych w płynie mózgowo-rdzeniowym (współczynniki)

W dalszej części analizy statystycznej określono współczynniki stężeń wybranych cytokin przeciwzapalnych i prozapalnych. Na rycinach 19-21 przedstawiono graficznie wartości współczynników stężeń odpowiednio IL-10/TNF- α , IL-10/IFN- γ i IL-10/IL-17A, wyrażone jako mediana ilorazów

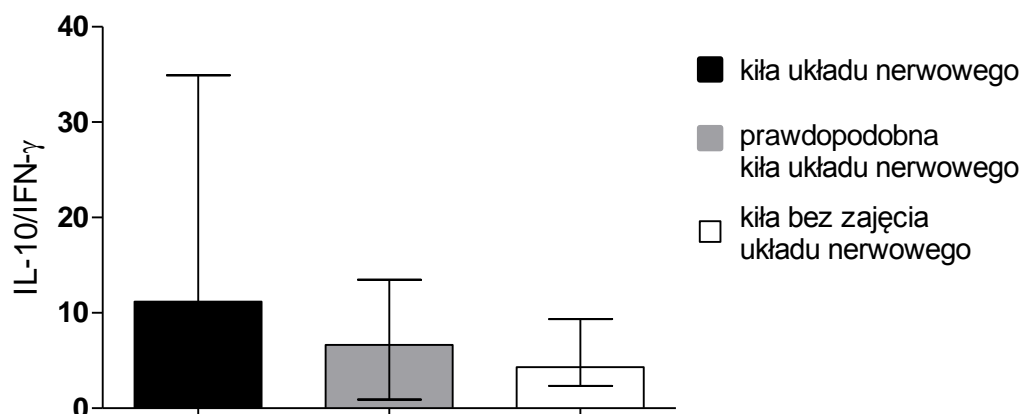
stężenia cytokin w płynie mózgowo-rdzeniowym, w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania. Zakresy (wąsy) oznaczają wartość rozstępu międzykwartylowego.

W porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego, chorzy z kiłą układu nerwowego i prawdopodobną kiłą układu nerwowego charakteryzowali wyższymi wartościami współczynników wyrażających stosunek stężeń cytokin przeciwzapalnych do prozapalnych (tj. IL-10/TNF- α , IL-10/IFN- γ i IL-10/IL-17A). Oznacza to u chorych z kiłą układu nerwowego i prawdopodobną kiłą układu nerwowego stwierdzono w płynie mózgowo-rdzeniowym względną przewagę odpowiedzi przeciwzapalnej nad prozapalną (Ryciny 19-21).

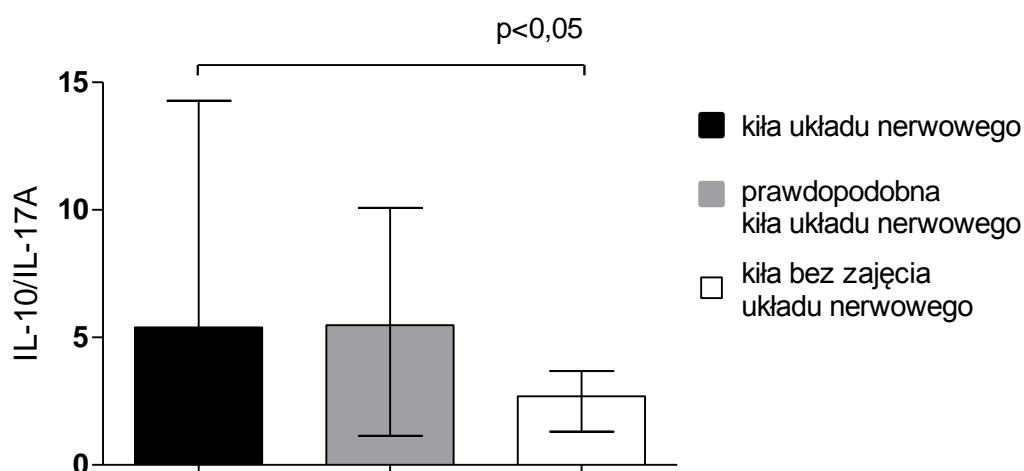
Rycina 19. Współczynniki stężeń IL-10/TNF- α w płynie mózgowo-rdzeniowym w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania.



Rycina 20. Współczynniki stężeń IL-10/IFN- γ w płynie mózgowo-rdzeniowym w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania.



Rycina 21. Współczynniki stężeń IL-10/IL-17A w płynie mózgowo-rdzeniowym w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania.



6.5 Stężenia cytokin w surowicy krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym i inne parametry laboratoryjne w grupach wyodrębnionych zgodnie ze statusem w zakresie zakażenia HIV

W celu odpowiedzi na pytanie, czy infekcja HIV istotnie wpływała na stężenia cytokin w surowicy krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym, wyodrębniono z grupy chorych z kiłą układu nerwowego i prawdopodobną kiłą układu nerwowego osoby HIV-pozytywne. Następnie porównano stężenia analizowanych cytokin i inne parametry laboratoryjne, z tymi oznaczonymi u chorych z kiłą układu nerwowego i prawdopodobną kiłą układu nerwowego, u których nie stwierdzono współistniejącej infekcji HIV.

W grupie chorych HIV-pozytywnych w porównaniu do chorych HIV-negatywnych stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenie IFN- γ w surowicy krwi (Tabela 9). W zakresie stężeń pozostałych cytokin zarówno w surowicy krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym oraz innych parametrów biochemicznych nie odnotowano istotnych różnic (Tabela 9 i 10).

Tabela 9. Stężenia analizowanych cytokin w surowicy krwi oraz wybrane parametry laboratoryjne w surowicy krwi w grupach wyodrębnionych zgodnie ze statusem w zakresie zakażenia HIV.

	Kiła układu nerwowego i prawdopodobna kiła układu nerwowego Chorzy HIV-pozytywni n=6	Kiła układu nerwowego i prawdopodobna kiła układu nerwowego Chorzy HIV-negatywni n=5	p
STĘŻENIA CYTOKIN W SUROWICY KRWI			
IFN- γ ; pg/ml	1,05 (2,7)	0,08 (0)	0,03
IL-17A; pg/ml	2,4 (4,32)	0,93 (5,44)	0,8
IL-4; pg/ml	0,13 (0)	0,13 (0)	-
TNF- α ; pg/ml	0,13 (0)	0,13 (0)	-
IL-1 β ; pg/ml	0,14 (0)	0,14 (0)	-
IL-10; pg/ml	14,6 (14,2)	2,72 (0,75)	0,05
TGF- β ; pg/ml	18465,1 (10839,1)	23046,5 (6122,4)	0,43
INNE PARAMETRY LABORATORYJNE W SUROWICY KRWI			
Leukocyty; $\times 10^3/\text{mm}^3$	5,3 (0,5)	6,7 (0,3)	0,08
Limfocyty; $\times 10^3/\text{mm}^3$	1,6 (0,3)	1,5 (0,4)	0,95
Limfocyty; (%)	33 (3,4)	25 (6,1)	0,23
Neutrofile; $\times 10^3/\text{mm}^3$	3,0 (0,63)	4,3 (0,8)	0,08
Neutrofile; (%)	57,0 (7,7)	69,4 (16,4)	0,43
Eozynofile; (%)	2,0 (1)	3,0 (2)	0,43
Monocyty; (%)	5,0 (3)	6,0 (2)	0,45
ALT; U/l	30,0 (38,8)	32,0 (2)	0,71
AST; U/l	28 (22,5)	23 (3)	0,14
Bilirubina całkowita; mmol/l	16 (4,25)	15 (6)	0,36
Kreatynina; mmol/l	74 (2)	75 (12)	0,92
Glukoza; mmol/l	4,6 (0,9)	4,3 (0,1)	0,31
CRP; mg/dl	13,7 (5,1)	5,8 (0)	0,12

Dane są przedstawione jako mediany i rozstęp międzykwartyłowy.

IFN- γ – Interferon gamma, IL-17A – Interleukina 17A, IL-4 – Interleukina 4, TNF- α – czynnik martwicy nowotworu α (ang. Tumor Necrosis Factor α), IL-1 β – Interleukina 1 β , IL-10 – Interleukina 10, TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β (ang. Transforming Growth Factor β), ALT – aminotransferaza alaninowa, AST – aminotransferaza asparaginianowa, CRP – białko C-reaktywne.

Tabela 10. Stężenia analizowanych cytokin w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz wybrane parametry laboratoryjne w płynie mózgowo-rdzeniowym w grupach wyodrębnionych zgodnie ze statusem w zakresie zakażenia HIV.

	Kiła układu nerwowego i prawdopodobna kiła układu nerwowego Chorzy HIV-pozytywni n=6	Kiła układu nerwowego i prawdopodobna kiła układu nerwowego Chorzy HIV-negatywni n=5	p
STĘŻENIA CYTOKIN W PŁYNIU MÓZGOWO-RDZENIOWYM			
IFN- γ ; pg/ml	1,09 (1,42)	0,36 (0,72)	0,08
IL-17A; pg/ml	1,39 (1,99)	1,31 (2,72)	0,46
IL-4; pg/ml	0,13 (0)	0,13 (0)	-
TNF- α ; pg/ml	1,67(0,57)	1,85 (0,9)	0,79
IL-1 β ; pg/ml	0,35 (0,24)	0,23 (0,2)	0,52
IL-10; pg/ml	6,4 (11,9)	9,4 (10,9)	0,93
TGF- β ; pg/ml	201,0 (38,8)	218,0 (29,8)	0,43
INNE PARAMETRY LABORATORYJNE W PŁYNIU MÓZGOWO-RDZENIOWYM			
Leukocyty; komórki/ μ l	17,5 (26,8)	18 (24)	0,94
Stężenie białka; mg/dl	0,65 (0,23)	0,8 (0,21)	0,58
Stężenie glukozy; mmol/l	2,8 (0,3)	2,8 (0,1)	0,91

Dane są przedstawione jako mediany i rozstęp międzykwartylowy.

IFN- γ – Interferon gamma, IL-17A – Interleukina 17A, IL-4 – Interleukina 4, TNF- α – czynnik martwicy nowotworu α (ang. Tumor Necrosis Factor α), IL-1 β – Interleukina 1 β , IL-10 – Interleukina 10, TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β (ang. Transforming Growth Factor β)

6.6 Korelacje stężeń cytokin z wybranymi parametrami laboratoryjnymi

6.6.1 Korelacje stężeń cytokin w surowicy krwi ze stężeniami w płynie mózgowo-rdzeniowym

W całej poddanej analizie grupie chorych stwierdzono pozytywną istotną statystycznie korelację między stężeniem IL-10 w surowicy krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym ($r=0,51$; $p<0,05$). W odniesieniu do stężenia innych cytokin nie stwierdzono istotnych korelacji między stężeniem w surowicy krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym (Tabela 11).

Tabela 11. Wartości współczynników korelacji rang Spearmana dla stężenia cytokin w surowicy krwi (SUR) i stężenia cytokin w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR).

	IFN- γ PMR	IL-17A PMR	IL-4 PMR	TNF- α PMR	IL-1 β PMR	IL-10 PMR	TGF- β PMR
IFN- γ SUR	0,42	0,13	-	0,11	0,01	0,11	-0,05
IL-17A SUR	0,31	0,3	-	0,48	0,34	0,65	0,02
IL-4 SUR	-	-	-	-	-	-	-
TNF- α SUR	-0,03	0,03	-	0,32	0,09	0,2	0,01
IL-1 β SUR	0,27	0,2	-	0,26	0,14	0,19	0,33
IL-10 SUR	0,05	0,07	-	0,15	0,17	0,51*	0,12
TGF- β SUR	0,18	0,07	-	-0,08	-0,10	-0,21	-0,05

SUR – surowica krwi, PMR – płyn mózgowo-rdzeniowy, IFN- γ – Interferon gamma, IL-17A – Interleukina 17A, IL-4 – Interleukina 4, TNF- α – czynnik martwicy nowotworu α (ang. Tumor Necrosis Factor α), IL-1 β – Interleukina 1 β , IL-10 – Interleukina 10, TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β (ang. Transforming Growth Factor β).

*p<0,05

6.6.2 Wzajemne korelacje stężeń poszczególnych cytokin w płynie mózgowo-rdzeniowym

Dla całej grupy chorych stwierdzono istotną statystycznie korelację stężenia TNF- α i IL-10 w PMR ze stężeniem IFN- γ oraz IL-17A w PMR (korelacja pozytywna). Dodatkowo odnotowano wzajemną, pozytywną, istotną statystycznie korelację stężenia TNF- α i IL-10 w PMR. Ponadto stężenie IL-1 β w płynie mózgowo-rdzeniowym korelowało istotnie statystycznie ze stężeniem IL-10 w PMR (korelacja pozytywna). Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji stężenia TGF- β w płynie mózgowo-rdzeniowym ze stężeniami innych analizowanych w płynie mózgowo-rdzeniowym cytokin (Tabela 12).

Tabela 12. Wartości współczynników korelacji rang Spearmana dla stężenia poszczególnych cytokin w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR).

	IFN- γ PMR	IL-17A PMR	IL-4 PMR	TNF- α PMR	IL-1 β PMR	IL-10 PMR	TGF- β PMR
IFN- γ PMR	X	0,4	-	0,45*	0,26	0,43*	0,25
IL-17A PMR	0,4	X	-	0,61*	0,42	0,58*	0,22
IL-4 PMR	-	-	-	-	-	-	-
TNF- α PMR	0,45*	0,61*	-	X	0,38	0,59*	0,27
IL-1 β PMR	0,26	0,42	-	0,38	X	0,52*	0,33
IL-10 PMR	0,43*	0,58*	-	0,59*	0,52*	X	0,4
TGF- β PMR	0,25	0,22	-	0,27	0,33	0,4	X

PMR – płyn mózgowo-rdzeniowy, IFN- γ – Interferon gamma, IL-17A – Interleukina 17A, IL-4 – Interleukina 4, TNF- α – czynnik martwicy nowotworu α (ang. Tumor Necrosis Factor α), IL-1 β – Interleukina 1 β , IL-10 – Interleukina 10, TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β (ang. Transforming Growth Factor β).

* $p < 0,05$

6.6.3 Korelacje stężeń analizowanych w płynie mózgowo-rdzeniowym cytokin z innymi parametrami laboratoryjnymi oznaczonymi w płynie mózgowo-rdzeniowym

W Tabeli 13 przedstawiono wartości współczynników dla korelacji stężeń poszczególnych cytokin w płynie mózgowo-rdzeniowym, pleocytozy, stężenia białka, stężenia glukozy oraz mian odczynu FTA w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Dla całej grupy liczba leukocytów (pleocytoza) w PMR istotnie statystycznie korelowała ze stężeniem IFN- γ , IL-17A, TNF- α , IL-10 i TGF- β w płynie mózgowo-rdzeniowym (korelacja pozytywna). Stężenie białka w PMR korelowało istotnie statystycznie ze stężeniem IL-17A, IL-10 i TGF- β w płynie mózgowo-rdzeniowym (korelacja pozytywna). Ponadto stwierdzono istotną statystycznie negatywną korelację między stężeniem glukozy w PMR a stężeniem IL-10 w płynie mózgowo-rdzeniowym. Dodatkowo odnotowano istotną statystycznie korelację między mianem odczynu FTA w PMR a stężeniem TGF- β w płynie mózgowo-rdzeniowym (korelacja pozytywna).

Tabela 13. Wartości współczynników korelacji rang Spearmana dla stężenia poszczególnych cytokin w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz pleocytozy w PMR, stężenia białka i stężenia glukozy.

	IFN- γ PMR	IL-17A PMR	IL-4 PMR	TNF- α PMR	IL-1 β PMR	IL-10 PMR	TGF- β PMR
pleocytoza w PMR	0,63*	0,6*	-	0,62*	0,2	0,62*	0,5*
stężenie białka w PMR	0,2	0,46*	-	0,2	0,22	0,48*	0,55*
stężenie glukozy w PMR	-0,23	-0,21	-	-0,16	-0,25	-0,46*	-0,38
FTA w PMR	0,41	0,34	-	0,28	0,15	0,47*	0,49*

PMR – płyn mózgowo-rdzeniowy, IFN- γ – Interferon gamma, IL-17A – Interleukina 17A, IL-4 – Interleukina 4, TNF- α – czynnik martwicy nowotworu α (ang. Tumor Necrosis Factor α), IL-1 β – Interleukina 1 β , IL-10 – Interleukina 10, TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β (ang. Transforming Growth Factor β), FTA – Fluorescent Treponema Assay.

*p<0,05

7. Dyskusja

Dane epidemiologiczne pochodzące z ostatnich lat wskazują, że kiła nadal pozostaje istotnym problemem medycznym.² Choroba nieleczone, lub leczona nieprawidłowo może przejść w stadium przewlekłe. Wydaje się, że najważniejszym późnym powikłaniem kiły jest kiła układu nerwowego z jej bogatą symptomatologią neurologiczną prowadzącą do znacznego stopnia upośledzenia funkcji motorycznych i umysłowych, a w konsekwencji do trwałego kalectwa. Objawowa kiła układu nerwowego rozwija się skrycie przez wiele lat, z często bardzo skąpymi i niespecyficznymi objawami. Gdy obraz kliniczny staje się charakterystyczny, wdrożone leczenie jest w stanie jedynie zatrzymać postęp choroby. Rzadko udaje się natomiast przywrócić choremu uprzednią sprawność. Dlatego tak ważne jest wczesne rozpoznanie zajęcia układu nerwowego w kile. Na obecnym stanie wiedzy nie zawsze jest to możliwe. Wydaje się konieczne lepsze poznanie dokładnego mechanizmu zajęcia układu nerwowego przez krętka białego i odpowiedzi gospodarza na patogen. Niezbędne jest także poszukiwanie markerów zajęcia układu nerwowego na wczesnym etapie zakażenia, tak aby adekwatne leczenie rozpocząć możliwie jak najszybciej.

7.1 Kontrowersje wokół rozpoznania bezobjawowej kiły układu nerwowego

Większość ekspertów nie ma wątpliwości, że chory z kiłą i objawami neuro-psychiatrycznymi powinien być diagnozowany w kierunku kiły układu nerwowego. Jednak wskazania do nakłucia lędźwiowego u chorych z kiłą i bez objawów neurologicznych są przedmiotem dyskusji. Marra i in.²⁷ wykazali, że niezależnie od okresu zakażenia, ryzyko pozytywnego wyniku VDRL w płynie mózgowo-rdzeniowym („złotego standardu” diagnostycznego kiły układu nerwowego u chorego bez objawów neurologicznych) jest aż 10-krotnie wyższe u immunokompetentnych chorych na kiłę, którzy mają miano odczynu RPR w surowicy krwi $\geq 1:32$. Mimo to, CDC i IUSTI nie zalecają rutynowo badania płynu mózgowo-rdzeniowego u chorych z kiłą bez objawów neurologicznych. W badaniach przeprowadzonych w erze przedantybiotykowej udowodniono, że liczba nieprawidłowości w badaniu płynu mózgowo-rdzeniowego u chorych na kiłę, niezależnie od okresu zakażenia, istotnie korelowała z ryzykiem rozwoju późnych powikłań neurologicznych. Z tego powodu, zanim wprowadzono penicylinę do leczenia kiły, badanie płynu mózgowo-rdzeniowego wykonywano u każdego chorego. W erze antybiotykowej znaczenie stwierdzanych nieprawidłowości w badaniu PMR, tym samym znaczenie rozpoznania bezobjawowej kiły układu nerwowego na wczesnym etapie zakażenia, pozostaje nieznane.

W latach 90-tych przeprowadzono badanie, w którym przed rozpoczęciem leczenia stwierdzono obecność *T. pallidum* w płynie mózgowo-rdzeniowym u 24% chorych z kiłą wczesną (zarówno HIV-negatywnych i HIV-pozytywnych) bez objawów neurologicznych i psychiatrycznych.⁵⁷ Chorych leczono następnie standardowo penicyliną (domięśniowo), lub amoksycyliną z probenecidem w schemacie doustnym. Schemat leczenia miał zapewnić krętkobójcze stężenie leku w płynie mózgowo-rdzeniowym. Po leczeniu obecność *T. pallidum* w płynie mózgowo-rdzeniowym wykazano u porównywalnego odsetka chorych, co przed leczeniem (20%). W cytowanym badaniu, współistniejące zakażenie HIV i schemat leczenia nie wpływał na częstość wykrywania krętka bladego w płynie mózgowo-rdzeniowym. U żadnego chorego, także spośród chorych, u których wyizolowano krętka bladego z płynu mózgowo-rdzeniowego po leczeniu, nie odnotowano w rocznym okresie obserwacji objawów neurologicznych i/lub

psychiatrycznych. Sugerowano zatem, że stwierdzane u chorych z kiłą wczesną i bez objawów neurologicznych, nieprawidłowości w badaniu płynu mózgowo-rdzeniowego mogą nie mieć znaczenia klinicznego.⁵⁷

Podkreślić jednak należy, że roczny okres obserwacji, w kontekście naturalnego przebiegu zakażenia krętkiem bladym, jest zbyt krótki. Badanie, które ostatecznie mogłoby wyjaśnić znaczenie bezobjawowej infekcji *T. pallidum* układu nerwowego u chorych leczonych jedynie standardowo, ze względów etycznych, nie może zostać przeprowadzone. Wymagałoby bowiem wstępnego badania płynu mózgowo-rdzeniowego u wszystkich chorych na kiłę, a następnie zastosowania standardowego leczenia penicyliną domięśniowo niezależnie od wyników badania PMR, oraz wieloletniej (nawet 30-letniej) obserwacji pod kątem rozwoju objawów neurologicznych i psychiatrycznych.

Nadal wiele kontrowersji dotyczy diagnostyki kiły układu nerwowego. Jak wspomniano wcześniej, nie ma jednego testu umożliwiającego postawienie pewnego rozpoznania. Dane z piśmiennictwa sugerują, że najważniejsze parametry, które należy oznaczyć w płynie mózgowo-rdzeniowym to VDRL, liczba leukocytów i stężenie białka.^{21, 22, 29} Wydaje się także, że oznaczenie odczynów krętkowych w płynie mózgowo-rdzeniowym jest wielce pomocne. W przypadku chorych z objawami neurologicznymi i nieprawidłowościami w płynie mózgowo-rdzeniowym, rozpoznanie kiły układu nerwowego nie budzi wątpliwości. Mniej jednoznaczna sytuacja dotyczy chorych z kiłą bez objawów neurologicznych. Biorąc pod uwagę teorię o samoistnej eliminacji krętków białych z płynu mózgowo-rdzeniowego, pojedyncze badanie płynu mózgowo-rdzeniowego u chorego z kiłą bez objawów neurologicznych, nie rozstrzyga, czy stwierdzane nieprawidłowości są przejściowe (tj. ulegną samoistnej eliminacji), czy trwałe, tj. nieleczone doprowadzą w różnie długim czasie do rozwoju późnych objawów neurologicznych i psychiatrycznych. Należy także mieć na uwadze, że chory z negatywnym wynikiem VDRL w PMR, pozostawiony bez interwencji leczniczej, może mieć pozytywny VDRL w PMR już za tydzień, czy za miesiąc.

Nie ulega więc wątpliwości, że identyfikacja chorych z nieprawidłowościami w płynie mózgowo-rdzeniowym na wczesnym etapie zakażenia, obejmuje zarówno tych, u których dojdzie do samoistnej eliminacji krętków białych

z płynu mózgowo-rdzeniowego, jak i tych u których ten proces nie nastąpi. Leczenie takich chorych zgodnie z protokołami dla kiły układu nerwowego zapobiegnie rozwojowi późnych objawów neurologicznych i psychiatrycznych.

W niniejszym badaniu, przyjęto restrykcyjne kryteria dla rozpoznania kiły układu nerwowego w oparciu o rekomendacje CDC (tj. pozytywny VDRL w PMR).²² Jednak u kilku chorych z negatywnym VDRL w PMR stwierdzono inne nieprawidłowości

w badaniu płynu mózgowo-rdzeniowego, najczęściej pleocytozę i podwyższone stężenie białka. Część tych chorych także mogła mieć kiłę układu nerwowego. Pleocytoza w PMR jest nieswoistym, ale uznanym markerem stanu zapalnego toczącego się na terenie układu nerwowego. Z tego powodu, opierając się na wynikach wcześniejszych doniesień⁵⁵, wyodrębniono grupę chorych z „prawdopodobną kiłą układu nerwowego”, składającą się z pacjentów, u których stwierdzono pleocytozę w PMR. Pojedyncze doniesienia wskazują, że reaktywny VDRL w PMR ma charakter stabilny i utrzymuje się stosunkowo długo. Wyniki pleocytozy w PMR u części chorych są stabilne, u innych mają tendencję do dużych wahań w stosunkowo krótkim czasie.⁸² W kontekście tych badań wynik pozytywny VDRL w PMR należy uznać za zakażenie, które prawdopodobnie nie ulegnie samoistnej eliminacji. Może to oznaczać, że w grupie „prawdopodobna kiła układu nerwowego” mogli się znaleźć chorzy, u których dojdzie do eliminacji krętka z układu nerwowego i badanie kontrolne płynu mózgowo-rdzeniowego wykonane nawet po krótkim czasie da wynik prawidłowy. Stwierdzenie wyłącznie podwyższonego stężenia białka w PMR, co wykazano u części chorych z grupy „kiła bez zajęcia układu nerwowego”, większość ekspertów uznaje za parametr zbyt mało czuły i swoisty dla rozpoznania kiły układu nerwowego.^{21,22} Zatem podwyższone stężenie białka w PMR występujące jako izolowana nieprawidłowość nie ma prawdopodobnie znaczenia klinicznego.

W niniejszym badaniu, celem poznania charakteru odpowiedzi immunologicznej w kile układu nerwowego i poszukując parametrów immunologicznych, które pozwoliłyby na identyfikację chorych z kiłą układu nerwowego, u wszystkich pacjentów oznaczono w płynie mózgowo-rdzeniowym

stężenie cytokin prozapalnych takich jak IFN- γ , IL-17A, TNF- α i IL-1 β i cytokin hamujących odpowiedź zapalną (tj. IL-10 i TGF- β).

7.2 Intratekalna produkcja cytokin

Stężenia cytokin prozapalnych (IFN- γ , IL-17A, TNF- α i IL-1 β) w płynie mózgowo-rdzeniowym, u wszystkich badanych chorych, były istotnie wyższe niż w surowicy krwi. Wskazuje to na lokalną (tj. w zakresie opon mózgowo-rdzeniowych) produkcję tych cytokin. Stężenie IL-10 w płynie mózgowo-rdzeniowym było wyższe niż w surowicy krwi jedynie w grupie chorych z kiłą układu nerwowego, co także wydaje się przemawiać za intratekalną produkcją tej cytokiny. W pozostałych grupach, stężenia IL-10 w płynie mózgowo-rdzeniowym wykazywały niższe wartości niż w surowicy krwi. Podobna obserwacja dotyczyła stężeń TGF- β u wszystkich chorych.

7.3 Wyższe stężenie TNF- α , IL-10 i TGF- β w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z kiłą układu nerwowego i prawdopodobną kiłą układu nerwowego

Zgodnie z obowiązującym obecnie stanem wiedzy, uważa się, że fizjologiczna odpowiedź immunologiczna na patogen powinna być ograniczona w czasie i przestrzeni. Zbyt duże nasilenie odpowiedzi immunologicznej może doprowadzić do nadmiernego stanu zapalnego i nadmiernego uszkodzenia tkanek. Natomiast nieefektywna odpowiedź immunologiczna może doprowadzić do stanu tolerancji, co stwarza zagrożenie rozwojem przewlekłego zakażenia. Oznacza to, że odpowiedź przeciw mikroorganizmom musi być precyzyjnie regulowana i kontrolowana, tak aby została osiągnięta równowaga między stanem zapalnym i usuwaniem patogenu oraz supresją odpowiedzi zapalnej, zapewniającej ochronę przed uszkodzeniem tkanek.

TNF- α jest jedną z głównych cytokin odpowiedzi zapalnej. Może być wytwarzany przez wiele komórek układu immunologicznego pod wpływem stymulacji przez antygeny związane z patogenami, a jego główna funkcja polega na aktywacji komórek śródbłonna i leukocytów i wywołanie ostrej miejscowej odpowiedzi zapalnej. Uważa się, że TNF- α w bakteryjnych i wirusowych zakażeniach układu nerwowego może odgrywać rolę czynnika uszkodzającego

barierę krew-mózg.^{83, 84} TNF- α odgrywa również istotną rolę w początkowym okresie infekcji *T. pallidum*, *in vitro* wykazano bowiem, że lipoproteiny *Treponema pallidum* są silnym czynnikiem stymulującym produkcję TNF- α przez makrofagi.⁸⁵ Po raz pierwszy w badaniu będącym przedmiotem niniejszej rozprawy wykazano podwyższone stężenie TNF- α w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z kiłą układu nerwowego i prawdopodobną kiłą układu nerwowego. Stężenie TNF- α w tych grupach chorych było około 2-krotnie wyższe w porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego. Stężenie TNF- α w płynie mózgowo-rdzeniowym pozytywnie korelowało ze stężeniami innych cytokin prozapalnych takich jak IFN- γ i IL-17A, a także z pleocytozą w PMR.

IL-1 β jest także cytokiną prozapalną, która produkowana jest przede wszystkim przez monocyty i makrofagi.⁸⁶ W płynie mózgowo-rdzeniowym w przebiegu zarówno bakteryjnego i wirusowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych stwierdzono podwyższone stężenia IL-1 β . Warto jednak zaznaczyć, że w procesie bakteryjnym w porównaniu do wirusowego, stężenia cytokin w PMR są wielokrotnie wyższe.⁸⁷ W zmianach skórnych typowych dla kiły II okresu stwierdzono zwiększoną ekspresję IL-1 β .⁷² Dowiedziono także, że antygeny krętka bladego stymulują produkcję i wydzielanie IL-1 β przez ludzkie monocyty krwi obwodowej.⁸⁸ W naszym badaniu u chorych z kiłą układu nerwowego stwierdziliśmy nieco ponad 2-krotne podwyższenie stężenia IL-1 β w płynie mózgowo-rdzeniowym w porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego. Różnica ta jednak nie była istotna statystycznie. W oparciu o dostępne dane z piśmiennictwa średnie stężenie IL-1 β w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z kiłą były dużo niższe w porównaniu do tych stwierdzanych w bakteryjnym czy wirusowym zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych.⁸⁷ Rola IL-1 β w odpowiedzi zapalnej w kile układu nerwowego pozostaje niewyjaśniona. Znacznie wyższa ekspresja tej cytokiny w kile II okresu w porównaniu do kiły układu nerwowego, sugeruje, że inne antygeny krętkowe mogą być zaangażowane w stymulację odpowiedzi immunologicznej w tych dwóch postaciach zakażenia. IL-1 β w wyższych stężeniach wykazuje działanie systemowe powodując gorączkę, wzmagając produkcję neutrofilów i białek ostrej fazy. Z kolei w niższych stężeniach pełni

funkcję mediatora lokalnej reakcji zapalnej, głównie zwiększając zdolność adhezyjną komórek śródbłonka.⁸⁶ Zatem także niskie stężenia IL-1 β w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych na kiłę mogą mieć znaczenie kliniczne.

Produkcja cytokin przeciwzapalnych jest jednym z mechanizmów hamujących nadmierną aktywację makrofagów (oraz innych komórek odpowiedzi nieswoistej) w odpowiedzi na antygeny bakteryjne. Jedną z najważniejszych cytokin jest IL-10, która w przeciwieństwie do TNF- α wykazuje działanie hamujące odpowiedź immunologiczną i zapalną. Uznaje się, że główna rola tej cytokiny polega na hamowaniu produkcji cytokin (TNF- α , IL-1 β , IL-12) przez makrofagi, hamowaniu produkcji IFN- γ przez limfocyty i hamowaniu aktywacji limfocytów T przez makrofagi.^{89, 90} Istotnie, w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych z zakażeniami układu nerwowego IL-10 jest wykrywana w wyższych stężeniach w okresie rekonwalescencji, a nie podczas ostrej fazy.⁹¹ Rola IL-10 w przebiegu zakażenia *T. pallidum* nie była do tej pory dokładnie zbadana. Ekspresję mRNA dla IL-10 stwierdzono w kiłowych zmianach skórnych u ludzi.⁷¹ Największa ekspresja IL-10 korelowała z największą liczbą makrofagów występujących w zmianach skórnych. Stąd sugerowano, że głównym źródłem IL-10 w kile mogą być właśnie makrofagi. W przedstawionej pracy wykazaliśmy, że stężenie IL-10 w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych z kiłą układu nerwowego i prawdopodobną kiłą układu nerwowego jest wyższe w porównaniu z chorymi bez cech zakażenia układu nerwowego. Stężenie IL-10 korelowało pozytywnie z poziomami innych cytokin prozapalnych takich jak IFN- γ , IL-17A, TNF- α , czy IL-1 β . Odnotowano także pozytywną korelację stężenia IL-10 w PMR z pleocytozą i stężeniem białka w płynie mózgowo-rdzeniowym. Obserwacje te wskazują, że odpowiedzi prozapalnej na zakażenie *T. pallidum* towarzyszą mechanizmy kompensacyjne związane z produkcją cytokin o działaniu przeciwzapalnym. Wiadomo, że oddziaływanie cytokin pro- i przeciwzapalnych w przebiegu zakażeń może wpływać na eliminację patogenu i przyczyniać się do powstania przewlekłego zakażenia.

Dotychczas nie wyjaśniono, dlaczego w naturalnym przebiegu kiły u części chorych następuje samoistna eliminacja patogenów z ustroju, a u niektórych zakażenie staje się przewlekłe. Nie są też znane mechanizmy prowadzące do zajęcia układu nerwowego przez *Treponema pallidum* tylko u części chorych na

kiłę. Stąd wydaje się interesujące porównanie stosunku stężeń cytokin przeciwzapalnych do cytokin prozapalnych oznaczanych w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych na kiłę. W naszej pracy po raz pierwszy wykazaliśmy, że współczynnik stężenia IL-10 do TNF- α w płynie mózgowo-rdzeniowym jest najwyższy u chorych z kiłą układu nerwowego, a najniższy u chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego. Tym samym wydaje się, że u chorych z kiłą układu nerwowego w odpowiedzi immunologicznej na zakażenie *T. pallidum* dominują mechanizmy supresyjne (hamujące odpowiedź zapalną). Z kolei przewaga odpowiedzi prozapalnej, której wyznacznikiem jest wartość stosunku IL-10/TNF α w PMR poniżej 1 (tj. 0,83) u chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego, może wiązać się z bardziej efektywną eliminacją *T. pallidum* z układu nerwowego i wykazywać działania ochronne przed rozwojem kiły układu nerwowego. Obserwacja ta uzupełnia wcześniejsze wyniki badań, w których wykazano, że limfocyty krwi obwodowej chorych na kiłę późną, stymulowane antygenami krętkowymi produkują większe ilości IL-10 niż cytokin o charakterze prozapalnym (np. IFN- γ). Z kolei w kile wczesnej stymulacja powoduje produkcję w przeważającej ilości cytokin typowych dla odpowiedzi prozapalnej.^{92, 93} Warto podkreślić, że podobne hipotezy, dotyczące nadmiernej aktywacji odpowiedzi przeciwzapalnej jako czynnika predysponującego do przewlekłego zakażenia były już stawiane w przypadkach innych infekcji, takich jak leiszmanioza⁹⁴, zakażenie *Chlamydia*^{95,96}, czy niektórych infekcjach wirusowych.⁹⁷

W 1987 roku Tabor i in. po raz pierwszy sugerowali, że w odpowiedzi na zakażenie krętkiem bladym może dochodzić do zwiększenia liczby limfocytów T określanych wówczas jako supresorowe, które mają zdolność do hamowania aktywności makrofagów.⁹⁸ Współczesna immunologia określa te limfocyty jako regulatorowe. Także one mają zdolność do produkcji IL-10. Kwestią nierozstrzygniętą pozostaje zatem, które komórki są głównym źródłem IL-10 w kile. Wyniki badań z ostatnich lat wskazują, że liczba komórek regulatorowych zwiększa się w kile.⁸⁸ Rozstrzygnąć jednak należy przede wszystkim, czy istnieją różnice w liczbie tych komórek w różnych stadiach kiły, zwłaszcza w kile późnej.

Uwzględniając naturalny przebieg zakażenia krętkiem bladym należy pamiętać, że u części chorych z kiłą następuje samoistna eliminacja krętków białych z układu nerwowego. Głównym ograniczeniem w interpretacji wyników

naszego badania jest właśnie brak możliwości identyfikacji tych chorych. Gdyby było to możliwe, można by jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, czy przewaga mechanizmów prozapalnych nad przeciwzapalnymi predysponuje do eliminacji patogenów z obszaru układu nerwowego.

Należy też podkreślić, że rola IL-10 w odpowiedzi przeciwzakaźnej nie jest do końca jednoznaczna. Oprócz opisywanych od dawna funkcji hamujących odpowiedź immunologiczną wydaje się, że może ona także wzmacniać cytotoksyczność komórek i stymulować produkcję przeciwciał.^{99,100} Częściowo może to uzasadniać odnotowaną przez nas pozytywną korelację między stężeniem IL-10 w PMR a mianem odczynu FTA w PMR, zakładając, że przeciwciała wykrywane w teście FTA produkowane są intratekalnie.

Transformujący czynnik wzrostu β (TGF β) jest inną cytokiną wykazującą działanie hamujące odpowiedź immunologiczną. Cytokiny z rodziny TGF- β produkowane są zarówno przez leukocyty jak i komórki rezydualne tkanek, a ich głównym zadaniem jest regulacja procesów różnicowania komórek. W układzie immunologicznym cytokiny TGF- β wydzielane są przede wszystkim przez limfocyty T-regulatorowe i mają silne właściwości supresyjne, między innymi z uwagi na ich zdolność do hamowania proliferacji i aktywacji limfocytów T efektorowych. Znaczenie TGF- β w zakażeniu *T. pallidum* było dotychczas tematem jednego badania. Babolin i wsp.⁸⁸ wykazali, że monocyty izolowane od chorych na kiłę wczesną wydzielają zwiększone ilości TGF- β w odpowiedzi na stymulację antygenami krętka bladego. Dodatkowo podkreśla to szczególną rolę cytokin o właściwościach przeciwzapalnych produkowanych (np. przez makrofagi tkankowe) w odpowiedzi na infekcję *T. pallidum*. W przedstawionym przez nas badaniu wykazano istotnie wyższe stężenia TGF- β w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z kiłą układu nerwowego w porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego. Interpretację wyników utrudnia jednak fakt, że wysokie stężenia tej cytokiny stwierdzono także w surowicy krwi. Dodatkowo, stężenie TGF- β w płynie mózgowo-rdzeniowym nie korelowało z IL-10 oraz poziomami cytokin prozapalnych. Może to oznaczać, że TGF- β w PMR jest produkowany także przez inne subpopulacje komórek, np. komórki napływowe (limfocyty). Potwierdzać to

może wykazana przez nas korelacja pomiędzy stężeniem TGF- β a liczbą leukocytów w PMR.

Podsumowując, w przedstawionym badaniu stwierdzono w PMR u chorych z kiłą układu nerwowego, w porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego, podwyższone stężenia cytokin o charakterze zarówno pro i przeciwzapalnym. U chorych z kiłą układu nerwowego odnotowano także względną przewagę cytokin o charakterze przeciwzapalnym w odniesieniu do prozapalnych, wyrażoną wyższą wartością współczynnika stężeń tych cytokin. Przewaga odpowiedzi przeciwzapalnej może być zatem odpowiedzialna za progresję choroby do stadium przewlekłego, w tym kiły układu nerwowego. Warto jednak podkreślić, że źródłem analizowanych cytokin oprócz makrofagów mogą być inne komórki napływowe, np. limfocyty regulatorowe. W dalszej części badania postanowiono więc ocenić stężenia cytokin produkowanych typowo przez limfocyty T.

7.4 Wyższe stężenie IFN- γ i IL-17A w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z kiłą układu nerwowego i prawdopodobną kiłą układu nerwowego

Wcześniejsze badania sugerowały, że w kile I okresu dominuje odpowiedź komórkowa typu Th1. Sugestie te oparte zostały głównie na obserwacji, że leukocyty krwi obwodowej pochodzące od chorych na kiłę I okresu stymulowane antygenami krętkowymi produkują większe ilości IFN- γ niż komórki pochodzące od chorych na inne stadia kiły.⁹² Postulowano, że wraz z progresją choroby i rozwojem objawów kiły II okresu zmienia się charakter odpowiedzi komórkowej z Th1 na Th2.¹⁰¹ Kolejne doniesienia nie potwierdziły tej hipotezy, gdyż dowiedziono, że zmiany skórne typowe dla kiły I i II okresu u ludzi wykazują ekspresję cytokin charakterystycznych dla odpowiedzi komórkowej typu Th1, przy niemal zupełnym braku ekspresji cytokin typowych dla odpowiedzi typu Th2 (tj. np. IL-4, IL-5, czy IL-13).⁷¹ W zwierzęcym modelu kiły układu nerwowego wykazano, że także w odpowiedzi immunologicznej w tej postaci zakażenia obserwuje się przewagę cytokin typu Th1, głównie IFN γ .⁸¹

W przedstawionym przez nas badaniu stężenia IL-4 (cytokiny typowej dla odpowiedzi typu Th2) w surowicy krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym były niskie, poniżej progu detekcji testów ELISA o wysokiej czułości. Zatem rola

odpowiedzi typu Th2 na zakażenie krętkiem bladym układu nerwowego wydaje się być, podobnie jak w innych postaciach kiły, marginalna.

IL-17A jest prozapalną cytokiną wytwarzaną przez aktywowane limfocyty T, przede wszystkim limfocyty efektorowe CD4⁺, niedawno wyodrębnione w oddzielną populację limfocytów Th17. Komórki te odgrywają ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej związanej z infekcjami, wspomagają między innymi odpowiedź przeciw bakteriom zewnątrzkomórkowym i grzybom.¹⁰² Doniesienia z ostatnich lat wskazują jednak, że nadmierna aktywacja lub ekspansja komórek produkujących IL-17A może odgrywać niekorzystną rolę w patogenezie wielu przewlekłych chorób zapalnych, głównie chorób z autoagresji m.in. reumatoidalnego zapalenia stawów, łuszczycy, czy toczenia rumieniowatego. W boreliozie, bakteryjnej chorobie wywoływanej także przez krętki, sugeruje się, że oprócz ich ważnej roli w odpowiedzi zapalnej, mającej na celu eliminację patogenu, wydają się mieć także sprawcze znaczenie w przewlekaniu się procesu chorobowego (związek z neuroboreliozą, czy przewlekłym zapaleniem stawów w przebiegu boreliozy).^{103, 104}

W przedstawionym badaniu wykazano znacznie podwyższone stężenia INF- γ i IL-17A w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z kiłą układu nerwowego i prawdopodobną kiłą układu nerwowego w porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego (dla INF- γ odpowiednio 17,5 i 8,5-krotnie, dla IL-17A 5-krotnie dla jednej i drugiej grupy). Wzajemne pozytywne korelacje stężeń tych cytokin, pozytywne korelacje stężeń ze stężeniami innych cytokin o profilu prozapalnym i pleocytozą oraz stężeniem białka w PMR niewątpliwie wskazują na udział komórek produkujących INF- γ i IL-17A w odpowiedzi zapalnej na zakażenie układu nerwowego krętkiem bladym.

Odnotowano ponadto najwyższy współczynnik stężeń IL-10/INF- γ IL-10/IL-17A w grupie chorych z kiłą układu nerwowego, a najniższy w grupie chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego. Jak wcześniej wspomniano wskazuje to, że odpowiedź przeciwzakaźna u chorych z kiłą układu nerwowego charakteryzuje się brakiem równowagi w zakresie mechanizmów pro- i przeciwzapalnych, z przewagą tych ostatnich, co może skutkować brakiem eliminacji patogenów i przewlekłym zakażeniem.

Nierozstrzygniętą kwestią pozostaje, jakie komórki układu immunologicznego produkują IFN- γ i IL-17A w przebiegu odpowiedzi zapalnej w kile układu nerwowego. Niedawno w zmianach skórnych w kile II okresu zidentyfikowano komórki CD8⁺ jako główne źródło zarówno IFN- γ jak i IL-17A.⁸⁰ Niewykluczone zatem, że to odpowiedź cytotoksyczna odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi zapalnej na zakażenie krętkiem bladym. Ostateczna weryfikacja tej hipotezy wymaga izolacji i scharakteryzowania komórek obecnych w płynie mózgowo-rdzeniowym metodami cytometrii przepływowej. Liczba komórek w płynie mózgowo-rdzeniowym, nawet w ostrym kiłowym zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych jest relatywnie mała. Wprowadza to znaczne ograniczenia techniczne i pociąga za sobą konieczność hodowli komórkowych.

7.5 Kiła u chorych HIV-pozytywnych

Jak wspomniano wcześniej, nie ma aktualnie wystarczających dowodów popierających tezę, że obraz kliniczny kiły u chorych HIV pozytywnych istotnie różni się w porównaniu do immunokompetentnych chorych z kiłą. Dotychczas udowodniono jedynie, że chorzy z kiłą i współtowarzyszącą infekcją HIV oraz liczbą komórek CD4⁺ we krwi obwodowej < 350/ μ l, obarczeni są większym ryzykiem zajęcia układu nerwowego i niepowodzenia po standardowym leczeniu.

W naszym badaniu zidentyfikowano łącznie ośmiu chorych HIV-pozytywnych. U wszystkich stwierdzono liczbę komórek CD4⁺ > 350/ μ l. Ze względu na brak istotnej immunosupresji, fakt, że część chorych była dodatkowo w trakcie leczenia antyretrowirusowego założono, że infekcja HIV stwierdzona u uczestników, nie wpływa na wyniki badania płynu mózgowo-rdzeniowego (podstawowe i stężenia cytokin). Dla poparcia słuszności tego założenia, z grupy chorych z kiłą układu nerwowego i prawdopodobną kiłą układu nerwowego wyodrębniono osoby HIV-pozytywne i te immunokompetentne. Następnie porównano parametry laboratoryjne w surowicy krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym, nie ujawniając istotnych statystycznie różnic (Tabela 9 i 10).

7.6 Poszukiwanie nowych markerów diagnostycznych zajęcia układu nerwowego w kile na wczesnym etapie zakażenia

Dostępne dane z piśmiennictwa wskazują na zaangażowanie odpowiedzi prozapalnej nieswoistej, typu Th1 i Th17 oraz przeciwzapalnej w odpowiedź immunologiczną w kile I i II okresu. Dotychczas w oparciu o nieliczne doniesienia sugerowano, że w przewlekłym zakażeniu krętkiem bladym mogą ogrywać rolę przede wszystkim mechanizmy hamujące odpowiedź zapalną, zapewniając optymalne warunki do przetrwania bakterii w organizmie. Każdorazowo pojawia się jednak wątpliwość, czy porównywanie chorych z kiłą I, II okresu i utajoną wczesną jest tożsame z porównaniem chorych z ostrym i przewlekłym zakażeniem. Kiła układu nerwowego jest modelem, który można uznać za przewlekłe stadium zakażenia. Wszystkie dane naukowe wskazują także, na fakt, że jest procesem niezależnym od zajęcia skóry, błon śluzowych, czy innych narządów. W naszym badaniu po raz pierwszy scharakteryzowano profil cytokinowy w kile układu nerwowego. W oparciu o analizę wyników tego badania i danych literaturowych wydaje się, że odpowiedź immunologiczna jest podobna do tej obserwowanej w kile I i II okresu. Stężenia cytokin w PMR u chorych z kiłą układu nerwowego zostały jednak odniesione do wyników u chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego. Oprócz zwiększonych stężeń cytokin w kile układu nerwowego, wykazano także przewagę odpowiedzi przeciwzapalnej nad prozapalną.

Wyniki naszego badania otwierają pole do dalszych badań, które powinny uwzględnić przede wszystkim poznanie charakteru odpowiedzi immunologicznej w późnej objawowej kile układu nerwowego oraz scharakteryzowanie komórek odpowiedzialnych za produkcję cytokin. Wydaje się także konieczne określenie znaczenia badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej jako czynników prognostycznych w kile układu nerwowego.

Szeroko rozumiana immunologia kiły jest kluczowym elementem patogenezy tej choroby. Badania immunologiczne, wykrywające odpowiedź ustroju na patogen prawdopodobnie mogą mieć przewagę nad badaniami molekularnymi, wykrywającymi patogen. Wydaje się bowiem, że kiła układu nerwowego rozwija się w mechanizmie zmienionej odpowiedzi zapalnej na patogen, a nie jest funkcją wirulencji samej bakterii.

Przedstawione badanie zostało zainspirowane m.in. problemem klinicznym, wynikającym z braku testu diagnostycznego o wysokiej swoistości i czułości pozwalającego na pewne rozpoznanie kiły układu nerwowego u chorych bez typowych objawów klinicznych. Oznaczone w PMR cytokiny, których podwyższone stężenie wykazano w niniejszej pracy u chorych z kiłą układu nerwowego, mogą posłużyć jako immunologiczne markery diagnostyczne kiły układu nerwowego. W tym celu konieczne są badania na większych grupach chorych celem ustalenia najbardziej swoistych i czułych punktów odcięcia. To jednak nie do końca wyczerpuje potrzeby praktyki klinicznej. W kontekście wiedzy, że standardowe leczenie kiły nie zapewnia krętkobójczego stężenia leku w płynie mózgowo-rdzeniowym, najistotniejsza wydaje się identyfikacja chorych z kiłą, którzy zagrożeni są zajęciem układu nerwowego na wczesnym etapie zakażenia. Optymalnym rozwiązaniem byłaby identyfikacja tej grupy chorych w oparciu o parametr oznaczany np. w surowicy krwi. Wydaje się, że nie będzie to możliwe do czasu kiedy nie zostanie w pełni poznany patomechanizm zakażenia krętkiem bladym i towarzysząca temu odpowiedź immunologiczna gospodarza.

8. Wnioski

1. U chorych z kiłą układu nerwowego w porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego stwierdza się w płynie mózgowo-rdzeniowym wyższe wartości stężeń cytokin prozapalnych typowych dla odpowiedzi nieswoistej (tj. TNF- α) i komórkowej typu Th1 i Th17 (tj. odpowiednio IFN- γ i IL-17A). Stężenia te korelują pozytywnie z parametrami stanu zapalnego takimi jak liczba leukocytów i stężenie białka w płynie mózgowo-rdzeniowym.
2. U chorych z kiłą układu nerwowego w porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego stwierdza się w płynie mózgowo-rdzeniowym wyższe wartości stężeń cytokin wykazujących działanie hamujące odpowiedź zapalną (tj. IL-10 i TGF- β). Sugeruje to, że odpowiedzi prozapalnej towarzyszącej zakażeniu układu nerwowego przez *T. pallidum* towarzyszą proporcjonalne mechanizmy kompensacyjne związane z produkcją cytokin o działaniu przeciwzapalnym. Stężenia IL-10 i TGF- β w płynie mózgowo-rdzeniowym korelują pozytywnie z parametrami stanu zapalnego takimi jak liczba leukocytów i stężenie białka w PMR.
3. Współczynniki wyrażające iloraz stężeń cytokin przeciwzapalnych do prozapalnych w płynie mózgowo-rdzeniowym są wyższe w grupie chorych z kiłą układu nerwowego niż w grupie z kiłą bez zajęcia układu nerwowego. Sugeruje to względną przewagę odpowiedzi przeciwzapalnej u chorych z kiłą układu nerwowego, co może zapewniać optymalne warunki do przetrwania patogenu i przewlekania się zakażenia.

9. Streszczenie

Wprowadzenie: Kiła jest chorobą przenoszoną głównie drogą kontaktów seksualnych wywołaną przez Gram-ujemną bakterię – krętka bladego (*Treponema pallidum*). Dane epidemiologiczne z ostatnich lat wskazują na wyraźny wzrost liczby zachorowań na kiłę. Do zajęcia układu nerwowego w przebiegu kiły może dojść już na wczesnym etapie zakażenia i wyrażać się jedynie nieprawidłowościami w badaniu płynu mózgowo-rdzeniowego. Nielezione lub leczone niewłaściwie zakażenie układu nerwowego na wczesnym etapie, kiedy nie występują objawy neurologiczne lub są one bardzo skąpe i niecharakterystyczne, może ulec samoistnej eliminacji lub skrycie, przez wiele lat postępować w konsekwencji prowadząc do późnych stadiów choroby, które nierzadko skutkują trwałym kalectwem. Odpowiedź immunologiczna typu Th1 i Th17 wydaje się dominować w kile wczesnej. Nieliczne doniesienia literaturowe sugerują, że progresja choroby może być związana z nadmierną aktywacją mechanizmów immunologicznych hamujących odpowiedź zapalną. Nadrzędnym celem niniejszego badania było poznanie charakteru odpowiedzi immunologicznej w kile układu nerwowego poprzez oznaczenie stężenia cytokin typowych dla odpowiedzi nieswoistej (TNF- α , IL-1 β), typu Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-17A) i przeciwzapalnej (IL-10, TGF- β) w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) u chorych na kiłę.

Metody: Do badania włączono 33 mężczyzn z kiłą II okresu lub kiłą utajoną wczesną hospitalizowanych w Klinice Dermatologii UJ CM w Krakowie. Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych ochotników dobranych pod względem płci i wieku. W grupie chorych oznaczono stężenia cytokin w surowicy krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym. W grupie kontrolnej oznaczenia wykonano wyłącznie w surowicy krwi.

Wyniki: Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic między stężeniami cytokin w surowicy krwi u chorych na kiłę i osób z grupy kontrolnej. W oparciu o wyniki podstawowych badań analitycznych i odczyny serologiczne w kierunku kiły wykonane w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na kiłę podzielono na grupy: (1) kiła układu nerwowego (n=5) – chorzy z reaktywnym odczynem VDRL w PMR, (2) prawdopodobna kiła układu nerwowego (n=6) – chorzy

z niereaktywnym VDRL w PMR ale z pleocytozą w PMR ≥ 5 komórek/ μl i (3) kiła bez zajęcia układu nerwowego (n=22) – chorzy z kiłą bez zajęcia układu nerwowego, tj. niereaktywny VDRL w PMR i leukocyty w PMR < 5 komórek/ μl . Wyodrębnione grupy chorych na kiłę nie różniły się istotnie pod względem cech demograficznych (jedynie wyższy średni wiek w grupie prawdopodobna kiła układu nerwowego w porównaniu do kiła bez zajęcia układu nerwowego; $p=0,04$), wyników podstawowych badań laboratoryjnych w surowicy krwi i stężenia analizowanych cytokin w surowicy krwi. U chorych z kiłą układu nerwowego w porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego stwierdzono w płynie mózgowo-rdzeniowym istotnie statystycznie wyższe stężenia IFN- γ ($p=0,0015$), IL-17A ($p=0,0004$), TNF- α ($p=0,007$), IL-10 ($p=0,0006$) i TGF- β ($0,006$). Chorzy z prawdopodobną kiłą układu nerwowego w porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego także charakteryzowali się wyższymi stężeniami analizowanych cytokin w PMR. Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic między grupami w zakresie stężeń w PMR IL-1 β i IL-4. Stężenie IL-4 w większości przypadków pozostawało poniżej limitu detekcji. Stężenia analizowanych cytokin, za wyjątkiem TGF- β , były wyższe w płynie mózgowo-rdzeniowym niż w surowicy krwi. Stężenia IFN- γ , IL-17A, TNF- α , IL-10 i TGF- β w PMR pozytywnie korelowały z pleocytozą w PMR. Współczynniki wyrażające iloraz stężeń cytokin przeciwzapalnych do prozapalnych (tj. IL-10/IFN- γ , IL-10/TNF- α i IL-10/IL-17A) były wyższe w grupie chorych z kiłą układu nerwowego w porównaniu do chorych z kiłą bez zajęcia układu nerwowego.

Wnioski: W odpowiedzi na zakażenie układu nerwowego przez krętka bladego bierze udział odpowiedź prozapalna typu Th1 i Th17. Proporcjonalnie do czynników prozapalnych zwiększa się odpowiedź o charakterze przeciwzapalnym wyrażona zwiększonymi stężeniami IL-10 i TGF- β w płynie mózgowo-rdzeniowym. Wydaje się, że odpowiedź immunologiczna w kile układu nerwowego charakteryzuje się względną przewagą mechanizmów przeciwzapalnych nad zapalnymi. Przypuszczalnie, stwarza to odpowiednie warunki do przetrwania bakterii i przewlekania się zakażenia.

Introduction: Syphilis is a sexually transmitted disease caused by Gram-negative bacterium – *Treponema pallidum*. Epidemiological data from recent years show a significant increase in the incidence of syphilis. Neurosyphilis may occur at an early stage of infection, and may be associated only with cerebrospinal fluid abnormalities. Early neurosyphilis with no or sparse/uncharacteristic neurological symptoms, when not treated or inappropriately treated may spontaneously clear or covertly progress for many years, leading to the late stages of neurosyphilis, which often results in permanent disability. Th1 and Th17-type immune responses seem to predominate in an early syphilis. However, few literature reports suggested that the progression of the infection to later stages may be associated with excessive activation of inhibitory immune mechanisms. The primary aim of this study was to characterize the immune response in neurosyphilis by determining the levels of cytokines typical for innate response (i.e. TNF- α , IL-1 β), Th1 (i.e. IFN- γ), Th2 (i.e. IL-4), Th17 (i.e. IL-17A) and anti-inflammatory (i.e. IL-10, TGF- β) in cerebrospinal fluid (CSF) in patients with syphilis.

Methods: The study included 33 men with secondary, or early latent syphilis admitted to the Department of Dermatology, Jagiellonian University in Krakow. The control group consisted of 15 healthy volunteers matched for age and sex. In patients cytokine concentrations were determined in serum and cerebrospinal fluid. In the control group determination was made only in the serum.

Results: There were no statistically significant differences between the concentrations of cytokines in the serum of patients with syphilis and those in the control group. Based on the results of the basic and serological tests in the cerebrospinal fluid, patients with syphilis were divided into groups: (1) neurosyphilis (n = 5) - patients with a reactive VDRL in CSF, (2) presumptive neurosyphilis (n = 6) - patients with non-reactive VDRL in CSF but with CSF pleocytosis ≥ 5 cells/ μ l, and (3) syphilis with no-neurosyphilis (n = 22) - patients with syphilis without nervous system involvement, such as non-reactive VDRL in CSF and CSF leukocytes <5 cells/ μ l. The groups of patients did not differ significantly with respect to demographic characteristics (only the higher average age in the group of presumptive neurosyphilis in comparison to syphilis with no-neurosyphilis, p = 0.04), the results of basic laboratory tests and serum

concentrations of the analyzed cytokines. Significantly higher levels of CSF IFN- γ ($p = 0.0015$), CSF IL-17 ($p = 0.0004$), CSF TNF- α ($p = 0.007$), CSF IL-10 ($p = 0.0006$), and CSF TGF- β ($0,006$) were found in patients with neurosyphilis when compared to patients with syphilis with no-neurosyphilis. Patients with presumptive neurosyphilis in comparison to patients with syphilis with no-neurosyphilis were characterized by higher concentrations of the analyzed cytokines in CSF. There were no statistically significant differences between groups of patients in levels of CSF IL-1 β and IL-4. In most cases levels of IL-4 was below the limit of detection. The levels of the analyzed cytokines, with the exception of TGF- β , were higher in the cerebrospinal fluid than in serum. The concentrations of IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-10 and TGF- β in CSF positively correlated with CSF pleocytosis. The ratios of the levels of anti-inflammatory/pro-inflammatory cytokines (i.e. IL-10/IFN- γ , IL-10/TNF- α and IL-10/IL-17A) were higher in patients with neurosyphilis as compared to patients with syphilis with no-neurosyphilis.

Conclusions: Th1 and Th17-type immune responses are associated with neurosyphilis. Anti-inflammatory response is activated in proportion, expressed as increased levels of CSF IL-10 and CSF TGF- β . It seems that the anti-inflammatory immune response predominates over the pro-inflammatory mechanisms in neurosyphilis. Presumably, this creates the conditions for the survival of bacteria and protraction of infection.

10. Piśmiennictwo

- ¹ Schmid G, Rowley JT, Samuelson J, Tun Y, Guraiib M, i in. World Health Organization (WHO) 2005 global estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted infections (STIs). WHO/CDC symposium: Congenital syphilis and the 2005 WHO estimates of STI incidence and prevalence: using the second to eliminate the first. 2009.
- ² Gerbase AC, Rowley JT, Heymann DH, Berkley SF, Piot P. Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs. *Sex Transm Infect* 1998; 74 (suppl 1): S12-16.
- ³ Panchaud C, Singh S, Feivelson D, Darroch JE. Sexually transmitted diseases among adolescents in developed countries. *Fam Plann Perspect* 2000; 32: 24-32.
- ⁴ Klimarx PH, Zaidi AA, Thomas JC, i in. Sociodemographic factors and the variation in syphilis rates among US countries, 1984 through 1993: an ecological analysis. *Am J Public Health* 1997; 87: 1937-1943.
- ⁵ Stapiński A. Powojenna akcja zwalczania chorób wenerycznych – akcja „W”. *Przegl Dermatol* 1995; 82: 399-404.
- ⁶ Majewski S, Rudnicka I. Choroby przenoszone drogą płciową w Polsce w 2006 roku w świetle danych z 2005 roku. *Przegl Epidemiol* 2007; 61: 331-338.
- ⁷ Majewski S, Rudnicka I. Choroby przenoszone drogą płciową w Polsce w 2008 roku. *Przegl Epidemiol* 2010; 64: 281-285.
- ⁸ Chodynicka B, Serwin AB, Klepacki A. Kiła. [W:] Choroby przenoszone drogą płciową. Mroczkowski TF. (red.) Czelej, Lublin 2012: 149-201.
- ⁹ LaFond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 29-49.
- ¹⁰ Gjestland T. The Oslo study of untreated syphilis; an epidemiologic investigation of the natural course of the syphilitic infection based upon a re-study of the Boeck-Bruusgaard material. *Acta Derm Venereol* 1955; 35: 3-368.
- ¹¹ Blanco DR, Champion CI, Dooley A, Cox DL, Whitelegge JP, Faull K, Lovett MA. A monoclonal antibody that conveys in vitro killing and partial protection in experimental syphilis binds a phosphorylcholine surface epitope of *Treponema pallidum*. *Infect Immun* 2005; 73: 3083-3095.
- ¹² Blanco DR, Radolf JD, Lovett MA, Miller JN. The antigenic interrelationship between the endoflagella of *Treponema pallidum* Nichols strain. I. Treponemicidal activity of cross-reactive endoflagellar antibodies against *T. pallidum*. *J Immunol* 1986; 137: 2973-2979.
- ¹³ Chamberlain NR, Brandt ME, Erwin AL, Radolf JD, Norgadr MV. Major integraf membrane protein immunogens of *Treponema pallidum* are proteolipids. *Infect Immun* 1989; 57: 2872-2877.

-
- ¹⁴ Baker-Sander SA, Hook EW, Bonin P, Handsfield HH, Lukehart SA. Antigens of *Treponema pallidum* recognized by IgG and IgM antibodies during syphilis in humans. *J Infect Dis* 1985; 151: 264-272.
- ¹⁵ Baker-Zander SA Roddy RE, Hansfield HH, Lukehart SA. IgG and IgM antibody reactivity to antigens of *Treponema pallidum* after treatment of syphilis. *Sex Transm Dis* 1986; 13: 214-220.
- ¹⁶ Lukehart SA, Miller JN. Demonstration of the in vitro phagocytosis of *Treponema pallidum* by rabbit peritoneal macrophages. *J Immunol* 1978; 121: 2014-2024.
- ¹⁷ Shaffer JM, Baker-Zander SA, Lukehart SA. Opsonization of *Treponema pallidum* is mediated by immunoglobulin G antibodies induced only by pathogenic treponemes. *Infect Immun* 1993; 61: 781-784.
- ¹⁸ Blanco DR, Miller JN, Hanff PA. Humoral immunity in experimental syphilis: the demonstration of IgG as a treponemicidal factor in immune rabbit serum. *J Immunol* 1984; 133: 2693-2697.
- ¹⁹ Bishop NH, Miller JN. Humoral immunity in experimental syphilis. II. The demonstration of resistance conferred by passive immunization. *J Immunol* 1976; 117: 191-196.
- ²⁰ Weiser RS, Erickson D, Perine PL, Pearsall NN. Immunity to syphilis: passive transfer in rabbits using serial doses of immune serum. *Infect Immun* 1976; 13: 1402-1407.
- ²¹ French P, Gomberg M, Janier M, i in. IUSTI: 2008 European Guidelines on the Management of syphilis. *Int J STD AIDS* 2009; 20: 300-309.
- ²² Workowski KA, Berman S. Sexually Transmitted Diseases Guidelines, 2010. *MMWR* 2010; 59: 1-116.
- ²³ Raiziss GW, Severac M. Rapidity with *Spirochaeta pallida* invade the bloodstream. *Arch Derm Syphilol* 1937; 35: 1101-1109.
- ²⁴ Collart P, Franceschini P, Durel P. Experimental rabbit syphilis. *Br J Vener Dis* 1971; 47: 389-400.
- ²⁵ Wile UJ, Stokes JH. A study of the spinal fluid with reference to involvement of the nervous system in secondary syphilis. *J Cutan Dis* 1914; 32: 607-623.
- ²⁶ Fildes P, Parnell RJ, Maitland HB. The occurrence of unsuspected involvement of the central nervous system in unselected cases of syphilis. *Brain* 1918; 41: 255-301.
- ²⁷ Marra CM, Maxwell CL, Smith SL, i in. Cerebrospinal fluid abnormalities in patients with syphilis: association with clinical and laboratory features. *J Infect Dis* 2004; 189: 369-376.
- ²⁸ Marra CM. Neurosyphilis. *Curr Neurol Neuroscien Rep* 2004; 4: 435-440.
- ²⁹ Ghanem KG. Neurosyphilis: a historical perspective and review. *CNS Neurosc Ther* 2010; 16: e157-e168.
- ³⁰ Moore JE, Hopkins HH. Asymptomatic neurosyphilis VI: The prognosis of early and late asymptomatic neurosyphilis. *J Am Med. Assoc* 1930; 95: 1637-1641.

-
- ³¹ Berry CD, Hooton TM, Colier AC, Lukehart SA. Neurologic relapse after benzathine penicillin therapy for secondary syphilis in patient with HIV infection. *N Engl J Med* 1987; 316: 1587-1589.
- ³² Walter T, Lebouche B, Mialhes P, Cotte L, Roure C, Schlienger I, i in. Symptomatic relapse of neurologic syphilis after benzathine penicillin G therapy for primary or secondary syphilis in HIV-infected patients. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 787-790.
- ³³ Richards BW, Hessburg TJ, Nussbaum JN. Recurrent syphilitic uveitis. *N Engl J Med* 1989; 320: 62.
- ³⁴ Mishra S, Walmsley SL, Loutfy MR, Kul R, Logue KJ, Gold WL. Ootosyphilis in HIV-coinfected individuals: a case series from Toronto, Canada. *AIDS Patient Care STDs* 2008; 22: 213-219.
- ³⁵ Merritt HH. The early clinical and laboratory manifestations of syphilis of the central nervous system. *N Engl J Med*. 1940; 223: 446-450.
- ³⁶ Ghanem KG, Moore RD, Rompalo AM, Erbeding EJ, Zenilman JM, Gebo KA. Neurosyphilis in a clinical cohort of HIV-1-infected patients. *AIDS* 2008; 22: 1145-1151.
- ³⁷ Bayne LL, Schmidley JW, Goodin DS. Acute syphilitic meningitis: Its occurrence after clinical and serologic cure of secondary syphilis with penicillin-G. *Arch Neurol* 1986; 43: 137-138.
- ³⁸ Musher DM. Syphilis, neurosyphilis, penicillin, and AIDS. *J Infect Dis* 1991; 163: 1201-1206.
- ³⁹ Danielsen AG, Weismann K, Jorgensen BB, Heidenheim M, Fugleholm AM. Incidence, clinical presentation and treatment of neurosyphilis in Denmark 1980-1997. *Acta Derm Venereol* 2004; 84: 459-462.
- ⁴⁰ Dewhurst K. The neurosyphilitic psychoses today: A survey of 91 cases. *Br J Psychiatry* 1969; 115: 31-38.
- ⁴¹ Weinert LS, Scheffel RS, Zoratto G, Samios V, Jeffmann MW, Dora JM, Goldani LZ. Cerebral syphilitic gumma in HIV-infected patients: case report and review. *Int J STD AIDS* 2008; 19: 62-64.
- ⁴² Bash S, Hathout GM, Cohen S. Mesiotemporal T2-weighted hyperintensity: neurosyphilis mimicking herpes encephalitis. *Am J Neuroradiol* 2001; 12: 314-317.
- ⁴³ Szilak I, Marty F, Helft J, Soeiro R. Neurosyphilis presenting as herpes simplex encephalitis. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1108-1109.
- ⁴⁴ Marano E, Briganti F, Tortora F, i in. Neurosyphilis with complex partial status epilepticus and mesiotemporal MRI abnormalities mimicking herpes simplex encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 833.
- ⁴⁵ Chang YP, Lin RT, Liu CK, i in. Neurosyphilis presenting with status epilepticus. *Neurologist* 2006; 12: 314-317.
- ⁴⁶ Lansberg MG, O'Brien MW, Norbash AM, i in. MRI abnormalities associated with partial status epilepticus. *Neurology* 1999; 52: 1021-1027.

-
- ⁴⁷ Marra CM. Update on neurosyphilis. *Curr Infect Dis Rep* 2009; 11: 127-134.
- ⁴⁸ Wharton M, Chorba TL, Vogt RL, Morse DL, Buehler JW. Case definitions for public health surveillance. *MMWR Recomm Rep* 1990; 39: 1-43.
- ⁴⁹ Luger AF, Schmidt BL, Kaulich M. Significance of laboratory findings for the diagnosis of neurosyphilis. *Int J STD AIDS* 2000; 11: 224-234.
- ⁵⁰ Hook EW, Marra CM. Acquired syphilis in adults. *N Engl J Med* 1992; 326: 1060-9.
- ⁵¹ Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 1-21.
- ⁵² Lukehart SA, Hook EW, Baker-Zander SA, Collier AC, Critchlow CW, Handsfield HH. Invasion of the CNS by *T. pallidum*. Implications for diagnosis and treatment. *Ann Intern Med* 1988; 109: 855-62.
- ⁵³ Jaffe HW, Larsen SA, Peters M, Jove DF, Lopez B, Schroeter AL. Tests for treponemal antibody in CSF. *Arch Intern Med*. 1978; 138: 252-255.
- ⁵⁴ Mcgeeney T, Yount F, Hinthorn DR, Liu C. Utility of the FTA-ABS test of cerebrospinal-fluid in the diagnosis of neurosyphilis. *Sex Transm Dis* 1979; 6: 195-198.
- ⁵⁵ Hooshmand H, Escobar MR, Kopf SW. Neurosyphilis. A study of 241 patients. *JAMA* 1972; 219: 726-9.
- ⁵⁶ Marra CM, Gary DW, Kuypers J, Jacobson MA. Diagnosis of neurosyphilis in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 1996; 174: 219-221.
- ⁵⁷ Rolfs RT, Joesoef MR, Hendershot EF, i in. A randomized trial of enhanced therapy for early syphilis in patients with and without human immunodeficiency virus infection: the Syphilis and HIV study group. *N Engl J Med* 1997; 337: 307-314.
- ⁵⁸ Rompalo AM, Joesoef MR, O'Donnell JA, i in. Clinical manifestations of early syphilis by HIV status and gender: results of the Syphilis and HIV study. *Sex Transm Dis* 2001; 28: 158-165.
- ⁵⁹ DiNubile MJ, Copare FJ, Gekowski KM. Neurosyphilis developing during treatment of secondary syphilis with benzathine penicillin in a patient without serologic evidence of human immunodeficiency virus infection. *Am J Med*. 1990; 88: 45N-48N.
- ⁶⁰ Jorgensen J, Tikjob G, Weismann K. Neurosyphilis after treatment of latent syphilis with benzathine penicillin. *Genitourin Med*. 1986; 62: 129-131.
- ⁶¹ Pavia CS, Folds JD, Baseman JB. Cell-mediated immunity during syphilis: a review. *Br J Vener Dis* 1978; 54: 144-150.
- ⁶² Turner DR, Wright DJM. Lymphadenopathy in early syphilis. *J Pathol* 1973; 110: 305-308.
- ⁶³ Lukehart SA, Miller JN. Demonstration of the in vitro phagocytosis of *Treponema pallidum* by Rabbit peritoneal macrophages. *J Immunol* 1978; 121: 2014-2024.

-
- ⁶⁴ Baker-Zander S, Sell S. A histopathologic and immunologic study of the course of syphilis in the experimentally infected rabbit: demonstration of long-lasting cellular immunity. *Am J Pathol* 1980; 101: 387-413.
- ⁶⁵ Chung KY, Kim KS, Lee MG, Chang NS, Lee JB. *Treponema pallidum* induces up-regulation of interstitial collagenase in human dermal fibroblasts. *Acta Derm Venereol* 2002; 82: 174-178.
- ⁶⁶ Riley BS, Oppenheimer-Marks N, Hansen EJ, Radolf JD, Norgard MV. Virulent *Treponema pallidum* activates human vascular endothelial cells. *J Infect Dis* 1992; 165: 484-493.
- ⁶⁷ Shin JL, Chung KY, Kang JM, Lee TH, Lee MG. The effects of *Treponema pallidum* on human dendritic cells. *Yonsei Med J* 2004; 45: 515-522.
- ⁶⁸ Bouis DA, Popova TG, Takashima A, Norgard MV. Dendritic cells phagocytose and are activated by *Treponema pallidum*. *Infect Immun* 2001; 69: 518-528.
- ⁶⁹ Lukehart SA, Baker-Zander SA, Sell S. Characterization of lymphocyte responsiveness in early experimental syphilis. I. In vitro response to mitogens and *Treponema pallidum* antigens. *J Immunol* 1980; 124: 454-460.
- ⁷⁰ Lukehart SA, Baker-Zander SA, Lloyd RM, Sell S. Characterization of lymphocyte responsiveness in early experimental syphilis. II. Nature of cellular infiltration and *Treponema pallidum* distribution in testicular lesions. *J Immunol* 1980; 124: 461-467.
- ⁷¹ Van Voornis WC, Barrett LK, Koelle DM, Nasio JM, Plummer FA, Lukehart SA. Primary and secondary syphilis lesions contain mRNA for Th1 cytokines. *J Infect Dis* 1996; 173: 491-495.
- ⁷² Van Voornis WC, Barrett LK, Nasio JM, Plummer FA, Lukehart SA. Lesions of primary and secondary syphilis contain activated cytolytic T cells. *Infect Immun* 1996; 64: 1048-1050.
- ⁷³ Cruz AR, Ramirez LG, Zuluaga AV, et al. Immune evasion and recognition of the syphilis spirochete in blood and skin of secondary syphilis patients: two immunologically distinct compartments. *PLOS Negl Trop Dis* 2012; 6: 1-18.
- ⁷⁴ Sell S, Baker-Zander S, Powell HC. Experimental syphilitic orchitis in rabbits: ultrastructural appearance of *Treponema pallidum* during phagocytosis and dissolution by macrophages in vivo. *Lab Invest* 1982; 46: 355-364.
- ⁷⁵ Lukehart SA, Miller JN. Demonstration of the in vivo phagocytosis of *Treponema pallidum* by Rabbit peritoneal macrophages. *J Immunol* 1978; 121: 2014-2024.
- ⁷⁶ Baker-Zander SA, Lukehart SA. Macrophage-mediated killing of opsonized *Treponema pallidum*. *J Infect Dis* 1992; 165: 69-74.
- ⁷⁷ Lukehart SA, Shaffer JM, Baker-Zander SA. A subpopulation of *Treponema pallidum* is resistant to phagocytosis: possible mechanism of persistence. *J Infect Dis* 1992; 166: 1449-1453.
- ⁷⁸ Chatila T. Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 949-959.

-
- ⁷⁹ Louten J, Boniface K, de Waal Malefyt R. Development and function of Th17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 1004-1011.
- ⁸⁰ Stary G, Klein I, Bruggen MC, i in. Host defense mechanisms in secondary syphilitic lesions. *Am J Pathol* 2010; 5: 2421-2432.
- ⁸¹ Marra CM, Castro CD, Kuller BSL, i in. Mechanisms of clearance of *Treponema pallidum* from CSF in a nonhuman primate model. *Neurology* 1998; 51: 957-961.
- ⁸² Marra CM, Maxwell CL, Tantaló L, Eaton M, Rompalo AM, Raines C, Stoner BP, Corbet JJ, i in. Normalization of cerebrospinal fluid abnormalities after neurosyphilis therapy: does HIV status matter? *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1001-6.
- ⁸³ Saukkonen K, Sande S, Cioffe C, Wolpe S, Sherry B, Cerami A, Tuomanen E. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J Exp Med* 1990; 171: 439-448.
- ⁸⁴ Ossege LM, Sindern E, Voss B, Malin JP. Expression of tumor necrosis factor- α and transforming growth factor- β 1 in cerebrospinal fluid cells in meningitis. *J Neur Sci* 1996; 144: 1-13.
- ⁸⁵ Akis DR, Purcell BK, Mitra MM, Norgard MV, Radolf JD. Lipid modification of the 17-kilodalton membrane immunogen of *Treponema pallidum* determines macrophage activation as well as amphiphilicity. *Infect Immun* 1993; 61: 1202-1210.
- ⁸⁶ Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cytokines [W] Cellular and molecular immunology. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (red.) Saunders Elsevier, 6th Edition; 2007: 267-301.
- ⁸⁷ Bociąga-Jasik M, Garlicki A, Ciesla A, Kalinowska-Nowak A, Sobczyk-Krupiarz I, Mach T. The diagnostics value of cytokine and nitric oxide concentrations in cerebrospinal fluid for the differential diagnosis of meningitis. *Adv Med Sci*, 2012; 57: 142-147.
- ⁸⁸ Babolin C, Amedei A, Ozolins D, Zilevica A, Milco D'Elis M, de Bernard M. TpF1 from *Treponema pallidum* activates inflammasome and promotes the development of regulatory T cells. *J Immunol* 2011; 187: 1377-1384.
- ⁸⁹ Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991; 147: 3815-3822.
- ⁹⁰ Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 1992; 148: 1143-1148.
- ⁹¹ Ichiyama T, Maeba S, Suenaga N, Saito K, Matsubara T, Furukawa S. Analysis of cytokine levels in cerebrospinal fluid in mumps meningitis: comparison with echovirus type 30 meningitis. *Cytokine* 2005; 30: 243-247.
- ⁹² Podwinska J, Lusiak M, Zaba R, Bowszyc J. The pattern and level of cytokines secreted by Th1 and Th2 lymphocytes of syphilitic patients correlate to progression of the disease. *FEMS Immunol Med. Microbiol* 2000; 28: 1-14.

-
- ⁹³ Lusiak M, Podwinska J. Interleukin 10 and its role in the regulation of the cell-mediated immune response in syphilis. *Arch Immunol Ther Exp* 2001; 49: 417-421.
- ⁹⁴ Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002; 420: 502-507.
- ⁹⁵ Bandholtz L, Kreuger MR, Svanholm C, Wigzell H, Rottenberg ME. Adjuvant modulation of the immune responses and the outcome of infection with *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Exp Immunol* 2002; 130: 393-403.
- ⁹⁶ Thiel A, Wu PH, Lauster R, Braun J, Radbruch A, Sieper J. Analysis of the antigen-specific T cell response in reactive arthritis by flow cytometry. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2834-2842.
- ⁹⁷ Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Ann Rev Immunol* 2011; 29: 71-109.
- ⁹⁸ Tabor DR, Kiel DP, Jacobs RF. Cyclophosphamide-sensitive activity of suppressor T-cells during treponemal infection. *Immunology* 1987; 62: 127-132.
- ⁹⁹ Borish L. IL-10: evolving concepts. *J Allergy Clin Immunol*. 1998; 101: 293-297.
- ¹⁰⁰ Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *J Immunol* 1998; 160: 3188-3193.
- ¹⁰¹ Fitzgerald TJ. The Th1/Th2-like switch in syphilis infection: is it detrimental? *Infect Immun* 1992; 60: 3475-3479.
- ¹⁰² Veerdonk FL, Gresnigt MS, Kullberg BJ, van der Meer JWM, Joosten LAB, Netea MG. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB reports* 2009; 42: 776-787.
- ¹⁰³ Burchill MA, Nardelli DT, England DM, DeCoster DJ, Christopherson JA, Callister SM, Schell RF. Inhibition of interleukin-17 prevents the development of arthritis in vaccinated mice challenged with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 2003; 71: 3437-3442.
- ¹⁰⁴ Henningson AJ, Tjernberg I, Malmvall BE, Fosberg P, Ernerudh J. Indications of Th1 and Th17 responses in cerebrospinal fluid from patients with Lyme neuroborreliosis: a large retrospective study. *J Neuroinflamm* 2011; 8: 36-47.