

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Agnieszka Wroczyńska

**WYSTĘPOWANIE PRZECIWCIAŁ
PRZECIWKO BIAŁKOM SZOKU TERMICZNEGO
ORAZ WYBRANYCH CYTOKIN W MALARII
I ICH ZNACZENIE KLINICZNE**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Praca wykonana w Zakładzie Parazytologii Tropikalnej
Międzywydziałowego Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej AM w Gdańsku
w ramach projektu badawczego MNiSW nr 2 P05 B 109 29

Promotor: prof. dr hab. n. med. Przemysław Myjak

GDAŃSK 2008

Serdecznie dziękuję:

*Panu prof. dr hab. n. med. Przemysławowi Myjakowi, Dyrektorowi MIMMiT AMG
i promotorowi niniejszej rozprawy, za opiekę naukową
oraz wsparcie na każdym etapie pracy,*

*Panu dr n. med. Wacławowi Leszkowi Nahorskiemu, Kierownikowi Kliniki Chorób
Tropikalnych i Pasożytniczych MIMMiT AMG, za wsparcie merytoryczne i organizacyjne
na obu kontynentach,*

*O. Andrzejowi Fecko SVD, Dyrektorowi Centrum Medycznego im. Św. Łukasza
w Kifangondo oraz s. Barbarze Sojce SSpS za umożliwienie i ogromną pomoc
w przeprowadzeniu badań w Angoli,*

*O. Waldemarowi Kusowi, Dyrektorowi Centrum Animacji Misyjnej Księży Werbistów
oraz wszystkim przyjaciółom ze Zgromadzenia Słowa Bożego i Zgromadzenia
Misyjnego Służebnic Ducha Świętego w Angoli za wszelką okazaną pomoc,*

*Współpracownikom z Kliniki Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych, Zakładu
Parazytologii Tropikalnej MIMMiT AMG oraz Centrum Medycznego im. Św. Łukasza
w Kifangondo za poświęcony czas i życzliwość,*

*Pani dr n. med. Hannie Żarnowskiej-Prymek za pomoc i udostępnienie materiału
do badań z Kliniki Chorób Odzwierzęcych i Tropikalnych AM w Warszawie*

*Pani dr n. med. Alicji Bąkowskiej z Zakładu Immunopatologii AMG za cenne rady
i wsparcie w badaniach oraz redagowaniu pracy,*

*Pani tech. Iwonie Muczyńskiej z Laboratorium Immunologii Klinicznej SPSK1 w
Gdańsku, za wykonanie części oznaczeń oraz naukę technik laboratoryjnych,*

*Panu dr n. med. Tomaszowi Bandurskiemu, Kierownikowi Zakładu Informatyki
Radiologicznej i Statystyki AMG, za wsparcie w opracowaniu statystycznym danych,*

a przede wszystkim Rodzinie za zrozumienie i wszelką okazaną pomoc.

Spis treści

1	Streszczenie	7
2	Wstęp	11
2.1	Zimnica (malaria)	11
2.1.1	Etiologia zimnicy oraz drogi zarażenia	12
2.1.2	Cykl rozwojowy zarodźca malarii.....	14
2.1.3	Epidemiologia zimnicy na świecie.....	15
2.1.4	Epidemiologia zimnicy przywlekanej do krajów Europy i Polski.....	18
2.1.5	Patogeneza malarii.....	19
2.1.6	Immunologia malarii.....	22
2.1.7	Diagnostyka laboratoryjna zimnicy.....	24
2.1.8	Objawy i przebieg kliniczny zimnicy.....	28
2.2	Cytokiny i ich znaczenie w odpowiedzi na zarażenie <i>Plasmodium spp</i>	31
2.2.1	Podstawowe właściwości cytokin i pojęcie sieci cytokin.....	31
2.2.2	Rola cytokin w zimnicy.....	33
2.2.3	Znaczenie poszczególnych cytokin w zimnicy	34
2.3	Przeciwciała przeciwko białkom szoku termicznego	40
2.3.1	Znaczenie przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w zimnicy	43
2.4	Centrum Medyczne im. Św. Łukasza w Kifangondo w Angoli.....	45
3	Cel.....	49
4	Materiał i metody.....	50
4.1	Grupy osób włączone do analizy oraz badania kliniczne i laboratoryjne wykonywane u pacjentów	50
4.1.1	Dorośli z zimnicą przywleczoną do Polski oraz grupa kontrolna.....	50
4.1.2	Badanie kliniczne oraz badania dodatkowe u dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski... 51	
4.1.3	Dzieci angolskie z zimnicą oraz grupa kontrolna	54
4.1.4	Badanie kliniczne oraz badania dodatkowe u dzieci angolskich z zimnicą.....	56
4.2	Kwalifikacja chorych do poszczególnych stopni ciężkości przebiegu zimnicy. 58	
4.3	Materiały	60
4.3.1	Surowice pacjentów z Polski.....	60
4.3.2	Surowice pacjentów z Angoli.....	60
4.3.3	Odczynniki i materiały zużywalne.....	60
4.3.4	Aparatura	61
4.3.5	Programy komputerowe.....	61
4.4	Oznaczanie stężeń cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy krwi.....	62
4.4.1	Oznaczanie stężeń TNF, IFN γ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18 w surowicy krwi.....	63
4.4.2	Oznaczanie stężeń przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy krwi.....	65
4.5	Analiza statystyczna	66
5	Wyniki	68
5.1	Charakterystyka pacjentów.....	68

5.1.1	Dorośli z zimnicą przywleczoną do Polski.....	68
5.1.2	Dzieci angolskie z zimnicą	72
5.2	Stężenia cytokin w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski....	76
5.2.1	Stężenia cytokin w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski o łagodnym i ciężkim przebiegu oraz w grupie kontrolnej	76
5.2.2	Zależności pomiędzy stężeniem cytokin w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski, a etiologią malarii oraz parazytemią.....	82
5.2.3	Zależności pomiędzy stężeniem cytokin w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski, a wcześniejszą ekspozycją na inwazję <i>Plasmodium</i> spp. i wiekiem chorych.....	83
5.2.4	Stężenia cytokin w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski przed leczeniem oraz po przebytej chorobie	83
5.2.5	Przydatność oznaczania surowicznych stężeń wybranych cytokin w rozróżnianiu przypadków malarii o łagodnym i ciężkim przebiegu u dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski....	89
5.3	Stężenia przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski.....	95
5.3.1	Stężenia przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski o łagodnym i ciężkim przebiegu oraz w grupie kontrolnej.....	95
5.3.2	Zależności pomiędzy stężeniem przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski, a etiologią zimnicy oraz parazytemią.....	97
5.3.3	Zależności pomiędzy stężeniem przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski, a wcześniejszą ekspozycją na inwazję <i>Plasmodium</i> spp. i wiekiem chorych	97
5.3.4	Stężenia przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski przed leczeniem oraz po przebytej chorobie.....	97
5.4	Stężenia cytokin w surowicy dzieci angolskich z zimnicą.....	99
5.4.1	Stężenia cytokin w surowicy dzieci angolskich z zimnicą o łagodnym i ciężkim przebiegu oraz w grupie kontrolnej	99
5.4.2	Zależności pomiędzy stężeniem cytokin w surowicy dzieci angolskich z zimnicą, a parazytemią.....	106
5.4.3	Zależności pomiędzy stężeniem cytokin w surowicy dzieci angolskich z zimnicą, a wcześniejszą ekspozycją na inwazję <i>Plasmodium</i> i wiekiem chorych.....	106
5.4.4	Stężenia cytokin w surowicy dzieci angolskich z zimnicą przed leczeniem oraz po przebytej chorobie	107
5.4.5	Przydatność oznaczania surowicznych stężeń wybranych cytokin w rozróżnianiu przypadków malarii o łagodnym i ciężkim przebiegu u dzieci angolskich z zimnicą	112
5.5	Stężenia przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dzieci angolskich z zimnicą.....	116
5.5.1	Stężenia przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dzieci angolskich z zimnicą o łagodnym i ciężkim przebiegu oraz w grupie kontrolnej.....	116
5.5.2	Zależności pomiędzy stężeniem przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dzieci angolskich z zimnicą, a parazytemią.....	118
5.5.3	Zależności pomiędzy stężeniem przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dzieci angolskich z zimnicą, a wcześniejszą ekspozycją na inwazję <i>Plasmodium</i> i wiekiem chorych	118

5.5.4	Stężenia przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy krwi dzieci angolskich z zimnicą przed leczeniem oraz po przebytej chorobie	118
6	Dyskusja.....	120
6.1	Analiza surowiczych stężeń cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w zależności od etiologii zimnicy i parazytemii.....	123
6.2	Analiza surowiczych stężeń cytokin u pacjentów dorosłych z przywleczoną zimnicą oraz u dzieci angolskich z malarią.....	125
6.2.1	Czynnik martwicy nowotworów.....	125
6.2.2	Interferon γ	128
6.2.3	Interleukina 6.....	130
6.2.4	Interleukina 10.....	132
6.2.5	Interleukina 12.....	135
6.2.6	Interleukina 13.....	136
6.2.7	Interleukina 18.....	137
6.3	Analiza surowiczych stężeń przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego u pacjentów dorosłych z przywleczoną zimnicą oraz u dzieci angolskich z malarią.....	139
6.4	Zimnica jako odpowiedź na inwazję <i>Plasmodium</i> o cechach niekontrolowanego zapalenia (rola „burzy cytokinowej” w malarii).....	142
6.5	Przydatność diagnostyczna oznaczeń surowiczych stężeń wybranych cytokin w malarii	146
6.6	Uwagi końcowe	148
7	Wnioski.....	150
8	Piśmiennictwo	151
9	Aneks	170
10	Spis rycin.....	179
11	Spis tabel.....	182

Objaśnienia najczęściej używanych skrótów:

CD4	Cząsteczka występująca na limfocytach T rozpoznających antygeny prezentowane w kontekście MHC klasy II (ang. Cluster of differentiation 4)
CD8	Cząsteczka występująca na limfocytach T rozpoznających antygeny prezentowane w kontekście MHC klasy I (ang. Cluster of differentiation 8)
CD36	Receptor błonowy biorący udział m. in. w procesie cytoadherencji erytrocytów zarażonych <i>P. falciparum</i> (ang. Cluster of differentiation 36)
CR1	Receptor dla dopełniacza typu 1, obecny m. in. na krwinkach czerwonych (ang. Complement receptor 1)
ELISA	Technika immunoenzymatyczna (ang. Enzyme-linked immunosorbent assay)
GPI	Glikofosfatydyloinozytol (ang. Glycosylphosphatidylinositol)
HRP	Peroksydaza chrzanowa (ang. Horseradish peroxidase)
Hsp	Białka szoku termicznego (ang. Heat shock proteins)
ICAM-1	Cząsteczka adhezji międzykomórkowej typu 1 (ang. Intercellular adhesion molecule 1)
IFA	Technika immunofluorescencji pośredniej (ang. Indirect fluorescent antibody test)
IL	Interleukina
IL-1Ra	Antagonista receptora dla interleukiny 1 (ang. IL-1 receptor antagonist)
IL-18BP	Białko wiążące interleukinę 18 (IL-18 binding protein)
IFN γ	Interferon γ
LR	Wskaźnik wiarygodności (ang. Likelihood Ratio)
NK	Grupa komórek układu odpornościowego odpowiedzialna za zjawisko naturalnej cytotoksyczności (ang. Natural Killers)
NPV	Wartość predykcji wyników ujemnych (ang. Negative predictive value)
P.	Zarodek (łac. <i>Plasmodium</i>)
PCR	Technika polimerazowej reakcji łańcuchowej (ang. Polymerase Chain Reaction)
PfEMP-1	Białko błonowe zarodźca sierpowatego typu 1 (ang. <i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1)
PfHsp70	Białko zarodźca sierpowatego z rodziny Hsp70 (<i>Plasmodium falciparum</i> Hsp 70)
PfHsp60	Białko zarodźca sierpowatego z rodziny Hsp60 (<i>Plasmodium falciparum</i> Hsp 60)
PvHsp70	Białko zarodźca ruchliwego z rodziny Hsp70 (<i>Plasmodium vivax</i> heat shock protein 70)
PPV	Wartość predykcji wyników dodatnich (ang. Positive predictive value)
ROC	Charakterystyka operacyjna odbiorcy (ang. Receiver Operator Characteristic)
SEM	Błąd standardowy średniej (ang. Standard Error of the Mean)
spp.	Gatunki (łac. Species)
sIL-1R	Rozpuszczalny receptor dla interleukiny 1 (ang. Soluble IL-1 receptor)
sTNF-R	Rozpuszczalny receptor dla czynnika martwicy nowotworów (ang. Soluble TNF receptor)
TGF β	Transformujący czynnik wzrostu β (ang. Transforming growth factor β)
Th1	Subpopulacja limfocytów T wydzielających m. in. IL-2, IL-3, IFN γ (ang. T helper type 1 lymphocytes)
Th2	Subpopulacja limfocytów T wydzielających m. in. IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 (ang. T helper type 2 lymphocytes)
TMB	Tetrametylobenzydyna
TNF	Czynnik martwicy nowotworów (ang. Tumor necrosis factor)
TropNetEurop	Europejska Sieć Nadzoru nad Przywiezianymi Chorobami Zakaźnymi (ang. European Network on Imported Infectious Disease Surveillance)
VCAM-1	Cząsteczka adhezji śródbłonna naczyniowego typu 1 (ang. Vascular cell adhesion molecule 1)
WHO	ang. World Health Organisation, Światowa Organizacja Zdrowia

1 Streszczenie

Współwystępowanie trzech zjawisk: oporności komarów na większość insektycydów, oporności *Plasmodium* na większość leków oraz trudności w wyprodukowaniu szczepionki przeciwzimniczej zniweczyło nadzieję na szybką eliminację lub pełną kontrolę malarii na świecie. Obecnie zimnica uważana jest za najpowszechniejszą chorobę pasożytniczą w tropiku, a zarazem jeden z ważniejszych problemów zdrowia publicznego w krajach rozwijających się. Ponadto malaria wciąż stanowi istotne zagrożenie dla podróżujących w rejony jej występowania. W Polsce przywlekana zimnica jest rzadkim, ale istotnym problemem klinicznym. Szczególnie niepokojącym zjawiskiem jest obserwowana w ciągu ostatnich lat, kilkakrotnie wyższa niż przeciętna w krajach europejskich, śmiertelność z powodu inwazji *P. falciparum* o ciężkim przebiegu. W tej niekorzystnej sytuacji wgląd w mechanizmy immunologiczne, stanowiące podstawę patogenezы zarażenia zarodźcem, może okazać się cenną pomocą zarówno w rozwoju narzędzi diagnostycznych, jak i metod terapeutycznych.

Coraz większą rolę w inwazji *Plasmodium* spp. przypisuje się odpowiedzi zapalnej i uczestniczących w niej wzajemnych oddziaływaniach pasożyta z komórkami gospodarza, w których to interakcjach istotną rolę odgrywają cytokiny. Wczesna produkcja prozapalnych cytokin, w szczególności interferonu γ (IFN γ) przy udziale czynnika martwicy nowotworów (TNF) oraz interleukin: IL-12, IL-1 i IL-6, wydaje się być konieczna do efektywnej redukcji parazytemii, a co za tym idzie, ustąpienia objawów choroby. Z drugiej strony, ciężkie postaci zimnicy okazały się powiązane z nadmierną ekspresją tych cząsteczek. Powyższy model odpowiedzi na zarażenie zarodźcem malarii opracowano jednak na podstawie obserwacji pochodzących z terenów endemicznych, a więc dotyczących głównie dzieci, u których stwierdza się istotne różnice w obrazie ciężkiej zimnicy w porównaniu z pacjentami dorosłymi. Jak dotąd nie dokonano wyczerpującej charakterystyki

surowiczego profilu cytokinowego u chorych z importowaną zimnicą, po raz pierwszy eksponowanych na inwazję *Plasmodium* spp.

Ponadto w chorobach pasożytniczych, istotną funkcję w relacji żywiciel-drobnoustrój pełnią białka szoku termicznego (Hsp). Produkowane są one w przebiegu inwazji zarówno przez komórki ludzkie, jak i pasożyty, poddane nagłej zmianie środowiska podczas transmisji z organizmu wektora do człowieka. Znacząco wysokie poziomy przeciwciał wytworzonych w odpowiedzi na antygeny białek Hsp obserwowano u chorych z malarią. Przeciwciała te mogą wykazywać właściwości immunoprotekcyjne, jak i brać udział w procesach autoimmunologicznych, ze względu na znaczną homologię międzygatunkową. Ich rola w zimnicy nie została jak dotąd wyjaśniona.

Celem niniejszej pracy była kompleksowa ocena relacji pomiędzy surowiczymi stężeniami wybranych cytokin prozapalnych, przeciwzapalnych i immunomodulujących oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego, a ciężkością przebiegu inwazji *Plasmodium* spp. zarówno wśród pacjentów z przywleczoną malarią, jak i pochodzących z rejonów endemicznego występowania tej choroby. Praca została wykonana w Zakładzie Parazytologii Tropikalnej MIMMIT AMG, przy współpracy z Kliniką Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych MIMMIT AMG oraz Centrum Medycznym im. Św. Łukasza w Kifangondo (Centro de Saúde São Lucas, Kifangondo, Angola).

Do badań włączono 94 dorosłych z przywleczoną zimnicą hospitalizowanych w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych MIMMIT AMG w Gdyni i Klinice Chorób Odzwierzęcych i Tropikalnych Instytutu Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych AM w Warszawie oraz 59 pacjentów w wieku rozwojowym, leczonych w Ośrodku Medycznym im. Św. Łukasza w Kifangondo. Analizie poddano również odpowiednio dobrane pod względem płci i wieku grupy kontrolne, składające się z 47 dorosłych Polaków z wywiadem wykluczającym wcześniejszy pobyt w tropiku oraz 40 dzieci angolskich, z ujemnym wynikiem mikroskopowego badania krwi obwodowej w kierunku malarii w momencie wykonania oznaczeń.

W badanych grupach metodą immunoenzymatyczną oznaczono surowicze stężenia TNF, IFN γ oraz interleukin: IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18. Przy użyciu tej samej techniki wykonano także pomiar poziomów przeciwciał przeciwko ludzkim białkom Hsp60 oraz Hsp70 w surowicach pacjentów z Polski. U Angolczyków oznaczono stężenia przeciwciał przeciwko Hsp60. Uzyskane wartości porównano pomiędzy grupami chorych o łagodnym i ciężkim przebiegu malarii, wyróżnionymi na podstawie kryteriów Światowej Organizacji Zdrowia z roku 2000, a osobami zdrowymi. Ponadto u 64 spośród osób włączonych do badań oznaczenia powtórzono

w okresie rekonwalescencji po przebytej malarii. Z wykorzystaniem krzywych ROC dokonano analizy przydatności diagnostycznej wybranych parametrów w ocenie ciężkości przebiegu klinicznego zimnicy w obu badanych populacjach.

W surowicach chorych z malarią rozpoznaną zarówno w Polsce, jak i w Angoli, stwierdzono istotnie wyższe stężenia TNF, IFN γ , IL-6, IL-10, IL-18 oraz przeciwciał przeciwko Hsp60 w porównaniu do osób zdrowych. U dzieci angolskich oraz dorosłych chorych z Polski uzyskano również znaczące różnice w zakresie surowicznych stężeń IL-6, IL-10 oraz IL-18 pomiędzy chorymi spełniającymi kryteria ciężkiej malarii, a osobami z łagodnym przebiegiem inwazji. U pacjentów Polskich relacje takie obserwowano również w odniesieniu do IL-12. W badanych grupach stężenia większości z oznaczanych cytokin uległy znaczącemu obniżeniu po leczeniu przeciwzimmicznym, jednakże wciąż utrzymywały się na poziomie istotnie wyższym niż u osób zdrowych. Na podstawie analizy krzywych ROC wykazano także, iż surowicze stężenia IL-6, IL-10, IL-18, a także IL-12 u dorosłych z przywleczoną malarią, charakteryzują się istotną statystycznie zdolnością dyskryminacyjną w zakresie różnicowania przypadków malarii łagodnych i zagrożonych ciężkim przebiegiem. Dokładność diagnostyczna oznaczania poziomu IL-18 u chorych z Polski oraz IL-10 u dzieci angolskich, oceniana za pomocą powyższej metody, plasuje te parametry wśród użytecznych wskaźników laboratoryjnych w ocenie ciężkości zimnicy. Ponadto wykazano, iż w inwazji *Plasmodium* spp. dochodzi do rozwoju odpowiedzi humoralnej skierowanej przeciwko endogennym białkom Hsp60.

Całość uzyskanych wyników pozwala uznać obraz kliniczny malarii za ogólnoustrojowy wyraz odpowiedzi na zarażenie *Plasmodium* spp. o cechach niekontrolowanego zapalenia, w którym istotny udział mają poddane analizie cytokiny. Niniejsze badania potwierdzają rolę tzw. „burzy cytokinowej” w patogenezie malarii i pozwalają zaobserwować związek pomiędzy surowiczymi stężeniami wybranych interleukin, a przebiegiem choroby. Wnioski te dotyczą zarówno dorosłych z importowaną chorobą, jak i pacjentów w wieku rozwojowym pochodzących z rejonu endemicznego. Wydaje się, iż wykazana przydatność diagnostyczna oznaczania surowicznych stężeń IL-10 oraz IL-18 stanowić może punkt wyjścia do dalszego badania roli tych parametrów w postępowaniu klinicznym w malarii. Wdrożenie tego typu analiz laboratoryjnych w opiece zdrowotnej w rejonach endemicznego występowania malarii może przyczynić się do poprawy identyfikacji pacjentów z zimnicą o ciężkim przebiegu, tym bardziej, iż oznaczenia wykonano przy użyciu nieskomplikowanych technik immunoenzymatycznych. Obarczone są one jednostkowo niedużymi kosztami, co w warunkach ekonomicznych krajów rozwijających się jest niezwykle ważne. Wykorzystanie pomiarów surowicznych

stężeń cytokin w ocenie ciężkości inwazji zarodźcem u pacjentów z przywleczoną malarią wydaje się szczególnie obiecujące w przypadku braku doświadczenia w diagnostyce parazytologicznej laboratoriów w krajach wolnych od tej choroby.

2 Wstęp

2.1 Zimnica (malaria)

Współwystępowanie trzech zjawisk: oporności komarów na większość insektycydów, oporności zarodźców na większość leków oraz trudności w wyprodukowaniu szczepionki przeciwzimniczej zniweczyło nadzieję na szybką eliminację lub pełną kontrolę malarii na świecie (Myjak i wsp. 1993). Dziś zimnica stanowi jeden z najważniejszych problemów zdrowia publicznego w krajach rozwijających się i wciąż jest istotnym zagrożeniem dla podróżujących. Epidemiologię malarii obrazowo przedstawia ponura statystyka: co 30 sekund umiera z tego powodu afrykańskie dziecko, jest to również najczęstsza przyczyna zgonów z powodu importowanych chorób zakaźnych (WHO 2005). W tej niekorzystnej sytuacji wgląd w mechanizmy immunologiczne, stanowiące podstawę patogenezы zarażenia zarodźcem, może okazać się cenną pomocą zarówno w rozwoju narzędzi diagnostycznych, jak i metod terapeutycznych (Miller i wsp. 2002)

Od opisania zimnicy jako odrębnej jednostki chorobowej, wyizolowania czynnika etiologicznego oraz potwierdzenia jej ogólnoustrojowego charakteru minęło kilkadziesiąt lat, jednak patogenezа malarii w wielu aspektach wciąż pozostaje niewyjaśniona. W ostatnich latach coraz większą rolę w inwazji *Plasmodium* spp. przypisuje się odpowiedzi zapalnej i uczestniczących w niej wzajemnych oddziaływaniach pasożyta z komórkami gospodarza, w których to interakcjach istotną rolę odgrywają cytokiny (Clark i wsp. 2008). W relacji żywiciel-drobnoustrój istotną funkcję odgrywają również białka szoku termicznego (Polla 1991). Oprócz rutynowych testów laboratoryjnych, w rozpoznawaniu oraz monitorowaniu uogólnionych zakażeń i chorób inwazyjnych, zwraca się uwagę na ocenę różnorodnych wskaźników immunologicznych. Do celów diagnostycznych wykorzystuje się badanie endogennych mediatorów zapalenia, czy reaktywnych związków tlenu oraz oznaczanie stężeń cytokin w surowicy chorych (Sikora 2005).

Wykazanie przydatności diagnostycznej tego typu testów wydaje się szczególnie obiecujące w warunkach braku doświadczenia w diagnostyce parazytologicznej w wielu ośrodkach laboratoryjnych w naszym kraju, przy jednocześnie kilkakrotnie wyższej, w porównaniu do innych państw europejskich, śmiertelności z powodu malarii (Pawłowski i wsp. 2004a).

Powyższe przesłanki stały się podstawą przeprowadzania badań nad znaczeniem cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w zimnicy, u chorych pochodzących z rejonu endemicznego występowania malarii oraz pacjentów z przywleczoną do Polski inwazją. Rezultaty analizy przedstawiono w niniejszej rozprawie.

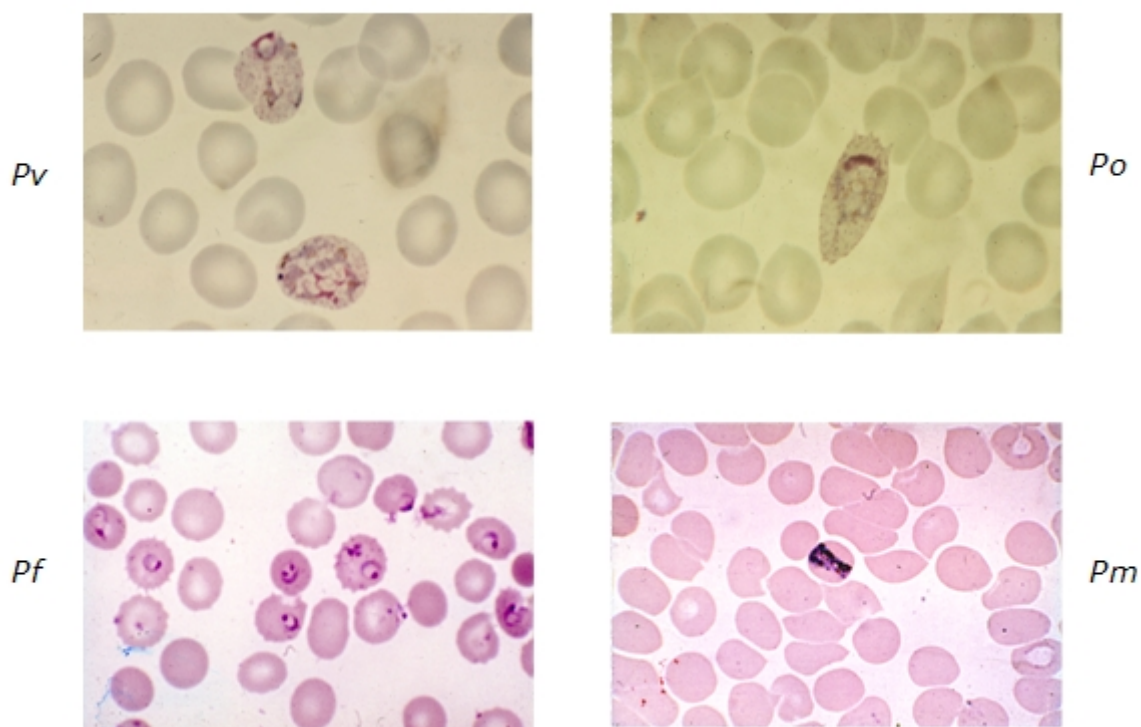
2.1.1 Etiologia zimnicy oraz drogi zarażenia

Zimnica jest chorobą pasożytniczą, wywoływaną przez zarodźce - pierwotniaki z rodzaju *Plasmodium* (*P.*). W warunkach naturalnych są one przenoszone przez samice komarów z rodzaju widliszków (*Anopheles*). Wyjątkowo możliwe jest też zarażenie zarodźcem przez przetoczenie krwi osoby chorej, ukłucie igłą oraz transplantację narządów od chorego z przewlekłą malarją. U mniej niż 5% noworodków urodzonych przez matki zarażone *Plasmodium* spp. rozwija się zimnica wrodzona (Fauci i wsp. 2000).

Istnieje kilkadziesiąt gatunków zarodźców malarii, z czego cztery uznaje się tradycyjnie za chorobotwórcze dla człowieka (Rycina 1, str. 13). Zaliczają się do nich: zarodziec sierpowaty (*Plasmodium falciparum*), zarodziec ruchliwy (*Plasmodium vivax*), zarodziec owalny (*Plasmodium ovale*) oraz zarodziec pasmowy (*Plasmodium malariae*). W ostatnich latach nieoczekiwanie okazało się, iż poważne zagrożenie dla ludzi stanowi również *Plasmodium knowlesi*, znany od kilkadziesiąt lat jako czynnik etiologiczny zimnicy u małp (Ng i wsp. 2008). Ze względu na podobieństwo morfologiczne krwinkowych stadiów rozwojowych tego gatunku do *P. malariae* i związane z tym trudności w różnicowaniu obu tych pierwotniaków w badaniu mikroskopowym, inwazje *P. knowlesi* rozpoznawane są przy pomocy metod molekularnych (Luchavez i wsp. 2008). Dzięki rozwojowi tego typu technik diagnostycznych, w ciągu ostatnich lat powiązано liczne przypadki ciężko przebiegającej zimnicy u mieszkańców Azji Południowo-Wschodniej z zarażeniem tym właśnie gatunkiem zarodźca (Cox-Singh i wsp. 2007).

W rejonach współwystępowania kilku gatunków zarodźca nierzadko dochodzi do inwazji więcej niż jednym gatunkiem pasożyta. Doniesienia na temat zarażeń

mieszanych *P. falciparum* i *P. vivax* wskazują na częstość ich występowania u od dwóch procent do aż 30% chorych z rozpoznaniem zimnicy (Mayxay i wsp. 2004).



Rycina 1. Gatunki *Plasmodium* chorobotwórcze dla człowieka (Pv – *P. vivax*, Po – *P. ovale*, Pf – *P. falciparum*, Pm – *P. malariae*, fot. prof. dr hab. n. med. P. Myjak)

Największe znaczenie kliniczne mają inwazje *P. falciparum*, których objawy przebieg określa się mianem malarii tropikalnej lub złośliwej. Gatunek ten odpowiedzialny jest za większość zgonów z powodu zimnicy. Okazjonalnie, ciężkie postaci choroby zakończone śmiertelnie mogą rozwinąć się również w przebiegu zarażeń pozostałymi gatunkami zarodźców (Beg i wsp. 2002). Dzięki postępom diagnostyki opartej na oznaczaniu sekwencji kwasów nukleinowych zarodźca, coraz częściej powikłany przebieg malarii rozpoznaje się w przypadkach wywołanych przez izolowaną inwazję *P. vivax*, którym wcześniej przypisywano etiologię mieszaną, ze współistniejącym zarażeniem *P. falciparum* (Price i wsp. 2007a). Charakterystykę parazytologiczno-kliniczną inwazji poszczególnymi gatunkami *Plasmodium* przedstawia Tabela 1 (str. 14).

2.1.2 Cykl rozwojowy zarodźca malarii

Zarodźce malarii wymagają w swoim cyklu rozwojowym dwóch żywicieli: komara widliszka i człowieka. Cykl płciowy zarodźca (sporogonia) zachodzi w ciele samicy komara, natomiast do rozrodu bezpłciowego (schizogonii) dochodzi w ciele człowieka (Rycina 2, str. 16). Żywicielem ostatecznym jest komar.

Tabela 1. Charakterystyka *Plasmodium* spp. patogennych dla ludzi (Fauci i wsp. 2000)

	Cechy różnicujące poszczególne gatunki			
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>
Okres fazy wątrobowej (dni)	5,5	8	9	15
Liczba merozoitów uwalnianych z zarażonego hepatocyta	30 000	10 000	15 000	15 000
Czas trwania cyklu krwinkowego (godz.)	48	48	50	72
Preferencja krwinki	może zarażać erythrocyty w każdym wieku	retikulocyty	retikulocyty	erythrocyty starsze
Morfologia zarodźców w badaniu mikroskopowym krwi obwodowej	zwykle tylko formy pierścieniowate, gametocyty w kształcie banana	nieregularne, duże pierścienie i trofozoity; powiększone zarażone erythrocyty, ziarnistości Schüffnera	owalne i powiększone zarażone erythrocyty, ziarnistości Schüffnera	typowe pasmowate formy trofozoitów
Zdolność do wywoływania nawrotów (obecność hipnozoitów w wątrobie)	nie	tak	tak	nie

Człowiek zaraża się poprzez ukłucie samicy komara widliszka. W trakcie pożywiania się krwią ludzką przez zarażonego uprzednio owada wraz z jego śliną do organizmu człowieka wnikają inwazyjne formy pasożyta, zwane sporozoitami. Sporozoity w ciągu kilkunastu minut przenoszone są drogą naczyń krwionośnych lub limfatycznych do wątroby. W hepatocytach zarodźce rozpoczynają bezpłciowy cykl rozwojowy, w wyniku którego z jednego sporozoitu powstają tysiące merozoitów. Proces namnażania zarodźców w komórkach wątrobowych trwa od kilku do

kilkunastu dni w zależności od gatunku *Plasmodium* (Tabela 1, str. 14). W przypadkach inwazji *P. ovale* lub *P. vivax* część sporozoitów w hepatocytach pozostaje w stanie uśpionia przez miesiące, a nawet lata. Fomy takie, nazywane hipnozoitami mogą być przyczyną późniejszych nawrotów malarii.

Po okresie schizogonii wątrobowej hepatocyty pękają, a merozoity przedostają się do krwi i tam wywołują klasyczne objawy choroby. Obecne w krwiobiegu pasożyty posiadają zdolność ruchu i aktywnie zarażają krwinki czerwone, wykorzystując swoiste receptory na powierzchni erytrocytów. Podczas schizogonii erytrocytarnej merozoity przyjmują postać trofozoitów. We wczesnych okresach rozwoju wewnątrzerytrocytarnej morfologia trofozoitów zarodźców wszystkich czterech gatunków jest podobna, następnie zaś trofozoit nabiera cech gatunkowo specyficznych. Zarodźce w późniejszej fazie rozwoju (dwa lub więcej jąder) określane są mianem schizontów. W wyniku kolejnych podziałów dochodzi do powstania od 8 do 40 merozoitów, które po pęknięciu erytrocytu uwolnione zostają do krwiobiegu. Proces rozpadu krwinek jest jednoczasowy w inwazjach *P. vivax*, *P. ovale* oraz *P. malariae*, co w konsekwencji wiąże się z cyklicznością występowania objawów klinicznych. W malarii o etiologii *P. falciparum* zjawisko to nie jest obserwowane. Uwolnione do krwi merozoity wykazują zdolność zarażania nowych krwinek czerwonych, w których powtarzają proces schizogonii.

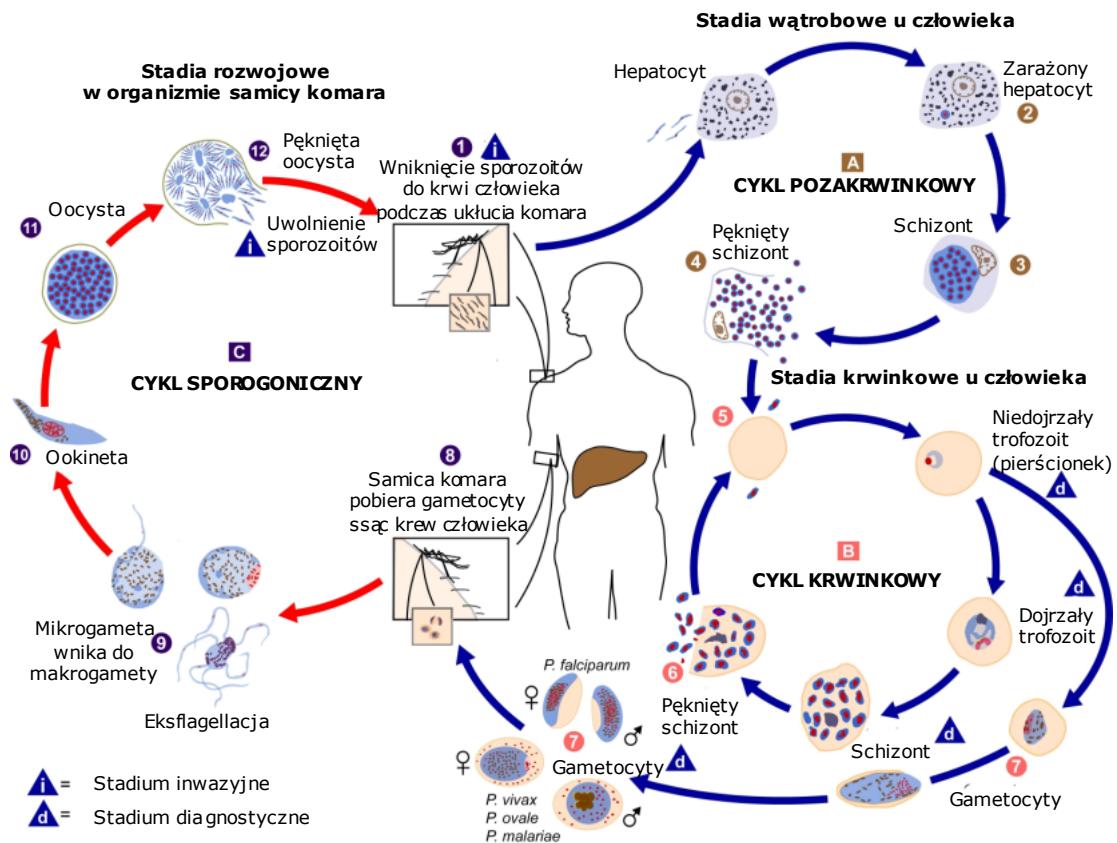
Podczas kolejnych cykli część z merozoitów przekształca się w gametocyty, czyli komórki przedpłciowe charakteryzujące się możliwością dłuższego przeżycia we krwi ludzkiej (do kilkunastu tygodni). Samica widliszka zaraża się ssąc krew człowieka zawierającą te właśnie formy rozwojowe zarodźca. Podczas ukłucia komara dostają się one do jego przewodu pokarmowego, gdzie gametocyt męski (mikrogametocyt) dzieli się tworząc ruchome mikrogamety, aktywnie poszukujące żeńskich komórek rozrodczych (makrogamet). Wytworzona w następstwie zapłodnienia zygota dojrzewając przekształca się w ookinetę, obdarzoną zdolnością penetracji ściany jelita komara i otorbiania się. Powstała w ten sposób oocysta dzieli się bezpłciowo i uwalnia dziesiątki tysięcy ruchliwych sporozoitów, które po pęknięciu oocysty migrują wraz z hemo limfą komara do jego gruczołów ślinowych i stanowią formę inwazyjną dla człowieka (Pałowski i wsp. 2004b).

Proces rozmnażania płciowego zarodźca w ciele samicy komara trwa od 7 do 35 dni i zależy m. in. od temperatury i wilgotności środowiska (Fauci i wsp. 2000).

2.1.3 Epidemiologia zimnicy na świecie

Malaria od stuleci stanowi istotne zagrożenie dla społeczeństw w krajach

tropikalnych oraz osób podróżujących. Obecnie uważa się ją z najpoważniejszą w skali globalnej chorobę pasożytniczą. Aktualnie występuje ona stale lub okresowo w ponad 100 krajach gorącej strefy klimatycznej, przy czym większość zachorowań i zgonów z jej powodu ma miejsce w Afryce, w krajach położonych na południe od Sahary. Ocenia się, iż ok. 40% światowej populacji żyje w regionach zagrożonych tym schorzeniem.



Rycina 2. Cykl rozwojowy zarodźca malarii w organizmie komara i człowieka (źródło: Centers for Diseases Control and Prevention, 2008, USA, www.cdc.gov)

Epidemiologia zimnicy jest złożona i może znacząco różnić się nawet na niewielkich obszarach geograficznych. Utrzymywanie się malarii na danym terenie wymaga występowania łącznie: rezerwuaru osób zarażonych, podatnych ludzi niezarażonych, odpowiedniego wektora oraz licznych czynników środowiskowych sprzyjających kontaktom między człowiekiem, komarem, a pierwotniakiem. Transmisja zimnicy zależy od liczby przenosieli w rejonie i ukłuć człowieka przez komara oraz długości życia wektora (Fauci i wsp. 2000).

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO – z j. ang. World Health Organisation) ocenia liczbę nowych zachorowań na 300 – 500 milionów każdego roku, z czego

umiera od jednego do trzech milionów osób rocznie (Pawłowski i wsp. 2004a). Niska wiarygodność danych epidemiologicznych zgłaszanych przez kraje rozwijające się sprawiła, że w ostatnich latach opublikowano analizy zachorowalności i umieralności z powodu zimnicy oparte m. in. na systemach informacji geograficznej, danych dotyczących gęstości zaludnienia, środowiska oraz występowania przenosicieli malarii. Wyniki tych badań sugerują, iż liczba przypadków może być nawet ponad dwa razy wyższa niż wynikająca ze statystyk narodowych (Hay i wsp. 2004). Obecnie szacuje się, iż liczba samych zachorowań na zimnicę o etiologii *P. vivax* może sięgać 390 milionów przypadków rocznie, zaś *P. falciparum* – ponad 500 milionów (Snow i wsp. 2005). Na zachorowanie, zwłaszcza o ciężkim przebiegu, najbardziej narażone są dzieci do 5 roku życia i kobiety ciężarne mieszkające w regionach endemicznych oraz osoby nieodporne, podróżujące ze strefy klimatu umiarkowanego do krajów endemicznego lub epidemicznego występowania malarii. Inwazje *P. falciparum* odpowiedzialne są za ponad 90% zgonów z powodu malarii (Pawłowski i wsp. 2004a).

Endemiczność malarii tradycyjnie definiuje się poprzez odsetek dzieci w wieku od 2 do 9 lat, u których w badaniu przedmiotowym można stwierdzić powiększoną śledzionę. Przy wartościach poniżej 10% rejon określa się jako hipoendemiczny, od 11% do 50% mówi się o rejonie mezoendemicznym, od 51% do 75% - hiperendemicznym, a powyżej 75% - holoendemicznym. W rejonach hiper- i holoendemicznych, o wysokiej i stabilnej transmisji malarii, na przebieg kliniczny choroby wpływają między innymi wykształcane z wiekiem mechanizmy odpornościowe. Tereny takie, do których należą m. in. niektóre kraje tropikalnej Afryki, w tym Angola, dotknięte są znaczną chorobowością i umieralnością dzieci z powodu zimnicy. To właśnie w tej grupie wiekowej obserwuje się tam ciężkie postaci zimnicy, podczas gdy u osób starszych często dochodzi do bezobjawowej parazytemii. Epidemiologia zarażeń *Plasmodium* w Angoli omówiona została szerzej w osobnym rozdziale niniejszej pracy (str. 45).

Regiony świata o niskim prawdopodobieństwie zarażenia zarodźcem zimnicy określane są jako tereny o niestabilnej transmisji malarii. U osób je zamieszkujących nie dochodzi do rozwoju odporności przeciwzimniczej, a jawna klinicznie inwazja *Plasmodium* spp. – podobnie jak w przypadku malarii importowanej przez mieszkańców rejonów wolnych od tej choroby - może wystąpić w każdym wieku.

W części krajów świata zimnica przebiega epidemicznie. Do takich miejsc należą m. in. niektóre regiony subkontynentu indyjskiego i południowo-wschodnia Azja. Wśród czynników sprzyjających epidemiom wymienić należy: masywne opady po okresach

suszy, pogorszenie warunków socjalnych oraz migracje ludności (Fauci i wsp. 2000).

2.1.4 Epidemiologia zimnicy przywlekanej do krajów Europy i Polski

Na kontynencie europejskim nie obserwuje się obecnie rodzimych zachorowań na zimnicę. W ostatnich latach w kilku krajach Europy (m. in. Hiszpania, Francja, Niemcy) zarejestrowano krótkotrwałą i szybko wygasłą transmisję pochodzącą od przypadków importowanych (Armengaud i wsp. 2007). Malaria jest natomiast jednym z najgroźniejszych schorzeń, które dotyczą osób udających się do tropiku i stanowi główną przyczynę zgonów z powodu chorób zakaźnych wśród podróżujących (Steffen i wsp. 2003). Liczbę przypadków malarii przywlekanych do Europy ocenia się na około 10 000 rocznie, a średnio u 5% spośród zarażonych pacjentów dochodzi do rozwoju ciężkich postaci klinicznych zimnicy (Trampuz i wsp. 2003).

W Polsce transmisji rodzimej malarii, wywołanej przez *P. vivax*, nie obserwuje się od 1963 roku. Istnieją jednak warunki niezbędne do jej powrotu (Kubica-Biernat 1999). W naszym kraju występuje bowiem 5 gatunków komarów widliszków, a chory z przywleczoną malarią w okresie parazytemii może stać się źródłem zarażenia owada. Importowana zimnica jest w Polsce rzadkim, ale istotnym problemem klinicznym. Rocznie rejestruje się kilkadziesiąt przypadków malarii zawleczonej do naszego kraju, a ponadto w ciągu roku odnotowuje się ok. 120-150 zachorowań u obywateli polskich podczas pobytu poza granicami kraju (Kotłowski 2007). Wśród przypadków zimnicy przywlekanej do Polski dominują zarażenia *P. falciparum* importowane z Afryki, które często charakteryzują się rozwojem ciężkich postaci klinicznych (Goljan i wsp. 2006).

Należy podkreślić, iż w ostatniej dekadzie w kraju rozwinęła się wysoce niekorzystna sytuacja w zakresie zapadalności i śmiertelności z powodu zimnicy zawlekanej z terenów endemicznych. Szczególnie niepokojącym zjawiskiem jest obserwowana kilkakrotnie wyższa niż przeciętna w krajach europejskich śmiertelność z powodu inwazji *P. falciparum* o ciężkim przebiegu (Pawłowski i wsp. 2004a).

Zgony w przebiegu zimnicy w Polsce dotyczą wprawdzie nie więcej niż kilku przypadków rocznie, jednak notowana śmiertelność jest od 7 do 16 razy wyższa niż w pozostałych państwach naszego kontynentu (Tabela 2, str. 19). Dla porównania, według danych TropNetEurop, śmiertelność z powodu przypadków malarii o etiologii *P. falciparum* wynosi w Europie jedynie 1,4% (Muhlberger i wsp. 2003).

Tabela 2. Zachorowalność, umieralność i śmiertelność z powodu malarii przywleczonej do Polski w latach 1992-2003 (źródło: Pawłowski i wsp. 2004a)

Rok	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
Zachorowania	17	27	18	21	31	37	38	3	24	27	22	17
Zgony	1	0	0	1	2	3	0	1	1	0	2	1
Śmiertelność	5,9%	0	0	4,8%	6,5%	8,1%	0	3%	4,2%	0	9,1%	6,3%
	7 *			8 *	12 *	16 *			10*		16*	

* Śmiertelność w Polsce jako wielokrotność średniej śmiertelności w Europie

2.1.5 Patogeneza malarii

Różnorodność mechanizmów biorących udział w inwazji *Plasmodium* spp. sprawia, iż zimnica nie może być uznana za jednolitą w swoim obrazie jednostkę chorobową, ale stanowi odzwierciedlenie szeregu procesów patologicznych. Złożoność ta wynika m. in. z ekspozycji na zarażanie pacjentów niejednorodnych genetycznie i immunologicznie, jak również z różnicy wirulencji poszczególnych gatunków i szczepów zarodźca. Istotną rolę w patogenezie malarii odgrywa wiek i wrażliwość osobnicza żywiciela, jego własna odpowiedź odpornościowa, współistniejące schorzenia, a w szczególności obecność hemoglobinopatii oraz innych infekcji i inwazji pasożytniczych, powszechnie występujących w rejonach tropikalnych o niskim poziomie higieny. W krajach rozwijających się, nie bez znaczenia dla obrazu choroby pozostaje utrudniony dostęp do opieki zdrowotnej (Miller i wsp. 2002). Kompleksowość aspektów patogenetycznych zimnicy, zależnych zarówno od organizmu pasożyta, jak i człowieka, a także czynników geograficzno-środowiskowych przedstawia Rydina 3 (str. 21).

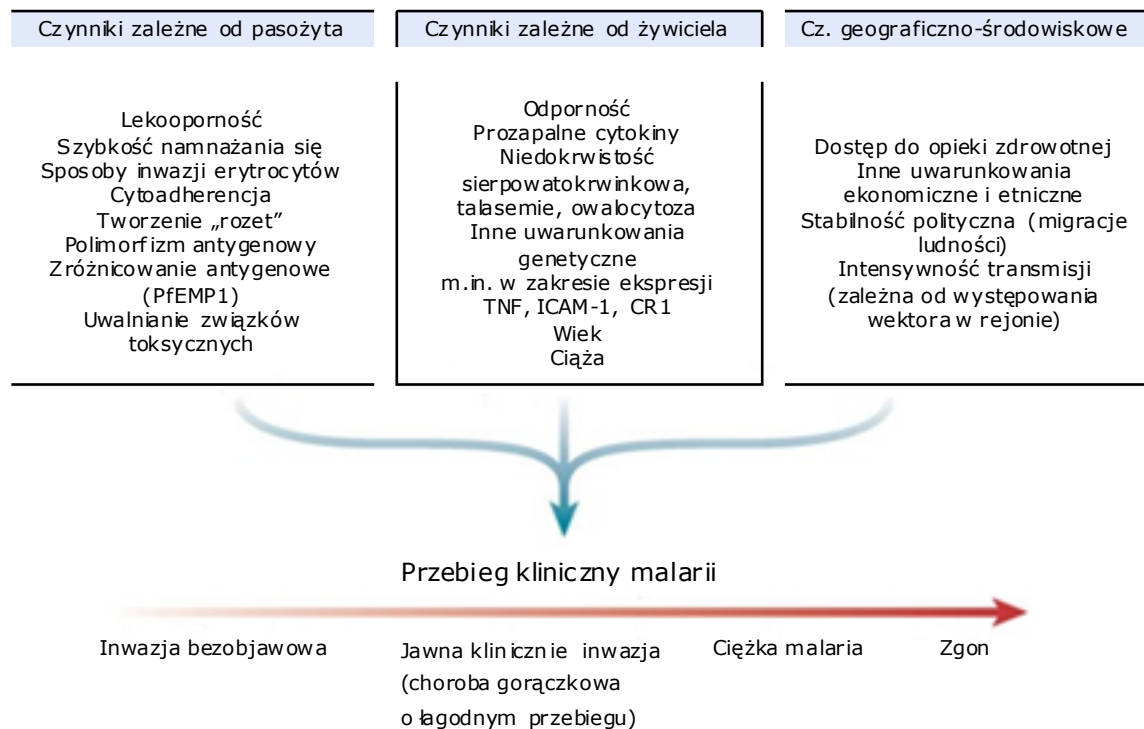
Powyższe zagadnienia nie zostały jak dotąd dokładnie zbadane. Wiadomo jednak, że do najważniejszych elementów patogenezy malarii zaliczyć można: postępującą inwazję pasożytniczą wyrażającą się w narastającej liczbie zarażonych erytrocytów, destrukcję krwinek czerwonych, zarówno zarażonych jak i wolnych od *Plasmodium* oraz oddziaływanie uwalnianych przez zarodźcę toksyn. Ciężkie postaci malarii o etiologii *P. falciparum* wiązane są z zaburzeniami w mikrokrażeniu zaatakowanych narządów, których rozwój uwarunkowany może być niekontrolowaną reakcją zapalną, stanowiącą konsekwencję odpowiedzi układu immunologicznego żywiciela (Atarvanis-Tsakonas i wsp. 2003). Sugeruje się istnienie podobnych mechanizmów regulujących przebieg zimnicy oraz posocznicy bakteryjnej, a w obu tych schorzeniach obserwuje się nagłe uwolnienie licznych mediatorów zapalnych,

między innymi prozapalnych cytokin, tlenku azotu i reaktywnych związków tlenowych. Ten aspekt patogenezы zimnicy postulowany jest również w odniesieniu do zarażeń pozostałymi gatunkami *Plasmodium* (Clark i wsp. 2007). Pogląd taki nie podważa jednak stwierdzanego od dawna znaczenia zjawisk sekwestracji, cytoadherencji oraz agregacji czerwonych krwinek w inwazji zarodźcem sierpowatym (Patel i wsp. 2003).

W zimnicy tropikalnej powyższe procesy mogą przebiegać na poziomie ogólnoustrojowym i oddziaływać na liczne tkanki oraz narządy, jak również ograniczać się do poszczególnych lokalizacji w organizmie np. ośrodkowego układu nerwowego w malarii mózgowej lub łożyska w zimnicy kobiet ciężarnych. Wydaje się, że związane jest to zarówno z czynnikami zależnymi od gospodarza, w tym ekspresji opisanych niżej białek receptorowych przez określone komórki, jak i aspektów związanych z zarodźcem, a zwłaszcza jego wpływem na zarażoną krwinkę czerwoną (Miller i wsp. 2002). W obrębie erytrocytów, które uległy inwazji, dochodzi bowiem do konsumpcji i degradacji białek śródkomórkowych przez merozoity *P. falciparum*, jak również ekspresji antygenów pasożyta na powierzchni błon komórkowych tych krwinek, co w szczególności dotyczy białka PfEMP-1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1). Warto zauważyć, że coraz więcej danych wskazuje na zaangażowanie systemu białek szoku termicznego zarodźca w transport peptydów produkowanych przez pasożyta na powierzchnię erytrocytu.

Proces sekwestracji dotyczy zarażonych krwinek czerwonych zawierających dojrzałe formy rozwojowe pierwotniaka, które ulegają adherencji do komórek śródbłonka drobnych naczyń żylnych i kapilar ważnych życiowo organów, co prowadzi tym samym do zaburzeń krążenia w ich obrębie (Fauci i wsp. 2000). W konsekwencji zjawiska te przyczyniają się do rozwoju dysfunkcji narządowych, anaerobowej glikolizy oraz kwasicy metabolicznej, stanowiących kliniczne wykładniki ciężkiej malarii tropikalnej, opisane szerzej w osobnym rozdziale niniejszej rozprawy (str. 29).

Cytoadherencja możliwa jest dzięki wspomnianym powyżej ligandom błonowym zarażonych erytrocytów (PfEMP-1) oraz białkom receptorowym komórek gospodarza, do których należą m. in. cząsteczki adhezyjne, takie jak: cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 (ICAM-1, z j. ang. intercellular adhesion molecule 1), cząsteczka adhezji śródbłonka naczyniowego 1 (VCAM-1, z j. ang. vascular cell adhesion molecule 1), selektyna E oraz siarczan chondroityny i receptor CD36 (Kirchgatter i wsp. 2005).



Rycina 3. Czynniki biorące udział w patogenezie malarii - zależne od organizmu żywiciela, pasożyta oraz geograficzno-środowiskowe (źródło: Miller i wsp. 2002)

Obecnie niektórzy badacze wiążą zjawisko ekspresji molekuł adhezyjnych przez śródbłonek poszczególnych narządów z oddziaływaniem prozapalnych cytokin, w szczególności czynnika martwicy nowotworów (TNF - z j. ang. tumor necrosis factor), uwalnianych przez komórki układu immunologicznego żywiciela w odpowiedzi na inwazję *Plasmodium* (Clark i wsp. 2007). Należy jednak podkreślić, iż regulacja opisywanych procesów nie została jak dotąd w pełni poznana. Między innymi wciąż niewyjaśniony pozostaje względnie łagodny przebieg inwazji *P. falciparum* u większości osób z zimnicą o tej etiologii, pomimo obecnych u nich zjawisk cytoadherencji i sekwestracji zarażonych krwinek. Dotychczas nie wykryto również czynników patogenetycznych odpowiedzialnych za progresję malarii od jej łagodnych do ciężkich postaci, choć wśród nich wymienia się właśnie nadmierną produkcję i uwalnianie cytokin przez komórki żywiciela (Miller i wsp. 2002).

Niezależnie od powyższych procesów, zarażone czerwone krwinki wykazują zdolność tworzenia tzw. „rozet” z erytrocytami zdrowymi, co w konsekwencji pogłębia zaburzenia mikrokrążenia i metabolizmu w zajętych organach wewnętrznych.

W efekcie wszystkich opisanych powyżej zjawisk, sekwestrowane zarodźce przechodzą kolejne fazy rozwojowe unikając eliminacji erytrocytów w śledzionie. Dlatego też, w zimnicy wywołanej przez *P. falciparum*, we krwi obwodowej rozpoznaje się zwykle jedynie młode, „pierścieniowate” formy bezpłciowego cyklu rozwojowego pasożyta, podczas gdy stwierdzany odsetek zarażonych krwinek nie musi odpowiadać rzeczywistej intensywności inwazji (Fauci i wsp. 2000). Zdarza się jednak, iż inwazjom tym gatunkiem *Plasmodium* towarzyszy bardzo wysoka parazytemia, do czego przyczynia się m. in. fakt zarażania przez *P. falciparum* krwinek w każdym wieku. Pozostałe gatunki zarodźca wykazują powinowactwo wyłącznie do retikulocytów albo erytrocytów starszych, stąd obserwowany poziom parazytemii rzadko przekracza dwa procent.

2.1.6 Immunologia malarii

Odpowiedź odpornościowa żywiciela na zarażenie zarodźcem malarii charakteryzuje się różnorodnością mechanizmów w nią zaangażowanych, co po części wynika ze złożoności cyklu rozwojowego *Plasmodium* spp. W cyklu erytrocytarnym, przyłączenie merozoita do powierzchni krwinki możliwe jest dzięki specyficznym receptorom na powierzchni erytrocytów. W przypadku *P. vivax* receptorami takimi są antygeny grupowe krwi Duffy Fy^a i Fy^b . Większość populacji krajów Afryki Zachodniej cechuje ujemny fenotyp Duffy $Fy^a Fy^b$ i w związku z tym pozostaje ona odporna na inwazję tym gatunkiem pierwotniaka (Fauci i wsp. 2000). Ponadto, uwarunkowane genetycznie zaburzenia strukturalne i funkcjonalne hemoglobiny oraz niedobór dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej przyczyniają się do łagodniejszego, często bezobjawowego przebiegu malarii. Najczęstsze hemoglobinopatie, czyli niedokrwistość sierpowatokrwinkowa i talasemia występują w wielu rejonach Afryki tropikalnej oraz innych częściach świata położonych w gorącej strefie klimatycznej i stanowią prawdopodobnie odpowiedź ewolucyjną wobec zimnicy (Cianciara i Juszczyk 2007).

Podstawowym elementem wczesnej odpowiedzi gospodarza na inwazję *Plasmodium* jest uruchomienie nieswoistych mechanizmów obronnych. Zarażone i rozpadłe krwinki czerwone niszczone są przez komórki zeme. W szczególności obserwuje się pobudzenie układu immunologicznego w śledzionie, dlatego też narząd ten w przebiegu malarii ulega powiększeniu. W przypadku *P. falciparum* śledzionowy wychwyt zarażonych erytrocytów ograniczony jest jednak przez zjawisko ich sekwestracji w drobnych naczyniach innych organów wewnętrznych (Miller i wsp. 2002).

Uwalniany w trakcie pęknięcia erytrocytów materiał pochodzenia pasożytniczego, przede wszystkim glikofosfatydyloinozytol (GPI – z j. ang. glycosylphosphatidylinositol), prowadzi do aktywacji makrofagów oraz produkcji tlenu azotu i reaktywnych związków tlenowych posiadających właściwości pierwotniakobójcze (Wandurska-Nowak 2004). Ten sam mechanizm indukuje również produkcję prozapalnych cytokin i ich uwalnianie przez komórki układu odpornościowego m. in. monocyty, makrofagi oraz komórki NK. Zjawiska te wydają się niezbędnym elementem odpowiedzi immunologicznej na inwazję, jednak w pewnych sytuacjach mogą prowadzić do rozwoju reakcji zapalnej o niekontrolowanym charakterze i niekorzystnych dla organizmu żywiciela konsekwencjach klinicznych. Udział cytokin zapalnych w odporności przeciwwimniczej oraz patogenezie ciężkich postaci klinicznych malarii został szerzej opisany w osobnym rozdziale niniejszej pracy (str. 33).

Odporność swoista w zimnicy odnosi się do poszczególnych gatunków i szczepów zarodźca. Jej mechanizmy nie zostały dotychczas dokładnie poznane, choć wiadomo, iż uczestniczy w niej zarówno odpowiedź typu komórkowego, jak i humoralnego. Rozwój odporności komórkowej opóźniają liczne czynniki, do których należy zaliczyć nieobecność antygenów zgodności tkankowej na powierzchni zarażonych erytrocytów oraz zmienność antygenową poszczególnych szczepów *Plasmodium*, a także zdolność zarodźca do indukowania zmian w zakresie ekspresji białek na powierzchni erytrocytów w trakcie inwazji (Fauci i wsp. 2000).

U osób wielokrotnie ekspozowanych na zarażenie zarodźcem malarii obserwuje się wzrost stężenia przeciwciał w klasach IgM, IgG i IgA w surowicy, choć nie wiąże się to bezpośrednio z odpornością na zarażenie. Przypuszczalnie przeciwciała skierowane przeciwko różnym antygenom pasożyta mogą jednak ograniczać *in vivo* namnażanie zarodźców. W rejonach endemicznego występowania malarii przeciwciała pochodzące od matki przyczyniają się do względnie łagodnego przebiegu zimnicy w pierwszych trzech miesiącach życia noworodka. Po kilkumiesięcznym okresie częściowej odporności dzieci stają się szczególnie wrażliwe na pełnoobjawowy, ciężki przebieg malarii o etiologii *P. falciparum*. Zgony w przebiegu malarii w rejonach o wysokiej transmisji tej choroby u dzieci powyżej 5 roku życia spotyka się rzadko, natomiast u osób dorosłych często dochodzi do bezobjawowej parazytemii i nawracających, samoograniczających się stanów gorączkowych. Odporność u takich osób może zaniknąć w przypadku przebywania wiele miesięcy poza rejonem endemii malarii i związanym z tym brakiem kolejnych zarażeń zarodźcem. Jak dotąd, nie wykryto wiarygodnego wykładnika laboratoryjnego opisanej powyżej częściowej odporności przeciwwimniczej u osób

zamieszkujących rejonów endemicznych (Schofield i wsp. 2005).

W tym miejscu należy również wspomnieć o doniesieniach sugerujących, iż zarażenie *Plasmodium* spp. może prowadzić do immunosupresji w organizmie żywiciela, wyrażającej się zaburzeniami chemotaksji monocytów, osłabieniem funkcji fagocytarnych komórek ziarnych, zahamowaniem dojrzewania komórek dendrytycznych i ich zdolności do stymulacji limfocytów T. Dlatego też, u chorych z ostrym epizodem malarii obserwuje się nierzadko współistniejące infekcje np. dur brzuszny lub bakteryjne zapalenie płuc (Schofield i wsp. 2005).

2.1.7 Diagnostyka laboratoryjna zimnicy

Badanie kliniczne jest nieodzownym elementem postępowania z chorym podejrzanym o zimnicę, jednak rozpoznanie choroby powinno opierać się wyłącznie na stwierdzeniu obecności form rozwojowych zarodźca malarii w rozmazach krwi lub wykazaniu sekwencji jego kwasów nukleinowych w krwi lub tkankach chorego techniką polimerazowej reakcji łańcuchowej (Pawłowski i wsp. 2004). Ponadto, w laboratoryjnej diagnostyce malarii wykorzystywane są badania wykrywające antygen *Plasmodium* spp. oraz swoiste przeciwciała przeciwwimnicze we krwi.

2.1.7.1 Badanie krwi metodą grubej kropli i cienkiego rozmazu

Najczęstszym, a zarazem podstawowym badaniem wykorzystywanym w rozpoznawaniu malarii, jest mikroskopowe badanie grubej kropli i cienkiego rozmazu krwi włośniczkowej, barwionych metodą Giemsy. Polega ono na ocenie obecności form rozwojowych *Plasmodium* spp. na podstawie obserwacji materiału pobranego od chorego podejrzanego o zimnicę z użyciem mikroskopu z obiektywem immersyjnym. Pod dużym powiększeniem zwraca się uwagę na właściwe zabarwienie rozmazu krwi, wielkość i kształt erytrocytów, obecność ziaren pigmentu w krwinkach oraz kształt stwierdzanych pasożytów wewnątrzkrwinkowych, jak również ich wielkość w porównaniu do krwinki, liczbę i ułożenie w erytrocytach. Określenie intensywności inwazji (parazytemii) w grubej kropli opiera się na obliczeniu liczby zarodźców w polach widzenia na 200 zabarwionych krwinek białych, natomiast dla cienkiego rozmazu krwi podaje się odsetek krwinek zarażonych w stosunku do ∞ najmniej 500 liczonych erytrocytów. Hiperparazytemia jest jednym z kryteriów laboratoryjnych rozpoznania zimnicy o ciężkim przebiegu (Tabela 7, str. 14).

Badanie mikroskopowe rozmazów krwi jest badaniem niezwykle cennym dla

lekarza podejmującego decyzje terapeutyczne w malarii. Pozwala ono nie tylko na postawienie rozpoznania, ale również określa gatunek pasożyta wywołującego schorzenie, rodzaj zaobserwowanych form rozwojowych (wczesny lub późny trofozoit, schizont niedojrzały, schizont dojrzały, gametocyty) oraz parazytemię. Wszystkie te aspekty mogą mieć znaczenie rokownicze dla chorego oraz wpływać na wybór postępowania leczniczego. Ponadto badania parazytologiczne krwi powtarzane podczas leczenia umożliwiają monitorowanie procesu terapii i pozwalają na stwierdzenie ewentualnej lekooporności zarodźca. Czułość badania mikroskopowego w kierunku malarii zależy jednak m. in. od jakości wykonania preparatu oraz doświadczenia w jego ocenianiu przez personel laboratoryjny. Osoby z dużym doświadczeniem potrafią wykryć 10-20 zarodźców w 1 μ l grubej kropli krwi, natomiast wykonujący badania poza rejonem endemicznego występowania malarii zazwyczaj są w stanie rozpoznać zimnicę przy parazytemii wynosząca co najmniej 100 lub więcej zarażonych erytrocytów na 1 μ l krwi (Myjak i wsp. 2004). Zależność pomiędzy umiejętnościami oceniającego, a wiarygodnością wyniku badania ma szczególne znaczenie w krajach wolnych od zimnicy, w tym i w Polsce, w których liczba przypadków przywleczonej malarii nie jest duża, a doświadczenie wielu laboratoriów szpitalnych w zakresie badań parazytologicznych – niewystarczające (Chiwakata i wsp. 2001). Dodatkowo, w przypadkach inwazji mieszanej oraz po uprzednim zastosowaniu nieskutecznej dawki leku przeciwozimniczego, określenie gatunku zarodźca może utrudniać niska parazytemia (Myjak i wsp. 2004). Należy również pamiętać, iż ujemny wynik jednorazowego badania mikroskopowego rozmazów krwi nie wyklucza zimnicy i wymaga kilkakrotnego powtórzenia, w tym przy użyciu materiału pobranego od chorego na szczycie gorączki (Pawłowski i wsp. 2004).

2.1.7.2 Oznaczanie sekwencji kwasów nukleinowych zarodźca techniką polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR)

Drugim badaniem umożliwiającym postawienie rozpoznania zimnicy, jest wykazanie swoistych sekwencji nukleotydów kwasów nukleinowych charakterystycznych dla określonego gatunku zarodźca techniką polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR – z j. ang. Polymerase Chain Reaction). Jest to test czasochłonny i kosztowny, pozwala jednak na stwierdzenie obecności pasożytów we krwi przy niskiej parazytemii, różnicowanie gatunku zarodźca oraz wykrywanie mutacji genowych związanych z lekoopornością *P. falciparum* (Myjak i wsp. 2002).

Czułość i specyficzność badania techniką PCR jest bardzo wysoka. Pozwala ono wykryć *Plasmodium* spp. w liczbie poniżej 1 pasożyta w 1 µl krwi. Do elementów ograniczających wykorzystanie tej metody, zwłaszcza w krajach rozwijających się, należą wysokie koszty aparatury i odczynników (Jason i wsp. 2001). Jej zastosowanie wiąże się również z koniecznością przeszkolenia personelu laboratoryjnego oraz względnie długim, w porównaniu do badania mikroskopowego, czasem oczekiwania na wynik. W badaniu techniką PCR nie jest możliwe różnicowanie obecnych we krwi form rozwojowych zarodźców.

Badania przy użyciu tej metody wykonywane są w Polsce jedynie w Międzywydziałowym Instytucie Medycyny Morskiej i Tropikalnej AMG w Gdyni. Wykorzystuje się je głównie w celu wykrycia inwazji o niewielkiej intensywności, w przypadkach trudnych diagnostycznie przy podejrzeniu inwazji mieszanej oraz w badaniach naukowych, zwłaszcza dotyczących identyfikacji szczepów *P. falciparum* opornych na wybrane leki przeciwwimnicze (Myjak i wsp. 2002).

2.1.7.3 Immunochromatograficzne wykrywanie obecności antygeny zarodźca malarii

Wprowadzone w ostatnich latach szybkie testy immunochromatograficzne (paskowe) opierają się na wykazaniu obecności swoistej dla *Plasmodium* dehydrogenazy mleczanowej, antygeny HRP-2 (HRP-2 - z j. ang. histidine-rich protein-2) lub pasożytniczej aldolazy (Marx i wsp. 2005). Tego typu testy umożliwiają wykonanie badania w kierunku malarii bez użycia dodatkowych urządzeń czy odczynników przez personel medyczny pierwszego kontaktu lub inne osoby po krótkim przeszkoleniu. Procedura badania nie jest czasochłonna, a jego wynik można odczytać w ciągu kilkunastu minut. Dlatego też szybkie testy oparte na tej metodzie mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce malarii w ośrodkach podstawowej opieki zdrowotnej w krajach rozwijających się w przypadku braku możliwości wykonania badania mikroskopowego (Rehliś i wsp. 2004). Testy immunochromatograficzne nie pozwalają jednak na ocenę intensywności inwazji, mogą dawać wyniki fałszywie ujemne przy niskiej parazytemii bądź fałszywie dodatnie np. przy jednoczesnym występowaniu we krwi czynnika reumatoidalnego.

Celem rozpoznania bądź wykluczenia zimnicy, zarówno dodatni, jak i ujemny wynik badania metodą immunochromatograficzną, wymaga więc potwierdzenia przy pomocy oceny mikroskopowej rozmazu krwi (Pałowski i wsp. 2004).

2.1.7.4 Wykrywanie swoistych przeciwciał przeciwwzimmicznych

Badania serologiczne przydatne w diagnostyce zimnicy bazują na technice immunofluorescencji pośredniej (IFA – z j. ang. Indirect Fluorescent Antibody) bądź metodzie immunoenzymatycznej (ELISA- z j. ang. Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Zastosowanie tych badań pozwala na wykazanie obecności swoistych przeciwciał przeciwwzimmicznych w surowicy chorego lub osoby po przebytej malarii. W przypadku techniki IFA najsilniejszą reakcję obserwuje się z przeciwciałami przeciwko *P. falciparum* (reakcja homologiczna) (Myjak i wsp. 1993). Natomiast dostępne obecnie testy ELISA opierają się na białkach zarodźca sierpowatego, pochodzącego z hodowli *in vitro*, jak również rekombinowanych antygenach *P. vivax* (Doderer i wsp. 2007).

Ograniczenia tego typu badań związane są z faktem, iż wykrywają one przeciwciała, a nie antygeny pasożyta. We wczesnym etapie zimnicy, u osoby chorującej po raz pierwszy, przeciwciała mogą jeszcze nie być obecne w surowicy. Z kolei w rejonie o wysokiej transmisji malarii, ze względu na częste epizody choroby dodatni wynik badania serologicznego nie jest jednoznaczny z aktywną inwazją *Plasmodium* spp. Przeciwciała te utrzymują się bowiem we krwi przez wiele miesięcy po przebyciu zimnicy (Myjak i wsp. 1993). Badanie serologiczne są jednak niezwykle cenne w retrospektywnym potwierdzaniu zimnicy przebytej poza granicami kraju, zwłaszcza w sytuacji braku dokumentacji lekarskiej lub laboratoryjnej oraz w celach orzecznich (Jaremin i wsp. 1993/1994).

2.1.7.5 Inne badania laboratoryjne w zimnicy

Przedstawione powyżej badania mają niebagatelne znaczenie dla podjęcia odpowiednich decyzji terapeutycznych. Istotne jest rozpoznanie zarówno gatunku zarodźca, zwłaszcza identyfikacja najgroźniejszego z nich (*P. falciparum*), jak i ocena intensywności zarażenia (parazytemii). Poza diagnostyką parazytologiczną, ustalenie stopnia ciężkości przebiegu inwazji u chorego opiera się na wyniku badania podmiotowego i przedmiotowego oraz licznych parametrach hematologicznych i biochemicznych. Najczęściej w praktyce klinicznej oraz w badaniach naukowych stosuje się w tym celu kryteria ciężkiej malarii opublikowane przez WHO (Tabela 7, str. 59). Kryteria te dotyczą zasadniczo malarii tropikalnej wywołanej przez *P. falciparum*, jako jednostki związanej z największym ryzykiem powikłań i zgonu u chorych. W niniejszej rozprawie posłużono się nimi także w analizie przebiegu

zimnicy w inwazjach pozostałymi gatunkami zarodźców, wśród których również spotyka się ciężkie postaci malarii opisane przez WHO (Beg i wsp. 2002).

Obliczenie parazytemii na podstawie preparatu cienkiego rozmazu lub grubej kropli krwi obwodowej osoby zarażonej jest ważnym elementem oceny ryzyka malarii dla zdrowia i życia pacjenta. Jak już wspomniano, ograniczeniem tego badania u chorych z importowaną inwazją *Plasmodium* spp. w krajach wolnych od tego schorzenia, jest często niewystarczające doświadczenie personelu laboratoryjnego (Myjak i wsp. 2004). Dlatego poszukuje się innych wskaźników o znaczeniu prognostycznym w zimnicy. Dotychczas wykazano związek rokowania w zimnicy m. in. z obecnością schizontów we krwi obwodowej, obniżonym stężeniem antytrombiny III, a także wysokim stężeniem TNF w surowicy krwi u chorych z inwazją *P. falciparum*. Trzeba jednak zauważyć, iż obserwacje te poczyniono na materiale ograniczonym do wybranych grup wiekowych oraz etnicznych i jak dotąd nie wykorzystuje się ich wyników w praktyce lekarskiej (Goljan i wsp. 2006). Różnorodność postaci ciężkiej zimnicy oraz skomplikowane relacje pomiędzy charakterystyką jej przebiegu, a wiekiem, pochodzeniem oraz stopniem transmisji malarii w danym rejonie i innymi czynnikami, znacznie utrudniają znalezienie wskaźnika laboratoryjnego o wartości rokowniczej mogącego znaleźć zastosowanie w postępowaniu diagnostyczno-terapeutycznym (Chiwakata i wsp. 2001).

2.1.8 Objawy i przebieg kliniczny zimnicy

Przebieg zimnicy, jej objawy, rokowanie oraz następstwa choroby są wypadkową szeregu aspektów zależnych od organizmu pasożyta, żywiciela i wpływów środowiskowych. Różnorodność czynników wpływających obraz kliniczny tego schorzenia sprawia, że inwazja *Plasmodium* spp. może mieć postać łagodnego, niemal bezobjawowego zarażenia, poprzez ostry, samoograniczający się kilkudniowy incydent gorączkowy, aż po ciężką ogólnoustrojową chorobę z zagrażającymi życiu powikłaniami, przypominającymi w przebiegu posocznicę bakteryjną (Miller i wsp. 2002).

U osób dorosłych objawy zimnicy pojawiają się najwcześniej po 7 dniach od ukłucia przez komara zarażonego zarodźcem malarii. Okres wylegania choroby w przypadku zarażenia inną drogą, np. po przetoczeniu krwi jest krótszy, gdyż nie obejmuje on wątrobowego etapu cyklu rozwojowego pasożyta (Fauci i wsp. 2000). Pierwsze objawy malarii, takie jak: złe samopoczucie, bóle głowy, bóle mięśni, nudności oraz wymioty z następowym wzrostem temperatury ciała, są niecharakterystyczne i typowe dla licznych infekcji o etiologii wirusowej. Klasyczna

triada objawów, czyli występujące kolejno po sobie dreszcze, kilkugodzinna wysoka gorączka oraz zlewne poty towarzyszące obniżaniu się temperatury ciała, spotykana jest coraz rzadziej, zwłaszcza we wczesnej fazie choroby. Zazwyczaj początkowo gorączka jest nieregularna, a w przypadku inwazji *P. falciparum* można w ogóle nie zaobserwować cykliczności występowania objawów malarii. Najczęściej zarażenie *P. vivax* i *P. ovale* w ciągu około tygodnia przechodzi w tzw. „trzeciaczkę” z napadami gorączki co 48 godzin, natomiast inwazja *P. malariae* – w „czwartaczkę” z objawami pojawiającymi się cyklicznie co 72 godziny (Pawłowski i wsp. 2004a).

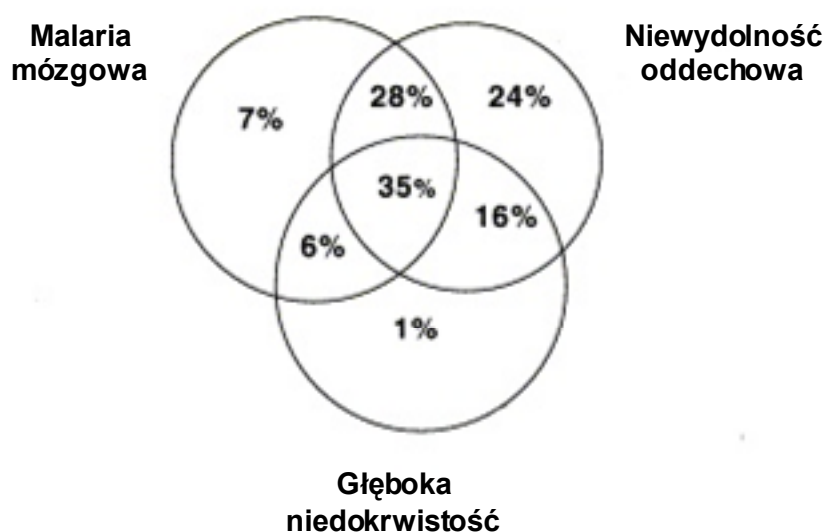
Opisano liczne i różnorodne postaci kliniczne ostrej fazy zimnicy, jednak w niepowikłanych przypadkach do najczęściej spotykanych objawów należą: gorączka, złe samopoczucie, objawy niewielkiego stopnia niedokrwistości oraz splenomegalia. Częste, zwłaszcza w młodszym wieku, jest też niewielkie powiększenie wątroby. U dzieci, przy zarażeniu każdym z gatunków *Plasmodium* spp., mogą pojawić się drgawki (Fauci i wsp. 2000). Szczególne znaczenie kliniczne mają inwazje *P. falciparum*, które nierzadko wywołują ciężką, ogólnoustrojową chorobę z niewydolnością wielonarządową i zagrażającymi życiu zaburzeniami metabolicznymi. Malaria tropikalna u osób nieodpornych w przebiegu zarażenia tym gatunkiem zarodźca może w ciągu kilku dni doprowadzić do zgonu (WHO 2000).

2.1.8.1 Obraz kliniczny zimnicy o ciężkim przebiegu

Większość przypadków ciężkich postaci zimnicy wywoływana jest przez *P. falciparum*. W malarii o tej etiologii dochodzi bowiem do cytoadherencji zarażonych erytrocytów, ich sekwestracji w obrębie drobnych naczyń oraz narządowych i metabolicznych konsekwencji tych zjawisk, które od wielu lat uważa się za podstawę patogenezy inwazji zarodźca sierpowatego (Pawłowski i wsp. 2004a). Sporaadycznie zdarzają się także zagrażające życiu powikłania lub zgon w przebiegu inwazji innymi gatunkami *Plasmodium* (Mendis i wsp. 2001). Do takich powikłań należą m. in. opisywane w literaturze przypadki pęknięcia powiększonej śledziony oraz znacznego stopnia niedokrwistość (Price i wsp. 2007). W ciągu ostatnich lat obserwowano również epizody niekardiogenego obrzęku płuc w przebiegu zarażenia *P. vivax* związanego z sekwestracją zarażonych erytrocytów w płucach, co może podawać w wątpliwość powszechnie uznawaną tezę o występowaniu tej patologii jedynie w inwazjach *P. falciparum* (Anstey i wsp. 2007). Podobne doniesienia kliniczne dotyczą również mózgowej postaci inwazji *P. vivax* (Beg i wsp. 2002).

W 1990 roku Światowa Organizacja Zdrowia opublikowała listę kryteriów zimnicy o ciężkim przebiegu, w celu ujednoczenia nomenklatury wykorzystywanej w

badaniach naukowych i epidemiologicznych (WHO, 1990). Należą do nich następujące odchylenia w badaniu klinicznym lub badaniach laboratoryjnych, obserwowane u chorego z parazytemią potwierdzoną badaniem mikroskopowym: śpiączka w przebiegu malarii mózgowej, drgawki, znacznego stopnia niedokrwistość, ostra niewydolność nerek, obrzęk płuc lub zespół ostrej niewydolności oddechowej, ostra niewydolność krążenia, zaburzenia krzepnięcia krwi pod postacią jawnych klinicznie krwawień lub zespołu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego, kwasica metaboliczna, głęboka hipoglikemia oraz hemoglobinuria. W roku 2000 poddano uprzednio ustalone kryteria rewizji, poszerzając listę o kolejne postaci zimnicy charakteryzujące się niekorzystnym rokowaniem (WHO 2000). Kryteria z roku 2000 obejmują dodatkowo następujące zespoły kliniczne i wskaźniki laboratoryjne: zaburzenia świadomości bez śpiączki, skrajne osłabienie, hipertermia o charakterze udaru ciepłego, uszkodzenie wątroby z hiperbilirubinemią oraz hiperparazytemia stwierdzona w badaniu mikroskopowym krwi obwodowej. Dokładny opis kryteriów WHO z roku 2000 zawiera Tabela 7 (str. 59).



Rycina 4. Śmiertelność z powodu poszczególnych postaci malarii o ciężkim przebiegu u dzieci (źródło: Maitland i wsp. 2004)

W rejonach o wysokiej i stabilnej transmisji malarii, ciężki przebieg inwazji *P. falciparum* dotyczy przede wszystkim dzieci do lat pięciu oraz kobiet ciężarnych. W takich okolicznościach, wraz z powtarzającymi się ekspozycjami na zarażenie zarodźcem, dochodzi do wykształcenia wspomnianych wcześniej mechanizmów odpornościowych, dzięki którym u osób dorosłych obserwuje się prawie wyłącznie

łagodne postaci zimnicy lub bezobjawową parazytemię. W pozostałych regionach występowania zimnicy, ciężkie postaci schorzenia mogą rozwinąć się w każdym wieku, a szczególnie zagrożeni powikłaniami inwazji *Plasmodium* spp. są nieodpomi podróżujący z naszej strefy klimatycznej do krajów malarycznych.

Każda z powyższych grup chorych charakteryzuje się własnym obrazem klinicznym ciężkiej malarii, jak również odmiennym rokowaniem (WHO 2000). U dorosłych z przywleczoną zimnicą najczęściej dochodzi do dysfunkcji wielonarządowej z niewydolnością nerek, obrzękiem płuc, wstrząsem i śpiączką, natomiast w rejonach endemicznych, w wieku rozwojowym dominuje malaria mózgowa oraz zaburzenia związane z głęboką niedokrwistością (Maitland i wsp. 2003). Co więcej, w przeciwieństwie do chorych dzieci z terenów endemicznych, w przypadku malarii przywleczonej przez osoby nieodporne, wiek jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym (Trampuz i wsp. 2003). Powyższe zjawiska nie znalazły jak dotąd wyczerpującego wyjaśnienia.

Śmiertelność z powodu przywleczonej zimnicy o ciężkim przebiegu sięga 20% (Trampuz i wsp. 2003). Rokowanie w przypadku poszczególnych postaci zimnicy u dzieci przedstawia Rycina 4 (str. 30).

2.2 Cytokiny i ich znaczenie w odpowiedzi na zarażenie *Plasmodium* spp.

2.2.1 Podstawowe właściwości cytokin i pojęcie sieci cytokin.

Cytokiny to liczna i niejednorodna grupa cząsteczek białkowych, kontrolujących szereg procesów biologicznych w organizmie człowieka. Należy do niej ponad 100 różnorodnych molekuł, będących mediatorami odpowiedzi immunologicznej oraz zapalnej, wpływających na proliferację i różnicowanie się komórek, a także uczestniczących w regulacji krwiotworzenia (Oppenheim i wsp. 2001). Głównym źródłem cytokin są komórki należące do układu odpornościowego, w tym: aktywowane monocyty, makrofagi, limfocyty oraz granulocyty. Ich oddziaływanie na komórki efektorowe odbywa się na drodze wiązania z receptorami błonowymi, co prowadzi do uaktywniania szlaków przekazywania sygnału w obrębie komórki (Pietruczuk i wsp. 2001).

Udowodniono, iż cytokiny regulują wszystkie fazy odpowiedzi immunologicznej, jak również w istotny sposób uczestniczą w procesie zapalnym. Na tej podstawie rozróżnia się cytokiny prozapalne oraz przeciwzapalne (Tabela 3, str. 32). Podział ten jest jednak arbitralny i niektóre cytokiny, w zależności od typu

odpowiedzi immunologicznej lub fazy procesu zapalnego, mogą wykazywać cechy charakterystyczne dla obu grup, jak również odznaczać się właściwościami immunomodulującymi.

Istotne znaczenie dla biologicznych efektów aktywności cytokin mają szczególne zjawiska regulujące ich działanie, do których należą: plejotropia (działanie wielokierunkowe), redundacja (wywoływanie tego samego efektu przez różne cytokiny), synergizm (współdziałanie) oraz antagonizm. Ważna jest także ich zdolność do indukowania kaskad i pętli dodatnich bądź ujemnych sprzężeń zwrotnych (Gołąb i wsp. 2001).

Złożoność działania wynikająca z opisanych powyżej właściwości, duża ilość zidentyfikowanych dotychczas cząsteczek należących do rodziny cytokin oraz różnorodność ich efektorów sprawiają, że w układzie immunologicznym oraz pomiędzy nim, a innymi układami oddziaływania, *in vivo* cytokiny tworzą dynamiczny, nieliniowy system powiązań czynnościowych, zwany siecią cytokin (Kokot i wsp. 2005).

Tabela 3. Ważniejsze cytokiny prozapalne, przeciwzapalne i ich receptory biorące udział w patogenezie chorób zakaźnych i pasożytniczych (Oppenheim i wsp. 2001)

Cytokiny i inne czynniki prozapalne	Cytokiny i inne czynniki przeciwzapalne
TNF	sTNF-R
IL-1 β	IL-1Ra, sIL-1R
IL-2	IL-4
IL-6	IL-13
IL-8	IL-10
IL-12	TGF β
IFN γ	
IL-18	IL-18 BP

Wykazano niejednokrotnie, że wzmożona ekspresja poszczególnych cytokin i ich oddziaływanie w obrębie sieci tych cząsteczek powiązane są z zaburzeniami metabolicznymi oraz dysfunkcją narządów wewnętrznych w przebiegu malarii, a także innych schorzeń infekcyjnych i niezakaźnych. Dotyczy to m. in. ostrej

niewydolności nerek (Parikh i Devarajan 2008), uszkodzenia wątroby (Flisiak 1999) i płuc (Bhatia i Moodhala 2004), czy zespołu rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (Kopeć 1997).

2.2.2 Rola cytokin w zimnicy

Dotychczasowe badania sugerują, że odpowiedź na inwazję *Plasmodium* spp. i potencjalnie związany z nią przebieg kliniczny zimnicy zależy może od dynamicznej równowagi pomiędzy aktywnością cytokin o charakterze prozapalnym, przeciwzapalnym oraz immunomodulacyjnym. Podobnie jak w przypadku posocznicy oraz niektórych ogólnoustrojowych infekcji wirusowych, niezbędna do usunięcia drobnoustroju z organizmu żywiciela reakcja zapalna może prowadzić jednocześnie do uszkodzeń narządowych i zaburzeń metabolicznych (Clark i wsp. 2007).

Udowodniono, iż w reakcji na zarażenie zarodźcem zimnicy dochodzi do wczesnej produkcji prozapalnych cytokin, w szczególności IFN γ przy udziale IL-12 oraz TNF, IL-1 i IL-6. Uwarunkowana wzmożoną ekspresją cytokin prozapalnych aktywacja makrofagów uznawana jest za jeden z podstawowych mechanizmów odpowiedzi nieswoistej w malarii i wydaje się być konieczna do efektywnej redukcji parazytemii, a co za tym idzie ustąpienia objawów choroby. Wykazano jednak, że nasilona produkcja i uwalnianie tych cytokin w przebiegu inwazji *P. falciparum* wiąże się z niekorzystnymi zjawiskami uogólnionymi, takimi jak głęboka niedokrwistość czy malaria mózgowa (Malaguarnera i wsp. 2002b). Jednocześnie wysokie stężenia większości cytokin zapalnych w surowicy u chorych okazały się być związane z ciężkimi postaciami inwazji *P. falciparum*, a istotne znaczenie dla rokowania przypisywano zrównoważonej produkcji cytokin przeciwzapalnych, w tym transformującego czynnika wzrostu β (TGF β – z j. ang. Transforming growth factor β) i IL-10 (Day i wsp. 1999).

Również inwazje pozostałymi gatunkami *Plasmodium* okazały się być związane ze wzmożoną ekspresją cytokin prozapalnych na poziomie ogólnoustrojowym. W zimnicy wywołanej przez *P. vivax* wykazano ścisły związek pomiędzy cyklicznie występującymi objawami malarii, a stężeniem TNF w surowicach chorych, a otrzymane wartości surowiczych stężeń tej cytokiny przewyższały nawet stężenia obserwowane w zimnicy o ciężkim przebiegu o etiologii *P. falciparum* (Karuna weera i wsp. 1992b).

Powyższe zjawiska oraz znaczenie cytokin w patogenezie malarii i ich związek z przebiegiem klinicznym choroby wciąż pozostają nie w pełni zbadane, a wyniki publikowanych prac są często rozbieżne.

2.2.3 Znaczenie poszczególnych cytokin w zimnicy

2.2.3.1 Czynniki martwicy nowotworów

Czynnik martwicy nowotworów (TNF¹) uważany jest za jedną z najważniejszych cytokin w odpowiedzi immunologicznej i zapalnej. Cząsteczka ta wykazuje plejotropowe działanie: uczestniczy w reakcjach zapalnych, bierze udział w przekazywaniu sygnałów pomiędzy komórkami odpowiedzi immunologicznej, a innymi komórkami, jak również wpływa na metabolizm komórkowy oraz zjawisko apoptozy. TNF działa chemotaktycznie na monocyty i neutrofile oraz aktywuje te komórki, podobnie oddziałując także na makrofagi. Ponadto TNF jest mediatorem cytotoxyczości monocytów i makrofagów. Poza bezpośrednim wpływem na układ odpornościowy, TNF indukuje produkcję i uwalnianie wielu innych cytokin, w tym IFN γ oraz IL-6 z makrofagów i limfocytów. Efekty biologiczne TNF zależą m. in. od intensywności jego wydzielania. Gwałtowne uwolnienie dużych ilości tej cząsteczki może wywołać m. in. objawy wstrząsu, ostrej niewydolności oddechowej, zespołu rozlanego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego oraz wysoką gorączkę (Gołąb i wsp. 2002).

Wykazano, iż wzmożona ekspresja TNF jest istotnym elementem odpowiedzi na zarażenie zarodźcem malarii. W zimnicy TNF uwalniany jest przez makrofagi aktywowane przez antygeny obecne na błonach komórkowych krwinek czerwonych zarażonych *Plasmodium* spp. oraz przez uwalniany w trakcie rozpadu erytrocytów GPI. Wielokierunkowe działanie przeciwpasożytnicze TNF opiera się m. in. na stymulacji fagocytozy poprzez wpływ na ekspresję receptorów dla fragmentu Fc immunoglobulin na monocytach. Ponadto obserwowano zdolność tej cytokiny do hamowania rozwoju i namnażania *P. falciparum* w mechanizmie niezależnym od fagocytozy *in vitro* (Muniz-Junqueira i wsp. 2001). Wraz z innymi cytokinami, a w szczególności IL-12, TNF bierze udział w stymulacji uwalniania IFN γ przez komórki

¹ Mianownictwo dotyczące tej cytokiny wymaga wyjaśnienia. Czynniki martwicy nowotworów został pierwotnie zidentyfikowany jako białko zdolne do zabijania komórek nowotworowych *in vitro*, podczas gdy równolegle opisywano istnienie kachektyny - cząsteczki indukującej wyniszczenie organizmu. Po udowodnieniu identyczności tych obu białek przypisano im nazwę czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α), w odróżnieniu od bardzo podobnej strukturalnie cząsteczki limfotoksyny, zwanej TNF- β . Obecnie znana jest jeszcze jedna cytokina zbliżona w budowie do limfotoksyny, dlatego też wprowadzono nowe mianownictwo: TNF- α nazywany jest TNF, a pozostałym dwóm cząsteczkom nadano miana limfotoksyn α i β (Gołąb i wsp. 2002). Taką nomenklaturę przyjęto również w niniejszej rozprawie.

NK oraz aktywowane makrofagi, co wydaje się być niezbędnym elementem odpowiedzi przeciw pasożytniczej we wczesnym etapie zimnicy. Stwierdzono, iż podwyższone surowicze stężenie TNF, a także współwystępujący wzrost poziomu tlenu azotu we krwi, związany jest z szybkim ustąpieniem gorączki oraz usunięciem zarodków z krwi chorych na zimnicę (Malaguarnera i wsp. 2002b).

Z drugiej strony, przypisywany tej cząsteczce wpływ na ekspresję cząsteczek adhezyjnych (m. in. ICAM-1, VCAM-1, selektyna E) w ścianach drobnych naczyń krwionośnych może nasilać zjawisko sekwestracji zarażonych zarodkami malarii erytrocytów i związane z tym powikłania (Artavanis-Tsakonas i wsp. 2003). U dzieci z malarią mózgową oraz głęboką niedokrwistością w przebiegu ciężkich postaci inwazji *P. falciparum* obserwowano wysokie stężenia TNF w surowicy (Kwiatkowski i wsp. 1990). Wysokie surowicze poziomy TNF stwierdzono również u chorych dorosłych z zimnicą o ciężkim przebiegu (Day i wsp 1999).

2.2.3.2 Interferon gamma

Interferony stanowią grupę cząsteczek należących do rodziny cytokin prozapalnych, wśród których największe znaczenie w odpowiedzi immunologicznej w chorobach pasożytniczych ma interferon γ (IFN γ). Podstawowe funkcje IFN γ obejmują: aktywację makrofagów, wspomaganie prezentacji antygenów, pobudzenie mechanizmów wrodzonej oraz nabytej odpowiedzi immunologicznej, kontrolę interakcji między komórkami śródbłonna i limfocytami, regulację odpowiedzi Th1/Th2 zależnej oraz wpływ na apoptozę komórek. Wzmoczona ekspresja IFN γ charakterystyczna jest dla odpowiedzi immunologicznej komórkowej typu Th1. IFN γ ułatwia różnicowanie limfocytów T cytotoksycznych oraz wzmacnia cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał, za którą odpowiedzialne są komórki NK. W inwazjach pasożytniczych IFN γ jest jednym z najsilniejszych aktywatorów makrofagów.

Cytokina ta wzmacnia ich właściwości cytotoksyczne, m. in. przez pobudzenie wytwarzania tlenu azotu (NO) na drodze stymulacji ekspresji jego indukowanej syntetazy. Poprzez produkcję NO, IFN γ prowadzi do eliminacji hepatocytów zarażonych zarodkiem zimnicy, a także wątrobowych form rozwojowych *Plasmodium* wewnątrz tych komórek (Malaguarnera i wsp. 2002b). Ponadto IFN γ nasila ekspresję innych cytokin prozapalnych, w tym IL-1, IL-6 oraz TNF i ich uwalnianie z aktywowanych makrofagów.

Obserwacje z wykorzystaniem myszy zarażonych *Plasmodium yoelli* oraz *Plasmodium berghei* sugerują korzystny wpływ produkcji IFN γ we wczesnej fazie

inwazji na przebieg choroby i ostateczne rokowanie (De Souza i wsp. 2003). W badaniach na modelach zwierzęcych stwierdzono jednak zarówno powiązanie wzmożonej ekspresji IFN γ z szybką redukcją parazytemii oraz zmniejszeniem śmiertelności w przebiegu inwazji *Plasmodium*, jak i ścisły związek IFN γ z rozwojem malarii mózgowej (Su i wsp. 2000). Również u ludzi wykazano, iż prozapalne właściwości IFN γ mogą ograniczać prawdopodobieństwo progresji choroby do zagrażających życiu postaci klinicznych (Torre i wsp. 2002). Z drugiej strony obserwowano korelację wysokich stężeń IFN γ w surowicy chorych z występowaniem powikłań malarii u ludzi (Riley 1999). Z kolei w eksperymentach *in vitro*, w odpowiedzi na ekspozycję na antygen *P. falciparum* wykazano znacząco mniejszą produkcję IFN γ przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej dorosłych zamieszkujących rejon endemiczny w Gabonie, w porównaniu do komórek Europejczyków świeżo przybyłych do tego rejonu (Kojima i wsp. 2004), co może sugerować związek klinicznej odporności przeciwwimniczej ze zdolnością organizmu żywiciela do regulacji ekspresji IFN γ w odpowiedzi na zarażenie *P. falciparum*.

2.2.3.3 Interleukina 6

Interleukina 6 uważana jest za jeden z podstawowych czynników regulujących mechanizmy obronne organizmu. Charakteryzuje się ona wielokierunkowym działaniem: bierze udział w odpowiedzi immunologicznej, reakcji zapalnej oraz w krwiotworzeniu. Wykazuje ona zarówno właściwości prozapalne (np. pirogenne), jak i przeciwzapalne, m. in. poprzez zdolność do hamowania produkcji TNF (Oppenheim i wsp. 2001). W reakcji ostrej fazy IL-6 odpowiedzialna jest za stymulację produkcji białek ostrej fazy, w tym białka C-reaktywnego w hepatocytach, komórkach śródbłonna oraz innych lokalizacjach. Ponadto cytokina ta wywiera wpływ na wytwarzanie przeciwciał, wzrost komórek śródbłonna, a także oddziałuje neurotrofowo oraz pirogenne (Gołąb i wsp. 2002). IL-6 wytwarzana jest głównie przez monocyty i makrofagi, ale także fibroblasty, komórki śródbłonna oraz limfocyty T i B, a do czynników stymulujących jej produkcję i wydzielanie zalicza się przede wszystkim: IL-1, TNF oraz interferony.

Wzmożoną ekspresję IL-6 stwierdzono zarówno w inwazjach *P. falciparum*, jak i *P. vivax* (Karunaweera i wsp. 1992a, Yeom i wsp., 2003). W zimnicy o ciężkim przebiegu obserwowano podwyższone stężenia IL-6 w surowicach chorych, szczególnie u dzieci afrykańskich z malarią mózgową (Lyke i wsp. 2004). U dorosłych pochodzących z Wietnamu, u których rozpoznano ciężkie klinicznie postaci zimnicy, wykazano związek nasilonej produkcji IL-6 z hiperparazytemią, żółtaczką

oraz wstrząsem, natomiast nie obserwowano w tej populacji chorych podobnej korelacji stężenia IL-6 z rozwojem malarii mózgowej. Udowodniono również iż, możliwe jest zastosowanie IL-6 jako czynnika rokowniczego u dorosłych z zimnicą o etiologii *P. falciparum* (Day i wsp. 1999)

2.2.3.4 Interleukina 10

Interleukina 10 jest cząsteczką o szerokiej aktywności immunoregulacyjnej, zaliczaną do cytokin przeciwzapalnych. Spełnia ona wiele funkcji, które w rezultacie hamują reakcje zapalne, a także odpowiedź immunologiczną typu komórkowego. IL-10 jest również kluczową cytokiną dla różnicowania się limfocytów Th2 (Gołąb i wsp. 2002).

Wytwarzana jest głównie przez pobudzone limfocyty T, zwłaszcza Th2, ale także limfocyty B, monocyty, makrofagi i keratynocyty. Jednym z podstawowych efektów aktywności tej interleukiny jest hamowanie produkcji cytokin prozapalnych, zwłaszcza IFN γ oraz IL-2, przez subpopulację limfocytów Th1. IL-10 hamuje również wytwarzanie cytokin przez monocyty i makrofagi, w szczególności dotyczy to IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12, TNF, a także reaktywnych związków tlenowych i tlenku azotu (Gołąb i wsp. 2002). Aktywność immunoregulacyjna IL-10 polega na jednoczesnym blokowaniu syntezy cytokin i prezentacji antygeny poprzez hamowanie ekspresji cząsteczek MHC klasy II na monocytach.

W zimnicy sugeruje się istotną rolę IL-10 w kontroli procesu zapalnego związanego z wczesną odpowiedzią immunologiczną o charakterze Th1 i wzmożoną produkcją IFN γ w odpowiedzi na zarażenie *Plasmodium* spp. (Artavanis-Tsakonas i wsp. 2003). Tę hipotezę potwierdzają badania z udziałem myszy z unieczynnionym genem kodującym IL-10, które charakteryzowały się wyższą śmiertelnością w przebiegu inwazji *Plasmodium chabaudi* w porównaniu do zarażonych myszy dzikich szczepów (z aktywnym tym genem). Zwraca się również uwagę na potencjalną relację między przebiegiem choroby i równowagą w zakresie produkcji cytokin pro- i przeciwzapalnych, w tym IL-10 i TGF β (Day i wsp. 1999). U dzieci wykazano związek pomiędzy rozwojem głębokiej niedokrwistości, a wysokim stężeniem TNF w surowicy, przy jednoczesnym niskim poziomie IL-10 (Othoro i wsp. 1999).

2.2.3.5 Interleukina 12

Interleukina 12 należy do grupy cząsteczek o charakterze prozapalnym oraz immunomodulującym i jest główną cytokiną, która odpowiada za równowagę

między odpowiedzią immunologiczną Th1 i Th2 zależną. Biologicznie aktywna IL-12 jest heterodimerem o masie ok. 70 kDa, określanym jako białko p70 (Gołąb i wsp. 2002). Produkowana jest przede wszystkim przez makrofagi i komórki dendrytyczne. IL-12 nasila proliferację, aktywuje i stymuluje cytotoxicność komórek NK, a także indukuje powstawanie limfocytów subpopulacji Th1 oraz wzmacnia ich aktywność. Wraz z innymi cytokinami, w szczególności synergistycznie z IL-18, wzmacnia wytwarzanie IFN γ oraz innych cytokin prozapalnych przez komórki Th1. Zalicza się ją do istotnych mediatorów odpowiedzi przeciwzakaźnej, w tym przeciw pasożytniczej (Trinchieri 2007).

Ponadto IL-12 bierze także udział w regulacji odporności humoralnej, m. in. poprzez stymulację produkcji przeciwciał przez limfocyty typu B oraz pobudzanie wydzielania niektórych podklas przeciwciał IgG oraz hamowanie IgE (Malaguamera i wsp. 2002b).

In vitro stwierdzono pobudzający wpływ IL-12 na krwiotworzenie, natomiast obserwacje *in vivo* wskazują, iż cytokina ta może wywoływać neutropenię, niedokrwistość oraz trombocytopenię u ludzi. Ponadto IL-12 uważana jest za czynnik współodpowiedzialny za liczne schorzenia o charakterze autoimmunologicznych (Gołąb i wsp. 2002)

W badaniach z użyciem myszy wykazano ochronną rolę IL-12 w przebiegu inwazji *P. chabaudi*, związaną ze stymulacją odpowiedzi o charakterze Th1, jak również odporności zależnej od przeciwciał (Su i wsp. 2002). W surowicach dzieci z głęboką niedokrwistością w przebiegu inwazji *P. falciparum* obserwowano niższe stężenia IL-12 niż u chorych z zimnicą niepowikłaną (Malaguamera i wsp. 2002a, Luty i wsp. 2000, Perkins i wsp. 2000). Podobne relacje pomiędzy IL-12 i ciężkością przebiegu malarii uzyskano w badaniach dotyczących osób dorosłych (Chaiyaraj i wsp. 2004). Podczas dwutygodniowej obserwacji chorych stwierdzono jednak ciągły wzrost stężenia tej cytokiny w surowicy pacjentów z hiperparazytemią i zimnicą mózgową (Gosi i wsp. 1999). Rozbieżności te nie zostały jak dotąd wyjaśnione.

2.2.3.6 Interleukina 13

Interleukina 13 jest jednym z ważnych mediatorów odpowiedzi przeciw pasożytniczej. Poprzez swój udział w mechanizmach odporności Th2 zależnych odgrywa szczególną rolę w inwazjach helmintów (Oppenheim i wsp. 2001). Niedawno wykazano również udział tej interleukiny w odpowiedzi na zarażenia wywołane przez pierwotniaki (Mansueto i wsp. 2007). Jako cytokina

przeciwzapalna wykazuje zdolność hamowania ekspresji wielu interleukin, w tym TNF oraz IL-12 (Oppenheim i wsp. 2001). Ponadto IL-13 bierze udział w reakcjach zapalnych związanych z alergią (Gołąb i wsp. 2002).

Cytokina ta wydzielana jest przede wszystkim przez aktywowane limfocyty subpopulacji Th2, jak również przez limfocyty T cytotoksyczne oraz komórki NK. IL-13 wywiera działanie przeciwzapalne poprzez regulację funkcji makrofagów i monocytów. Oddziałuje także na limfocyty B, wzmagając ich proliferację oraz syntezę przeciwciał klasy IgE. Udowodniono, iż IL-18 działając samodzielnie, tj. w warunkach braku współdziałania z IL-12, stymuluje limfocyty T oraz komórki NK do produkcji IL-13 (Hoshino i wsp. 1999). Niskie stężenia IL-12 obserwowano dotychczas w kilku badaniach dotyczących ciężkich postaci zimnicy u dzieci (Malaguarnera i wsp. 2002c, Chaiyaraj i wsp. 2003). Potencjalny związek tego zjawiska ze stężeniem IL-13 w surowicy chorych, a także jego ewentualne znaczenie kliniczne, nie zostały wyjaśnione w dotychczasowych badaniach nad rolą sieci cytokin w malarii. Kilka lat temu wykazano natomiast związek polimorfizmu genu dla IL-13 z kliniczną odpornością w zakresie ciężkich postaci malarii u dorosłych (Ohashi i wsp. 2003).

2.2.3.7 Interleukina 18

Interleukina 18 została odkryta względnie niedawno. Początkowo określano ją mianem czynnika indukującego interferon γ (Wereszczyńska i wsp. 2004). Obecnie wiadomo, że IL-18 jest cytokiną o wielokierunkowym działaniu immunomodulacyjnym. Częsteczkę tę charakteryzuje podobieństwo strukturalne do IL-1 β , natomiast funkcjonalnie wykazuje ona istotną analogię do IL-12 (Tschoeke i wsp. 2006). Poza produkcją IFN γ , IL-18 stymuluje syntezę i wydzielanie cytokin prozapalnych, w tym TNF i interleukiny 1, przez makrofagi, wzmacnia cytotoksyczność komórek NK oraz wpływa na różnicowanie się limfocytów Th1 (Gołąb i wsp. 2002).

W zakresie produkcji IFN γ przez makrofagi obserwuje się efekt synergistyczny działania IL-18 i IL-12. Co więcej, wyniki niektórych badań sugerują iż wydzielanie IFN γ stymulowane przez IL-18 może mieć miejsce wyłącznie w warunkach zwiększenia ekspresji receptora dla tej cytokiny przez IL-12 (Dinarello 1999).

Oddziałując na limfocyty T CD4+, komórki NK, bazofile oraz komórki tuczne, IL-18 może również w określonych okolicznościach indukować produkcję IL-4 oraz IL-13. W ten sposób IL-18 wykazuje szczególną wśród cytokin zdolność do

wzmagania zarówno odpowiedzi Th1 jak i Th2 zależnej, z którą związany jest wzrost limfocytów B oraz synteza przeciwciał (Dinarello i wsp. 2003).

Analiza piśmiennictwa pokazuje, iż surowicze stężenie IL-18 może być przydatnym wskaźnikiem diagnostycznym w chorobach o podłożu autoimmunologicznym oraz zapalnym, o charakterze zarówno miejscowym, jak i uogólnionym. Jak dotąd stwierdzono m. in. znaczenie prognostyczne poziomu tej interleukiny w ostrym zapaleniu trzustki, udział IL-18 w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów i reakcji ostrego odrzucenia przeszczepu (Kuśnierz-Cabała i wsp. 2006). Obserwowano także związek jej miejscowej i ogólnoustrojowej ekspresji z aktywnością niespecyficznych chorób zapalnych jelita grubego (Wiercińska-Drapało i wsp. 2005) oraz przydatność w monitorowaniu przebiegu klinicznego ciężkich infekcji bakteryjnych, w szczególności posocznicy wywołanej drobnoustrojami Gram-dodatnimi (Tschoeke i wsp. 2006).

Dopiero od niedawna interleukina 18 stała się przedmiotem zainteresowania badaczy zajmujących się patogenezą malarii. Dotychczas wykazano, że transgeniczne myszy z unieczynnionym genem kodującym IL-18 są bardziej podatne na zarażenie *P. berghei* niż osobniki dzikie, zaś terapia przy użyciu rekombinowanej IL-18 wykazuje ochronne działanie w przebiegu zimnicy u tych zwierząt (Singh i wsp. 2002). Publikacje poświęcone roli tej cytokiny w malarii u ludzi są jednak jak dotąd bardzo nieliczne, a ich wyniki – niejednoznaczne (Torre i wsp. 2001, Nagamine i wsp. 2003).

2.3 Przeciwciała przeciwko białkom szoku termicznego

Białka szoku termicznego (Hsp) są ważnymi efektorami komórkowej odpowiedzi stresowej, produkowanymi w odpowiedzi na działanie różnorodnych czynników zakłócających miejscową homeostazę. Poza podwyższoną temperaturą, ekspresja Hsp stymulowana może być przez m. in. niedotlenienie, działanie utleniaczy, infekcje i stan zapalny. Do zasadniczych funkcji tych cząsteczek należy udział w prawidłowym fałdowaniu nowopowstałych białek oraz denaturacja lub degradacja białek uszkodzonych. Poprzez te oddziaływania Hsp chronią komórkę przed skutkami zmian środowiskowych, dlatego też określa się je mianem „białek opiekuńczych”. Uczestniczą one także w różnorodnych procesach komórkowych w warunkach bezstresowych i dotyczy to m. in. transkrypcji, translacji i transportu innych białek oraz przekazywania sygnału (Dżaman-Serafin i wsp. 2005).

Białka szoku termicznego obecne są we wszystkich organizmach żywych i

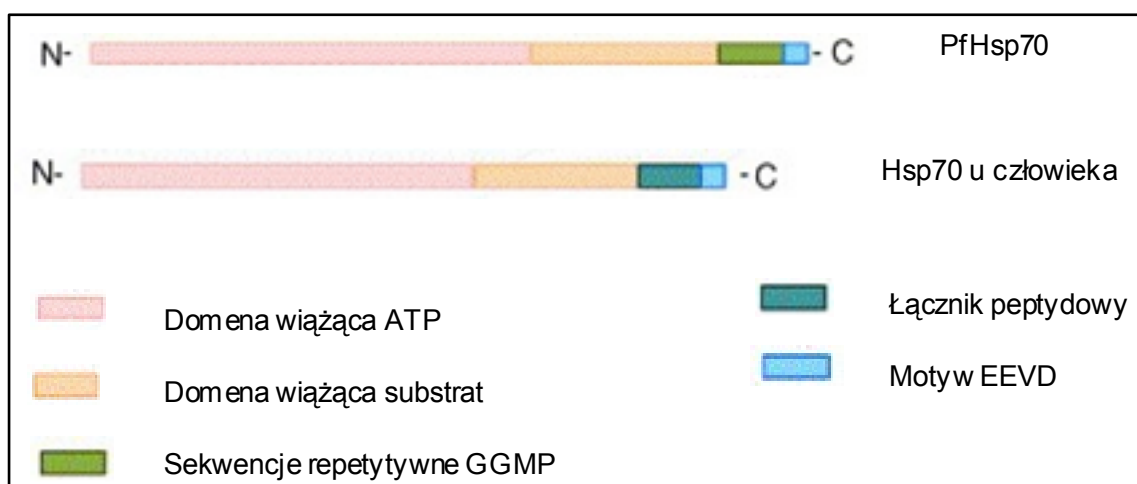
stanowią grupę cząsteczek niezwykle konserwatywnych filogenetycznie. W swej budowie wykazują dużą homologię międzygatunkową, nawet pomiędzy tak odległymi ewolucyjnie organizmami, jak człowiek i pierwotniaki z rodzaju *Plasmodium*.

Białka te zostały podzielone na kilka głównych grup, w zależności od ich przybliżonej masy cząsteczkowej wyrażonej w kilodaltonach. Nazwano je odpowiednio: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 oraz małe Hsp. Białka z rodziny Hsp70 ułatwiają syntezę, gromadzenie i degradację innych białek. Uczestniczą także w przez błonowym transporcie cząsteczek proteinowych oraz wpływają na rozpuszczalność kompleksów białkowych. Hsp60 jest białkiem zlokalizowanym głównie w mitochondriach, jednak w obserwowano również i inne lokalizacje wewnątrzkomórkowe białek z tej grupy, a także jego ekspresję na powierzchni komórek (Das i wsp. 1997). Hsp60 bierze udział w transporcie polipeptydów do organelli komórkowych oraz w formowaniu białek zbudowanych z wielu podjednostek (Dżaman-Serafin i wsp. 2005).

Białka szoku termicznego produkowane przez drobnoustroje w chorobach zakaźnych wykazują właściwości antygenowe i stanowią ligandy dla limfocytów Tγδ gospodarza. W badaniach nad odpowiedzią immunologiczną skierowaną przeciwko tym cząsteczkom stwierdzono, iż mogą one być celem zarówno odpowiedzi komórkowej, jak i humoralnej. Jednocześnie, ze względu na podobieństwa międzygatunkowe w zakresie sekwencji aminokwasów, przeciwciała przeciwko Hsp drobnoustrojów mogą reagować krzyżowo z endogennymi białkami szoku termicznego organizmu gospodarza. Zaobserwowano związek pomiędzy występowaniem autoprzedwciał przeciwko Hsp, a patogenezą różnorodnych jednostek chorobowych, w tym infekcji i inwazji o różnej etiologii, schorzeń autoimmunologicznych oraz chorób naczyniowych, których podłożem są zmiany miażdżycowe związane z uszkodzeniem komórek śródbłonna naczyniowego (Zügel i wsp. 1999).

Wydaje się, że zarówno białka szoku termicznego, jak i przeciwciała skierowane przeciwko Hsp, biorą udział w regulacji odpowiedzi zapalnej i wykazują związki z ekspresją cytokin (Wu i wsp. 2006). Zauważono, iż synteza Hsp stymulowana jest m. in. przez TNF oraz IL-6 (Tchórzewski 1998). Z drugiej strony, Hsp mogą prowadzić do aktywacji makrofagów i uwalniania przez te komórki prozapalnych mediatorów, w tym TNF, IL-12 oraz tlenku azotu. Zaobserwowano ponadto, iż jednojądrzaste komórki krwi obwodowej małych immunizowanych uprzednio antygenami białka z rodziny Hsp70 *Mycobacterium tuberculosis*, stymulowane *in vitro* tym białkiem produkowały znacząco większe ilości IL-12 w porównaniu do

zwierząt niepoddanych szczepieniu (Wang i wsp. 2002).



Rycina 5 Podobieństwo strukturalne ludzkiego białka Hsp70 oraz PfHsp70 (źródło Acharya i wsp. 2007)

W przebiegu licznych chorób pasożytniczych białka szoku termicznego produkowane są zarówno przez komórki ludzkie w odpowiedzi na inwazję, jak i przez drobnoustroje poddane nagłej zmianie środowiska podczas transmisji z organizmu wektora do człowieka (Polla 1991). W swoim cyklu rozwojowym, zarodźce malarii poddawane są skokowi temperatury otoczenia o ∞ najmniej 10°C . Dotyczy to momentu opuszczenia zmiennoocielnego organizmu komara i wniknięcia do krwiobiegu ludzkiego. Ponadto, w trakcie epizodów gorączki w przebiegu zimnicy, pasożyty ekspozowane są w dalszym ciągu na warunki stresu cieplnego. W badaniach nad genomem *P. falciparum* stwierdzono, że aż dwa procent spośród jego materiału genetycznego koduje białka opiekuńcze, a ich syntezę obserwuje się w każdym ze stadiów rozwojowych tego pierwotniaka (Acharya i wsp. 2007). Obecnie uważa się, iż znaczenie białek szoku termicznego pochodzenia pasożytniczego w zimnicy nie ogranicza się do odpowiedzi zarodźca na zmiany temperatury. Przypuszczalnie, funkcje Hsp u *P. falciparum* obejmują także transport białek zarodźca na powierzchnię zarażonego erytrocytu. W patogenezie ciężkich postaci malarii, szczególnie istotny wydaje się udział Hsp w zmianach antygenowych indukowanych przez te pierwotniaki w błonie komórkowej krwinek czerwonych i związanym z tym wpływem na zjawiska cytodherencji i sekwestracji (Acharya i wsp. 2007). Białkom tym przypisuje się także rolę w lekooporności oraz metabolizmie hemoglobiny przez komórki *Plasmodium* (Pavithra i wsp. 2007). Ze względu na zdolność Hsp zarodźca do wywoływania odpowiedzi immunologicznej u żywiciela

oraz homologię strukturalną cząsteczek Hsp u poszczególnych gatunków i szczepów *Plasmodium*, rozważa się zastosowanie tych białek w produkcji szczepionki przeciwwimniczej (Alexandre i wsp. 1997). Interesująca wydaje się możliwość farmakologicznego indukowania zaburzeń w systemie białek opiekuńczych zarodźca malarii. Obiecujące rezultaty uzyskano w badaniach nad jednym z inhibitorów aktywności Hsp90 (geldanamycyną), w których obserwowano zahamowanie rozwoju *P. falciparum* w odpowiedzi na działanie tego leku *in vitro* (Banumathy i wsp. 2003).

Jak już wspomniano, białka szoku termicznego odznaczają się dużą homologią międzygatunkową, jednocześnie wykazując właściwości immunogenne. Białko Hsp70 zarodźca sierpowatego wykazuje 80% podobieństwa strukturalnego do Hsp70 ludzkiego (Rycina 5, str. 42). Wiadomo, iż w przebiegu bezpłciowego cyklu rozwojowego *Plasmodium*, rozpad zarażonych krwinek czerwonych może wiązać się z uwolnieniem do krwi zarówno białek szoku termicznego pochodzenia pasożytniczego, jak i endogennych Hsp syntezowanych w obrębie erythrocytu, obejmujących białka zarówno z rodziny Hsp60, jak i Hsp70. Wobec powyższego, nasuwa się pytanie o występowanie oraz rolę odpowiedzi odpornościowej skierowanej przeciwko tym cząsteczkom w zimnicy. Potencjalnie, przeciwciała wytworzone w reakcji na antygeny białek szoku termicznego zarodźca mogą wykazywać właściwości immunoprotekcyjne, jak i brać udział w procesach autoimmunologicznych, z uwagi na udowodnioną reaktywność krzyżową z ludzkimi Hsp (Mattei i wsp. 1989). Jak dotąd nie badano jednak relacji między poziomem przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego i ciężkością przebiegu malarii u ludzi.

2.3.1 Znaczenie przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w zimnicy

2.3.1.1 Przeciwciała przeciwko białkom Hsp60

Odpowiedź odpornościowa przeciwko białkom z grupy Hsp60 została zaobserwowana zarówno w chorobach wywoływanych przez bakterie, jak i pierwotniaki. Uważa się, iż w inwazjach pasożytniczych celem reakcji immunologicznej są przede wszystkim antygeny białek rodziny Hsp70 (Dżaman-Serafin i wsp. 2005). Zidentyfikowano jednakże białka produkowane przez *P. falciparum*, należące do grupy Hsp60, wykazujące wysoki stopień podobieństwa do mitochondrialnych białek szoku termicznego różnorodnych gatunków prokariotów i eukariotów. Ekspresja białka PfHsp60 nie jest uzależniona od zmian temperatury w cyklu rozwojowym pasożyta,

a cząsteczka ta produkowana jest w sposób konstytutywny, zarówno stadiach zarodźca malarii w organizmie przenosiiciela, jak i człowieka. (Das i wsp 1997).

Badania nad odpowiedzią immunologiczną przeciwko Hsp60 w inwazji *Plasmodium* spp. prowadzono jak dotąd w bardzo ograniczonym stopniu i zwykle dotyczyły one występowania przeciwciał przeciwko białku Hsp65 pochodzenia mykobakteryjnego. W surowicach myszy zarażonych *P. yoelli* obserwowano znacząco wyższe poziomy przeciwciał przeciwko temu białku w klasie IgG, niż u zwierząt zdrowych (Zhang i wsp. 2001). Z kolei wśród dorosłych chorych z inwazją *P. falciparum* hospitalizowanych w Tajlandii w porównaniu do osób zdrowych nie stwierdzono różnic w surowicznych poziomach przeciwciał przeciwko Hsp65 w tej klasie. Wykazano natomiast istotne różnice poziomów przeciwciał w klasach IgA oraz IgM (Zhang i wsp. 2001). U pacjentów z malarią pochodzących z Nigerii, również nie stwierdzono znaczących różnic w surowicznym poziomie przeciwciał przeciwko rekombinowanemu białku Hsp65 w klasie IgG, w porównaniu do grupy kontrolnej, przy czym u tych chorych nie analizowano pozostałych klas przeciwciał (Adebajo i wsp. 1995)

2.3.1.2 Przeciwciała przeciwko białkom Hsp70

U *P. falciparum* zidentyfikowano 5 regionów kodujących białka z rodziny Hsp70 (PfHsp70). Wykazano, iż PfHsp70 produkowane jest w dużych ilościach przez bezpłdowe postaci rozwojowe tego pasożyta w temperaturze 37°C, a ekspresja tego białka wzrasta jeszcze bardziej w warunkach podwyższenia temperatury środowiska do ponad 40°C (Acharya i wsp. 2007). Ekspresję białka Hsp70 (PvHsp70) stwierdzono również u zarodźców z gatunku *P. vivax*. Udowodniono ponadto, iż PvHsp70 charakteryzuje się znaczną homologią w odniesieniu do Hsp70 pozostałych gatunków *Plasmodium* spp. (Na i wsp. 2007).

W badaniach na modelu mysim, obserwowano znacząco wyższe poziomy przeciwciał przeciwko Hsp70 w klasie IgG u zwierząt zarażonych *P. yoelli* w porównaniu do myszy zdrowych (Zhang i wsp. 2007). Co więcej, u małp z gatunku *Saimiri sciureus*, obecność przeciwciał skierowanych przeciwko PfHsp70 wiązała się z odpornością na zarażenie *P. falciparum* (Dubois i wsp. 1984). W przebiegu malarii ludzkiej nie wykazano jednak jak dotąd ochronnej roli przeciwciał przeciwko białkom Hsp70, pomimo udokumentowanego ich występowania (Behr i wsp. 1992). Nie wyjaśniono również potencjalnego udziału tych przeciwciał w reakcjach autoimmunologicznych w patogenezie zimnicy, aczkolwiek *in vitro* wykazano, iż białka z rodziny Hsp70 zarodźców mogą indukować powstawanie autoprzeciwciał u

ludzi (Mattei i wsp. 1989).

W surowicy chorych dorosłych zarażonych *P. falciparum* w Brazylii obserwowano znacząco wyższe poziomy przeciwciał w klasie IgM oraz IgG skierowanych przeciwko różnorodnym epitopom Hsp70 w porównaniu do grupy kontrolnej i stwierdzono ponadto związek pomiędzy poziomem przeciwciał IgM, a czasem trwania inwazji (De Oliveira-Ferreira i wsp. 1999). W badaniach prowadzonych zarówno w rejonie holoendemicznego występowania zimnicy w Afryce, jak i w brazylijskiej części dorzecza Amazonki, charakteryzującej się niestabilną transmisją malarii, wykazano korelację pomiędzy wiekiem i wcześniejszą ekspozycją na zarażenie *P. falciparum*, a obecnością i poziomem przeciwciał przeciwko Hsp70 (Behr i wsp. 1999, Alexandre i wsp. 1999). Takich badań nie prowadzono jak dotąd wśród pacjentów nieodpornych, z inwazją *Plasmodium* spp. przywleczoną do krajów wolnych od tej choroby. Nie analizowano również związku pomiędzy poziomem tych przeciwciał, a ciężkością przebiegu choroby.

2.4 Centrum Medyczne im. Św. Łukasza w Kifangondo w Angoli

Centrum Medyczne im. Św. Łukasza (Centro de Saúde São Lucas) w Kifangondo położone jest w dystrykcie Cacuaco Angoli, w rejonie endemicznego występowania zimnicy, w pobliżu stolicy kraju - Luandy (Rycina 6, str. 46). Angola usytuowana jest nad Oceanem Atlantyckim, w południowej części Afryki. Trwająca tamże przez ponad 20 lat wojna domowa, zakończona w roku 2002, przyczyniła się do dramatycznego pogorszenia sytuacji zdrowotnej populacji angolskiej, liczącej około 16 milionów ludzi. Średnia długość życia mieszkańców Angoli nie przekracza obecnie 40 lat, a umieralność dzieci do lat 5 wynosi 260/1000 i należy do najwyższych na świecie (WHO 2005). Niedożywienie i niedokrwistość stanowią wiodące przyczyny zgonów wśród uchodźców wojennych w obrębie kraju (Agadjanian i wsp. 2003).

Dystrykt Cacuaco obejmuje nizinne tereny nadmorskie, należące do strefy klimatu tropikalnego. Dobowe temperatury powietrza sprzyjające rozwojowi *Plasmodium*, brak działań zapewniających kontrolę nad wektorem podczas wojny i w latach powojennych oraz trudno dostępna opieka medyczna sprawiają, iż malaria jest jednym z najważniejszych problemów zdrowia publicznego w Angoli. Obecnie jest ona główną przyczyną zachorowalności i umieralności w tym kraju. W latach 1999-2002 obserwowano tam 1,5 miliona zachorowań na zimnicę rocznie. Uważa się, iż około 50% wszystkich przypadków chorobowych leczonych ambulatoryjnie w Angoli

związana jest z inwazjami *Plasmodium*, podczas gdy ciężkie postaci malarii odpowiedzialne są za 25% zgonów szpitalnych w tym kraju (Cuamba i wsp. 2006).



Rycina 6. Centrum Medyczne im. Św. Łukasza i jego usytuowanie w Angoli (mapa: CIA Factbook 2008, fot. Archiwum A. Ł. Wroczyńskich).

Centrum Medyczne im. Św. Łukasza w Kifangondo powstało w trakcie wojny domowej, jako odpowiedź placówki misjonarzy Zgromadzenia Słowa Bożego na ogromne potrzeby społeczeństwa angolańskiego. Ośrodek ten otwarty został w 1996 roku przez o. Andrzeja Fecko SVD, zaś merytoryczny nadzór nad Centrum pełni dr n. med. Waław L. Nahorski, kierownik Kliniki Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych MIMMIT AMG. Od 12 lat Centrum to rozwija działalność medyczno-badawczą i świadczy usługi w zakresie poradnictwa ambulatoryjnego oraz szpitalnictwa zamkniętego. Ośrodek w Kifangondo oferuje diagnostykę medyczną oraz leczenie dla ok. 700 000 mieszkańców dystryktu Cacuaco.

Pacjenci konsultowani są w poradniach Centrum dla dorosłych i dzieci,

obsługujących około 100-120 osób dziennie, natomiast chorzy wymagający leczenia szpitalnego przyjmowani są do Oddziału. Obecnie dyrektorem tego ośrodka jest o. Andrzej Fecko SVD, natomiast dr n. med. Waław L. Nahorski koordynuje działalność badawczą oraz medyczną. W Centrum zatrudniona jest na stałe s. Marta Sojka SSpS, nadzorująca angolski personel medyczny (ponad 30 osób, w tym pielęgniarki, diagnostycy radiologiczni, personel laboratoryjny i pracownicy apteki szpitalnej) oraz lekarz z Polski kierujący Oddziałem Szpitalnym (m. in. lek. T. Kryger, lek. A. Wojtacha, lek. A. Kuna). Centrum dysponuje nowoczesną aparaturą RTG, przenośnym ultrasonografem oraz laboratorium umożliwiającym wykonywanie badań mikroskopowych, podstawowych badań biochemicznych, hematologicznych, a także immunoserologicznych i hormonalnych metodą ELISA. Malaria oraz zakażenie wirusem HIV/AIDS należą do najczęstszych problemów zdrowotnych pacjentów Centrum. Większość pacjentów Oddziału Szpitalnego stanowią dzieci do lat 5. W roku 2004 podpisano porozumienie o współpracy naukowo-badawczej pomiędzy Akademią Medyczną w Gdańsku a Uniwersytetem im. Agostinho Neto w Luandzie (Angola), uwzględniające działalność Międzywydziałowego Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w obrębie Centrum Medycznego im. Św. Łukasza.



Rycina 7. Oddział Szpitalny Centrum Medycznego im. Św. Łukasza w Kifangondo
(fot. Archiwum Kliniki Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych MIMMiT
AMG)

Na terenie Centrum prowadzono wspólne badania z zakresu genetycznie uwarunkowanej oporności *P. falciparum* na chlorochinę, pyrimetaminę i sulfadoksynę oraz roli cytokin w patogenezie malarii (Kryger i wsp. 2004, Wroczyńska i wsp. 2005, Nahorski i wsp. w opracowaniu).

Od 5 lat w obrębie Centrum realizowane są projekty rozwojowe będące częścią programu polskiej pomocy zagranicznej udzielanej za pośrednictwem Ministerstwa Spraw Zagranicznych RP, dotyczące poprawy jakości diagnostyki i terapii pacjentów angolskich z zakażeniem HIV, malarią oraz gruźlicą. Projekty te wdrażane są w ramach współpracy z Centrum Animacji Misyjnej Księży Werbistów, a ich koordynatorem jest dr n. med. Waław L. Nahorski. W ciągu ostatnich lat, co roku w tych pracach brali udział lekarze z Kliniki Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych MIMMiT AMG oraz lekarze specjaliści innych jednostek (m. in. okulistyka, kardiologia) i personel laboratoryjny.

3 Cel

Celem niniejszych badań była ocena znaczenia klinicznego wybranych cytokin pro- i przeciwzapalnych oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w zimnicy, a w szczególności analiza istnienia ich związku z ciężkością stanu klinicznego chorych oraz relacji względem zaburzeń narządowych i metabolicznych w tej chorobie.

Do celów szczegółowych zaliczały się:

1. Porównanie surowiczych stężeń TNF, IFN γ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-13 oraz IL-18, a także przeciwciał przeciwko Hsp60 oraz Hsp70 pomiędzy chorymi na malarię, a osobami zdrowymi.
2. Porównanie stężeń powyższych cząsteczek w surowicach chorych z łagodnym i ciężkim przebiegiem inwazji *Plasmodium* spp.
3. Analiza istnienia zależności pomiędzy badanymi parametrami, a etiologią zimnicy oraz wiekiem chorych i ich wcześniejszą ekspozycją na zarażenie zarodźcem.
4. Ocena dynamiki zmian stężeń powyższych cząsteczek w surowicy pacjentów z ostrymi objawami malarii oraz po zakończeniu leczenia przeciwzaimniczego, w okresie rekonwalescencji.
5. Analiza przydatności wybranych parametrów w ocenie ciężkości przebiegu klinicznego zimnicy.

Wszystkie wyżej wymienione cele badań realizowano w odniesieniu zarówno do populacji chorych w wieku rozwojowym pochodzących z rejonu endemicznego występowania malarii, jak i pacjentów dorosłych z importowaną (przywleczoną) do Polski inwazją *Plasmodium* spp..

4 Materiał i metody

4.1 Grupy osób włączone do analizy oraz badania kliniczne i laboratoryjne wykonywane u pacjentów

4.1.1 Dorośli z zimnicą przywleczoną do Polski oraz grupa kontrolna

4.1.1.1 Dorośli z zimnicą przywleczoną do Polski

Badaniom poddano 91 dorosłych pacjentów z przywleczoną zimnicą hospitalizowanych w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Katedry Medycyny Tropikalnej i Parazytologii Międzywydziałowego Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni Akademii Medycznej w Gdańsku (kierownik: dr n. med. Waław Leszek Nahorski) w latach 1995-2006. Ponadto do badań włączono 6 chorych z malarią hospitalizowanych w Klinice Chorób Odzwierzęcych i Tropikalnych Instytutu Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych Akademii Medycznej w Warszawie w latach 2005-2007 (kierownik: prof. dr hab. Piotr Zaborowski).

Rozpoznanie malarii u 96 osób opierało się na stwierdzeniu obecności form rozwojowych jednego lub więcej gatunków z rodzaju *Plasmodium* w mikroskopowym badaniu grubej kropli bądź cienkiego rozmazu krwi obwodowej, barwionych metodą Giemsy, natomiast u jednej osoby wykazano we krwi swoiste kwasy nukleinowe zarodźców malarii metodą PCR, przy ujemnym wyniku badania mikroskopowego krwi.

Z badanej grupy wykluczono pacjentów z rozpoznaną aktywną inwazją pasożytniczą o innej etiologii (trzy osoby, w tym dwie z trichuriozą i jedna z amebozą). Ostatecznie, do analizy włączono 94 chorych, w tym 16 kobiet i 78 mężczyzn, w wieku od 18 do 70 lat (średnio 39,7 lat). Szczegółowe dane epidemiologiczno-kliniczne chorych przedstawia Tabela 10 (str. 70).

Badania przeprowadzono po uzyskaniu zgody Komisji Etycznej AMG (nr NKEBN/46/2005). Przed pobraniem materiału (krwi) pacjenci zostali poinformowani

o celach i sposobie prowadzenia nieniejszej pracy oraz wyrazili pisemną zgodę.

4.1.1.2 Dorośli pacjenci z Polski po przebytej zimnicy

Kolejną grupę włączoną do badań stanowiło 44 spośród powyższych pacjentów, w tym 7 kobiet i 37 mężczyzn, w wieku od 22 do 70 lat (średnio 38,2 lat), u których powtórzono oznaczenia wybranych parametrów podczas hospitalizacji kontrolnej w okresie od 4 do 8 tygodni (średnio 6,5 tyg.) po przebytej malarii, po wykluczeniu nawrotu zimnicy oraz innych jawnych klinicznie infekcji lub inwazji pasożytniczych.

4.1.1.3 Grupa kontrolna – dorośli z Polski

Grupa kontrolna, odpowiadająca grupie chorych pod względem płci i wieku, składała się z 47 zdrowych dorosłych Polaków, w tym 7 kobiet oraz 40 mężczyzn w wieku od 25 do 69 lat (średnio 35,4 lat), z wywiadem wykluczającym wcześniejszy pobyt w rejonach tropikalnych.

4.1.2 Badanie kliniczne oraz badania dodatkowe u dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski

U pacjentów z zimnicą przywleczoną do Polski opracowano dane na podstawie analizy dokumentacji medycznej, dotyczące wyników badania podmiotowego i przedmiotowego. Badania te przeprowadzone zostały przede mną osobiście lub wykonywał je inny lekarz prowadzący w pierwszym dniu hospitalizacji, przed włączeniem leczenia przeciwpasożytniczego, za pomocą standaryzowanego kwestionariusza, używanego w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych. Dane z lat 1995-2004 zebrano retrospektywnie, natomiast informacje pochodzące z okresu od września 2004 roku – prospektywnie. Grupy pacjentów z obu okresów nie różniły się istotnie pod względem analizowanych parametrów. Informacje o pacjentach hospitalizowanych w Klinice Chorób Odzwierzęcych i Tropikalnych AMW pozyskano z dokumentacji medycznej dzięki uprzejmości dr n. med. Hanny Żarnowskiej-Prymek.

Z pełnego badania klinicznego do analizy włączono wybrane informacje dotyczące aspektów epidemiologicznych i etiologicznych zimnicy u poszczególnych pacjentów oraz szereg danych związanych z charakterem zaburzeń narządowych i metabolicznych w przebiegu tej choroby. Szczegółowy wywiad obejmował informacje o pobytach chorego w rejonach występowania zimnicy w okresie poprzedzającym zachorowanie. Zebrano również dane dotyczące długości pobytu na

terenach zagrożonych malarią oraz ewentualnych wcześniejszych inwazjach *Plasmodium* spp. u tych chorych. Ustalono czas, jaki minął w każdym przypadku od pojawienia się pierwszych objawów schorzenia do momentu ustalenia diagnozy.

Badanie przedmiotowe obejmowało m. in.: ocenę stanu ogólnego pacjenta, pomiar ciśnienia krwi, częstości akcji serca, temperatury ciała oraz ocenę ewentualnych zaburzeń świadomości i innych odchylenia w zakresie ośrodkowego układu nerwowego. Odnotowano odchylenia charakterystyczne dla ciężkiego przebiegu zimnicy, do których zaliczono: żółtaczkę, objawy wstrząsu, zaburzenia diurezy pod postacią oligurii bądź anurii oraz obecność jawnych krwawień z dziąseł, nosa lub przewodu pokarmowego. Malarię mózgową rozpoznawano za pomocą skali śpiączki Glasgow (GCS - z j. ang. Glasgow Coma Scale) (Tabela 4, str. 52).

Tabela 4. Skala śpiączki Glasgow (GCS)

Czynniki oceniane	Kryteria punktacji
Otwieranie oczu	4 punkty - spontaniczne 3 punkty - na polecenie 2 punkty - na bodźce bólowe 1 punkt - pacjent nie otwiera oczu
Kontakt słowny	5 punktów - odpowiedź logiczna, pacjent zorientowany co do miejsca, czasu i własnej osoby 4 punkty - odpowiedź splątana, pacjent zdeorientowany 3 punkty - odpowiedź nieadekwatna, nie na temat lub krzyk 2 punkty - niezrozumiałe dźwięki, pojękiwanie 1 punkt - brak reakcji na kontakt słowny
Reakcja ruchowa	6 punktów - spełnianie ruchowych poleceń słownych, migowych 5 punktów - ruchy celowe, pacjent lokalizuje bodziec bólowy 4 punkty - reakcja obronna na ból, wycofanie, próba usunięcia bodźca bólowego 3 punkty - patologiczna reakcja zgięciowa, odkorowanie (przywiedzenie ramion, zgięcie w stawach łokciowych i ręki, przeprost w stawach kończyn dolnych) 2 punkty - patologiczna reakcja wyprostna, odmóżdzenie (przywiedzenie i obrót ramion do wewnątrz, wyprost w stawach łokciowych, nawrócenie przedramion i zgięcie stawów ręki, przeprost w stawach kończyn dolnych, odwrócenie stopy) 1 punkt - brak reakcji

Analizie poddano również wyniki badań laboratoryjnych, uzyskanych podczas rutynowych oznaczeń hematologicznych i biochemicznych wykonywanych niezwłocznie po hospitalizacji chorych z zimnicą w laboratorium szpitalnym. W szczególności oceniano parametry morfologii krwi (stężenie hemoglobiny we krwi, wartość hematokrytu, liczbę płytek krwi w mm^3) oraz układu krzepnięcia (czas protrombinowy, międzynarodowy współczynnik znormalizowany czasu protrombinowego, czas kaolinowo-kefalinowy, stężenie fibrynogenu w osoczu). W wybranych przypadkach wykorzystano również wyniki badań układu fibrynolizy (stężenie produktów degradacji fibryny i fibrynogenu oraz d-dimerów w osoczu). Zaburzenia krzepnięcia stratyfikowano za pomocą kryteriów diagnostycznych jawnego zespołu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC - z j. ang. disseminated intravascular coagulation) opracowanych w roku 2001 przez International Society on Thrombosis and Haemostasis (Tabela 5, str. 53). Spośród wykonywanych u chorych badań biochemicznych analizowano stężenie glukozy, kreatyniny i bilirubiny w surowicy oraz parametry gazometrii krwi tętniczej. U części chorych przeprowadzono badania obrazujące (m. in. badanie radiologiczne klatki piersiowej), których wynik odnotowywano celem analizy.

Tabela 5. Kryteria laboratoryjne rozpoznawania DIC według ISTH (Fletcher i wsp. 2001)

Oceniane wyniki badań laboratoryjnych	Liczba płytek krwi w 1 μl krwi Stężenie D-dimerów i/lub produktów degradacji fibrynogenu (FDP, z j. ang. – Fibrinogen Degradation Products) Stężenie fibrynogenu w osoczu Czas protrombinowy (PT, z j. ang. – Prothrombin time)
Punktacja	Liczba płytek krwi w 1 μl krwi: $>100 = 0$ punktów, $<100 = 1$ punkt, $<50 = 2$ punkty Stężenie D-dimerów i/lub FDP: w normie = 0 punktów, nieznaczny wzrost = 2 punkty, silny wzrost = 3 punkty Przedłużenie PT: do 3 sekund = 0 punktów, > 3 i < 6 sekund = 1 punkt, > 6 sekund = 2 punkty Stężenie fibrynogenu: > 1 g/l = 0 punktów, $< 1 = 1$ punkt
Kryteria rozpoznania DIC	Suma punktów co najmniej 5 uprawnia do rozpoznania jawnego zespołu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC)

U wszystkich pacjentów przeprowadzono badania mikroskopowe cienkiego rozmazu i grubej kropli krwi obwodowej, z określeniem gatunku zarodźca oraz oceną

parazytemii, wyrażonej jako odsetek zarażonych erytrocytów w co najmniej 500 krwinkach czerwonych. Do analizy użyto wartości parazytemii stwierdzone przed rozpoczęciem terapii przeciwzimmniczej w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych. Ponadto w wybranych przypadkach wykorzystano również wyniki badań metodami molekularnymi (PCR), które umożliwiły postawienie rozpoznania zimnicy bądź identyfikację gatunków *Plasmodium* w zarażeniach mieszanych. U chorych wykonano także pomiar poziomu swoistych przeciwciał przeciwzimmniczych przy użyciu techniki immunofluorescencji pośredniej (Myjak i wsp. 1993).

Zebrano informacje o zastosowanym leczeniu oraz przebiegu choroby w trakcie hospitalizacji aż do wypisu lub zgonu.

Wszystkie te informacje odnotowano w formularzach bazy danych skonstruowanej na potrzeby niniejszej rozprawy przy użyciu programu Open Office (wersja 2.0.1). W oparciu o powyższe dane wyróżniono dwie grupy chorych ze względu na łagodną lub ciężką (powikłaną) postać malarii według najnowszych kryteriów laboratoryjnych i klinicznych Światowej Organizacji Zdrowia z 2000 roku (Trampuz i wsp. 2001). Szczegółową charakterystykę epidemiologiczno-kliniczną pacjentów z przywleczoną zimnicą przedstawia Tabela 10 (str. 70).

4.1.3 Dzieci angolskie z zimnicą oraz grupa kontrolna

4.1.3.1 Dzieci angolskie z zimnicą

Badania objęły dzieci z zimnicą rozpoznaną w Centrum Medycznym im. Św. Łukasza w Kifangondo w Angoli (kierownik: o. Andrzej Fecko SVD) w miesiącach od listopada do grudnia roku 2005 oraz od czerwca 2006 do grudnia 2006. Okres, w którym prowadzono rekrutację pacjentów do badania stanowi koniec pory suchej i początek pory deszczowej w tym rejonie kraju. Do analizy włączono 59 pacjentów, w tym 28 chłopców i 31 dziewcząt, w wieku od 5 miesięcy do 16 lat (średnio 46 miesięcy), diagnozowanych w Poradni Pediatrycznej Centrum (Tabela 12, str. 74). Dzieci z rozpoznaną ambulatoryjnie zimnicą o ciężkim przebiegu hospitalizowane były niezwłocznie w Oddziale Szpitalnym ośrodka (Rycina 8, str. 55). Badaniami objęto wyłącznie chorych w wieku rozwojowym, ze względu na to, że ciężkie postaci zimnicy u dorosłych zamieszkałych w prowincji Cacuaco spotykane były jedynie sporadycznie.

Rozpoznanie malarii u badanych dzieci opierało się na stwierdzeniu obecności form rozwojowych jednego albo więcej gatunków z rodzaju *Plasmodium* w mikroskopowym badaniu grubej kropli bądź cienkiego rozmazu krwi obwodowej

barwionych metodą Giemsy.



Rycina 8. Pacjenci z malarią hospitalizowani w Oddziale Szpitalnym Centrum Medycznego im. Św. Łukasza, w trakcie leczenia (fot. Archiwum Kliniki Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych)

Badania przeprowadzono po uzyskaniu zgody Dyrekcji Centrum Medycznego im. Św. Łukasza. Przed pobraniem materiału (krwi) pacjenci zostali poinformowani o celach i sposobie prowadzenia nieniejszej pracy oraz wyrazili pisemną zgodę.

4.1.3.2 Dzieci angolskie po przebytej zimnicy

Badania powtórzono u 20 spośród powyższych osób, w tym 12 dziewcząt i 8 chłopców, w wieku od 5 miesięcy do 16 lat (średnio 56,9 miesięcy). Materiał do oznaczeń kontrolnych pobrano podczas ambulatoryjnej konsultacji po przebytej malarii, w okresie od jednego do dwóch tygodni (średnio 1,4 tygodnia) po przebytej zimnicy. Taki odstęp czasowy został wyznaczony na podstawie doświadczeń wyniesionych z prac prowadzonych uprzednio w Ośrodku w Kifangondo (Kryger i wsp. 2004). Zaobserwowano wówczas, iż okres do dwóch tygodni charakteryzuje się optymalnym odsetkiem pacjentów zgłaszających się celem wykonania badań kontrolnych, a próby jego wydłużenia powodują znaczny spadek zgłaszalności chorych.

4.1.3.3 Grupa kontrolna – dzieci angolskie

Grupę kontrolną, odpowiadającą grupie chorych pod względem płci i wieku, stanowiło 40 dzieci, w tym 19 dziewcząt i 21 chłopców, w wieku od 5 miesięcy do 9 lat (średnio 52,2 miesiące), zgłaszających się na badania przesiewowe przeprowadzane w Centrum Medycznym im. Św. Łukasza, z zimnicą wykluczoną na podstawie mikroskopowej oceny grubej kropli krwi obwodowej barwionej metodą Giemsy.

4.1.4 Badanie kliniczne oraz badania dodatkowe u dzieci angolskich z zimnicą

U włączonych do analizy dzieci z rozpoznaną malarią zebrano dane z badania podmiotowego i przedmiotowego, które przeprowadzone zostały przeze mnie osobiście podczas konsultacji w Poradni Pediatrycznej bądź w pierwszym dniu hospitalizacji w Centrum według standaryzowanego kwestionariusza opracowanego na potrzeby niniejszej pracy. Wywiad zbierany był od pacjentów lub ich opiekunów w języku portugalskim, u części osób dzięki uprzejmości osoby tłumaczącej, wieloletniego mieszkańca Angoli, o. Edwarda Sito SVD. Dzieci z objawami zimnicy o ciężkim przebiegu niezwłocznie kierowane były do Oddziału Szpitalnego (ordynator: lek. Anna Wojtacha, a następnie lek. Anna Kuna). W niektórych przypadkach, wymagających szczególnie pilnej interwencji, odbywało się to z pominięciem konsultacji w Poradni. Pozostałe dzieci otrzymywały zalecenia odnośnie leczenia oraz wyznaczano termin konsultacji kontrolnej.

Wywiad epidemiologiczny obejmował informacje o wcześniejszych epizodach zimnicy oraz okresie, jaki upłynął od pojawienia się pierwszych objawów choroby do momentu zgłoszenia się do Centrum Medycznego im. Św. Łukasza i ustalenia rozpoznania. Badanie podmiotowe i przedmiotowe obejmowało m. in. ocenę stanu ogólnego pacjenta, pomiar częstości akcji serca oraz temperatury ciała, badanie stanu świadomości pacjentów oraz ocenę odchyień w badaniu ośrodkowego układu nerwowego (objawy oponowe, drgawki obserwowane podczas pobytu w Centrum lub zgłaszane w wywiadzie), ocenę obecności objawów niedokrwistości, jawnych krwawień, żółtaczki i zaburzeń dotyczących układu oddechowego (duszność, patologiczne objawy osłuchowe). Malarię mózgową, w zależności od stopnia rozwoju dziecka, rozpoznawano za pomocą skali śpiączki Glasgow lub Blantyre (BCS – z j. ang. Blantyre Coma Scale) (Tabela 6, str. 57).

Tabela 6. Skala śpiączki Blantyre (BCS)

Czynniki oceniane	Kryteria punktacji
Reakcja ruchowa	2 punkty – pacjent lokalizuje bodźce bólowe, tj. tępy ucisk na okolicę mostka lub łuk brwiowy 1 punkt – reakcja obronna na ból, pacjent wycofuje kończynę w reakcji na ucisk okolicy paznokci 0 punktów - brak reakcji lub reakcja nieadekwatna
Kontakt słowny	2 punkty – płacz w odpowiedzi na bodźce bólowe lub reakcja słowna u starszego dziecka 1 punkt – pojękiwanie lub nietypowy płacz 0 punktów – brak reakcji głosowej na bodźce bólowe
Otwieranie oczu	1 punkt – pacjent otwiera oczy, wodzi wzrokiem np. za twarzą matki lub ojca 2 punkty – brak reakcji

Badania laboratoryjne wykonywano przy użyciu przenośnego analizatora Reflotron Plus, będącego w posiadaniu Centrum. Analizator ten wykorzystuje do oznaczeń metodę fotometrii odbiciowej. Analizowano następujące wyniki badań hematologicznych oraz biochemicznych: poziom hemoglobiny we krwi, stężenie glukozy, kreatyniny, bilirubiny w surowicy oraz w wybranych przypadkach poziom kwasu mlekowego w surowicy. Podobnie jak u pacjentów z przywleczoną malarią, u dzieci angolskich określono gatunek zarodźca malarii oraz dokonano oceny parazytemii. Zebrano także informacje o zastosowanym leczeniu oraz przebiegu choroby w trakcie hospitalizacji aż do wypisu. Nie stwierdzono zgonów w tej grupie chorych.

Wszystkie te informacje odnotowano w formularzach bazy danych, skonstruowanej na potrzeby niniejszej rozprawy przy użyciu programu Open Office (wersja 2.0.1). Na podstawie powyższych danych wyróżniono dwie grupy chorych: z łagodną lub ciężką (powikłaną) postacią malarii według kryteriów Światowej Organizacji Zdrowia z 2000 roku (Tabela 12, str.74).

4.2 Kwalifikacja chorych do poszczególnych stopni ciężkości przebiegu zimnicy

Jak wspomniano już wcześniej, na podstawie intensywności inwazji, obecności oraz charakteru zaburzeń narządowych i metabolicznych, każdego z pacjentów kwalifikowano do grupy chorych o łagodnym lub ciężkim przebiegu zimnicy. Ocenę stopnia ciężkości przebiegu malarii przeprowadzono według kryteriów laboratoryjnych i klinicznych Światowej Organizacji Zdrowia z roku 2000 (WHO 2000).

Ciężką malarię rozpoznawano w przypadku występowania jednego lub więcej z objawów lub zespołów objawów zdefiniowanych powyższych kryteriach (Tabela 7, str. 59), przy jednoczesnym stwierdzeniu obecności bezpłciowych form rozwojowych *Plasmodium* spp. w badaniu mikroskopowym krwi obwodowej, bądź wykazaniu sekwencji jego kwasów nukleinowych we krwi chorego metodą PCR (WHO 2000).

Przy ocenie stopnia niedokrwistości, wartości ciśnienia tętniczego krwi oraz wydolności nerek stosowano kryteria dotyczące odpowiednio dorosłych bądź dzieci, w zależności od wieku pacjenta. Kwasicę metaboliczną u pacjentów Kliniki Chorób Tropikalnych rozpoznawano na podstawie wyniku badania pH krwi tętniczej oraz stężenia HCO_3 w surowicy, natomiast w Angoli w tym celu posługiwano się wynikiem badania stężenia kwasu mlekowego w krwi włośniczkowej, co wynikało z dostępności metod laboratoryjnych w Centrum Medycznym im. Św. Z tego samego powodu zaburzenia krzepnięcia u dzieci angolańskich oceniano wyłącznie na podstawie badania fizykalnego pacjentów. Celem stratyfikacji parazytemii zastosowano kryteria odpowiednie dla osób nieodpornych u pacjentów zimnicą z przywleczoną do Polski (WHO 2000) oraz kryteria przyjęte lokalnie dla dzieci u chorych z Angoli, zgodnie z zaleceniami WHO odnośnie definicji hiperparazytemii w rejonach wysokiej i stabilnej transmisji malarii (Ministério da Saúde 2005).

Tabela 7. Kryteria laboratoryjne i kliniczne zimnicy o ciężkim przebiegu (WHO 2000)

Objawy lub zespoły	Definicja
Malaria mózgową	Śpiączka, której nie można wytłumaczyć inną niż zimnica przyczyną, w przypadku wystąpienia uogólnionych drgawek utrzymująca się co najmniej 30 minut po ustąpieniu napadu. Warunki rozpoznania śpiączki: < 9 punktów w skali GCS u dorosłych (u dzieci < 3 punkty w skali BCS)
Głęboka niedokrwistość	Hematokryt < 20 % lub stężenie hemoglobiny we krwi < 7 g/dl przy parazytemii > 10 000/μl u dorosłych (u dzieci – hematokryt < 15 % lub stężenie hemoglobiny we krwi < 5 g/dl)
Uszkodzenie wątroby	Stężenie bilirubiny w surowicy > 3.0 mg/dl
Ostra niewydolność nerek	Oliguria < 400 ml/24 godziny u dorosłych (u dzieci < 12 ml/kg masy ciała/24 godziny) bez poprawy po nawodnieniu lub poziom kreatyniny w surowicy > 3 mg/dl
Obrzęk płuc lub ostra niewydolność oddechowa	Obrzęk płuc potwierdzony badaniem radiologicznym lub ARDS [†]
Hipoglikemia	Stężenie glukozy w surowicy < 40 mg/dl
Wstrząs	Skurczowe ciśnienie tętnicze krwi < 80 mmHg u osób powyżej 5 roku życia (< 50 mmHg u dzieci w wieku do 5 lat) z objawami wstrząsu
Krwawienie lub DIC	Krwawienie z dziąseł, nosa, układu pokarmowego i/lub DIC potwierdzony laboratoryjnymi badaniami układu krzepnięcia
Drgawki	Więcej niż dwa uogólnione napady drgawkowe w ciągu 24 godzin
Hemoglobinuria	Makroskopowa hemoglobinuria, której nie można wyjaśnić działaniem leków ani niedoborem dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej
Inne zaburzenia świadomości	Zaburzenia świadomości niespełniające kryteriów śpiączki
Skrajne osłabienie	Niezdolność do pozycji siedzącej lub niezdolność do przyjmowania pokarmów u dzieci, które nie wykazują umiejętności siedzenia z racji wieku
Hiperparazytemia	Parazytemia > 5 % lub obecność schizontów <i>P. falciparum</i> we krwi obwodowej u nieodpornych osób dorosłych z przywleczoną zimnicą (> 2% u dzieci angolskich **)
Hipertermia	Głęboka temperatura ciała powyżej 40 °C
Kwasica	pH krwi tętniczej < 7.25 lub stężenie HCO ₃ w surowicy < 15 mmol/l lub poziom kwasu mlekowego w surowicy > 5 mmol/l

[†] ARDS – zespół ostrej niewydolności oddechowej dorosłych, z j. ang. Acute Respiratory Distress Syndrome

** wartość 2 % obrano według zaleceń WHO na podstawie lokalnych standardów diagnostyki zimnicy (Ministério da Saúde 2005)

4.3 Materiały

4.3.1 Surowice pacjentów z Polski

Od pacjentów z przywleczoną zimnicą oraz dorosłych należących do grup kontrolnych, po uzyskaniu zgody od zakwalifikowanych do badań osób, pobierano po 5 ml krwi żyłnej do sterylnej probówki na skrzep. Krew od chorych pobierano jak najszybciej po ustaleniu rozpoznania (do kilku godzin), natomiast materiał od osób zdrowych oraz pacjentów po przebytej malarii pobierano w godzinach porannych. Pobrany krew następnie odwirowywano przez 10 minut przy 4000 *g*. Uzyskaną w ten sposób surowicę natychmiast porcjowano po 140 μ l do 1,5 ml probówek Eppendorfa i przechowywano w temperaturze -70°C do czasu wykonania oznaczeń.

4.3.2 Surowice pacjentów z Angoli

Od zakwalifikowanych do badań pacjentów angolskich oraz osób wchodzących w skład grup kontrolnych, po uzyskaniu zgody rodziców lub opiekunów zakwalifikowanych do badań dzieci, pobierano po 5 ml krwi żyłnej do sterylnej probówki na skrzep.

Krew od chorych pobierano niezwłocznie po ustaleniu rozpoznania, przed włączeniem leczenia przeciwwimniczego, natomiast materiał od osób zdrowych oraz pacjentów po przebytej malarii pobierano w godzinach porannych. Następnie odwirowywano krew przez 10 minut przy 4000 *g*. Uzyskaną w ten sposób surowicę natychmiast porcjowano po 140 μ l do 1,5 ml probówek Eppendorfa. Ze uwagi na możliwości laboratorium Centrum Medycznego im. Św. Łukasza, materiał przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania oznaczeń.

4.3.3 Odczynniki i materiały zużywalne

1. Zestaw do oznaczania TNF metodą immunoenzymatyczną (Human TNF alpha Colorimetric ELISA Kit, Endogen, USA)
2. Zestaw do oznaczania IFN γ metodą immunoenzymatyczną (Human IFN gamma Colorimetric ELISA Kit, Endogen, USA)
3. Zestaw do oznaczania IL-6 metodą immunoenzymatyczną (Human IL-6 Colorimetric ELISA Kit, Endogen, USA)
4. Zestaw do oznaczania IL-10 metodą immunoenzymatyczną (Human IL-10 Colorimetric ELISA Kit, Endogen, USA)

5. Zestaw do oznaczania IL-12 metodą immunoenzymatyczną (Human IL-12 total Colorimetric ELISA Kit, Endogen, USA)
6. Zestaw do oznaczania IL-13 metodą immunoenzymatyczną (Human IL-13 Colorimetric ELISA Kit, Endogen, USA)
7. Zestaw do oznaczania IL-18 metodą immunoenzymatyczną (Human IL-18 ELISA, BenderMedSystems, Austria)
8. Zestaw do oznaczania przeciwciał przeciwko HSP60 metodą immunoenzymatyczną (Hsp60 Anti-Human IgG/A/M ELISA Kit, Stressgen, USA)
9. Zestaw do oznaczania przeciwciał przeciwko HSP70 metodą immunoenzymatyczną (Hsp70 Anti-Human IgG/A/M ELISA Kit, Stressgen, USA)
10. Zestawy do jałowego pobierania krwi na skrzep (Medlab Products, Polska)
11. Probówki typu Eppendorf (Medlab Products, Polska)
12. Płytki 96-dołkowe płaskodenne (Medlab Products, Polska)

4.3.4 Aparatura

1. Czytnik płytek Expert (ASYSHitech, Austria), używany w MIMMIT w Gdyni
2. Czytnik płytek Expert Plus (ASYSHitech, Austria), używany w Centrum Medycznym im. Św. Łukasza w Angoli
3. Wirówka S-8 (Boeckel+Co, Republika Federalna Niemiec)
4. Mikrowirówka Vortex mixer V1 plus (Boeckel+Co, Republika Federalna Niemiec)
5. Automatyczna płuczka mikropłytek Atlantis (ASYSHitech, Austria)
6. Analizator Reflotron Plus (Roche Diagnostics, Szwajcaria), używany w Centrum Medycznym im. Św. Łukasza w Angoli

4.3.5 Programy komputerowe

1. Mikrowin 2000 S.C., 2000 (Mikrotek Laborsysteme, Republika Federalna Niemiec)
2. Open Office wersja 2.0.1, 2005 (Sun Microsystems Inc., USA)
3. Statistica, wersja 8.0, 2007 (StatSoft, USA)
4. Microsoft Excel, wersja 12.0, 2008 (Microsoft Corporation, USA)
5. Analyse-it for Microsoft Excel, wersja 2.11, 2008 (Analyse-it Software Ltd., Wielka Brytania)

4.4 Oznaczanie stężeń cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy krwi

Stężenia badanych cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego oznaczano w surowicy krwi chorych i osób z grupy kontrolnej metodą immunoenzymatyczną (ELISA – z j. ang. *enzyme linked immunosorbent assay*). Celem pomiaru stężeń cytokin wykorzystano dostępne komercyjnie zestawy firm Endogen (obecnie Pierce Biotechnology) oraz BenderMedSystems. Poziom przeciwciała przeciwko białkom szoku termicznego oznaczano za pomocą testów produkowanych przez Stressgen (obecnie Assay design). Użyte zestawy do badań immunoenzymatycznych pozwalały na wykrycie ludzkich cytokin (TNF, IFN γ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18) oraz przeciwciał w klasach IgA, IgM i IgG, skierowanych przeciwko rekombinowanym białkom ludzkim, odpowiednio z rodziny Hsp60 lub Hsp70. Ze względu na pozytywne wcześniejsze doświadczenia oraz wygodną metodykę wykonywania testów, do oznaczania większości cytokin (TNF, IFN γ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-13) wybrano zestawy produkowane przez Endogen, z wyjątkiem zestawu do oznaczania IL-18, który w okresie przeprowadzania badań nie wchodził w skład oferty tego wytwórcy. Stężenia IL-18 oznaczano przy pomocy zestawu wytwarzanego przez BenderMedSystems.

U chorych z przywleczoną zimnicą, pacjentów dorosłych po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej w Polsce przeprowadzono oznaczenia stężeń TNF, IFN γ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18 oraz przeciwciał przeciwko Hsp60 i Hsp70. Oznaczenia TNF, IFN γ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18 oraz przeciwciał przeciwko Hsp60 w materiale pobranym w Centrum Medycznym im. Św. Łukasza w Kifangondo przeprowadzono w Laboratorium tego ośrodka (kierownik: s. Marta Sojka SsPS). U dzieci włączonych tamże do badań oznaczono te same parametry w surowicy krwi, co u pacjentów z Polski, z wyjątkiem przeciwciał przeciwko Hsp70, ze względu na brak możliwości przewiezienia do Angoli stężonego standardu, wymagającego temperatury -20°C podczas transportu.

Wszystkie oznaczenia wykonano według instrukcji do poszczególnych zestawów. Instrukcje oraz szczegółowa dokumentacja udostępnione są w serwisach internetowych producentów (Tabela 8, str. 63).

Tabela 8. Instrukcje wykonywanie testów ELISA dostępne w internecie

Nazwa testu	Producent	Adres internetowy instrukcji
Human TNF alpha Colorimetric ELISA Kit	Endogen	http://www.piercenet.com/files/1337gj4.pdf
Human IFN gamma Colorimetric ELISA Kit	Endogen	http://www.piercenet.com/files/1278sd6.pdf
Human IL-6 Colorimetric ELISA Kit	Endogen	http://www.piercenet.com/files/1350gj4.pdf
Human IL-10 Colorimetric ELISA Kit	Endogen	http://www.piercenet.com/files/1353sd6.pdf
Human IL-12 total Colorimetric ELISA Kit	Endogen	http://www.piercenet.com/files/1357sd6.pdf
Human IL-13 Colorimetric ELISA Kit	Endogen	http://www.piercenet.com/files/1380sd6.pdf
Human IL-18 ELISA	BenderMed Systems	http://www.bendermedsystems.com/bm_products/MAN/267-2CE.pdf
Hsp60 Anti-Human IgG/A/M ELISA Kit	Stressgen	http://www.assaydesigns.com/objects/catalog/product/extras/EKS-650M.pdf
Hsp70 Anti-Human IgG/A/M ELISA Kit	Stressgen	http://www.assaydesigns.com/objects/catalog/product/extras/EKS-750M.pdf

4.4.1 Oznaczanie steżeń TNF, IFN γ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18 w surowicy krwi

Testy przeprowadzono na płytках 96-dołkowych, opłaszczonych monoklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko danej substancji (TNF, IFN γ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-13 lub IL-18). Na płytkę nanoszono w zalecanych ilościach dostarczone przez producenta standardy (wzorce), kontrole oraz surowice badane wraz z odpowiednim buforem do rozcieńczeń, zgodnie z instrukcjami do poszczególnych zestawów. Do wszystkich dołków płytki dodawano po 100 μ l odczynnika zawierającego przeciwciała detekcyjne sprzężone z biotyną. Po inkubacji płytki przez dwie godziny pod szczelnym przykryciem w temperaturze pokojowej (20-25°C) przemywano wszystkie dołki trzy razy buforem do płukania w celu usunięcia nadmiaru przeciwciał detekcyjnych. Płukanie płytki wykonywano przy pomocy automatycznej płuczki.

Calculation Status : Valid Assay

#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	0,069	0,511	2,788	0,160	0,101	0,245	0,083	0,077	0,101	0,085	0,072
B	0,073	0,478	2,788	0,151	0,089	0,251	0,076	0,064	0,060	0,083	0,080
C	0,105	1,086	0,264	0,077	0,105	0,081	0,062	0,069	0,068	0,087	0,069
D	0,108	1,004	0,286	0,077	0,110	0,083	0,068	0,074	0,074	0,095	0,076
E	0,148	0,234	0,259	0,183	0,073	0,166	0,118	0,086	0,125	0,631	0,072
F	0,153	0,239	0,277	0,196	0,082	0,176	0,096	0,090	0,135	0,610	0,077
G	0,270	0,802	2,225	0,147	0,072	0,108	0,062	0,097	0,076	0,088	0,066
H	0,279	0,826	2,263	0,171	0,076	0,106	0,073	0,084	0,075	0,096	0,073

For Help, press F1 Valid Measurement Valid Assay IL10190506_1.dat * IL10r

Rycina 9. Oznaczenia IL-10 w surowicach osób włączonych do badań - odczyt absorbancji prób przedstawiony za pomocą programu Mikrowin 2000 S.C.

W kolejnym etapie badania do wszystkich dołków dodawano streptawidynę sprzężoną z peroksydazą chrzanową (HRP - z j. ang. horseradish peroxidase). Po drugiej, półgodzinnej inkubacji i trzech cyklach przemywania płytki, do dołków nakładano substrat dla peroksydazy chrzanowej (TMB - tetrametylobenzodyna). Następnie płytkę inkubowano bez dostępu światła i po wskazanym przez producenta czasie, wynoszącym 30 minut, zatrzymywano reakcję za pomocą odczynnika blokującego zawierającego 0,16 M kwas siarkowy. Absorbancję barwnego produktu reakcji enzymatycznej mierzono w Polsce przy pomocy czytnika płytek Expert, natomiast w Angoli – Expert Plus, przy długości fali 450nm (Rycina 9, str. 64). Dane przetworzono za pomocą programu Mikrowin 2000 S.C., przy użyciu którego, na podstawie krzywych wzorcowych uzyskano stężenia badanych substancji w próbkach eksperymentalnych. Stężenia poszczególnych parametrów określano w dwóch próbach i wyrażano jako wartość średnią. Wartości stężeń badanych cytokin w surowicy podano w pg/ml. Charakterystyka poszczególnych testów zebrana została w Tabeli Tabela 9 (str. 65).

4.4.2 Oznaczanie stężeń przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy krwi

Wybrane do oznaczenia stężeń przeciwciał przeciwko Hsp60 lub Hsp70 surowice rozcieńczono w dostarczonej przez producenta buforze w stosunku 1:1000 (v/v) przed wykonaniem oznaczeń. Testy przeprowadzono na płytkach 96-dołkowych, opłaszczonych rekombinowanym ludzkim białkiem szoku termicznego, odpowiednio: Hsp60 lub Hsp70.

Tabela 9. Charakterystyka testów ELISA podana przez producenta

Nazwa testu	Producent	Czułość	Zakres krzywej wzorcowej
Human TNF alpha Colorimetric ELISA Kit	Endogen	< 2 pg/ml	15.6-1,000 pg/ml
Human IFN gamma Colorimetric ELISA Kit	Endogen	< 2 pg/ml	25.6-1,000 pg/ml
Human IL-6 Colorimetric ELISA Kit	Endogen	< 1 pg/ml	10.2 - 400 pg/ml
Human IL-10 Colorimetric ELISA Kit	Endogen	< 3 pg/ml	15.4 - 600 pg/ml
Human IL-12 total Colorimetric ELISA Kit	Endogen	< 5 pg/ml	25.6 - 1,000 pg/ml
Human IL-13 Colorimetric ELISA Kit	Endogen	< 7 pg/ml	25.6 - 1,000 pg/ml
Human IL-18 ELISA	BenderMed Systems	9.2 pg/ml	78.1 - 5000 pg/ml
Hsp60 Anti-Human IgG/A/M ELISA Kit	Stressgen	2.88 ng/ml	7.81 - 250 ng/ml
Hsp70 Anti-Human IgG/A/M ELISA Kit	Stressgen	6.79 ng/ml	31.25-1000 ng/ml

Na płytkę nanoszono w zalecanych ilościach dostarczone przez producenta standardy, oraz rozcieńczone surowice badane, zgodnie z instrukcjami do poszczególnych zestawów. Następnie inkubowano płytkę przez dwie godziny pod szczelnym przykryciem, na wytrząsarce w temperaturze pokojowej (20-25°C), po czym przemywano wszystkie dołki 4 razy buforem do płukania. Płukanie płytki wykonywano przy pomocy automatycznej płuczki Atlantis. W kolejnym etapie badania do dołków dodawano poliklonalne przeciwciała przeciwko ludzkim

immunoglobulinom IgA, IgG oraz IgM sprzężone z peroksydazą chrzanową. Po drugiej, godzinnej inkubacji na wytrząsarce, a także 4 cyklach przemywania płytki, do wszystkich dołków nakładano substrat dla peroksydazy chrzanowej (TMB - tetrametylobenzodyna) i ponownie inkubowano płytkę na wytrząsarce. Po wskazanym przez producenta czasie wynoszącym 15 minut zatrzymywano reakcję. Absorbancję barwnego produktu reakcji enzymatycznej mierzono u pacjentów z przywleczoną do Polski zimnicą przy pomocy czytnika płytek Expert, natomiast w Angoli – Expert Plus, przy długości fali 450 nm. Dane opracowano za pomocą programu Mikrowin 2000 S.C., przy użyciu którego, na podstawie krzywych wzorcowych uzyskano stężenia badanych substancji w próbkach eksperymentalnych. Stężenia poszczególnych parametrów określano w dwóch próbach i wyrażano jako wartość średnią. Wartości stężeń badanych przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy podano w ng/ml. Charakterystykę poszczególnych testów przedstawia Tabela 9 (str. 65).

4.5 Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, w której dla poszczególnych zmiennych ciągłych w badanych grupach obliczono średnią arytmetyczną oraz szereg miar skupienia i rozproszenia. Ze względu na niewielką liczebność grup, jako miarę rozproszenia wybrano błąd standardowy średniej (SEM – z j. ang. Standard Error of the Mean) (Watała 2002). Pozostałe parametry przedstawiono w Aneksie do niniejszej pracy (str. 170).

Dokonano analizy rozkładów badanych zmiennych za pomocą oceny histogramów oraz testu Shapiro-Wilka. W przypadku cech o rozkładzie odbiegającym od normalnego dalsze obliczenia przeprowadzono za pomocą testów nieparametrycznych (dotyczyło to m. in. surowiczych stężeń wszystkich oznaczanych cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego u chorych oraz w grupach kontrolnych). W ocenie różnic między dwiema zmiennymi niepowiązanymi zastosowano test t-Studenta dla cech o rozkładzie normalnym, w pozostałych przypadkach posłużono się testem Manna-Whitneya. W analizie różnic między większą ilością grup wykorzystano test Kruskala-Wallisa. Do oceny danych zależnych zastosowano test Wilcoxa. Zależności między dwiema cechami mierzalnymi analizowano przy użyciu współczynnika korelacji Spearmana. Za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0,05$ (Krzych 2007).

W celu określenia przydatności diagnostycznej surowiczych stężeń wybranych cytokin wykreślono dla nich krzywe ROC, z j. ang. - *Receiver Operating*

Characteristic (Watała 2002). Możliwość zastosowania badanych zmiennych do różnicowania przypadków łagodnej i ciężkiej malarii oceniono interpretując otrzymane krzywe, opisujące zależność pomiędzy odsetkami wyników prawdziwie i fałszywie dodatnich. Dla każdego z analizowanych w ten sposób parametrów wyznaczono punkt krytyczny, pozwalający na identyfikację pacjentów z ciężkim przebiegiem inwazji z optymalną czułością i swoistością. Wykorzystując fakt, iż obszar pod krzywą ROC odpowiada zdolności rozdzielczej danej zmiennej, porównano pola powierzchni pod tymi krzywymi w odniesieniu do stężeń cytokin w surowicy oraz innych wskaźników laboratoryjnych (Kochańska-Dziurawicz i wsp. 1999).

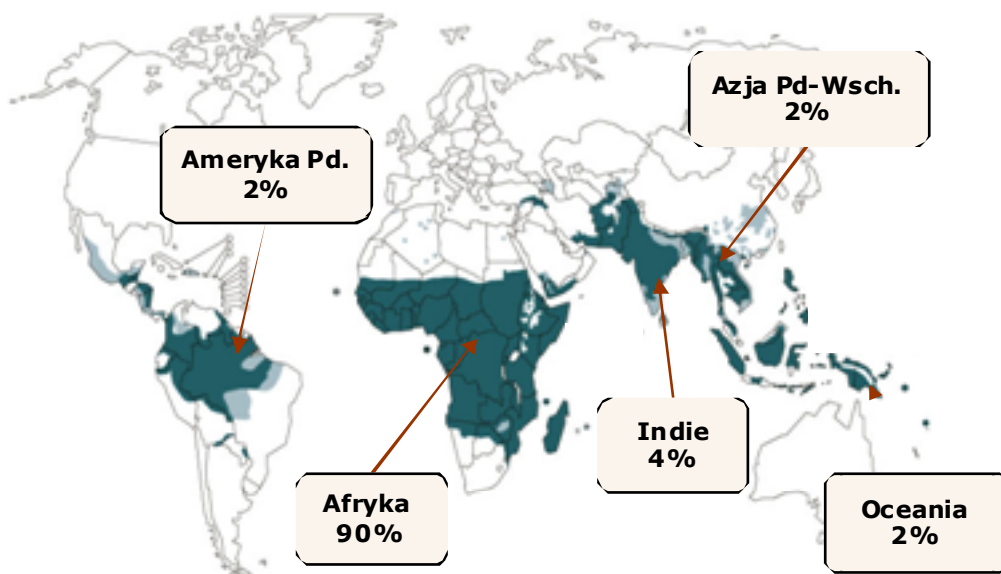
Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programów Statistica (wersja 8.0, StatSoft Inc., 2007, USA) oraz Analyse-it for Microsoft Excel (wersja 2.11, Analyse-it Software Ltd., 2008, Wielka Brytania) pod kierunkiem dr n. med. Tomasza Bandurskiego, Kierownika Zakładu Informatyki Radiologicznej i Statystyki AMG.

5 Wyniki

5.1 Charakterystyka pacjentów

5.1.1 Dorośli z zimnicą przywleczoną do Polski

Do badań zakwalifikowano 94 pacjentów z malarią w wieku powyżej 18 lat, w tym 16 kobiet i 78 mężczyzn. Średnia wieku wszystkich chorych wynosiła 39,7 lat.



Rycina 10. Tereny endemicznego występowania zimnicy na świecie (źródło: WHO, 2008) oraz odsetek pacjentów, u których doszło do zarażenia *Plasmodium* spp. w danym rejonie

W badanej grupie dominowały zarażenia *P. falciparum*, które wykryto u 67% pacjentów. U 22% osób stwierdzono inwazję *P. vivax*, natomiast u 9% rozpoznano zarażenia mieszane. Wśród tych ostatnich odnotowano dwa przypadki malarii o

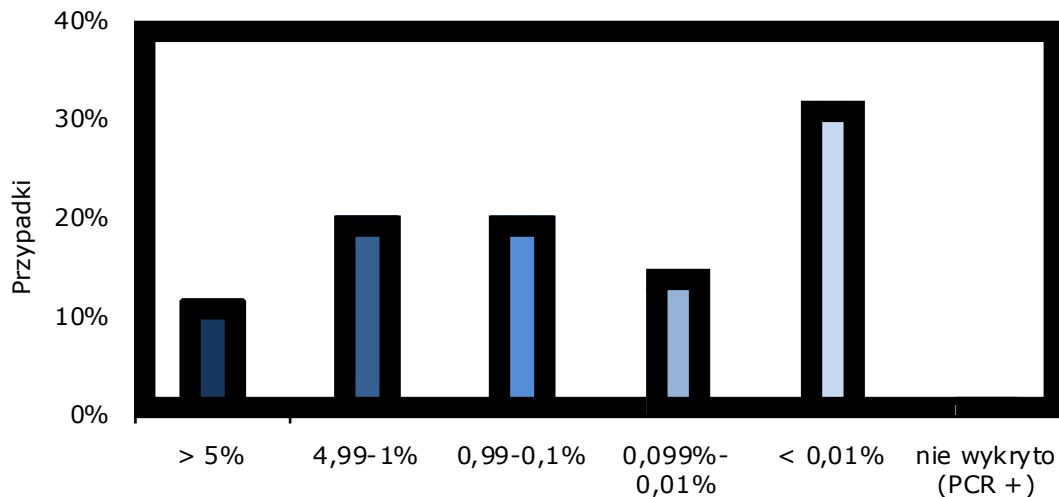
etiologii *P. falciparum* i *P. malariae*, nie obserwowano natomiast w badanej grupie inwazji wyłącznie *P. malariae*. Inwazję *P. ovale* stwierdzono u dwóch osób.

U większości pacjentów zimnicę rozpoznano po powrocie z krajów Afryki Subsaharyjskiej (90% chorych), natomiast u 4% chorych do inwazji doszło podczas pobytu w Indiach. Pozostałe, nieliczne zachorowania dotyczyły pacjentów, którzy w wywiadzie zgłosili podróże do innych rejonów, w tym Ameryki Południowej, Azji Południowo-Wschodniej oraz wysp Oceanii (Rycina 10, str. 68).

Rozpoznanie malarii ustalono u chorych średnio po 5,8 dniach od zaobserwowania przez nich pierwszych objawów choroby, przy czym najkrótszy odnotowany okres w badanej grupie wynosił kilka godzin, najdłuższy zaś – 3 tygodnie.

U 57 osób zimnica została rozpoznana po raz pierwszy w życiu, pozostali chorzy zgłaszali w wywiadzie od jednego do kilkunastu przebytych epizodów malarii, z których jednak większość nie została potwierdzona wynikami badań mikroskopowych lub inną dokumentacją medyczną.

U 31 osób stwierdzono parazytemię niższą od 0,01%. U pozostałych chorych wynosiła ona średnio 2,7% (od 0,01% do 24%). U jednego chorego nie stwierdzono form rozwojowych *Plasmodium* w badaniu mikroskopowym krwi, natomiast rozpoznanie zimnicy o etiologii *P. falciparum* ustalono na podstawie wyniku badania krwi metodą PCR. Zestawienie stopnia parazytemii u pacjentów z przywleczoną zimnicą przedstawia (Rycina 11, str. 69).



Rycina 11. Parazytemia u dorosłych pacjentów z zimnicą przywleczoną do Polski.

U 88 chorych wykonano badania serologiczne przy użyciu odczynu immunofluorescencji pośredniej (Myjak i wsp. 1993). U 13 spośród powyższych pacjentów uzyskano wynik ujemny, u 8 – niskodatni w mianie 1:20 lub 1:40. U

24 chorych stwierdzono obecność tych przeciwciał w mianie 1:80-1:320, a u 43 - w wysokim mianie 1:640 lub więcej.

Na podstawie kryteriów WHO z roku 2000 chorych podzielono na grupy o łagodnym i ciężkim przebiegu zimnicy. Podsumowanie parametrów klinicznych i laboratoryjnych chorych obu grup przedstawia Tabela 10 (str. 70).

Tabela 10. Charakterystyka epidemiologiczno-kliniczna badanej grupy – dorośli z przywleczoną do Polski zimnicą

		Przebieg zimnicy	
		Ciężki	Łagodny
Liczba pacjentów		24	70
Wiek (lata)		38,1 ± 2,0	40,2 ± 1,6
Płeć (kobiety/mężczyźni)		4 / 20	12 / 58
Okres pobytu w tropiku (tygodnie)		20,5 ± 8,1	15,4 ± 6,2
Czas trwania objawów (dni)		4,9 ± 0,8	6,1 ± 2,0
Temperatura ciała (°C)		38,7 ± 0,3	39,0 ± 0,5
Zgony		2	0
Intensywna terapia w KMHIRM		4	0
Badania laboratoryjne	Norma		
Parazytemia (%)	0	5,77 ± 1,2	0,52 ± 0,2
Hemoglobina (g/dl)	12-17	13,1 ± 0,3	13,5 ± 0,3
Hematokryt (%)	35-52	37,5 ± 0,9	39,3 ± 1,0
Płytki krwi (10⁶/l)	140-400	81,5 ± 18,7	115,4 ± 8,4
Stężenie kreatyniny w surowicy (mg/dl)	0,7-1,4	1,7 ± 0,4	1,1 ± 0,1
Stężenie bilirubiny w surowicy (mg/dl)	<1,1	3,0 ± 0,5	1,2 ± 0,1
Stężenie glukozy w surowicy (mg/dl)	70-110	112,9 ± 16,6	98,8 ± 2,5

Wyniki przedstawiają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (± SEM); zaznaczono znamienne statystycznie różnice pomiędzy grupami (p<0,05)

Do grupy chorych o łagodnym przebiegu zimnicy zaliczono 70 osób, w tym 40 pacjentów z rozpoznaną inwazją *P. falciparum*, 20 *P. vivax*, dwóch – *P. ovale* oraz 8 pacjentów z malarią o etiologii mieszanej. U osób z tej grupy malaria przebiegała typowo: z osłabieniem, gorączką, bólami głowy i mięśniowo-stawowymi oraz splenomegalią jako wiodącymi objawami patologicznymi.

Chorzy z tej grupy leczeni byli dożylnymi lub doustnymi preparatami chininy w połączeniu z doksycykliną lub preparatami artemizyny. W przypadku zarażeń *P. vivax* lub *P. ovale* zastosowano także prymachinę celem eradykacji form tkankowych pasożyta odpowiedzialnych za nawroty zimnicy (hipnozoitów wątrobowych). Wszystkie powyższe przypadki zakończyły się całkowitym wyzdrowieniem pacjentów.

Do grupy chorych z ciężką zimnicą zakwalifikowano 24 osoby. U 22 spośród tych pacjentów rozpoznano inwazję wyłącznie *P. falciparum*, natomiast u jednej osoby stwierdzono zimnicę o etiologii mieszanej *P. falciparum* i *P. malariae*. Ponadto u jednego z pacjentów rozpoznano w badaniu mikroskopowym inwazję *P. vivax*.

Do najczęściej obserwowanych postaci zimnicy o ciężkim przebiegu należały zaburzenia ze strony ośrodkowego układu nerwowego pod postacią malarii mózgowej lub zaburzeń świadomości bez śpiączki, które stwierdzono łącznie u 15 osób w tej grupie chorych. Podobnie często rozpoznawano głębokie odchylenia w układzie krzepnięcia. U 14 osób postawiono rozpoznanie zespołu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego na podstawie badań laboratoryjnych, jednak jawne krwawienia wystąpiły tylko u jednego pacjenta. U 9 chorych parazytemia przekraczała 5%, przy czym u jednego spośród nich, w badaniu mikroskopowym krwi obwodowej stwierdzono schizonty *P. falciparum*. Wszystkie wykładniki ciężkiej i powikłanej malarii wraz z częstością ich występowania w badanej grupie przedstawia Tabela 11 (str. 72). Nie stwierdzono żadnego przypadku hipoglikemii i głębokiej niedokrwistości, który spełniałby kryteria WHO (WHO 2000).

Chorzy z tej grupy leczeni byli dożylnymi preparatami chininy w połączeniu z doksycykliną, ponadto u jednej osoby włączono do leczenia meflochinę. W każdym przypadku stosowano także odpowiednią terapię wspomagającą oraz leczenie objawowe. U 4 osób koniecznością było leczenie w warunkach intensywnej terapii w Klinice Medycyny Hiperbarycznej i Ratownictwa Morskiego (kierownik: dr n. med. Zdzisław Sićko)

U badanej grupie wystąpiły dwa zgony: w przebiegu malarii mózgowej oraz powodu niewydolności wielonarządowej. Oba zgony dotyczyły pacjentów z zimnicą o etiologii *P. falciparum*.

Tabela 11. Wykładniki zimnicy o ciężkim przebiegu w grupie dorosłych z przywleczoną do Polski zimnicą	
Wykładniki zimnicy o ciężkim przebiegu	Liczba przypadków * n=24
Zimnica mózgowa (GCS < 9)	3
Zaburzenia świadomości bez śpiączki	12
Niewydolność nerek	4
Hiperbilirubinemia	7
Krwawienie lub DIC (ISTH DIC >4)	14
Wstrząs	3
Obrzek płuc lub ARDS	3
Kwasica	1
Skrajne osłabienie	1
Hipertermia	1
Hiperterparazytemia	9

* u 18 chorych stwierdzono dwa lub więcej z wymienionych zaburzeń

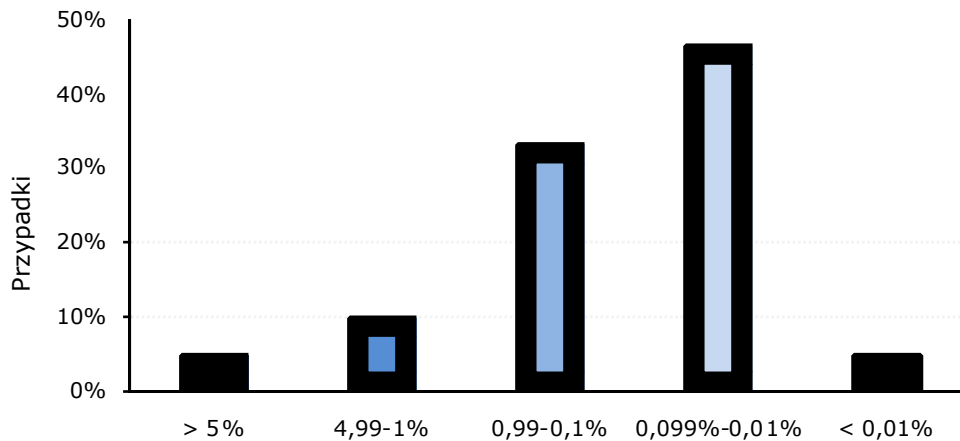
5.1.2 Dzieci angolskie z zimnicą

Do badań zakwalifikowano 59 pacjentów z malarią w wieku 5 miesięcy do 16 lat, w tym 31 dziewczynek i 28 chłopców. Średnia wieku chorych wynosiła 46 miesięcy. Wszyscy pacjenci angolscy włączeni do badań pochodzili z prowincji Caucaco, z terenów wiejskich położonych w promieniu ok. 30 km od Centrum Medycznego im. Św. Łukasza w Kifangondo.

U wszystkich chorych rozpoznano inwazję *P. falciparum*. Nie stwierdzono zarażeń innymi gatunkami zarodźców, ani zimnicy o etiologii mieszanej u żadnego z badanych dzieci.

Według danych podanych przez opiekunów, rozpoznanie malarii ustalono u dzieci średnio po 5,1 dniach od zaobserwowania przez nich pierwszych objawów choroby, przy czym najkrótszy odnotowany okres w badanej grupie wynosił kilka godzin, najdłuższy zaś – 4 tygodnie.

Od 49 osób uzyskano dane, co do wcześniejszych zachorowań na malarię u badanych dzieci. Zgodnie z informacjami podanymi podczas badania podmiotowego, u 18 osób zimnica została rozpoznana po raz pierwszy w życiu. W pozostałych przypadkach (n=31) zgłaszano w wywiadzie od jednego do kilkunastu przebytych przez dzieci objawowych epizodów malarii. Opiekunowie 10 chorych nie umieli podać danych w powyższym zakresie.



Rycina 12. Parazytemia w badanej grupie dzieci angolskich z zimnicą

U trzech osób stwierdzono parazytemię niższą od 0,01%. U pozostałych chorych wynosiła ona średnio 0,85%.

Na podstawie kryteriów WHO z roku 2000, dzieci podzielono na grupy o łagodnym i ciężkim przebiegu zimnicy. Podsumowanie parametrów klinicznych i laboratoryjnych chorych obu grup przedstawia Tabela 12 (str. 74).

Do grupy chorych o łagodnym przebiegu zimnicy zaliczono 44 osoby. Wiodące objawy patologiczne obserwowane przez opiekunów u dzieci z tej grupy to: osłabienie, gorączka, brak apetytu oraz biegunka.

Chorzy z inwazją przebiegającą łagodnie otrzymywali zalecenie ambulatoryjnego leczenia preparatami chlorochiny lub doustnymi preparatami chininy, a od grudnia roku 2005, zgodnie z opublikowanymi wówczas wytycznymi Ministerstwa Zdrowia Angoli – preparatami lumefantryny w połączeniu z artemeterem (Ministério da Saúde, 2005).

Do grupy chorych z ciężką zimnicą zakwalifikowano 15 dzieci angolskich. Do najczęściej obserwowanych postaci zimnicy o ciężkim przebiegu u tych osób należały zaburzenia ze strony ośrodkowego układu nerwowego pod postacią malarii mózkowej lub zaburzeń świadomości bez śpiączki, które stwierdzono łącznie u 6 chorych. U jednego z pacjentów obserwowano z kolei powtarzające się napady drgawkowe.

U 5 dzieci rozpoznano głęboką niedokrwistość. Średnie stężenie hemoglobiny we krwi tych pacjentów wynosiło 4,8 mg/dl. Ponadto u 4 pacjentów rozpoznano hipoglikemię, a u 6 chorych parazytemia przekraczała dwa procent. Nie stwierdzono żadnego przypadku ostrej niewydolności nerek, ani jawnych klinicznie zaburzeń krzepnięcia krwi w badanej grupie.

Tabela 12. Charakterystyka epidemiologiczno-kliniczna badanej grupy dzieci angolskich z zimnicą

		Przebieg zimnicy	
		Ciężki	Łagodny
Liczba pacjentów		15	44
Wiek (miesiące)		41,9 ± 9,1	47,6 ± 8,3
Płeć (kobiety/mężczyźni)		8 / 7	23 / 21
Czas trwania objawów (dni)		4,1 ± 0,8	5,3 ± 1,2
Temperatura ciała (°C)		38,5 ± 0,9	37,6 ± 0,4
Zgony		0**	0
Badania laboratoryjne	Norma		
Parazytemia		2,98 ± 1,05	0,1 ± 0,03
Hemoglobina (g/dl)	10,5 - 14	8,0 ± 0,8	10,5 ± 0,2
Stężenie kreatyniny w surowicy (mg/dl) *	<1,1	0,52 ± 0,01	0,51 ± 0,01
Stężenie bilirubiny w surowicy (mg/dl) *	<1,0	1,9 ± 0,4	1,0 ± 0,1
Stężenie glukozy w surowicy (mg/dl)	70-105	70,6 ± 8,5	93,7 ± 5,5
Stężenie kwasu mlekowego we krwi włośniczkowej (mmol/l)		3,5 ± 0,7	3,4 ± 0,4

Wyniki przedstawiają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej ± SEM; zaznaczono znamienne statystycznie różnice pomiędzy grupami ($p < 0,05$)

* normy podano zgodnie z instrukcją producenta analizatora Reflotron Plus

** jeden z pacjentów został wypisany na żądanie opiekunów przed ukończeniem diagnostyki i terapii w Oddziale Szpitalnym Centrum Zdrowia im. Św. Łukasza, jego losy pozostają nieznane

Wszystkie wykładniki ciężkiej i powikłanej malarii wraz z częstością ich występowania w badanej grupie przedstawia Tabela 13 (str. 75).

Chorzy z ciężkim przebiegiem zimnicy leczeni byli dożylnymi, a następnie doustnymi preparatami chininy. W każdym przypadku stosowano także odpowiednią terapię wspomagającą oraz leczenie objawowe.

W badanej grupie nie odnotowano zgonów, natomiast jedno z dzieci nie ukończyło diagnostyki i terapii w Oddziale Szpitalnym Centrum Zdrowia im. Św. Łukasza z powodu decyzji rodziców o przeniesieniu dziecka do szpitala w Luandzie, stolicy kraju. Z tego powodu nie udało się uzyskać danych, co do przeżycia lub wyzdrowienia tego pacjenta.

Tabela 13. Wykładniki zimnicy o ciężkim przebiegu w grupie dzieci angolskich z zimnicą według kryteriów WHO z roku 2000

Wykładniki zimnicy o ciężkim przebiegu	Liczba przypadków * n=15
Zimnica mózgowa (BCS <3)	1
Zaburzenia świadomości bez śpiączki	5
Głęboka niedokrwistość	5
Hipoglikemia	4
Hiperbilirubinemia	3
Ostra niewydolność oddechowa	3
Kwasica	2
Drgawki	1
Hipererparazytemia	6

* u 6 chorych stwierdzono dwa lub więcej z wymienionych zaburzeń

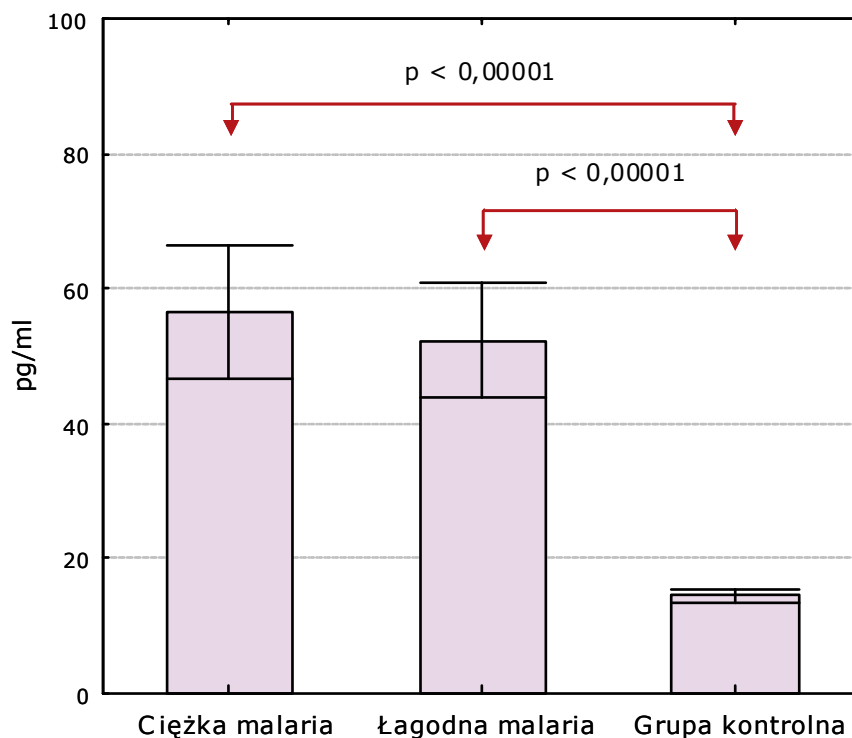
5.2 Stężenia cytokin w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski

5.2.1 Stężenia cytokin w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski o łagodnym i ciężkim przebiegu oraz w grupie kontrolnej

Czynnik martwicy nowotworów

Stężenie TNF w surowicy krwi pacjentów z ciężką zimnicą wynosiło średnio 56,41 pg/ml, natomiast w surowicy chorych z łagodnym przebiegiem inwazji – 52,26 pg/ml (Rycina 13, str. 76). Obie te wartości były znamienne statystycznie wyższe niż średnie stężenie TNF w surowicy osób z grupy kontrolnej, w której wynosiło ono 14,41 pg/ml ($p < 0,00001$).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomych stężeniach TNF w surowicy pacjentów z malarią o ciężkim i łagodnym przebiegu.

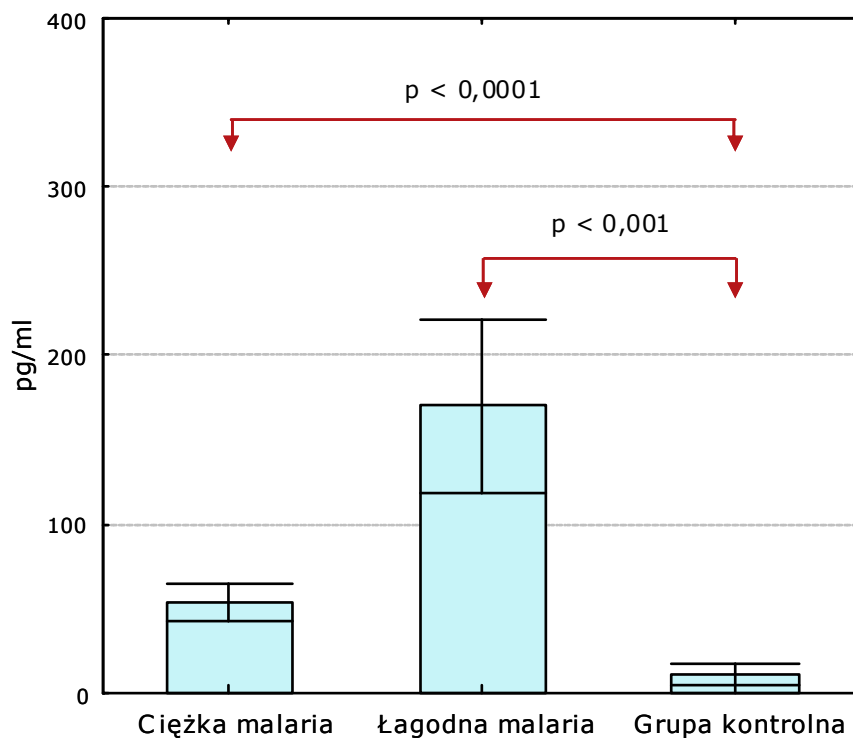


Rycina 13. Stężenie TNF w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Interferon γ

Stężenie IFN γ w surowicy krwi chorych z ciężką zimnicą wynosiło średnio 53,24 pg/ml, natomiast w surowicy chorych z łagodnym przebiegiem inwazji – 169,95 pg/ml. Obie te wartości były istotnie statystycznie wyższe niż średnie stężenie IFN γ w surowicy osób z grupy kontrolnej, w której wynosiło ono 10,71 pg/ml (odpowiednio $p < 0,0001$, $p < 0,001$).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomach stężeń IFN γ w surowicy pacjentów z malarią o ciężkim i łagodnym przebiegu, pomimo iż u chorych z łagodną inwazją średni surowiczy poziom tej cytokiny był ponad trzykrotnie wyższy niż wartość uzyskana u osób z zimnicą ciężko przebiegającą (Rycina 14, str. 77).



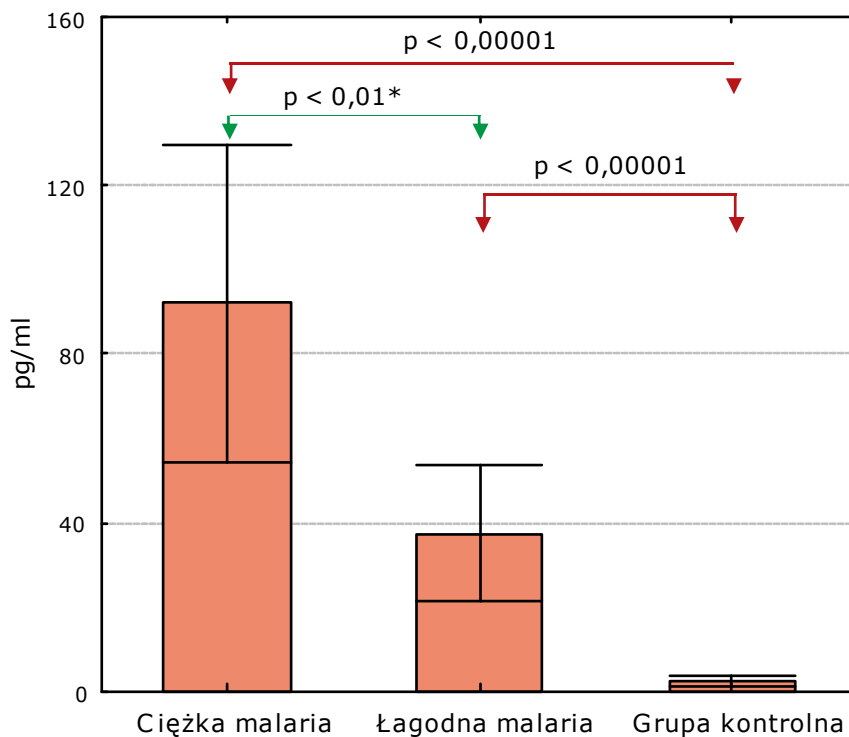
Rycina 14. Stężenie IFN γ w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej.

Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Interleukina 6

Stężenie IL-6 w surowicy krwi pacjentów z ciężką zimnicą wynosiło średnio 92,17 pg/ml, natomiast w surowicy chorych z łagodnym przebiegiem inwazji – 37,39 pg/ml (Rycina 15, str. 78). Obie te wartości były znamienne statystycznie wyższe niż średnie stężenie IL-6 w surowicy osób z grupy kontrolnej, w której wynosiło ono 2,14 pg/ml ($p < 0,00001$).

Ponadto średnie stężenie IL-6 było znamienne statystycznie wyższe w surowicy pacjentów z ciężką zimnicą niż w grupie pacjentów z łagodną malarią ($p < 0,01$ w teście Manna Whitneya).



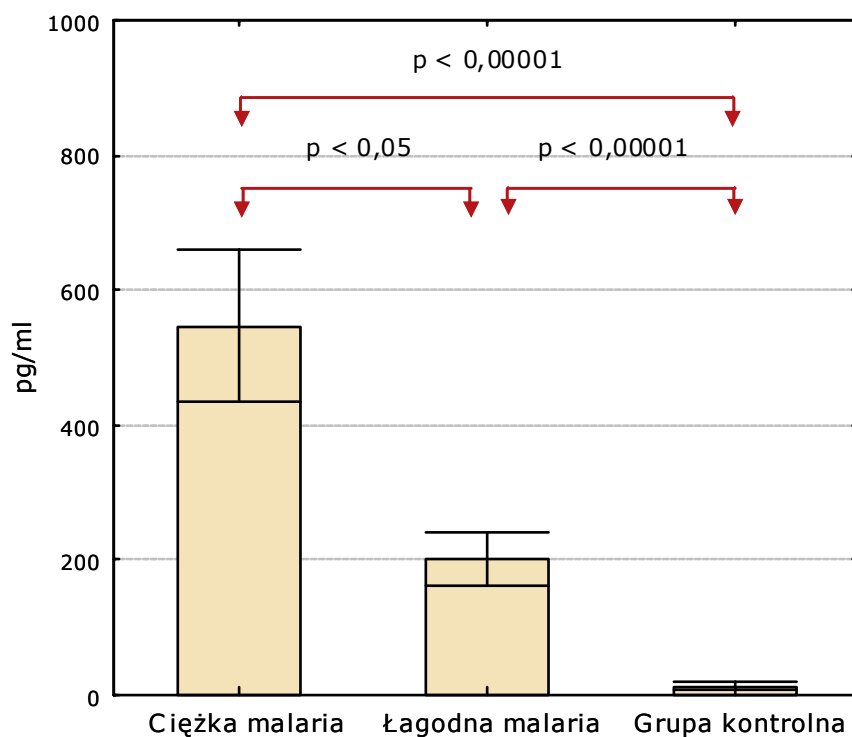
Rycina 15. Stężenie IL-6 w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

* różnica istotna statystycznie w teście Manna Whitneya

Interleukina 10

Stężenie IL-10 w surowicy krwi chorych z ciężką zimnicą wynosiło średnio 546,84 pg/ml, natomiast w surowicy chorych z łagodnym przebiegiem inwazji - 201,75 pg/ml (Rycina 16, str. 79). Obie te wartości były znamienne statystycznie wyższe niż średnie stężenie IL-10 w surowicy osób z grupy kontrolnej, wynoszące 12,77 pg/ml ($p < 0,00001$).

Ponadto średnie stężenie IL-10 w surowicy pacjentów z ciężką zimnicą było istotnie wyższe w grupie pacjentów z łagodną malarią ($p < 0,05$).



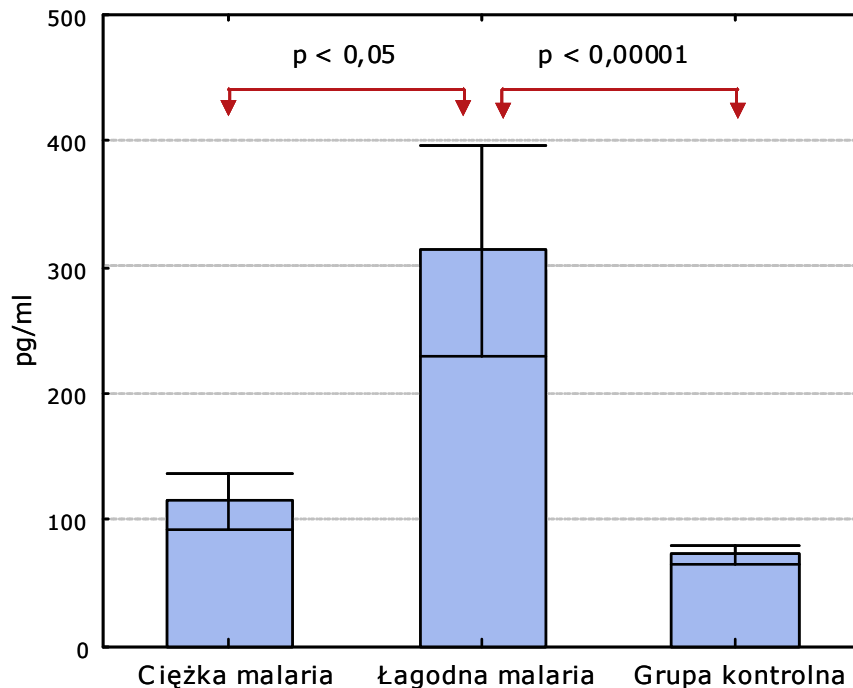
Rycina 16. Stężenie IL-10 w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Interleukina 12

Średnie stężenie IL-12 w surowicy pacjentów z łagodnym przebiegiem malarii wynosiło 313,83 pg/ml i było znamienne statystycznie wyższe niż średnie stężenie IL-12 w surowicy osób z grupy kontrolnej (72,92 pg/ml, $p < 0,00001$) oraz chorych z

ciężkim przebiegiem inwazji (115,21, $p < 0,05$)

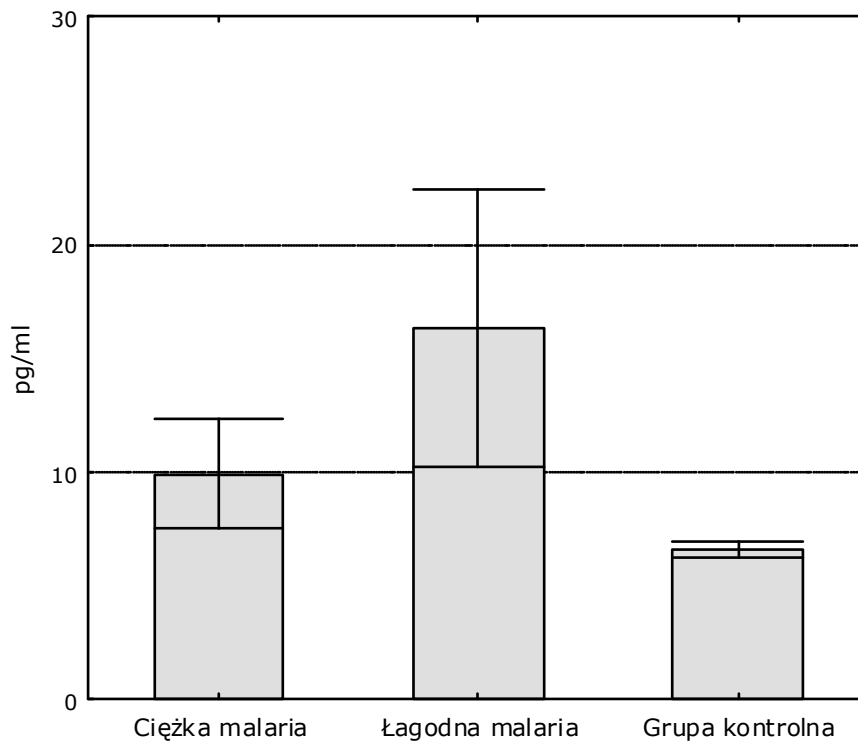
Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomach stężeń tej interleukiny w surowicy pacjentów z malarią o ciężkim przebiegu i osób z grupy kontrolnej (Rycina 17, str. 80).



Rycina 17. Stężenie IL-12 w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Interleukina 13

Stężenie IL-13 w surowicy krwi chorych z ciężką zimnicą wynosiło średnio 9,88 pg/ml, natomiast u chorych z łagodnym przebiegiem inwazji - 16,33 pg/ml. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomach stężeń tej interleukiny w surowicy krwi chorych o obu stopniach ciężkości przebiegu zimnicy, a grupą kontrolną, w której średnie stężenie IL-13 wynosiło 6,55 pg/ml (Rycina 18, str. 81). Nie zaobserwowano również istotnych statystycznie różnic w surowiczych poziomach stężeń tej interleukiny u pacjentów z malarią o ciężkim i łagodnym przebiegu.

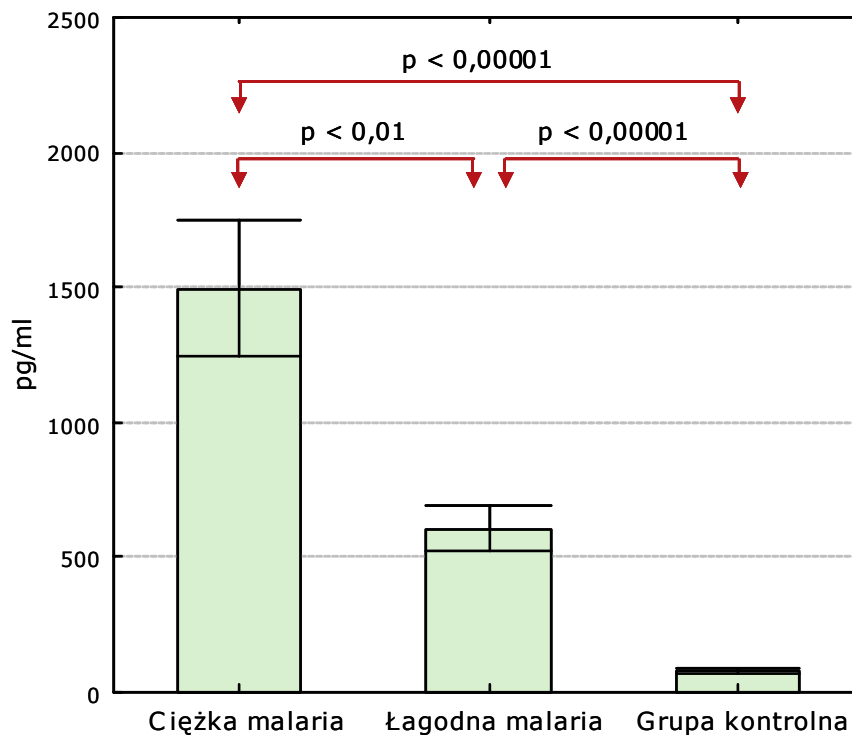


Rycina 18. Stężenie IL-13 w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM)

Interleukina 18

Stężenie IL-18 w surowicy krwi chorych z ciężką zimnicą wynosiło średnio 1493,03 pg/ml, natomiast w surowicy chorych z łagodnym przebiegiem inwazji – 602,85 pg/ml (Rycina 19, str. 82). Obie te wartości były istotnie statystycznie wyższe niż średnie stężenie IL-18 w surowicy osób z grupy kontrolnej, u których wynosiło ono 80,51 pg/ml ($p < 0,00001$).

Ponadto średnie, surowicze stężenie IL-18 było znamienne statystycznie wyższe u pacjentów z ciężką zimnicą niż w grupie pacjentów z łagodną malarią ($p < 0,01$).



Rycina 19. Stężenie IL-18 w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

5.2.2 Zależności pomiędzy stężeniem cytokin w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski, a etiologią malarii oraz parazytemią

Nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic w średnich poziomach stężeń TNF, IFN γ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-13 oraz IL-18 w surowicy u pacjentów podzielonych na grupy według etiologii malarii, tj. pomiędzy chorymi zarażonymi *P. falciparum*, *P. vivax* oraz osobami z inwazją mieszaną (więcej niż jednym gatunkiem zarodźca malarii).

Wykazano natomiast istotną statystycznie korelację pomiędzy parazytemią, a surowiczym stężeniem IFN γ ($p < 0,05$, $R = 0,28$), IL-6 ($p < 0,001$, $R = 0,45$), IL-10 ($p < 0,01$, $R = 0,34$) oraz IL-18 ($p < 0,01$, $R = 0,34$) u chorych zarażonych *Plasmodium* spp.

5.2.3 Zależności pomiędzy stężeniem cytokin w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski, a wcześniejszą ekspozycją na inwazję *Plasmodium* spp. i wiekiem chorych

U dorosłych z pierwszą w życiu inwazją *Plasmodium* spp., średnie stężenie TNF, IFN γ oraz IL-13 było znamienne statystycznie wyższe niż w grupie chorych, którzy podawali w wywiadzie uprzednio przebyte epizody malarii ($p < 0,05$). Nie stwierdzono podobnych zależności w odniesieniu do pozostałych badanych cytokin (Tabela 14, str. 83).

Tabela 14. Stężenia badanych cytokin u dorosłych z przywleczoną z zimnicą w zależności od uprzednio przebytych epizodów malarii.

Cytokina	Chorzy z pierwszą w życiu zimnicą n=56	Chorzy z przebyłym epizodem lub epizodami zimnicy w wywiadzie n=38
TNF (pg/ml) *	59,93 \pm 8,36	43,14 \pm 11,43
IFN γ (pg/ml)**	220,75 \pm 61,08	15,98 \pm 3,70
IL-6 (pg/ml)	59,31 \pm 19,34	39,16 \pm 25,67
IL-10 (pg/ml)	361,23 \pm 67,74	179,90 \pm 37,64
IL-12 (pg/ml)	295,53 \pm 27,38	213,18 \pm 88,18
IL-13 (pg/ml)*	18,79 \pm 7,41	8,36 \pm 1,68
IL-18 (pg/ml)	831,14 \pm 126,88	828,57 \pm 158,27

Wyniki przedstawiają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej \pm SEM; zaznaczono znamienne statystycznie różnice pomiędzy grupami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$)

Nie obserwowano natomiast istotnych korelacji pomiędzy wiekiem chorych z przywleczoną zimnicą, a surowiczym stężeniem badanych cząsteczek.

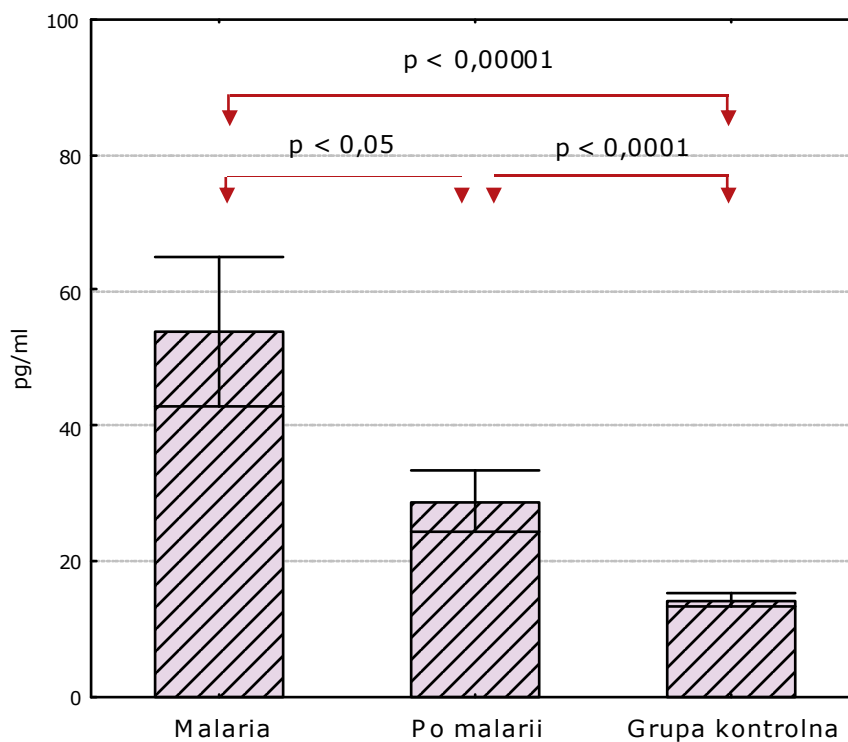
5.2.4 Stężenia cytokin w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski przed leczeniem oraz po przebytej chorobie

U 44 pacjentów, którzy zgłosili się celem wykonania badań kontrolnych po przebytej zimnicy oznaczono stężenia tych spośród badanych cytokin, których poziom istotnie

różnił się u chorych z malarią przed leczeniem w porównaniu do grupy kontrolnej (n=47) złożonej z osób zdrowych. Dotyczyło to następujących cytokin: TNF, IFN γ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-18.

Czynnik martwicy nowotworów

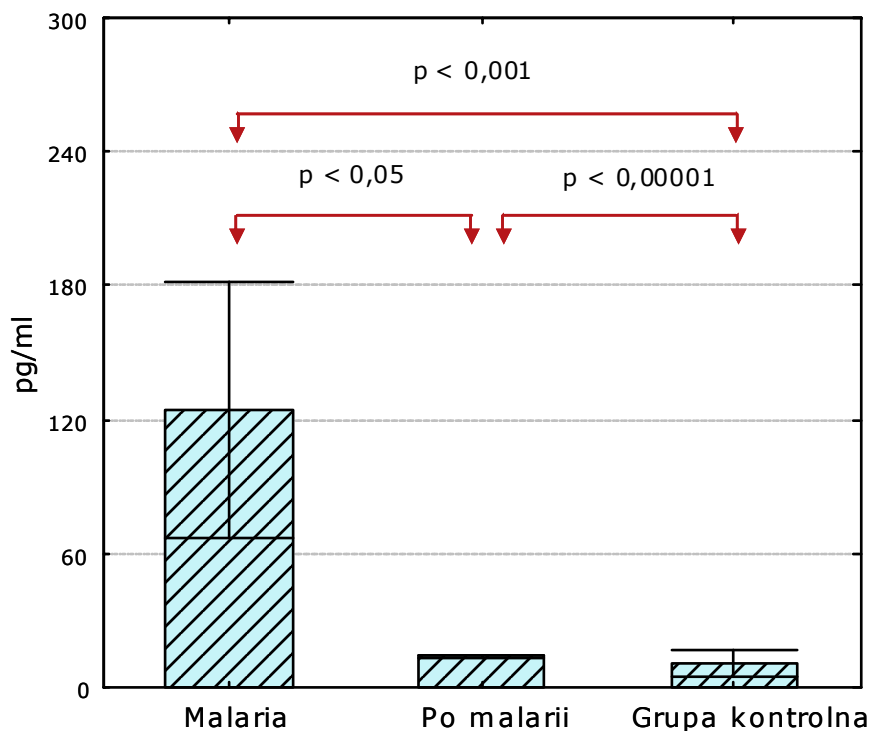
Średnie stężenie TNF w surowicy krwi pacjentów hospitalizowanych po przebytej malarii wynosiło 28,89 pg/ml (Rycina 20, str. 84). Uległo ono istotnemu obniżeniu w porównaniu do średniego stężenia TNF w surowicy tych samych osób przed leczeniem, u których wynosiło ono 54,09 pg/ml ($p < 0,01$). Nadal jednak pozostawało znamienne statystycznie wyższe niż średnie stężenie TNF w surowicy osób z grupy kontrolnej wynoszące 14,41 pg/ml ($p < 0,0001$).



Rycina 20. Stężenie TNF w surowicy krwi dorosłych z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Interferon γ

Średnie stężenie IFN γ w surowicy krwi pacjentów hospitalizowanych po przebytej malarii istotnie zmniejszyło się w porównaniu do średniego stężenia IFN γ w surowicy tych samych osób przed leczeniem (odpowiednio 14,17 pg/ml i 124,19 pg/ml, $p < 0,05$), wciąż jednak pozostawało ono znamienne statystycznie wyższe niż średnie stężenie IFN γ w surowicy osób z grupy kontrolnej ($p < 0,00001$), u których wynosiło ono 10,71 pg/ml (Rycina 21, str. 85).

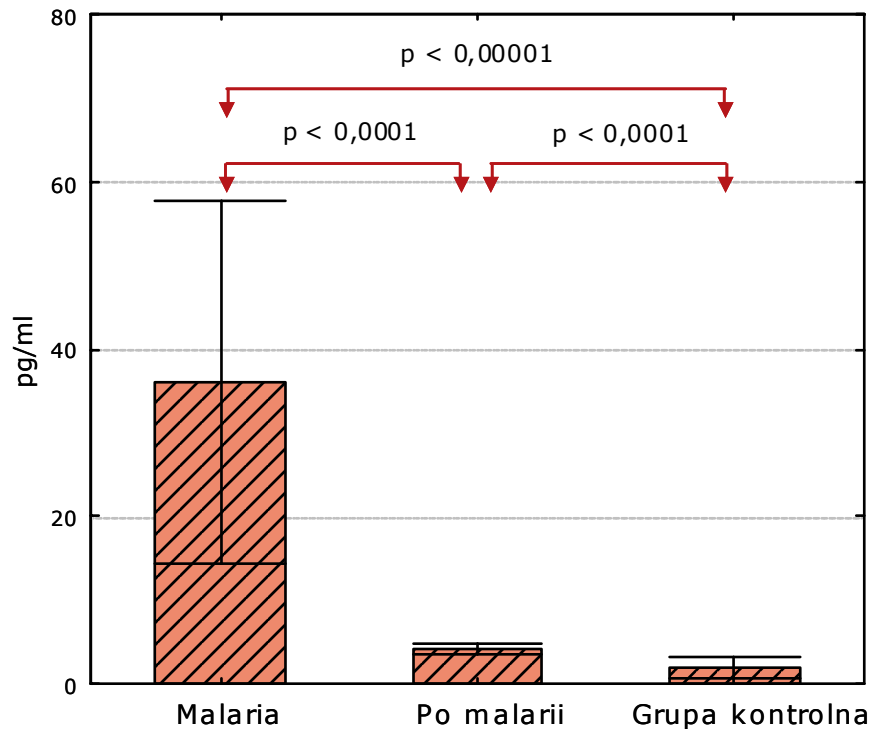


Rycina 21. Stężenie IFN γ w surowicy krwi dorosłych z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Interleukina 6

Średnie stężenie IL-6 w surowicy krwi pacjentów hospitalizowanych po przebytej malarii wynosiło 4,1 pg/ml i uległo istotnemu obniżeniu w porównaniu do średniego stężenia IL-6 w surowicy tych samych osób przed leczeniem wynoszącego 35,9 pg/ml ($p < 0,0001$). Nadal jednak pozostawało ono znamienne statystycznie wyższe

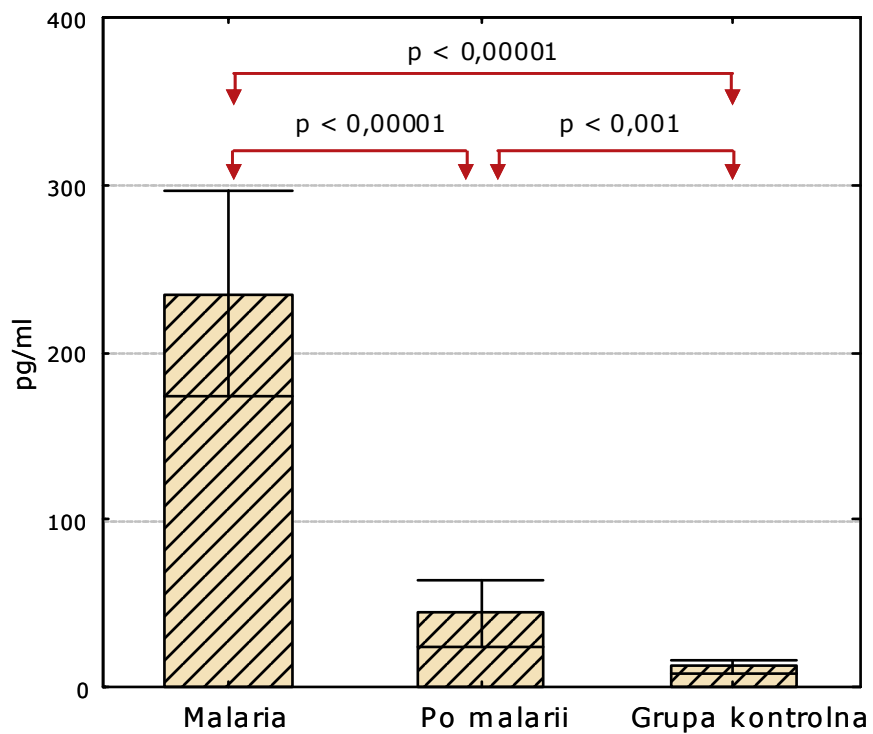
niż średnie stężenie IL-6 w surowicy osób z grupy kontrolnej ($p < 0,0001$), które wynosiło 2,13 pg/ml (Rycina 22, str. 86).



Rycina 22. Stężenie IL-6 w surowicy krwi dorosłych z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Interleukina 10

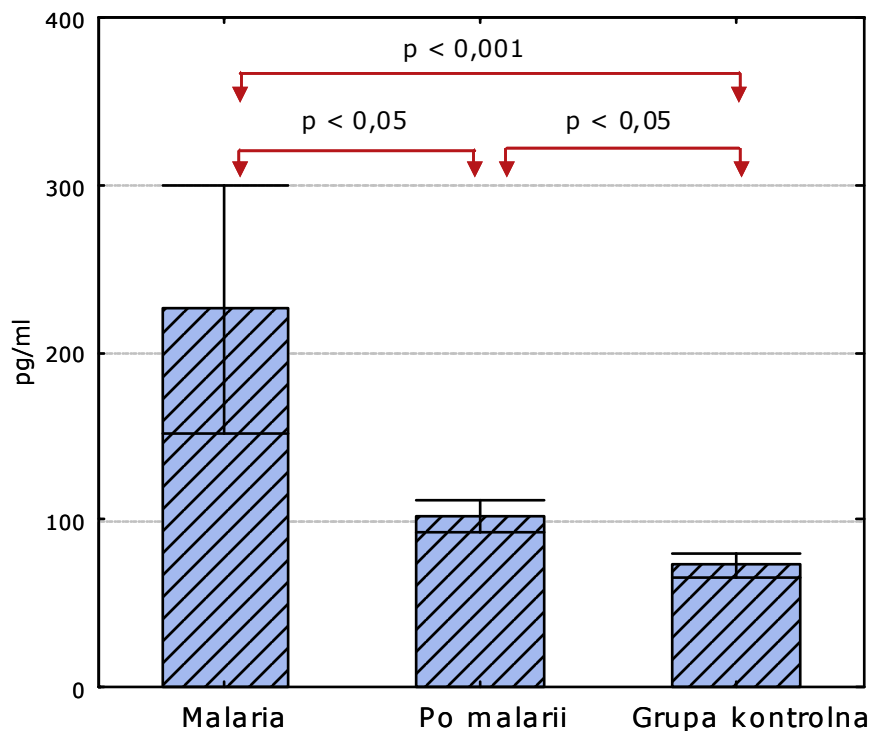
Średnie stężenie IL-10 w surowicy krwi pacjentów hospitalizowanych po przebytej malarii istotnie zmniejszyło się w porównaniu do średniego stężenia IL-10 w surowicy tych samych osób przed leczeniem (odpowiednio 44,28 pg/ml i 234,93 pg/ml, $p < 0,00001$), wciąż jednak pozostawało znamienne statystycznie wyższe niż średnie stężenie IL-10 w surowicy osób z grupy kontrolnej ($p < 0,001$), u których wynosiło ono 12,76 pg/ml (Rycina 23, str. 87).



Rycina 23. Stężenie IL-10 w surowicy krwi dorosłych z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Interleukina 12

Średnie stężenie IL-12 w surowicy krwi pacjentów hospitalizowanych po przebytej malarii wynosiło 102,08 pg/ml i uległo istotnemu obniżeniu ($p < 0,05$) w porównaniu do średniego stężenia IL-12 w surowicy tych samych osób przed leczeniem (225,82 pg/ml). Nadal jednak pozostawało ono znamienne statystycznie wyższe niż średnie stężenie IL-12 w surowicy osób z grupy kontrolnej ($p < 0,05$), które wynosiło 72,92 pg/ml (Rycina 24, str. 88).

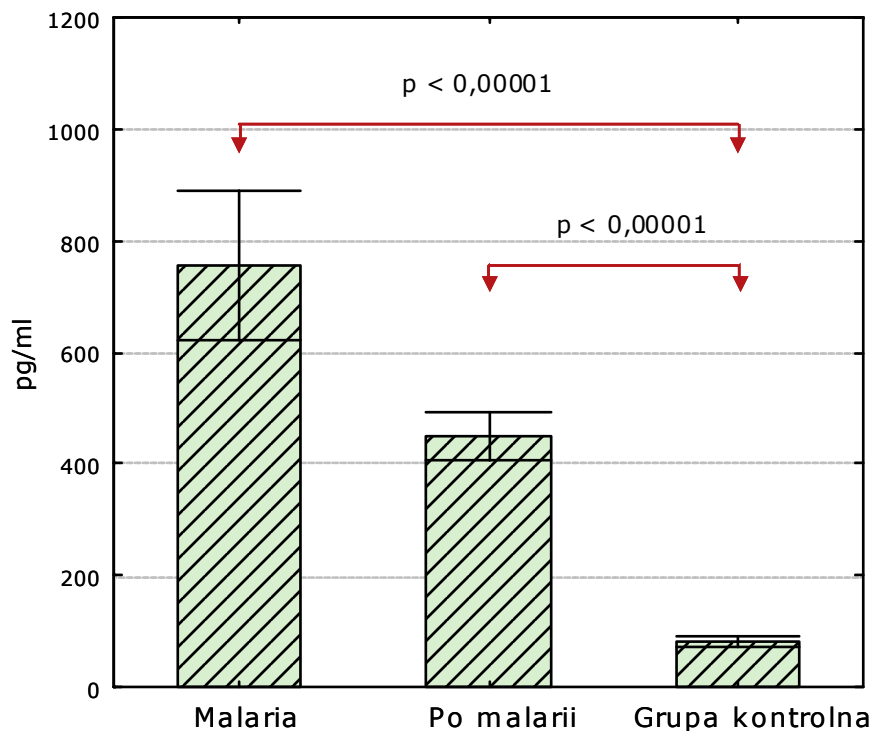


Rycina 24. Stężenie IL-12 w surowicy krwi dorosłych z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Interleukina 18

Średnie stężenie IL-18 w surowicy krwi pacjentów hospitalizowanych po przebytej malarii wynosiło 450,67 pg/ml i było istotnie statystycznie wyższe niż średnie stężenie IL-18 w surowicy osób z grupy kontrolnej, wynoszące 80,51 pg/ml ($p < 0,00001$).

Średni poziom IL-18 w surowicy krwi pacjentów hospitalizowanych po ustąpieniu objawów zimnicy był niższy w porównaniu do stężenia IL-18 w surowicy tych samych osób przed leczeniem (755,74 pg/ml), jednak różnica ta nie wykazywała istotności statystycznej (Rycina 25, str. 89).



Rycina 25. Stężenie IL-18 w surowicy krwi dorosłych z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice statystycznie

5.2.5 Przydatność oznaczania surowiczych stężeń wybranych cytokin w rozróżnianiu przypadków malarii o łagodnym i ciężkim przebiegu u dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski

Do analizy przydatności diagnostycznej oznaczania stężeń cytokin w ocenie ciężkości przebiegu zimnicy wybrano te cząsteczki, których średnie surowicze stężenia różniły się istotnie w grupach pacjentów z łagodnie i ciężko przebiegającą malarią, czyli IL-6, IL-10, IL-12 oraz IL-18. Przy użyciu metody krzywych ROC oceniono zdolność dyskryminacyjną do różnicowania powyższych dwóch grup chorych dla każdego z tych parametrów.

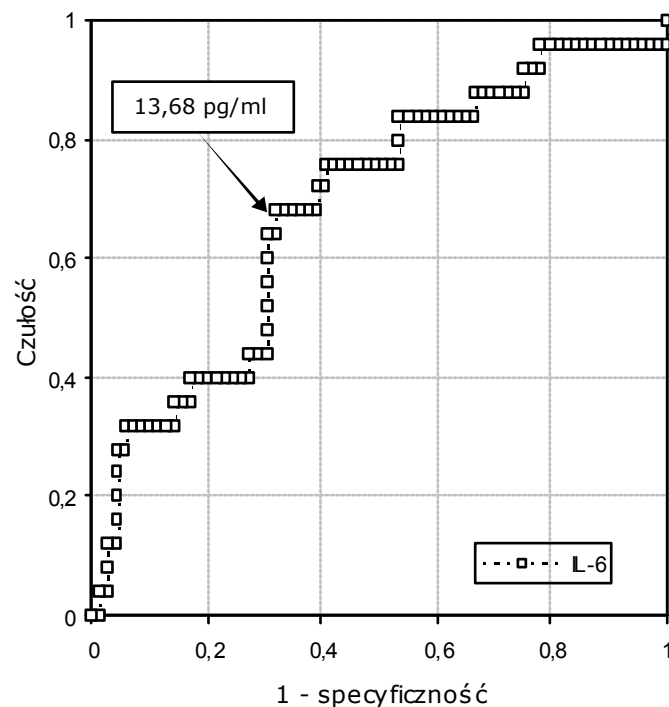
Ponadto na podstawie wykreślonych krzywych, wyznaczono dla każdej z wybranych interleukin punkt odcięcia, różnicujący przypadki łagodnej i ciężkiej zimnicy z optymalną czułością i specyficnością. Celem wyłonienia najbardziej przydatnego wskaźnika diagnostycznego obliczono pola powierzchni pod krzywymi

ROC dla każdej z tych cząsteczek oraz porównano je z wartościami pól uzyskanymi dla wyników parazytemii i innych badań laboratoryjnych, stosowanych u chorych z malarią.

Interleukina 6

Udowodniono znaczącą statystycznie zdolność dyskryminacyjną surowiczego stężenia IL-6 w zakresie odróżniania chorych z zimnicą o łagodnym i ciężkim przebiegu ($p < 0,01$). Pole powierzchni pod krzywą ROC wykreśloną dla tej interleukiny wynosiło 0,68 (Rycina 26, str. 90).

Stężenie IL-6 w surowicy optymalnie różnicujące przypadki łagodnej i ciężkiej malarii wyniosło 13,68 pg/ml. Czulość testu uzyskana dla tego punktu odcięcia wynosiła 64%, natomiast specyficzność – 69,6% (Tabela 15, str. 91).



Rycina 26. Krzywa ROC dla surowiczego stężenia IL-6 u dorosłych z przywleczoną zimnicą

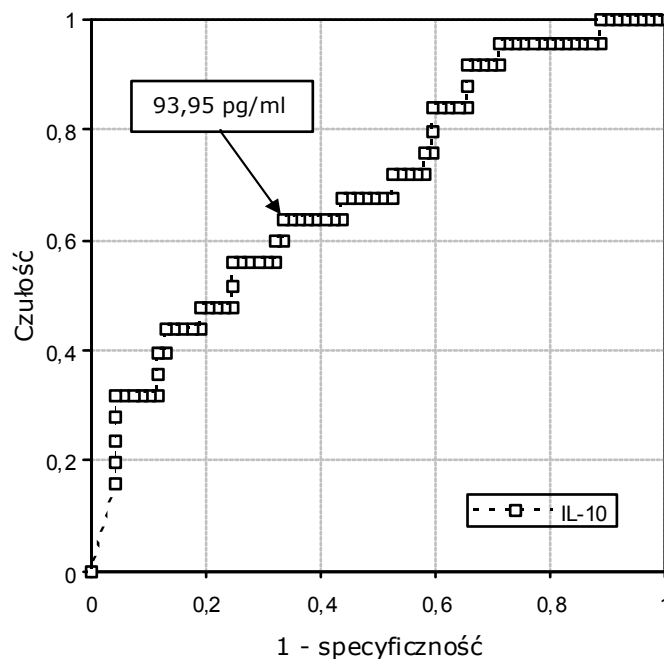
Tabela 15. Parametry krzywej ROC dla IL-6 u dorosłych z przywleczoną zimnicą.

Pole powierzchni pod krzywą ROC	Punkt krytyczny umożliwiający różnicowanie przypadków zimnicy o ciężkim i łagodnym przebiegu	Czułość dla punktu krytycznego	Specyficzność dla punktu krytycznego
0,68	13,68 pg/ml	64%	69,6%

Interleukina 10

Wykazano istotną statystycznie zdolność dyskryminacyjną stężenia IL-10 w surowicy w zakresie różnicowania przypadków łagodnej i ciężkiej zimnicy ($p < 0,01$). Pole powierzchni pod krzywą ROC wykreśloną dla tej interleukiny wynosiło 0,70 (Rycina 27, str. 91).

Punkt krytyczny dla surowiczego stężenia IL-10, pozwalający na optymalne rozróżnienie przypadków malarii o łagodnym i ciężkim przebiegu, wynosił 93,95 pg/ml. Czułość tej metody dla uzyskanej wartości określono na 64%, a specyficzność na 66,7% (Tabela 16, str. 92)



Rycina 27. Krzywa ROC dla surowiczego stężenia IL-10 u dorosłych z przywleczoną zimnicą

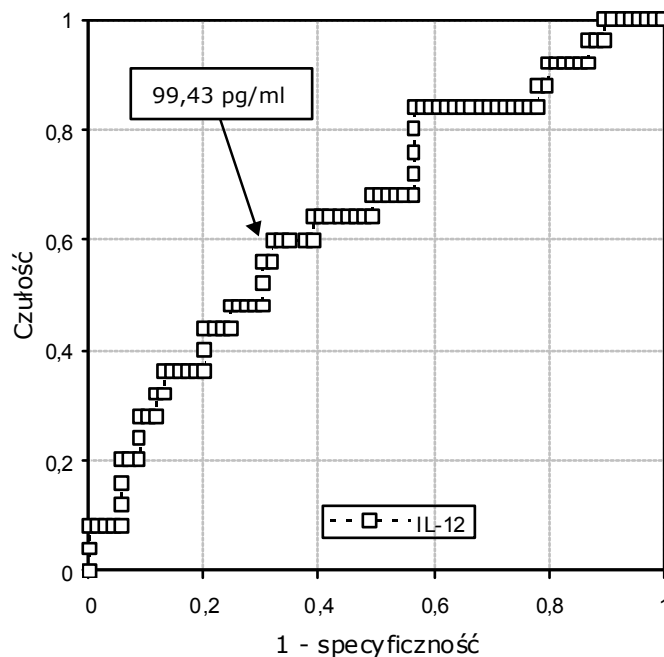
Tabela 16. Parametry krzywej ROC dla IL-10 u dorosłych z przywleczoną zimnicą.

Pole powierzchni pod krzywą ROC	Punkt krytyczny umożliwiający różnicowanie przypadków zimnicy o ciężkim i łagodnym przebiegu	Czułość dla punktu krytycznego	Specyficzność dla punktu krytycznego
0,70	93,95 pg/ml	64%	66,7%

Interleukina 12

Stwierdzono istotną statystycznie zdolność dyskryminacyjną surowiczego poziomu IL-12 do różnicowania chorych z zimnicą o łagodnym i ciężkim przebiegu ($p < 0,01$). Pole powierzchni pod krzywą ROC wykreśloną dla IL-12 wynosiło 0,65 (Rycina 28, str. 92).

Progowe tężenie tej interleukiny w surowicy, optymalnie różnicujące przypadki łagodnej i ciężkiej malarii, wyniosło 99,44 pg/ml. Czułość testu uzyskana dla tej wartości wynosiła 60%, natomiast specyficzność – 68% (Tabela 17, str. 93).



Rycina 28. Krzywa ROC dla surowiczego stężenia IL-12 u dorosłych z przywleczoną zimnicą

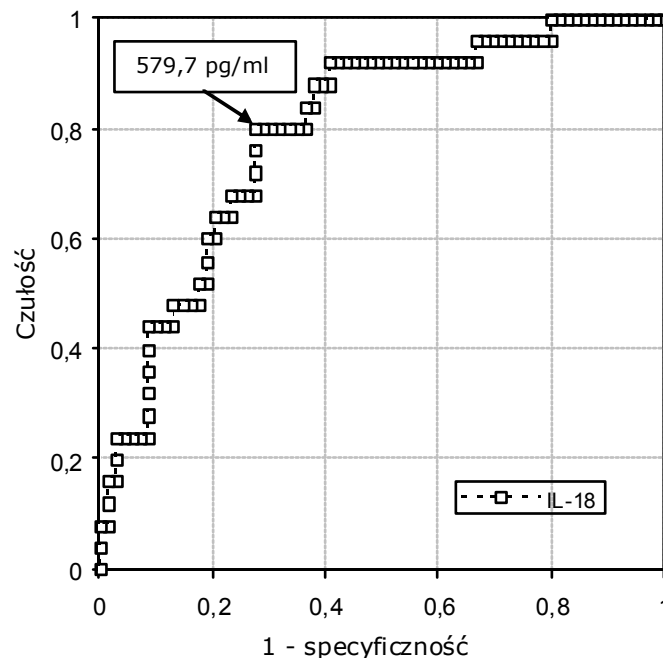
Tabela 17. Parametry krzywej ROC dla IL-12 u dorosłych z przywleczoną zimnicą.

Pole powierzchni pod krzywą ROC	Punkt krytyczny umożliwiający różnicowanie przypadków zimnicy o ciężkim i łagodnym przebiegu	Czułość dla punktu krytycznego	Specyficzność dla punktu krytycznego
0,65	99,43 pg/ml	60%	68,1%

Interleukina 18

Wykazano znaczącą statystycznie zdolność dyskryminacyjną surowiczego stężenia IL-18 w zakresie różnicowania przypadków łagodnej i ciężkiej zimnicy ($p < 0,0001$). Pole powierzchni pod krzywą ROC wykreśloną dla tej interleukiny wynosiło 0,80 (Rycina 29, str. 93).

Wartość progowa surowiczego stężenia IL-18 pozwalająca na optymalne odróżnienie przypadków malarii o łagodnym i ciężkim przebiegu wynosiła 579,7 pg/ml. Czułość testu dla tego punktu odcięcia określono na 80%, a specyficzność na 72,5% (Tabela 18, str.94).



Rycina 29. Krzywa ROC dla surowiczego stężenia IL-18 u dorosłych z przywleczoną zimnicą.

Tabela 18. Parametry krzywej ROC dla IL-18 u dorosłych z przywleczoną zimnicą.

Pole powierzchni pod krzywą ROC	Punkt krytyczny umożliwiający różnicowanie przypadków zimnicy o ciężkim i łagodnym przebiegu	Czułość dla punktu krytycznego	Specyficzność dla punktu krytycznego
0,80	579,7 pg/ml	80%	72,5%

Porównanie przydatności oznaczania surowicznych stężeń cytokin oraz innych testów laboratoryjnych w różnicowaniu przypadków łagodnej i ciężkiej malarii u dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski

Celem porównania przydatności diagnostycznej surowicznych stężeń cytokin i innych, rutynowo wykonywanych u chorych z malarią badań laboratoryjnych, porównano pola powierzchni pod krzywymi ROC wykreślonymi dla tych parametrów (Tabela 19, str.94). Najwyższe wartości pola powierzchni pod krzywą ROC uzyskano dla parazytemii (0,85), IL-18 (0,80) oraz bilirubiny (0,78).

Tabela 19. Pola powierzchni pod krzywymi ROC dla wybranych cytokin oraz innych parametrów laboratoryjnych wykorzystywanych w różnicowaniu przypadków łagodnej i ciężkiej malarii u dorosłych z przywleczoną zimnicą.

Parametr laboratoryjny	Pole powierzchni pod krzywą ROC	Zdolność dyskryminacyjna parametru laboratoryjnego *
Stężenie IL-6 w surowicy	0,68	p<0,01
Stężenie IL-10 w surowicy	0,70	p<0,01
Stężenie IL-12 w surowicy	0,65	p<0,01
Stężenie IL-18 w surowicy	0,80	p<0,0001
Parazytemia	0,85	p<0,0001
Hemoglobina (g/dl)	0,55	NS
Płytki krwi (10⁶/l)	0,74	p<0,001
Stężenie kreatyniny w surowicy	0,60	NS
Stężenie bilirubiny w surowicy	0,78	p<0,0001
Stężenie glukozy w surowicy	0,52	NS

* NS – brak zdolności dyskryminacyjnej w ocenianym zakresie

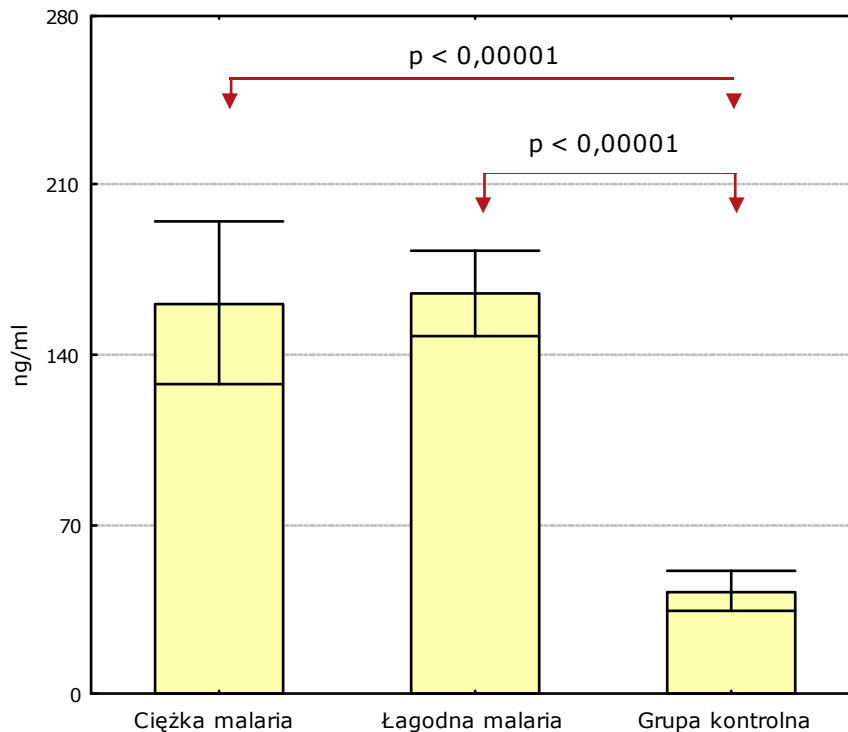
5.3 Stężenia przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski

5.3.1 Stężenia przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski o łagodnym i ciężkim przebiegu oraz w grupie kontrolnej

Przeciwciała przeciwko Hsp60

Stężenie przeciwciał przeciwko Hsp60 w surowicy krwi pacjentów z ciężką zimnicą wynosiło średnio 161,31 ng/ml, natomiast w surowicy chorych z łagodnym przebiegiem inwazji – 165,57 ng/ml. Obie te wartości były znamienne statystycznie wyższe niż poziom tych przeciwciał u osób z grupy kontrolnej, w której wynosił on średnio 42,11 ng/ml ($p < 0,00001$).

Nie stwierdzono jednak istotnych statystycznie różnic w surowiczym stężeniu przeciwciał przeciwko Hsp60 u pacjentów z malarią o ciężkim i łagodnym przebiegu (Rycina 30, str. 95).

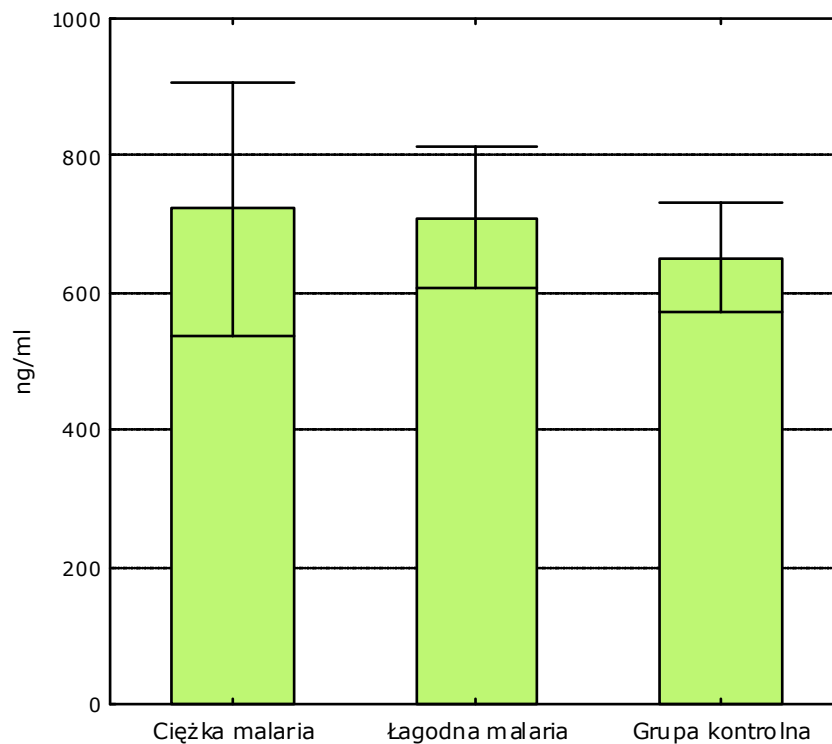


Rycina 30. Stężenie przeciwciał przeciwko Hsp60 w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Przeciwciała przeciwko Hsp70

Stężenie przeciwciał przeciwko Hsp70 w surowicy krwi chorych z ciężką zimnicą wynosiło średnio 721,80 ng/ml, natomiast u chorych z łagodnym przebiegiem inwazji – 709,80 ng/ml. Nie stwierdzono znaczących statystycznie różnic w surowiczych stężeniach tych przeciwciał pomiędzy chorymi o obu stopniach ciężkości przebiegu zimnicy, a grupą kontrolną, w której poziom przeciwciał przeciwko Hsp70 wynosił 641,77 ng/ml.

Nie zaobserwowano również istotnych różnic w stężeniu tych przeciwciał w surowicy pacjentów z malarią o ciężkim i łagodnym przebiegu (Rycina 31, str. 96).



Rycina 31. Stężenie przeciwciał przeciwko Hsp70 w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM).

5.3.2 Zależności pomiędzy stężeniem przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski, a etiologią zimnicy oraz parazytemią

Nie stwierdzono znamiennych statystycznie różnic w średnich poziomach przeciwciał przeciwko Hsp60 oraz Hsp70 w surowicy krwi pacjentów podzielonych na grupy według etiologii malarii, tj. pomiędzy chorymi zarażonymi *P. falciparum*, *P. vivax* oraz osobami z inwazją mieszaną więcej niż jednym gatunkiem zarodźca malarii. Nie obserwowano również istotnej korelacji pomiędzy parazytemią, a surowicznym poziomem tych przeciwciał u chorych zarażonych *Plasmodium* spp.

5.3.3 Zależności pomiędzy stężeniem przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski, a wcześniejszą ekspozycją na inwazję *Plasmodium* spp. i wiekiem chorych

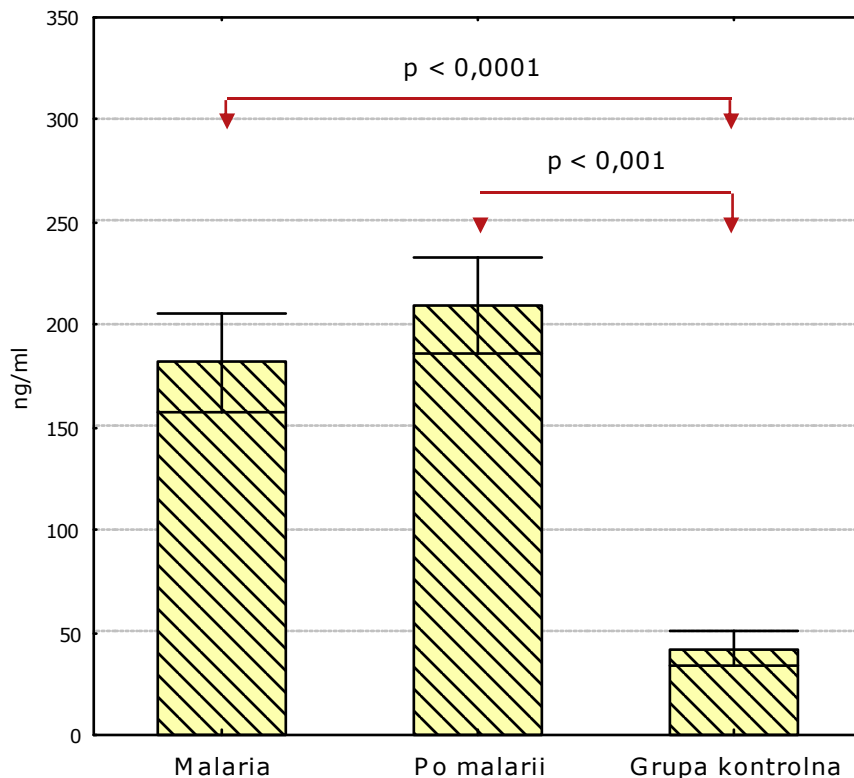
Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu przeciwciał przeciwko Hsp60 oraz Hsp70 pomiędzy grupą chorych dorosłych z pierwszą w życiu inwazją *Plasmodium* spp., a pacjentami, którzy podawali w wywiadzie uprzednio przebyte epizody malarii.

Nie obserwowano także znamiennych korelacji pomiędzy wiekiem chorych z przywleczoną zimnicą, a surowicznym poziomem tych przeciwciał.

5.3.4 Stężenia przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski przed leczeniem oraz po przebytej chorobie

Przeciwciała przeciwko Hsp60

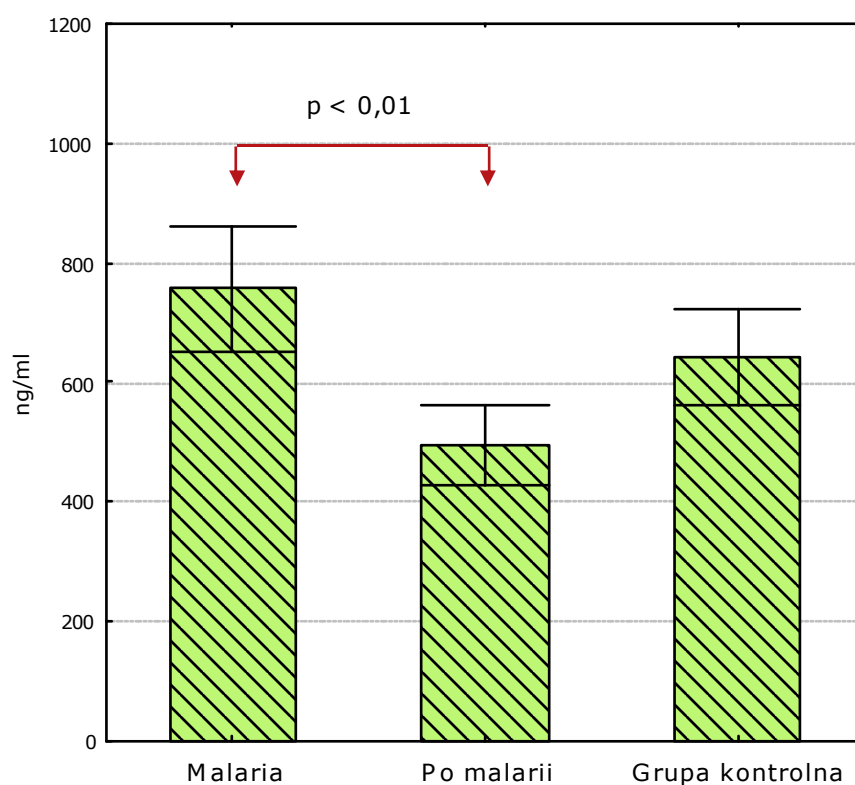
Stężenie przeciwciał przeciwko Hsp60 w surowicy krwi pacjentów po przebytej zimnicy wynosiło średnio 209,29 ng/ml i nie różniło się istotnie od poziomu badanych przeciwciał u tych samych chorych przed leczeniem (181,82 ng/ml). Obie te wartości były znamienne statystycznie wyższe niż średnie stężenie przeciwciał przeciwko Hsp60 u osób z grupy kontrolnej ($p < 0,00001$), w której wynosiło ono 42,11 ng/ml (Rycina 32, str. 98).



Rycina 32. Stężenie przeciwciał przeciwko Hsp60 w surowicy krwi dorosłych z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Przeciwciała przeciwko Hsp70

Średnie stężenie przeciwciał przeciwko Hsp70 w surowicy krwi pacjentów po przebytej zimnicy wynosiło średnio 493,95 ng/ml (Rycina 33, str. 99). Uległo ono istotnemu obniżeniu w porównaniu do surowiczego poziomu badanych przedwciał u tych samych osób przed leczeniem, wynoszącego 756,50 ng/ml ($p < 0,01$) i nadal nie różniło się znacząco od średniego stężenia przeciwciał przeciwko Hsp70 w surowicy krwi zdrowych dorosłych z grupy kontrolnej (641,77 ng/ml).



Rycina 33. Stężenie przeciwciał przeciwko Hsp70 w surowicy krwi dorosłych z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

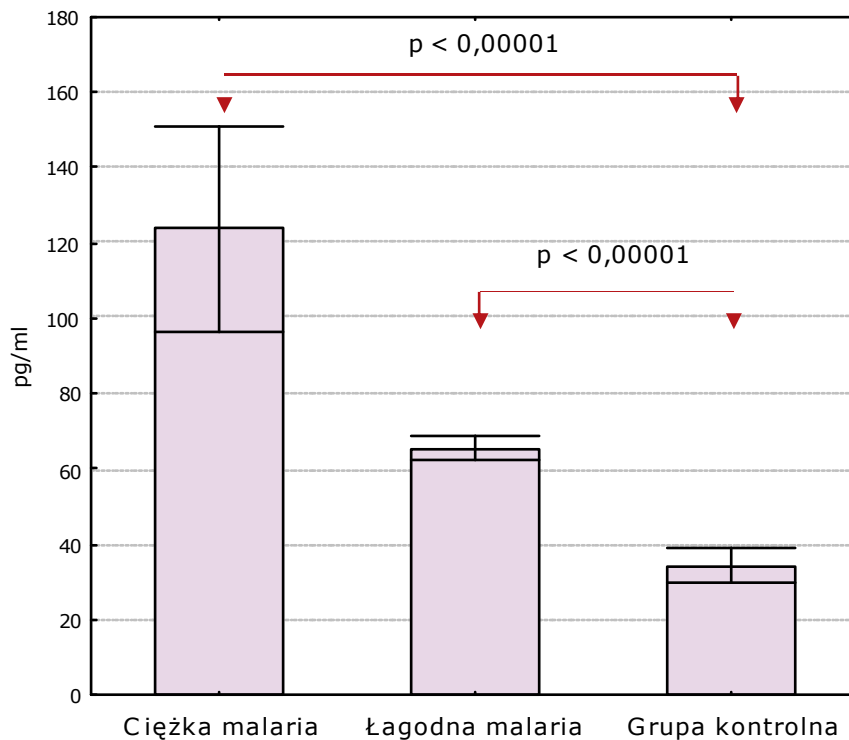
5.4 Stężenia cytokin w surowicy dzieci angolskich z zimnicą

5.4.1 Stężenia cytokin w surowicy dzieci angolskich z zimnicą o łagodnym i ciężkim przebiegu oraz w grupie kontrolnej

Czynnik martwicy nowotworów

Stężenie TNF w surowicy krwi dzieci z ciężką zimnicą wynosiło średnio 123,76 pg/ml, natomiast w surowicy chorych z łagodnym przebiegiem inwazji – 65,39 pg/ml. Obie te wartości były znamienne statystycznie wyższe niż średnie stężenie TNF w surowicy osób z grupy kontrolnej, w której wynosiło ono 34,32 pg/ml ($p < 0,00001$).

Nie stwierdzono natomiast istotnych statystycznie różnic w poziomach stężeń TNF w surowicy pacjentów angolskich z malarią o ciężkim i łagodnym przebiegu (Rycina 34, str. 100).

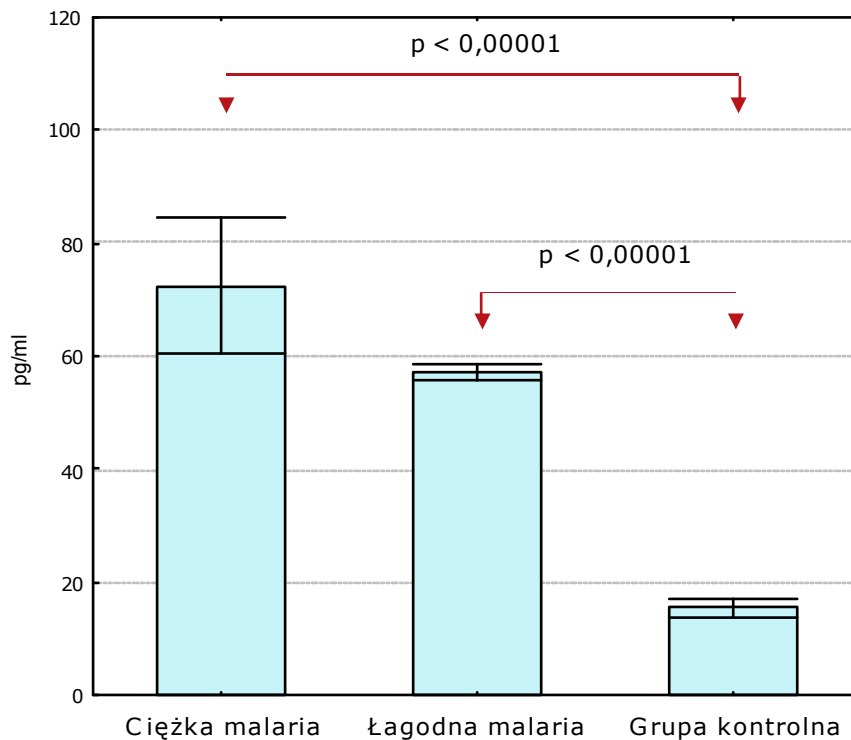


Rycina 34. Stężenie TNF w surowicy krwi chorych dzieci angolskich z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Interferon γ

Stężenie IFN γ w surowicy krwi chorych dzieci z ciężką zimnicą wynosiło średnio 72,39 pg/ml, natomiast w surowicy pacjentów z łagodnym przebiegiem inwazji – 57,18 pg/ml. Obie te wartości były istotnie statystycznie wyższe niż średnie stężenie IFN γ w surowicy osób z grupy kontrolnej (15,52 pg/ml, $p < 0,00001$).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomach stężeń IFN γ w surowicy pacjentów angolskich z malarią o ciężkim i łagodnym przebiegu (Rycina 35, str. 101).

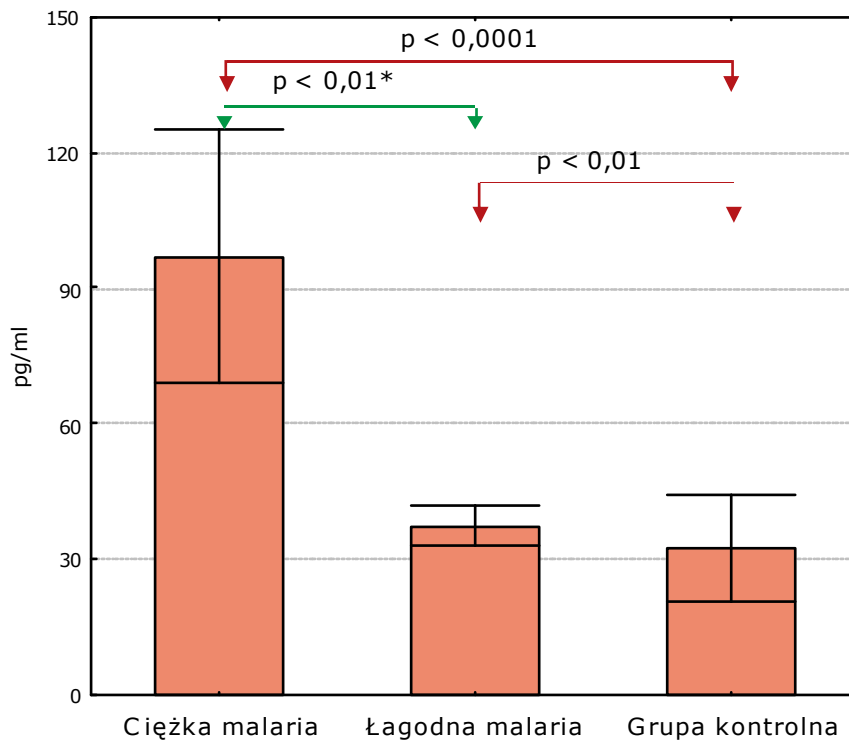


Rycina 35. Stężenie IFN γ w surowicy krwi dzieci z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Interleukina 6

Stężenie IL-6 w surowicy krwi pacjentów angolskich z ciężką zimnicą wynosiło średnio 96,94 pg/ml, natomiast w surowicy dzieci z łagodnym przebiegiem inwazji – 37,53 pg/ml (Rycina 36, str. 102). Obie te wartości były znamienne statystycznie wyższe niż średnie stężenie IL-6 w surowicy osób z grupy kontrolnej, w której wynosiło ono 32,55 pg/ml (odpowiednio: $p < 0,0001$, $p < 0,01$).

Ponadto średnie stężenie IL-6 było znamienne statystycznie wyższe w surowicy pacjentów z ciężką zimnicą niż w grupie pacjentów z łagodną malarią ($p < 0,01$ w teście Manna-Whitneya).



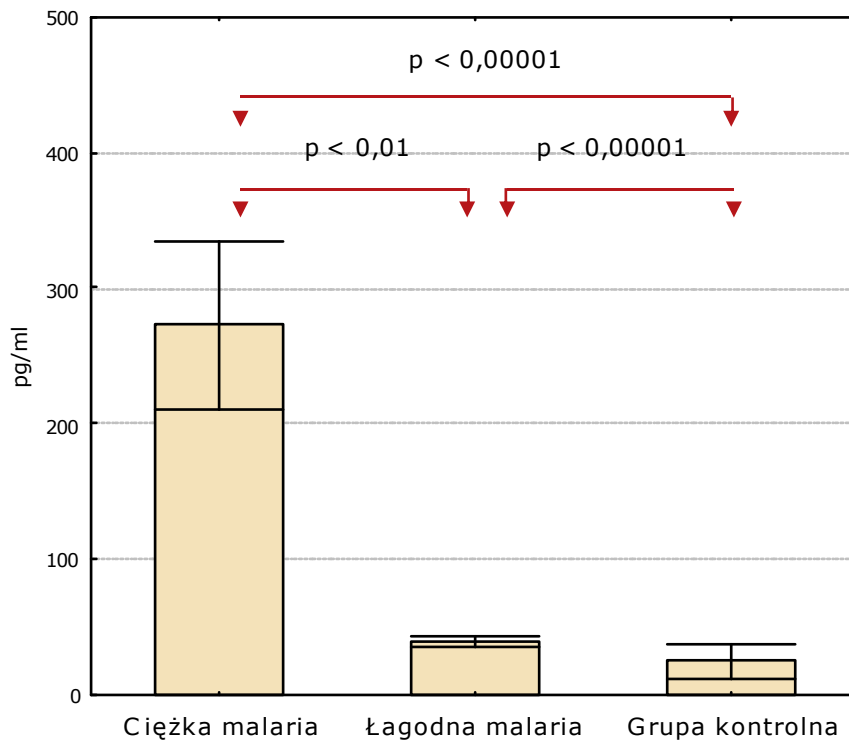
Rycina 36. Stężenie IL-6 w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie.

* różnica istotna statystycznie w teście Manna Whitneya

Interleukina 10

Średnie stężenie IL-10 w surowicy krwi dzieci z ciężką zimnicą było wielokrotnie wyższe niż wartość uzyskana w grupie kontrolnej i wynosiło średnio 272,90 pg/ml, natomiast w surowicy chorych z łagodnym przebiegiem inwazji - 40,63 pg/ml (Rycina 37, str. 103). Obie te wartości były znamienne statystycznie wyższe niż średnie stężenie IL-10 w surowicy osób z grupy kontrolnej, wynoszące 25,52 pg/ml ($p < 0,00001$).

Ponadto średnie stężenie IL-10 w surowicy pacjentów z ciężką zimnicą było istotnie wyższe niż w grupie pacjentów z łagodną malarią ($p < 0,01$).

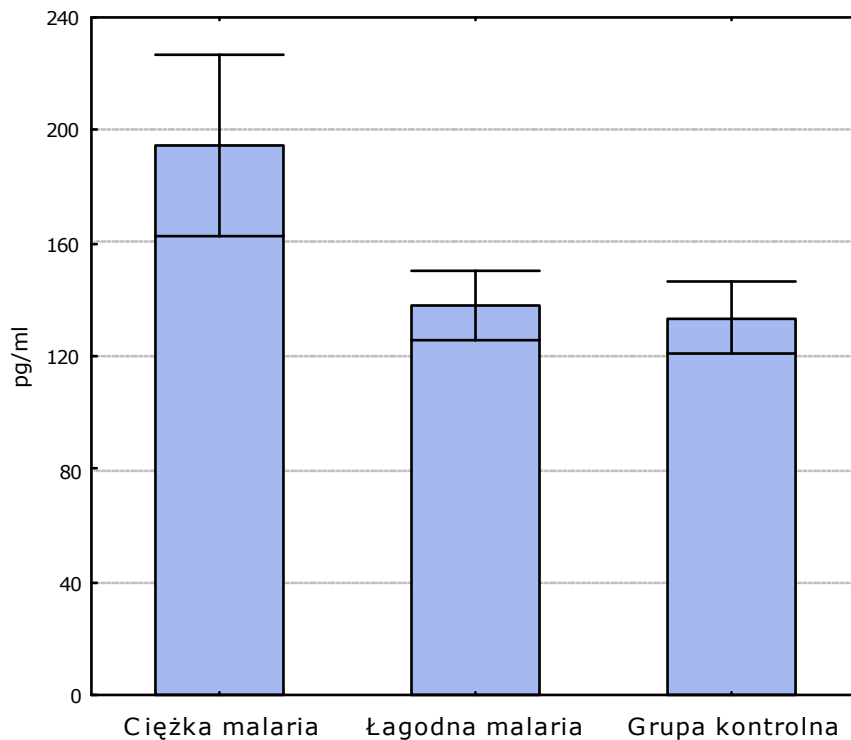


Rycina 37. Stężenie IL-10 w surowicy krwi dzieci z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz standardowy błąd średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Interleukina 12

Stężenie IL-12 w surowicy krwi dzieci z ciężką zimnicą wynosiło średnio 194,27 pg/ml, natomiast w surowicy chorych z łagodnym przebiegiem inwazji - 138,13 pg/ml. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomach stężeń tej interleukiny w surowicy krwi chorych w obu stopniach ciężkości przebiegu zimnicy i osób z grupy kontrolnej, w której średnie surowicze stężenie IL-12 wynosiło 133,56 pg/ml (Rycina 38, str. 104).

Nie zaobserwowano również istotnych statystycznie różnic w poziomach stężeń tej interleukiny w surowicy pacjentów z malarią o ciężkim i łagodnym przebiegu.

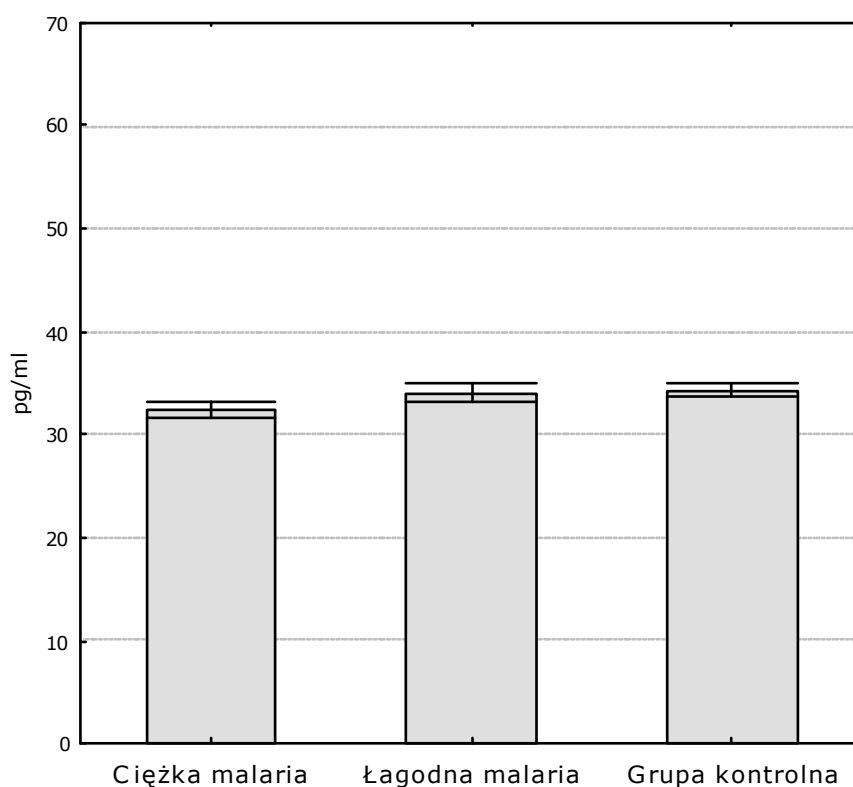


Rycina 38. Stężenie IL-12 w surowicy krwi dzieci z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz standardowy błąd średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Interleukina 13

Stężenie IL-13 w surowicy krwi dzieci z ciężką zimnicą wynosiło średnio 32,46 pg/ml, natomiast w surowicy pacjentów z łagodnym przebiegiem inwazji – 34,07 pg/ml. Nie stwierdzono istotnych różnic w poziomach stężeń tej interleukiny w surowicy krwi chorych w obu stopniach ciężkości przebiegu zimnicy, a grupą kontrolną, w której średnie stężenie IL-13 wynosiło 34,24 pg/ml (Rycina 39, str. 105).

Nie zaobserwowano również znaczących statystycznie różnic w poziomach stężeń tej interleukiny w surowicy pacjentów z malarią o ciężkim i łagodnym przebiegu.

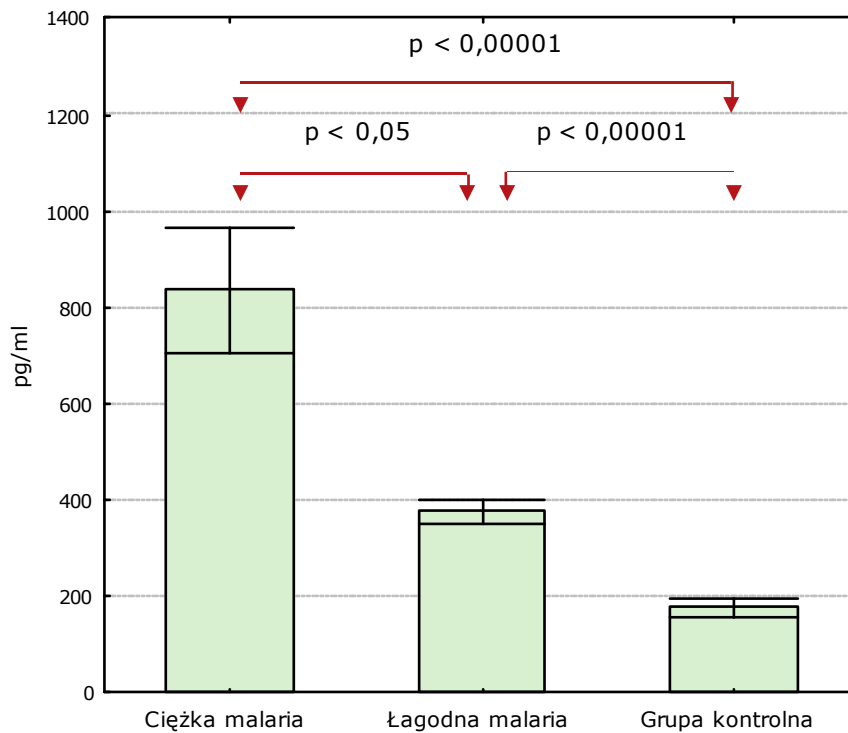


Rycina 39. Stężenie IL-13 w surowicy krwi dzieci z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM).

Interleukina 18

Stężenie IL-18 w surowicy krwi dzieci z ciężką zimnicą wynosiło średnio 835,53 pg/ml, natomiast w surowicy chorych z łagodnym przebiegiem inwazji 376,26 pg/ml, czyli ponad dwukrotnie mniej (Rycina 40, str. 106). Obie te wartości były istotnie statystycznie wyższe niż średnie stężenie IL-18 w surowicy osób z grupy kontrolnej, w której wynosiło ono 177,27 pg/ml ($p < 0,00001$).

Ponadto średnie stężenie IL-18 było znamienne statystycznie wyższe w surowicy pacjentów angolskich z ciężką zimnicą niż w grupie pacjentów z łagodną malarią ($p < 0,05$).



Rycina 40. Stężenie IL-18 w surowicy krwi dzieci z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz standardowy błąd średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

5.4.2 Zależności pomiędzy stężeniem cytokin w surowicy dzieci angolskich z zimnicą, a parazytemią

W badanym materiale nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji pomiędzy parazytemią, a surowiczym stężeniem poszczególnych cytokin u dzieci angolskich z zimnicą.

5.4.3 Zależności pomiędzy stężeniem cytokin w surowicy dzieci angolskich z zimnicą, a wcześniejszą ekspozycją na inwazję *Plasmodium* i wiekiem chorych

U dzieci angolskich z pierwszą w życiu inwazją *P. falciparum*, zgodnie z wywiadem podanym przez rodziców lub opiekunów, średnie stężenie IL-18 było znamienne statystycznie wyższe niż w grupie chorych, których opiekunowie podawali w wywiadzie uprzednio przebyte epizody malarii ($p < 0,01$). Nie stwierdzono podobnych

zależności w odniesieniu do pozostałych badanych cytokin (Tabela 20, str. 107).

Tabela 20. Stężenia badanych cytokin u dzieci angolskich z zimnicą w zależności od uprzednio przebytych epizodów malarii.

Cytokina	Chorzy z pierwszą w życiu zimnicą n=18	Chorzy z przebyłym epizodem lub epizodami zimnicy w wywiadzie n=31
TNF (pg/ml)	79,78 ± 10,98	73,12 ± 12,00
IFN γ (pg/ml)	63,76 ± 3,32	62,71 ± 5,73
IL-6 (pg/ml)	51,50 ± 10,89	56,13 ± 14,75
IL-10 (pg/ml)	172,73 ± 52,85	65,50 ± 20,56
IL-12 (pg/ml)	166,25 ± 27,38	140,93 ± 13,87
IL-13 (pg/ml)	32,96 ± 0,89	35,16 ± 1,93
IL-18 (pg/ml)	690,81 ± 117,77	395,27 ± 37,84

Wyniki przedstawiają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej \pm SEM; zaznaczono znamienne statystycznie różnice pomiędzy grupami ($p < 0,01$)

Obserwowano ponadto istotną statystycznie, ujemną korelację pomiędzy wiekiem chorych dzieci angolskich, a surowiczym stężeniem IL-18 ($p < 0,05$, $R = -0,30$).

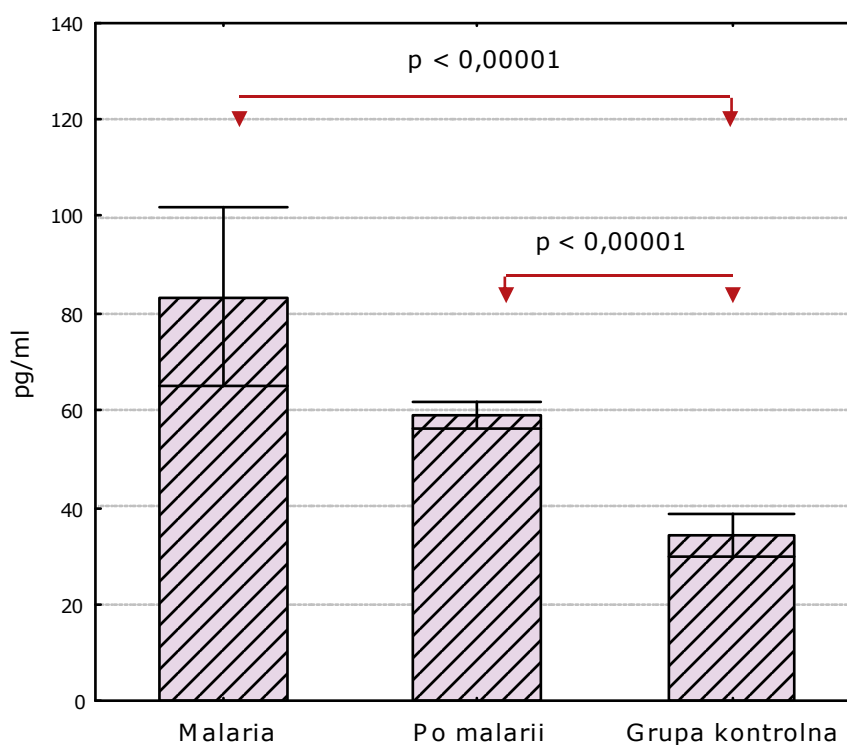
5.4.4 Stężenia cytokin w surowicy dzieci angolskich z zimnicą przed leczeniem oraz po przebytej chorobie

U 20 pacjentów, którzy zgłosili się do Centrum Medycznego im. Św. Łukasza celem wykonania badań kontrolnych po przebytej zimnicy oznaczono stężenia tych spośród badanych cytokin, których surowicze stężenie przed leczeniem istotnie różniło się w porównaniu do grupy kontrolnej ($n=40$) złożonej z dzieci zdrowych. Dotyczyło to następujących cytokin: TNF, IFN γ , IL-6, IL-10 oraz IL-18.

Czynnik martwicy nowotworów

Nie stwierdzono istotnego statystycznie obniżenia średniego stężenia TNF w surowicy krwi dzieci po przebytej malarii (59,10 pg/ml), w porównaniu do średniego stężenia tej cytokiny w surowicy tych samych osób przed leczeniem, które było nieco wyższe i wynosiło 83,39 pg/ml (Rycina 41, str. 108).

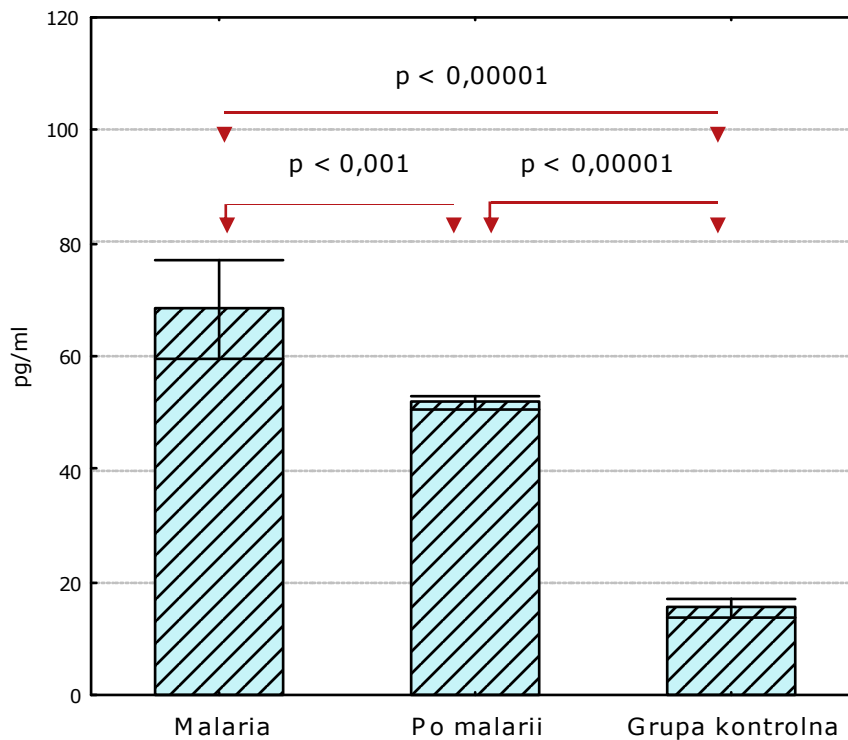
Średnie stężenie TNF w surowicy krwi dzieci po przebytej malarii pozostawało natomiast znamienne statystycznie wyższe niż średnie stężenie tej cytokiny w surowicy dzieci zdrowych, wynoszące 34,32 pg/ml ($p < 0,00001$).



Rycina 41. Stężenie TNF w surowicy krwi dzieci z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Interferon γ

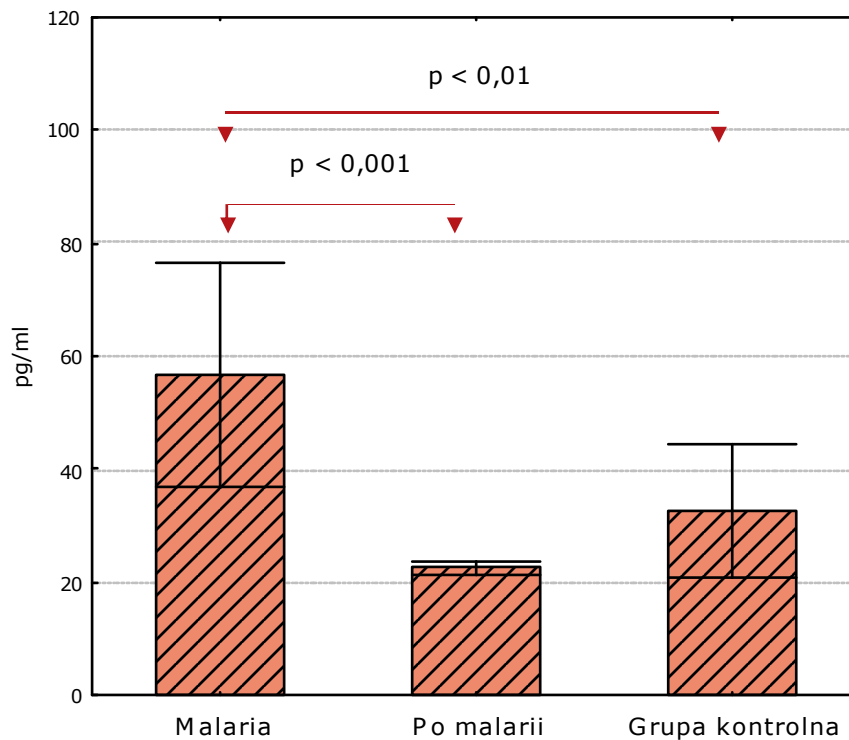
Średnie stężenie IFN γ w surowicy krwi dzieci po przebytej malarii istotnie zmniejszyło się w porównaniu do średniego stężenia IFN γ w surowicy tych samych osób przed leczeniem (odpowiednio 51,92 pg/ml i 68,31 pg/ml, $p < 0,001$), wciąż jednak pozostawało znamienne statystycznie wyższe niż średnie surowicze stężenie IFN γ u osób z grupy kontrolnej ($p < 0,00001$), u których wynosiło ono 15,52 pg/ml (Rycina 42, str. 109).



Rycina 42. Stężenie IFN γ w surowicy krwi dzieci z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice statystycznie

Interleukina 6

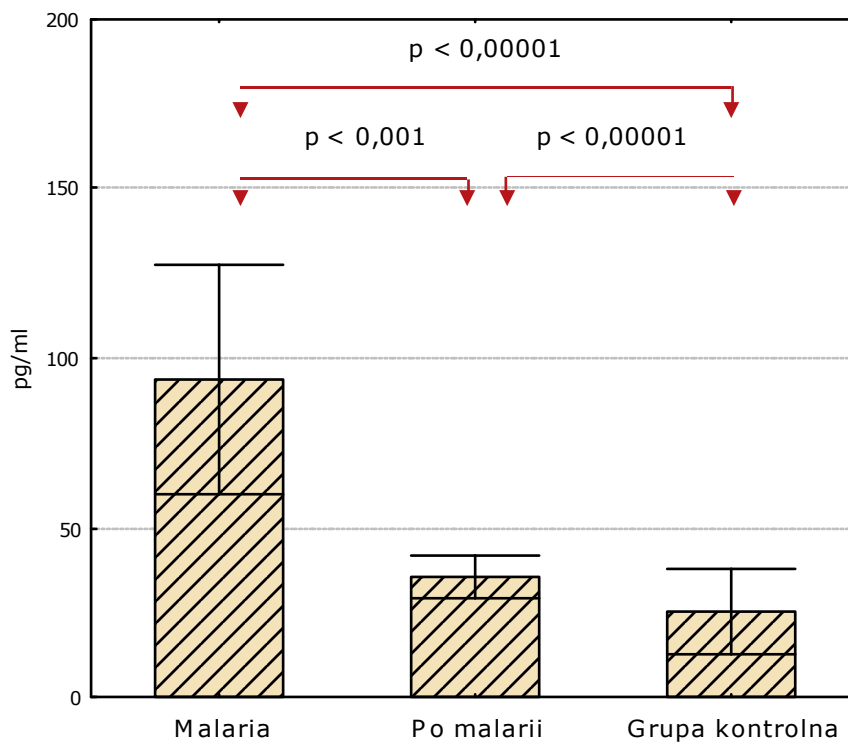
Średnie stężenie IL-6 w surowicy krwi dzieci po przebytej malarii wynosiło 22,56 pg/ml (Rycina 43, str. 110). Uległo ono istotnemu obniżeniu w porównaniu do średniego stężenia IL-6 w surowicy tych samych osób przed leczeniem, wynoszącego 56,70 pg/ml ($p < 0,001$) i nie różniło się znacząco od średniego stężenia tej cytokiny w surowicy krwi dzieci zdrowych z grupy kontrolnej (32,55 pg/ml).



Rycina 43. Stężenie IL-6 w surowicy krwi dzieci z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Interleukina 10

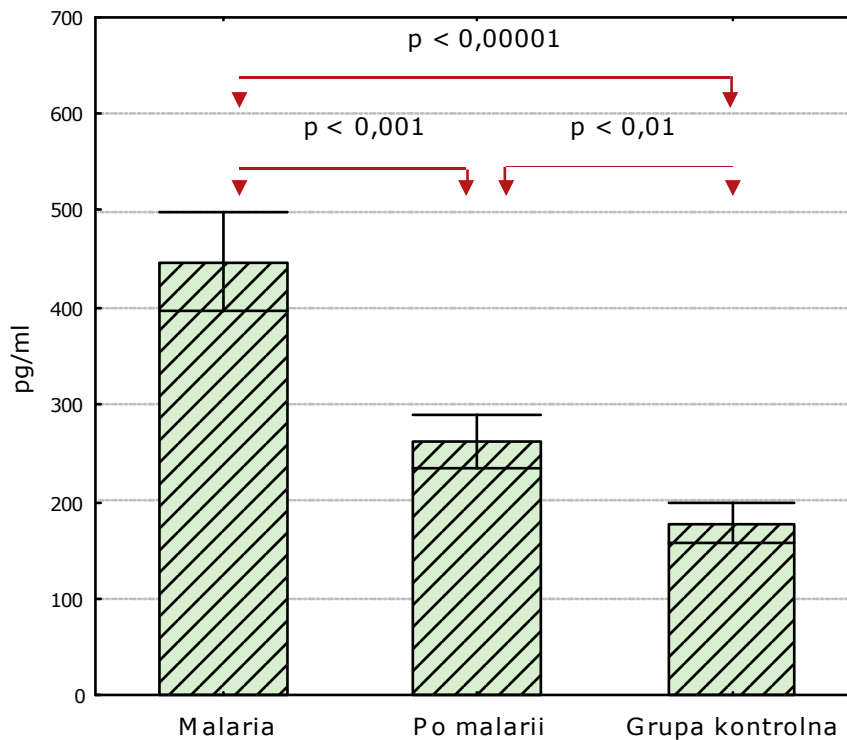
Średnie stężenie IL-10 w surowicy krwi pacjentów po przebytej malarii istotnie zmniejszyło się w porównaniu do średniego stężenia IL-10 w surowicy tych samych osób przed leczeniem (odpowiednio 35,69 pg/ml i 93,68 pg/ml, $p < 0,001$), wciąż jednak pozostawało znamienne statystycznie wyższe niż średnie stężenie IL-10 w surowicy osób z grupy kontrolnej ($p < 0,00001$), u których wynosiło ono 25,52 pg/ml (Rycina 44, str. 111).



Rycina 44. Stężenie IL-10 w surowicy krwi dzieci z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

Interleukina 18

Średnie stężenie IL-18 w surowicy krwi dzieci po przebytej malarii istotnie zmniejszyło się w porównaniu do średniego stężenia IL-18 w surowicy tych samych pacjentów przed leczeniem (odpowiednio 262,09 pg/ml i 447,20 pg/ml, $p < 0,001$), nadal jednak pozostawało znamienne statystycznie wyższe niż średnie stężenie IL-18 w surowicy dzieci zdrowych z grupy kontrolnej ($p < 0,01$), u których wynosiło ono 177,27 pg/ml (Rycina 45, str. 112).



Rycina 45. Stężenie IL-18 w surowicy krwi dzieci z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

5.4.5 Przydatność oznaczania surowicznych stężeń wybranych cytokin w rozróżnianiu przypadków malarii o łagodnym i ciężkim przebiegu u dzieci angolskich z zimnicą

Do analizy przydatności diagnostycznej oznaczania stężeń cytokin w ocenie ciężkości przebiegu zimnicy wybrano te cząsteczki, których średnie poziomy w surowicy różniły się istotnie w grupach dzieci angolskich z łagodnie i ciężko przebiegającą malarią, czyli IL-6, IL-10 oraz IL-18. Za pomocą metody krzywych ROC oceniono zdolność dyskryminacyjną każdej z tych parametrów w odniesieniu do różnicowania powyższych dwóch grup chorych.

Dla każdej z wybranych interleukin wyznaczano wartość progową różnicującą przypadki łagodnej i ciężkiej zimnicy z optymalną czułością i specyficznoscią. Celem wyłonienia najbardziej przydatnego wskaźnika diagnostycznego obliczono pola powierzchni pod krzywymi ROC dla każdej z tych cząsteczek oraz porównano je z wartościami pól uzyskanymi dla wyników parazytemii i innych badań

laboratoryjnych, stosowanych u chorych z malarią.

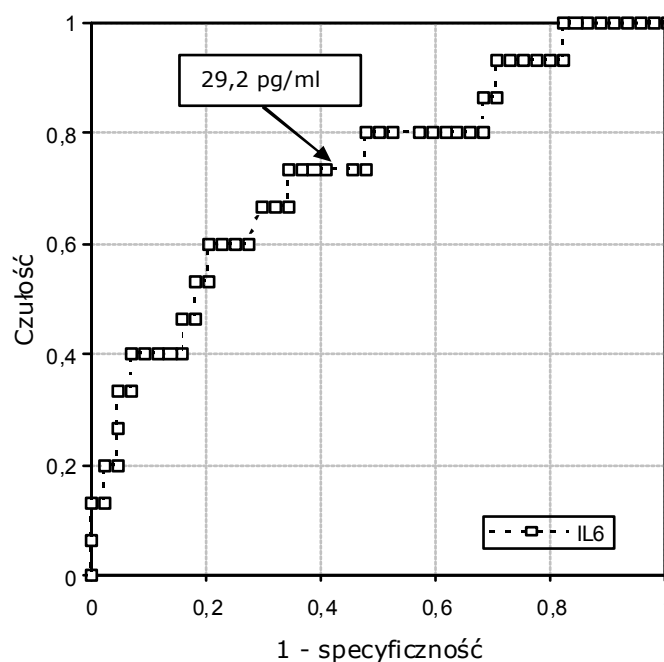
Interleukina 6

Udowodniono znaczącą statystycznie zdolność dyskryminacyjną surowiczego stężenia IL-6 w zakresie różnicowania chorych z zimnicą o łagodnym i ciężkim przebiegu ($p < 0,01$). Pole powierzchni pod krzywą ROC wykreśloną dla tej interleukiny wynosiło 0,73.

Punkt odcięcia dla stężenia IL-6 w surowicy, charakteryzujący się optymalnym odróżnieniem przypadków malarii o łagodnym i ciężkim przebiegu, u dzieci angolskich wynosił 29,2 pg/ml (Rycina 46, str. 114). Czułość testu dla uzyskanej wartości progowej określono na 73,3%, a specyficzność na 65,9% (Tabela 21, str. 113).

Tabela 21. Parametry krzywej ROC dla IL-6 u dzieci angolskich z malarią.

Pole powierzchni pod krzywą ROC	Punkt krytyczny umożliwiający różnicowanie przypadków zimnicy o ciężkim i łagodnym przebiegu	Czułość dla punktu krytycznego	Specyficzność dla punktu krytycznego
0,73	29,2 pg/ml	73,3%	65,9%



Rycina 46. Krzywa ROC dla surowiczego stężenia IL-6 u dzieci angolskich z zimnicą

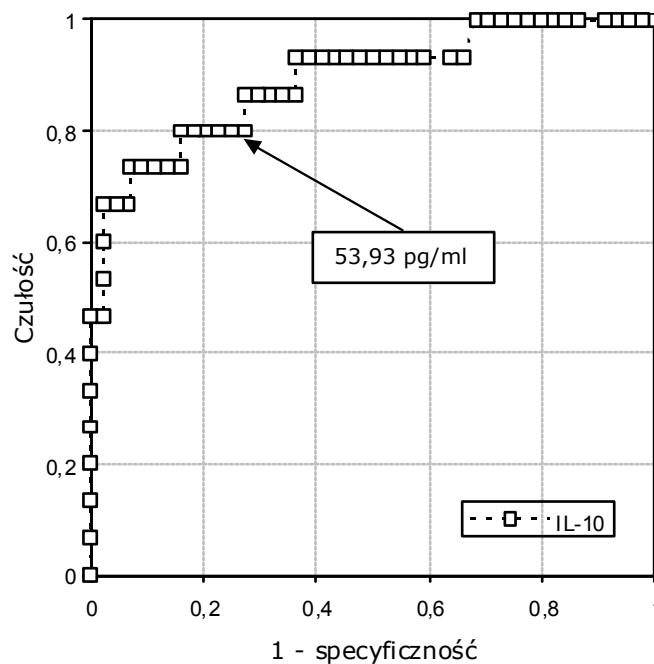
Interleukina 10

Wykazano istotną statystycznie zdolność dyskryminacyjną surowiczego stężenia IL-10 w zakresie różnicowania przypadków łagodnej i ciężkiej zimnicy ($p < 0,0001$). Pole powierzchni pod krzywą ROC wykreśloną dla tej interleukiny wynosiło 0,89 (Rycina 47, str. 114).

Punkt krytyczny poziomu IL-10 w surowicy, który pozwalał na optymalne rozróżnienie przypadków malarii o łagodnym i ciężkim przebiegu, u dzieci angolskich wynosił 53,93 pg/ml. Czułość tej metody dla uzyskanej wartości określono na 80%, a specyficzność na 84,1% (Tabela 22, str. 114).

Tabela 22. Parametry krzywej ROC dla IL-10 u dzieci angolskich z malarią.

Pole powierzchni pod krzywą ROC	Punkt krytyczny umożliwiający różnicowanie przypadków zimnicy o ciężkim i łagodnym przebiegu	Czułość dla punktu krytycznego	Specyficzność dla punktu krytycznego
0,89	53,93 pg/ml	80%	84,1%



Rycina 47 Krzywa ROC dla surowiczego stężenia IL-10 u dzieci angolskich z zimnicą

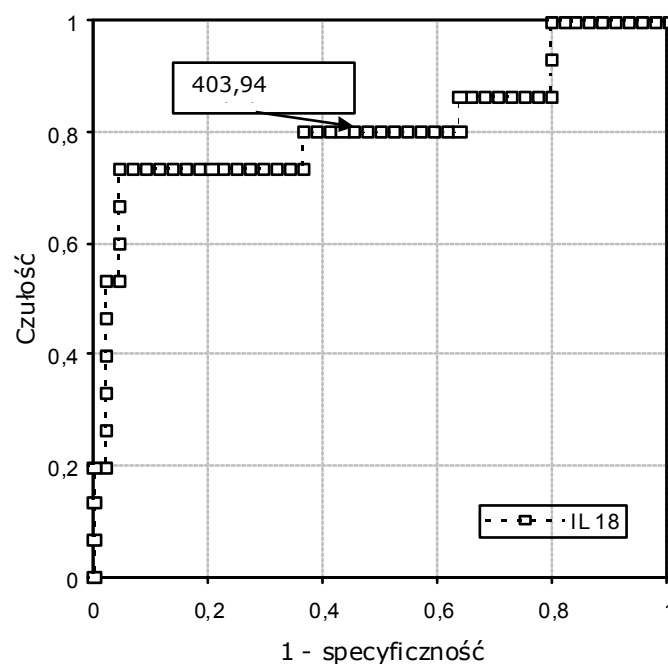
Interleukina 18

Stwierdzono istotną statystycznie zdolność dyskryminacyjną surowiczego poziomu IL-18 w zakresie różnicowania chorych z zimnicą o łagodnym i ciężkim przebiegu ($p < 0,0001$). Pole powierzchni pod krzywą ROC wykreśloną dla IL-18 wynosiło 0,81 (Rycina 48, str. 115).

Stężenie tej interleukiny w surowicy optymalnie różniące przypadki łagodnej i ciężkiej malarii wyniosło 403,94 pg/ml. Czułość tej metody uzyskana dla wartości progowej wynosiła 80%, natomiast jej specyficzność – 63,6% (Tabela 23, str. 115).

Tabela 23. Parametry krzywej ROC dla IL-18 u dzieci angolskich z malarią.

Pole powierzchni pod krzywą ROC	Punkt krytyczny umożliwiający różnicowanie przypadków zimnicy o ciężkim i łagodnym przebiegu	Czułość dla punktu krytycznego	Specyficzność dla punktu krytycznego
0,81	403,94 pg/ml	80%	63,6%



Rycina 48. Krzywa ROC dla surowiczego stężenia IL-18 u dzieci angolskich z zimnicą

5.4.5.1 Porównanie przydatności oznaczania surowiczych stężeń cytokin i innych testów laboratoryjnych w różnicowaniu przypadków łagodnej i ciężkiej malarii u dzieci angolskich z zimnicą

Celem porównania przydatności diagnostycznej surowiczych stężeń cytokin i innych, wykonywanych u dzieci z malarią badań laboratoryjnych, porównano pola powierzchni pod krzywymi ROC wykreślonymi dla tych parametrów (Tabela 24, str. 116). Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli. Najwyższe wartości pola powierzchni pod krzywą ROC uzyskano dla IL-10 (0,90), IL-18 (0,81) oraz parazytemii (0,74).

Tabela 24. Pola powierzchni pod krzywymi ROC dla wybranych cytokin oraz innych wskaźników diagnostycznych wykorzystywanych w różnicowaniu przypadków łagodnej i ciężkiej malarii u dzieci angolskich.

Parametr laboratoryjny	Pole powierzchni pod krzywą ROC	Zdolność dyskryminacyjna parametru laboratoryjnego *
Stężenie IL-6 w surowicy	0,68	p<0,01
Stężenie IL-10 w surowicy	0,90	p<0,0001
Stężenie IL-18 w surowicy	0,81	p<0,0001
Parazytemia	0,74	p<0,01
Hemoglobina (g/dl)	0,73	p<0,01
Stężenie kreatyniny w surowicy	0,52	NS
Stężenie bilirubiny w surowicy	0,69	p<0,05
Stężenie glukozy w surowicy	0,71	p<0,01
Stężenie kwasu mlekowego we krwi włośniczkowej	0,52	NS

* NS – brak zdolności dyskryminacyjnej w ocenianym zakresie

5.5 Stężenia przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dzieci angolskich z zimnicą

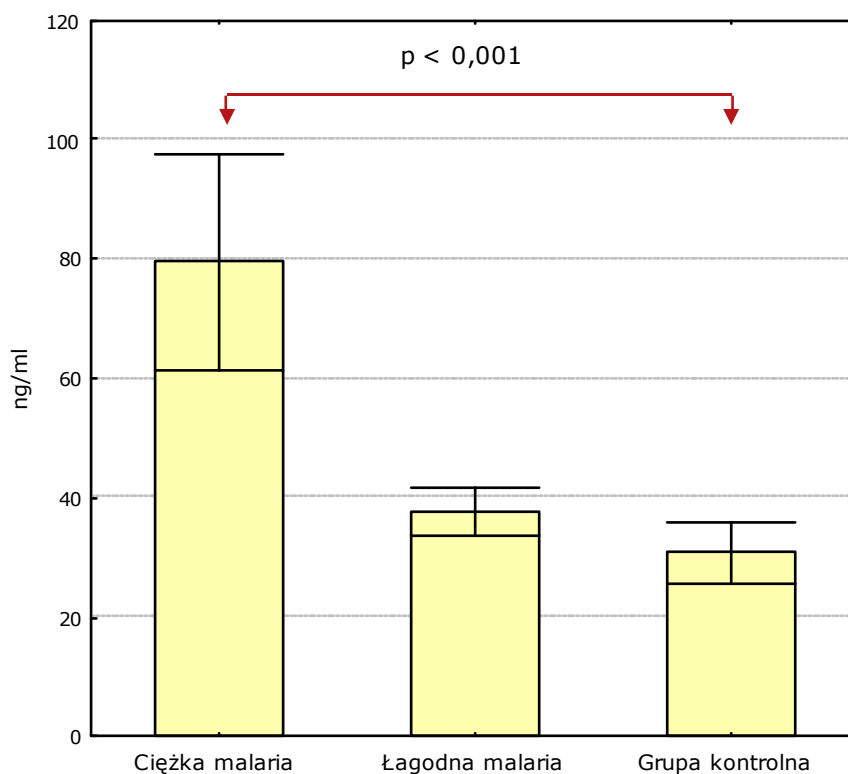
5.5.1 Stężenia przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dzieci angolskich z zimnicą o łagodnym i ciężkim przebiegu oraz w grupie kontrolnej

Przeciwciała przeciwko Hsp60

Stężenie przeciwciał przeciwko Hsp60 w surowicy krwi dzieci z ciężką zimnicą wynosiło średnio 79,59 ng/ml i było znamienne statystycznie wyższe niż poziom tych przeciwciał u osób z grupy kontrolnej, w której wynosiło ono 30,82 ng/ml ($p < 0,01$).

Stężenie przeciwciał przeciwko Hsp60 w surowicy chorych z łagodnym przebiegiem inwazji wynosiło natomiast 37,6 ng/ml i nie różniło się istotnie od poziomu badanych przeciwciał u dzieci z grupy kontrolnej.

Nie wykazano również znamienych statystycznie różnic w surowiczym stężeniu przeciwciał przeciwko Hsp60 u pacjentów z malarią o ciężkim i łagodnym przebiegu (Rycina 49, str. 117).



Rycina 49. Stężenie przeciwciał przeciwko Hsp60 w surowicy krwi dzieci z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice znamienne statystycznie

5.5.2 Zależności pomiędzy stężeniem przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dzieci angolskich z zimnicą, a parazytemią

Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy parazytemią, a surowicznym stężeniem przeciwciał przeciwko Hsp60 u dzieci z zimnicą.

5.5.3 Zależności pomiędzy stężeniem przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dzieci angolskich z zimnicą, a wcześniejszą ekspozycją na inwazję *Plasmodium* i wiekiem chorych

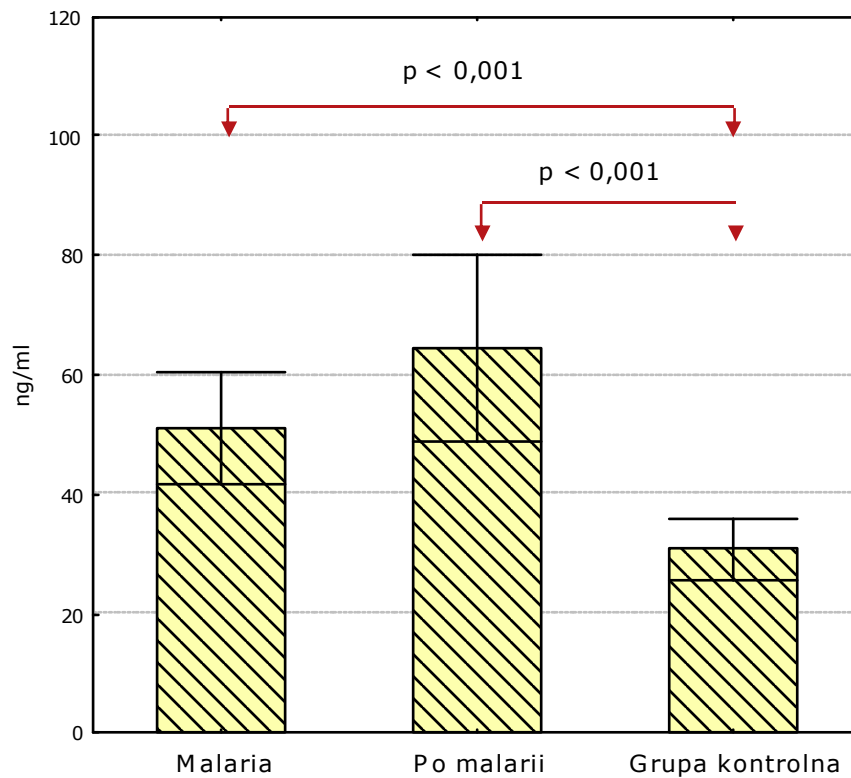
Nie obserwowano znamienych statystycznie różnic w stężeniu przeciwciał przeciwko Hsp60 pomiędzy chorymi z pierwszą w życiu malarią, a dziećmi, których opiekunowie podawali w wywiadzie uprzednio przebyte epizody zimnicy.

Nie obserwowano także znamienych korelacji pomiędzy wiekiem pacjentów angolskich z zimnicą, a surowicznym poziomem tych przeciwciał.

5.5.4 Stężenia przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy krwi dzieci angolskich z zimnicą przed leczeniem oraz po przebytej chorobie

Przeciwciała przeciwko Hsp60

Średnie stężenie przeciwciał przeciwko Hsp60 w surowicy krwi dzieci po przebytej zimnicy wynosiło 64,43 ng/ml i nie różniło się istotnie od poziomu badanych przeciwciał u tych samych chorych przed leczeniem, u których otrzymano wartość 50,89 ng/ml (Rycina 50, str. 119). Obie te wartości były natomiast znamienne statystycznie wyższe niż średnie stężenie przeciwciał przeciwko Hsp60 u osób z grupy kontrolnej, w której wynosiło ono 30,82 ng/ml ($p < 0,00001$).



Rycina 50. Stężenie przeciwciał przeciwko Hsp60 w surowicy krwi dzieci z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej. Dane wyrażają średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM). Zaznaczono strzałkami różnice statystycznie

6 Dyskusja

Brak skutecznej szczepionki, narastająca lekoopomość zarodźców malarii oraz niezadawalające wyniki terapii ciężkich postaci inwazji *Plasmodium* spp. sprawiają, iż zimnica stanowi wciąż jeden z najważniejszych problemów zdrowia publicznego w krajach strefy tropikalnej. W Polsce w ciągu ostatnich lat obserwuje się z kolei niepokojąco wysoką zapadalność i śmiertelność w przebiegu przywlekanej malarii. Do przyczyn tego zjawiska należy zaliczyć niedostateczne stosowanie profilaktyki przeciwmalarycznej wśród ciągle rosnącej liczby osób podróżujących, niski poziom diagnostyki parazytologicznej w wielu ośrodkach medycznych, a przede wszystkim jej opóźnienie względem momentu wystąpienia objawów. Niemałe znaczenia mają również błędy terapeutyczne, a wśród nich - zbyt późne wdrożenie intensywnych form leczenia u chorych tego wymagających (Nahorski i wsp. 2007).

Dlatego wciąż poszukuje się nowych, efektywnych wskaźników diagnostycznych, pozwalających na rozpoznanie przypadków zimnicy zagrożonych ciężkim przebiegiem. W praktyce klinicznej, najczęściej stosowanym parametrem o znaczeniu rokowniczym u chorych z inwazją *Plasmodium* jest parazytemia (Chiwakata i wsp. 2001). Czułość mikroskopowego badania krwi w kierunku malarii zależy jednak od doświadczenia personelu laboratoryjnego. U osób wykonujących badanie poza strefą endemiczną jest ona wyraźnie niższa niż wśród pracowników laboratoriów w rejonach o wysokiej zapadalności na zimnicę (Myjak i wsp. 2004). Odpowiednie doświadczenie w rozpoznawaniu gatunku zarodźca oraz ustaleniu odsetka zarażonych erytrocytów w warunkach naszego kraju posiada zaledwie kilka ośrodków referencyjnych. Alternatywne parametry biochemiczne lub immunologiczne, związane z ciężką malarią, przyczynić się mogą do poprawy w zakresie identyfikacji chorych o wysokim ryzyku powikłanego przebiegu zimnicy wśród przypadków przywlekanej inwazji *Plasmodium* spp. (Chiwakata i wsp. 2001). Także w rejonach endemicznych, czyli najczęściej w krajach rozwijających się, usprawnienie różnicowania pacjentów z łagodną i ciężką klinicznie malarią, na poziomie nieskomplikowanej diagnostyki ambulatoryjnej, mogłoby polepszyć

rokowanie u tych chorych poprzez optymalizację decyzji o wdrożeniu leczenia w warunkach szpitalnych.

Ponadto w sytuacji wciąż niezadawalających wyników terapeutycznych i śmiertelności z powodu zimnicy mózgowej sięgającej 20%, poszukuje się nowych form interwencji leczniczej. Wykazanie zależności między charakterem odpowiedzi immunologicznej w tej chorobie, a stopniem zaburzeń narządowych i metabolicznych wydaje się obiecujące ze względu na możliwość zastosowania terapii immunomodulacyjnej, tym bardziej iż jej pierwsze próby przyniosły obiecujące wyniki (Looareesuwan i wsp. 1999).

Powyzsze przesłanki stały się podstawą do przeprowadzenia badań nad udziałem wybranych cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w przebiegu malarii u pacjentów w różnych grupach wiekowych: u dorosłych z przywleczoną malarią oraz u dzieci zamieszkałych w endemicznym rejonie występowania tej choroby. Wspólną cechą obu tych populacji jest fakt podobnego narażenia na zachorowanie i pełnoobjawowy przebieg zimnicy, wobec braku wykształcenia swoistej, częściowej odporności przeciwmalarycznej u większości badanych pacjentów.

Dobór analizowanych cząsteczek wynikał z danych z piśmiennictwa oraz rezultatów prac prowadzonych w Zakładzie Parazytologii Tropikalnej MIMMIT (Wroczyńska i wsp. 2005). Szeroki wybór cytokin włączonych do badań podyktowany był także opisanymi we wstępie do niniejszej rozprawy zjawiskami dotyczącymi ich aktywności, takimi jak: plejotropowe działanie, antagonizmy pomiędzy poszczególnymi cząsteczkami, synergizm oraz redundancja. W ten sposób postanowiono uwzględnić doniesienia dotyczące patogenezy zespołu dysfunkcji wielonarządowej, w których sugeruje się odmienność właściwości sieci cytokin w porównaniu do tych samych cząsteczek działających w układach wyizolowanych (Modzelewski 1996). Z uwagi na wysuniętą w niektórych pracach hipotezę dotyczącą udziału tzw. „burzy cytokinowej” w patogenezie malarii, jak również postulowaną rolę równowagi pomiędzy ekspresją poszczególnych interleukin, wybrano do badań cząsteczki o charakterze zarówno pro-, jak i przeciwzapalnym (Clark 2007a).

W celu oznaczenia surowiczych stężeń TNF, IFN γ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18 oraz przeciwciał przeciwko Hsp60 i Hsp70 wykorzystano technikę ELISA. Metoda ta w ciągu ostatnich kilkunastu lat znalazła szerokie zastosowanie w badaniach nad różnorodnymi wykładnikami odpowiedzi immunologicznej i zapalnej, w tym także ocenie aktywności cytokin na poziomie ogólnoustrojowym (Lyke i wsp. 2004). Warto jednak przypomnieć, iż w pewnych sytuacjach immunoenzymatyczna, ilościowa detekcja białka nie jest równoznaczna z określeniem jego aktywności

biologicznej, z uwagi na występowanie w surowicy naturalnych antagonistów lub receptorów błonowych „złuszczonych” poza komórki. W przypadku cytokin, na wyniki badań tego typu wpływać może również relatywnie krótki okres półtrwania większości z nich w surowicy, a co za tym idzie czas pobrania próby względem momentu zadziałania bodźca do ich produkcji i uwalniania. Należy również pamiętać, iż surowicze stężenia cytokin nie muszą odpowiadać ich ekspresji na poziomie komórkowym (Day i wsp. 1999). Niezależnie od rozważenia powyższych ograniczeń, przy wyborze metodyki badań kierowano się również jej przydatnością w warunkach niedostatków ekonomicznych i infrastrukturalnych opieki zdrowotnej krajów rozwijających się (Jason i wsp. 2001).

W pracach dotyczących inwazji *P. vivax*, najwyższe wartości stężenia TNF oraz IL-6 w surowicy obserwowano podczas napadu gorączki malarycznej (Kraunaweera i wsp. 1992). U chorych włączonych do badań własnych za priorytetowe uznano pobranie krwi przed włączeniem swoistego leczenia, niezależnie od stwierdzonej wówczas temperatury ciała i objawów towarzyszących. Taki sposób pozyskiwania materiału podyktowany był doniesieniami, w których opisywano względnie szybkie obniżenie stężeń cytokin w surowicy chorych po zastosowaniu terapii przedwzimniczej (Hugosson i wsp. 2006). Celem uwzględnienia opisywanego w literaturze dobowego rytmu wydzielania cytokin, krew od osób z grup kontrolnych pobierano zawsze o tej samej porze dnia, czyli w godzinach porannych. U pacjentów z zimnicą, z przyczyn wymienionych powyżej, materiał pozyskiwano możliwie jak najszybciej po ustaleniu rozpoznania.

Mimo dość obszernego piśmiennictwa dotyczącego poruszanego zagadnienia, znaczenie cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w malarii wciąż pozostaje nie w pełni zbadane, a wyniki publikowanych prac są rozbieżne. Dotychczasowe prace najczęściej obejmują wyłącznie pacjentów z rejonów endemicznego występowania zimnicy, a stratyfikacja ciężkości przebiegu ich choroby niejednokrotnie ograniczona jest do oceny klinicznej oraz wybiórczych parametrów laboratoryjnych i odbiega od zalecanej przez WHO (WHO 2000). Warto podkreślić, iż badania własne w Angoli, dzięki odpowiedniemu wyposażeniu diagnostycznemu przeprowadzone zostały w całości w obrębie Centrum Medycznego im. Św. Łukasza w Kifangondo i obejmowały pełną ocenę przedmiotową i podmiotową oraz szeroki zakres analiz laboratoryjnych. Pozwoliło to na rozpoznanie większości z postaci klinicznych ciężkich inwazji *P. falciparum*.

Z kolei wartość opublikowanych jak dotąd prac dotyczących udziału cytokin w przywleczonej zimnicy nierzadko obniża niewielka liczba chorych objętych analizą (Ramharter i wsp. 2003), a w szczególności nieobecność wśród nich pacjentów z

ciężkim przebiegiem choroby (Torre i wsp. 2001). Tego ograniczenia udało się uniknąć w niniejszym badaniu, dzięki włączeniu pacjentów hospitalizowanych w ciągu kilku lat w dwóch polskich ośrodkach, w których leczona jest większość chorych z zimnicą importowaną do Polski. Znaczenie przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego u osób z przywleczoną malarią nie było jak dotąd tematem żadnej publikacji.

W przedstawionej pracy, w przeciwieństwie do badań innych autorów, podjęto próbę oceny relacji pomiędzy wybranymi parametrami odpowiedzi immunologicznej, a przebiegiem klinicznym zimnicy zarówno u pacjentów dorosłych z przywleczoną chorobą, jak i chorych w wieku rozwojowym zamieszkujących holoendemiczny rejon występowania malarii. Wyczerpujący, surowiczy profil cytokinowy oraz występowanie przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego badano u pacjentów z malarią niezależnie od jej etiologii, a kwalifikację do grup chorych o łagodnym i ciężkim przebiegu inwazji przeprowadzono w oparciu o kryteria WHO (WHO 2000). U wszystkich pacjentów hospitalizowanych w Polsce, przeprowadzone dodatkowo badania laboratoryjne pozwoliły na wykluczenie innych aktywnych inwazji pasożytniczych, natomiast u chorych angolskich przeprowadzono jedynie diagnostykę kliniczną w tym zakresie.

W tak zdefiniowanych grupach stwierdzono istotne zależności pomiędzy surowiczym stężeniem większości spośród badanych parametrów, a przebiegiem choroby, zarówno wśród dorosłych z przywleczoną zimnicą, jak i chorych dzieci angolskich. Przeprowadzono także analizę przydatności diagnostycznej wybranych zmiennych za pomocą oceny krzywych ROC. Dzięki użyciu tej metody przedstawiono potencjalne możliwości wykorzystania stężeń cytokin w różnicowaniu przypadków zimnicy o łagodnym i ciężkim przebiegu.

6.1 Analiza surowiczych stężeń cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w zależności od etiologii zimnicy i parazytemii

Jak wspomniano powyżej, większość publikacji dotyczących znaczenia cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w zimnicy poświęcona jest inwazjom o etiologii *P. falciparum*, który jest najczęstszym gatunkiem wywołującym malarię w Afryce Subsaharyjskiej (Cianciara i Juszczak 2007). Te uwarunkowania epidemiologiczne odzwierciedla charakterystyka zarażeń w grupie pacjentów angolskich włączonych do badań, obejmującej wyłącznie dzieci zarażone zarodźcem

sierpowatym. Chorych z przywleczoną do Polski malarią rekrutowano niezależnie od rozpoznanego gatunku *Plasmodium*. W tegorocznej pracy pochodzącej z rejonu niestabilnej transmisji malarii w Brazylii, zauważono, że inwazje *P. falciparum* i *P. vivax* charakteryzują się podobnym profilem cytokinowym w zakresie surowiczych stężeń TNF, IFN γ , IL-10, oraz IL-12 (Femandes i wsp. 2008). Potwierdzają to uzyskane wyniki własne, w których nie obserwowano znamiennych statystycznie różnic w poziomach stężeń badanych cytokin w surowicy dorosłych pacjentów z przywleczoną inwazją poszczególnymi gatunkami zarodźca. Nie stwierdzono również istotnych różnic w stężeniach przeciwciał przeciwko Hsp60 i Hsp70 pomiędzy grupami chorych wyróżnionymi na podstawie etiologii malarii.

W badanej grupie dorosłych chorych z Polski 26% pacjentów spełniało kryteria ciężkiej malarii (WHO 2000). Podobną częstość obserwowano we wcześniejszych publikacjach dotyczących importowanej zimnicy (Jennings i wsp. 2006, Trampuz i wsp. 2003). Wśród badanych przez mnie pacjentów z ciężkim przebiegiem choroby dominowały zarażenia *P. falciparum*, ponadto w tej grupie chorych rozpoznano także malarię o etiologii mieszanej oraz izolowaną inwazję *P. vivax*. Przebieg choroby u tego ostatniego pacjenta charakteryzował się wstrząsem, obrzękiem płuc oraz zespołem rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego. Powikłania takie, tradycyjnie wiązane są z malarią o etiologii *P. falciparum* i występującą w przebiegu tej choroby sekwestracją zarażonych erytrocytów w naczyniach włosowatych i drobnych naczyniach krążenia żylnego oraz ich cytoadherencją do komórek śródbłonka (Stelmach i wsp. 2001). W ciągu ostatnich lat, w literaturze opisano jednak co najmniej kilkadziesiąt przypadków inwazji *P. vivax* o ciężkim, typowym dla *P. falciparum* przebiegu (Kochar i wsp. 2005, Price i wsp. 2007b). Badania takie mogły zostać przeprowadzone dzięki rozwojowi molekularnych technik diagnostycznych, za pomocą których wykluczono u analizowanych chorych współwystępującą inwazję *P. falciparum*, którą w praktyce klinicznej podejrzewa się przy tego typu objawach. Uważa się jednak, iż w zarażeniach *P. vivax* nie obserwuje się zjawiska sekwestracji zarażonych krwinek, przypadki takie mogą więc potwierdzać rolę niekontrolowanej reakcji zapalnej i jej mediatorów, w szczególności zapalnych cytokin, w rozwoju zespołu dysfunkcji wielonarządowej w zimnicy, niezależnie od występowania sekwestracji i cytoadherencji (Clark i wsp. 2006). Wspomniany przypadek pacjenta z inwazją *P. vivax* w badanej grupie zdaje się potwierdzać tak sformułowaną hipotezę.

Warto zauważyć, iż w grupie chorych z przywleczoną zimnicą obserwowano korelację pomiędzy parazytemią, a surowiczym stężeniem IFN γ , IL-6, IL-10 oraz IL-18, przy czym najsilniej wyrażony okazał się związek intensywności inwazji z

poziomem IL-6 u tych pacjentów. Korelację pomiędzy surowiczym stężeniem IL-6, a parazytemią, niezależnie od gatunku zarodźca stanowiącego czynnik etiologiczny malarii opisano w jedynej jak dotąd pracy obejmującej chorych z importowaną zimnicą o różnej etiologii tj. zarażonych *P. vivax* lub *P. falciparum* (Kern i wsp. 1989). Należy jednak pamiętać, iż odsetek zarażonych erytrocytów obliczony na podstawie badania rozmazu krwi obwodowej nie musi odzwierciedlać całkowitej liczby pasożytów w organizmie żywiciela, ze względu na zjawisko sekwestracji występujące w inwazjach *P. falciparum*. Ponadto, u pacjentów z przywleczoną do Polski zimnicą należy uwzględnić ewentualny wpływ stosowanej przed zachorowaniem chemioprophylaktyki przeciwzimmniczej na wynik badania mikroskopowego. U dzieci angolskich nie wykazano z kolei istotnych zależności pomiędzy surowiczymi stężeniami badanych cytokin, a parazytemią.

6.2 Analiza surowiczych stężeń cytokin u pacjentów dorosłych z przywleczoną zimnicą oraz u dzieci angolskich z malarią

6.2.1 Czynniki martwicy nowotworów

TNF jest przez wielu badaczy uważany za kluczowy czynnik aktywujący kaskadę cytokin w reakcjach zapalnych. Cząsteczka ta bierze także udział w prezentacji antygeny przez limfocyty oraz aktywuje makrofagi, przez co wzmaga fagocytozę i wewnątrzkomórkowe zabijanie drobnoustrojów (Oppenheim i wsp. 2001). Jednocześnie, w wyniku łącznego działania TNF i zależnych od niego mediatorów wtórnych, może rozwinąć się niekorzystna odpowiedź biologiczna z zespołem zaburzeń m. in. sercowo-naczyniowych, hematologicznych i metabolicznych (Tchórzewski 1998). Obecnie czynnikowi martwicy nowotworów oraz licznym innym cytokinom zapalnym przypisuje się podwójną rolę w patogenezie niektórych chorób zakaźnych. Uważa się je zarówno za mediatory niezbędne w neutralizacji i eliminacji drobnoustroju, jak i przyczyniające się do uszkodzeń narządowych w przypadku ich nadmiernej sekrecji. Hipotezę taką po raz pierwszy przedstawiono już ponad 20 lat temu, właśnie na podstawie badań dotyczących malarii, a w szczególności przebiegu inwazji u myszy zarażonych *Plasmodium vinckei* (Clark i wsp. 1981). Kolejne obserwacje wykazały, iż TNF bierze podobny udział w różnych reakcjach zapalnych, co dotyczy nie tylko zimnicy, ale również posocznicy bakteryjnej, czy ogólnoustrojowych infekcji wirusowych (Clark 2007b).

W niniejszych badaniach stwierdzono istotnie wyższe stężenia TNF w surowicy chorych z inwazją *Plasmodium* spp. w porównaniu do grupy kontrolnej, zarówno wśród pacjentów dorosłych z przywleczoną do Polski zimnicą, jak i u dzieci angolskich. Obserwacja ta zgodna jest z wynikami prac innych autorów, w odniesieniu do osób dorosłych z przywleczoną malarią (Kem i wsp. 1989) i pacjentów w wieku rozwojowym (Perkins i wsp. 2000). Nie wykazano natomiast znaczących różnic pomiędzy surowiczym stężeniem tej cytokiny pomiędzy grupami chorych z łagodnym i ciężkim przebiegiem malarii w obu badanych populacjach. Relacje takie obserwowano uprzednio w pracach dotyczących dzieci afrykańskich z zimnicą mózgową (Grau i wsp. 1989) oraz głęboką niedokrwistością w przebiegu malarii (Luty i wsp. 2000). Wysokie stężenia TNF stwierdzono także u dorosłych z Wietnamu z rozpoznaną ciężką inwazją *P. falciparum*, przy czym najwyższe wartości dotyczyły tych chorych, u których malaria zakończyła się zgonem (Day i wsp. 1999). Rozbieżności pomiędzy wynikami wymienionych powyżej publikacji, a rezultatami badań własnych tłumaczyć może kilka czynników. Jednym z nich są zapewne różne kryteria włączenia chorych przez poszczególnych autorów. Parametry kliniczne i laboratoryjne identyfikujące ciężką malarię ogłoszone przez WHO w roku 1990 (WHO 1990) zostały istotnie poszerzone dziesięć lat później (WHO 2000), a znaczenie tego faktu zdają się potwierdzać wyniki pracy pochodzącej z rejonu endemicznego występowania zimnicy w Mali z roku 2004, której autorzy także nie stwierdzili różnic w zakresie stężenia TNF pomiędzy chorymi z łagodnym i ciężkim przebiegiem inwazji (Lyke i wsp. 2004). Także w badaniach z roku 2006 nie obserwowano takich zależności dotyczących TNF (Casals-Pascual i wsp. 2006). Warto zauważyć, iż w grupie chorych włączonych do tego ostatniego badania nie stwierdzono zgonów, podobnie jak wśród pacjentów angolskich. Większość badań analizujących rolę TNF w tej chorobie u dzieci afrykańskich dotyczy przede wszystkim pacjentów z głęboką niedokrwistością wywołaną inwazją *P. falciparum* (Luty i wsp. 2000). Ten aspekt malarii można kojarzyć ze wykazanim *in vitro* supresyjnym wpływem TNF na proces erytropoezy (Oppenheim i wsp. 2001). U pacjentów angolskich głęboką niedokrwistość rozpoznano względnie często, bo u ponad 30% chorych z zimnicą o ciężkim przebiegu, jednak niskie stężenie hemoglobiny nie było wyłącznym kryterium włączenia do tej grupy. Wydaje się więc, iż ekspresja TNF w malarii może różnić się w poszczególnych postaciach klinicznych malarii.

Ponadto, wśród badanych chorych z przywleczoną zimnicą jedynie dwa przypadki zakończyły się śmiertelnie, natomiast w grupie angolskiej nie stwierdzono ani jednego zgonu. W kilku zaś wcześniejszych publikacjach obserwowano związek

szczególnie wysokiego surowiczego stężenia TNF z zimnicą o śmiertelnym przebiegu (Day i wsp. 1999, Kwiatkowski i wsp. 1990). Można więc przypuszczać, iż wysokie stężenia TNF w surowicy dotyczą przede wszystkim tych przypadków malarii, w których dochodzi do zgonu z powodu inwazji.

Należy również zauważyć, iż w badaniach własnych w grupie osób z ciężkim przebiegiem zimnicy wykazano znacząco wyższe surowicze stężenia IL-10, zarówno wśród chorych z Polski jak i Angoli. Brak istotnych różnic pomiędzy średnim stężeniem TNF u pacjentów z łagodnym i ciężkim przebiegiem choroby może być wyjaśniony działaniem tej właśnie przeciwzapalnej interleukiny, ze względu na jej hamujący wpływ na uwalnianie TNF z makrofagów (Gołąb i wsp. 2002). Można wysunąć hipotezę, iż początkowy wzrost ekspresji i wydzielania TNF w przebiegu zarażenia *Plasmodium* u badanych pacjentów z ciężką malarią pociągnął za sobą wzmożoną produkcję innych cytokin prozapalnych (w tym IL-6), co w efekcie sprzężenia zwrotnego wywołało odpowiedź przeciwzapalną zdolną do obniżenia stężenia TNF w surowicy tych chorych. Podobnie jak w wynikach uzyskanych przez innych autorów, na to zjawisko może wywierać wpływ m. in. długość okresu, po jakim u badanych chorych rozpoznano inwazję zarodźca zimnicy i pobrano materiał do badań (Lyke i wsp. 2004). W obu grupach chorych z ciężką malarią, tj. polskiej i angolskiej, okres ten można ocenić jako dość długi (średnio 6,5 i 5,3 dnia od momentu pojawienia się dolegliwości).

Przeprowadzono również oznaczenia stężenia TNF w surowicach osób po przebytej malarii. U pacjentów dorosłych z Polski średnie stężenie tej cytokiny uległo znaczącemu obniżeniu w porównaniu do wartości uzyskanych u tych samych chorych przed leczeniem. U pacjentów angolskich nie zaobserwowano podobnego zjawiska, to znaczy nie wykazano istotnych różnic pomiędzy stężeniem TNF u chorych z malarią przed leczeniem i po ustąpieniu objawów choroby. Wiązać się to może z czasem, po jakim pacjenci zgłaszali się celem wykonania badań kontrolnych. U chorych z przywleczoną malarią był to okres od 4 do 8 tygodni po wypisie z Kliniki, podczas gdy u dzieci angolskich krew do badań kontrolnych pobierano po jednym do dwóch tygodni po leczeniu. W przypadku pacjentów z Angoli decyzja taka została podjęta na podstawie doświadczeń wyniesionych z wcześniejszych prac prowadzonych w Ośrodku w Kifangondo (Kryger i wsp. 2004). Stwierdzono wówczas, iż okres do dwóch tygodni charakteryzuje się optymalnym odsetkiem pacjentów zgłaszających się celem wykonania badań kontrolnych, natomiast próby jego wydłużenia powodują znaczny spadek zgłaszalności chorych.

Jak dotąd opublikowano nieliczne prace porównujące stężenie TNF w surowicy chorych z malarią w okresie objawowym i po leczeniu. W jednej z nich

wykazano istotne obniżenie stężenia TNF w osoczu u dzieci afrykańskich po przebytej zimnicy w porównaniu do wartości otrzymanych przed leczeniem. Badania kontrolne wykonano jednak u tych osób po 6 miesiącach od momentu pobrania materiału podczas choroby i po wykluczeniu kolejnego zarażenia *Plasmodium* spp. lub nawrotu malarii przynajmniej przez 1,5 miesiąca przed pobraniem próby kontrolnej (Luty i wsp. 2000). Jest to okres o wiele dłuższy niż przyjęty w pracy własnej, co może wyjaśnić różnice w uzyskanych wynikach. Z kolei w badaniach dotyczących chorych z importowaną inwazją *P. falciparum* i *P. vivax*, u których oznaczano stężenie TNF w surowicy po 7 dniach od włączenia leczenia stwierdzono jego spadek względem wartości uzyskanych zaraz po rozpoznaniu malarii, jednak zjawisko to dotyczyło nie wszystkich chorych włączonych do badania i autorzy nie wykazali istotności statystycznej w odniesieniu do poczynionej obserwacji (Kern i wsp. 1989)

Ciekawą obserwacją poczynioną w niniejszej pracy, w obu badanych populacjach, jest stwierdzone podwyższone stężenie TNF w surowicach pacjentów po przebytej zimnicy w porównaniu do odpowiednich grup kontrolnych, złożonych z osób zdrowych. Zjawisko to może sugerować utrzymywanie się bezobjawowego stanu zapalnego u pacjentów pomimo efektywnego klinicznie leczenia i ustąpienia parazytemii w badaniach mikroskopowych, co wymaga dokładniejszego wyjaśnienia.

W interpretacji przedstawionych wyników, tak jak w przypadku każdej pracy analizującej surowicze stężenie TNF jako wyraz systemowej ekspresji tej cytokiny, należy ponadto wziąć pod uwagę fakt, iż znaczenie biologiczne może mieć nie tylko bezwzględne stężenie TNF w surowicy, ale także jego wpływ na syntezę i uwalnianie innych cytokin i mediatorów zapalnych oraz oddziaływanie rozpuszczalnych receptorów dla tej cząsteczki.

6.2.2 Interferon γ

Interferon γ jest cytokiną odpowiedzialną m. in. za aktywację makrofagów w zarażeniach pasożytniczych. W inwazjach pierwotniaków odgrywa podstawową rolę zarówno w mechanizmach odporności wrodzonej, jak i swoistej odporności typu komórkowego (Abbas i wsp. 2005). W badaniach z użyciem myszy wykazano korzystne, prozapalne działanie tej cytokiny we wczesnej fazie inwazji *P. chabaudi*. Z drugiej strony stwierdzono także iż nadmierna produkcja IFN γ może przyczynić się do rozwoju ciężkich postaci malarii, w tym zimnicy mózgowej u tych zwierząt. Podobne znaczenie przypisuje się IFN γ w patogenezie zimnicy u ludzi (Artavanis-Tsakonas i wsp. 2003).

W pracy własnej obserwowano znacząco wyższe stężenie IFN γ w surowicach chorych z malarią niezależnie od stopnia ciężkości przebiegu inwazji u chorych polskich i angolskich. Obserwacje te zgodne są z wynikami uzyskanymi w kilku dotychczasowych pracach dotyczących chorych z rejonów endemicznych (Kwiatkowski i wsp. 1990) oraz pacjentów z importowaną zimnicą (Kem i wsp. 1989).

Na podstawie rezultatów wcześniejszych badań na modelach zwierzęcych, niektórzy autorzy sugerowali związek nasilonej produkcji i uwalniania IFN γ z ciężkością przebiegu choroby także u ludzi (Malaguarnera i wsp. 2002). Podobne wnioski wysunięto na podstawie stwierdzonych wyższych osoczowych stężeń IFN γ u pacjentów afrykańskich z jawną klinicznie malarią w porównaniu do osób z parazytemią przebiegającą bezobjawowo (Riley i wsp. 1991). W kilku przeprowadzonych jak dotąd badaniach nie zauważono jednak bezpośredniego związku nasilonej ogólnoustrojowej ekspresji IFN γ z zimnicą o ciężkim przebiegu, jak i ryzykiem powikłań czy zgonu. Prace porównujące chorych z łagodną i ciężką malarią nie wykazały znaczących różnic w zakresie surowicznych stężeń tej cząsteczki (Jennings i wsp. 2006, Kwiatkowski i wsp. 1990, Luty i wsp. 2000). Także w badaniach własnych nie wykazano istotnych różnic pomiędzy średnim stężeniem IFN γ w surowicach chorych z łagodnie i ciężko przebiegającą inwazją *Plasmodium* w obu badanych populacjach.

Wiadomo, iż wydzielanie interferonu γ przez komórki układu immunologicznego, w tym limfocyty T i makrofagi, w odpowiedzi na zarażenie zarodźcem malarii podlega regulacji przez IL-12 oraz IL-18. Niektórzy autorzy uważają wręcz, iż synergizm między tymi dwiema cząsteczkami jest warunkiem niezbędnym do produkcji IFN γ (Dinarelo, 1999). W surowicach chorych z ciężką inwazją *Plasmodium* spp. w obu analizowanych populacjach stwierdzono wysokie surowicze stężenia IL-18, jednakże nie obserwowano podobnego nasilenia ekspresji w zakresie IL-12. Co więcej, u pacjentów z przywleczoną zimnicą obserwowano istotnie niższe poziomy tej ostatniej cytokiny. Podobnie jak w przypadku TNF, sytuacja taka wiązać się może z opisanym wcześniej supresyjnym oddziaływaniem IL-10. Wykazano bowiem, iż IL-10 hamuje produkcję IL-12 przez aktywowane makrofagi i może w ten sposób obniżać wydzielanie IFN γ zależne od IL-12 (Abbas i wsp. 2005). Niniejsza praca nie rozstrzyga, czy powyższe zjawiska mają korzystny wpływ na przebieg kliniczny zimnicy. Relacje te nie były także wcześniej analizowane w pracach dotyczących roli cytokin w malarii, ze względu na wybiórczy zazwyczaj wybór tych cząsteczek włączanych do badań.

W dotychczasowych publikacjach bardzo rzadko poddawano ocenie stężenia

IFN γ u pacjentów po przebytej zimnicy. Analizę obejmującą to zagadnienie przedstawiono w odniesieniu do dzieci afrykańskich, uzyskując istotne obniżenie surowiczego stężenia IFN γ w próbkach pobranych 6 miesięcy po leczeniu malarii w porównaniu do wartości uzyskanych w trakcie występowania objawów inwazji (Luty i wsp. 2005). Podobny spadek poziomu tej cytokiny w surowicach pacjentów po przebytej malarii zaobserwowano w badaniach własnych, zarówno u dzieci angolskich, jak i dorosłych z przywleczoną zimnicą. Ze względu na dużo krótszy okres, po którym pozyskiwano materiał do badań kontrolnych w obu grupach włączonych do niniejszej pracy, rezultaty takie wskazują na wyraźną dynamikę zmian stężeń IFN γ w przebiegu inwazji *Plasmodium* spp.

6.2.3 Interleukina 6

IL-6 stanowi kolejne znaczące ogniwo w odpowiedzi zapalnej i immunologicznej, zarówno o charakterze nieswoistym, jak i nabytym (Oppenheim i wsp. 2001).

W niniejszych badaniach obserwowano znacząco wyższe stężenia tej interleukiny u pacjentów z malarią o łagodnym i ciężkim przebiegu w porównaniu do odpowiednich grup kontrolnych. Różnice te szczególnie wyraźnie zaznaczone były wśród pacjentów z Polski, u których średnie stężenie IL-6 w surowicy chorych z ciężką zimnicą przewyższało ponad 40-krotnie surowiczy poziom tej cytokiny u osób zdrowych. U pacjentów angolskich, pomimo potwierdzenia istotności statystycznej stwierdzonych zależności, uzyskane wartości nie charakteryzowały się aż takimi różnicami, a średnie stężenie IL-6 u chorych z łagodnym przebiegiem inwazji *P. falciparum* (37,53 pg/ml) różniło się nieznacznie od stężenia tej interleukiny u dzieci z grupy kontrolnej (32,55 pg/ml). Wydaje się, iż odmienności te mogą tłumaczyć stwierdzone przez innych autorów różnice w produkcji i wydzielaniu cytokin prozapalnych przez komórki układu odpornościowego w poszczególnych grupach wiekowych (O'Mahony i wsp. 1998, Lilic i wsp. 1997). Na podstawie wywiadu lekarskiego nie można także wykluczyć przebycia zimnicy w nieodległej przeszłości przez osoby włączone do grupy kontrolnej, co również mogłoby wywierać wpływ na poziom cytokin w surowicy. Ponadto, ze względu na powszechność innych schorzeń pasożytniczych w krajach tropikalnych, należy uwzględnić możliwość ich występowania u Angolczyków. Dostępna baza diagnostyczna i koszty pozwoliły na wykonanie pełnego zakresu analiz laboratoryjnych w kierunku chorób inwazyjnych jedynie u pacjentów z Polski. Przeprowadzone u dzieci afrykańskich badanie kliniczne nie pozwala na wykluczenie pasożytów o przebiegu bezobjawowym lub skąpoobjawowym, które mogą modulować ekspresję badanych cytokin (Turner i

wsp. 2008). Przypuszczenie takie potwierdzają badania porównujące profil wydzielanych cytokin przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) u zdrowych Europejczyków i Afrykanów, w których wykazano znaczące różnice jakościowe i ilościowe zarówno wśród dzieci, jak i dorosłych (Wilfing i wsp. 2001).

Niezależnie od powyższych uwag, tak u chorych z Polski, jak i pacjentów z Angoli, wykazano znaczącą statystycznie różnicę pomiędzy średnim stężeniem IL-6 w surowicach osób z łagodnym i ciężkim przebiegiem zimnicy. Obserwacja ta świadczyć może o istotnej roli tej cytokiny w patogenezie ciężkiej malarii i jest zgodna z rezultatami prac innych autorów (Lyke i wsp. 2004, Day i wsp. 1999). Z kolei w pracy dotyczącej pacjentów z zimnicą pochodzących z rejonu endemicznego występowania tej choroby w Indiach stwierdzono odwrotną zależność pomiędzy przebiegiem malarii, a stężeniem IL-6 w surowicy chorych (Prakash i wsp. 2006). Rozbieżności między tą publikacją, a wynikami własnymi wynikać mogą jednak z różnic w przyjętych kryteriach ciężkiej malarii, a co za tym idzie – charakterystyce klinicznej chorych włączonych do badań. Ponadto w pracy tej uwzględniono jedynie dorosłych chorych z inwazją *P. falciparum*, podczas gdy wśród pacjentów z Polski włączonych do badań rozpoznawano inwazje także pozostałymi gatunkami *Plasmodium*. Warto dodać, iż w dotychczasowych badaniach dotyczących przywleczonej malarii o różnej etiologii, obserwowano wyższe stężenia IL-6 w surowicach chorych z ciężkim przebiegiem choroby, w porównaniu do wartości uzyskanych u pacjentów z łagodną zimnicą (Kern i wsp. 1989). Wysokie surowicze stężenie tej cząsteczki stwierdzano również u dorosłych z uszkodzeniem wątroby w przebiegu malarii wywołanej zarażeniem *P. vivax* (Yeom i wsp. 2003).

Bardzo nieliczne publikacje dotyczą poziomów IL-6 w surowicy pacjentów po przebytej inwazji *Plasmodium* spp. W badaniach własnych zaobserwowano istotne obniżenie się średniego surowiczego stężenia tej interleukiny u osób po przebytej zimnicy w porównaniu do wartości uzyskanych przed leczeniem. Zjawisko to dotyczyło zarówno dorosłych z przywleczoną do Polski zimnicą, jak i dzieci angolskich. U pacjentów polskich poziom IL-6 oznaczony podczas wykonywania badań kontrolnych po 4 do 8 tygodniach po ustąpieniu objawów malarii nadal jednak był znacząco wyższy niż w grupie kontrolnej złożonej z osób zdrowych. Występowanie takich różnic nie zostało jak dotąd opisane w literaturze i – podobnie jak w przypadku pozostałych analizowanych cytokin – wymaga dalszych badań. U mieszkańców Angoli poziom IL-6 oznaczony po jednym do dwóch tygodni po przebytej chorobie obniżył się do wartości porównywalnych z uzyskanymi w grupie kontrolnej, jednak tłumaczyć można to nie tyle dynamiką zmian stężenia tej interleukiny w przebiegu zarażenia zarodźcem malarii, co opisanym wyżej

relatywnie wysokim stężeniem IL-6 u dzieci włączonych do grupy kontrolnej.

6.2.4 Interleukina 10

Doniesienia ostatnich lat pozwalają przypuszczać, iż IL-10 jest jednym z kluczowych czynników immunoregulatorowych w infekcjach wirusowych i bakteryjnych oraz zarażeniach pasożytniczych, w tym w inwazjach pierwotniaków. Interleukina ta przyczynia się do hamowania mechanizmów nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, jak również odpowiedzi Th1 zależnej oraz wykazuje działanie przeciwzapalne, co może prowadzić do redukcji niepożądanych zjawisk immunopatologicznych w przebiegu reakcji zapalnej, ale także do upośledzenia kontroli nad drobnoustrojem (Couper i wsp. 2008).

W badaniach własnych wykazano znacząco wyższe stężenia IL-10 w surowicy chorych z malarią, niezależnie od stopnia ciężkości choroby, w porównaniu do grupy kontrolnej w obu analizowanych populacjach. Szczególnie wysokie wartości, podobnie jak w przypadku IL-6, dotyczyły chorych dorosłych z przywleczoną do Polski zimnicą o ciężkim przebiegu, u których obserwowano aż 42 krotnie wyższe średnie surowicze stężenie tej interleukiny w porównaniu do osób zdrowych (Rycina 16, str. 79). Różnice stężeń obserwowane wśród dzieci angolskich nie były aż tak wyrażone, a poziom IL-10 u osób z grupy kontrolnej, aczkolwiek znacząco niższy od wartości stwierdzanych u chorych, nie odbiegał od nich aż tak bardzo, jak miało to miejsce u Polaków. Także w przypadku IL-10, relacje te można próbować wyjaśnić w oparciu o rozpowszechnienie chorób pasożytniczych w tej części Afryki i związane z tym odmienności w ekspresji cytokin u osób włączonych do polskiej i angolskiej grupy kontrolnej. Potwierdzeniem tej hipotezy może być wykazane niedawno zjawisko wzmożonej konstytutywnej sekrecji cytokin immunoregulacyjnych, w tym IL-10 u dzieci Afrykańskich, zamieszkujących regiony o wysokim ryzyku ekspozycji na zarażenia wywoływane przez helminty (Turner i wsp. 2008).

Ważną obserwacją dotyczącą obu badanych populacji jest wykazana znacząca statystycznie różnica pomiędzy średnim stężeniem IL-10 u chorych z ciężkim przebiegiem malarii w porównaniu do osób z łagodnym przebiegiem choroby, stwierdzona zarówno wśród pacjentów angolskich, jak i chorych z zimnicą przywleczoną do Polski. Podobne rezultaty uzyskano wcześniej w pracach dotyczących dzieci afrykańskich z głęboką niedokrwistością lub hiperparazytemią w przebiegu zimnicy *P. falciparum* (Perkins i wsp. 2000), a także dzieci z ciężką malarią definiowaną przez kryteria WHO z roku 2000 (Lyke i wsp. 2004). Co więcej, w badaniu dotyczącym dorosłych chorych z Wietnamu, wykazano związek wysokiego

surowiczego stężenia tej interleukiny z ryzykiem zgonu z powodu zimnicy (Day i wsp. 1999). Wysokie poziomy IL-10 obserwowano także u osób zarażonych *P. vivax* z dysfunkcją wątroby w przebiegu choroby (Yeom i wsp. 2003). Jedynie nieliczne publikacje dotyczą znaczenia IL-10 u dorosłych pacjentów z przywleczoną malarią, a ich autorzy nie wykazali istotnych relacji pomiędzy stężeniem tej cytokiny w surowicy i nasileniem patologicznych zmian narządowych czy metabolicznych związanych z inwazją (Jennings i wsp. 2006, Torre i wsp. 2002). Należy jednak zauważyć, że grupy chorych włączonych do badań w tych pracach oraz w pracy własnej różniły się zarówno pod względem ciężkości przebiegu malarii, jak i charakterystyki epidemiologicznej. W przeciwieństwie do pacjentów analizowanych w niniejszej pracy, w obu wymienionych publikacjach chorzy pochodzili głównie ze środowiska imigrantów z krajów Afryki Subsaharyjskiej, co mogło wiązać się z wcześniejszymi ekspozycjami na zarażenie zarodźcem malarii i wykształceniem pewnego stopnia odporności wyrażającej się odmienną odpowiedzią w zakresie badanych cytokin. Ponadto w jednej z powyższych publikacji nie stwierdzono w ogóle przypadków ciężkiej malarii, ani zgonów z powodu tej choroby (Torre i wsp. 2002).

Wydaje się, iż wysokie surowicze stężenia IL-10 obserwowane u analizowanych pacjentów z ciężkim przebiegiem malarii są przejawem reakcji na kaskadowo narastający ogólnoustrojowy proces zapalny w przebiegu choroby, mającej na celu jego ograniczenie i odzyskanie homeostazy ustroju. Nie jest jednak jasne, czy zjawisko to odgrywa korzystną rolę poprzez wygaszanie reakcji zapalnych indukowanych inwazją *Plasmodium* spp., czy też, hamując odpowiedź immunologiczną w zakresie odporności komórkowej, przyczynia się do nasilenia parazytemii i związanej z tym progresji choroby (Malaguamera i wsp. 2002). Tę ostatnią hipotezę wydają się potwierdzać badania na modelu mysim, które wykazały, że upośledzenie produkcji i wydzielania IL-10 wiąże się z wyższą śmiertelnością tych zwierząt w przebiegu inwazji *P. chabaudi* (Linke i wsp. 1996).

Niezależnie od powyższych rozważań należy podkreślić, iż w obu badanych populacjach surowicze stężenie IL-10 okazało się badaniem o istotnej statystycznie zdolności dyskryminacyjnej w zakresie diagnostyki różnicowej przypadków zimnicy o łagodnym i ciężkim przebiegu. Szczególnie wyraźnie dotyczy to grupy chorych angolskich, u których analiza za pomocą krzywych ROC wykazała, że stężenie tej interleukiny 53,93 pg/ml lub więcej pozwala na rozpoznanie ciężkiej zimnicy z czułością 80% i specyficznością 84%. U chorych z przywleczoną do Polski malarią punkt krytyczny dla IL-10 wynosił 93,95 pg/ml. Dla tej wartości stężenia IL-10 czułość badania obliczono na 64%, natomiast specyficzność na 67%. Ponadto

poziom IL-10 u pacjentów angolskich charakteryzował się największym polem pod krzywą ROC spośród analizowanych wskaźników laboratoryjnych, co pozwala na uznanie oznaczania stężenia IL-10 w surowicy chorych z malarią za badanie przydatne w identyfikacji przypadków zagrożonych ciężkim przebiegiem inwazji, zwłaszcza u dzieci w rejonach endemicznych.

Jak dotąd, istnieją jedynie nieliczne publikacje podejmujące powyższą tematykę korzystające z użytej w niniejszej pracy metodologii. W pracy dotyczącej dorosłych z Wietnamu analizowano za pomocą krzywych ROC przydatność oznaczania IL-10 w ocenie ryzyka zgonu w przebiegu malarii, otrzymując wartość pola pod krzywą ROC 0,65 (Day i wsp. 1999). W tych badaniach nie analizowano jednak w ogóle przypadków zimnicy przebiegającej łagodnie. Z kolei w niedawnej publikacji dotyczącej ciężarnych afrykańskich, udowodniono za pomocą krzywych ROC, iż stężenie IL-10 może okazać się cennym surowiczym wskaźnikiem malarii łożyskowej, którą trudno rozpoznać przy użyciu badania mikroskopowego krwi obwodowej w warunkach wysokiej transmisji zimnicy ze względu na sekwestrację zarażonych krwinek w naczyniach łożyska (Kabyemela i wsp. 2008). W pracy własnej tylko u jednej z osób z przywleczoną do Polski zimnicą rozpoznano tę chorobę w okresie ciąży, a malaria łożyskowa nie była przedmiotem analizy. Trudno więc o ścisłe odniesienie się do wyników wspomnianej publikacji.

Podobnie ograniczone piśmiennictwo dotyczy zagadnienia dynamiki stężenia IL-10 w surowicy w okresie ostrych objawów zimnicy oraz w trakcie rekonwalescencji. W badaniach własnych obserwowano istotnie statystycznie obniżenie surowiczego poziomu tej interleukiny u pacjentów po przebytych leczeniu. Mimo znacznych różnic w długości okresu, po którym pobierano materiał do oznaczeń kontrolnych w poszczególnych badaniach, podobne rezultaty uzyskali inni autorzy (Luty i wsp. 2000, Wenisch i wsp. 1995). W badaniu własnym surowicze stężenie IL-10 u dzieci angolskich stwierdzone po jednym do dwóch tygodni po przebytej zimnicy utrzymywało się na znacząco wyższym poziomie niż wartości otrzymane u osób zdrowych. W publikacji dotyczącej pacjentów z malarią pochodzących z Tajlandii, powrót stężenia tej interleukiny w surowicy do wartości typowych dla osób zdrowych obserwowano po trzech tygodniach od rozpoznania malarii (Wenisch i wsp. 1995). Można więc przypuszczać, iż przyczyną obserwowanych różnic surowiczego stężenia IL-10 pomiędzy pacjentami angolskimi po przebytej zimnicy, a osobami zdrowymi jest krótszy odstęp czasowy dzielący kolejne oznaczenia, zwłaszcza iż otrzymane wartości nie odbiegają od siebie w sposób znaczny. Wydaje się jednak, iż dalszych badań wymaga stwierdzony podwyższony poziom IL-10 u pacjentów dorosłych po przebytej zimnicy

przywleczonej do Polski, jako że w tej grupie oznaczenia kontrolne wykonywane były po dłuższym okresie wynoszącym od 4 do 8 tygodni.

6.2.5 Interleukina 12

IL-12 zaliczana jest do głównych czynników regulujących mechanizmy nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, skierowanej przeciwko patogenom wewnątrzkomórkowym. Cytokina ta bierze również udział w regulacji odpowiedzi komórkowej i humoralnej w zimnicy (Malaguarnera i wsp. 2002). Jak już wspomniano we wstępie do niniejszej rozprawy, w dotychczasowych badaniach nad znaczeniem IL-12 w tej chorobie wykazano jej korzystną rolę w przebiegu choroby u myszy (Crutcher i wsp. 1995). Obiecujące rezultaty uzyskano także w pracy dotyczącej ochronnego działania rekombinowanej IL-12 u małych rebusów eksponowanych na zarażenie *P. cynomolgi* (Hoffman i wsp. 1997). Wyniki kilku przeprowadzonych jak dotąd prac dotyczących związków tej interleukiny z malarią u ludzi okazały się jednak rozbieżne (Chaiyaraj i wsp. 2003).

U dorosłych z przywleczoną do Polski malarią stwierdzono znaczący wzrost surowiczego stężenia IL-12 u chorych z łagodnym przebiegiem inwazji w porównaniu do wartości uzyskanych u osób zdrowych. Jednocześnie nie obserwowano takiej zależności pomiędzy grupami pacjentów z ciężką malarią i osób zdrowych. Rezultaty te sugerują, iż wzmożona ekspresja IL-12 przyczynić się może do korzystnego klinicznie przebiegu zimnicy i zapobiega rozwojowi dysfunkcji narządowych i innych postaci dężkiej malarii. W tym zakresie wyniki te zgodne są z danymi przedstawionymi kilka lat temu w publikacji dotyczącej dorosłych z importowaną zimnicą o łagodnym przebiegu (Torre i wsp. 2002). Sformułowaną powyżej hipotezę zdaje się również potwierdzać stwierdzone w pracy własnej znacząco niższe stężenie tej interleukiny w surowicy pacjentów z ciężkimi postaciami malarii, w porównaniu do inwazji przebiegającej łagodnie wśród badanych chorych z importowaną zimnicą. Niskie stężenia IL-12 u chorych z ciężkim przebiegiem zarażenia *Plasmodium* spp. były już stwierdzane w badaniach obejmujących zróżnicowanych wiekowo mieszkańców rejonów o różnym stopniu transmisji malarii (Chaiyaraj i wsp. 2003). Rezultaty prac dotyczące poziomów IL-12 u chorych z łagodną malarią nie tworzą jednak spójnego obrazu. Jak dotąd, w porównaniu do osób zdrowych, stwierdzano bowiem zarówno wzrost surowiczego stężenia IL-12 u takich pacjentów (Perkins i wsp. 2000, Luty i wsp. 2003, Prakash i wsp. 2006), jak i jego obniżenie (Ong'écha i wsp. 2007) lub brak znaczących zmian w tym zakresie (Chaiyaraj i wsp. 2003). Wśród pacjentów angolskich nie

stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami chorych o różnym stopniu ciężkości malarii oraz grupą kontrolną. Przepuszczalnie, do takich odmienności w wynikach poszczególnych badań przyczyniają się różnorodne czynniki. Wśród nich zapewne można wymienić wspomnianą wcześniej różnorodność kryteriów ciężkiej malarii stosowaną przed opublikowaniem wytycznych WHO (WHO 2000) oraz możliwość współwystępowania u mieszkańców rejonów tropikalnych innych inwazji pasożytniczych i infekcji, w tym zakażenia wirusem HIV, które mogą wywierać wpływ na ekspresję cytokin. Zmienność w zakresie produkcji i wydzielania interleukin w malarii może być również uwarunkowana pochodzeniem etnicznym włączonych do analizy pacjentów (Farouk i wsp. 2005).

6.2.6 Interleukina 13

Uważa się, iż jako jeden z mediatorów odpowiedzi Th2 zależnej, IL-13 odgrywa ważną rolę w inwazjach pasożytniczych (Mentink-Kane i wsp. 2004).

Jak dotąd, brakuje jednak publikacji dotyczących bezpośredniego znaczenia klinicznego tej interleukiny w zimnicy zarówno u ludzi, jak i w modelach zwierzęcych. Niedawno wykazano natomiast związek polimorfizmu w regionie promotorowym genu dla IL-13 z kliniczną odpornością w zakresie ciężkich postaci malarii u dorosłych pochodzących z Tajlandii (Ohashi i wsp. 2003). Z kolei w badaniach analizujących przeciwzapalne właściwości tej cytokiny stwierdzono powiązanie wysokich stężeń IL-13 w surowicy ze zgonem w przebiegu posocznicy dorosłych oraz korelację pomiędzy jej surowiczym poziomem, a stężeniem TNF (Collighan i wsp. 2004). Powyższe przesłanki oraz stwierdzane w badaniach innych autorów podobieństwo pomiędzy kaskadą cytokinową regulującą odpowiedź zapalną w posocznicy i malarii (Clark i wsp. 2008) zadecydowały o włączeniu tej cytokiny do niniejszych badań. Zarówno jednak wśród chorych dzieci angolskich, jak i pacjentów dorosłych z przywleczoną zimnicą, nie zaobserwowano związków pomiędzy surowiczym stężeniem IL-13, a przebiegiem klinicznym inwazji. Nie stwierdzono bowiem istotnych statystycznie różnic pomiędzy poziomem IL-13 w surowicy chorych z łagodną oraz ciężką malarią, a grupą kontrolną, jak również pomiędzy poszczególnymi podgrupami pacjentów w obu analizowanych populacjach.

Badania innych autorów pokazały, iż IL-18 działając samodzielnie, tj. w warunkach braku współdziałania z IL-12, może przyczyniać się do wzmożonej sekrecji IL-13 przez różne komórki układu immunologicznego (Hoshino i wsp. 1999). W pracy własnej, obserwowane u chorych z ciężkim przebiegiem zimnicy wysokie stężenia IL-18 bez towarzyszącego wzrostu poziomu IL-12, nie wiązały się z

jednak z podwyższeniem stężeń IL-13. Rezultaty takie mogą wynikać z potencjalnego oddziaływania innych czynników hamujących ekspresję tej cytokiny, które nie były przedmiotem niniejszych badań. Autorzy publikacji dotyczącej zależności pomiędzy polimorfizmem genu dla IL-13, a podatnością na rozwój ciężkich postaci malarii sugerują związek wykrytych mutacji w tym genie z regulacją produkcji tej cytokiny (Ohashi i wsp. 2003), co jednak nie musi znajdować odzwierciedlenia w stężeniu tej interleukiny w surowicy.

6.2.7 Interleukina 18

IL-18 jest cytokiną o szerokiej aktywności biologicznej, zidentyfikowaną względnie niedawno, bo w roku 1995 (Okamura i wsp. 1995). Od tego czasu opublikowano zaledwie kilka prac dotyczących znaczenia tej interleukiny w zimnicy u ludzi (Torre i wsp. 2001, Malaguamera i wsp. 2002c, Nagamine i wsp. 2003). Nieliczne są dotychczasowe publikacje obejmujące pacjentów dorosłych, brakuje także badań z zakresu roli IL-18 w zarażeniach innymi gatunkami zarodźców niż *P. falciparum*.

Niniejsza praca jako pierwsza opisuje relację pomiędzy ciężkim przebiegiem zimnicy i stężeniem interleukiny 18 w surowicy chorych z przywleczoną inwazją *Plasmodium* spp. W tej grupie pacjentów wykazano znacząco wyższe stężenie IL-18 w surowicy w porównaniu do osób z malarią przebiegającą łagodnie. Ponadto, średnie surowicze stężenie tej cytokiny w obu powyższych grupach chorych okazało się istotnie wyższe niż poziom IL-18 w surowicach osób zdrowych. Ta ostatnia obserwacja zgodna jest z rezultatami jedynej pracy dotyczącej znaczenia IL-18 u chorych z przywleczoną do Europy zimnicą, w której jednak, w przeciwieństwie do badań własnych, uwzględniono jedynie pacjentów z łagodnym przebiegiem choroby (Torre i wsp. 2001). U pacjentów tych obserwowano spadek stężenia IL-18 w surowicy po trzech dobach terapii. Pomimo dużo dłuższego okresu, po którym pobierano materiał do oznaczeń kontrolnych, w niniejszych badaniach nie stwierdzono istotnego statystycznie obniżenia poziomu tej cytokiny w surowicach pacjentów z przywleczoną do Polski malarią. Wydaje się, iż można tłumaczyć tę obserwację faktem włączenia do badań własnych także chorych z ciężkim przebiegiem inwazji, u których wyjściowo obserwowano bardzo wysokie stężenia IL-18, średnio 19 razy przewyższające wartości u osób zdrowych. Podobne wyniki uzyskano także w badaniach obejmujących dorosłych pochodzących z Tajlandii, w których wykazano znaczącą różnicę surowicznych stężeń IL-18 pomiędzy grupami chorych z łagodnym i ciężkim przebiegiem malarii (Nagamine i wsp. 2003). Także u

tych chorych nie obserwowano istotnego obniżenia poziomu tej interleukiny w okresie do 20 dni po leczeniu.

Wyjaśnienia wymaga obserwacja, iż wysokie wartości stężeń IL-18 stwierdzono przy jednoczesnym wzroście poziomu IL-10 w surowicach osób z ciężką malarią. Wiadomo, iż IL-10 wywiera hamujący wpływ na produkcję i uwalnianie licznych cytokin i jak już wspomniano wcześniej, jej wzmożona ekspresja mogła przyczynić się do relatywnie niskich stężeń innych cząsteczek prozapalnych, w tym TNF oraz IFN γ (Oppenheim i wsp. 2001). Nieobecność tego efektu w odniesieniu do IL-18 tłumaczyć można jednak wykazaniem w badaniach z udziałem myszy zjawiskiem braku hamującego wpływu IL-10 na produkcję IL-18 w przebiegu reakcji zapalnej (Zediak i wsp. 2003).

U chorych dzieci angolskich również stwierdzono znacząco wyższe średnie stężenie IL-18 w porównaniu do osób z grupy kontrolnej, niezależnie od stopnia ciężkości choroby. Ponadto, obserwowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy średnim surowiczym poziomem tej cytokiny u dzieci z ciężkim przebiegiem zimnicy i pacjentów z łagodną malarią. Wyniki innych dotychczasowych badań dotyczących IL-18 u pacjentów w wieku rozwojowym z zimnicą, zamieszkałych w rejonach jej endemicznego występowania, nie są jednoznaczne. W badaniach przeprowadzonych w Burkina Faso wykazano istotny wzrost poziomu IL-18 w surowicy dzieci z zimnicą w porównaniu do grupy kontrolnej złożonej z osób zdrowych, jednak najwyższe stężenia tej interleukiny zaobserwowano u chorych z łagodnym przebiegiem inwazji (Malaguarnera i wsp. 2002c). Autorzy tej pracy nie podali jednak informacji dotyczących czasu pobrania materiału do badań względem momentu włączenia terapii przeciwzimniczej, który to parametr może mieć wpływ na ekspresję IL-18 u chorych z malarią (Perkmann i wsp. 2005). W innych publikacjach dotyczących znaczenia IL-18 u dzieci z malarią nie udowodniono istnienia zależności pomiędzy ciężkością przebiegu choroby, a stężeniem tej cytokiny w surowicy pacjentów (Chaiyaroj i wsp. 2004, Chaisavaneeyakorn i wsp. 2003). Należy jednak zauważyć, iż grupy pacjentów włączone do tych badań były bardzo nieliczne, co mogło stanowić przeszkodę w uwidocznieniu istotnych statystycznie relacji.

W tym miejscu warto podkreślić wykazaną w pracy własnej przydatność diagnostyczną oznaczania surowiczego stężenia IL-18 w różnicowaniu przypadków malarii o łagodnym i ciężkim przebiegu. W obu badanych populacjach poziom IL-18 w surowicy okazał się wskaźnikiem o istotnej zdolności dyskryminacyjnej w powyższym zakresie, przy czym wśród chorych z zimnicą przywleczoną do Polski analiza za pomocą krzywych ROC wykazała, iż stężenie tej interleukiny 579,7 pg/ml lub więcej pozwala na rozpoznanie ciężkiej zimnicy z czułością 80% i specyficnością

73%. W odniesieniu do pacjentów dorosłych z przywleczoną zimnicą, tę właśnie cytokinę charakteryzowało największe pole pod krzywą ROC, wykreśloną dla surowiczego jej stężenia. U chorych dzieci angolskich, wyliczony w podobny sposób punkt krytyczny dla surowiczego stężenia IL-18 wynosił 403,94 pg/ml. Wartość ta umożliwiała różnicowanie przebiegu klinicznego zimnicy w tej grupie pacjentów z czułością 80% i swoistością 64%. Przeprowadzona analiza pozwala na uznanie oznaczania stężenia IL-18 w surowicy chorych z malarią za badanie pomocne w rozpoznawaniu przypadków zagrożonych ciężkim przebiegiem inwazji, zwłaszcza u nieodpornych dorosłych z przywleczoną malarią. Ta obserwacja wydaje się szczególnie cenna w warunkach polskich, gdzie wśród przyczyn wysokiej śmiertelności z powodu zimnicy wymienia się opóźnienia w zakresie zarówno diagnostycznym, jak i terapeutycznym, a wiele ośrodków medycznych w kraju nie dysponuje możliwością laboratoryjnego rozpoznawania malarii, a co za tym idzie i parazytemii.

Dotychczasowe publikacje dotyczące znaczenia IL-18 w malarii u ludzi nie odpowiadają na pytanie, czy IL-18 powinna być traktowana wyłącznie jako marker ciężkości stanu pacjentów, czy też ma ona istotny udział w patogenezie tej choroby. Obserwacje z wykorzystaniem modeli zwierzęcych pozwalają na wysunięcie hipotezy, iż IL-18 może przyczyniać się do rozwoju uszkodzeń tkankowych i narządowych, jako nadrzędny czynnik w kaskadzie cytokinowej związanej z uogólnioną reakcją zapalną (Oppenheim i wsp. 2001). Z drugiej strony wykazano, iż terapia przy użyciu rekombinowanej IL-18 zwiększa przeżycie myszy zarażonych *P. berghei* i *P. yoelli*, co może świadczyć o ochronnym znaczeniu analizowanej cytokiny w zarażeniach *Plasmodium* spp. (Singh i wsp. 2002). Wątpliwości te, jak również znaczenie systemowej ekspresji IL-18 u chorych z malarią zróżnicowanych wiekowo i etnicznie, wymagają dalszych badań.

6.3 Analiza surowicznych stężeń przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego u pacjentów dorosłych z przywleczoną zimnicą oraz u dzieci angolskich z malarią

Uważa się, że w chorobach inwazyjnych białka szoku termicznego oraz skierowane przeciwko nim przeciwciała, pełnią istotną rolę w relacji żywiciel-pasożyt. W zimnicy Hsp produkowane są zarówno przez zarodźce malarii poddane oddziaływaniu zmian środowiskowych w procesie transmisji z organizmu wektora do człowieka, jak i przez komórki ludzkie, w odpowiedzi na inwazję (Mazier i wsp. 1991).

Wydaje się, iż epizody gorączki w przebiegu malarii, wiązane z pirogennym wpływem uwalnianych do krwiobiegu TNF i IL-6, nasilają ekspresję zarówno pasożytniczych, jak i endogennych białek Hsp. Temu zjawisku przypisuje się działanie cytoprotekcyjne, z uwagi na zdolność Hsp do obniżania wrażliwości komórek na toksyczne działanie TNF (Polla 1991). Ze względu na znaczące, międzygatunkowe podobieństwo strukturalne białek szoku termicznego oraz wysoką immunogenność tych cząsteczek, przeciwciała przedwko antygenom Hsp drobnoustrojów mogą prowadzić do odpowiedzi autoimmunologicznych. W malarii szczególnie istotna wydaje się możliwość reakcji z autoantygenami Hsp na powierzchni śródbłonna, potencjalnie wiążąca się z uszkodzeniem komórek endotelium i nasileniem niekorzystnych zmian w zakresie zjawisk cytodherencji i sekwestracji zarażonych erytrocytów w przebiegu inwazji *P. falciparum*. Jak dotąd, jedynie nieliczne publikacje dotyczą występowania przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w zimnicy u ludzi i ich znaczenia klinicznego.

W badaniach własnych przeprowadzono analizę związku surowicznych stężeń przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego u dorosłych z przywleczoną zimnicą oraz u chorych dzieć angolskich. W grupie pacjentów z Polski badano przeciwciała przeciwko Hsp60 oraz Hsp70, natomiast u Angolczyków do analizy włączono jedynie tę pierwszą cząsteczkę ze względu na ograniczenia techniczne związane z transportem zestawów do oznaczeń tych przeciwciał. W wykorzystanych zestawach immunoenzymatycznych antygen stanowiły odpowiednio: rekombinowane ludzkie białko Hsp60, charakteryzujące się 50% homologią w odniesieniu do odpowiadającej cząsteczki produkowanej przez *P. falciparum* oraz rekombinowane ludzkie białko Hsp70, wykazujące w 80% podobieństwo strukturalne do cząsteczki PfHsp70 (Holloway i wsp. 1994). Zarówno u dorosłych z importowaną inwazją *Plasmodium* spp., jak i dzieci angolskich z zimnicą wykazano znacząco wyższe surowicze stężenia przeciwciał przeciwko Hsp60, w porównaniu do osób zdrowych (Rycina 30, str. 95), przy czym u Angolczyków zjawisko to dotyczyło jedynie chorych z ciężkim przebiegiem malarii (Rycina 49, str. 117). U dorosłych, wzrost poziomu przeciwciał przeciwko Hsp60 względem grupy kontrolnej odnotowano niezależnie od stopnia ciężkości inwazji. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w stężeniach przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy, pomiędzy chorymi z ciężko i łagodnie przebiegającą chorobą, w obu badanych populacjach.

Występowanie przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w zimnicy obserwowano w kilku przeprowadzonych uprzednio badaniach poświęconych temu zagadnieniu (Wu i wsp. 2006). Dotyczyły one jednak przede wszystkim przeciwciał

przeciwko Hsp70, natomiast odpowiedzi humoralnej przeciwko Hsp60 przypisywano w inwazjach pierwotniaków mniejsze znaczenie (Dżamar-Serafin i wsp. 2005). W niniejszej analizie nie stwierdzono istotnych różnic w poziomach przeciwciał przeciwko Hsp70 w surowicy u chorych dorosłych z importowaną malarią, niezależnie od ciężkości przebiegu choroby, w porównaniu do osób z grupy kontrolnej (Rycina 31, str. 96). Odmienności pomiędzy wynikami własnymi, a rezultatami wcześniejszych publikacji tłumaczyć może kilka czynników. Przede wszystkim, w dotychczasowych analizach podkreślano, iż obecność przeciwciał przeciwko Hsp70 niekoniecznie związana jest z aktualną inwazją *Plasmodium* (Kumar i wsp. 1990), a ich poziom zależy bardziej od skumulowanej liczby wcześniejszych ekspozycji na zarażenie zarodźcem, niż od intensywności obecnego zarażenia (Behr i wsp. 1992). Większość badanych przez mnie dorosłych z importowaną chorobą stanowili zaś chorzy z pierwszym w życiu epizodem malarii. Porównanie pacjentów chorujących po raz pierwszy z osobami podającymi w wywiadzie przebyte uprzednio inwazje *Plasmodium* spp. także nie wykazało istotnych różnic w zakresie surowicznych stężeń przeciwciał przeciwko Hsp70, co jednak związane być może z faktem, iż liczba wcześniejszych epizodów malarii u tych osób ograniczała się do co najwyżej kilku inwazji. Jest to względnie niewielka ekspozycja, w porównaniu do częstotliwości zarażeń *Plasmodium* obserwowanych wśród osób włączonych do analizy odpowiedzi immunologicznej przeciwko Hsp70 w rejonie całorocznej, wysokiej transmisji malarii w terenie wiejskim w Senegalu (Behr i wsp. 1992), bądź też w brazylijskiej części dorzecza Amazonki (Alexandre i wsp. 1999). Z tych samych niewątpliwie przyczyn, w niniejszych badaniach nie stwierdzono obserwowanej przez innych autorów relacji pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego, a wiekiem. Nawet w grupie chorych angolskich, łączna liczba inwazji *P. falciparum* mogła być bowiem zbyt niska, by wykazać takie zależności. Oczywiście, w interpretacji uzyskanych rezultatów należy również uwzględnić wpływ użytego do oznaczeń antygenu na otrzymane wyniki. Mimo znacznej homologii w zakresie struktury białek rodziny Hsp70 pomiędzy poszczególnymi gatunkami *Plasmodium*, a także pomiędzy tymi pierwotniakami, a innymi organizmami, pewną trudnością w porównywaniu wyników dotychczasowych badań nad odpowiedzią humoralną przeciwko Hsp70 w malarii stanowi fakt wykorzystywania różnych antygenów Hsp70 przez różnych autorów (Na i wsp. 2007, Zhang i wsp. 2001, Behr i wsp. 1992, Kumar i wsp. 1990).

Wydaje się, iż różnice w zakresie zastosowanych antygenów oraz dobór analizowanej grupy mogły przyczynić się także do różnic w obserwacjach dotyczących przeciwciał przeciwko Hsp60 w badaniach własnych i przedstawionych

w piśmiennictwie. W przeciwieństwie do wcześniejszych publikacji (Zhang i wsp. 2001, Adebajo i wsp. 1995), niniejsza analiza wykazała istnienie wyraźnych różnic pomiędzy stężeniem przeciwciał przeciwko Hsp60 u pacjentów z malarią, w porównaniu do osób zdrowych. W szczególności, zjawisko to widoczne było u chorych dorosłych z przywleczoną do Polski zimnicą (Rycina 30, str. 95). W obu populacjach, nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian poziomu tych przeciwciał po przebytej malarii. Oznaczone podczas badań kontrolnych stężenie przeciwciał przeciwko Hsp60 nadal jednak utrzymywało się na znacząco wyższym poziomie w porównaniu do wartości uzyskanej u osób zdrowych. Dynamika stężeń przeciwciał przeciwko Hsp60 w inwazji *Plasmodium* spp. nie była jak dotąd przedmiotem prac naukowych i zasługuje na dokładniejszą analizę.

Całość obserwowanych w niniejszych badaniach zjawisk dotyczących występowania przeciwciał przeciwko Hsp60 w malarii nie umożliwia jednoznacznej oceny ich roli w patogenezie choroby i jej przebiegu klinicznym. Rezultaty własne pozwalają jednak wykazać istnienie znaczącej odpowiedzi humoralnej skierowanej przeciwko endogennym Hsp60 w inwazji *Plasmodium* spp., zarówno u osób dorosłych z przywleczoną zimnicą, jak i chorych dzieci z rejonu endemicznego występowania tego schorzenia.

6.4 Zimnica jako odpowiedź na inwazję *Plasmodium* o cechach niekontrolowanego zapalenia (rola „burzy cytokinowej” w malarii)

Rezultaty coraz liczniejszych badań dotyczących chorób infekcyjnych i pasożytniczych przebiegających z uogólnionym odczynem zapalnym pozwalają postawić hipotezę, iż fenotypowo całkowicie różne drobnoustroje uruchamiają niezwykle podobne mechanizmy immunopatologiczne (Juszczak 2003). Według doniesień z ostatnich lat, przebieg kliniczny zimnicy warunkowany może być przez tzw. „burzę cytokinową”, czyli nagłe uwolnienie licznych mediatorów zapalnych prowadzących do zespołu niewydolności wielonarządowej, nierzadko o nieodwracalnym przebiegu (Clark i wsp. 2008). Pojęcie „burzy cytokinowej” zostało wprowadzone po raz pierwszy w roku 1993 w odniesieniu do mechanizmów uczestniczących w ostrym odrzuceniu przeszczepu (Ferrara i wsp. 1993). Od tego czasu powyższemu zjawisku przypisano udział w patogenezie licznych schorzeń zakaźnych i niezakaźnych, w tym posocznicy bakteryjnej, niektórych ogólnoustrojowych infekcji wirusowych, ostrego zapalenia trzustki czy choroby

oparzeniowej (Clark 2007a).

W powyższym ujęciu, reakcja organizmu gospodarza na inwazję *Plasmodium* spp., nosząca cechy niekontrolowanego zapalenia, wyrażonego m. in. poprzez systemową i miejscową nasiloną ekspresję cytokin, wydaje się być ważnym, a być może nawet podstawowym aspektem patogenezy malarii. Produkcja prozapalnych cytokin przypuszczalnie stanowi niezbędny element odpowiedzi przeciw pasożytniczej we wczesnym okresie choroby. Udowodniono, że ze zjawiskiem tym wiąże się efektywna kontrola parazytemii oraz szybkie ustąpienie objawów chorobowych. Z drugiej strony, nadmierna ekspresja cząsteczek prozapalnych prowadzi nierzadko do uszkodzeń narządowych i zaburzeń metabolicznych oraz rozwoju ciężkich postaci klinicznych malarii (Artavanis-Tsakonas i wsp. 2003). Z kolei rozwijająca się w przebiegu choroby reaktywność prozapalna zwrótnie indukuje mechanizmy ją hamujące, które mają na celu przywrócenie homeostazy ustroju (Couper i wsp. 2008). Niektórzy badacze za ważny czynnik powiązany z przebiegiem klinicznym zimnicy uznają nie tyle wzmożoną ekspresję cytokin, co zdolność organizmu do zachowania równowagi pomiędzy produkcją cząsteczek pro- i przeciwzapalnych w odpowiedzi na zarażenie zarodźcem (Perkins i wsp. 2000, Day i wsp. 1999).

W niniejszych badaniach wykazano wzrost stężeń szeregu cytokin zapalnych w surowicach chorych w porównaniu do wartości uzyskanych u osób zdrowych, co wydaje się potwierdzać hipotezę „burzy cytokinowej”. W szczególności zależność taką obserwowano w odniesieniu do TNF, IFN, IL-6, IL-10, IL-18 oraz, u pacjentów dorosłych, IL-12. W przeważającej mierze proces ten dotyczył zarówno osób z przywleczoną do Polski chorobą, jak i dzieci angolskich zamieszkujących rejon o wysokiej i stabilnej transmisji zimnicy. Pomimo złożoności relacji w obrębie sieci cytokin w malarii, wyniki niniejszych badań zarysowują możliwość opracowania charakterystycznego surowiczego profilu cytokinowego u pacjentów z zimnicą o ciężkim przebiegu, definiowanym kryteriami WHO (WHO 2000). Wykazano, iż w porównaniu do osób z łagodną malarią, u takich pacjentów w obu badanych populacjach, w surowicy krwi przed włączeniem terapii przeciwzimniczej obserwuje się znacząco podwyższone stężenia IL-18 oraz IL-10, a także IL-6, aczkolwiek w przypadku tej ostatniej interleukiny zależność ta nie jest aż tak wyraźnie zaznaczona. Brak podobnych rezultatów w zakresie innych cytokin prozapalnych u chorych z ciężką zimnicą można przynajmniej częściowo tłumaczyć hamującym oddziaływaniem IL-10, której wysokie stężenia w surowicach chorych odzwierciedlają zapewne zwrotną regulację przeciwzapalną. Wysokie poziomy IL-18 u tych osób wydają się natomiast potwierdzać udowodniony przez innych autorów brak wpływu IL-10 *in vitro* na ekspresję tej cząsteczki (Zediak i wsp. 2003).

Całość powyższych obserwacji pozwala przypuszczać, iż IL-18, która dopiero od niedawna jest przedmiotem badań dotyczących malarii, może stanowić kluczową rolę w kaskadzie zapalnej w przebiegu inwazji *Plasmodium* spp.

W tym miejscu należy zadać pytanie o udział wykazanej wzmożonej ekspresji cytokin zapalnych w patogenezie malarii oraz istnienie związku obserwowanych zjawisk z czynnikami tradycyjnie uznanymi za decydujące o ciężkim przebiegu choroby, czyli cytoadherencją i sekwestracją zarażonych erytrocytów w obrębie drobnych naczyń krwionośnych oraz związanych z tym zaburzeń w mikrokrażeniu narządów wewnętrznych (Stelmach i wsp. 2001). Udowodniono, że niektóre cytokiny prozapalne, a w szczególności TNF, wykazują zdolność indukowania ekspresji cząsteczek adhezyjnych, w tym ICAM-1, VCAM-1 i selektyny E, na powierzchni komórek śródbłonna naczyniowego. Proces ten w poszczególnych narządach przebiega jednak w niejednakowym stopniu i zależy m. in. od lokalnej produkcji tromboduliny. Trombodulina jest białkiem receptorowym dla trombiny, która poza regulacją produkcji molekuł adhezyjnych, zaangażowana jest również w kaskadę krzepnięcia, aktywację czynników chemotaktycznych oraz zwrotną regulację miejscowej produkcji TNF. Różny stopień aktywacji komórek śródbłonna naczyniowego poszczególnych organów, będący odpowiedzią na wysokie stężenia cytokin zapalnych krążących w surowicy, przyczynić się może do zróżnicowania narządowego procesów cytoadherencji i sekwestracji (Clark i wsp. 2008). Nasilenie tych zjawisk w potencjalnie niebezpiecznych lokalizacjach, w tym w mózgu bądź łożysku w przypadku zimnicy ciężamych, prowadzić może do rozwoju ciężkich klinicznie postaci malarii. W ten sposób hipoteza „burzy cytokinowej” tłumaczy przebieg inwazji *P. falciparum*, który to gatunek stanowi obecnie największe zagrożenie dla chorych, zarówno wśród osób z importowaną zimnicą, u których do zarażenia doszło w podróży, jak i mieszkańców rejonów endemicznego występowania tej choroby. Niezależnie od powiązań z sekwestracją i jej konsekwencjami, prozapalne cytokiny stymulują wydzielanie tlenu azotu i reaktywnych związków tlenu, co w konsekwencji może pogłębić uszkodzenia tkankowe (Wandurska-Nowak 2004). Ponadto cząsteczki te mogą bezpośrednio przyczyniać się do zaburzeń metabolicznych, czego przykładem jest indukowanie przez TNF hipoglikemii i kwasicy mleczanowej (Kwiatkowski i wsp. 1990). Wszystkie te procesy wywierają potencjalnie niekorzystny wpływ na przebieg kliniczny inwazji *Plasmodium* spp. i mogą tłumaczyć występowanie przypadków ciężkiej zimnicy także u chorych z malarią spowodowaną innymi gatunkami zarodźców, które nie wykazują zdolności do wywoływania cytoadherencji zarażonych krwinek. Tego typu przypadki w praktyce klinicznej należą do rzadkości, jednak wraz z rozwojem

diagnostyki opartej na technikach molekularnych, pacjenci tacy coraz częściej opisywani są w piśmiennictwie (Price i wsp. 2007a).

Wiadomo, iż odpowiedź na inwazję *Plasmodium* spp. w zakresie produkcji i uwalniania cytokin zapalnych zależy może od wielu czynników związanych zarówno z organizmem gospodarza, jak i pasożyta. U osób zarażonych *P. falciparum* obserwowano powiązania pomiędzy nasileniem ekspresji cytokin prozapalnych, a szczepem zarodźca wywołującego chorobę (Malaguamera i wsp. 2002). Nie bez znaczenia pozostaje pochodzenie etniczne chorych oraz uwarunkowania genetyczne. Wykazano bowiem, iż wydzielanie TNF, IFN γ oraz licznych interleukin, w tym IL-6 oraz IL-10, związane może być z występowaniem określonych polimorfizmów w obrębie genów kodujących te cząsteczki. Obserwowano również zależności pomiędzy określonymi mutacjami w genach dla TNF, IFN γ oraz IL-6, a przebiegiem klinicznym zimnicy u chorych afrykańskich (Gourley i wsp. 2002). U obywateli Mali stwierdzono istnienie znaczących różnic w ekspresji wybranych cytokin pomiędzy osobami należącymi do dwóch plemion, charakteryzujących się zwykle odmienną podatnością na zarażenie *P. falciparum* (Farouk i wsp. 2005). Dostępna literatura, jak i wyniki badań własnych sugerują, iż jednym z powyższych czynników może być również wiek oraz liczba uprzednio przebytych inwazji *Plasmodium* spp. (Mshana i wsp. 1991). Z powtarzającymi się epizodami zimnicy wiązać się może bowiem wytwarzanie przeciwciał przeciwko powierzchniowym antygenom glikolipidowym zarodźca, które *in vitro* wykazują hamujący wpływ na produkcję TNF przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (Malaguamera i wsp. 2002). W wynikach własnych zwraca również uwagę bardzo wyraźna, znamienna różnica pomiędzy stężeniem IFN γ w surowicy chorych z pierwszą w życiu malarią w porównaniu do osób, które podały w wywiadzie wcześniejsze inwazje *Plasmodium* spp. Związek ekspresji tej cytokiny z liczbą przebytych epizodów zimnicy i wykształcanymi w przebiegu zachorowań mechanizmami ochronnymi sugerowano we wcześniejszych publikacjach, jednak jak dotąd potwierdzono go jedynie w eksperymentach *in vitro* (Rhee i wsp. 2001).

Duża liczba oraz różnorodność domniemanych okoliczności regulujących ekspresję cytokin w przebiegu zimnicy przyczynia się do niebagatelnej zmienności osobniczej w tym zakresie. Zmienność taką wykazano w niedawno opublikowanej pracy dotyczącej kinetyki ogólnoustrojowej odpowiedzi cytokinowej w eksperymentalnej inwazji *P. falciparum* u dorosłych (Walther i wsp. 2006), a jej istnienie potwierdzają również rezultaty badań własnych, a w szczególności wysokie wartości miar rozproszenia badanych zmiennych (Tabela 25-Tabela 30, str. 171-173).

Należy zauważyć, iż wyniki niniejszej pracy nie pozwalają powiązać charakteru odpowiedzi cytokinowej z poszczególnymi postaciami ciężkiej zimnicy typowymi dla danej grupy wiekowej, tj. niewydolności wielonarządowej u dorosłych oraz malarii mózgowej i głębokiej niedokrwistości u dzieci. W przeciwieństwie do sugestii spotykanej w piśmiennictwie (Clark i wsp. 2008) obserwowano bowiem podobny profil w zakresie ogólnoustrojowej ekspresji cytokin w zimnicy o ciężkim przebiegu zarówno u dorosłych, jak i pacjentów w wieku rozwojowym. Obie badane grupy cechowały się szerokim zakresem objawów chorobowych i współwystępowaniem u chorych licznych wykładników ciężkiej malarii. Mimo tak zróżnicowanej charakterystyki epidemiologicznej i klinicznej pacjentów, wykazano, iż zimnica o ciężkim przebiegu w badanych grupach w sposób uniwersalny wiąże się z podwyższonym surowiczym stężeniem prozapalnej interleukiny 18 oraz przeciwzapalnej IL-10, stanowiącej zapewne element sprzężenia zwrotnego.

6.5 Przydatność diagnostyczna oznaczeń surowiczych stężeń wybranych cytokin w malarii

W celu określenia przydatności diagnostycznej badanych zmiennych wykorzystano ocenę pól powierzchni pod krzywymi ROC. Krzywa ROC opisuje zależność pomiędzy odsetkami wyników prawdziwie i fałszywie dodatnich dla każdego z analizowanych w badaniu parametrów. Obszar pod krzywą odpowiada zdolności rozdzielczej danej zmiennej w zakresie dyskryminacji pomiędzy dwoma alternatywnymi stanami klinicznymi, jest więc miarą dokładności diagnostycznej testu. Pole powierzchni tego obszaru wynoszące 0,5 oznacza brak jakiegokolwiek zdolności rozdzielczej, podczas gdy pole równe 1,0 - doskonałą zdolność rozdzielczą. Względne położenie dwu lub więcej krzywych ROC dostarcza z kolei jakościowego porównania dokładności kilku badań.

Wykazano, iż surowicze stężenia IL-6, IL-10, IL-18, a także IL-12 u dorosłych z przywleczoną malarią, charakteryzują się znaczącą statystycznie zdolnością dyskryminacyjną w zakresie odróżniania przypadków malarii zagrożonych ciężkim i łagodnym przebiegiem (WHO 2000). Największe pole pod krzywą ROC u dorosłych pacjentów z przywleczoną do Polski malarią uzyskano dla surowiczego stężenia IL-18, natomiast u dzieci angolskich z zimnicą właściwość ta charakteryzowała IL-10. Warto zauważyć, iż dokładność diagnostyczna oznaczania poziomu tych cytokin w surowicy, oceniana za pomocą analizy krzywych ROC, plasuje te parametry wśród najbardziej użytecznych wskaźników laboratoryjnych, identyfikujących ciężkie

klinicznie postaci zimnicy (Tabela 19 i Tabela 24, str. 94 i 116).

Warto podkreślić, iż wykresy krzywych ROC uważane są za pełną reprezentację zdolności testu do rozróżnienia dwóch wariantów stanu zdrowia u badanych osób (Kochańska-Dziurkiewicz i wsp. 1999). Uwzględniają one cały zakres możliwych punktów odcięcia i są niezależne od częstości występowania choroby w badanej próbie. W niniejszej pracy, na podstawie wykresów ROC, dla określonych powyżej cytokin wyznaczono wartości progowe ich surowiczych poziomów, charakteryzujące się optymalną czułością i swoistością w różnicowaniu przypadków inwazji *Plasmodium* przebiegających łagodnie i ciężko. Dla tak wybranych punktów odcięcia, obliczono wskaźniki wiarygodności wyników dodatnich (LR+, z j. ang. Positive likelihood ratio), uzyskując wartość LR+ powyżej dwóch w odniesieniu do IL-18 w obu populacjach, a także IL-6 oraz IL-10 u dzieci angolskich z zimnicą (Tabela 31, str. 174; Tabela 32, str. 174). Rezultat taki pozwala uznać oznaczenie surowiczych stężeń tych interleukin u chorych z malarią za testy użyteczne w procesie diagnostycznym (Fagan 1975). Analiza wskaźników wiarygodności wyników ujemnych (LR-, z j. ang. Negative likelihood ratio) wykazała, iż powyższe testy charakteryzują się wartościami LR- niższymi od 0,5 dla wyznaczonych punktów odcięcia, co uprawnia do podobnych wniosków. Żadne z analizowanych badań nie uzyskało jednak wskaźników wiarygodności z przedziału typowego dla wartości wiarygodności decyzyjnej, a co za tym idzie oznaczenia te powinny być stosowane jako badania dodatkowe w procesie diagnostycznym. Wysokie wartości predykcji wyników ujemnych (powyżej 90%) otrzymane dla progowych stężeń powyższych IL-18, a także IL-10 u Angolczyków, umożliwiają z dużym prawdopodobieństwem wykluczenie ciężkich postaci zimnicy u chorych zarażonych *Plasmodium* spp. z negatywnym wynikiem testu dla danej cytokiny (Tabela 31, str. 174; Tabela 32, str. 174). Obliczone dla tych samych surowiczych poziomów IL-10 oraz IL-18 wartości predykcji wyników dodatnich (PPV – z j. ang. Positive predictive value) okazały się niższe i nie przekraczały 70%. Trzeba jednak wziąć pod uwagę, iż powyższe parametry dotyczą jedynie pojedynczych wartości progowych surowiczych stężeń badanych interleukin. Wartości predycyjne, w tym NPV oraz PPV, zależne są od obranego punktu operacyjnego na krzywej ROC i częstości występowania danego stanu klinicznego w badanej próbie. Dostarczają one więc ograniczoną informację o charakterystyce testu, w przeciwieństwie do pełnej analizy krzywych ROC, które przedstawiają, jak już wspomniano, kompletny obraz dokładności diagnostycznej badania dla wszystkich punktów odcięcia. Ponadto, w zależności od potrzeb diagnostycznych wynikających z określonej sytuacji klinicznej (konieczność wykluczenia bądź potwierdzenia rozpoznania), obierając inną wartość progową na

krzywej ROC, można manipulować czułością i specyficnością testu laboratoryjnego, co również dotyczy badań ocenianych w niniejszej pracy. Należy jednak pamiętać, iż przesuwanie punktu odcięcia wiąże się ze zmianami wszystkich rozpatrywanych parametrów, w tym czułości i swoistości oraz wskaźników wiarygodności i wartości predykcyjnych (Jaeschke i wsp. 1998).

Warto zauważyć, iż analiza użyteczności badań laboratoryjnych wymaga oceny wielu czynników, związanych nie tylko z właściwościami testów, ale również z okolicznościami ich zastosowań klinicznych (Kochańska-Dziurawicz i wsp. 1999). Przedstawione w niniejszej rozprawie obserwacje wydają się mieć istotne znaczenie w ocenie ciężkości przebiegu klinicznego przywleczonej do Polski malarii w przypadku braku doświadczenia w zakresie mikroskopowego rozpoznawania gatunków zarodźców zimnicy oraz oceny intensywności inwazji w wielu laboratoriach medycznych w naszym kraju. Uzyskane rezultaty uprawniają do stwierdzenia, iż pomiar stężeń wymienionych powyżej cytokin w surowicy krwi pacjenta zarażonego *Plasmodium* spp., przed włączeniem leczenia przeciwzimmicznego, może stanowić dodatkowe narzędzie oceny ciężkości przebiegu choroby. Uzyskana za jego pomocą poprawa oceny rokowania u pacjenta, przez wpływ na optymalizację decyzji terapeutycznych, wydaje się szczególnie ważna dla pacjentów z ciężkim przebiegiem importowanej zimnicy, u których jedną z przyczyn zgonów stanowi opóźnienie wdrożenia intensywnych form terapii (Nahorski i wsp. 2007).

Warto również podkreślić, że badania własne przeprowadzono przy użyciu nieskomplikowanych technik immunoenzymatycznych obciążonych jednostkowo relatywnie niewielkimi kosztami. Jest to aspekt niezwykle ważny w odniesieniu do ewentualnego wdrożenia tego typu analiz w realiach opieki zdrowotnej w krajach rozwijających się, w których placówki medyczne zwykle nie dysponują możliwością wykonania pełnego panelu badań laboratoryjnych oceniających ciężkość przebiegu zimnicy, a dodatkowym problemem są ograniczone perspektywy szkolenia personelu laboratoryjnego, podyktowane względami ekonomicznymi (Jason i wsp. 2001). W takich warunkach, identyfikacja uniwersalnego laboratoryjnego markera ciężkiego przebiegu zimnicy, wydaje się szczególnie cenna. Biorąc pod uwagę wszystkie wymienione powyżej aspekty, można uznać, iż wykazana użyteczność diagnostyczna oznaczania surowiczych stężeń wybranych interleukin stanowi punkt wyjścia do dalszego badania roli tych testów w postępowaniu klinicznym w malarii.

6.6 Uwagi końcowe

Niewątpliwie, pomimo szerokiego zakresu przeprowadzonych analiz, niniejsza

rozprawa nie wyczerpuje w całości podjętego zagadnienia. Cennym uzupełnieniem tej pracy byłaby ocena profilu cytokinowego w poszczególnych postaciach ciężkiej zimnicy. Szczególnie interesujące wydaje się pogłębienie dociekań w zakresie tych wykładników zimnicy o ciężkim przebiegu, które wydają się odróżniać obie badane populacje. Dotyczy to w szczególności ostrej niewydolności nerek u dorosłych z przywleczoną zimnicą i niedokrwistości u dzieci afrykańskich. Wnikliwej oceny wymagają stwierdzone w materiale własnym, ale niepublikowane w niniejszej rozprawie, liczne korelacje pomiędzy poziomami cytokin, zwłaszcza IL-18, a laboratoryjnymi parametrami dysfunkcji narządowych. Warto dalszych badań wydaje się być również wyjaśnienie relacji pomiędzy ogólnoustrojową ekspresją cytokin, a często obserwowanymi w grupie chorych z importowaną malarią zaburzeniami krzepnięcia. Zależności takie można podejrzewać na podstawie przesłanek teoretycznych i danych dotyczących innych jednostek chorobowych (Esmon 2005), jednakże jak dotąd nie zostały one poddane kompleksowej analizie w zimnicy. Podwyższone poziomy cytokin stwierdzone w surowicy pacjentów po przebytej chorobie mogą stanowić przejaw bezobjawowego stanu zapalnego, utrzymującego się pomimo leczenia, co wskazuje kolejny kierunek badań, tym bardziej, że zagadnienie to nie było dotychczas przedmiotem prac badawczych.

7 Wnioski

1. W przebiegu zimnicy dochodzi do nasilonej ogólnoustrojowej ekspresji licznych cytokin zapalnych, zarówno wśród dorosłych z przywleczoną malarią, jak i dzieci zamieszkujących rejon endemicznego występowania tej choroby. Obserwuje się również odpowiedź humoralną przeciwko endogennym białkom Hsp60, przy czym u chorych dzieci z rejonu endemicznego zjawisko to występuje wyłącznie wśród osób z ciężkim przebiegiem malarii, natomiast u dorosłych z przywleczoną zimnicą jest niezależne od przebiegu choroby.
2. Ciężki przebieg inwazji *Plasmodium* spp. wśród dorosłych z importowaną zimnicą i dzieci z rejonu endemicznego występowania choroby związany jest z podobnym surowiczym profilem cytokinowym, charakteryzującym się podwyższonym stężeniem prozapalnych IL-18 oraz IL-6, jak również przeciwzapalnej IL-10.
3. Ekspresja cytokin może być związana z wcześniejszą ekspozycją na zarażenie zarodźcem malarii, co w szczególności dotyczy IFN γ u dorosłych z przywleczoną zimnicą.
4. Obserwowane podwyższone stężenia cytokin zapalnych w surowicy pacjentów po przebytej malarii mogą świadczyć o utrzymywaniu się bezobjawowego stanu zapalnego, pomimo skutecznego klinicznie leczenia przeciwezimniczego u tych osób.
5. Surowicze stężenia IL-18 oraz IL-10 mogą stanowić przydatne narzędzie diagnostyczne w różnicowaniu przypadków zimnicy o łagodnym i ciężkim przebiegu. Ze względu na korzystne parametry uzyskane w analizie krzywych ROC oraz powszechną dostępność technik ich oznaczania, mogą one stanowić cenne uzupełnienie tradycyjnych badań laboratoryjnych, zarówno w ocenie ciężkości przebiegu przypadków zimnicy przywleczonej do kraju, jak i w diagnostyce malarii w krajach rozwijających się.

8 Piśmiennictwo

1. Abbas AK, Lichtman AH: Cellular and molecular immunology, Saunders Elsevier, 2005
2. Acharya P, Kumar R, Tatu U: Chaperoning a cellular upheaval in malaria: heat shock proteins in *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 2007, 153, 85-94
3. Adebajo AO, Williams DG, Hazleman BL, Maini RN: Antibodies to the 65 kDa mycobacterial stress protein in west Africans with rheumatoid arthritis, tuberculosis and malaria. Br J Rheumatol. 1995, 34, 352-354
4. Agadjanian V, Prata N: Civil war and child health: regional and ethnic dimensions of child immunization and malnutrition in Angola. Soc Sci Med. 2003, 56, 2515-2527
5. Alexandre CO, Camargo LM, Mattei D, Ferreira MU, Katzin AM, Camargo EP, da Silva LH.: Humoral immune response to the 72 kDa heat shock protein from *Plasmodium falciparum* in populations at hypoendemic areas of malaria in western Brazilian Amazon. Acta Trop. 1997, 64, 155-166
6. Anstey NM, Handojo T, Pain MC, Kenangalem E, Tjitra E, Price RN, Maguire GP: Lung injury in *vivax* malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. J Infect Dis. 200, 195, 589-596
7. Armengaud A, Legros F, D'Ortenzio E, Quatresous I, Barre H, Houze S, Valayer P, Fanton Y, Schaffner F: A case of autochthonous *Plasmodium vivax* malaria, Corsica, August 2006. Travel Med Infect Dis. 2008, 6, 36-40

8. Artavanis-Tsakonas K., Tongren J.E., Riley E.M.: The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol.* 2003, 133, 145-152
9. Banumathy G, Singh V, Pavithra SR, Tatu U: Heat shock protein 90 function is essential for *Plasmodium falciparum* growth in human erythrocytes. *J Biol Chem.* 2003, 278, 18336-18845
10. Bashyam H: Interleukin-12: A master regulator. *J Exp Med.* 2007, 204, 969
11. Beg MA, Khan R, Baig SM, Gulzar Z, Hussain R, Smego RA Jr: Cerebral involvement in benign tertian malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2002, 67, 230-232
12. Behr C, Sarthou JL, Rogier C, Trape JF, Dat MH, Michel JC, Aribot G, Dieye A, Claverie JM and Druihle P: Antibodies and reactive T cells against the malaria heat-shock protein Pf72/Hsp70-1 and derived peptides in individuals continuously exposed to *Plasmodium falciparum*. *J Immunol.* 149, 10, 3321-3330
13. Beutler B, Grau GE: Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. *Crit Care Med.* 1993, 21 (Supl.), S423-435
14. Bhatia M, Moochhala S: Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol.* 2004, 202, 145-156
15. Chaisavaneeyakorn S, Othoro C, Shi YP, Otieno J, Chaiyaroj SC, Lal AA, Udhayakumar V: Relationship between plasma Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 levels and severe malarial anemia in an area of holoendemicity in western Kenya. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003, 10, 362-366
16. Chaiyaroj SC, Rutta AS, Muenthaisong K, Watkins P, Na Ubol M, Looreesuwan S.: Reduced levels of transforming growth factor-beta1,

- interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria. *Acta Trop.* 2004, 89, 319-327
17. Chizzolini C, Grau GE, Geinoz A, Schrijvers D.: T lymphocyte interferon-gamma production induced by *Plasmodium falciparum* antigen is high in recently infected non-immune and low in immune subjects. *Clin Exp Immunol.* 1990, 79, 95-99
 18. Chiwakata CB, Manegold C, Bönicke L, Waase I, Jülch C, Dietrich M: Procalcitonin as a parameter of disease severity and risk of mortality in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 2001, 183, 1161-1164
 19. Cianciara J, Juszczak J: *Choroby zakaźne i pasożytnicze*, Wydawnictwo Czelej, 2007
 20. Clark IA, Virelizier JL, Carswell EA, Wood PR: Possible importance of macrophage-derived mediators in acute malaria. *Infect Immun.* 1981, 32, 1058-1066
 21. Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB: Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malar J.* 2006, 5, 85-117
 22. Clark IA: The advent of the cytokine storm. *Immunol Cell Biol.* 2007a, 85, 271-273
 23. Clark IA: How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007b, 18, 335-343
 24. Clark IA, Alleva LM, Budd AC, Cowden WB: Understanding the role of inflammatory cytokines in malaria and related diseases. *Travel Med Infect Dis.* 2008, 6, 67-81
 25. Collighan N, Giannoudis PV, Kourgeraki O, Perry SL, Guillou PJ, Bellamy MC: Interleukin 13 and inflammatory markers in human sepsis. *Br J Surg.* 2004, 91, 762-768
 26. Couper KN, Blount DG, Riley EM: IL-10: the master regulator of immunity

- to infection. *J Immunol.* 2008, 180, 5771-5777
27. Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B: *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis.* 2008, 46, 165-171
 28. Crutcher JM, Stevenson MM, Sedegah M, Hoffman SL: Interleukin-12 and malaria. *Res Immunol.* 1995, 146, 552-559
 29. Cuamba N, Choi KS, Townson H: Malaria vectors in Angola: distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex, their pyrethroid insecticide knockdown resistance (kdr) status and *Plasmodium falciparum* sporozoite rates. *Malar J.* 2006, 5, 2-8
 30. Das A, Syin C, Fujioka H, Zheng H, Goldman N, Aikawa M, Kumar N: *Mol Biochem Parasitol: Molecular characterization and ultrastructural localization of Plasmodium falciparum Hsp 60.* 1997, 88, 95-104
 31. Day NP, Hien TT, Schollaardt T: The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis.* 1999, 180, 1288-1297
 32. De Oliveira-Ferreira J, Banic DM, Santos F, Ferreira-da-Cruz MF, Dubois P, Daniel-Ribeiro CT: Cellular and antibody responses to the *Plasmodium falciparum* heat shock protein Pf72/HSP70 during and after acute malaria in individuals from an endemic area of Brazil. *Acta Trop.* 1999, 73, 1-10
 33. De Souza JB, Williamson KH, Otani T, Playfair JH.: Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. *Infect Immun.* 1997, 65, 1593-1598
 34. Dinarello CA: Interleukin-18. *Methods.* 1999, 19, 121-132
 35. Dinarello CA, Fantuzzi G: Interleukin-18 and host defense against infection. *J Infect Dis.* 2003;187 Suppl 2, S370-384
 36. Doderer C, Heschung A, Guntz P, Cazenave JP, Hansmann Y, Senegas A,

- Pfaff AW, Abdelrahman T, Candolfi E: A new ELISA kit which uses a combination of *Plasmodium falciparum* extract and recombinant *Plasmodium vivax* antigens as an alternative to IFAT for detection of malaria antibodies. *Malar J.* 2007, 6, 19.
37. Dubois P, Dedet JP, Fandeur T, Roussilhon C, Jendoubi M, Pauillac S, Mercereau-Puijalon O, Pereira Da Silva L: Protective immunization of the squirrel monkey against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* by use of parasite protein fractions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984, 81, 229-232
38. Dżaman-Serafin S, Telatyńska-Śmieszek B, Ciechanowski K: Białka szoku termicznego i ich właściwości. *Pol. Merk. Lek.* 2005, 110, 215-219
39. Esmon CT: The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol.* 2005, 131, 417-430
40. Fagan TJ: Nomogram for Bayes's Theorem. *N. Engl. J. Med.* 1975, 293, 257
41. Farouk SE, Dolo A, Bereczky S, Kouriba B, Maiga B, Fämert A, Perlmann H, Hayano M, Montgomery SM, Doumbo OK, Troye-Blomberg M: Different antibody- and cytokine-mediated responses to *Plasmodium falciparum* parasite in two sympatric ethnic tribes living in Mali. *Microbes Infect.* 2005, 7, 110-117
42. Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL: *Interna Harrisona*, Wydawnictwo Czelej, 2000
43. Femandes AA, Carvalho LJ, Zanini GM, Ventura AM, Souza JM, Cotias PM, Silva-Filho IL, Daniel-Ribeiro CT: Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon region. *Clin Vaccine Immunol.* 2008, 15, 650-658
44. Ferrara JL, Abhyankar S, Gilliland DG: Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1. *Transplant Proc.* 1993, 25,

1216-1217

45. Flisiak R: Cytokiny w patogenezie włóknienia wątrobowego. *Przeg. Lek.* 1999,56, 604-607
46. Goljan J, Nahorski WL, Wroczyńska A, Felczak-Korzybska I, Pietkiewicz H: Severe malaria--analysis of prognostic symptoms and signs in 169 patients treated in Gdynia in 1991-2005. *Int Marit Health.* 2006, 57, 149-162
47. Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W: *Immunologia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2002
48. Gosi P, Khusmith S, Looareesuwan S, Sitachamroom U, Glanarongran R, Buchachart K, Walsh DS: Complicated malaria is associated with differential elevations in serum levels of interleukins 10, 12, and 15. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1999, 30, 412-417
49. Gourley IS, Kurtis JD, Kamoun M, Amon JJ, Duffy PE: Profound bias in interferon-gamma and interleukin-6 allele frequencies in western Kenya, where severe malarial anemia is common in children. *J Infect Dis.* 2002, 186, 1007-1012
50. Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Vassalli P, Hommel M, Lambert PH: Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Engl J Med.* 1989, 320, 1586-1591
51. Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW: The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis.* 2004, 4, 327-336
52. Hoffman SL, Crutcher JM, Puri SK, Ansari AA, Villinger F, Franke ED, Singh PP, Finkelman F, Gately MK, Dutta GP, Sedegah M: Sterile protection of monkeys against malaria after administration of interleukin-12. *Nat Med.* 1997, 3, 80-83
53. Holloway SP, Min W, Inselburg JW: Isolation and characterization of a chaperonin-60 gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.

Mol Biochem Parasitol. 1994, 64, 25-32

54. Hoshino T, Wiltrout RH, Young HA: IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *J Immunol.* 1999, 62, 5050-5057
55. Hugosson E, Montgomery SM, Premji Z, Troye-Blomberg M, Björkman A: Relationship between antipyretic effects and cytokine levels in uncomplicated falciparum malaria during different treatment regimes. *Acta Trop.* 2006, 99, 75-82
56. Jaeschke R, Cook D, Guyatt G: Ocena artykułów na temat testów diagnostycznych. Cz. II - metody określania przydatności testu. *Medycyna Praktyczna* 1998,11, 184-191
57. Jaremin B, Nahorski W, Goljan J, Felczak-Korzybska I, Górski J, Myjak P, Kołowski A: Malaria as an occupational disease. *Bull. Inst. Marit. Trop. Med.* 1993/1994, 44/45, 43-50
58. Jason J, Archibald LK, Nwanyanwu OC, Byrd MG, Kazembe PN, Dobbie H, Jarvis WR: Comparison of serum and cell-specific cytokines in humans. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001, 8, 1097-1103
59. Jennings RM, DE Souza JB, Todd JE, Armstrong M, Flanagan KL, Riley EM, Doherty JF: Imported *Plasmodium falciparum* malaria: are patients originating from disease-endemic areas less likely to develop severe disease? A prospective, observational study. *Am J Trop Med Hyg.* 2006, 75, 1195-1199
60. Juszczak K: Zakażenia, nieodłączny problem medycyny. *Przegl. Epidemiol.* 2003, 57, 237-47
61. Kabyemela ER, Muehlenbachs A, Fried M, Kurtis JD, Mutabingwa TK, Duffy PE: Maternal peripheral blood level of IL-10 as a marker for inflammatory placental malaria. *Malar J.* 2008, 7, 26-32

62. Karunaweera ND, Carter R, Grau GE, Kwiatkowski D, Del Giudice G, Mendis KN: Tumour necrosis factor-dependent parasite-killing effects during paroxysms in non-immune *Plasmodium vivax* malaria patients. Clin Exp Immunol. 1992a, 88, 499
63. Karunaweera ND, Grau GE, Gamage P, Carter R, Mendis KN: Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992b, 89, 3200-3203
64. Kem P, Hemmer CJ, Van Damme J, Gruss HJ, Dietrich M: Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated *Plasmodium falciparum* malaria. Am J Med. 1989, 87, 139-143
65. Kirchgatter K, Del Portillo HA: Clinical and molecular aspects of severe malaria. An Acad Bras Cienc. 2005, 77, 455-475
66. Kochańska-Dziurawicz A, Klimek A, Mielniczuk M: Przydatność krzywych ROC w ocenie stosowanych testów laboratoryjnych. Diagn. Lab. 1999, 1, 83-104
67. Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A: *Plasmodium vivax* malaria. Emerg Infect Dis. 2005, 11, 132-134
68. Kojima S, Nagamine Y, Hayano M, Loareesuwan S, Nakanishi K: A potential role of interleukin 18 in severe falciparum malaria. Acta Trop. 2004, 89, 279-284
69. Kokot T, Nowakowska-Zajdel E, Wierzgon J, Kozowicz A, Muc-Wierzgon A: Modeling of TNF α , TNF RI, TNF RII gene expression level in cells of colon cancer Bio-Algorithms and Med-Systems 2005, 1, 227-232
70. Kopeć M: Udział cytokin w mechanizmach patogenetycznych rozlanego krzepnięcia śródnaczyniowego. Acta Haematol. Pol. 1997, 28 (supl. 1), 59-67
71. Kotłowski A: Profilaktyka malarii, Lek. Rodz. 2007, 12, 536-551

-
72. Kryger T, Nahorski W, Wojtacha A, Szostakowska B, Pietkiewicz H, Myjak P: Assessment of clinical course and outcome of *Plasmodium falciparum* malaria in Angola diagnosed by microscopic and molecular methods. *Int Marit Health*. 2004, 55, 75-85
73. Krzych Ł: Interpretacja wyników analizy statystycznej danych. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska* 2007, 4, 315-321
74. Kubica-Biemat B: Distribution of mosquitoes (Diptera: Culicidae) In Poland. *Europ. Mosquito Bull*. 1995, 5, 1-17.
75. Kuśnierz-Cabala B, Galicka-Latała D, Naskalski JW, Sieradzki J: Przydatność oznaczeń interleukiny 18 w diagnostyce klinicznej. *Prz. Lek*. 2006, 63, 789-791
76. Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, Cerami A, Brewster DR, Greenwood BM: TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*. 1990, 336, 1201-1204
77. Lilic D, Cant AJ, Abinun M, Calvert JE, Spickett GP: Cytokine production differs in children and adults. *Pediatr Res*. 1997, 42, 237-240
78. Linke A, Kühn R, Müller W, Honarvar N, Li C, Langhorne J: *Plasmodium chabaudi chabaudi*: differential susceptibility of gene-targeted mice deficient in IL-10 to an erythrocytic-stage infection. *Exp Parasitol*. 1996, 84, 253-263
79. Looareesuwan S, Sjöstrom L, Krudsood S, Wilairatana P, Porter RS, Hills F, Warrell DA.: Polyclonal anti-tumor necrosis factor-alpha Fab used as an ancillary treatment for severe malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1999, 61, 26-33
80. Luchavez J, Espino F, Curameng P, Espina R, Bell D, Chiodini P, Nolder D, Sutherland C, Lee KS, Singh B: Human Infections with *Plasmodium*

- knowlesi*, the Philippines. *Emerg Infect Dis.* 2008, 14, 811-813
81. Luty AJ, Perkins DJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Herbich K, Schmid D, Weinberg JB, Kreamsner PG: Low interleukin-12 activity in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* 2000, 68, 3909-3915
 82. Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I, Kone A, Harley R, Plowe CV, Doumbo OK, Sztein MB: Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun.* 2004, 72, 5630-5637.
 83. Malaguamera L, Imbesi RM, Pignatelli S, Simporè J, Malaguamera M, Musumeci S.: Increased levels of interleukin-12 in *Plasmodium falciparum* malaria: correlation with the severity of disease. *Parasite Immunol.* 2002a, 24, 387-389
 84. Malaguamera L, Musumeci S: The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis.* 2002b, 2, 472-478
 85. Malaguamera L, Pignatelli S, Musumeci M, Simporè J, Musumeci S.: Plasma levels of interleukin-18 and interleukin-12 in *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasite Immunol.* 2002c, 24, 489-492
 86. Mansueto P, Vitale G, Di Lorenzo G, Rini GB, Mansueto S, Cillari E: Immunopathology of leishmaniasis: an update. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2007, 20, 435-445
 87. Marx A, Pewsner D, Egger M, Nüesch R, Bucher HC, Genton B, Hatz C, Jüni P: Meta-analysis: accuracy of rapid tests for malaria in travelers returning from endemic areas. *Ann Intern Med.* 2005, 142, 836-846
 88. Mattei D, Scherf A, Bensaude O., da Silva LP.: A heat shock-like protein from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* induces autoantibodies. *Eur J Immunol.* 1989, 19, 1823-1828

89. Mayxay M, Pukrittayakamee S, Newton PN, White NJ: Mixed-species malaria infections in humans. *Trends in Parasitology* 2004, 20, 233-240
90. Maitland K, Marsh K: Pathophysiology of severe malaria in children. *Acta Trop.* 2004, 90, 131-140
91. Mazier D, Mattei D.: Parasite heat-shock proteins and host responses: the balance between protection and immunopathology. *Springer Semin Immunopathol.* 1991, 13, 37-53.
92. Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R: The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2001, 64, 97-106
93. Mentink-Kane MM, Wynn TA: Opposing roles for IL-13 and IL-13 receptor alpha 2 in health and disease: *Immunol Rev.* 2004, 202, 191-202
94. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK: The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 2002, 415, 673-679
95. Ministério da Saúde: Bases da Política Nacional de Tratamento da Malária Em Angola 2005-2009, PNCM, 2005
96. Modzelewski B: Współdziałanie interleukin prozapalnych w sieci cytokin u chorych z zespołem septycznym. *Pol. Merkuriusz Lek.* 1996, 1, 284-286
97. Mshana RN, Boulandi J, Mshana NM, Mayombo J, Mendome G: Cytokines in the pathogenesis of malaria: levels of IL-1 beta, IL-4, IL-6, TNF-alpha and IFN-gamma in plasma of healthy individuals and malaria patients in a holoendemic area. *J Clin Lab Immunol.* 1991, 34, 131-139
98. Mühlberger N, Jelinek T, Behrens RH, Gjørup I, Coulaud JP, Clerinx J, Puente S, Burchard G, Gascon J, Gröbusch MP, Weitzel T, Zoller T, Kollaritsch H, Beran J, Iversen J, Hatz C, Schmid ML, Björkman A, Fleischer K, Bisoffi Z, Guggemos W, Knobloch J, Matteelli A, Schulze MH, Laferl H, Kapaun A, McWhinney P, Lopez-Velez R, Fätkenheuer G, Kern P, Zieger BW, Kotlowski A, Fry G, Cuadros J, Myrvang B; TropNetEurop; Surveillance

- importierter Infektionen in Deutschland Surveillance Networks: Age as a risk factor for severe manifestations and fatal outcome of falciparum malaria in European patients: observations from TropNetEurop and SIMPID Surveillance Data. Clin Infect Dis. 2003, 36, 990-995
99. Muniz-Junqueira MI, dos Santos-Neto LL, Tosta CE: Influence of tumor necrosis factor-alpha on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in vitro. Cell Immunol. 2001, 208, 73-79
100. Musumeci M, Malaguamera L, Simpoire J, Messina A, Musumeci S.: Modulation of immune response in *Plasmodium falciparum* malaria: role of IL-12, IL-18 and TGF-beta. Cytokine. 2003, 21, 172-178
101. Myjak P, Jaremin B, Zwierz Cz, Nahorski W, Pietkiewicz H, Kocięcka W, Stefaniak J, Żamowska-Prymek H, Niścigorska J, Płotkowiak J: Przydatność odczynu immunofluorescencji pośredniej z antygenem *Plasmodium falciparum* dla bieżącego i wstecznego rozpoznania malarii. Pol. Tyg. Lek. 1993, 48, 732-736
102. Myjak P, Nahorski W, Pieniazek NJ, Pietkiewicz H: Usefulness of PCR for diagnosis of imported malaria in Poland. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002, 21, 215-218
103. Myjak P, Nahorski W, Żarnowska-Prymek H, Pietkiewicz H: Przydatność zestawu "Optimal rapid malaria test" do szybkiego rozpoznawania malarii importowanej do Polski. Wiad Parazytol. 2004, 50, 193-199
104. Nagamine Y, Hayano M, Kashiwamura S, Okamura H, Nakanishi K, Krudsod S, Wilairatana P, Looareesuwan S, Kojima S: Involvement of interleukin-18 in severe *Plasmodium falciparum* malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003, 97, 236-241
105. Nahorski WL, Goljan J, Wroczyńska A, Kuna A, Myjak P, Pietkiewicz H: Trudności diagnostyczno-terapeutyczne malarii w Polsce. Wiad. Parazytol. 2007, 53 (supl.), 168

106. Na BK, Park JW, Lee HW, Lin K, Kim SH, Bae YA, Sohn WM, Kim TS, Kong Y: Characterization of *Plasmodium vivax* heat shock protein 70 and evaluation of its value for serodiagnosis of tertian malaria. Clin Vaccine Immunol. 2007, 14, 320-342
107. Ng OT, Ooi EE, Lee CC, Lee PJ, Ng LC, Pei SW, Tu TM, Loh JP, Leo YS: Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. Emerg Infect Dis. 2008, 14, 814-816
108. Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Looareesuwan S, Tokunaga K.: A single-nucleotide substitution from C to T at position -1055 in the IL-13 promoter is associated with protection from severe malaria in Thailand. Genes Immun. 2003, 4, 528-531
109. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K: Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. Nature. 1995, 378, 88-91
110. O'Mahony L, Holland J, Jackson J, Feighery C, Hennessy TP, Mealy K: Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related changes in proinflammatory cytokine production. Clin Exp Immunol. 1998, 113, 213-219
111. Ong'echa JM, Remo AM, Kristoff J, Hittner JB, Were T, Ouma C, Otieno RO, Vulule JM, Keller CC, Awandare GA, Perkins DJ: Increased circulating interleukin (IL)-23 in children with malarial anemia: in vivo and in vitro relationship with co-regulatory cytokines IL-12 and IL-10. Clin Immunol. 2008, 126, 211-221
112. Oppenheim JJ, Feldmann M.: Cytokine reference : a compendium of cytokines and other mediators of host defense. Vol. 1, Ligands, Academic Press, 2001.
113. Othoro C, Lal AA, Nahlen B, Koeh D, Orago AS, Udhayakumar V: A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. J Infect Dis. 1999, 179, 279-282

114. Parikh CR, Devarajan P: New biomarkers of acute kidney injury. *Crit Care Med.* 2008, 36(supl. 4), 159-165
115. Patel DN, Pradeep P, Surti MM, Agarwal SB: Clinical Manifestations of Complicated Malaria - An Overview. *JACM* 2003, 4, 323-331
116. Pavithra SR, Kumar R, Tatu U: Systems analysis of chaperone networks in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS Comput Biol.* 2007, 3, 1701-1715
117. Pawłowski ZS, Knap JP, Dzbeński TH, Kacprzak E, Kierznikowicz B, Myjak P, Nahorski WL, Stefaniak J: Profilaktyka, diagnostyka i leczenie malarii. Alfa-medica press, 2004a
118. Pawłowski ZS, Stefaniak J: Parazytologia kliniczna w ujęciu wielodyscyplinarnym. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2004b
119. Perkins DJ, Weinberg JB, Kremsner PG: Reduced interleukin-12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity. *J Infect Dis.* 2000, 182, 988-992
120. Perkmann T, Winkler H, Graninger W, Kremsner PG, Winkler S: Circulating levels of the interleukin (IL)-4 receptor and of IL-18 in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. *Cytokine.* 2005, 29, 153-158
121. Pietruczuk A, Zajkowska JM., Hermanowska-Szpakowicz T: Cytokiny prozapalne w odpowiedzi humoralnej. *Pol. Merkurusz Lek.* 2001, 11, 434
122. Polla BS.: Heat shock proteins in host-parasite interactions. *Parasitol Today.* 1991, 7, 38-41
123. Price L, Planche T, Rayner C, Krishna S: Acute respiratory distress syndrome in *Plasmodium vivax* malaria: case report and review of the literature. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007a 101, 655-659
124. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM: Vivax

- malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg.* 2007b 77, 79-87
125. Ramharter M, Willheim M, Winkler H, Wahl K, Lagler H, Graninger W, Winkler S: Cytokine profile of *Plasmodium falciparum*-specific T cells in non-immune malaria patients. *Parasite Immunol.* 2003, 25, 211-219
126. Rehlis N, Javor P: Interpretacja testów immunochromatograficznych z antygenem HRP-2 u dzieci do lat 5 w rejonie o wysokim ryzyku transmisji zimnicy w Papua Nowej Gwinei. *Wiad. Parazytol.* 2004, 50, 201-208
127. Rhee MS, Akanmori BD, Waterfall M, Riley EM: Changes in cytokine production associated with acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol.* 2001, 126, 503-510
128. Riley EM, Jakobsen PH, Allen SJ, Wheeler JG, Bennett S, Jepsen S, Greenwood BM: Immune response to soluble exoantigens of *Plasmodium falciparum* may contribute to both pathogenesis and protection in clinical malaria: evidence from a longitudinal, prospective study of semi-immune African children. *Eur J Immunol.* 1991, 21, 1019-1025.
129. Riley EM: Is T-cell priming required for initiation of pathology in malaria infections? *Immunol Today.* 1999, 20, 228-233
130. Schlagenhauf-Lawlor P: Travelers' malaria. BC Decker, 2001
131. Schofield L, Grau GE: Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* 2005, 5, 722-735
132. Shaffer N, Grau GE, Hedberg K, Davachi F, Lyamba B, Hightower AW, Breman JG, Phuc ND: Tumor necrosis factor and severe malaria. *J Infect Dis.* 1991, 163, 96-101
133. Sikora JP: Wybrane wskaźniki immunologiczne i ich użyteczność kliniczna w diagnostyce i prognozowaniu uogólnionych zakażeń i urazów. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2005, 14, 777-783
134. Singh RP, Kashiwamura S, Rao P, Okamura H, Mukherjee A, Chauhan VS:

- The role of IL-18 in blood-stage immunity against murine malaria *Plasmodium yoelii* 265 and *Plasmodium berghei* ANKA. J Immunol. 2002, 168, 4674-4681
135. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI: The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. Nature. 2005, 434, 214-217
136. Steffen R, deBernardis C, Baños A: Travel epidemiology--a global perspective. Int J Antimicrob Agents. 2003, 21, 89-95
137. Stelmach WR, Walski M, Olszański R: Cytoadherencja w malarii mózgowej jako szczególny przykład patologii w układzie gospodarz - pasożyt. Wiad. Parazytol. 2001, 47, 573-578
138. Su Z, Stevenson MM: Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. Infect Immun. 2000, 68, 4399-4406
139. Su Z, Stevenson MM: IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. J Immunol. 2002, 168, 1348-1355
140. Tchórzewski H: Zapalenie. Patofizjologia i klinika. Medpress, 1998
141. Torre D, Giola M, Speranza F, Matteelli A, Basilico C, Biondi G: Serum levels of interleukin-18 in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. Eur Cytokine Netw. 2001, 12, 361-364
142. Torre D, Speranza F, Giola M, Matteelli A, Tambini R, Biondi G: Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. Clin Diagn Lab Immunol. 2002, 9, 348-351
143. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM.: Clinical review: Severe malaria. Crit Care. 2003, 7, 315-323
144. Trinchieri G: Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and

- adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003, 3, 133-146
145. Trinchieri G: Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 1995, 13, 251-276
146. Tschoeke SK, Oberholzer A, Moldawer LL: Interleukin-18: a novel prognostic cytokine in bacteria-induced sepsis. *Crit Care Med.* 2006, 34, 1225-1233
147. Turner JD, Jackson JA, Faulkner H, Behnke J, Else KJ, Kamgno J, Boussinesq M, Bradley JE: Intensity of intestinal infection with multiple worm species is related to regulatory cytokine output and immune hyporesponsiveness. *J Infect Dis.* 2008, 197, 1204-1212,
148. Wandurska-Nowak E: Rola tlenu azotu w inwazjach pasożytniczych. *Wiad Parazytol* 2004, 50, 665-678
149. Wang Y, Kelly CG, Singh M, McGowan EG, Carrara AS, Bergmeier LA, Lehner T: Stimulation of Th1-polarizing cytokines, C-C chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70. *J Immunol.* 2002, 169, 2422-2429
150. Watała C: Biostatystyka - wykorzystanie metod statystycznych w pracy badawczej w naukach biomedycznych. Alfa Medica Press, 2002
151. Wenisch C, Parschalk B, Narzt E, Looareesuwan S, Graninger W: Elevated serum levels of IL-10 and IFN-gamma in patients with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995, 74, 115-117
152. Wereszczyńska-Sięmiątkowska U, Kosel J, Siemiątkowski A: Właściwości biologiczne interleukiny 18. *Pol. Merkuriusz Lek.* 2004, 16, 279-281
153. Wiercinska-Drapalo A, Fisiak R, Jaroszewicz J, Prokopowicz D: Plasma interleukin-18 reflects severity of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2005, 11, 605-608

154. Wilfing A, Winkler S, Schratlbauer K, Willheim M, Baier K, Aichelburg A, Müller T, Graninger W, Kremsner PG: African-European differences in the capacity of T-cell cytokine production. *Am J Trop Med Hyg.* 2001, 65, 504-509
155. Wojtacha A: St. Lucas Health Center in Kifangondo, Angola. *Int Marit Health.* 2004, 55, 177-180
156. World Health Organisation: International Travel and Health, WHO Press, 2008
157. World Health Organisation: Severe and complicated malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990, 84 (Supl. 2), 165
158. World Health Organisation: Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000, 94 (Supl. 1), S1-90
159. World Health Organisation: World Malaria Report 2005. Prepared by Roll Back Malaria/WHO/UNICEF, Geneva 2005
160. Wu T, Tanguay RM: Antibodies against heat shock proteins in environmental stresses and diseases: friend or foe? *Cell Stress Chaperones.* 2006, 11, 1-12
161. Yeom JS, Park SH, Ryu SH, Park HK, Woo SY, Ha EH, Lee BE, Yoo K, Lee JH, Kim KH, Kim S, Kim YA, Ahn SY, Oh S, Park HJ, Min GS, Seoh JY, Park JW: Serum cytokine profiles in patients with *Plasmodium vivax* malaria: a comparison between those who presented with and without hepatic dysfunction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003, 97, 687-691
162. Zediak VP, Hunter CA: IL-10 fails to inhibit the production of IL-18 in response to inflammatory stimuli. *Cytokine.* 2003, 21, 84-90
163. Zhang M, Hisaeda H, Kano S, Matsumoto Y, Hao YP, Looaresuwan S, Aikawa M, Himeno K: Antibodies specific for heat shock proteins in human and murine malaria. *Microbes Infect.* 2001, 3, 363-367

-
164. Zügel U, Kaufmann SH: Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 1999, 12, 19-39

9 Aneks

W niniejszej części rozprawy przedstawiono szczegółowe dane statystyczne dotyczące charakterystyki badanych zmiennych, w tym wartości miar rozproszenia oraz skupienia stężeń cytokin i przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicach osób badanych, a także parametry wydolności diagnostycznej oznaczania surowicznych poziomów wybranych interleukin w zimnicy. Dane te dostarczają możliwość pełnej interpretacji uzyskanych wyników, jednak umieszczenie ich we wcześniejszych rozdziałach wpłynęłoby niekorzystnie na czytelność pracy.

Objaśnienia do zamieszczonych poniżej tabel:

95% CI	95% Przedział ufności (z j. ang. Confidence Interval)
Min.	Wartość minimalna
Maks.	Wartość maksymalna
SD	Odchylenie standardowe (z j. ang. Standard Deviation)
SEM	Błąd standardowy średniej (z j. ang. Standard Error of the Mean)
PPV	Wartość predykcji wyników dodatnich (z j. ang. Positive predictive value)
NPV	Wartość predykcji wyników ujemnych (z j. ang. Negative predictive value)
LR+	Wskaźnik wiarygodności dla wyniku dodatniego (z j. ang. Positive likelihood ratio)
LR-	Wskaźnik wiarygodności dla wyniku ujemnego (z j. ang. Negative likelihood ratio)

Tabela 25. Stężenia cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dorosłych z przywleczoną do Polski zimnicą o ciężkim przebiegu

Cząsteczka	Średnia	95% CI	Min.	Maks.	SD	SEM	Mediana
TNF (pg/ml)	56,41	36,01-76,81	13,35	202,26	48,32	9,86	43,35
IFN γ (pg/ml)	53,24	30,57-75,91	1,29	168,96	53,7	10,96	36,91
IL-6 (pg/ml)	92,17	14,27-170,08	0,27	724	184,5	37,66	14,48
IL-10 (pg/ml)	546,84	309,75-783,93	12,85	1436,0	561,47	114,61	262,89
IL-12 (pg/ml)	115,21	69,93-160,48	2,03	408,04	107,23	21,89	82,18
IL-13 (pg/ml)	9,88	4,92-14,84	0,54	53,9	11,75	2,4	6,8
IL-18 (pg/ml)	1493,03	970,14-2015,92	84,46	4687,2	1238,3	252,77	1014,02
Przeciwciała przeciwko Hsp60 (ng/ml)	161,31	92,01-230,62	24,4	688,18	164,12	33,5	101,3
Przeciwciała przeciwko Hsp70 (ng/ml)	721,8	339,33-1104,27	56,68	4133,21	905,77	184,89	493,42

Tabela 26. Stężenia cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dorosłych z przywleczoną do Polski zimnicą o łagodnym przebiegu

Cząsteczka	Średnia	95% CI	Min.	Maks.	SD	SEM	Mediana
TNF (pg/ml)	52,26	35,3-69,23	2,72	439,58	71,17	8,5	31,94
IFN γ (pg/ml)	169,95	68,22-271,67	0,72	2087,54	426,61	50,99	15,71
IL-6 (pg/ml)	37,39	5,37-69,41	0,32	958,49	134,29	16,05	8,96
IL-10 (pg/ml)	201,75	121,11-282,39	2,52	1436	338,21	40,42	52,33
IL-12 (pg/ml)	313,83	476,72-480,94	8,46	4045,84	700,84	83,77	136,17
IL-13 (pg/ml)	16,33	4,24-28,43	0,15	423,36	50,71	6,06	7,17
IL-18 (pg/ml)	602,85	432,24-773,45	27,14	3336,93	715,5	85,52	355,95
Przeciwciała przeciwko Hsp60 (ng/ml)	165,57	130,59-200,55	2,48	563,54	146,69	17,53	111,33
Przeciwciała przeciwko Hsp70 (ng/ml)	709,8	501,1-918,46	51,94	5732,65	875,18	104,6	469,76

Tabela 27. Stężenia cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dorosłych Polaków po przebytej zimnicy

Cząsteczka	Średnia	95% CI	Min.	Maks.	SD	SEM	Mediana
TNF (pg/ml)	28,89	19,88-37,9	2,35	189,79	29,62	4,47	23,18
IFN γ (pg/ml)	14,17	12,19-16,14	3,25	33,09	6,49	0,98	14,81
IL-6 (pg/ml)	4,1	2,93-5,28	0,11	15,96	3,86	0,58	3,44
IL-10 (pg/ml)	44,28	3,6-84,96	1,7	871,32	133,8	20,17	14,07
IL-12 (pg/ml)	102,08	81,93-122,23	2,07	252,256	66,28	10	85,41
IL-18 (pg/ml)	450,67	367,27-534,08	8,6	1602,47	274,32	41,36	448,71
Przeciwciała przeciwko Hsp60 (ng/ml)	209,29	161,06-257,52	40,55	768	158,64	23,92	186,88
Przeciwciała przeciwko Hsp70 (ng/ml)	493,95	359,09-628,81	40,9	2529,61	44,59	66,87	399,75

Tabela 28. Stężenia cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dzieci angolskich z zimnicą o ciężkim przebiegu

Cząsteczka	Średnia	95% CI	Min.	Maks.	SD	SEM	Mediana
TNF (pg/ml)	123,76	65,42-182,11	47,62	427,44	105,36	27,2	70,85
IFN γ (pg/ml)	72,39	46,64-98,14	31,83	230,31	46,5	12,01	59,2
IL-6 (pg/ml)	96,94	37,01-156,87	20,71	421,5	108,22	27,94	56,63
IL-10 (pg/ml)	272,9	139,89-405,9	29,57	698,86	240,18	62,01	148,1
IL-12 (pg/ml)	194,27	125,75-262,79	42,41	513,3	123,73	31,95	164,28
IL-13 (pg/ml)	32,46	30,84-34,09	27,52	36,57	2,93	0,76	32,09
IL-18 (pg/ml)	835,53	557,05-1114	220,76	2179,41	502,86	129,84	793,79
Przeciwciała przeciwko Hsp60 (ng/ml)	79,59	40,89-118-26	21,42	262,59	69,88	18,04	53,82

Tabela 29. Stężenia cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dzieci angolskich z zimnicą o łagodnym przebiegu

Cząsteczka	Średnia	95% CI	Min.	Maks.	SD	SEM	Mediana
TNF (pg/ml)	65,39	58,87-71,91	40,06	177,03	21,45	3,23	63,73
IFN γ (pg/ml)	57,18	54,62-59,75	46,09	75,57	8,43	1,27	55,84
IL-6 (pg/ml)	37,53	28,32-46,75	11,23	159,92	30,31	4,57	24,31
IL-10 (pg/ml)	40,63	33,02-48,24	16,89	155,3	25,03	3,77	33,96
IL-12 (pg/ml)	138,13	113,09-163,17	21,93	366,41	82,36	12,42	127,72
IL-13 (pg/ml)	34,07	32,11-36,03	28,96	68,97	6,46	0,97	32,86
IL-18 (pg/ml)	376,26	322,58-429,92	223,9	2042,73	176,53	26,61	372,57
Przeciwciała przeciwko Hsp60 (ng/ml)	37,6	29,46-47,74	1,95	146,99	26,76	4,03	29,83

Tabela 30. Stężenia cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dzieci angolskich po przebytej zimnicy

Cząsteczka	Średnia	95% CI	Min.	Maks.	SD	SEM	Mediana
TNF (pg/ml)	59,1	53,29-64,9	43,33	94,47	12,4	2,77	63,83
IFN γ (pg/ml)	51,92	49,54-54,31	45,3	61,45	5,1	1,14	51,8
IL-6 (pg/ml)	22,56	19,73-25,87	17,68	41,08	6,04	1,35	19,89
IL-10 (pg/ml)	35,69	22,16-49,23	12,67	132,4	28,92	6,47	23,88
IL-18 (pg/ml)	262,09	202,01-322,17	98,64	610,61	128,37	28,7	261,95
Przeciwciała przeciwko Hsp60 (ng/ml)	64,43	32,02-96,83	14,18	287,37	69,23	15,48	41,89

Tabela 31. Parametry wydolności diagnostycznej surowiczych stężeń wybranych cytokin, uznanych za optymalne (progowe) za pomocą krzywych ROC w różnicowaniu lekkiej i ciężkiej malarii u dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski

Cytokina	Stężenie (pg/ml)	Specyficzność	Czułość	PPV*	NPV**	LR+	LR-
IL-6	13,68	64,0%	69,6%	43,2%	84,2%	1,93	0,48
IL-10	93,95	64,0%	66,7%	41,0%	83,6%	1,85	0,52
IL-12	99,443	60,0%	68,1%	40,5%	82,5%	1,70	0,53
IL-18	579,67	80,0%	72,5%	51,3%	90,9%	3,63	0,34

Tabela 32. Parametry wydolności diagnostycznej surowiczych stężeń wybranych cytokin, uznanych za optymalne (progowe) za pomocą krzywych ROC w różnicowaniu lekkiej i ciężkiej malarii u chorych dzieci angolskich

Cytokina	Stężenie (pg/ml)	Specyficzność	Czułość	PPV*	NPV**	LR+	LR-
IL-6	29,2	73,3%	65,9%	42,3%	87,9%	2,47	0,47
IL-10	53,93	80,0%	84,1%	63,2%	92,5%	4,21	0,2
IL-18	403,94	80,0%	63,6%	42,9%	90,3%	3,18	0,46

Na kolejnych stronach aneksu przedstawiono zapisy porozumienia o współpracy naukowo-badawczej pomiędzy Akademią Medyczną w Gdańsku a Uniwersytetem im. Agostinho Neto w Luandzie (Angola), uwzględniającego działalność Międzywydziałowego Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w obrębie Centrum Medycznego im. Św. Łukasza w Kifangondo. Dzięki tej umowie, podpisanej w roku 2004, możliwe było przeprowadzenie badań opisanych w niniejszej rozprawie.

10 Spis rycin

Rycina 1. Gatunki Plasmodium chorobotwórcze dla człowieka (Pv – P. vivax, Po – P. ovale, Pf – P. falciparum, Pm – P. malariae).....	13
Rycina 2. Cykl rozwojowy zarodźca malarii w organizmie komara i człowieka.....	16
Rycina 3. Czynniki biorące udział w patogenezie malarii - zależne od organizmu żywiciela, pasożyta oraz geograficzno-środowiskowe.....	21
Rycina 4. Śmiertelność z powodu poszczególnych postaci malarii o ciężkim przebiegu u dzieci.....	30
Rycina 5. Podobieństwo strukturalne ludzkiego białka Hsp70 oraz PfHsp70	42
Rycina 6. Centrum Medyczne im. Św. Łukasza i jego usytuowanie w Angoli.....	46
Rycina 7. Oddział Szpitalny Centrum Medycznego im. Św. Łukasza w Kifangondo ..	47
Rycina 8. Pacjenci z malarią hospitalizowani w Oddziale Szpitalnym Centrum Medycznego im. Św. Łukasza, w trakcie leczenia.....	55
Rycina 9. Oznaczenia IL-10 w surowicy osób włączonych do badań - odczyt absorbancji prób przedstawiony za pomocą programu Mikrowin 2000 S.C.	64
Rycina 10. Tereny endemicznego występowania zimnicy na świecie oraz odsetek pacjentów, u których doszło do zarażenia Plasmodium spp. w danym rejonie	68
Rycina 11. Parazytemia u dorosłych pacjentów z zimnicą przywleczoną do Polski...	69
Rycina 12. Parazytemia w badanej grupie dzieci angolskich z zimnicą	73
Rycina 13. Stężenie TNF w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	76
Rycina 14. Stężenie IFN γ w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	77
Rycina 15. Stężenie IL-6 w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	78
Rycina 16. Stężenie IL-10 w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	79

Rycina 17. Stężenie IL-12 w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	80
Rycina 18. Stężenie IL-13 w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	81
Rycina 19. Stężenie IL-18 w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	82
Rycina 20. Stężenie TNF w surowicy krwi dorosłych z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	84
Rycina 21. Stężenie IFN γ w surowicy krwi dorosłych z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	85
Rycina 22. Stężenie IL-6 w surowicy krwi dorosłych z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	86
Rycina 23. Stężenie IL-10 w surowicy krwi dorosłych z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	87
Rycina 24. Stężenie IL-12 w surowicy krwi dorosłych z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	88
Rycina 25. Stężenie IL-18 w surowicy krwi dorosłych z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	89
Rycina 26. Krzywa ROC dla surowiczego stężenia IL-6 u dorosłych z przywleczoną zimnicą.....	90
Rycina 27. Krzywa ROC dla surowiczego stężenia IL-10 u dorosłych z przywleczoną zimnicą.....	91
Rycina 28. Krzywa ROC dla surowiczego stężenia IL-12 u dorosłych z przywleczoną zimnicą.....	92
Rycina 29. Krzywa ROC dla surowiczego stężenia IL-18 u dorosłych z przywleczoną zimnicą.....	93
Rycina 30. Stężenie przeciwciał przeciwko Hsp60 w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej...	95
Rycina 31. Stężenie przeciwciał przeciwko Hsp70 w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej...	96
Rycina 32. Stężenie przeciwciał przeciwko Hsp60 w surowicy krwi dorosłych z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	98
Rycina 33. Stężenie przeciwciał przeciwko Hsp70 w surowicy krwi dorosłych z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	99
Rycina 34. Stężenie TNF w surowicy krwi chorych dzieci angolskich z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	100
Rycina 35. Stężenie IFN γ w surowicy krwi dzieci z ciężkim i łagodnym przebiegiem	

malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	101
Rycina 36. Stężenie IL-6 w surowicy krwi dorosłych z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	102
Rycina 37. Stężenie IL-10 w surowicy krwi dzieci z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	103
Rycina 38. Stężenie IL-12 w surowicy krwi dzieci z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	104
Rycina 39. Stężenie IL-13 w surowicy krwi dzieci z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz grupy kontrolnej.....	105
Rycina 40. Stężenie IL-18 w surowicy krwi dzieci z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	106
Rycina 41. Stężenie TNF w surowicy krwi dzieci z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	108
Rycina 42. Stężenie IFN γ w surowicy krwi dzieci z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	109
Rycina 43. Stężenie IL-6 w surowicy krwi dzieci z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	110
Rycina 44. Stężenie IL-10 w surowicy krwi dzieci z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	111
Rycina 45. Stężenie IL-18 w surowicy krwi dzieci z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	112
Rycina 46. Krzywa ROC dla surowiczego stężenia IL-6 u dzieci angolskich z zimnicą	114
Rycina 47. Krzywa ROC dla surowiczego stężenia IL-10 u dzieci angolskich z zimnicą	114
Rycina 48. Krzywa ROC dla surowiczego stężenia IL-18 u dzieci angolskich z zimnicą	115
Rycina 49. Stężenie przeciwciał przeciwko Hsp60 w surowicy krwi dzieci z ciężkim i łagodnym przebiegiem malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	117
Rycina 50. Stężenie przeciwciał przeciwko Hsp60 w surowicy krwi dzieci z malarią i po przebytej malarii oraz osób z grupy kontrolnej.....	119

11 Spis tabel

Tabela 1. Charakterystyka <i>Plasmodium</i> spp. patogennych dla ludzi (Fauci i wsp. 2000).....	14
Tabela 2. Zachorowalność, umieralność i śmiertelność z powodu malarii przywleczonej do Polski w latach 1992-2003 (źródło: Pawłowski i wsp. 2004a).....	19
Tabela 3. Ważniejsze cytokiny prozapalne, przeciwzapalne i ich receptory biorące udział w patogenezie chorób zakaźnych i pasożytniczych (Oppenheim i wsp. 2001)	32
Tabela 4. Skala śpiączki Glasgow.....	52
Tabela 5. Kryteria laboratoryjne rozpoznawania DIC według ISTH (Fletcher i wsp. 2001).....	53
Tabela 6. Skala śpiączki Blantyre	57
Tabela 7. Kryteria laboratoryjne i kliniczne zmnicy o ciężkim przebiegu (WHO 2000).....	59
Tabela 8. Instrukcje wykonywanie testów ELISA dostępne w internecie.....	63
Tabela 9. Charakterystyka testów ELISA podana przez producenta	65
Tabela 10. Charakterystyka epidemiologiczno-kliniczna badanej grupy – dorośli z przywleczoną do Polski zmnicy	70
Tabela 11. Wykładniki zmnicy o ciężkim przebiegu w grupie dorosłych z przywleczoną do Polski zmnicy	72
Tabela 12. Charakterystyka epidemiologiczno-kliniczna badanej grupy dzieci angolskich z zmnicy.....	74
Tabela 13. Wykładniki zmnicy o ciężkim przebiegu w grupie dzieci angolskich z zmnicy według kryteriów WHO z roku 2000	75
Tabela 14. Stężenia badanych cytokin u dorosłych z przywleczoną z zmnicy w zależności od uprzednio przeżytych epizodów malarii.....	83
Tabela 15. Parametry krzywej ROC dla IL-6 u dorosłych z przywleczoną zmnicy.....	91
Tabela 16. Parametry krzywej ROC dla IL-10 u dorosłych z przywleczoną zmnicy. .	92

Tabela 17. Parametry krzywej ROC dla IL-12 u dorosłych z przywleczoną zimnicą. .	93
Tabela 18. Parametry krzywej ROC dla IL-18 u dorosłych z przywleczoną zimnicą. .	94
Tabela 19. Pola powierzchni pod krzywymi ROC dla wybranych cytokin oraz innych parametrów laboratoryjnych wykorzystywanych w różnicowaniu przypadków łagodnej i ciężkiej malarii u dorosłych z przywleczoną zimnicą.	94
Tabela 20. Stężenia badanych cytokin u dzieci angolskich z zimnicą w zależności od uprzednio przebytych epizodów malarii.	107
Tabela 21. Parametry krzywej ROC dla IL-6 u dzieci angolskich z malarią.	113
Tabela 22. Parametry krzywej ROC dla IL-10 u dzieci angolskich z malarią.	114
Tabela 23. Parametry krzywej ROC dla IL-18 u dzieci angolskich z malarią.	115
Tabela 24. Pola powierzchni pod krzywymi ROC dla wybranych cytokin oraz innych wskaźników diagnostycznych wykorzystywanych w różnicowaniu przypadków łagodnej i ciężkiej malarii u dzieci angolskich.	116
Tabela 25. Stężenia cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dorosłych z przywleczoną do Polski zimnicą o ciężkim przebiegu	171
Tabela 26. Stężenia cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dorosłych z przywleczoną do Polski zimnicą o łagodnym przebiegu	171
Tabela 27. Stężenia cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dorosłych Polaków po przebytej zimnicy.	172
Tabela 28. Stężenia cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dzieci angolskich z zimnicą o ciężkim przebiegu	172
Tabela 29. Stężenia cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dzieci angolskich z zimnicą o łagodnym przebiegu	173
Tabela 30. Stężenia cytokin oraz przeciwciał przeciwko białkom szoku termicznego w surowicy dzieci angolskich po przebytej zimnicy.	173
Tabela 31. Parametry wydolności diagnostycznej surowiczych stężeń wybranych cytokin, uznanych za optymalne (progowe) za pomocą krzywych ROC w różnicowaniu lekkiej i ciężkiej malarii u dorosłych z zimnicą przywleczoną do Polski	174
Tabela 32. Parametry wydolności diagnostycznej surowiczych stężeń wybranych cytokin, uznanych za optymalne (progowe) za pomocą krzywych ROC w różnicowaniu lekkiej i ciężkiej malarii u chorych dzieci angolskich.	174