

Závěrečná zpráva ke grantovému projektu České kardiologické společnosti

Název grantového projektu: Identifikace přítomnosti *Borrelia burgdorferi* v myokardu u jedinců s normální systolickou funkcí levé komory, kteří podstupují chirurgickou revaskularizaci myokardu

Hlavní řešitel: MUDr. Petr Kuchynka, Ph.D., II. interní klinika – klinika kardiologie a angiologie, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

Spoluřešitelé: Prof. MUDr. Tomáš Paleček, Ph.D., a MUDr. Eduard Němeček, II. interní klinika – klinika kardiologie a angiologie, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

Datum schválení grantu: 10. 1. 2012

Doba řešení grantu: leden 2013 – leden 2015

(Smlouva o poskytnutí finančních prostředků na řešení vědeckovýzkumného projektu, která je nutná pro zahájení grantového projektu, byla ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze opakovaně podrobena připomínkovým řízením a její definitivní verze byla podepsána 30. 10. 2012.)

Východisko grantového projektu:

Dilatační kardiomyopatie (DKMP) je charakterizována dilatací a systolickou dysfunkcí levé komory (LK) srdeční, které nelze vysvětlit abnormalitou zatížení LK v důsledku arteriální hypertenze, chlopenní či vrozené srdeční vady nebo stupněm onemocnění koronárních tepen. Dilatační kardiomyopatie je nejčastější příčina srdečního selhání u mladých jedinců. Celosvětově je přibližně polovina všech transplantací srdce prováděna u jedinců s DKMP. K obrazu DKMP může vést řada onemocnění, které srdeční sval postihují primárně nebo sekundárně, v rámci systémového postižení. Přibližně 20–30 % případů DKMP je podmíněno geneticky. U jedinců bez zjevné familiární historie DKMP je často zvažována příčinná souvislost s prodělaným virovým či jiným zánětem srdečního svalu, tj. myokarditidou. Infekce myokardu může proběhnout velmi různorodě, od zcela inaparentního průběhu až po těžké srdeční selhání či náhlou srdeční smrt. U více než poloviny nemocných s myokarditidou s iniciálním postižením funkce LK, tj. sníženou ejekční frakcí, dochází postupně ke kompletní normalizaci stavu. Ve zbývajících případech přetrvává systolická dysfunkce LK a vyvíjí se obraz DKMP.

Postižení srdce se vyskytuje ve druhém stadiu lymeské borreliózy a dobře známa je asociace mezi borreliovou infekcí a arytmiemi, zejména atrioventrikulárními blokádami. Vztah mezi borreliovou infekcí a rozvojem DKMP byl donedávna považován za ne zcela jasný. V roce 1990 byla *Borrelia burgdorferi* (*Bb*) poprvé vykultivována z myokardu u nemocného s dlouhotrvající DKMP [1]. Nicméně genom *Bb* nebyl metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) následně zjištěn u žádného z jedinců s DKMP podstupujících srdeční transplantaci pro terminální srdeční selhání [2,3]. Česká republika patří podle Světové zdravotnické organizace mezi vysoce endemické oblasti lymeské borreliózy. Práce českých autorů prokázaly, že u nemocných s DKMP žijících v České republice je v bioptických vzorcích myokardu (EMB) velmi často nalézán genom *Bb* [4,5]. V případě průkazu *Bb* v EMB jsou postižení jedinci léčeni antibiotickou terapií, konkrétně cefalosporiny III. generace. Tato léčba sice vede k zlepšení systolické funkce LK, k její úplné normalizaci však dochází

jen u části nemocných [4]. Lze spekulovat, že příčinu nejednotného účinku cílené léčby představuje rozdílné trvání borreliové infekce a stupeň ireverzibilního poškození myokardu před zahájením léčby, jasný důkaz pro tuto hypotézu ale dosud chybí. S ohledem na to, že u nemocných s průkazem *Bb* v EMB neexistují žádné randomizované studie porovnávající vliv antibiotické léčby s placebem, nelze samozřejmě vyloučit, že ke zlepšení systolické funkce LK vede samotná konvenční léčba srdečního selhání nebo že k němu dochází zcela spontánně. Konečně není zcela jasno, zda u všech nemocných je příčinou dysfunkce skutečně borreliová infekce jako taková. Práce zkoumající výskyt *Bb* v myokardu jedinců netrpících DKMP nebyly dosud provedeny.

Provedení EMB u jedinců s normální velikostí a funkcí levé komory srdeční, u kterých není přítomno podezření na zánětlivé či specifické onemocnění myokardu, není z etických důvodů možné.

Vzhledem k tomu je jediným možným přístupem k získání vzorku srdečního svalu od takovýchto probandů odebrání části myokardu v průběhu kardiokirurgického výkonu, prováděného ze standardní klinické indikace. Periferní resekce ouška pravé síně je totiž běžnou součástí kardiokirurgického výkonu s nutností mimotělního oběhu. Žilní kanyla mimotělního oběhu je zaváděna do místa ouška pravé síně právě po jeho předchozí periferní resekcí. Tímto způsobem lze tedy pro studijní účely získat vzorek myokardu, který je v rámci výkonu odebírán standardně.

Cíle projektu:

- 1) Zjistit prevalenci *Borrelia burgdorferi* v myokardu nemocných s normální systolickou funkcí nedilatované levé komory podstupujících kardiokirurgickou revaskularizaci myokardu.
- 2) U nemocných s průkazem *Borrelia burgdorferi* v myokardu posoudit aktivitu onemocnění.

Vlastní grantový projekt a jeho závěry:

Do grantového projektu bylo prospektivně dle původního plánu zařazeno 50 jedinců (67 ± 9 let, 15 žen) s ejekční frakcí LK ≥ 50 % podstupujících elektivní kardiokirurgic-



kou revaskularizaci myokardu či zákrok na chlopenním aparátu. Nikdo z jedinců neměl anamnézu myokarditidy ani nedávného infekčního onemocnění a všichni jedinci měli normální hodnoty zánětlivých parametrů při analýze krevních vzorků. V den kardiokirurgického výkonu bylo prováděno vyšetření protilátek proti *Bb* a vzorky myokardu získané resekci ouška pravé síně byly odeslány k vyšetření elektronovou mikroskopií a PCR na přítomnost *Bb* a k vyšetření histopatologickému, resp. imunohistochemickému cílenému na detekci zánětlivé infiltrace myokardu. *Borrelia burgdorferi* nebyla zjištěna v myokardu žádného z jedinců ani PCR, ani elektronovou mikroskopií. Imunohistochemickým vyšetřením bylo zjištěno zánětlivé poškození myokardu pouze u dvou jedinců, navíc jen u jednoho z nich se jednalo o současnou pozitivitu jak T-lymfocytů, tak i lidských leukocytárních antigenů (HLA-DR). Sérologické vyšetření prokázalo metodou ELISA protilátky v IgM třídě u 2 (4 %) jedinců a v IgG třídě u 6 (12 %) jedinců. Metodou Western blot byly nalezeny protilátky v třídách IgM i IgG u 7 (14 %) jedinců. Metodou Western blot byly potvrzeny pozitivní nálezy zjišťované metodou ELISA u všech jedinců, a navíc byla zjištěna pozitivita IgM protilátek u dalších pěti jedinců a ve třídě IgG u dalšího jednoho jedince.

Tato práce zjistila, že *Bb* se u nemocných s normální systolickou funkcí LK nemajících anamnézu myokarditidy a podstupujících elektivní kardiokirurgickou operaci nevyskytuje. Přítomnost *Bb* u nemocných s dilatační kardiomyopatií a její absence u nemocných s normální systolickou funkcí levé komory podporuje teorii o kauzálním vztahu mezi přítomností *Bb* v myokardu a rozvojem dilatační kardiomyopatie.

Navíc v naší práci bylo prováděno i sérologické vyšetření protilátek proti *Bb*. Sérologické vyšetření je považováno za jedno z klíčových laboratorních vyšetření v diagnostice borreliové infekce. Nicméně vlastní diagnóza lymeské nemoci je založena především na zhodnocení klinických projevů a sérologické vyšetření má spíše podpůrný význam při stanovení diagnózy. V naší studii neměl žádný z nemocných anamnézu lymeské nemoci ani žádné klinické příznaky svědčící pro borreliovou infekci. Je dobře známo, že snížená specifita sérologických metod může být ovlivněna řadou faktorů, mezi které patří například přítomnost zkříženě reagujících protilátek či nastavení příliš nízkých detekčních limitů dané metody. Sérologické metody mohou být rovněž ovlivněny oligoklonální stimulací pozorovanou u některých virových i nevirových infekcí. Navíc ve vysoce endemických oblastech borreliózy, mezi které patří Česká republika, je známa vysoká prevalence specifických protilátek proti *Bb* v obecné populaci a sérologická diagnostika má i z tohoto pohledu omezený klinický význam. Ve studii

Kodyma a spol. byla analyzována séra 100 zdravých dárců krve, kteří neměli anamnézu lymeské nemoci. Séropozitivita byla zjištěna celkem u 29 % jedinců a u 12 % všech jedinců byla nalezena pozitivita ve třídě IgM [6]. Na základě dosud publikovaných dat a našich výsledků se domníváme, že izolovaná pozitivita protilátek proti *Bb* u nemocných bez anamnézy lymeské nemoci a bez příznaků suspektních z lymeské borreliózy má zcela omezený klinický význam.

Literatura

- [1] G. Stanek, J. Klein, R. Bittner, D. Glogar, Isolation of *Borrelia burgdorferi* from a patient with longstanding cardiomyopathy, *New England Journal of Medicine* 322 (1990) 249–252.
- [2] N. de Leeuw, W.J. Melchers, A.H. Balk, et al., Study on microbial persistence in end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy, *Clinical Infectious Diseases* 29 (1999) 522–525.
- [3] M. Suedkamp, C. Lissel, H. Eiffert, et al., Cardiac myocytes of hearts from patients with end-stage dilated cardiomyopathy do not contain *Borrelia burgdorferi* DNA, *American Heart Journal* 138 (1999) 269–272.
- [4] T. Palecek, P. Kuchynka, D. Hulinska, et al., Presence of *Borrelia burgdorferi* in endomyocardial biopsies in patients with new-onset unexplained dilated cardiomyopathy, *Medical Microbiology and Immunology* 199 (2010) 139–143.
- [5] M. Kubánek, M. Šramko, D. Berenová, et al., Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in endomyocardial biopsy specimens in individuals with recent-onset dilated cardiomyopathy, *European Journal of Heart Failure* 14 (2012) 588–596.
- [6] P. Kodym, J. Hořejší, Z. Kurzová, et al., Borreliosis in Prague: prevalence in ticks, blood donors and patients of the National Reference Laboratory as compared with reported incidence data. In: V4 Parasitological Meeting “Parasites in the Heart of Europe”, Stará Lesná, Slovakia, 25.–30. 5. 2014. Book of Abstracts: 32.

Publikace v časopisech s IF a dedikací grantového projektu:

1. P. Kuchynka, T. Palecek, T. Grus, J. Lindner, D. Berenová, Z. Kurzová, P. Balatová, D. Krsek, I. Vitková, E. Nemecek, J. Podzimekova, A.B. Danek, A. Linhart, Absence of *Borrelia burgdorferi* in the myocardium of subjects with normal left ventricular systolic function: a study using PCR and electron microscopy, *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czech Republic* 160 (2016) 136–139.
2. P. Kuchynka, T. Palecek, T. Grus, J. Schramlova, D. Krsek, I. Vitkova, V. Rohn, J. Lindner, E. Wicks, E. Nemecek, G. Dostalova, J. Podzimekova, A. Linhart, A high frequency of viral agents yet absence of *Borrelia burgdorferi* is seen within the myocardium of subjects with normal left ventricular systolic function: an electron microscopy study, *Folia Microbiologica (Praha)* 61 (2016) 129–135.
3. P. Kuchynka, T. Palecek, E. Nemecek, M. Fikrle, A. Linhart, New therapeutic aspects of inflammatory cardiomyopathy, *Current Pharmaceutical Design* 21 (2015) 459–465.

Tabulka 1 – Vynaložené finanční prostředky na realizaci grantového projektu

Provedená vyšetření	Instituce provádějící vyšetření	Zaplacená částka (Kč)
Sérologické vyšetření krve, PCR a elektronová mikroskopie myokardu cílené na průkaz <i>Borrelia burgdorferi</i>	Státní zdravotní ústav v Praze	175 650
Imunohistochemické vyšetření myokardu	Ústav patologie VFN v Praze	75 000
Náklady na publikace	Poplatek v časopisu <i>Biomedical Papers</i>	10 000
Celkové výdaje		260 650

4. **P. Kuchynka**, T. Palecek, S. Havranek, I. Vitkova, E. Nemecek, R. Trckova, D. Berenova, D. Krsek, J. Podzimkova, M. Fikrle, B.A. Danek, A. Linhart, Recent-onset dilated cardiomyopathy associated with *Borrelia burgdorferi* infection, *Herz* 40 (2015) 892–897.

Prezentace grantového projektu na kongresu:

XXIII. výroční sjezd České kardiologické společnosti (Brno, 27. 5. 2015)

*Název přednášky: Absence *Borrelia burgdorferi* v myokardu jedinců s normální systolickou funkcí levé komory: PCR a elektronmikroskopická studie*

Vyúčtování grantového projektu:

Výdaje související s realizací grantu jsou uvedeny v tabulce 1. Původní výdaje spočteny na 270 650 Kč, reálné výdaje byly o 10 000 Kč nižší, což souviselo s menšími výdaji souvisejícími s publikací a prezentací výzkumného projektu.