

# A CITOKIN HÁLÓZAT VÁLTOZÁSAI PERINATÁLIS HIPOXIÁS-ISCHÉMIÁS AGYKÁROSODÁST KÖVETŐEN

Doktori értekezés

**Dr. Bajnok Anna**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Toldi Gergely, PhD, önkéntes segítő

Hivatalos bírálók:

Dr. Romicsné Görbe Éva, PhD, egyetemi docens

Dr. Szapáry László, PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Machay Tamás, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Prof. Dr. Nagy György, egyetemi tanár

Dr. Somogyvári Zsolt, PhD

Budapest

2019

# 1 BEVEZETÉS

A perinatális asphyxia vagy hipoxiás-ischémiás (HI) agykárosodás és a következményes globális hipoxiás-ischémiás ecephalopathia (HIE) továbbra is a perinatális morbiditás, mortalitás és az élethosszig tartó neurológiai károsodás egyik vezető oka világszerte. Habár az utóbbi évtizedekben rengeteg előrelépés történt a perinatális diagnosztika és a neonatális intenzív ellátás területén, individualizált, célzott terápiára egyelőre nincs lehetőség. Kiemelendő, hogy az kezdeti hipoxiás inzultus mértéke és az újszülött klinikai státusza gyakran nem teszi lehetővé a fejlődésneurológiai végkimenetel predikcióját. Míg egyes gyermekek különösebb maradványtünet nélkül nőnek fel, másoknál eltérő mértékű neurológiai diszfunkció alakul ki, amelyek közül a legsúlyosabbak a mentális retardáció, a szenzórikus károsodás, a cerebrális parézis és a görcsök. Az, hogy mely tényezők állnak ennek az igen nagyfokú egyéni variabilitásnak a hátterében az egyik legfontosabb kérdésköre ennek a tudományterületnek. Így kiemelt jelentőséggel bírna azoknak a faktoroknak az azonosítása, amelyek által lehetőség nyílna az enyhe és a súlyos agykárosodás közötti differenciálásra.

Egyre egyértelműbbé válik, hogy a neurológiai végkimenetelt a kezdeti hipoxiás inzultus súlyosságán túl több tényező is befolyásolja. Az egyik kulcsfontosságú faktor, amely meghatározza az agykárosodás lefolyását, az a HI inzultus által kiváltott neuroinflammatorikus válasz. Az utóbbi évek eredményei alapján elfogadottá vált, hogy a központi idegrendszer (KIR) gyulladása, azaz a neuroinflammáció minden neurológiai károsodásra jellemző, így a perinatális asphyxiához kötötten bekövetkező károsodásokra is. A neuroinflammatorikus válasznak két fő aspektusa van: amíg bizonyos mértékű gyulladással válasz szükséges a KIR fiziológiás regenerációjához, addig a túlzott mértékű neuroinflammáció az idegi károsodás progresszióját okozza. Az utóbbi évek kutatásai kimutatták, hogy a neuroinflammatorikus válasz a kezdeti HI inzultust követően hónapokig fennállhat, és ez a krónikus, látens gyulladás fontos

komponense lehet a perinatális asphyxia hosszútávú következményeinek.

A neuroinflammáció során aktiválódnak a microglia és asztrocita sejtek, amely pro-inflammatorikus citokineket és kemokineket szabadítanak fel. A vér-agy gát átjárhatósága növekszik, amely elősegíti a perifériás mononukleáris sejtek KIR-be történő belépését. A perifériás immunsejtek a gyulladásos reakció további eskalálódását okozzák, beindítva az excito-toxikus kaszkádot, amely nagymértékű idegsejt nekrozishoz és apoptozishoz vezet. A gyulladásos válaszreakció azonban nem korlátozódik a KIR-re, a periférián is kimutatható. Mind a KIR-ben, mind a periférián zajló gyulladásnak központi regulátorai a T limfociták. A T-sejtek neurotoxicitásában fontos szerepe van a szabadgyökök felszabadításának, a neurális apoptotikus útvonalak aktiválásának és mindenekelőtt a pro- és anti-inflammatorikus citokinek szekretálásának.

Bőségesen állnak rendelkezésre olyan adatok, melyek az idegrendszeri gyulladás hátrányos következményeit igazolják, azonban az elmúlt évtized eredményei rámutattak arra, hogy a gyulladásos válasz hasznos is lehet a KIR számára. A neuronális gyulladás előnyei között szerepel a neuroprotekciónak, az idegi prekursorok mobilizálása a regenerációhoz, a remyelinizáció és az axonregeneráció. A neurogenesisben bizonyos citokinek is fontosak.

A korábbi asphyxiás vizsgálatok alapján a citokinek közül kiemelkedő szerepe van a pro-inflammatorikus IL-1- $\beta$ -nak, TNF- $\alpha$ -nak és IFN- $\gamma$ -nak. Jelentős lehet továbbá az IL-6 és IL-8, valamint IL-17 (Th17 sejtek) szerepe. Az anti-inflammatorikus TGF- $\beta$ -nak és IL-10-nek protektív szerepe van, fontosak a KIR regeneráció során. Fontos lehet az adhézióban szerepet játszó molekulák vizsgálata, melyek elősegítik a limfociták KIR-be való kilépését. Limfocitákon a legismertebb ilyen molekula a VLA-4 egyik része, a CD49d, amely az endotheliális VCAM-1 molekulához kötődik. Habár a VCAM-1 nem kizárólag a KIR-ben expresszálódik, HI agykárosodást követően a T limfociták CD49d

expressziója korrelálható a sejtek KIR-be való kilépési képességével.

A terápiás hipotermia igazoltan javítja a neurológiai végkimenetelt és az utóbbi években fontos alapkövénnyé vált a perinatális asphyxiával diagnosztizált újszülöttek terápiájának. Az egyik fontos mechanizmus, amely által a hipotermia kifejti a neuroprotektív hatását, az éppen a neuroinflammáció mértékének a csökkentése.

A kinurenin rendszer és a citokinek kölcsönhatásai mind a veleszületett, mind az adaptív immunválaszok során fontos regulátoros szerepet játszanak. Kiemelten fontos tényezői a KIR és az immunrendszer közötti bonyolult „neuroimmun” interakcióknak. A rendszer központi faktora az IDO, amely rate-limiting enzime a triptofán degradációjának. Az IDO-t elsősorban az antigén-prezentáló sejtek termelik pro-inflammatorikus stimulusok hatására és számos immunszuppresszív hatást fejt ki, amelyek közül a legfontosabbak a T sejt funkció gátlása és a regulátoros T limfociták (Treg) aktiválása. A triptofánnak (TRP) és első metabolitjának, a kinureninnek (KYN) a hányadosa (K/T) jó becslést ad az IDO enzimaktivitásáról. A kinurenin rendszer eltéréseit a neurológiai kórképek széles spektrumában sikerült már igazolni, azonban perinatális HI agykárosodást követően még nem vizsgálták.

A perinatális időszak során a legnagyobb a stroke rizikója is az egész gyermekkorban. A neonatális artériás ischémiás stroke (NAIS) definíció szerint egy a neonatális időszakban diagnosztizált artériás ischémiás stroke, amely a klinikai tünetek mellett radiológiai vizsgálattal is megerősítésre kerül. A NAIS az élethosszig tartó a finom motoros károsodástól a féloldali cerebrális parézisig terjedő motoros, a kognitív és a viselkedési zavarok egyik vezető oka. A NAIS esetek többnyire nem kerülnek időben felismerésre a prenatális kezdet és az aspecifikus tünettan miatt, így az intervenciók lehetőségei elsősorban a prevencióra és az inzultust követő gyulladáshoz vezető folyamat mérséklésére korlátozódnak. A NAIS diagnosztizálását tovább nehezíti az a

tény, hogy a rizikótényezők és a klinikum jelentős átfedést mutatnak a globális HIE-vel és a kettő együttes fennállása is gyakori. A két kórkép elkülönítése komplex kérdés, különösen, mivel a neuroinflammáció mindkettő sajátossága.

Érdekes módon a NAIS csaknem minden esetben a carotis artériás törzsből fejlődő intracraniális ereket érinti, amelyek az arteria cerebri anterior (ACA) proximális részét, az arteria cerebri medialis (ACM) és az az arteria cerebri posterior (ACP) jelentik. Ezzel szemben az arteria basilaris és az extracranialis artériák megkíméltek. A NAIS patofiziológiai hátteréről kevés ismerettel rendelkezünk, így betegség-specifikus prognosztikus tényezők és terápiás lehetőségek nem állnak rendelkezésre. A klasszikus pathofiziológiai hipotézis szerint az ischémiás események hátterében thromboembolizáció áll, melynek forrása elsősorban a placenta és az umbilicalis erek. Ez a hipotézis azonban nem ad kielégítő magyarázatot arra a megfigyelésre, miszerint a NAIS szinte kizárólag a carotis ágakat érinti. Emellett angiográfiai vizsgálatok kimutattak lokális defektusokat az intracraniális artériafalakon in situ trombus képződés jelei mellett. Az utóbbi évek preklinikai eredményei egy új pathofiziológiai hipotézist vetettek fel, amely figyelembe veszi a koagulációs és inflammatorikus kaskád komplex, kétirányú kapcsolatát. Eszerint a NAIS a perinatális inflammáció és a HI együttes fennállásának a következménye. In vivo állatkísérletek során kimutatták, hogy a maternofetalis gyulladás fokális arteritist vált ki a carotis ágak intracranialis szakaszán, amelyek jelentősen növeli a NAIS kockázatát. A fenti érszakaszokon számos pro-inflammatorikus citokin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1) magasabb intramurális szintjét sikerült igazolni. Az inflammáció fokozott oxidatív stresszt jelent, és előzetes szenzitálódást követően a HI inzultus hatására bekövetkező KIR károsodás mértéke is növekedett. Ezen a tudományterületen jelenleg az elsődleges cél a pathomechanizmus pontosabb feltérképezése, kiváltképpen az inflammatorikus útvonalak aktivációjának tekintetében. Ez segítheti a specifikus prevenciók lehetőségeit, diagnosztikus és terápiás opciók feltérképezését.

## 2 CÉLKITŰZÉSEK

A jelen vizsgálatban a célunk volt:

- 1) A T limfociták prevalenciájának és citokin termelésének a leírása a perinatális HI agykárosodást követő első élethónap során összehasonlítva a mérsékelt, valamint súlyos károsodás során bekövetkező változásokat. Ezáltal a neuroinflammatorikus válasz azon komponenseit szeretnénk volna feltérképezni, amelyek befolyásolhatják a károsodás mértékét.
- 2) Jellemezni a citokin plazmaszintjének eltéréseit a HI agykárosodást követő első élethónap során összevetve azokat az intracelluláris citokinszintek változásaival és összehasonlítva a mérsékelt, valamint a súlyos HIE során bekövetkező változásokat.
- 3) Meghatározni a kinurenin rendszer komponenseinek a plazma szintjét (TRP, KYN és KYNA) és a KYN/TRP arány alapján az IDO aktivitást, összehasonlítva a mérsékelt, valamint a súlyos HIE csoportokat.
- 4) A négy igazolt NAIS eset kísérletes adatait összesítve leírni a főbb immunológiai eltéréseket NAIS és HIE között. Összehasonlítottuk a T limfociták prevalenciát, citokin termelését, valamint a citokinek plazma szintjét az első élethónap során. Ehhez hasonló humán kísérletes adatok korábban nem kerültek közlésre, így bár a jelen tanulmányban a NAIS esetek száma igen alacsony volt, ezek az adatok hasznos alapul szolgálhatnak jövőbeli, nagyobb esetszámú immunológiai tanulmányok számára.

## 3 MÓDSZEREK

### 3.1 Betegek

A vizsgálatunkba 33 érett újszülöttet vontunk be, akik perinatális asphyxia iránydiagnózissal kerültek beutalásra a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekgyógyászati Klinikájának neonatális intenzív részlegére. A középsúlyos-súlyos születési asphyxia diagnózisa és a terápiás hipotermia szükségessége a TOBY kritériumrendszer alapján került megállapításra. Valamennyi újszülött megfelelt a terápiás hipotermia bevonási kritériumainak, amelyet legkésőbb az osztályos felvételükkor, átlagosan az első és ötödik életóra között kezdtek meg. A 72 órás intervenciós időszak során az újszülöttek rektális testhőmérséklete szoros monitorozás mellett 33 és 34 °C között volt.

Az újszülöttektől 5 alkalommal vettünk alkalmanként 2 ml vért, a születést követően 6, 24 és 72 órával, illetve egy hetes, majd 1 hónapos korban. A vérvételeket a klinikai diagnosztikai célú rutin vérvételekhez igazítottuk.

A vizsgálatunk kizárási kritériumai a kongenitális fejlődési rendellenességek, az egyéb veleszületett betegségek, a maternális chorioamnionitis gyanúja, valamint a perinatális fertőzések voltak. Felvételkor valamennyi esetben készült hemokultúra és fül leoltás a bakteriális fertőzések kizárása érdekében. A vizsgálati időszak alatt egy résztvevőnél sem fordult elő klinikai vagy hemokultúra által igazolt szepszis. Valamennyi újszülött profilaktikus ampicillin és gentamicin antibiotikus kezelésben és a standard intenzív terápiás ellátásban részesült.

Az újszülöttek agyműködését aEEG vizsgálattal monitoroztuk. Egy hetes korban, amennyiben az újszülöttek klinikai állapota lehetővé tette, MRI vizsgálat történt, amely minden esetben megtörtént a 12. életnapig. Az MRI felvételek a Rutherford és mtsai által felállított kritériumrendszer alapján kerültek értékelésre. Az MRI felvételek alapján 4 újszülött esetében igazolódott NAIS. Egy újszülött kizárással került metabolikus betegség valószínűsége miatt. Így összesen 28 újszülött került a

globális asphyxia, HIE csoportba, amelyet mérsékelt és súlyos HIE alcsoportra osztottunk a hipoxiás agykárosodás súlyossága alapján, amely az aEEG és MRI felvételek alapján került megállapításra. Azokban az esetekben, ahol az MRI vizsgálat nem volt elvégezhető az újszülött kritikus állapota miatt, a besorolás az aEEG adatok alapján történt. A súlyos csoportba (n = 11) azok az újszülöttek kerültek, akiknél az MRI felvétel középsúlyos-súlyos HIE jeleit mutatta, ÉS az aEEG felvételen a háttértevékenységre a „burst suppression” VAGY a folyamatos extrém alacsony feszültség (low voltage) VAGY a „flat tracing” volt jellemző VAGY több, mint 48 óra telt el az aEEG normalizálódásáig VAGY korai halál (<28 nap) következett be. Azok az újszülöttek, akiknél a fenti kritériumok nem teljesültek, a mérsékelt csoportba (n=17) kerültek. Az ő esetükben az MRI felvétel normális volt vagy enyhe HIE jelei ábrázolódtak ÉS folyamatos vagy szakaszos normál feszültség jellemezte a háttértevékenységet az aEEG felvételen és az aEEG normalizálódása 48 órán belül bekövetkezett.

A súlyos csoportban 3 újszülött hunyt el egy hónapos kor előtt. A rendelkezésre álló adatokat a megfelelő időpontokban bevontuk. Így 2 újszülött esetében hiányzik a 72 h, 1 hét és 1 hó adatok és egy újszülött esetében az 1 hónapos adat. A négy igazolt NAIS esetből származó kísérletes adatokat pool-oztuk és azokat a HIE csoportokhoz hasonlítottuk az immunológiai eltérések nagy vonalakban való jellemzése érdekében.

A vizsgálatunkat a regionális Etikai Bizottság jóváhagyásával (TUKEB 6578-0/2011-EKU) és a résztvevő gyermekek szüleinek tájékozott beleegyezése mellett végeztük. A tanulmány megfelelt a Helsinki Deklaráció aktuális követelményeinek.

### **3.2 Áramlási citometria**

A perifériás vérminták feldolgozása során először a plazma került szeparálásra centrifugálással. A plazma mintákat alikvotolást követően azonnal lefagyasztottuk és a feldolgozásig -80 °C-on tároltuk.



A sejteket RPMI (Roswell Park Memorial Institute)-1640 médiumban vettük fel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és 6 órán keresztül stimuláltuk 37 °C-on PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) (50 ng/ml), ionomycin (1 microg/ml) és BFA (Brefeldin A) (10 microg/ml) jelenlétében a citokinek intracelluláris szintjének a mérhető szintre emelése érdekében.

Ezt követően az alábbi fluorokrómmal konjugált anti-humán monoklonális antitesteket használtuk a sejtfelszíni markerek jelölésére: CD4 PE-Cy7 (Phycoerythrin-Cyanine 7) és CD8 APC-Cy7 (Allophycocyanin-Cyanine 7) (1-es panel), VAGY CD4 APC-Cy7 és CD49d PerCP (Peridinin-Chlorophyll-Protein) (2-es panel). A jelölés a gyártó instrukcióinak megfelelően történt. Valamennyi terméket a BioLegend cégtől rendeltük (San Diego, CA, USA).

Ezt követően lizáltuk a vörösvérteseket és permeabilizáltuk a perifériás vérből származó mononukleáris sejteket FACSLysing és FACSPermeabilizing oldatokkal (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A sejteket mosást követően PBS-ben (phosphate buffer saline) vettük fel és két egyenlő alikvotra osztottuk őket az intracelluláris citokinek megjelölése céljából. Az alábbi fluorokrómmal konjugált anti-humán monoklonális antitesteket vagy a megfelelő izotípus kontrollokat használtuk: IL-6 PE (Phycoerythrin), IL-17A PerCP, IL-10 APC (Allophycocyanin), IFN- $\gamma$  FITC (Fluorescein Isothiocyanate) (1-es panel), VAGY TNF- $\alpha$  PE-Cy7, FoxP3 PE, TGF- $\beta$  APC, IL-1 $\beta$  FITC (2-es panel), (valamennyi a BioLegend cégtől). A jelölés a gyári protokoll szerint történt.

A mosást követően a mintákat PBS-ben szuszpendáltuk fel és egy BD FACSAria áramlási citométeren (BD Biosciences) mintánkként 100.000 sejtet mértünk le. Az áramlási citométeres méréseket végző szakemberek nem ismerték az újszülöttek klinikai állapotát.

### 3.3 Immunoassay vizsgálatok

A plazma mintákat  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a mérés időpontjáig. Felolvasztást követően az alábbi citokinek, kemokinek és növekedési faktorok plazma szintje került meghatározásra Bio-Plex Pro Assay-k segítségével (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA): IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1b és VCAM. A Bio-Plex Pro Assay-k a szendvics ELISA-hoz hasonló elven működnek, amelyben egy mágneses gyöngyhöz vannak a capture antitestek kovalensen kötve. A biotinilált detekciós antitestek egy szendvics komplexet képeznek majd a komplex streptavidin- phycoerythrin (SA-PE) konjugátummal kerül megjelölésre. A végleges detekciós komplexumban a PE szolgál fluoreszcens jelölésként. A reakciók egy Luminex alapú platformon kerülnek leolvasásra.

### 3.4 Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC)

A plazma mintákat  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a mérésig. A mérést megelőzően a plazmamintákat kiolvasztottuk és vortexelést követően  $300\text{ }\mu\text{l}$  plazmamintát  $700\text{ }\mu\text{l}$  precipitációs oldószerbe „lövelltünk” (amely  $3,57\text{ w/w}\%$  perklórsavat és  $2,857\text{ mM}$  3-nitro-L-tyrosine-t tartalmazott belső standardként (Scharlau, Barcelona, Spain)). A mintákat ezt követően centrifugáltuk ( $13000\text{ G-n}$ ,  $10\text{ percig}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C-on}$ ), majd a felülúszót leszívtuk. KYN, KYNA, és TRP szintek meghatározását egy Agilent 1100 HPLC rendszeren (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) végeztük. A rendszerben található egy fluoreszcens detektor, amely a KYNA és TRP koncentráció meghatározására szolgált és egy UV detektor, amelyet a KYN és a belső standard koncentrációjának a meghatározására használtunk. A mintákat először egy Hypersil ODS előoszlopon ( $20 \times 2.1\text{ mm I.D.}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$  részecskeméret (Agilent Technologies)), amelyben a mobilis fázis kompozíciója  $0.2\text{ M}$  cink-acetát/acetonitril  $95/5\text{ v/v}\%$  volt és a pH  $6.2$ -re került beállításra jégacet segítségével. A kromatográfiai szeparálásokat egy Onyx Monolithic C18 oszlopon ( $100\text{ mm} \times 4.6\text{ mm I.D.}$  (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA)) végeztük

izokratikus elúció alkalmazásával. Az áramlási ráta (flow rate) és az injekciós volumen 1,5 ml/perc és 20  $\mu$ l volt. A fluoreszcens detektor excitációs és emissziós hullámhossza 344 nm és 398 nm volt, amelyeket minden minta 3,5 percen keresztül való futtatása után 254 nm-re és 398 nm-re változtattunk. Az UV detektor hullámhossza 365 nm-re került beállításra. Az L-TRP, az L-KYN szulfát, a KYNA és a cink-acetát-dihidrát a Sigma-Aldrich cégtől került beszerzésre, az ecetsav pedig a VWR International cégtől volt (Radnar, PA, USA).

### **3.5 A statisztikai elemzések módszertana**

A statisztikai elemzés során az adatok normalitásának vizsgálatára a Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk, amely alapján az adatok nem Gaussi eloszlást követtek, így nem paraméteres statisztikai próbákat használtunk. Valamennyi adatot medián és interkvartilis terjedelem formában adtunk meg. A különböző vizsgálati csoportok összehasonlítására Mann-Whitney tesztet használtunk. Az egy csoporton belüli, különböző időpontból származó adatok összehasonlítására Friedman tesztet használtunk. A statisztikailag kiugró értékeket Grubbs' teszt segítségével azonosítottuk. Valamennyi esetben a 0,05-nél kisebb p értéket vettük szignifikánsnak. A statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism 5.0 Software segítségével (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037 USA) végeztük.

## 4 EREDMÉNYEK

### 4.1 A mérsékelt és súlyos HIE csoportok összehasonlításából származó eredmények

#### 4.1.1 IL-1 $\beta$

Súlyos HIE esetében magasabb volt az IL-1 $\beta$ -t expresszáló CD4+ sejtek prevalenciája 6 órával a születést követően, mint mérsékelt HIE esetén. Ezeknek a sejteknek emelkedett volt a KIR-be való kilépése is a súlyos csoportban 6 óránál, amelyet a keringésben visszamaradó CD49d-t expresszáló CD4+ IL-1 $\beta$ + T sejtek alacsonyabb prevalenciája jelzett. A későbbi időpontokban nem volt eltérés a vizsgálati csoportok között ezeknek a sejteknek a prevalenciájában.

Az IL-1 $\beta$  intracelluláris szintje, amelyet az intracelluláris IL-1 $\beta$  átlagos fluoreszcens intenzitása (MFI) jelzett mindkét HIE csoportban 6 óránál tetőzött és a későbbi időpontokban hasonlóan alacsony volt. Az IL-1 $\beta$  plazmaszintje hasonló időbeli lefolyást mutatott a mérsékelt HIE csoportban és hasonló tendenciát mutatott a súlyos HIE csoportban, ahol azonban a különbségek nem voltak szignifikánsak. Az IL-1 $\beta$  plazmaszintjében nem volt eltérés a mérsékelt és a súlyos HIE között. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a T limfociták által termelt IL-1 $\beta$ -nak elsősorban neuroinflammatorikus válasz korai szakaszában lehet fontos szerepe.

#### 4.1.2 IL-6

Az IL-6-ot termelő CD4+ T limfociták prevalenciája és az intracelluláris IL-6 szintje hasonló volt a két HIE csoportban, nem találtunk eltérést. Mindkét HIE csoportban 24 óránál érte el a CD4+ T sejtek intracelluláris IL-6 szintje a legmagasabb értéket. Az intracelluláris IL-6 szint ezt követően csökkent, amely arra utal, hogy a CD4+ T sejtek IL-6 termelése is elsősorban a gyulladásos válasz korai szakaszában játszik szerepet.

Az IL-6 plazmaszintje azonban különbözően alakult a két HIE csoport esetében. Egy hetes korban magasabb volt súlyos, HIE csoportban, mint mérsékeltben. A mérsékelt csoportban az első

élethónap végére szignifikánsan lecsökkent az IL-6 plazmaszintje, a súlyos csoportban azonban nem volt szignifikáns ez az eltérés.

#### 4.1.3 IL-17

A súlyos csoportban az IL-17 termelő CD4+ T sejteknek (amelyek a Th17 alcsoportot képezik) a prevalenciája 24 órát követően emelkedett volt az első élethónap végéig a 6 órás értékhez képest. Egy hetes korban ez a különbség szignifikáns volt a súlyos és mérsékelt HIE csoportok között. A CD4+ sejtek intracelluláris IL-17 szintje (amelyet az IL-17 MFI értéke jelzett) is magasabb volt a súlyos csoportban a mérsékeltéhez képest 72 óránál.

Az IL-17 termelő CD8+ T sejtek prevalenciája azonban a mérsékelt HIE csoportban volt magasabb 6 órás életkorban. A mérsékelt HIE csoporton belül a CD8+ T sejtek intracelluláris IL-17 szintje 72 óránál érte el a legmagasabb értéket, majd 1 hónapos korra lecsökkent. Mindazonáltal, 24 órás korban a CD8+ limfociták intracelluláris IL17 szintje valamelyest magasabb volt a súlyos HIE csoportban, mint a mérsékelt HIE csoportban.

Az IL-17 plazmaszintjében nem észleltünk különbséget a két HIE csoport között.

#### 4.1.4 TNF- $\alpha$

A CD4+ T limfociták intracelluláris TNF- $\alpha$  szintje (amelyet a TNF- $\alpha$  MFI értéke jelzett) a 6 órás értékhez képest valamennyi későbbi időpontban magasabb volt mindkét HIE csoportban, Egy hónapos korban a CD4+ T sejtek TNF- $\alpha$  termelése magasabb volt a súlyos HIE csoportban, mint a mérsékeltben, amely fenntartott gyulladásos választ jelezhet súlyos HIE esetében, amely hozzájárulhat a perinatális asphyxia hosszútávú következményeihez. A TNF- $\alpha$  plazmaszintje nem különbözött a két HIE csoport esetében.

A CD49d-t expresszáló CD4+ TNF- $\alpha$ + T sejtek képesek kilépni a KIR-be. Ezen sejtek prevalenciája 6 órás korban alacsonyabb súlyos HIE esetében a későbbi időpontokhoz és a mérsékelt csoporthoz képest is, amelynek hátterében feltehetően fokozott

mértékű extravazáció áll. Mindazonáltal, 72 óras életkorra megnövekszik a CD49d-t expresszáló CD4+ TNF- $\alpha$ + T sejtek prevalenciája súlyos HIE esetében a 6 óras és a mérsékelt csoporthoz viszonyítva, amely arra utalhat, hogy 72 órát követően a CD49d expressziója fokozódik súlyos károsodásban.

#### 4.1.5 További pro-inflammatorikus citokinek

A CD4+ T sejtek intracelluláris IFN- $\gamma$  szintje 72 óránál magasabb volt a súlyos, mint a mérsékelt csoportban.

A G-CSF plazmaszintje szintén magasabb volt súlyos HIE esetén, mérsékelt HIE-vel összevetve 24 óras és egy hetes életkorban. Mérsékelt HIE esetében a G-CSF plazmaszintje lecsökkent egy hetes korra és alacsony maradt a vizsgálati időszak további szakaszában.

Az MCP-1 plazmaszintje 6 óras életkor után növekedett és szignifikánsan magasabb volt 24, 72 óras és egy hetes korban a 6 óras értékhez képest.

#### 4.1.6 TGF- $\beta$

A mérsékelt HIE csoportban a CD49d-t expresszáló CD4+ TGF- $\beta$ + T sejtek prevalenciája 72 óra után megemelkedett és magas maradt az első élethónap végéig. Ez a TGF- $\beta$  termelő CD4+ T sejtek fokozott extravazációs készségére utal a mérsékelt HIE csoportban, amely a reparatív folyamatok fontos komponense lehet. Habár hasonló tendencia volt megfigyelhető súlyos HIE esetében is, itt a különbségek nem voltak szignifikánsak.

#### 4.1.7 Treg sejtek

A Treg sejtek prevalenciája valamelyest emelkedett volt súlyos HIE esetében 24 óránál mérsékelt HIE-vel összevetve. Felmerül, hogy ez az eltérés a gyulladáshoz adott kompenzatorikus mechanizmusok része lehet, azonban a biológiai jelentősége ennek a különbségnek nehezen meghatározható.

#### 4.1.8 További anti-inflammatorikus citokinek

A mérsékelt csoportban az IL-10 plazmaszintje egy hónapos korra lecsökkent a 6 és 24 óras értékekhez képest. A súlyos csoportban az IL-13 plazmaszintje 72 óras kort követően alacsonyabb volt,

mint 6, illetve 24 órás korban. Az IL-13 és az IL5 plazmaszintjei is magasabbak voltak a mérsékelt, mint a súlyos csoportban 72 óránál.

#### 4.1.9 A kinurenin rendszer

A kinurenin plazma szintje magasabb volt mérsékelt HIE esetében 1 hónapos korban, mint súlyos HIE esetében. A kinurenin rendszer komponensei egyebekben hasonló időbeli lefolyást mutattak a két HIE csoportban. A TRP szintje fokozatos emelkedést mutatott mindkét csoportban az első élethónap végéig. Ezzel szemben a plazma KYN és KYNA metabolitok szintje fokozatos csökkenést mutatott. A K/T hányados alapján számítottIDO aktivitás ez alapján szintén csökkenést mutatott az első élethónap végéig perinatális HI agykárosodást követően. Ez arra utal, hogy a fokozott IDO enzimatis működés szintén elsősorban az neuroinflammáció korai szakaszában játszhat szerepet.

#### 4.1.10 ROC analízis

ROC (receiver operating characteristic curve) analízist végeztünk, hogy meghatározzuk, mely paraméterek alkalmasak a mérsékelt és súlyos HIE közötti differenciálásban korai stádiumban. Ebben a tekintetben az egyedüli hasznos marker a T sejtek IL-1 $\beta$  termelése volt. A CD4+ IL-1 $\beta$ + T sejtek prevalenciája 6 órás korban ( $p = 0.018$ , ROC AUC = 0.784) valamint a CD4+ IL-1 $\beta$ + CD49d+ sejtek prevalenciája ( $p = 0.027$ , ROC AUC = 0.767) 6 órás korban elfogadható szenzitivitással és specificitással jelezte előre a HIE súlyosságát.

### **4.2 A HIE és NAIS csoportok összehasonlításából származó eredmények**

#### 4.2.1 Pro-inflammatorikus citokinek

A HIE csoportokhoz hasonlóan, NAIS során is 6 órás korban a legmagasabb a CD4+ T limfociták intracelluláris IL-1 $\beta$  szintje (amelyet az IL-1 $\beta$  MFI értéke jelez) és hasonlóan csökken 24 órás korra. Az IL-1 $\beta$  termelés tekintetében nem volt eltérés a HIE és NAIS csoportok között.

Ugyanakkor az intracelluláris IL-6 szint (MFI érték) CD8+ T sejtek esetében alacsonyabb volt NAIS-ban 72 óránál, mint súlyos HIE esetében. Ez a különbség azonban megfordult 1 hónapos korra, amíg a HIE csoportokban lecsökkent, addig NAIS-ban nőtt a CD8+ sejtek IL-6 termelése.

Az IL-17-et expresszáló CD8+ T sejtek szintje magasabb volt 6 óras életkorban NAIS-ban, mint súlyos HIE esetén és ezen sejtek intracelluláris IL-17 szintje (MFI) is magasabb volt NAIS esetében.

NAIS esetében a CD4+ T limfociták IFN- $\gamma$  termelése (MFI) 24 óránál tetőzött, majd 72 óras korra lecsökkent és mindkét HIE csoporthoz képest alacsonyabb értéket ért el.

NAIS során 72 óras korban a gyulladáshoz való válasz fokozódása figyelhető meg HIE-hez képest, amelyet számos plazma citokin szintjének a megemelkedése jelez (IL-5, IL-17, MCP-1). Az MCP-1 plazmaszintje 72 óras korban a többi időponthoz képest is kiemelkedően magas volt NAIS-ban. Egy hónapos életkorban azonban a gyulladáshoz való válasz lecsengése figyelhető meg NAIS-t követően, amelyet számos citokin alacsonyabb plazmaszintje (IL-4, IL-12, IL-17) jelez HIE-hez képest. A NAIS csoporton belül az IL-4 szintje a 72 óras értékhez képest is szignifikánsan alacsonyabb volt. Hasonló tendenciát mutatott az IL-12 és az IL-17 is, azonban itt nem volt szignifikáns az eltérés, vélhetően az alacsony esetszám miatt.

#### 4.2.2 Anti-inflammatorikus citokinek

Az IL-10-et expresszáló CD8+ limfociták prevalenciája alacsonyabb volt NAIS-ban, mint súlyos HIE-ben 6 és 72 óránál. Az IL-10-et expresszáló CD4+ limfociták aránya azonban magasabb volt NAIS-ban, mint mérsékelt HIE-ben.

Egy hetes életkorban kifejezett emelkedés volt megfigyelhető NAIS-ban a TGF- $\beta$ -termelő CD4+ T sejtek CD49d expressziójában mind a 6 óras értékhez, mind HIE csoportokhoz képest. Egy hónapos életkorra azonban a TGF- $\beta$ -termelő CD4+ T sejtek prevalenciája NAIS-ban a HIE csoportokhoz képest alacsonyabb lett.



## 5 KÖVETKEZTETÉSEK

- 1) A perinatális HIE-t követő adaptív immunválasz korai fázisában központi szerepet játszhatnak az IL-1 $\beta$  és IL-6 termelő T limfociták.
- 2) A T sejtek TNF- $\alpha$  termelése végig emelkedett a perinatális asphyxiát követő első élethónap során és egy hónapos korban magasabb súlyos HIE esetében. Ez fontos komponense lehet a HIE krónikus fázisának.
- 3) A Th17 limfociták magasabb prevalenciája az első hét végén súlyos HIE esetében felveti, hogy ez a sejtcsoport szerepet játszhat a HI agykárosodás késleltetett progressziójában.
- 4) A CD4<sup>+</sup> T limfociták emelkedő TGF- $\beta$  termelése és fokozott extravazációja fontos regulátoros szerepet játszhat HIE során, hozzájárulva a reparatív folyamatok beindulásához, ezzel mérsékelve a HI agykárosodás mértékét.
- 5) Az IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> sejtek prevalenciájának és CD49d expressziójának a vizsgálata a ROC analízis alapján már korai stádiumban (6 órás korban) előre jelezheti a HIE súlyosságát.
- 6) NAIS során 72 órás korban a gyulladáshoz vezető válasz fokozódása figyelhető meg, amelyet számos plazma citokin szintjének a megemelkedése jelez (IL-5, IL-17, MCP-1).
- 7) Egy hetes korban NAIS esetén határozott emelkedés figyelhető meg a TGF- $\beta$ -termelő CD4<sup>+</sup> T sejtek CD49d expressziójában mind a 6 órás értékhez, mind HIE csoportokhoz képest, amely a reparatív folyamatok korábbi megindulását jelezheti.
- 8) Egy hónapos korra a gyulladáshoz vezető válasz lecsengése figyelhető meg NAIS esetében, amelyet számos citokin plazmaszintjének és a TGF- $\beta$  termelő CD4<sup>+</sup> sejtek prevalenciájának a csökkenése jelez.

## 6 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

*Összesített impakt faktor: 10,386.*

- 1) Bajnok A, Berta L, Orbán C, Tulassay T, Toldi G. (2018) Cytokine production pattern of T lymphocytes in neonatal arterial ischemic stroke during the first month of life-a case study. *J Neuroinflammation*. 15(1):191. **IF: 5,193**
- 2) Bajnok A, Berta L, Orbán C, Veres G, Zádori D, Barta H, Méder Ü, Vécsei L, Tulassay T, Szabó M, Toldi G. (2017) Distinct cytokine patterns may regulate the severity of neonatal asphyxia-an observational study. *J Neuroinflammation*. 14(1):244. **IF: 5,193**

### Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

*Összesített impakt faktor: 42,072; első szerzőként: 6,615*

- 1) Bajnok A, Ivanova M, Rigó J Jr, Toldi G. (2017) The Distribution of Activation Markers and Selectins on Peripheral T Lymphocytes in Preeclampsia. *Mediators Inflamm*. 2017:8045161. **IF: 3,549**
- 2) Bajnok A, Kaposi A, Kovács L, Vásárhelyi B, Balog A, Toldi G. (2013) Analysis by flow cytometry of calcium influx kinetics in peripheral lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Cytometry A*. 83(3):287-93. **IF: 3,066**
- 3) Orbán C, Vásárhelyi Z, Bajnok A, Sava F, Toldi G. Effects of caffeine and phosphodiesterase inhibitors on activation of neonatal T lymphocytes. *Immunobiology*. 223(11):627-633. **IF: 2,873**
- 4) Dulic S, Vasarhelyi Z, Bajnok A, Szalay B, Toldi G, Kovacs L, Balog A (2018). The Impact of Anti-TNF Therapy on CD4+ and CD8+ Cell Subsets in Ankylosing Spondylitis. *Pathobiology*. 85(3):201-210. **IF: 1,592**

- 5) Orbán C, D Szabó, A Bajnok, B Vásárhelyi, T Tulassay, A Arató, G Veres, G Toldi. (2017) Altered activation of peripheral CD8+ T cells in pediatric Crohn's disease. *Immunol Lett*, 185:48-51. **IF: 2,483**
- 6) Legány N, G Toldi, C Orbán, N Megyes, A Bajnok, A Balog. Calcium influx kinetics, and the features of potassium channels of peripheral lymphocytes in primary Sjögren's syndrome. (2106) *Immunobiology* 221:1266-1272. **IF:2,720**
- 7) Orbán C, D Szabó, A Bajnok, B Vásárhelyi, T Tulassay, A Arató, G Veres, G Toldi. (2016) Altered calcium influx of peripheral Th2 cells in pediatric Crohn's disease: infliximab may normalize activation patterns. *Oncotarget*. 7(29):44966-44974. **IF: 5,168**
- 8) Orban C, E Perez-Garcia, A Bajnok, G McBean, G Toldi, A Blanco-Fernandez. Real time kinetic flow cytometry measurements of cellular parameter changes evoked by nanosecond pulsed electric field. (2016) *Cytometry Part A* 89:472-479. **IF: 3,222**
- 9) Folyovich A, Biczó D, Bajnok A, Bessenyei D, Kis I, Gimesi-Ország J, Béres-Molnár AK, Toldi G. (2016) Higher Incidence of Stroke on the Last Day of the Month in Hungary-a Role for Psychosocial Factors and Financial Insecurity? *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 25(5):1192-1195. **IF: 1,517**
- 10) Toldi G, ZE Vásárhelyi, J Rigó Jr, C Orbán, Z Tamássy, A Bajnok, T Shima, S Saito, A Molvarec. Prevalence of Regulatory T-Cell Subtypes in Preeclampsia. (2015) *American Journal of Reproductive Immunology* 74:110-115. **IF: 2,916**
- 11) Grozdics E, Berta L, Bajnok A, Veres G, Ilisz I, Klivényi P, Rigó J Jr, Vécsei L, Tulassay T, Toldi G. (2014) B7 costimulation and intracellular indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) expression in peripheral blood of healthy pregnant

- and non-pregnant women. BMC Pregnancy Childbirth. 14:306. **IF: 2,190**
- 12) Orbán C, A Bajnok, B Vasarhelyi, T Tulassay, G Toldi. (2014) Different calcium influx characteristics upon Kv1.3 and IKCa1 potassium channel inhibition in T helper subsets. Cytometry Part A, 85: 636-641. **IF: 2,928**
  - 13) Folyovich A, Biro E, Orban C, Bajnok A, Varga V, Beres-Molnar AK, Vasarhelyi B, Toldi G. Relevance of novel inflammatory markers in stroke-induced immunosuppression. (2014) BMC Neurology 14:41. **IF:2,040**
  - 14) Folyovich A, Biró E, Orbán C, Bajnok A, Vásárhelyi B, Toldi G. Kv1.3 lymphocyte potassium channel inhibition as a potential novel therapeutic target in acute ischemic stroke. (2014) CNS & Neurological Disorders-Drug Targets 13:801-806. **IF: 2,628**
  - 15) Orbán C, E Biro, E Grozdics, A Bajnok, G Toldi. (2013) Modulation of T lymphocyte calcium influx patterns via the inhibition of Kv1.3 and IKCa1 potassium channels in autoimmune disorders. Frontiers in Immunology 4: 3.
  - 16) Toldi G, Bajnok A, Dobi D, Kaposi A, Kovács L, Vásárhelyi B, Balog A. (2013) The effects of Kv1.3 and IKCa1 potassium channel inhibition on calcium influx of human peripheral T lymphocytes in rheumatoid arthritis. Immunobiology. 218(3):311-6. **IF: 3,180**