

**Streszczenie pracy doktorskiej lek. Elżbiety Klimiec-Moskal pt.: „*The association between Toll-like receptor 4-mediated inflammatory response and outcome after ischemic stroke*”**  
**(„Związek pomiędzy reakcją zapalną zależną od receptora Toll-podobnego typu 4 a rokowaniem w udarze niedokrwiennym mózgu”)**

Celem pierwszej pracy z cyklu było określenie związku między aktywnością LPS oraz stężeniem LBP i sCD14 w osoczu a rokowaniem funkcjonalnym i śmiertelnością po udarze niedokrwiennym mózgu. Do badania włączono 335 pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu (mediana wieku: 71 lat; 47.5% kobiet). Pomiar aktywności LPS oraz stężeń LBP i sCD14 wykonano w ciągu 24 godzin od momentu wystąpienia objawów udaru. Rokowanie funkcjonalne oceniano 3 miesiące po udarze za pomocą zmodyfikowanej Skali Rankina. Niekorzystne rokowanie definiowano jako liczba punktów w zmodyfikowanej Skali Rankina > 2. W badaniu oceniano także śmiertelność 3 i 12 miesięcy po udarze. Nie stwierdzono związku między aktywnością LPS i rokowaniem funkcjonalnym ani śmiertelnością po udarze. W analizie wieloczynnikowej wyższe stężenia LBP (OR: 1.84, 95% CI: 1.32–2.58,  $p < 0.01$ ) i sCD14 (OR: 1.62, 95% CI: 1.15–2.29,  $p < 0.01$ ) były związane z większym ryzykiem zgonu 3 miesiące po udarze. W analizie wieloczynnikowej związek ze śmiertelnością obserwowano także po 12 miesiącach od udaru zarówno dla LBP (HR: 1.68, 95% CI: 1.35–2.09,  $p < 0.01$ ), jak i sCD14 (HR: 1.34, 95% CI: 1.11–1.62,  $p < 0.01$ ). Wyniki badania sugerują, że wyższe stężenia LBP i sCD14 związane są ze zwiększonym ryzykiem zgonu u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu.

Celem drugiej pracy było określenie związku między syntezą wybranych cytokin w odpowiedzi na stymulację pełnej krwi endotoksyną a rokowaniem funkcjonalnym w udarze niedokrwiennym. Do badania włączono 156 pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu (mediana wieku: 69 lat; 40.4% kobiet). Krew żylną, pobraną w trzecim dniu od początku objawów udaru, stymulowano za pomocą LPS (10 ng/ml). Następnie wykonano pomiar TNF $\alpha$  jako wskaźnika aktywacji szlaku zależnego od MyD88 oraz indukowanego przez interferon gamma białka 10 (ang. interferon-gamma-inducible protein 10, IP-10) jako wskaźnika aktywacji szlaku niezależnego od MyD88. Rokowanie funkcjonalne oceniano 3 miesiące po udarze za pomocą zmodyfikowanej Skali Rankina. Niekorzystne rokowanie definiowano jako liczba punktów w zmodyfikowanej Skali Rankina > 2. U pacjentów z niekorzystnym rokowaniem funkcjonalnym stwierdzono niższe uwalnianie TNF $\alpha$  (mediana: 2.2 vs 3.5 pg/103 monocytów,  $p < 0.01$ ) i IP-10 (mediana: 0.3 vs 0.6 pg/103 monocytów,  $p < 0.01$ ) po stymulacji endotoksyną. W analizie wieloczynnikowej, po uwzględnieniu w modelu: wieku, stopnia deficytu neurologicznego przy przyjęciu i występowania infekcji, niższe uwalnianie TNF $\alpha$  było związane z gorszym rokowaniem (OR: 4.23, 95% CI: 1.64–10.90,  $p = 0.03$ ). Podobnie, niższa synteza IP-10 wiązała się ze zwiększonym ryzykiem niekorzystnego rokowania po udarze (OR: 3.42, 95% CI: 1.49–8.21,  $p < 0.01$ ). Najgorsze rokowanie obserwowano u pacjentów z obniżonym uwalnianiem zarówno TNF $\alpha$ , jak i IP-10. Badanie wykazało, że zmniejszone uwalnianie TNF $\alpha$  i IP-10 po stymulacji endotoksyną jest związane z gorszym rokowaniem po udarze. Wyniki badania sugerują, że zahamowanie obu szlaków aktywowanych przez receptory TLR4 — zarówno szlaku zależnego od MyD88 jak i szlaku niezależnego od MyD88 — jest związane z niekorzystnym rokowaniem po udarze niedokrwiennym mózgu.

Celem trzeciej pracy było określenie wartości predykcyjnej pojedynczych cytokin uwalnianych po stymulacji pełnej krwi endotoksyną oraz ich kombinacji w prognozowaniu rokowania po udarze niedokrwiennym mózgu. Do badania włączono 248 pacjentów z udarem niedokrwiennym (mediana wieku: 69 lat, 41.1% kobiet). Krew pobraną w trzeciej dobie od początku objawów udaru stymulowano za pomocą LPS (10 ng/ml). Następnie wykonano

pomiary stężeń syntetyzowanych cytokin: TNF $\alpha$ , IP-10, IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10 i IL-12 oraz pomiar stężenia IL-6 w osoczu. Rokowanie funkcjonalne oceniano 3 miesiące po udarze za pomocą zmodyfikowanej Skali Rankina. Niekorzystne rokowanie definiowano jako liczba punktów w zmodyfikowanej Skali Rankina  $> 2$ . W celu oceny wartości predykcyjnych badanych cytokin wykorzystano wieloczynnikową regresję logistyczną, analizę skupień oraz skonstruowano „multimarker score”. Zmniejszone uwalnianie IP-10, TNF $\alpha$ , IL-1b i IL-12, zwiększone uwalnianie IL-10 i IL-8 po stymulacji endotoksyną oraz wyższe stężenie IL-6 w osoczu były związane z niekorzystnym rokowaniem. Za pomocą analizy skupień zidentyfikowano 3 grupy pacjentów o różnym profilu cytokin. Grupę o najgorszym rokowaniu charakteryzowała wysoka synteza IL-10, IL-8, IL-1b i IL-6, niska synteza IL-12, IP-10 i TNF $\alpha$  oraz wysokie stężenie IL-6 w osoczu. Pacjenci z najlepszym rokowaniem mieli wysoką syntezę TNF $\alpha$ , IP-10, IL-12, IL-1b i IL-6, niską syntezę IL-10 i IL-8 po stymulacji endotoksyną oraz niskie stężenie IL-6 w osoczu. W grupie o pośrednim rokowaniu obserwowano obniżoną syntezę wszystkich mierzonych cytokin oraz niskie stężenie IL-6 w osoczu. Skonstruowano „multimarker score” oparty na stężeniach cytokin IL-12, IL-10 i TNF $\alpha$  po stymulacji endotoksyną oraz stężeniu IL-6 w osoczu. Dodanie „multimarker score” do modelu klinicznego, składającego się z wieku i stopnia deficytu neurologicznego przy przyjęciu, znacząco poprawiło wartość predykcyjną modelu: statystykę C (ang. C-statistic) (0.81 vs 0.73,  $p = 0.02$ ) oraz poprawę reklasifikacji netto (ang. net reclassification improvement, NRI) (0.25,  $p < 0.01$ ). Wyniki badania sugerują, że zmniejszone uwalnianie IP-10, TNF $\alpha$ , IL-1b i IL-12 oraz zwiększone uwalnianie IL-10 i IL-8 po stymulacji pełnej krwi endotoksyną są związane z niekorzystnym rokowaniem po udarze niedokrwiennym mózgu.

## Summary

The aim of the first study was to determine a relationship between plasma LPS activity, level of LBP and sCD14 and functional outcome as well as mortality after ischemic stroke. Three hundred thirty-five patients with ischemic stroke were included into study (median age: 71 years; 47.5% female). Plasma LPS activity and levels of LBP and sCD14 were measured within 24 hours of the onset of stroke symptoms. Functional outcome was assessed 3 months after stroke using modified Rankin Scale score. Poor functional outcome was defined as a modified Rankin Scale score  $> 2$ . In addition, 3-month and 12-month case fatality were assessed. There was no association between plasma LPS activity and either functional outcome or mortality after stroke. In multivariate analysis higher levels of LBP (OR: 1.84, 95% CI: 1.32–2.58,  $p < 0.01$ ) and sCD14 (OR: 1.62, 95% CI: 1.15–2.29,  $p < 0.01$ ) were associated with increased risk of death 3 months after stroke. In multivariate analysis, the association with mortality was also observed 12 months after stroke for both LBP (HR: 1.68, 95% CI: 1.35–2.09,  $p < 0.01$ ) and sCD14 (HR: 1.34, 95% CI: 1.11–1.62,  $p < 0.01$ ). Results of the study suggest that higher levels of LBP and sCD14 are associated with increased risk of death in stroke patients.

The aim of the second study was to determine the association between selected cytokine release after whole blood LPS stimulation and the outcome after ischemic stroke. One hundred fifty-six patients were included into study (median age: 69 years; 40.4% female). Venous blood was collected at day 3 after the onset of stroke and stimulated with LPS (10 ng/ml). Next, the level of TNF $\alpha$  was measured as a proxy of the MyD88-dependent pathway, and interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10) was measured as a proxy of the MyD88-independent pathway. The functional outcome was assessed at 3 months after stroke onset using a modified Rankin Scale score. Poor functional outcome was defined as a modified Rankin Scale score  $> 2$ . Patients with poor outcome had reduced release of TNF $\alpha$  (median: 2.2 vs 3.5 pg/10<sup>3</sup> monocytes,  $p < 0.01$ ) and IP-10 (median: 0.3 vs 0.6 pg/10<sup>3</sup> monocytes,  $p < 0.01$ ) after LPS stimulation. In a multivariate logistic regression analysis after adjustment for age, neurological deficit

on admission and infections, low TNF $\alpha$  release was associated with a poor outcome (OR: 4.23, 95% CI: 1.64– 10.90,  $p = 0.03$ ). Similarly, low IP-10 release was related to an unfavourable prognosis after stroke (OR: 3.42, 95% CI: 1.49–8.21,  $p < 0.01$ ). The patients with a low synthesis of both TNF $\alpha$  and IP-10 had the worst prognosis. The study showed that decreased release of TNF $\alpha$  and IP-10 after stimulation with endotoxin is associated with poor outcome. Results of the study suggest that the inhibition of both, the MyD88-dependent pathway and MyD88-independent pathway of TLR4 signalling is associated with an unfavourable prognosis in stroke patients.

The aim of the third study was to examine the individual and collective utility of cytokines released after whole blood stimulation with endotoxin for predicting stroke outcome. Two hundred forty-eight patients with ischemic stroke were included into study (median age 69 years; 41.1% female). Blood samples were collected at day 3 after the onset of stroke and stimulated with LPS (10 ng/ml). Next, the concentration of synthesized cytokines: TNF $\alpha$ , IP-10, IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, and IL-12, and plasma IL-6 level were measured. The functional outcome was assessed at 3 months after stroke onset using modified Rankin Scale score. Poor functional outcome was defined as a modified Rankin Scale score  $> 2$ . To assess the prognostic ability of cytokines, multivariate logistic regression, cluster analysis and construction of multimarker score were applied. Decreased release of IP-10, TNF $\alpha$ , IL-1b and IL-12, increased release of IL-10 and IL-8 after stimulation with LPS and higher plasma IL-6 level were associated with poor outcome. Cluster analysis identified three groups of patients with distinct cytokine profiles. The group with the worst outcome demonstrated high synthesis of IL-10, IL-8, IL-1b and IL-6 and low synthesis of IL-12, IP-10 and TNF $\alpha$  accompanied by the high circulating IL-6 level. The group with the best prognosis showed high synthesis of TNF $\alpha$ , IP-10, IL-12, IL-1b and IL-6, low synthesis of IL-10 and IL-8 and low plasma IL-6. Patients with intermediate outcome had low synthesis of all cytokines accompanied by low circulating IL-6. Multimarker score based on IL-12, IL-10 and TNF $\alpha$  levels after LPS stimulation and plasma IL-6 level was constructed. Addition of this score to clinical model composed of age and neurological deficit on admission led to significant improvement of prognostic value of the model: C-statistic (0.81 vs 0.73,  $p = 0.02$ ) and net reclassification improvement (NRI) (0.25,  $p < 0.01$ ). Results of the study suggest that decreased release of IP-10, TNF $\alpha$ , IL-1b and IL-12, and increased release of IL-10 and IL-8 after whole blood LPS stimulation are related to poor outcome after stroke.