

Magdalena Telec

**Znaczenie krążących limfocytów T regulatorowych, komórek NK
oraz niekonwencjonalnych limfocytów T
w klinicznym przebiegu udaru mózgu**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Maria Łukasik
Promotor pomocniczy: dr n. biol. Magdalena Frydrychowicz



Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2021

*Składam serdeczne podziękowania Pani Promotor, Marii Łukasik za nadzór naukowy,
nieustającą motywację i nieoceniony wkład w powstanie tej pracy.*

*Pragnę podziękować Panu Profesorowi Grzegorzowi Dworackiemu oraz Pani Doktor
Magdalenie Frydrychowicz za pomoc w realizacji części doświadczalnej.*

*Szczególne podziękowania pragnę złożyć Panu Profesorowi Radosławowi
Każmierskiemu za nadzór nad realizacją kliniczną projektu oraz całemu Zespołowi Kliniki
Neurologii i Chorób Naczyniowych Układu Nerwowego za zaangażowanie w jego realizację.*

Moim Bliskim dziękuję za wsparcie.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	5
1.1 Wprowadzenie.....	5
1.2 Układ odpornościowy a ośrodkowy układ nerwowy	5
1.2.1 Elementy układu odpornościowego w ośrodkowym układzie nerwowym.....	6
1.2.2 Nadzór immunologiczny ośrodkowego układu nerwowego	7
1.3 Immunologiczne aspekty udaru.....	8
1.3.1 Wrodzona odpowiedź immunologiczna w udarze.....	8
1.3.2 Nabyta odpowiedź immunologiczna w udarze.....	12
1.3.3. Czasowa sekwencja zjawisk immunologicznych po udarze	21
1.3.4 Aktywacja układu autonomicznego: współczulnego oraz przywspółczulnego	25
1.3.5 Infekcja związana z udarem jako poudarowa depresja układu odpornościowego	26
2. CEL PRACY	29
3. MATERIAŁ I METODY	30
3.1. Kryteria kwalifikacji do badania	30
3.1.1. Grupa chorych	30
3.1.2. Grupa kontrolna	32
3.2 Metody badawcze	33
3.2.1 Ocena kliniczna	34
3.2.2 Ocena kliniczna SAI	38
3.2.3 Analiza cytometryczna subpopulacji limfocytów i komórek NK	38
3.3 Analiza statystyczna	48
4. WYNIKI	49
4.1 Grupa badana	49
4.2 Grupa kontrolna.....	50
4.3 Charakterystyka badanych populacji	51
4.4 Analiza morfologii krwi obwodowej	54
4.4.1 Ocena ilościowa badanych subpopulacji limfocytów T (Treg, T $\gamma\delta$, iNKT), komórek NK oraz limfocytów CD4 ⁺ i limfocytów CD8 ⁺	57
4.5 Analiza stanu klinicznego chorych z uwzględnieniem infekcji związanej z udarem (SAI)	65
4.6 Ocena ilościowa subpopulacji limfocytów z uwzględnieniem infekcji związanej z udarem	68
4.7 Ocena związku pomiędzy wykładnikami laboratoryjnymi stanu zapalnego a parametrami badanych subpopulacji limfocytów	70

4.7.1 Związek między CRP a parametrami Treg	70
4.7.2 Związek między CRP a limfocytami CD4 ⁺ i CD8 ⁺	71
4.8 Związek między stanem klinicznym ocenianym w skali NIHSS, SSS i mRS a badanymi parametrami wybranych subpopulacji limfocytów	71
4.8.1 Limfocyty Treg	71
4.8.2 Limfocyty Tγδ	72
4.8.3 Limfocyty iNKT	73
4.8.4 Komórki NK	73
4.8.5 Limfocyty CD4 ⁺ i CD8 ⁺	74
4.9 Ocena ilościowa badanych parametrów subpopulacji limfocytów z uwzględnieniem leczenia trombolitycznego	74
4.10 Analiza parametrów badanych subpopulacji limfocytów z uwzględnieniem klasyfikacji udaru oraz czynników ryzyka udaru niedokrwinnego	75
4.10.1 Nadciśnienie tętnicze	75
4.10.2 Cukrzyca	76
4.10.3 Choroba niedokrwienność serca	78
4.10.4 Przebyty udar niedokrwienności	78
5. Dyskusja	80
5.1 Ograniczenia pracy	98
6. Wnioski	99
7. Spis Rycin	100
8. Spis Tabel	103
9. Wykaz skrótów	104
10. Bibliografia	108
11. Zgoda Komisji Bioetycznej	121
12. Streszczenie	122
13. Summary	124

1.WSTĘP

1.1 Wprowadzenie

Udar niedokrwienny mózgu jest jedną z wiodących przyczyn śmierci oraz niepełnosprawności osób dorosłych na świecie [1]. Pomimo ogromnego postępu w rozumieniu patofizjologii udaru oraz wdrożenia terapii wewnątrznacyniowych jak tromboliza czy trombektomia, nadal pozytywne efekty uzyskuje się w stosunkowo niewielkiej grupie chorych. Dodatkowo dostępne metody terapeutyczne ograniczone są do pierwszych godzin od początku objawów udaru. Powoduje to konieczność wnikliwej analizy wszelkich aspektów udaru mózgu, celem poszukiwania nowych metod terapeutycznych.

Przenikanie się układu immunologicznego oraz ośrodkowego układu nerwowego (OUN) stanowi patogenezę wielu chorób neurologicznych, zarówno przewlekłych jak i ostrych [2]. Jest już pewnikiem, że układ odpornościowy odgrywa kluczową rolę w procesie patofizjologicznym udaru niedokrwiennego [3]. Stąd mechanizmy immunologiczne związane z udarem niedokrwiennym są przedmiotem ożywionych badań z uwagi na ich udział w ostatecznym rezultacie udaru mózgu oraz potencjalny nowy kierunek rozwoju możliwości terapeutycznych [4].

1.2 Układ odpornościowy a ośrodkowy układ nerwowy

Przez wiele lat OUN uważany był za immunologicznie uprzywilejowany, a u podłoża przekonania leżała teza o immunologicznej izolacji antygenów z nim związanych, obecność bariery krew-mózg oraz ograniczona tolerancja procesów zapalnych, wynikająca z braku wolnej przestrzeni na tworzący się w trakcie zapalenia obrzęk z towarzyszącą kumulacją komórek i płynów, niekorzystnego efektu promowania szybkiej śmierci uszkodzonych komórek czy dysfunkcji poznawczo-ruchowych związanych zarówno z zapaleniem jak i procesem gojenia [5,6]. Żaden z etapów procesu zapalnego, włącznie z naprawczym, nie jest korzystny dla komórek neuronalnych. Stąd fizjologicznie, w stanie spoczynku, w parenchymie OUN znajduje się znikoma liczba limfocytów, a możliwości prezentacji antygenów, w porównaniu do innych narządów, również wydają się niewielkie. Nie zachodzi też – w odróżnieniu od organów obwodowych - bardzo szybka odpowiedź na obecność patogenów w postaci infiltracji parenchymy przez komórki mielomonocytarne. Zakładano, że w procesie zapalnym w OUN kluczowe znaczenie mogą mieć opony mózgowo, w których lokują się liczne populacje komórek, płyn mózgowo-rdzeniowy (PMR) oraz płyn

międzykomórkowy. Jednak z czasem zaczęły pojawiać się doniesienia o błędnym założeniu niezależności układu odpornościowego i ośrodkowego układu nerwowego [7,8], prace na temat ich wzajemnego przenikania się [9,10], a w końcu – dowody na ich ścisłą interakcję [5,11-13].

1.2.1 Elementy układu odpornościowego w ośrodkowym układzie nerwowym

1.2.1.1 Odpowiedź wrodzona

Reprezentantami wrodzonej odpowiedzi immunologicznej są rezydujące w parenchymie, a pochodzące ze szpiku kostnego, komórki mikrogleju [2]. Od wczesnych etapów embriogenezy lokalizują się one w OUN, pozostając pod osłoną bariery krew-mózg [14]. Ich liczebność zwiększa się poprzez proliferację stymulowaną lokalnymi prekursorami, już bez udziału szpiku [15,16]. Makrofagi stanowią obok mikrogleju drugi typ komórek pochodzących ze szpiku i obecnych w OUN zdrowego człowieka. Wielkość populacji makrofagów w OUN jest utrzymywana przede wszystkim dzięki stałemu napływowi monocytów z krwi [15-17]. Monocyty znajdują się także w PMR, stanowią 1-5% jego składu komórkowego i aż 75% z nich pozostaje w stanie aktywacji [18]. Fizjologicznie makrofagi i mikroglej występują w ograniczonej liczbie, natomiast w sytuacji zachwiania homeostazy, poprzez urazy czy choroby, w tym udar niedokrwienny, komórki te zaczynają z jednej strony proliferować, a z drugiej przyciągać i wspierać infiltrację komórek napływających z krwią z obwodu [19,20]. Makrofagi zlokalizowane w przestrzeniach okołonaczyniowych są odpowiedzialne za restymulację limfocytów po ich wynaczynieniu oraz umożliwiają im wniknięcie do parenchymy [15-17]. W OUN obecne są również komórki tuczne, typowo związane z oponami oraz przestrzeniami okołonaczyniowymi [5].

1.2.1.2 Odpowiedź nabyta

Głównymi reprezentantami odpowiedzi nabytej w OUN są limfocyty obecne w PMR, choć w porównaniu do składu ilościowego innych jałowych płynów ustrojowych ich liczba jest niewielka. W przeważającej większości są to limfocyty T [21]. Proporcje limfocytów T $CD4^+$ do limfocytów T $CD8^+$ w PMR wynoszą 3,5:1, a część z nich stanowią komórki pamięci [21,22]. Limfocyty T krążą w PMR zdrowego człowieka, stanowią ok. 60% leukocytów PMR, stale inwigilują OUN i wnikają do niego w większej liczbie, w sytuacji toczącego się w nim zapalenia [23,24]. Pozostałe komórki układu immunologicznego obecne w PMR to limfocyty B, stanowiące mniej niż 1% jego składu komórkowego [5]. Innymi

reprezentantami odpowiedzi nabytej w OUN są komórki pochodzenia szpikowego, wykazujące ekspresję markerów charakterystycznych dla komórek dendrytycznych znajdujące się w różnych przedziałach OUN, włącznie z parenchymą. Ponadto sploty naczyńiówkowe, komory oraz opony mózgowe zawierają komórki przypominające komórki plazmatyczne, które potencjalnie mogą przemieszczać się i kontaktować z głębokimi szyjnymi węzłami chłonnymi (ang.: *deep cervical lymph nodes, DCLN*) [25,26].

1.2.2 Nadzór immunologiczny ośrodkowego układu nerwowego

Wraz z hipotezą o stałej inwigilacji ośrodkowego układu nerwowego przez komórki układu odpornościowego, pojawiły się pytania o ogniwo łączące OUN z nabytą odpowiedzią immunologiczną i zjawiskiem prezentacji antygenów. W komunikacji „z wnętrza-na zewnątrz” brana jest pod uwagę m.in. rola makrofagów opon mózgowo-rdzeniowych, które dzięki ekspresji receptora dla chemokiny 7 (CCR7) wykazują zdolność migracji do okolicznych węzłów chłonnych i prezentacji mielinowych antygenów tamtejszym limfocytom T pamięci lub dziewiczym [5]. Z kolei, wydaje się, że w komunikacji „z zewnątrz – do wnętrza” pewną rolę w nadzorze immunologicznym OUN odgrywa selektyna P oraz chemokina CCR6, promujące przemieszczenie obwodowych limfocytów T do PMR oraz do przestrzeni podpajęczynówkowej. Istotne znaczenie ma także integryna VLA-4 ($\alpha 4$) (ang.: *very late integrin-4*) występująca na limfocytach i monocytach, która łącząc się z cząsteczką adhezji komórek naczyń 1 (ang.: *vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1*) umożliwia komórkom układu leukocytnego przekroczenie bariery krew-mózg [5].

Powyższe hipotezy zakładają, że w odpowiedź na procesy zapalne toczące się w OUN są zaangażowane przede wszystkim komórki układu immunologicznego spoza tego przedziału. W związku z coraz częstszymi doniesieniami o udziale komórek odpowiedzi nabytej w początkowych fazach wielu stanów patologicznych w OUN, pojawiły się pytania o potencjalnych lokalnych mediatorów tej interakcji i o wyjaśnienie mechanizmów, które nimi rządzą. Kolejnym krokiem w ich rozumieniu było odkrycie układu glejowo-limfatycznego (glimfatycznego) przypominającego układ chłonny. Umożliwia on przepływ PMR z przestrzeni podpajęcznej poprzez przestrzeń okołonacyniową wokół tętnic opony miękkiej (przestrzeń Virchowa-Robina) i dalej poprzez błonę podstawną komórek glejowych i wypustki astrogleju. Następnie PMR osiąga przedział parenchymalny, gdzie miesza się z płynem międzykomórkowym. Przejście mieszaniny płynów przez astrocyty ułatwiają kanały wodne akwaporyny 4 (AQP4). W obrębie struktur śródmiaższowych płyn rozchodzi się

przestrzeniami zewnątrzkomórkowymi w kierunku żylnych przestrzeni okołonaczyniowych i przestrzeni okołonerwowych i opuszcza OUN spływając do węzłów chłonnych szyi wzdłuż opuszki węchowej czy pochewek nerwów czaszkowych oraz rdzeniowych, drogą naczyń limfatycznych opon, a także poprzez ziarnistości pajęczynówki [27,28]. System ten stwarza przestrzeń do drenażu PMR oraz spływu komórek układu immunologicznego do DCLN [29]. Poznanie tego zjawiska może być kluczowe dla opisu powiązań między OUN a układem immunologicznym i może implikować zrozumienie innych zjawisk zachodzących w przestrzeni dotąd uznawanej za immunologicznie izolowaną. Wydaje się, że immunologiczna odmiennosc OUN określana niegdyś „uprzywilejowaniem” nie wynika z braku naczyń limfatycznych, ale zależy od dynamicznych procesów fizjologicznych i interakcji międzykomórkowych.

1.3 Immunologiczne aspekty udaru

Udar niedokrwienny mózgu wywołuje uruchomienie kaskady procesów immunologicznych. Komórki układu odpornościowego patrolujące OUN w odpowiedzi na cytokiny i chemokiny wytwarzane przez uszkodzone neurony mogą zostać aktywowane, a w sytuacji uszkodzenia bariery krew-mózg wnikać z krwi do uszkodzonego obszaru parenchymy. Z drugiej strony mogą wpływać na inne, sąsiadujące komórki pobudzając je do pro- lub przeciwzapalnej odpowiedzi nie tylko lokalnie, w strefie uszkodzonej tkanki nerwowej, ale również ogólnoustrojowo: we krwi obwodowej, szpiku, śledzionie i innych narządach limfatycznych [29-31]. W odpowiedzi na udar uruchamiane są mechanizmy odpowiedzi wrodzonej i nabytej.

1.3.1 Wrodzona odpowiedź immunologiczna w udarze

1.3.1.1 Przedział naczyniowy

Odpowiedź wrodzona w przedziale naczyniowym pojawia się w ciągu pierwszych godzin od wystąpienia udaru niedokrwiennego i polega na aktywacji monocytów, neutrofilów oraz komórek tucznych, a także komórek NK oraz układu dopełniacza [5,32-34]. Neutrofile są linią komórkową, która jako pierwsza odpowiada na niedokrwienie. Komórki te pojawiają się w okolicach tworzącego się ogniska udarowego w ciągu kilku minut od początku niedokrwienia. W dalszej kolejności napływają monocyty, które stają się aktywnymi makrofagami [32]. Uszkodzenie bariery krew-mózg wraz ze wzrostem ilości molekuł adhezyjnych na komórkach śródbłona prowadzi do wzmożonego przedostawania się

neutrofili i monocytów do niedokrwionego obszaru. Liczba komórek tych populacji w niedokrwionym obszarze osiąga maximum w 3-ciej dobie od początku objawów, i utrzymuje się do 7-miu dni [32]. Ponadto zamknięcie naczyńia mózgowego powodujące deficyt tlenu sprzyja uwalnianiu wolnych rodników, które dodatkowo aktywują śródbłonek, a także układ dopełniacza, płytki krwi i kaskadę krzepnięcia [34]. Na powierzchni płytek i śródbłonka zwiększa się ekspresja cząstek adhezyjnych, w tym selektyny P, która wiąże się z glikoproteiną PSGL-1 na monocytach, co prowadzi do intensywnego formowania agregatów monocytarno-płytkowych [34]. Interakcja z płytkami ułatwia monocytom kotwiczenie do śródbłonka oraz stymuluje produkcję cytokin prozapalnych, takich jak: czynnik martwicy nowotworów (ang.: *tumor necrosis factor*, TNF- α), interleukin: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 oraz białka zapalnego makrofagów MIP-1 β . Wiązanie monocytów z płytkami może mieć charakter przetrwały, a większa liczba krążących agregatów koreluje z gorszym stanem klinicznym chorych [35]. Podczas pierwszych dni od początku udaru niedokrwinnego w krwi obwodowej obserwuje się leukocytozę, z przewagą granulocytów i monocytów oraz towarzyszącą limfopenią, a w surowicy zwiększone stężenie cząstek prozapalnych: IL-1 α - pochodzącej z leukocytów i płytek, chemokin płytkowych CCL5, CXCL4 i CXCL7 oraz cytokin pochodzenia monocytarnego: IL-1 β , TNF- α i IL-6. W odpowiedzi na niedokrwienie i reperfuzję, komórki NK wchodzą w przedziale naczyniowym OUN, w sposób pośredni i bezpośredni, w interakcje z monocytami i płytkami promując mechanizmy zakrzepowe i aktywując układ dopełniacza [33]. Ponadto aktywowane leukocyty wydzielają enzymy proteolityczne: elastazę i metaloproteinazy (MMP8, MMP9, MT6-MMP), a komórki śródbłonka i płytki uwalniają prostanoidy, leukotrieny i naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang.: *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF). Substancje te propagują stan zapalny poprzez zwiększenie przepuszczalności bariery krew-mózg i umożliwiają przejście do przestrzeni pozanaczyniowej prozapalnych czynników molekularnych i komórkowych [34]. Przerwanie ciągłości bariery jest dwufazowe. Pierwsze otwarcie ma charakter hemodynamiczny i jego skutkiem jest obrzęk cytotoksyczny, a po 24-48 h dochodzi do ponownego otwarcia, czego skutkiem jest obrzęk naczynioruchowy [34]. Należy mieć na uwadze również alternatywne drogi migracji leukocytów z krwi do parenchymy mózgu, poprzez krążenie oponowe oraz sploty naczyniówkowe. Ta różnorodność wrót dwukierunkowego przenikania komórek układu odpornościowego, stwarza szerokie możliwości immunologicznej penetracji OUN, wcześniej uznawanego za izolowany [30].

1.3.1.2 Przedział nerwowy

Pośród mechanizmów odpowiedzi wrodzonej uruchamianych w udarze niedokrwiennym w przedziale nerwowym najistotniejsza jest aktywacja mikrogleju i makrofagów. Na uwagę zasługuje też rola komórek NK. Okluzja tętnicy mózgowej i zamknięcie dopływu krwi do określonego obszaru mózgu powoduje stres oksydacyjny i deficyt energetyczny, doprowadzający do martwicy i programowanej śmierci neuronów. Obumieranie neuronów skutkuje utratą integralności tkankowej i przerwaniem połączeń międzykomórkowych między neuronami i mikroglejem, czego konsekwencją jest aktywacja mikrogleju, który uwalnia cytokiny prozapalne: TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 i IL-18. Cytokiny nasilają zjawisko cytotoksyczności, wywołują również zwiększony napływ leukocytów (w tym limfocytów T $\gamma\delta$, Treg i CD4⁺) do miejsca tworzącego się zapalenia [34,36]. Ponadto obumierające komórki nerwowe wydzielają nukleotydy ATP, UDP i UTP (w wysokim stężeniu aktywują mikroglej poprzez receptory purynergiczne), a także prozapalne chemokiny, m.in. CCL2, CCL3, CCL5, promujące rekrutację leukocytów, zwłaszcza monocytów, i powodujące infiltrację tkanki nerwowej przez makrofagi [4,37]. Niemniej zasadniczą rolą odpowiedzi wrodzonej jest przygotowanie i inicjacja immunologicznej odpowiedzi nabytej.

1.3.1.3 Komórki NK

Komórki NK (ang.: *natural killer cells*) to specyficzna grupa limfocytów nieposiadająca na swej błonie ani receptora TCR (ang.: *T-cell receptor*) ani BCR (ang.: *B-cell receptor*), a więc odmienna od limfocytów T i B [38]. Przez niektórych autorów komórki NK są zaliczane do grupy wrodzonych komórek limfoidalnych (ang.: *innate lymphoid cells*, ILC) [39]. Cechują się morfologią dużych granulocytarnych limfocytów i stanowią od 5% do 15% wszystkich limfocytów krążących we krwi obwodowej [40]. Posiadają zdolność rozpoznawania i eliminowania obcych, zakażonych i ulegających złośliwej transformacji nowotworowej komórek. Reakcja ta nie wymaga wcześniejszego uwrażliwienia, nie zależy od restrykcji receptora MHC i zachodzi w ciągu kilku godzin [38,39]. Z tego powodu komórki NK zaliczane są do komórek odpowiedzi wrodzonej (nieswoistej) [40].

Cytotoksyczność komórek NK zachodzi w mechanizmie bezpośrednim, poprzez uwolnienie z cytoplazmy ziaren litycznych perforyn, granzymów i granulizyn, lub poprzez indukcję apoptozy przy pomocy receptorów z nadrodziny TNF (FASL, TRAIL, TWEAK)

podlegających ciągłej regulacji poprzez przeciwstawne sygnały hamujące i aktywujące, a także w mechanizmie pośrednim, zależnym od przeciwciał (ang.; *Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity*, ADCC) [38,39]. Cytotoksyczność komórek NK jest aktywowana przede wszystkim przez IL-15, ale też IL-2, IL-12, IL-18, IL-21 oraz IFN- α , a hamowana przez PGE2, TGF- β , kortyzol, IL-17 i PDGF [38].

Komórki NK fenotypowo są definiowane poprzez obecność na ich powierzchni markera CD56 oraz brak markera CD3 (CD56⁺CD3⁻). Gęstość markera CD56 na ich powierzchni pozwala wyróżnić wśród nich dwa podtypy: z wysoką gęstością markera, nazywane CD56^{bright}, określane też niedojrzałymi, oraz te z niską gęstością - CD56^{dim} - określane jako dojrzałe [41]. Zróżnicowanie fenotypowe odzwierciedla również odmienne funkcje w układzie immunologicznym [41]. Podtypy komórek NK charakteryzują się różnorodną ekspresją molekuł adhezyjnych (CD62L, PEN5, LFA-1, CD2, CD44, CD49e, CD54, LFA-3 oraz ICAM-1) na swej powierzchni. Różnią się też potencjałem cytotoksycznym, poziomem ekspresji receptorów dla cytokin i odpowiedzią na chemokiny [2,39].

W przypadku chorób nowotworowych komórki NK głównie kontrolują rozrosty hematologiczne oraz przerzuty nowotworowe, a ich infiltracja do uformowanych guzów jest niewielka. Mniejsza liczba komórek NK we krwi obwodowej koreluje z cięższym przebiegiem choroby nowotworowej [42].

W kontekście infekcji wirusowych, komórki NK biorą udział w walce z niektórymi zakażeniami, szczególnie z rodziny Herpesviridae. Ich zadaniem nie jest eliminacja wirusa, raczej kontrolują jego miano dopóki w ramach odpowiedzi nabytej nie zadziałają limfocyty T. Ta rola regulacyjna na etapie indukcji odpowiedzi nabytej polega m.in. na zabijaniu niedojrzałych komórek dendrytycznych (po aktywacji receptora NKp30), ale także na promocji dojrzewania komórek dendrytycznych w węzłach chłonnych. W odpowiedzi na to zjawisko komórki dendrytyczne wydzielając IL-12, IL-15, IL-18 i IFN- γ stymulują komórki NK, czego efektem jest wykształcenie komórek CD56^{dim} CD16⁺ o silnych właściwościach cytotoksycznych [38]. Komórki NK, w ramach właściwości regulacyjnych, są też zdolne do zabijania aktywowanych limfocytów T [43]. Komórki NK poprzez sekrecję IFN γ biorą również udział w kontroli zakażeń pasożytniczych [44].

Nasza wiedza na temat roli komórek NK w udarze mózgu, zwłaszcza w jego ostrej fazie, jest w porównaniu z nowotworzeniem czy infekcjami bardzo ograniczona. Ostatnie badania eksperymentalne na modelach zwierzęcych wskazują na udział komórek NK we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej po udarze. Potwierdzono, że liczba komórek NK w niedokrwionej parenchymie zwiększa się, zwłaszcza w strefie penumbry [33,45,46]. Komórki NK aktywowane nieswoiście wykorzystują mechanizmy cytotoksyczności pośredniej i bezpośredniej indukując martwicę neuronów poprzez IFN- γ . W dodatku uwolnienie IFN- γ może aktywować działanie chemokiny CXCL3, przyciągającej do uszkodzonego obszaru makrofagi. Niekorzystny wpływ komórek NK na niedokrwioną tkankę nerwową jest pośredniczony także przez IL-15 [47,48]. Poza tym komórki NK biorą udział w uszkodzeniu bariery krew-mózg w odpowiedzi na indukowaną interferonem proteinę 10 (IP-10), która działa jako chemoatraktant [46]. Odnotowano również, iż cytoliza neuronów, pośredniczona przez komórki NK w mechanizmie związanym z perforynami i granzymami, nasila lokalne zapalenie i przyspiesza przebieg zawału mózgu [49].

Wyniki ilościowej oceny komórek NK w krwi obwodowej chorych z udarem nie są jednoznaczne, co może być związane z indywidualną zmiennością, stanem klinicznym i obecnością powikłań [33]. We wczesnych etapach odpowiedzi na udar dochodzi do redystrybucji komórek NK i ich liczba w krwi obwodowej, podobnie jak limfocytów B, T CD4⁺ i CD8⁺, zmniejsza się, podczas gdy zwiększa się ich reprezentacja w obrębie parenchymy [50,51]. Istnieją też prace wskazujące na niezmienną się liczbę krążących komórek NK u chorych z udarem niedokrwinnym [49,52,53]. Natomiast coraz więcej badań wskazuje na udział komórek NK w immunosupresji poudarowej i związanej z udarem infekcji (ang.: *stroke associated infection*, SAI). Odnotowano, że liczba krążących komórek NK w pierwszych godzinach udaru jest wyższa u osób rozwijających infekcję niż u tych bez infekcji. To sugeruje możliwość wykorzystania komórek, NK jako zwiastuna infekcji poudarowej [54].

1.3.2 Nabyta odpowiedź immunologiczna w udarze

Wedle reguł odpowiedzi nabytej, aktywacja subpopulacji limfocytów przez kontakt z komórką prezentującą antygen zachodzi zazwyczaj w ciągu 5-7 dni od zadziałania czynnika spustowego, a w udarze niedokrwinnym, co nietypowe i nadal do końca niewyjaśnione, już w pierwszych 24 godzinach od początku objawów klinicznych udaru [55]. Między innymi z

tego powodu zależna od antygeny aktywacja limfocytów T po udarze stanowi przedmiot licznych kontrowersji.

Odpowiedź nabytą, skierowaną przeciwko własnym antygenom inicjują w udarze uwalniane przez uszkodzone neurony cząstki wzorca molekularnego związanego z zagrożeniem (ang.: *danger associated molecular patterns, DAMP*) takie jak m.in.: ATP, białko HMGB1 (ang.: *High-Mobility Group Box-1*), białko S100, mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A (ang.: *mitochondrial transcription factor A, TFAM*) [32]. Aktywują one m.in. receptory Toll-podobne (TLR) i receptory zmiatacze umiejscowione na komórkach prezentujących antygen (ang.: *antigen presenting cell, APC*), takich jak komórki dendrytyczne, mikroglej, limfocyty B, śródbłonek naczyń oraz makrofagi przestrzeni okołonaczyniowych [34].

Wczesna odpowiedź wrodzona, powodując uszkodzenie połączeń ścisłych bariery krew-mózg, sprzyja przejściu do krążenia ogólnego antygenów pochodzących z tkanki nerwowej OUN. Alternatywną drogą wyjścia antygenów poza OUN jest drenaż parenchymy i płynu śródmiaższowego przez układ limfatyczny [28,56] .

Akumulacja komórek prezentujących antygen i zwiększona ekspresja cząstek MHC II w tkankach OUN czasowo koreluje z największą kumulacją limfocytów T w mózgu i mogłaby mieć związek z zależną od antygeny odpowiedzią immunologiczną angażującą lokalne limfocyty T, a nie komórki pochodzenia obwodowego [55]. Jak dotąd pozostaje nierozstrzygnięte, czy antygeny pochodzenia ośrodkowego docierają do komórek prezentujących antygen w obwodowych węzłach chłonnych, czy antygeny pochodzenia mózgowego są wychwytywane przez APC parenchymy i w ten sposób docierają do węzłów chłonnych szyi, inicjując aktywację limfocytów T na obwodzie, a następnie ich migrację do OUN [57,58]. To, czy procesy immunologiczne potoczą się dalej w kierunku rozwoju odpowiedzi nabytej czy tolerancji zależy od szeregu czynników, w tym dojrzałości komórek dendrytycznych, aktywacji APC w węzłach chłonnych, obecności cząstek kostymulujących, środowiska, w którym zachodzi prezentacja antygeny czy genetycznej skłonności do autoimmunizacji.

1.3.2.1 Prezentacja antygeny

Wydaje się, że parenchyma OUN jest kontrolowana immunologicznie przede wszystkim przez wysoko wyspecjalizowaną i samoodnawialną populację komórek

mikrogleju. Jednak ich rola w prezentacji antygeny jest nadal niejasna. Komórki te wykazują ekspresję cząstek MHC II i mogłyby prezentować antygen przyległym limfocytom. Jednak wszystko wskazuje na to, że mikroglej raczej aktywuje limfocyty obwodowe, które wchodzi do parenchymy, niż bezpośrednio prezentuje antygen sąsiadującym limfocytom. Jak wykazały badania, funkcje APC mogą pełnić komórki dendrytyczne (ang.: *dendritic cells*, DC), zlokalizowane w oponach i innych elementach bariery krew-mózg, wchodzących w interakcje z PMR. Konwencjonalne komórki dendrytyczne (DC1) zasiedlają przede wszystkim spłoty naczyńiówkowe, podczas, gdy komórki dendrytyczne DC2 są komórkami zawierającymi receptor CCR7, dzięki któremu migrują z opon mózgowych do węzłów chłonnych szyi, by w stanach patologii, również tych spowodowanych niedokrwieniem, jako APC aktywować limfocyty T po ich przejściu do OUN. Komórki dendrytyczne odgrywają istotną rolę w utrzymaniu tolerancji immunologicznej. Niedojrzałe DC, obecne w oponach i spłotach naczyńiówkowych OUN, prezentują autoantygeny limfocytom T, powodując ich anergię i zapobiegając reakcjom z autoagresji. Z kolei aktywacja DC przez DAMP powoduje ich dojrzewanie i migrację w kierunku obszaru zawału, a także zwiększenie ekspresji cząstek MHC II i kostymulujących, co sprzyja intensyfikacji reakcji autoagresji. Ostatnio potwierdzono również, że strefa udaru bardzo wcześnie jest nacieczona przez DC2, które w mechanizmie niezależnym od prezentacji antygeny indukują produkcję IL-17 przez limfocyty $T\gamma\delta$ i w ten sposób pośrednio promują infiltrację niedokrwionego obszaru przez neutrofile [59].

Po udarze antygeny mózgowe wiążą się z cząstkami MHC klasy II i są prezentowane na powierzchni APC. Kompleks antygen-cząstka MHC klasy II jest rozpoznawany przez limfocytarny receptor TCR. Odbyna się to w obecności cząstek kostymulujących występujących zarówno na APC: CD80 i CD86, jak i limfocytach T: CD28, a efektem jest rekrutacja komórek $CD4^+$ i $CD8^+$ [34].

Po uszkodzeniu bariery krew-mózg, z makrofagami i neutrofilami, do parenchymy wkraczają limfocyty B i T, które wchodzi w dalsze interakcje z komórkami mikrogleju [32]. Autoantygeny związane z cząstkami MHC II, obecnymi na astrocytach i mikrogleju, i przez nie prezentowane napływającym limfocytom, powodują dalsze nasilenie rekrutacji komórek $CD4^+$ i $CD8^+$.

Sekwencja reakcji immunologicznych po udarze wciąż jest przedmiotem badań, a odróżnienie efektów odpowiedzi wrodzonej od nabytej nie jest oczywiste. W jednym z

modeli eksperymentalnych udaru opisano naciek limfocytów $CD8^+$ w strefie zawału już w 3 godziny od zamknięcia naczynia, natomiast limfocytów $CD4^+$ - w ciągu pierwszych 24 godzin [60]. Inne prace sugerują, że zjawisko to zachodzi w dobie 3. [61], 5. [62], a nawet w 7. tygodniu [63] od udaru. Obserwowano również kumulację limfocytów T podwójnie ujemnych $CD4^-/CD8^-$ w niedokrwionej półkuli, która zachodzi już w 1.-3. dobie po reperfuzji i wydaje się, że to właśnie podwójnie ujemne limfocyty T, a nie limfocyty $CD4^+$ lub $CD8^+$, odgrywają istotną, prozapalną rolę w pierwszych godzinach niedokrwienia [55,64]. We wczesnej fazie niedokrwienia/reperfuzji, limfocyty T ułatwiają adhezję płytek i leukocytów do śródbłonna naczyń mózgowych będąc przyczyną fenomenu zwanego w języku angielskim *thromboinflammation*, kiedy to komórki i cząstki biorące udział w procesie krzepnięcia stają się promotorami zapalenia i prowokują mikrozatory, nasilając tym samym zniszczenie. Interakcje pomiędzy komórkami T oraz płytkami mogą mieć też efekt hemostatyczny, chroniący ognisko niedokrwienia przed transformacją krwotoczną [65]. Obecność limfocytów T odnotowywano w naczyniach opony miękkiej, naczyniach korowych oraz w obrębie ogniska niedokrwienia [4]. W tym ostatnim dominowały cytotoksyczne $CD8^+$. U myszy limfocyty T $CD4^+$ kumulowały się w mózgu do 30. dnia po udarze, ze szczytem w 14. dniu od początku udaru. Zatem reakcja antygenowo specyficzna limfocytów T ma miejsce również w fazie podostrej i przewlekłej udaru, i może wiązać się z gorszym stanem neurologicznym [4]. Około 40% limfocytów T naciekających obszar niedokrwienia to limfocyty T $CD4^+$ pomocnicze (Th), a 30% to cytotoksyczne $CD8^+$.

Limfopenia oraz zmiany jakościowe zachodzą zarówno we krwi obwodowej, jak i w obwodowych narządach limfatycznych [66]. Dochodzi do przesunięć jakościowych i wśród dominujących w tym czasie we krwi obwodowej limfocytów $CD4^+$ przeważa typ Th2 nad Th1. Odpowiedź z dominacją limfocytów Th2, będących źródłem przeciwzapalnych cytokin, prawdopodobnie ma działać neuroprotekcynie, bowiem podanie IL-4 i IL-33 - cytokin promujących odpowiedź Th2 - zmniejsza obszar uszkodzenia mózgu po udarze niedokrwinnym [67]. Wydaje się, że wczesna limfopenia wynika z przesunięć populacji limfocytów między kompartmentami, gdyż w tym samym czasie wzrasta liczba limfocytów w obszarze niedokrwienia, a stan ten może utrzymywać się przez kilka dni [55]. Z kolei w krwi obwodowej chorych z udarem liczba komórek Th17 i $T\gamma\delta$, oraz poziom IL-17A, IL-23, IL-6 i IL-1 β zwiększa się [68].

Rola limfocytów B w udarze niedokrwiennym nie jest do końca poznana i prawdopodobnie jest zróżnicowana w zależności od fazy niedokrwienia [69]. We wczesnym okresie udaru wskazuje się na protekcyjną rolę regulatorowych limfocytów B, które stanowią znikomy (0,5%-0,7%) odsetek komórek CD19⁺. Zwierzęta pozbawione limfocytów B doznawały udaru o większej objętości, z towarzyszącymi gorszymi deficytami neurologicznymi i wyższą śmiertelnością [70], a korzystny dla przebiegu udaru był transfer limfocytów B zastosowany przed epizodem naczyniowym [71]. Limfocyty B zmniejszają towarzyszący udarowi stan zapalny dzięki produkcji cytokin przeciwzapalnych, takich jak IL-10 i TGF-β [72]. W przeciwieństwie do prawdopodobnie korzystnej roli limfocytów B w ostrej fazie udaru, w przewlekłej fazie mogą mieć udział w poudarowych zaburzeniach poznawczych [73].

1.3.2.2 Limfocyty Treg

Obecność limfocytów T regulatorowych w układzie immunologicznym jest jednym z czynnych zabezpieczeń przed autoagresją. Ich naturalną funkcją jest utrzymanie immunologicznej homeostazy poprzez hamowanie odpowiedzi immunologicznej oraz utrzymanie tolerancji wobec własnych antygenów [4]. Komórkom tym przypisuje się również supresję reakcji immunologicznych przeciwko komórkom nowotworowym, alergenom oraz narządom transplantowanym [74]. Wykazano, że ich brak u człowieka, jak i eksperymentalne wyczerpanie w modelach zwierzęcych, jest pierwotną przyczyną chorób autoimmunologicznych, a rekonstytucja chroni przed rozwojem tego typu chorób [75]. Poszczególne funkcje limfocytów Treg przedstawiono w tabeli 1.

Limfocyty Treg stanowią 5-10% limfocytów CD4⁺ [76]. W czasie różnicowania się limfocytów w grasicy, limfocyty CD4⁺ rozpoznające własne antygeny, nie ulegają selekcji negatywnej, lecz zaczynają wytwarzać marker CD25 oraz czynnik transkrypcyjny FoxP3 [38]. Mechanizm, jaki pozwala autoreaktywnym limfocytom przejść etap selekcji wciąż nie jest do końca poznany, podejrzewa się jednak, że komórki te muszą posiadać chroniące je antyapoptotyczne molekuly [77].

Komórki CD4⁺ wykazują różną ekspresję markera CD25, będącego łańcuchem α receptora dla IL-2 (IL-2Rα). Znaczna większość wykazuje jego niską intensywność (CD25^{dim}), mniejszy odsetek to limfocyty CD25^{bright} [77]. Jądrowy czynnik transkrypcyjny FoxP3 jest odpowiedzialny za indukowanie supresji limfocytów T efektorowych (CD4⁺,

CD8⁺), a prawdopodobnie także za indukcję supresji komórek NK, NKT, limfocytów B i komórek dendrytycznych [77].

W linii komórkowej charakteryzującej się zestawem markerów CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺, a określanej mianem naturalnie występujących Treg (*natural* Treg, nTreg) wyróżniamy dwie subpopulacje [78,79]:

- tTreg (*thymus-derived* Treg) – limfocyty produkowane w grasicy; rozpoznając autoantygeny w grasicy nie ulegają selekcji negatywnej, CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺
- pTreg (*peripheral* Treg) – limfocyty indukowane na obwodzie, nabywają funkcje regulatorowe poza grasicą pod wpływem działania przedłużonej i powtarzanej stymulacji antygenowej oraz cytokinowej, w tym PGE2, szczególnie w stosunku do antygenów flory bakteryjnej i pokarmu; pochodzą z CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁺. Określane są również mianem iTreg (*induced* Treg), choć to określenie używane jest też do opisu Treg powstałych i indukowanych w warunkach *in vitro* [80].

Tabela 1. Funkcje limfocytów Treg

Obszar wpływu	Funkcja
autoagresja	hamowanie aktywności autoreaktywnych limfocytów T
żywienie	tolerancja na antygeny flory jelitowej i pokarmów
nowotworzenie	rozwój tolerancji na antygeny nowotworowe (zależny od specyficznego immunologicznego środowiska, w jakim działają limfocyty Treg, a nie programu genetycznego)
transplantacja	tolerancja na przeszczepy allogeniczne
ciąża	ochrona płodu przed odrzuceniem przez układ odpornościowy matki
zakażenie	hamowanie nadmiernej odpowiedzi przeciwzakaźnej i nadwrażliwości, celem ochrony tkanek przed nadmiernym uszkodzeniem
alergia	supresja indukcji Th2 oraz supresja wydzielania cytokin stymulujących limfocyty B do uwalniania Ig-E, odpowiedzialnej za objawy alergiczne
regeneracja	indukcja naprawy uszkodzonych z tytułu reakcji zapalnej tkanek, poprzez wydzielanie amfireguliny
pamięć immunologiczna	hamowanie eliminacji mikroorganizmów, celem podtrzymania aktywności limfocytów pamięci (co może przedłużać infekcję)
tolerancja	tolerancja na tzw. zmienione ligandy peptydowe, czyli zmienione antygeny nabierające cechy antagonistów i przekazujące odwrotny sygnał limfocytom

Limfocyty tTreg są najlepiej zbadaną i opisaną subpopulacją. Początkowo były identyfikowane głównie jako wykazujące wysoką ekspresję markerów CD25 i FoxP3 oraz niską CD127 i brak ekspresji CD45RA. Badania wykazały, iż tTreg poza CD4⁺, CD25⁺ wykazują ekspresję markera mTGF-β1, oraz cząstki o typowo immunosupresyjnej roli -

CTLA-4. Ten rodzaj ma z kolei mniej znaczącą rolę w produkcji IL-10 i nie wydzielą IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 i IFN- γ [81].

Limfocyty Treg muszą być aktywowane, aby zaczęły spełniać swoją immunosupresyjną rolę. Ich aktywacja jest antygenowo specyficzna, a zatem, prowokowana przez nie supresja jest antygenowo zależna [76]. Induktorem aktywacji limfocytów Treg jest TGF- β i IL-10, na ich różnicowanie i czynność wpływa IL-2, a IFN- γ hamuje ich aktywność [38].

Poza markerami CD4, CD25, FoxP3 limfocyty Treg wykazują ekspresję szeregu innych istotnych cząstek m.in.: powierzchniowej CD127 (IL-7R α , łańcuch alfa receptora dla IL-7), występującej zwłaszcza na limfocytach Treg pamięci czy cząstki Helios – wewnątrzkomórkowego czynnika transkrypcyjnego z rodziny Ikaros [80].

Czynnik transkrypcyjny Helios jest specyficzny dla wszystkich Treg powstałych w grasicy [82,83]. Komórki Helios⁺ i Helios⁻ różni około 1 tysiąca genów, a pod względem fenotypowym Treg Helios⁻ wytwarzają więcej cytokin zapalnych, szczególnie IFN- γ i rzadziej niż Helios⁺ wykazują ekspresję CD103, Nrp-1, OX40, TNFRII oraz CD69, markerów typowych dla aktywowanych limfocytów Treg o zdolnościach supresorowych. Jak dotąd nie zdefiniowano w pełni roli czynnika Helios, jednak wykazano, że eksperymentalne zmiany jego poziomu wpływają na funkcję limfocytów Treg [84] i przyjęto uważać limfocyty Treg Helios⁺ za typ prosupresorowy, a Helios⁻ za prozapalny. Nadal nie ustalono czy Helios⁺ i Helios⁻ można uznać za osobne subpopulacje czy raczej za kolejne stadia różnicowania limfocytów Treg, a jedna z hipotez zakłada, iż Treg Helios⁻ są formą prekursorową, która pod wpływem aktywacji wykazuje ekspresję m.in. Helios⁺, stając się w pełni funkcjonalnym limfocytom Treg. Helios⁺ stanowią 70-90% populacji limfocytów Treg. Ekspresja FoxP3 jest znacznie bardziej stabilna na komórkach Helios⁺, jednak w niektórych sytuacjach klinicznych dochodzi do utraty czynnika Helios, co jest związane z utratą również czynnika FoxP3 [80].

Limfocyty Treg oddziałują bezpośrednio oraz poprzez mediatory nie tylko na inne limfocyty, m.in. limfocyty T efektorowe (cytotoksyczne (Tc) i pomocnicze (Th)), dziewicze, pamięci, limfocyty B oraz komórki NK i NKT, ale również na komórki prezentujące antygen [75]. Mechanizmy działania limfocytów Treg przedstawiono w tabeli 2 [38,77,79,85,86]

Tabela 2. Mechanizmy działania limfocytów Treg

Mechanizm	Znaczenie
wytwarzanie TGF- β , IL-10	cytokiny przeciwzapalne, które modyfikują działanie komórek dendrytycznych i hamują wytwarzanie przeciwciał
wytwarzanie IL-35	cytokina przeciwzapalna, uczestniczy w indukcji tolerancji infekcyjnej, promuje powstawanie limfocytów regulatorowych zwanych iTr35 oraz hamuje proliferację limfocytów T efektorowych
wytwarzanie galektyny 9	łączy się z cząstką TIM-3 (<i>T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>) na limfocytach Th
wytwarzanie IL-17	prozapalna cytokina, obecna we krwi obwodowej i w migdałkach
indukowanie 2,3-dioksygenazy indolaminy	pośrednio indukcja powstawania limfocytów Treg. IDO wzmacnia wytwarzanie TGF β , również nasilającego proliferację Treg
wytwarzanie adenozyiny z ATP przy pomocy ektonukleotydaz CD39 i CD73	hamowanie aktywacji komórek efektorowych: dendrytycznych i limfocytów
wiązanie IL-2 przy pomocy IL-2R	ograniczenie dostępu tej cytokiny do innych limfocytów
ekspresja granzymów, perforyn i FASL	indukcja cytolizy innych (autoreaktywnych) limfocytów efektorowych
ekspresja molekuł (CTLA-4, CD39, PD-1)	immunosupresja
uwalnianie egzosomów zawierających miRNA	immunosupresja
indukcja powstawania tolerogennych komórek dendrytycznych	tolerancja

Wydaje się, że w udarze niedokrwiennym limfocyty T regulatorowe ograniczają immunologiczną reakcję zapalną, która potęguje wtórne do niedokrwienia uszkodzenie mózgu [87]. Począwszy od lat 90-tych ubiegłego wieku podejmowano próby opisu kinetyki infiltracji limfocytów Treg do mózgu w sytuacji niedokrwienia [88]. Nadal jednak nie scharakteryzowano roli tej populacji w udarze, nie uchwycono dokładnego miejsca działania ani momentu aktywacji. Dotychczas dowiedziono, że limfocyty Treg są obecne w zdrowym mózgu szczura [89]. Potwierdzono też ich akumulację i proliferację po ostrym niedokrwieniu w mózgach mysich [90].

Rezultaty badań eksperymentalnych, koncentrujących się na wpływie limfocytów Treg na obszar niedokrwienia są źródłem rozbieżnych informacji - od działania pozytywnego, zmniejszającego obszar uszkodzenia [92-101], poprzez brak wpływu [90,102,103], aż po oddziaływanie niekorzystne, zwiększające zakres udaru [104,105]. Nieśpójności mogą częściowo wynikać z różnic metodologicznych - między innymi zróżnicowanego początkowego rozmiaru analizowanego ogniska udarowego oraz czasu, jaki minął od uszkodzenia. Ponadto limfocyty Treg wchodząc w interakcje z płytkami i śródbłonką eskalują formowanie mikrozatorów, które ograniczają światło naczyń mikrokrążenia i utrudniają perfuzję, co wskazuje na niekorzystny, acz nieimmunologiczny

aspekt obecności limfocytów Treg w uszkodzonym OUN [104,105]. Mogą również przyspieszać śmierć neuronów i ograniczać napływ do parenchymy komórek ograniczających negatywne skutki udaru [106]. Z kolei korzystny efekt działania limfocytów Treg jest związany z ich działaniem przeciwzapalnym [100], poprzez zwiększenie produkcji IL-10 [91,95,101], TGF β i IL-35 [93,107], ograniczenie aktywacji komórek T efektorowych i produkcji cytokin zapalnych (zmniejszenie produkcji IFN- γ) [99-101] oraz redukcję aktywacji mikrogleju i makrofagów z ograniczeniem produkcji TNF- α [92,93,101]. Możliwa jest również, za pośrednictwem IL-10, stymulacja neurogenezy poprzez wpływ limfocytów Treg na neuronalne komórki progenitorowe (ang.: *neural stem cell*, NSC). Komórki te w odpowiedzi na udar niedokrwienny miałyby migrować do miejsca uszkodzenia i tam różnicować się w dojrzałe komórki nerwowe, zastępując te uszkodzone [102]. Limfocyty Treg działając poprzez VEGF i TGF- β pobudzają nowotworową angio- i waskulogenezę, ale oddziałując poprzez IFN- γ mogą również te procesy hamować [108]. Nie wiadomo jednak, w jaki sposób komórki Treg angażują się w te procesy po udarze.

W modelu eksperymentalnym udaru znaczne zwiększenie liczby limfocytów Treg we krwi obwodowej oraz śledzenie obserwowano już w pierwszych dobach [109], a nawet godzinach, od początku niedokrwienia [110]. Natomiast wyniki sekwencyjnej oceny ilościowej limfocytów Treg w krwi obwodowej u ludzi są niespójne: obserwowano zarówno zmniejszenie liczby Treg [52,78,87,111], brak zmian [112], jak i ich zwiększenie [113,114]. Zwiększona liczba limfocytów Treg wiązała się jednak z ich obniżoną funkcją supresorową [114]. Zwrócono także uwagę na rolę proporcji limfocytów Treg do limfocytów Th17 w przebiegu udaru. W związku ze znaczącym zmniejszeniem liczby limfocytów Treg we krwi obwodowej, poziomu TGF- β oraz ekspresji FoxP3 w pierwszych dniach udaru niedokrwienego, połączonym ze znacznym wzrostem liczby limfocytów Th17 i produkowanej przez nie IL-17A uznano tę proporcję za element patogenezy udaru, szczególnie tego, powstającego na podłożu zmian miażdżycowych [111]. Hipotezę potwierdza wyrównanie proporcji na korzyść limfocytów supresorowych w fazie podostrej udaru [78]. Ponadto Treg korzystnie wpływają na zakres i przebieg kliniczny ukrwotocznienia udaru po odroczonym leczeniu trombolitycznym [115].

W licznie przeprowadzanych badaniach wciąż brakuje jednoznacznej odpowiedzi dotyczącej roli limfocytów Treg w udarze niedokrwiennym. Czy ich obecność i działanie jest korzystne dla przebiegu udaru, czy wręcz przeciwnie, a może limfocyty Treg to broń

obosieczna [106]? Niemniej czynniki decydujące o tym, które oblicze limfocytów Treg obserwujemy nie są aktualnie zdefiniowane.

1.3.3. Czasowa sekwencja zjawisk immunologicznych po udarze

1.3.3.1. Hipoteza stanu zapalnego wyprzedzającego objawy kliniczne udaru niedokrwienne

W świetle wciąż niewyjaśnionej kaskady zdarzeń angażujących układ odpornościowy w reakcji na uszkodzenie mózgu, tym bardziej budzi zainteresowanie niespodziewana szybkość i gotowość układu immunologicznego do rozwinięcia odpowiedzi nabytej. Potencjalnym wyjaśnieniem tej sytuacji mogą być sytuacje kliniczne, które zwiększają ryzyko udaru jak ostre stany zapalne (infekcje czy zabieg chirurgiczny) czy przewlekłe (np. układowe choroby tkanki łącznej). Również miażdżyca, będąca przyczyną dużego odsetka epizodów naczyniowych w OUN, jest chorobą zapalną, pobudzającą układ odpornościowy. Wydaje się, że sytuacje te powodują aktywację układu immunologicznego jeszcze przed objawami klinicznymi ostrego niedokrwienia OUN, co może mieć miejsce zwłaszcza w udarach wynikających z choroby małych czy dużych naczyń, na podłożu zakrzepowym, w których ograniczenie przepływu w danym naczyniu jest długotrwałym procesem, a objawy kliniczne ostatecznym efektem krytycznego, choć stopniowo narastającego ograniczenia przepływu w danym obszarze.

1.3.3.2. Hipoteza udziału niekonwencjonalnych limfocytów: $T\gamma\delta$, iNKT

Wśród hipotez próbujących wyjaśnić szybką odpowiedź nabytą układu immunologicznego na udar znajduje się ta, o udziale limfocytów niekonwencjonalnych $T\gamma\delta$ oraz iNKT, a więc subpopulacji, które łączą w sobie cechy komórek odpowiedzi wrodzonej i nabytej i zdolne są do działania bez uprzedniej prezentacji antygeny.

1.3.3.2.1 Limfocyty $T\gamma\delta$

Limfocyty $T\gamma\delta$ stanowią 1-10% limfocytów krwi obwodowej i mniej niż 1% tymocytów. Są subpopulacją filogenetycznie starą, stąd często określane są limfocytami prymitywnymi [38]. Powstają w grasicy, a różnicowanie w kierunku limfocytów $T\gamma\delta$ determinuje budowa receptora TCR, co zachodzi na etapie komórek podwójnie ujemnych ($CD4^-CD8^-$). Ogólnie są charakteryzowane jako komórki $CD2^+CD3^+CD4^-CD8^-$ i zaledwie 20-30% jest $CD8^+$. Limfocyty $T\gamma\delta$ opuszczają grasicę falami i zasiedlają stopniowo tkanki

obwodowe: krew, tkankę nabłonkową (skórę i naskórek), błonę śluzową jelit, płuc i dróg moczowo-płciowych oraz tkankę chłonną jamy nosowej (NALT) [38,116].

Podział limfocytów $T\gamma\delta$ na podtypy opiera się na różnicy w segmencie V (*variable*), który dołączany jest podczas rearanżacji łańcuchów γ oraz δ receptora TCR, rozpoznającego antygen [117]. Dwa dobrze scharakteryzowane u człowieka podtypy limfocytów $T\gamma\delta$ to V δ 1 i V δ 2. Podtypy limfocytów $T\gamma\delta$ różnią się dystrybucją tkankową, mechanizmami rozpoznawania antygenów oraz funkcją [118,119]. Większość ludzkich limfocytów $T\gamma\delta$ w krwi obwodowej to właśnie unikatowe dla naczelnych V δ 2, podczas gdy limfocyty $T\gamma\delta$ z segmentem V δ 1 występują w przede wszystkim w błonie śluzowej i w wątrobie [119,120]. Limfocyty V δ 2 są znane ze zdolności rozpoznawania fosfoantygenów tj. fosforylowanych metabolitów pochodzących od mikroorganizmów lub od gospodarza. Z kolei limfocyty zawierające segment V δ 1 lokalizując się głównie w nabłonkach, rozpoznają lipidy oraz glikolipidy prezentowane przez cząstkę CD1d [121]. Proporcje podtypów V δ 1 i V δ 2 zmieniają się u człowieka wraz z wiekiem. Limfocyty $T\gamma\delta$ z segmentem V δ 1 dominują przy urodzeniu i stopniowo ich liczba w stosunku do V δ 2 zmniejsza się, a około 10 roku życia V γ 9V δ 2 zaczynają ilościowo dominować i w takiej proporcji pozostają w życiu dorosłym. W wieku starszym przewaga limfocytów $T\gamma\delta$ V δ 2 nad V δ 1, szczególnie u płci męskiej, zaczyna zmniejszać się.

Poza podziałem opartym na różnicach w konstrukcji receptora TCR, pojawiają się nowe koncepcje wyróżnienia subpopulacji limfocytów $T\gamma\delta$, oparte na ich funkcji. Aktywowane limfocyty V δ 2 różnicują się z fenotypu przypominającego limfocyty T pomocnicze Th1 do fenotypu charakterystycznego dla limfocytów Th2, Th17, grudek limfocytów T pomocniczych (TFH) i limfocytów Treg. Funkcja każdego z fenotypów powiązana jest charakterystycznymi markerami obecnymi na powierzchni, czynnikami transkrypcyjnymi, a także specyficznymi cytokinami wymaganymi do zainicjowania różnicowania i wytwarzanymi przez daną linię, co wskazuje na niezwykle plastyczność limfocytów $T\gamma\delta$ [119]. W warunkach indukujących nabywanie funkcji typowych dla Th1, czyli w obecności IL-12, limfocyty $T\gamma\delta$ zaczynają produkować większe ilości IFN- γ i TNF- α , natomiast pod wpływem IL-4 nabierają cech fenotypowych Th2 i wytwarzają jeszcze więcej IL-4. U zdrowych dorosłych 50-80% limfocytów V δ 2 wykazuje cechy Th1 i produkuje IFN- γ oraz TNF- α , mniej niż 1% z nich produkuje IL-17. Możliwość wielokierunkowej modyfikacji funkcji wskazuje na niezwykle plastyczność limfocytów $T\gamma\delta$ [119].

Limfocyty T $\gamma\delta$ rozpoznają białka szoku cieplnego własnych komórek oraz mykobakterii, fosfoantygeny (to rola głównie V δ 2), rozpoznają lipidy oraz glikolipidy prezentowane przez cząstkę CD1d (rola głównie V δ 1), wytwarzane przez bakterie alkilaminy oraz cząstki MICA i MICB, obecne na komórkach zakażonych wirusem, na komórkach nowotworowych lub z uszkodzonym DNA [121].

Limfocyty T $\gamma\delta$ są aktywowane bezpośrednio przez DAMP (rozpoznawanie molekuł uwalnianych nagle w sytuacjach stresu) oraz poprzez receptory NKR (ang: *natural killer receptor*) bez konieczności ekspansji klonalnej czy prezentacji antygeny, co pozwala na udział we wczesnych stadiach odpowiedzi immunologicznej. Zatem limfocyty T $\gamma\delta$ działają równolegle z komórkami odpowiedzi wrodzonej. Ponieważ ekspresja receptorów dla IL-1 β i IL-23 jest cechą konstytucyjną limfocytów T $\gamma\delta$, mogą one również odpowiadać na sygnały cytokinowe. W sytuacji braku ligandu dla receptora TCR, ich aktywacja może zachodzić za pomocą receptora TLR (ang.: *toll-like receptor*) albo dektyny [122]. Aktywacja limfocytów T $\gamma\delta$ może zachodzić również poprzez typowe sygnały odpowiedzi nabytej, czyli prezentację antygeny przez komórki MHC-zależne. Co charakterystyczne, w ciągu kilku godzin od aktywacji i bez wcześniejszej systemowej ekspansji, limfocyty T $\gamma\delta$ mogą produkować w wysokich stężeniach IFN- γ , IL-17, TNF- α oraz granzymy [122].

Ponadto, limfocyty T $\gamma\delta$ posiadają zdolność produkowania licznych chemokin i czynników regulacyjnych, w tym IL-13 oraz IGF-1, które pozwalają im na interakcje z limfocytami B i T $\alpha\beta$. Z kolei w zwierzęcych modelach infekcji, reakcji nadwrażliwości i autoimmunizacji, limfocyty T $\gamma\delta$ jako główne źródło IL-17, aktywnie uczestniczą w odpowiedzi wrodzonej, rekrutując neutrofile.

Ponadto komórki te działając poprzez receptor CD95 i receptory TNF-zależne (TRAILR) oraz uwalniając cytotoksyczne granzymy i perforyny, są związane z indukcją zaprogramowanej śmierci komórki [122].

Ten zasób możliwych sposobów reakcji czyni subpopulację limfocytów T $\gamma\delta$ pomostem pomiędzy odpowiedzią immunologiczną wrodzoną i nabytą.

Zwiększenie liczby jak i odsetka limfocytów T $\gamma\delta$ zachodzi przede wszystkim w infekcjach wirusowych i pasożytniczych, chorobach autoimmunologicznych i w nowotworzeniu [118].

Prace eksperymentalne sugerują negatywny wpływ limfocytów T $\gamma\delta$ na przebieg i rokowanie w udarze niedokrwiennym mózgu, czego przyczyną miałyby być promowana przez limfocyty T $\gamma\delta$ synteza prozapalnej IL-17A, która stymuluje rekrutację neutrofili i ich migrację do strefy niedokrwienia. U chorych z udarem niedokrwiennym potwierdzono obecność limfocytów T $\gamma\delta$ w oponach mózgowych, natomiast w modelach zwierzęcych komórki te były widoczne również w obszarze *penumbry*, a ich zarówno bezwzględna liczba jak i odsetek wyraźnie zwiększały się w 3. dobie ostrego niedokrwienia [4,116,123]. Co więcej ograniczenie liczby limfocytów T $\gamma\delta$, jak również limfocytów CD4⁺, CD8⁺ prowadziło do redukcji obszaru niedokrwienia i korzystnie wpływało na ostateczny stan kliniczny [4,59,124].

1.3.3.2.2 Limfocyty iNKT

Komórki NKT (ang.: *Natural Killer T*) to subpopulacja stanowiąca ok. 0.2% (0,01%-1%) populacji limfocytów T. Wykazuje na swej powierzchni ekspresję receptora TCR, charakterystycznego dla limfocytów T oraz niektórych receptorów właściwych komórkom NK, takich jak NKG2D, TLR, NK1.1 czy Ly49A. Stanowią tym samym pomost pomiędzy odpowiedzią wrodzoną i nabytą układu immunologicznego [125]. Receptor TCR komórek NKT składa się w przeważającej większości z podjednostek α i β . Różnice związane z tymi podjednostkami pozwalają wyodrębnić w subpopulacji NKT na dwa typy. W typie I NKT receptor TCR jest zbudowany z ograniczonej puli podjednostek α i β , w przypadku organizmów ludzkich są to głównie łańcuchy V α 24-J α 18 [126] i V β 11 [127]. Z uwagi na swoją stałość w tworzeniu łańcucha α (w 80% ta sama podjednostka) oraz łańcucha β z ograniczonego zakresu podjednostek, typ I komórek NKT znany jest pod nazwą *invariant iNKT* (niezmienny) [128]. W typie II NKT łańcuchy α i β receptora TCR zbudowane są z różnych podjednostek [125]. Limfocyty NKT rozpoznają głównie lipidy, prezentowane przez CD1d [91]. Przy czym typ II, dzięki zróżnicowaniu w budowie receptora TCR, rozpoznaje szersze ich spektrum: glikolipidy i fosfolipidy [129]. Natomiast typ I, w swojej “niezmienności” charakteryzuje się rozpoznawaniem α -galaktozyloceramidu (α -GalCer) - glikosfingolipidu izolowanego z morskiej gąbki oraz, co odkryto w ostatnim czasie, izoglobotrihexozyloceramidu (iGb3) i disialogangliozydu (GD3) [126,127,129]. Są to glikolipidy wchodzące w skład ścian komórkowych bakterii, ale będące również endogennymi cząstkami alarmującymi, informującymi układ odpornościowy o pojawiającym się niebezpieczeństwie.

Komórki iNKT rezydują w wątrobie i śledzionie, kontrolując środowisko na poziomie naczyń włosowatych tych narządów [128]. W zależności od wydzielanych cytokin z komórek iNKT wyodrębniono subpopulacje: iNKT1, iNKT2, iNKT17 oraz iNKTfh [130, 131]. Poza aktywacją bezpośrednią poprzez CD1d lub poprzez odpowiednie cytokiny, limfocyty NKT mogą być aktywowane, podobnie jak limfocyty $T\gamma\delta$, bezpośrednio przez cząstki DAMP i PAMP [132,133].

Limfocyty NKT aktywują limfocyty cytotoksyczne, komórki NK, komórki dendrytyczne oraz makrofagi [38]. Pełnią funkcję w odporności przeciwwzakaźnej, immunoregulacji oraz w reakcjach przeciwnowotworowych, odgrywają też rolę w patogenezie infekcji, alergii, miażdżycy, chorób autoimmunologicznych oraz nowotworowych, jak również w odpowiedzi na przeszczepy [38,125,127]. Uczestniczą w komórkowej modulacji przebiegu niektórych chorób neurologicznych, w tym stwardnienia rozsianego, glejaka czy chorób neurodegeneracyjnych w tym stwardnienia zanikowego bocznego [125,134].

W trakcie udaru niedokrwienego, limfocyty NKT biorą udział w tzw. immunosupresji indukowanej udarem. Zadziwiająca jest ich zdolność do szybkiej reakcji na ostre niedokrwienie mózgu i przemieszczenie się do strefy udaru z tak odległej lokalizacji, jaką jest wątroba. Wykazano również, że większe ognisko udarowe wiązało się z większą aktywacją komórek iNKT. Wyniki sugerują, iż istnieje powiązanie pomiędzy ciężkim przebiegiem udaru a większą aktywacją obwodowych iNKT, zwiększoną produkcją IL-10 oraz nasiloną immunosupresją, a modulowanie aktywacji komórek NKT, w szczególności w zakresie ograniczenia produkcji IL-10, może zapobiegać poudarowym infekcjom [1,128]. Inne badania przeprowadzone na zwierzętach sugerowały udział aktywowanych komórek iNKT w uszkodzeniu mózgu, stwierdzając ich akumulację w obszarze niedokrwienia, udział w zwiększeniu obszaru niedokrwienia, obrzęku mózgu czy nasileniu deficytu neurologicznego [45,55,135].

1.3.4 Aktywacja układu autonomicznego: współczulnego oraz przywspółczulnego

Udar niedokrwienny mózgu wywołujący ogólnoustrojową reakcję stresową organizmu i stymulując oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczową powoduje aktywację układu współczulnego [136]. Skutkuje to pobudzeniem receptorów adrenergicznych na komórkach efektorowych różnych narządów i uruchomieniem komórek pozostających w

obwodowych rezerwuarach, takich jak śledziona [137]. Jak wykazano w badaniach na modelach eksperymentalnych, usunięcie śledziony przed udarem bądź też jej naświetlenie w trakcie ostrego niedokrwienia, skutkowało zmniejszeniem obszaru uszkodzenia [138]. Aktywacja części współczulnej układu autonomicznego pojawiająca się na początku udaru, w dalszych etapach ustępuje miejsca mechanizmom zależnym od układu przywspółczulnego, które wspierają neuroprotekcję, poprzez m.in. zmniejszenie wydzielania TNF- α przez makrofagi [139].

Ponadto w odpowiedzi na pojawiające się pytanie o mediatora interakcji obwodowych komórek układu immunologicznego z komórkami zlokalizowanymi w obszarze uszkodzenia w ośrodkowym układzie nerwowym wysunięto koncepcję sugerującą istotną rolę układu autonomicznego. Założenie, że ostre uszkodzenie mózgu powoduje wzrost ilości uwalnianych katecholamin i kortykosteroidów, co z kolei wpływa hamująco na odpowiedź układu immunologicznego, prowadząc do większej podatności na infekcje, opierało się o dane opisujące wzrost katecholamin i kortyzolu u pacjentów z dużym ogniskiem niedokrwinnym oraz o wyniki badań eksperymentalnych, kiedy to blokada receptorów β -adrenergicznych prowadzi do normalizacji procesów immunologicznych [66]. Ponadto odnotowano korelację liczby poudarowych infekcji oraz zgonów z przedłużonymi zmianami w stężeniu wolnych metoksykatecholamin w osoczu, normetanefryny (NMN) oraz metanefryny (MN) [136]. Koncept układu współczulnego, jako inicjatora poudarowej immunosupresji został jednak podważony przez grupę badaczy, która oceniając prospektywnie chorych po ostrym naczyniopochodnym uszkodzeniu mózgu nie potwierdziła istotnej korelacji poziomu mediatorów reakcji stresowych z odpowiedzią immunologiczną i powikłaniami infekcyjnymi. Wyniki ich badania wskazywały wzrost niektórych metabolitów katecholamin i kortyzolu jedynie w przypadku dużych ognisk udarowych (niedokrwiniowych i krwotocznych), a poziom katecholamin i steroidów nie był czynnikiem rokowniczym limfocytopenii czy poudarowej infekcji w przeciwieństwie do limfocytopenii w chwili przyjęcia do szpitala, która jest istotnym, niezależnym predyktorem poudarowych zakażeń [140].

1.3.5 Infekcja związana z udarem jako poudarowa depresja układu odpornościowego

Objawiająca się limfopenią tzw. immunosupresja wywołana udarem (ang.: *stroke induced immunodepression syndrome*, SIDS) jest przyczyną zwiększonej podatności na zakażenia u osób hospitalizowanych z powodu udaru. Prawdopodobieństwo infekcji u tych

chorych wynosi 21-65% [141], z czego około 30% umrze [137], co czyni poudarowe infekcje zagadnieniem klinicznie istotnym. Zwiększona podatność na infekcje bakteryjne po udarze mózgu sugeruje, że odpowiedź immunologiczna jest u tych chorych zaburzona [1]. Z jednej strony chory po udarze jest szczególnie narażony na kontakt z patogenami infekcyjnymi poprzez unieruchomienie, konieczność cewnikowania pęcherza moczowego, nadmierną senność, osłabienie odruchów opuszkowych i zaburzenia połykania, prowadzące do częstych aspiracji [3]. Z drugiej strony pojawiająca się u tych chorych immunosupresja z limfopenią oraz zmianą proporcji limfocytów Th, tzn. przewagi Th2 nad Th1, która ma za zadanie chronić uszkodzony mózg przed wygórowaną reakcją zapalną, jednocześnie zwiększa podatność na infekcję [51]. Wynika to ze zmiany proporcji cytokin przeciwzapalnych (IL-10) do prozapalnych (TNF α), na korzyść tych pierwszych. Proporcja ta ma wartość rokowniczą w kwestii SAI [142]. Zmiany zachodzące w odpowiedzi na ostre uszkodzenie OUN dotyczą w największej mierze odpowiedzi komórkowej i oprócz limfocytów T, dotyczą też funkcji monocytów i komórek NK [137]. Odnotowano także zwiększoną aktywację komórek iNKT sugerując ich istotny udział w poudarowej immunosupresji [128]. SAI najczęściej przebiega pod postacią zakażenia układu moczowego (ZUM) oraz zapalenia płuc. Czynniki sprzyjającymi SAI są: starszy wiek, ciężki stan kliniczny przy przyjęciu, rozległa strefa udaru oraz niska liczba limfocytów CD4⁺ odnotowana na początku udaru [51]. Infekcja często wiąże się z dyselektrolitemią, hipoksją oraz gorączką, które niekorzystnie wpływają na przeżycie neuronów w obszarze *penumbry*. Ponadto gorączka może zwiększyć mózgowe zapotrzebowanie metaboliczne, przepuszczalność bariery krew-mózg oraz sprzyjać kwasicy, a żaden z tych efektów nie wpływa korzystnie na ukrwienie OUN. Bakteriemia oraz obecność lipopolisacharydów we krwi wiąże się natomiast z powikłaniami zakrzepowymi, które są konsekwencją zwiększonego uwalniania TNF- α , zmniejszonej ekspresji trombomoduliny i hamowania układu fibrynolitycznego [141]. Nadal jednak nie ustalono czy SAI jest wykładnikiem powikłanego przebiegu udaru, czy sama w sobie stanowi niezależny czynnik ryzyka pogorszenia przebiegu niedokrwienia [142].

Historia rozważań na temat roli stanu zapalnego, przewlekłej lub ostrej choroby infekcyjnej wyprzedzającej udar sięga XIX wieku [143]. Stan zapalny czy przewlekła infekcja są elementem patofizjologii miażdżycy – jednego z najważniejszych czynników ryzyka chorób naczyniowych [144,145]. Z kolei cukrzyca, otyłość czy nikotynizm, będące istotnymi czynnikami ryzyka udaru, prowadzą do immunosupresji i zwiększonej podatności na czynniki infekcyjne [143]. Powyższe powiązania, jak i te obserwowane pomiędzy

markerami stanu zapalnego (leukocytoza, CRP) a rokowaniem, sprawiły, że dziś traktujemy udar jako konsekwencję koincydencji toczącego się stanu zapalnego z predyspozycją genetyczną oraz czynnikami spustowymi prowadzącymi do epizodu niedokrwiennego w określonym momencie życia. I choć wykładniki stanu zapalnego stają się użytecznym klinicznie zwiastunem ryzyka wystąpienia epizodu naczyniowego, nadal nie mamy potwierdzonych metod przeciwdziałania udarom przy pomocy modulacji parametrów zapalnych [141,143,146-151]. Pozostaje też niejasne czy zmiany zachodzące w układzie immunologicznym wraz z pierwszymi objawami udaru niedokrwiennego powstają na podłożu już istniejących stanów zapalnych, a jeśli tak, to jaki jest mechanizm tych zmian.

2. CEL PRACY

Udar niedokrwienny mózgu jest na szczycie światowej listy chorób prowadzących do śmierci i niepełnosprawności, a dostępne metody terapii ograniczone. Z tego powodu niezwykle istotne jest poszerzanie wiedzy na temat jego przebiegu i mechanizmów z nim związanych, co przyczyni się do opracowania nowych metod prognostycznych i terapeutycznych. Dostępne obecnie dane dotyczące roli subpopulacji limfocytów T (Treg, $T\gamma\delta$, iNKT) oraz komórek NK w udarze niedokrwiennym są niezbyt liczne, a często sprzeczne. W wielu badaniach podkreśla się konieczność zgłębienia zagadnień, szczególnie w warunkach klinicznych.

Zadaniami badawczymi niniejszej pracy są:

1. Prospektywna ocena ilościowa krążących subpopulacji limfocytów T (Treg, $T\gamma\delta$, iNKT) oraz komórek NK u chorych z udarem niedokrwiennym w fazie ostrej (pierwsza [W1] i trzecia [W3] doba udaru), podostrej (dziesiąta doba udaru [W10]) oraz w fazie rekonwalescencji (dziewięćdziesiąt dni od początku udaru [W90]) w odniesieniu do grupy kontrolnej, dobranej pod względem proporcji płci, wieku i czynników ryzyka
2. Odniesienie ewentualnych zmian ilościowych w badanych populacjach komórkowych do stanu klinicznego chorych ze szczególnym uwzględnieniem infekcji związanej z udarem (SAI)
3. Porównanie liczby krążących subpopulacji limfocytów T (Treg, $T\gamma\delta$, iNKT) oraz komórek NK w grupie chorych poddanych trombolizie i leczonych zachowawczo

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Kryteria kwalifikacji do badania

Do badania włączano osoby, które wyraziły świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniu. Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr: 139/2018).

3.1.1. Grupa chorych

Do badania włączano kolejnych chorych hospitalizowanych z powodu udaru mózgu w Klinice Neurologii i Chorób Naczyniowych Układu Nerwowego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, którzy spełniali następujące kryteria włączenia:

1. udar niedokrwienny mózgu, w znanym mechanizmie, potwierdzony w badaniu tomografii komputerowej (TK) i/lub rezonansu magnetycznego (MR) głowy
2. czas od wystąpienia objawów do włączenia do badania: 24h
3. wiek: 40 lat lub więcej

Typ udaru określano zgodnie z klasyfikacją Adamsa, znaną pod nazwą TOAST (*Trial of ORG 10172 in acute stroke treatment*) (tabela 3) Do badania włączano chorych, u których prawdopodobną przyczyną udaru była miażdżycza dużych naczyń, choroba małych naczyń, zator kardiogeny lub inna zidentyfikowana etiologia (TOAST 1, 2, 3 i 4).

Tabela 3. Etiologiczna klasyfikacja udaru mózgu TOAST

1. Choroba dużych naczyń (<i>large vessel disease, LVD</i>) - potwierdzone w badaniu ultrasonograficznym lub angiograficznym zwężenie powyżej 50% tętnicy wewnątrz lub zewnątrzczaszkowej zaopatrującej obszar mózgu, z którego pochodzą objawy udaru - obecność ogniska niedokrwiennego o średnicy powyżej 1,5 cm w badaniach neuroobrazowych (tomografia komputerowa, tomografia rezonansu magnetycznego) - wykluczona zatorowość pochodzenia sercowego - obecność chromania przestankowego, przemijających ataków niedokrwienych (TIA), szmeru nad tętnicą szyjną bądź osłabienie tętna na tętnicy szyjnej
2. Choroba małych naczyń - udar zatokowy (<i>small vessel disease, SVD</i>) - objawy kliniczne udaru zatokowego- brak ogniska niedokrwiennego lub ognisko o średnicy <1,5cm w badaniach neuroobrazowych (tomografia komputerowa, tomografia rezonansu magnetycznego) - wykluczone inne przyczyny udaru
3. Udar sercowo-zatorowy (<i>cardioembolic, CE</i>) - obecność co najmniej jednego źródła zatorowości w sercu - wykluczona choroba dużych naczyń
4. Udar o innej etiologii (<i>other etiology, OE</i>) - obecność rzadkiej przyczyny udaru (np. zapalenie naczyń, koagulopatia) - wykluczona choroba dużych naczyń i udar sercowo-zatorowy
5. Udar o nieustalonej etiologii (<i>undetermined etiology, UE</i>) - dwie lub więcej prawdopodobne przyczyny udaru - brak przyczyny udaru mimo wykonania badań diagnostycznych - niepełny komplet badań

Kryteria wykluczające udział w badaniu:

1. krwotok podpajęczynówkowy i krwotok śródmózgowy
2. udar niedokrwienno o nieustalonej etiologii [wg klasyfikacji TOAST]
3. aktywny proces nowotworowy lub wyleczona choroba nowotworowa w ciągu 5 lat poprzedzających badanie
4. choroby autoimmunologiczne (poza niedoczynnością tarczycy)
5. choroby serca (ostry incydent wieńcowy świeży lub w ciągu roku poprzedzającego badanie, poważna wada zastawkowa)
6. niewydolność wątroby, ciężka niewydolność nerek (GFR <30 ml/min)
7. zaburzenia hematologiczne (białaczka, polycytomia, nieprawidłowa liczba płytek)
8. choroba wrzodowa żołądka/dwunastnicy uniemożliwiająca przyjmowanie kwasu acetylosalicylowego (ASA)
9. choroba alkoholowa, nadużywanie leków
10. prewencja chorób naczyniowych za pomocą leków przeciwplatektywnych innych niż ASA

3.1.2. Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiły osoby z czynnikami ryzyka chorób naczyniowych leczone na Oddziale Wewnętrznym SPZOZ MSWiA im. Ludwika Bierkowskiego w Poznaniu, spełniające poniższe kryteria włączenia i nie podlegające poniższym kryteriom wykluczającym:

Kryteria włączenia:

1. wiek: 40 lat lub więcej
2. brak w wywiadzie ostrego incydentu naczyniowego (udar mózgu, zawału serca, incydentu obwodowej niedrożności tętnic)
3. obecność co najmniej dwóch czynników ryzyka chorób naczyniowych spośród następujących:
 - nadciśnienie tętnicze
 - hipercholesterolemia
 - cukrzyca typu 2
 - otyłość
 - palenie tytoniu
4. przyjmowanie preparatu ASA w dawce minimalnej 75 mg/d w ramach profilaktyki pierwotnej chorób sercowo-naczyniowych przewlekłe przed hospitalizacją

Kryteria wyłączenia:

- ostra choroba niedokrwienna serca, kardiomiopatia, wady zastawkowe
- aktywny stan zapalny
- choroba nowotworowa
- choroba autoimmunologiczna
- niewydolność wątroby/nerek
- zaburzenia hematologiczne
- uzależnienie od alkoholu i/lub leków
- uczulenie na preparaty ASA
- czynna choroba przewodu pokarmowego
- przewlekłe stosowanie NLPZ
- stosowanie innych niż preparaty ASA leków antyagregacyjnych

3.2 Metody badawcze

Protokół badania obejmował badanie podmiotowe, przedmiotowe oraz badania dodatkowe uwzględniające ocenę wybranych parametrów laboratoryjnych oraz istotnych badań dodatkowych. Poszczególne badania odbywały się w punktach czasowych określanych następująco:

W1- pierwsza doba udaru, faza ostra

W3- trzecia doba udaru, faza ostra

W10- dziesiąta doba udaru lub wypis ze szpitala, faza podostra

W90- dziewięćdziesiąta doba po udarze (± 10 dni), faza rekonwalescencji

Tabela 4. Wykaz procedur badawczych w poszczególnych punktach czasowych

Procedura badawcza	Czas od udaru			
	W1	W3	W10	W90
wywiad chorobowy, stosowane dotychczas leki	x			
aktualne leczenie	x	x	x	x
badanie neurologiczne	x	x	x	x
klasyfikacja udaru (TOAST, OCSP)	x			
skala NIHSS	x	x	x	x
skala SSS	x	x	x	x
skala mRankin	x	x	x	x
masa ciała, wzrost	x			x
parametry życiowe	x	x	x	x
EKG (12-odprowadzeniowe)	x	x		
morfologia krwi z rozmazem	x	x	x	x
biochemia	x			x
CRP	x	x	x	x
badanie moczu	x	x	x	
ocena SAI	x	x	x	
cytometria przepływowa	x	x	x	x

3.2.1 Ocena kliniczna

3.2.1.1 Badanie podmiotowe i przedmiotowe

Badanie podmiotowe dotyczyło:

- diagnozy udaru mózgu
- danych demograficznych (wiek, płeć),
- czasu od wystąpienia objawów do przyjęcia pacjenta do szpitala
- wywiadu chorobowego pod kątem czynników ryzyka chorób naczyniowych takich jak: cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, choroba niedokrwienna serca, migotanie przedsionków, inne zaburzenia rytmu serca, hipercholesterolemia, otyłość, nikotynizm
- leczenia przed i w trakcie hospitalizacji

Badanie przedmiotowe obejmowało:

- standardowe badanie internistyczne oraz neurologiczne
- pomiar temperatury ciała
- pomiar wzrostu i masy ciała celem określenia BMI
- pomiar ciśnienia tętniczego i tętna
- ocenę kliniczną wg skali oceny deficytów neurologicznych: NIHSS (*National Institutes of Health Stroke Scale*) - tabela 5
- ocenę kliniczną wg Skandynawskiej Skali Udaru (*Scandinavian Stroke Scale, SSS*) - tabela 6
- ocenę stopnia niesprawności ruchowej wg zmodyfikowanej skali Rankin (mRankin, mRS) - tabela 7

Tabela 5. Skala oceny deficytów neurologicznych NIHSS

1a. Poziom przytomności	0= przytomny 1= podsypiający, wybudza się przy niewielkiej stymulacji 2= nieprzytomny, wymaga wielokrotnej stymulacji 3= brak reakcji na bodźce
1b. Odpowiedź na pytanie odnośnie imienia i miesiąca	0= obie odpowiedzi prawidłowe 1= jedna odpowiedź prawidłowa 2= obie odpowiedzi nieprawidłowe
1c. Spełnianie poleceń	0= oba polecenia wykonane prawidłowo 1=jedno polecenie wykonane prawidłowo 2= chory nie spełnia żadnego polecenia
2. Ruchomość gałek ocznych	0= prawidłowa 1= częściowe porażenia (zbaczanie gałek ocznych) 2= przymusowe ustawienie lub całkowite porażenie
3. Pole widzenia	0= bez zaburzeń 1= częściowe niedowidzenie połowiczne 2= całkowite niedowidzenie połowiczne 3= obustronne niedowidzenie połowiczne
4. Porażenie nerwu twarzowego	0= prawidłowe, symetryczne ruchy 1= nieznaczny niedowład (<i>spłaszczony fałd nosowo-wargowy</i>) 2=częściowe porażenie (całkowite lub prawie całkowite porażenie dolnej części twarzy) 3= całkowite porażenie jedno- lub obustronne (dolnej i górnej części twarzy)
5. Siła mięśniowa kończyn górnych	0= nie opada, chory utrzymuje kończynę pod kątem 90/45 °przez 10s 1= opada, chory utrzymuje kończynę pod kątem 90/45 ° krócej niż 10s 2= częściowy ruch przeciwko sile ciężkości 3= brak ruchu przeciwko sile ciężkości 4= brak ruchu 9= amputacja, blok w stawie
6. Siła mięśniowa kończyn dolnych	0= nie opada, chory utrzymuje kończynę pod kątem 30°przez 5s 1= opada powoli przed upływem 5s 2= szybko opada powoli przed upływem 5s, zachowany opór przeciwko sile ciężkości 3= opada natychmiast, ślad ruchu 4= brak ruchu 9= amputacja, blok w stawie
7. Ataksja kończyn	0= nieobecna 1= obecna w jednej kończynie 2=obecna w obu kończynach (górnej i dolnej) 3= amputacja lub blok w stawie
8. Czucie	0= prawidłowe 1= łagodna lub umiarkowana utrata czucia 2=ciężka lub całkowita utrata czucia
9. Mowa	0= brak afazji, mowa prawidłowa 1= afazja łagodna lub umiarkowana 2= afazja dużego stopnia 3= niemy, całkowita afazja
10. Dyzartria	0=brak 1= łagodna lub umiarkowana 2=ciężka 9= chory zaintubowany lub inna bariera fizyczna
11. Reakcja na bodźce zewnętrzne (zespół zaniedbywania połowicznego)	0= prawidłowa 1= połowiczny brak rozróżnienia bodźca jednego rodzaju (czucia, słuchu, wzroku) 2= połowiczny brak rozróżnienia więcej niż jednego bodźca

Zaadaptowano z: Lyden P., Brott T., Tilley B. i wsp.: Improved reliability of the NIH Stroke Scale using video training. NINDS TPA Stroke Study Group. Stroke 1994; 25: 2220–2226. Copyright © 1994, American Heart Association, Inc.

Tabela 6. Skandynawska Skala Udaru SSS

Punktacja prognostyczna	
1. Świadomość	
-pełna	6 pkt
-podsypiający, jest w stanie powrócić do pełnej świadomości	4
-reaguje na polecenia, ale nie w pełni przytomny	2
2. Ustawienie gałek ocznych	
- prawidłowe	4
-niedowład	2
-zbaczenie	0
3. Siła mięśniowa kończyny górnej	
-unosí kończynę z prawidłową siłą	6
-unosí kończynę z obniżoną siłą	5
-unosí kończynę poprzez zgięcie w stawie łokciowym	4
-porusza kończyną, ale niezdolny do pokonania siły ciężkości	2
-bezwład	0
4. Siła mięśniowa kończyny dolnej	
-unosí kończynę z prawidłową siłą	6
-unosí kończynę z obniżoną siłą	5
-unosí kończynę poprzez zgięcie w stawie kolanowym	4
-porusza kończyną, ale niezdolny do pokonania siły ciężkości	2
-bezwład	0
Punktacja długoterminowa	
1. Siła mięśniowa kończyny górnej- jak w punktacji prognostycznej	
2. Siła ręki	
-pełna	6
-obniżona, lecz ruchomość pełna	4
- porusza, lecz nie zaciska w pięść	2
-bezwład	0
3. Siła mięśniowa kończyny dolnej- jak w punktacji prognostycznej	
4. Orientacja	
-poprawna dla czasu, miejsca, osób	6
-dwa z powyższych	4
-jeden z powyższych	2
-dezorientacja	0
5. Mowa	
-bez afazji	10
-ograniczone słownictwo albo niespójna mowa	6
-więcej niż tak/nie, ale bez dłuższych wypowiedzi	3
-tylko tak/nie, albo wcale	0
6. Porażenie nerwu twarzowego	
-bez/wątpliwe	2
-obecne	0
7. Chód	
-chód na dystansie 5m bez pomocy	12
-chód z pomocą sprzętu asekuracyjnego	9
-chód z pomocą drugiej osoby	6
-siedzi bez podparcia	3
-leży/porusza się w wózku inwalidzkim	0

Tabela 7. Zmodyfikowana skala Rankin

0	Brak objawów
1	Brak znaczącej niepełnosprawności mimo objawów. Pacjent wykonuje wszystkie, typowe dla siebie aktywności i obowiązki
2	Niewielka niepełnosprawność. Pacjent nie wykonuje wszystkich typowych dla siebie aktywności, ale może zająć się swoimi sprawami bez pomocy
3	Umiarkowana niepełnosprawność. Pacjent wymaga pomocy, ale chodzi samodzielnie
4	Umiarkowana ciężka niepełnosprawność. Pacjent nie chodzi samodzielnie i wymaga pomocy w czynnościach dnia codziennego,
5	Ciężka niepełnosprawność. Pacjent leżący, nie trzyma moczu i stolca, wymaga ciągłej opieki i nadzoru

W grupie kontrolnej uzyskano informacje na temat danych demograficznych, wywiadu chorobowego dotyczącego czynników ryzyka chorób naczyniowych (cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, choroba niedokrwienna serca, migotanie przedsionków, inne zaburzenia rytmu serca, hipercholesterolemia, otyłość, nikotynizm) oraz przyjmowanych przed hospitalizacją leków, ze szczególnym uwzględnieniem leków przeciwplatek: kwas acetylosalicylowy, kłopidogrel, leków przeciwkrzepliwych: antagonistów witaminy K i tzw. nowych doustnych leków antykoagulacyjnych (NOAC), leków hipotensyjnych (beta-blokerów, blokerów wapnia, ACE-inhibitorów, sartanów, diuretyków) statyn, niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), doustnych leków przeciwcukrzycowych i insuliny; danych dotyczących masy ciała i wzrostu, celem określenia BMI.

3.2.1.2 Badania laboratoryjne

Każdy chory przyjęty do szpitala z objawami udaru miał wykonane rutynowe badania laboratoryjne. Pobranie krwi miało miejsce na wizytach W1, W3, W10 i W90. Ocena parametrów laboratoryjnych w 1. 3. 10. i 90. dobie od udaru obejmowała: morfologię krwi z rozmazem oraz stężenie w surowicy białka C-reaktywnego (CRP). Badania biochemiczne (glikemia, stężenie kreatyniny, enzymów wątrobowych (AspAT, ALAT) lipidogram (cholesterol całkowity, LDL, HDL, TAG), przeprowadzono zgodnie z harmonogramem (tabela 4) . Pobranie krwi w 90-tej dobie od udaru były przeprowadzone podczas kontrolnej, ambulatoryjnej wizyty chorego w szpitalu (W90). W grupie kontrolnej pobranie krwi wykonywano jednorazowo. Analizy badań przeprowadzone były w zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej SPZOZ MSWiA w Poznaniu.

3.2.2 Ocena kliniczna SAI

Każdy pacjent był obserwowany pod kątem SAI, którą definiowano jako:

- temperatura $>37.8^{\circ}\text{C}$ u chorego z objawami sugerującymi infekcję i/lub
- liczba leukocytów w krwi obwodowej (WBC) $>11,000/\text{mL}$ lub $<4,000/\text{mL}$ lub zmiany zapalne w rentgenogramie (rtg) klatki piersiowej i/lub
- posiew krwi lub moczu wskazujący na obecność drobnoustrojów i/lub
- terapia antybiotykiem lub chemioterapeutyką w ciągu 10 dni od początku objawów udaru

W tym celu monitorowano wykładniki stanu zapalnego: ciepłotę ciała, morfologię krwi z rozmazem, CRP, badanie ogólne moczu (Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej SPZOZ MSWiA w Poznaniu) i wykonano rtg klatki piersiowej (Oddział Diagnostyki Obrazowej SPZOZ MSWiA w Poznaniu). U części pacjentów wykonano posiew krwi lub moczu (Pracownia Diagnostyki Mikrobiologicznej Wielkopolskiego Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Poznaniu).

3.2.3 Analiza cytometryczna subpopulacji limfocytów i komórek NK

Do oceny ilościowej subpopulacji limfocytów CD4^{+} , CD8^{+} , Treg, $\text{T}\gamma\delta$, iNKT i komórek NK wykorzystano metodę cytometrii przepływowej krwi obwodowej (ang.: *fluorescence activated cell sorting*, FACS). Metoda ta umożliwia ocenę składu procentowego leukocytów zawierających określone antygeny, przeciwko którym użyto odpowiednie przeciwciała. Właściwy dobór przeciwciał pozwala różnicować leukocyty na subpopulacje.

Badania przeprowadzono we współpracy z Katedrą Patomorfologii i Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (kierownik: prof. dr hab. n. med. Grzegorz Dworacki).

3.2.3.1. Pobranie krwi

Badanie cytometryczne wykonano w badanej grupie chorych czterokrotnie, tj. w 1., 3., 10. i 90-tej dobie po udarze i jednokrotnie w grupie kontrolnej. Krew żylną pobierano na czczo, z żyły odłokciowej, w ilości 4 ml, bezpośrednio do probówki BD Vacutainer® (Becton Dickinson, USA) zawierającej antykoagulant K2EDTA (sól dwupotasową kwasu etylenodiaminotetraoctowego) w stężeniu 1,8 mg/ml krwi pełnej. Próby krwi dostarczano do

laboratorium cytometrycznego nie później niż w ciągu 1 godziny od pobrania materiału biologicznego. Procedura znakowania była przeprowadzona w ciągu 4 godzin od pobrania krwi.

Charakterystykę użytych przeciwciał zestawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Charakterystyka przeciwciał użytych do oceny cytometrycznej

Antygen różnicowania	Fluorochrom	Klon	Numer katalogowy	Producent
CD3	APC-Cy7	UCHT1	300426	BioLegend®, USA
CD4	PE/Cy7	SK3	344612	BioLegend®, USA
CD8	PerCP	SK1	344708	BioLegend®, USA
CD25	PerCP	MEM-181	A15802	ThermoFisher Scientific®, USA
FoxP3	PE	150D	320008	BioLegend®, USA
CD127 (IL-7Rα)	FITC	A019D5	351312	BioLegend®, USA
Helios	APC	22F6	137222	BioLegend®, USA
TCRγδ	APC	B1	555718	BD Biosciences®, USA
TCR Vδ1	FITC	TS8.2	TCR2730	ThermoFisher Scientific®, USA
TCR Vδ2	PE	B6	331408	BioLegend®, USA
Vα24-Jα18 (iNKT)	APC	6B11	342908	BioLegend®, USA
CD56	PerCP	A019D5	351312	BioLegend®, USA

3.2.3.2 Znakowanie próbek krwi z wykorzystaniem reakcji antygen-przeciwciało - barwienie powierzchniowe

Do oceny populacji subpopulacji limfocytów CD4⁺, CD8⁺, Tγδ, iNKT i komórek NK metodą cytometrii przepływowej wykorzystano metodę barwienia powierzchniowego.

Na dno probówek cytometrycznych dodawano po 5 µl przeciwciał wiążących się z odpowiednim antygenem powierzchniowym limfocytów i 100 µl krwi obwodowej. Całość delikatnie mieszano, a następnie inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej,

chroniąc przed dostępem światła. Po upływie tego czasu dodawano 1 ml buforu lizującego (FACS lysing solution, Becton Dickinson, USA) i inkubowano przez 10 minut bez dostępu światła. Bufor lizujący poza lizą erytrocytów utrwala komórki oraz połączenie antygen-przeciwciała. Po zakończeniu inkubacji, komórki płukano i wirowano dwukrotnie w buforze PBS (Roche Diagnostics) przez 5 minut przy 1500 obrotach na minutę, w temperaturze 4°C, każdorazowo usuwając supernatant. Charakterystykę zastosowanych przeciwciał i ich zestawy przedstawiono w tabelach 9 i 11. Akwizycję komórek przeprowadzano przy pomocy cytometru FACS Canto (BD Biosciences, USA). W celu analizy poszczególnych subpopulacji komórek akwizycji poddawano 10000 zdarzeń

3.2.3.3 Znakowanie prób krwi z wykorzystaniem reakcji antygen-przeciwciała - barwienie cytoplazmatyczne

Do oceny subpopulacji limfocytów Treg wykorzystano metodę barwienia cytoplazmatycznego.

Na dno probówek cytometrycznych dodawano po 4 µl przeciwciał: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD25 i 100 µl krwi pełnej. Inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Po upływie tego czasu dodawano 1 ml bufora lizującego (FACS lysing solution, Becton Dickinson, USA) w rozcieńczeniu 1:10 i inkubowano 10 minut chroniąc przed dostępem światła. Następnie dodawano bufor PBS (Roche Diagnostics, Niemcy) rozcieńczony 1:10 i wirowano przez 4 minuty przy prędkości 1500 obrotów/minutę, w temperaturze 4°C. Supernatant usuwano, osad komórkowy rozbijano, a następnie dodawano 1ml saponiny (BD Biosciences, USA) rozcieńczonej 1:10 w celu permeabilizacji błony komórkowej i inkubowano 1 godzinę na lodzie. Po upływie tego czasu mieszaninę wirowano, usuwano supernatant i przystępowano do barwienia wewnątrzkomórkowych czynników transkrypcyjnych Helios i FoxP3 dodając do osadu komórkowego po 4 µl odpowiedniego przeciwciała monoklonalnego. Mieszaninę komórek z przeciwciałami inkubowano 1 godzinę na lodzie bez dostępu światła. Po upływie godziny komórki płukano, dodając 2 ml rozcieńczonej saponiny i wirowano przez 4 minuty przy prędkości 1500 obrotów/minutę, w temperaturze 4°C, a następnie usuwano supernatant i rozbijano osad komórkowy. Akwizycję przeprowadzano przy użyciu aparatu FACS Canto (BD Biosciences, USA) analizując 30 000 zdarzeń.

Tabela 9. Charakterystyka zastosowanych odczynników

Odczynnik	Numer katalogowy	Producent
FACS lysing solution, 10X Concentrate	349202	Becton Dickinson, USA
Premixed PBS Buffer, 10x	11666789001	ROCHE Diagnostic, Niemcy
Saponina	51-2091KZ	BD Biosciences, USA

3.2.3.4 Analiza danych

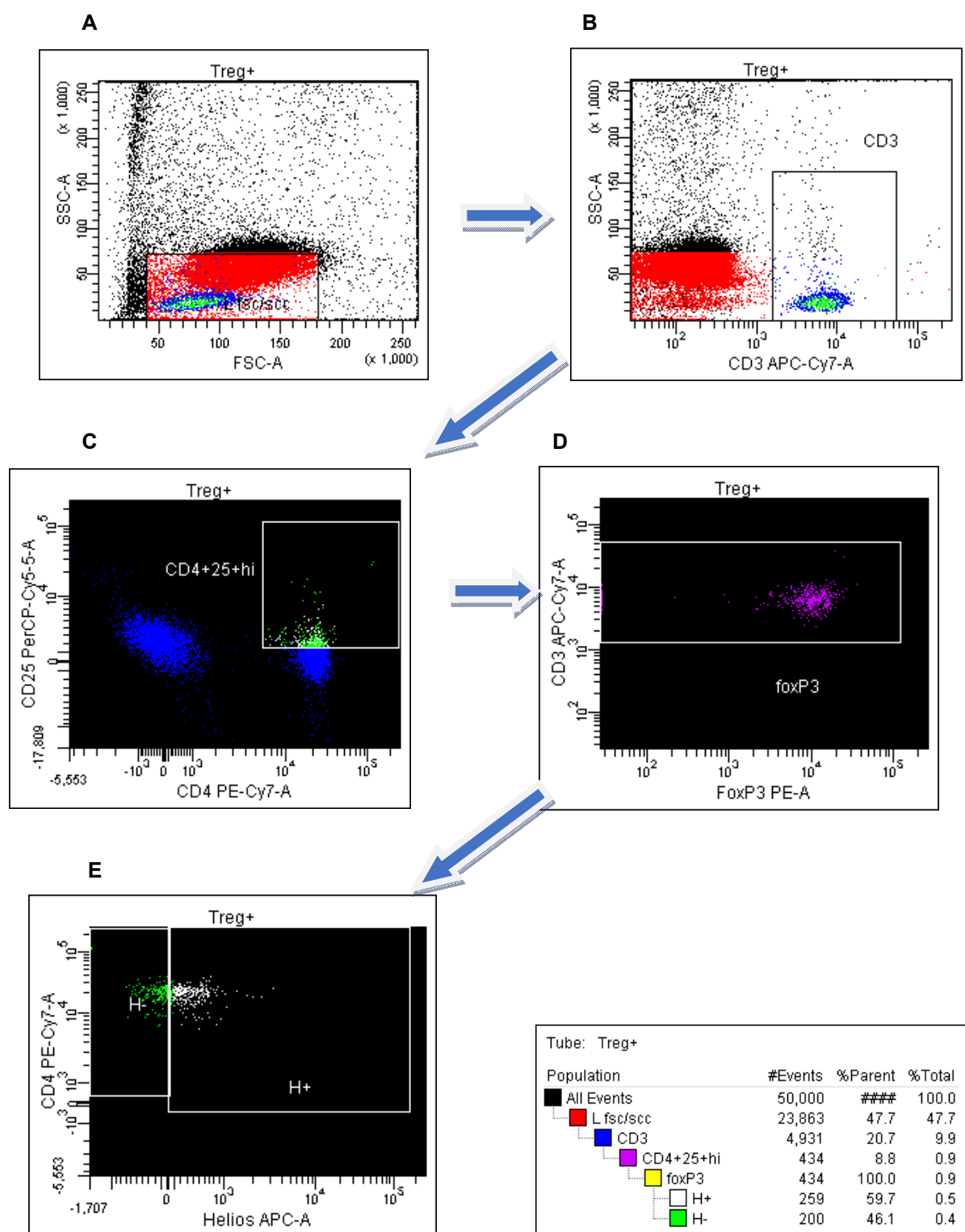
Do analizy danych wykorzystywano oprogramowanie FACS Diva (BD Biosciences, USA). Populacja limfocytów była bramkowana na podstawie rozprożeń światła w układzie FSC/SSC (*forward scatter/side scatter*) oraz w oparciu o obecną ekspresję CD3 (limfocyty T pomocnicze CD4⁺ [Th], limfocyty T cytotoksyczne CD8⁺ [Tc], limfocyty T regulatorowe [Treg], limfocyty T $\gamma\delta$, lub jej brak (limfocyty iNKT, komórki NK) oraz obecną ekspresję CD56 (komórki NK). Poszczególne subpopulacje limfocytów bramkowano z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciw typowym dla danej subpopulacji antygenom znacznikowym, co przedstawiają ryciny 1-5. W tabeli 11 przedstawiono badane populacje komórek oraz sposób ich identyfikacji za pomocą zestawu przeciwciał. W celu prawidłowego skompensowania nakładających się widm emisji fluorescencji poszczególnych fluorochromów przy znakowaniu wielokolorowym zastosowano technikę FMO (ang.: *fluorescence-minus-one*), w której próby kontrolne były znakowane wszystkimi przeciwciałami obecnymi w panelu oprócz jednego. Pusty kanał stanowił kontrolę dla próby znakowanej wszystkimi przeciwciałami panelu, sprzężonymi z fluorochromami.

Tabela 10. Populacje badanych komórek oraz sposób ich identyfikacji

Populacja	Markery komórek
Leukocyty	CD45 ⁺
Limfocyty T	CD3 ⁺
Limfocyty Tc	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺
Limfocyty Th	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻
Limfocyty Treg	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺
Limfocyty Treg Helios ^{+/-}	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Helios [±]
Limfocyty Tγδ	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻
Limfocyty Tγδ Vδ1	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻ Vδ1 ⁺
Limfocyty Tγδ Vδ2	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻ Vδ2 ⁺
Limfocyty iNKT	CD3 ⁺ CD56 ⁺ Vα24 ⁺
Komórki NK	CD3 ⁻ CD56 ⁺

Limfocyty T regulatorowe

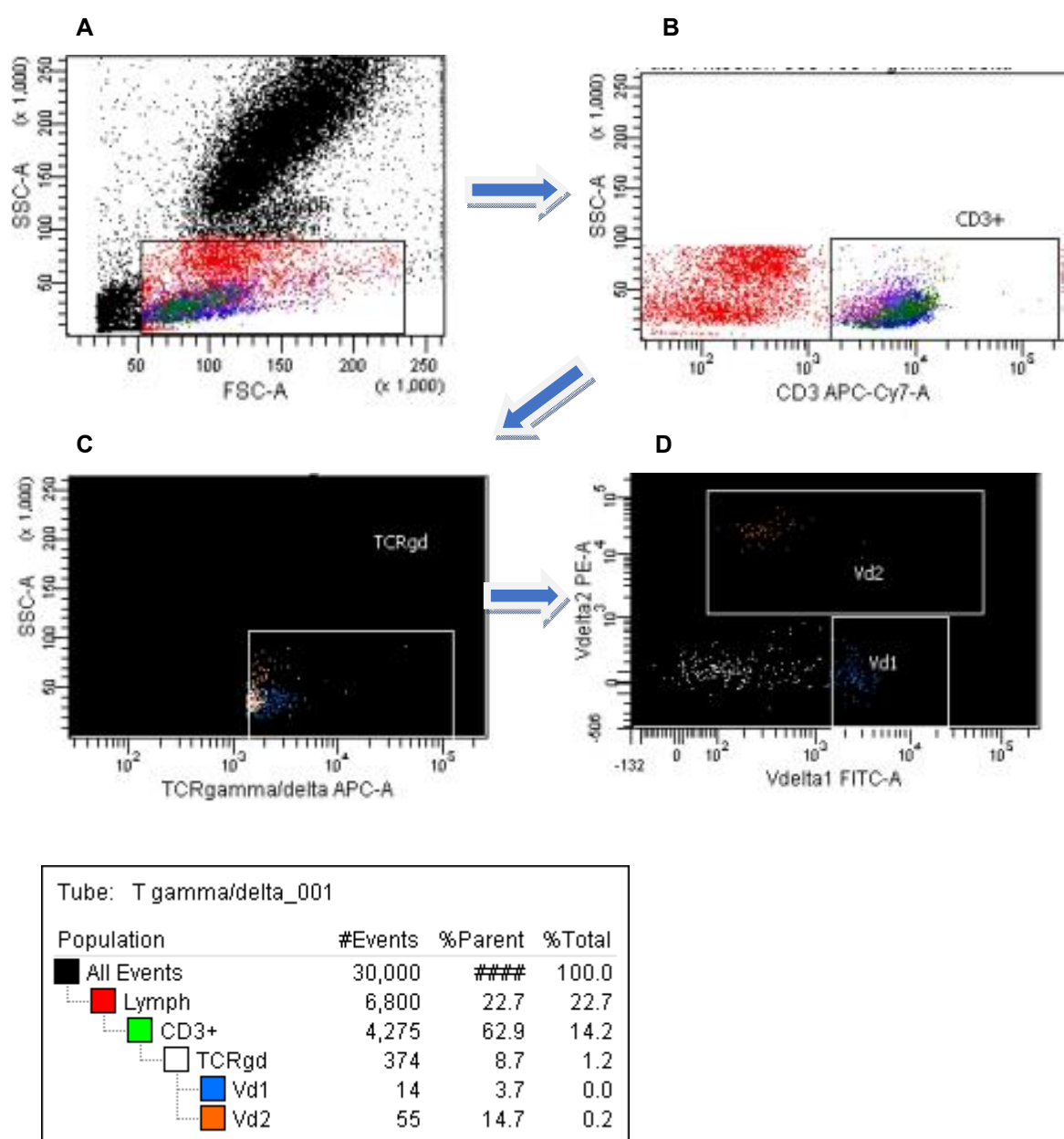
Limfocyty identyfikowano w układzie FSC/SSC oraz w oparciu o ekspresję CD3. Limfocyty Treg definiowano na podstawie ekspresji CD4/CD25/FoxP3 i określano ich odsetek względem populacji limfocytów CD3⁺ (rycina 1).



Rycina 1. Przykład oceny odsetka limfocytów Treg. A. limfocyty w układzie FSC/SSC, B. identyfikacja populacji limfocytów w oparciu o ekspresję CD3, C. limfocyty w oparciu o ekspresję CD4⁺25⁺high, D. limfocyty w oparciu o ekspresję FoxP3, E. limfocyty w oparciu o ekspresję Helios

Limfocyty T $\gamma\delta$

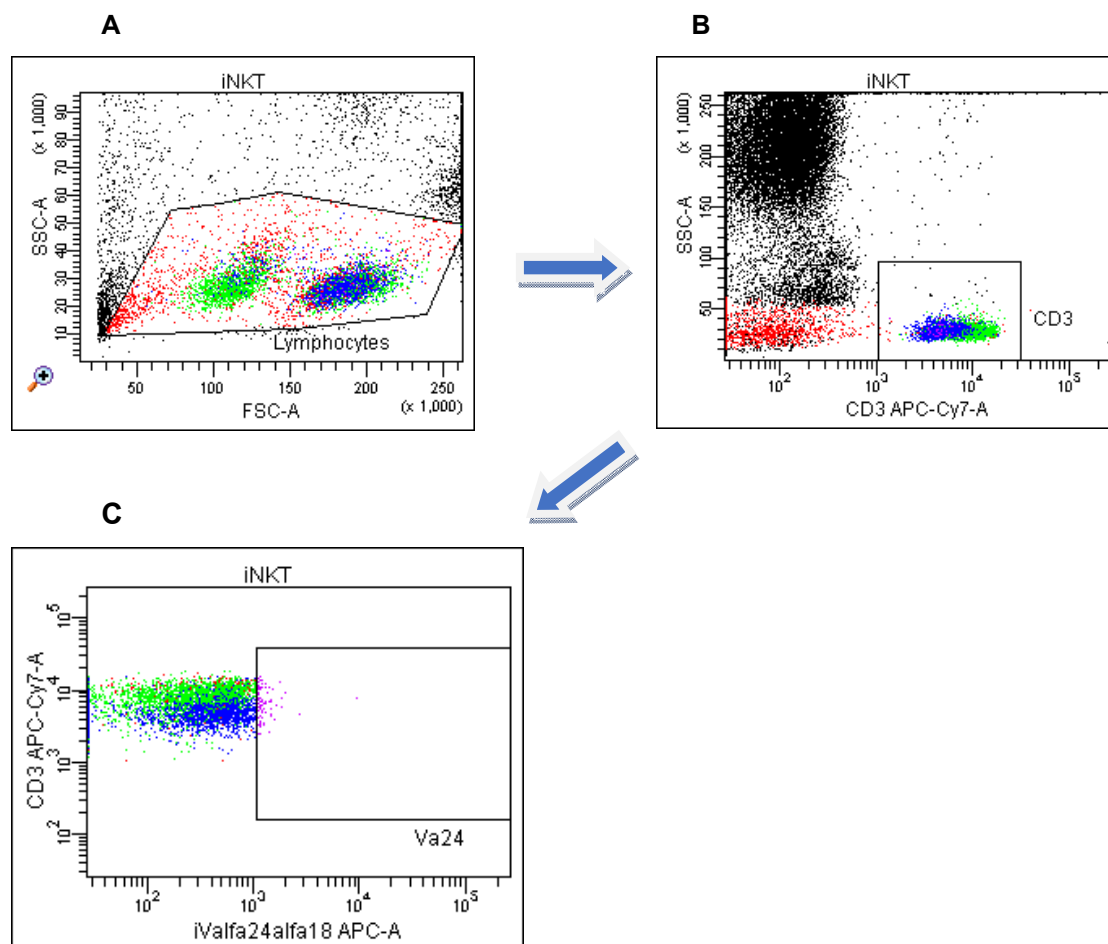
Limfocyty identyfikowano w układzie FSC/SSC oraz w oparciu o ekspresję CD3. Limfocyty T $\gamma\delta$ definiowano na podstawie ekspresji CD3/TCR $\gamma\delta$, a podtypy V δ 1 lub V δ 2 definiowano uwzględniając koekspresję odpowiednich fragmentów łańcucha δ . Odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ określano względem populacji limfocytów CD3⁺, a odsetek subpopulacji V δ 1 i V δ 2 względem limfocytów T $\gamma\delta$. Rycina 2 przedstawia przykład oceny odsetka komórek TCR $\gamma\delta$.



Rycina 2. Przykład oceny odsetka limfocytów T $\gamma\delta$. A. limfocyty w układzie FSC/SSC, B. identyfikacja populacji limfocytów w oparciu o ekspresję CD3, C. limfocyty z TCR $\gamma\delta$, D. limfocyty T $\gamma\delta$: V δ 1 i V δ 2

Limfocyty iNKT

Limfocyty identyfikowano w układzie FSC/SSC oraz w oparciu o ekspresję CD3. Limfocyty iNKT definiowano na podstawie koekspresji $CD3^+/CD56^+/V\alpha24^+$. Odsetek limfocytów iNKT określano względem populacji limfocytów $CD3^+$ (rycina 3).

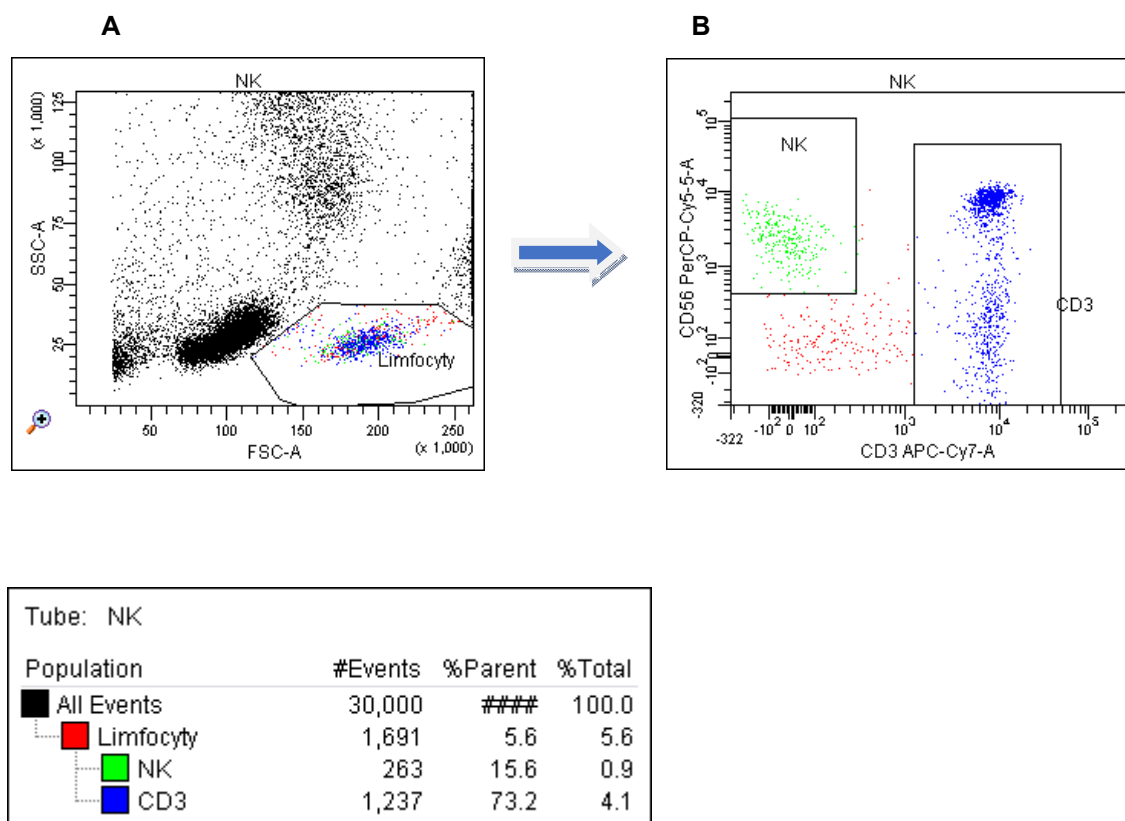


Tube: iNKT			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	30,000	###	100.0
Lymphocytes	5,524	18.4	18.4
CD3	3,404	61.6	11.3
CD4	2,201	64.7	7.3
CD8	1,082	31.8	3.6
Va24	44	1.3	0.1

Rycina 3. Przykład oceny odsetka limfocytów iNKT. A. limfocyty w układzie FSC/SSC, B. identyfikacja populacji limfocytów w oparciu o ekspresję CD3, C. limfocyty Va24

Komórki NK

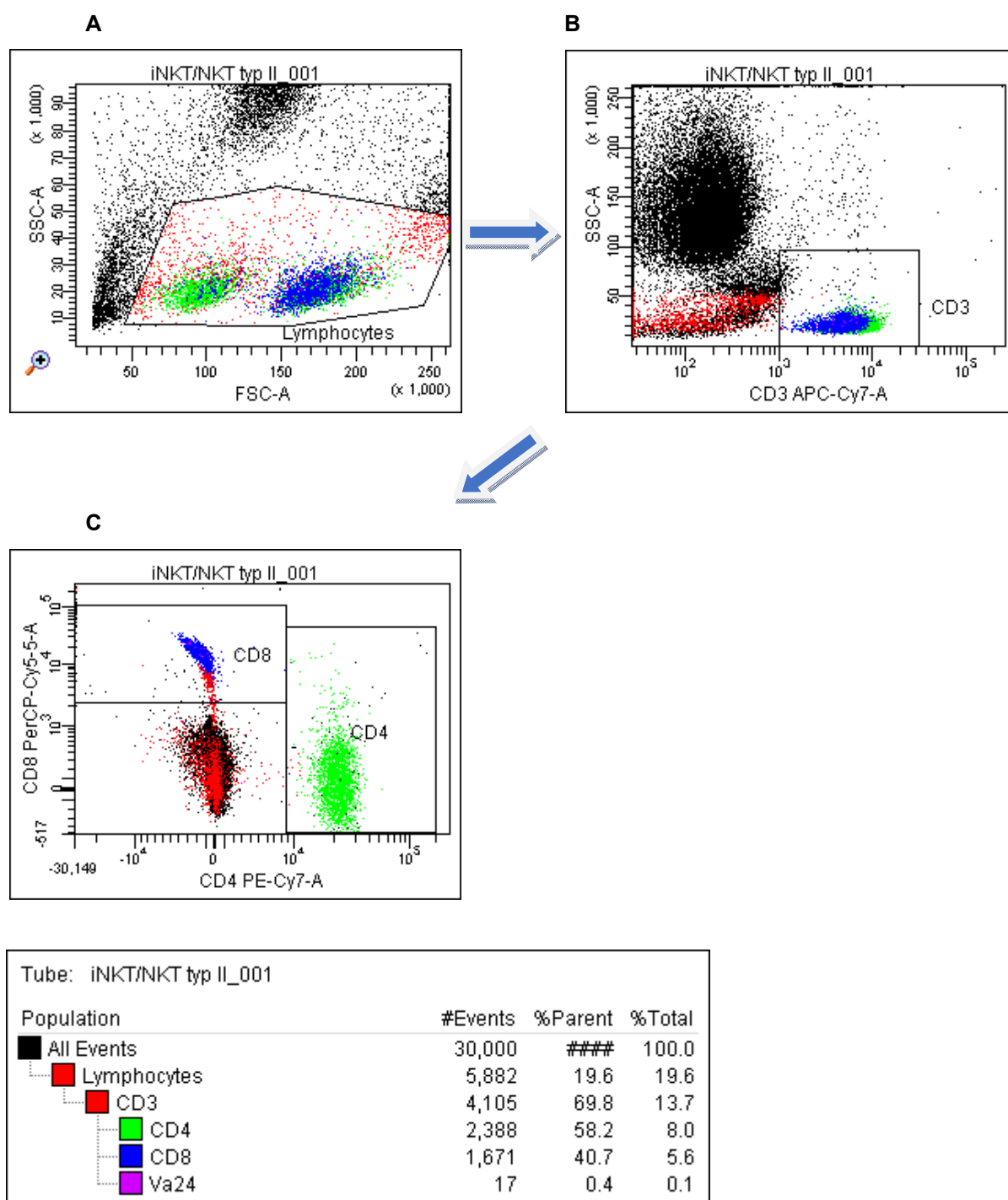
Komórki NK identyfikowano w układzie FSC/SSC oraz w oparciu o brak ekspresji CD3 oraz ekspresję CD56 (rycina 4).



Rycina 4. Przykład oceny odsetka komórek NK. A. limfocyty w układzie FSC/SSC, B. identyfikacja populacji komórek NK w oparciu o brak ekspresji CD3

Limfocyty $CD4^+$ i $CD8^+$

Limfocyty identyfikowano w układzie FSC/SSC oraz w oparciu o ekspresję CD3 (rycina 5). Limfocyty T pomocnicze (Th) $CD4^+$ definiowano na podstawie koekspresji $CD3^+/CD4^+/CD8^-$, a limfocyty T cytotoksyczne (Tc) – na podstawie koekspresji $CD3^+/CD4^-/CD8^+$. Odsetek limfocytów $CD4^+$ lub $CD8^+$ określano względem populacji limfocytów $CD3^+$.



Rycina 5. Przykład oceny odsetka limfocytów $CD4^+/CD8^+$. A. limfocyty w układzie FSC/SSC, B. identyfikacja populacji limfocytów w oparciu o ekspresję CD3, C. limfocyty $CD4^+$ i $CD8^+$

Wartości bezwzględne (kom/ μ l) badanych populacji wyliczono na podstawie odsetka wynikającego z analizy cytometrycznej w odniesieniu do liczby limfocytów ocenionej w automatycznej analizie laboratoryjnej morfologii krwi obwodowej pobranej jednocześnie.

3.3 Analiza statystyczna

Dane ilościowe wyrażone w skali interwałowej przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej $\pm$ odchylenie standardowe (SD) oraz mediany z zakresem międzykwartylowym (kwartyl dolny-kwartyl górny). Dla danych jakościowych wyrażonych w skali porządkowej i skali nominalnej podano liczebność badanej cechy (n) w analizowanym materiale wraz z zapisem procentowym (%), natomiast dla danych w skali porządkowej wyznaczono także medianę i kwartyle.

Zgodność z rozkładem normalnym zmiennych na skali interwałowej badano testem Shapiro-Wilka. Porównanie zmiennych między dwoma grupami wykonano za pomocą testów parametrycznych i nieparametrycznych. Do porównania dwóch niezależnych grup użyto odpowiednio testu t studenta lub testu Manna-Whitneya. W przypadku porównania dwóch grup zależnych stosowano odpowiednio test t studenta lub test Wilcoxon. Porównania wielokrotne między zmiennymi zależnymi przeprowadzono odpowiednio testem nieparametrycznym porównań wielokrotnych ANOVA Friedmanna lub testem nieparametrycznym kolejności par Wilcoxon z poprawką Benferroniego.

Zmienne kategoryjne na skali nominalnej (tabele 2x2) analizowano za pomocą testu niezależności Chi-kwadrat lub dokładnego testu Fishera.

Korelacje między wybranymi zmiennymi, które nie wykazywały rozkładu normalnego badano za pomocą nieparametrycznego testu korelacji rang Spearmana. Dla porównań dwóch grup i dla korelacji rang za istotną statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$, a dla porównań wielokrotnych – wartość $p < 0,01$.

Analizę przeprowadzono za pomocą programu Statistica, wersja 13, TIBCO Software Inc. (2017) oraz przy pomocy programu GraphPad Prism w wersji 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California).

4. WYNIKI

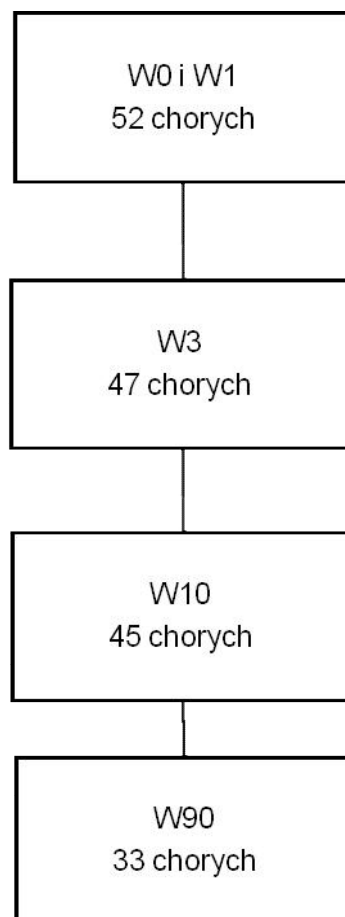
4.1 Grupa badana

Grupę badaną stanowiło 52 chorych z udarem niedokrwiennym, w wieku od 42 do 88 lat, u których czas trwania objawów w momencie włączenia do badania nie przekraczał 24 h. Na rycinie 6 przedstawiony jest schemat kwalifikacji do badania.



Rycina 6. Schemat klasyfikacji chorych do badania

Rycina 7 przedstawia schemat udziału chorych w kolejnych badanych punktach czasowych. Zmniejszająca się liczba chorych wynikała z odmowy kontynuacji udziału w badaniu (17 osób) lub zgonu (2 osoby).



Rycina 7. Schemat liczby chorych uczestniczących w kolejnych punktach czasowych badania

4.2 Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiło 34 pacjentów hospitalizowanych na Oddziale Chorób Wewnętrznych Szpitala MSWiA w Poznaniu.

4.3 Charakterystyka badanych populacji

Struktura demograficzna, BMI oraz częstość występowania klasycznych czynników ryzyka chorób naczyniowych w badanych populacjach zostały przedstawione w tabeli 11.

Tabela 11. Charakterystyka chorych po udarze i grupy kontrolnej (GK)

	udar niedokrwienny W1 (n=52)	grupa kontrolna (n=34)	p_{W1 vs GK}
Wiek, lata	69 (±12,1)	68 (±12,7)	p=0,658
BMI (kg/m²)	25,4 (23,6-28,4)	27,0 (24,9-30,6)	p=0,368
Płeć- kobiety n, (%)	25 (48,1%)	13 (38,2%)	p=0,386
Nadciśnienie tętnicze n, (%)	42 (80,8%)	30 (88,2%)	p=0,551
Cukrzyca n, (%)	10 (19,2%)	6 (17,7%)	p> 0,99
Choroba niedokrwienna serca n, (%)	19 (36,5%)	14 (41,2%)	p=0,821
Migotanie przedsionków n, (%)	20 (38,5%)	3 (8,8%)	p=0,003
Palenie tytoniu n, (%)	18 (34,6%)	7 (20,6%)	p=0,225
Hiperlipidemia n, (%)	16 (30,8%)	12 (35,3%)	p=0,814

Wartości zostały wyrażone jako liczba bezwzględna, procent, średnia ± SD lub jako mediana i zakres międzykwartyłowy (25-75 percentyl)

Badane populacje nie różniły się pod względem wieku, proporcji płci, BMI, częstości występowania czynników ryzyka chorób naczyniowych takich jak nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, hipercholesterolemia, choroba niedokrwienna serca, zestawu leków stosowanych w związku z w/w czynnikami ryzyka czy odsetka osób palących papierosy. W grupie z udarem niedokrwiennym występowała większa liczba chorych z migotaniem przedsionków oraz stosujących doustne antykoagulanty.

W tabeli 12 przedstawiono dane dotyczące stosowanego dotychczas leczenia w badanych grupach.

Tabela 12. Charakterystyka stosowanego leczenia w grupie chorych po udarze i w grupie kontrolnej

	udar niedokrwienny W1 (n=52)	grupa kontrolna (n=34)	p_{W1 vs GK}
ASA, n (%)	52 (100%)	34 (100%)	p>0,99
ACEI, n (%)	20 (38,5%)	17 (50%)	p=0,374
diuretyki, n (%)	23 (44,2%)	12 (35,3%)	p=0,502
β - blokery, n (%)	22 (42,3%)	17 (50%)	p=0,514
Ca-blokery, n (%)	9 (17,3%)	8 (23,5%)	p=0,582
ARB, n (%)	7 (13,5%)	1 (2,9%)	p=0,139
statyny, n (%)	14 (26,9%)	15 (44,1%)	p=0,110
przeciwcukrzycowe doustne, n (%)	8 (15,4%)	4 (11,8%)	p=0,757
insulina, n (%)	3 (5,8%)	3 (8,8%)	p=0,677
antykoagulanty doustne, n (%)	7 (13,5%)	0 (0%)	p=0,039

Wartości zostały wyrażone jako liczba bezwzględna i procent;

ASA- chorzy leczeni kwasem acetylosalicylowym w ramach profilaktyki pierwotnej lub wtórnej chorób sercowo-naczyniowych

ACEI- chorzy leczeni przewlekłe inhibitorami konwertazy angiotensyny w ramach terapii nadciśnienia tętniczego lub profilaktyki chorób sercowo-naczyniowych

diuretyki- chorzy leczeni przewlekłe lekami moczopędnymi z grup diuretyków pętlowych, tiazydowych, antagonistów aldosteronu

β - blokery- chorzy leczeni przewlekłe beta-adrenolitykami w ramach terapii nadciśnienia tętniczego

Ca-blokery- chorzy leczeni przewlekłe blokerami kanału wapniowego w ramach terapii nadciśnienia tętniczego

ARB- chorzy leczeni przewlekłe antagonistami receptora angiotensyny II w ramach terapii nadciśnienia tętniczego

statyny- chorzy leczeni przewlekłe statynami z powodu hipercholesterolemii

przeciwcukrzycowe doustne - chorzy leczeni przewlekłe doustnymi preparatami przeciwcukrzycowymi z grup pochodnych sulfonilomocznika, pochodnych biguanidów, glinidów z powodu cukrzycy typu II

insulina- chorzy leczeni przewlekłe analogami insuliny z powodu cukrzycy

W grupie badanej określano typ etiologiczny udaru zgodnie z klasyfikacją TOAST (tabela 3, rozdział 3). Do badania nie włączano chorych o niewyjaśnionej etiologii udaru (TOAST 5). Rozpoznanie udaru i określenie jego typu opierało się na wywiadzie, badaniu przedmiotowym oraz wynikach badań dodatkowych. Wyniki klasyfikacji przedstawiają się następująco: TOAST 1- 13 chorych (25%), TOAST 2 – 12 chorych (23%), TOAST 3- 22 chorych (42%), TOAST 4- 5 chorych (9,6%).

Lokalizację ogniska niedokrwiennego oceniano wg klasyfikacji OCSF (tabela 8, rozdział 3). Liczba chorych z udarem z danego zakresu unaczynienia kształtowała się następująco:

- TACI (*total anterior circulation infarct*): 6 (11,8%)
- PACI (*partial anterior circulation infarct*): 27 (52,9%)
- POCI (*posterior circulation infarct*): 13 (25,5%)
- LACI (*lacunar infarction*): 4 (7,8%)

W celu określenia stopnia deficytu neurologicznego pacjentów oceniano w skalach NIHSS, SSS wg punktacji progностycznej (pSSS) i długoterminowej (dSSS) oraz mRS (rozdział 3, tabele: 5, 6, 7). Wyniki oceny w każdym z punktów czasowych zostały przedstawione w tabeli 13.

Tabela 13. Ocena deficytu neurologicznego i stopnia niepełnosprawności w wyznaczonych punktach czasowych

	W1	W3	W10	W90
NIHSS	7 (4-11) P _{W1 vs W3} = 0,347 P _{W1 vs W10} < 0,0001 P _{W1 vs W90} = 0,001	3 (1-13) P _{W3 vs W10} = 0,008 P _{W3 vs W90} = 0,024	2 (0-5) P _{W10- W90} = 0,154	1 (0-40)
pSSS	20 (14-22) P _{W1 vs W3} = 0,417 P _{W1 vs W10} = 0,002	21 (18-22) P _{W3 vs W10} = 0,167 P _{W3 vs W90} = -	22 (19-22) P _{W10- W90} = -	-
dSSS	32 (18- 41) P _{W1 vs W3} < 0,0001 P _{W1 vs W10} < 0,0001 P _{W1 vs W90} < 0,0001	42 (25-46) P _{W3 vs W10} = 0,717 P _{W3 vs W90} = 0,026	44 (36- 48) P _{W10- W90} = 0,003	48 (44-48)
mRS	- P _{W1 vs W3} = - P _{W1 vs W10} = - P _{W1 vs W90} = -	2,0 (1-4) P _{W3 vs W10} = 0,186 P _{W3 vs W90} = 0,001	1,0 (0-4) P _{W10- W90} = 0,001	0,5 (0-1)

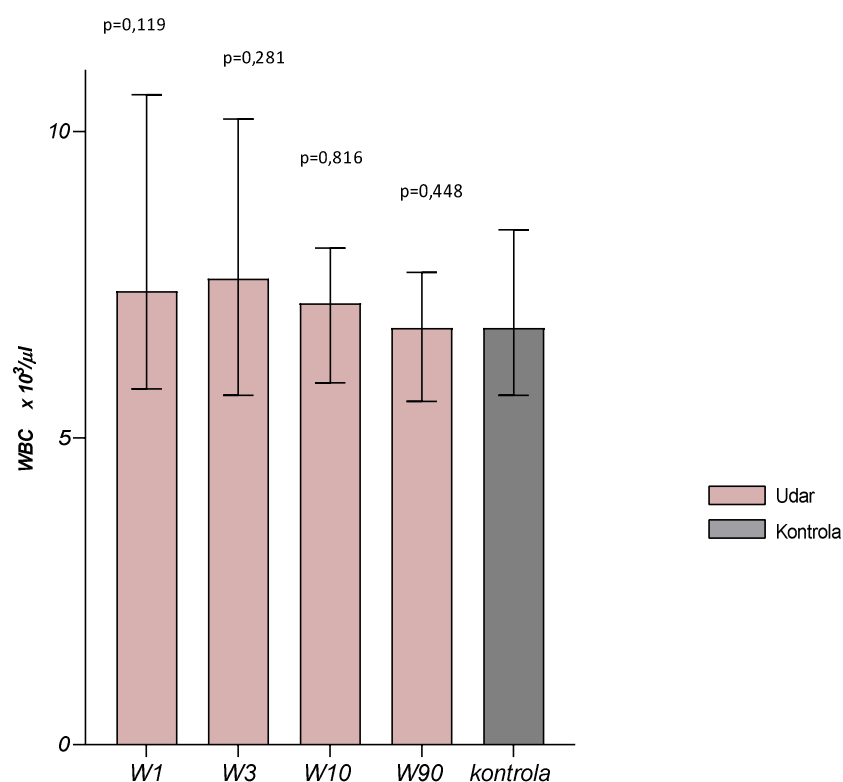
Wartości zostały wyrażone jako mediana i zakres międzykwartylowy (25-75 percentyl); wartości istotne statystycznie (p<0,05) oznaczono pogrubioną czcionką

Wykazano istotne statystycznie różnice pomiędzy stanem klinicznym chorych w 1. dobie a stanem w kolejnych punktach czasowych. Wynik oceny był najwyższy w skali

NIHSS, a najniższy w skali dSSS w 1. dobie hospitalizacji, natomiast w 3., 10. i 90. dobie od udaru wynik w skali NIHSS był niższy, a dSSS wyższy (stan kliniczny się poprawiał). Ponadto wykazano istotnie statystycznie niższy wynik oceny w skali NIHSS oraz istotnie statystycznie wyższy wynik oceny w skali dSSS w 10. i 90. dobie od udaru w stosunku do oceny w 1. i 3. dobie udaru. Wykazano również istotną statystycznie różnicę w ocenie wg skali mRS; w 90. dobie po udarze sprawność ruchowa poprawiała się, wynik istotnie statystycznie niższy niż w 3. i 10. dobie udaru.

4.4 Analiza morfologii krwi obwodowej

Wykazano, że niezależnie od czasu, jaki upłynął od udaru, liczba leukocytów (WBC), monocytów, erytrocytów (RBC) i płytek w krwi obwodowej chorych nie różniła się istotnie w porównaniu do tej obserwowanej w grupie kontrolnej. Stwierdzono istotnie statystycznie większą liczbę WBC w 1. dobie po udarze w porównaniu z 90. dobą ($p_{W1vsW90} = 0,016$). Najwyższe wartości WBC odnotowano w 3. a najniższe w 90. dobie po udarze, różnice te jednak nie osiągnęły istotności statystycznej (rycina 8).



Rycina 8. Wartości WBC w ocenianych punktach czasowych w grupie chorych z udarem w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy

Liczba bezwzględna limfocytów krwi obwodowej w 1. i 10. dobie po udarze oraz odsetek limfocytów względem WBC w 1., 3. i 10. dobie udaru były istotnie statystycznie mniejsze ($p < 0,05$) w porównaniu z wartościami obserwowanymi w grupie kontrolnej. Wykazano także istotnie statystycznie ($p < 0,05$) mniejszy odsetek monocytów i eozynofili w grupie chorych z udarem w 1. dobie w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej oraz istotnie statystycznie większy ($p < 0,05$) odsetek neutrofilów w 1. i 3. dobie udaru w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 14 i 15).

Tabela 14. Porównanie morfologii komórek krwi obwodowej w kolejnych ocenianych punktach czasowych w grupie chorych z udarem oraz w grupie kontrolnej (GK)

badany parametr	Udar W1	Udar W3	Udar W10	Udar W90	grupa kontrolna	p W1 vs GK	p W3 vs GK	p W10 vs GK	p W90 vs GK
WBC $\times 10^3/\mu\text{l}$	7,4 (5,8-10,6)	7,6 (5,7-10,2)	7,2 (5,9-8,1)	6,8 (5,6-7,7)	6,8 (5,7-8,4)	$p=0,119$	$p=0,281$	$p=0,816$	$p=0,448$
Limfocyty $\times 10^3/\mu\text{l}$	1,7 $\pm 0,9$	2,0 $\pm 0,9$	1,8 $\pm 0,7$	1,9 $\pm 0,7$	2,3 $\pm 1,2$	$p=0,008$	$p=0,114$	$p=0,024$	$p=0,075$
Limfocyty %	21,5 $\pm 11,6$	25,3 $\pm 10,9$	25,8 $\pm 10,2$	28 $\pm 7,5$	31,3 ± 10	$p=0,000$	$p=0,018$	$p=0,029$	$p=0,155$
Monocyty $\times 10^3/\mu\text{l}$	0,6 (0,5-0,8)	0,7 (0,5-1,0)	0,6 (0,5-0,8)	0,6 (0,5-0,8)	0,7 (0,6-0,8)	$p=0,255$	$p=0,538$	$p=0,652$	$p=0,348$
Monocyty %	8 (6,5-10)	10 (8-11)	9 (8-11)	9 (8-11)	9,5 (8-11,5)	$p=0,016$	$p=0,693$	$p=0,344$	$p=0,658$
Neutrofile $\times 10^3/\mu\text{l}$	4,7 (3,3- 7,4)	4,0 (3,3- 7,0)	4,2 (2,9- 4,8)	4,1 (3,0-4,9)	4,1 (2,8-5,1)	$p=0,056$	$p=0,127$	$p=0,974$	$p=0,875$
Neutrofile %	65 (55-75)	62 (53-72)	59,5 (50- 65)	60 (54-63)	56 (51-65)	$p=0,009$	$p=0,047$	$p=0,610$	$p=0,340$
Eozynofile $\times 10^3/\mu\text{l}$	0,1 (0,0-0,2)	0,2 (0,1- 0,3)	0,2 (0,1-0,3)	0,2 (0,1-0,3)	0,2 (0,1-0,3)	$p=0,017$	$p=0,553$	$p=0,484$	$p=0,918$
Eozynofile %	1 (0-3)	3 (1-5)	3 (2-5)	3 (2-5)	3 (2-5)	$p=0,003$	$p=0,784$	$p=0,508$	$p=0,747$
RBC $\times 10^6/\mu\text{l}$	4,5 $\pm 0,5$	4,5 $\pm 0,6$	4,4 $\pm 0,6$	4,4 $\pm 0,4$	4,4 $\pm 0,6$	$p=0,658$	$p=0,684$	$p=0,781$	$p=0,731$
PLT $\times 10^3/\mu\text{l}$	231 $\pm 65,9$	235 $\pm 79,4$	254 ± 97	239 ± 59	245 ± 69	$p=0,379$	$p=0,584$	$p=0,679$	$p=0,720$

WBC (ang. *white blood cells*) liczba białych krwinek

RBC (ang. *red blood cells*) liczba czerwonych krwinek

PLT (ang. *platelets*) liczba płytek

Wartości zostały wyrażone jako mediana i zakres międzykwartylowy (25-75 percentyl) lub jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe; wartości istotne statystycznie ($p < 0,05$) oznaczono pogrubioną czcionką

Tabela 15. Porównanie wartości bezwzględnych badanych subpopulacji w kolejnych ocenianych punktach czasowych w grupie chorych z udarem oraz w grupie kontrolnej

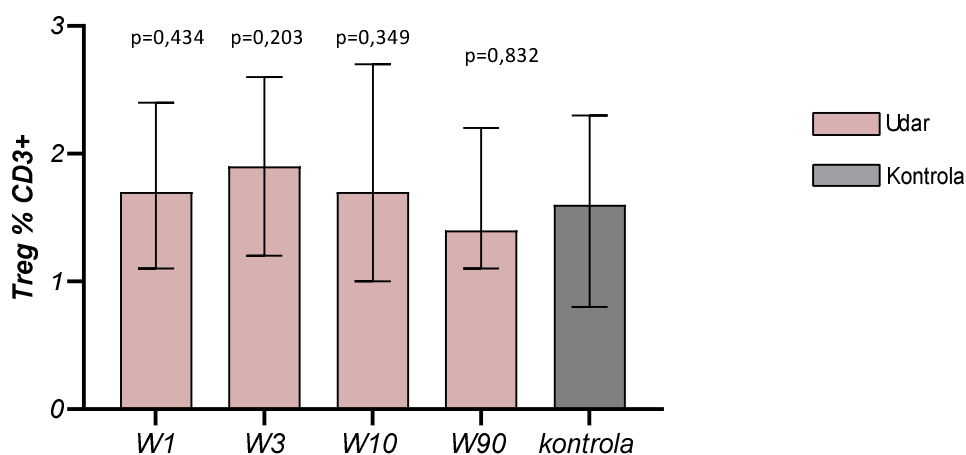
	W1	W3	W10	W90	grupa kontrolna (GK)	p
CD4⁺ (kom/ μ l)	525 $\pm$ 240	611 $\pm$ 302	534 $\pm$ 241	523 $\pm$ 237	625 $\pm$ 364	p W1 vs GK = 0,147 p W3 vs GK = 0,863 p W10 vs GK = 0,212 p W90 vs GK = 0,204
CD8⁺ (kom/ μ l)	263 (158-343)	295 (198-447)	280 (192-366)	321 (175-425)	290 (158-547)	p W1 vs GK = 0,330 p W3 vs GK = 0,874 p W10 vs GK = 0,667 p W90 vs GK = 0,959
Treg (kom/ μ l)	13.2 (8.6-19.8)	15.4 (9.2-27.4)	12.9 (8.7-18.2)	14.5 (10.2-20.7)	16.4 (9.07-21.1)	p W1 vs GK = 0,600 p W3 vs GK = 0,605 p W10 vs GK = 0,416 p W90 vs GK = 0,912
Treg Helios⁺ (kom/ μ l)	8.0 (4.6-15.8)	9.2 (4.3-21.2)	6.0 (4.6-12.7)	9.4 (7.5-15.9)	13.8 (7.1-18.6)	p W1 vs GK = 0,096 p W3 vs GK = 0,574 p W10 vs GK = 0,066 p W90 vs GK = 0,286
Treg Helios⁻ (kom/ μ l)	4.6 (2.6-6.81)	4.7 (3.5 -9.8)	5.3 (3.9-7.3)	4.3 (1.0-8.5)	1.0 (0.5-3.1)	p W1 vs GK < 0,0001 p W3 vs GK < 0,0001 p W10 vs GK < 0,0001 p W90 vs GK = 0,006
Tyδ (kom/ μ l)	311 (224-476)	382 (140-611)	306 (135-462)	390 (211-480)	457 (200-724)	p W1 vs GK = 0,026 p W3 vs GK = 0,102 p W10 vs GK = 0,015 p W90 vs GK = 0,208
Tyδ Vδ1 (kom/ μ l)	4.0 (1.6-10.3)	5.1 (1.3-10.7)	5.6 (1.8-9.1)	4.9 (2.9-12.1)	3.8 (2.2-9.1)	p W1 vs GK = 0,631 p W3 vs GK = 0,772 p W10 vs GK = 0,733 p W90 vs GK = 0,572
Tyδ Vδ2 (kom/ μ l)	8.2 (3.9-16.8)	10.5 (4.1-26.0)	7.4 (2.9-16.9)	18.9 (3.7-32.1)	12.5 (4.9-22.5)	p W1 vs GK = 0,316 p W3 vs GK = 0,932 p W10 vs GK = 0,126 p W90 vs GK = 0,415
iNKT (kom/ μ l)	7.7 (4.4-13.1)	10.1 (6.3-16.6)	8.0 (5.3-12.8)	7.3 (4.5-14.2)	7.0 (3.3-11.9)	p W1 vs GK = 0,534 p W3 vs GK = 0,045 p W10 vs GK = 0,380 p W90 vs GK = 0,769
NK (kom/ μ l)	183 (106-262)	188 (122-288)	182 (97.9-273)	181 (114-317)	171 (103-293)	p W1 vs GK = 0,884 p W3 vs GK = 0,682 p W10 vs GK = 0,923 p W90 vs GK = 0,504

Wartości zostały wyrażone jako mediana i zakres międzykwartylowy (25-75 percentyl) lub jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe. Wartości istotne statystycznie, ($p < 0,05$) oznaczono pogrubioną czcionką

4.4.1 Ocena ilościowa badanych subpopulacji limfocytów T (Treg, T $\gamma\delta$, iNKT), komórek NK oraz limfocytów CD4⁺ i limfocytów CD8⁺

4.4.1.1 Ocena ilościowa limfocytów Treg

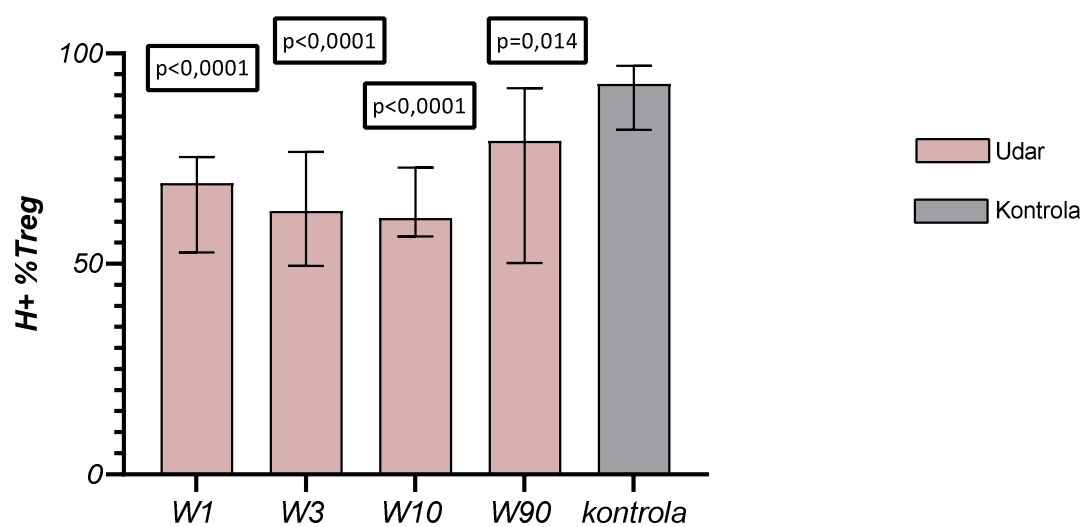
Badane wartości limfocytów Treg nie miały rozkładu normalnego. Wartości bezwzględne, jak i odsetek limfocytów Treg w odniesieniu do populacji limfocytów CD3⁺ u chorych w 1., 3., 10., i 90. dobie po udarze mózgu nie różnił się od wartości uzyskanych w grupie kontrolnej i istotnie nie zmieniał się w czasie, jaki upłynął od udaru (tabela 15, rycina 9).



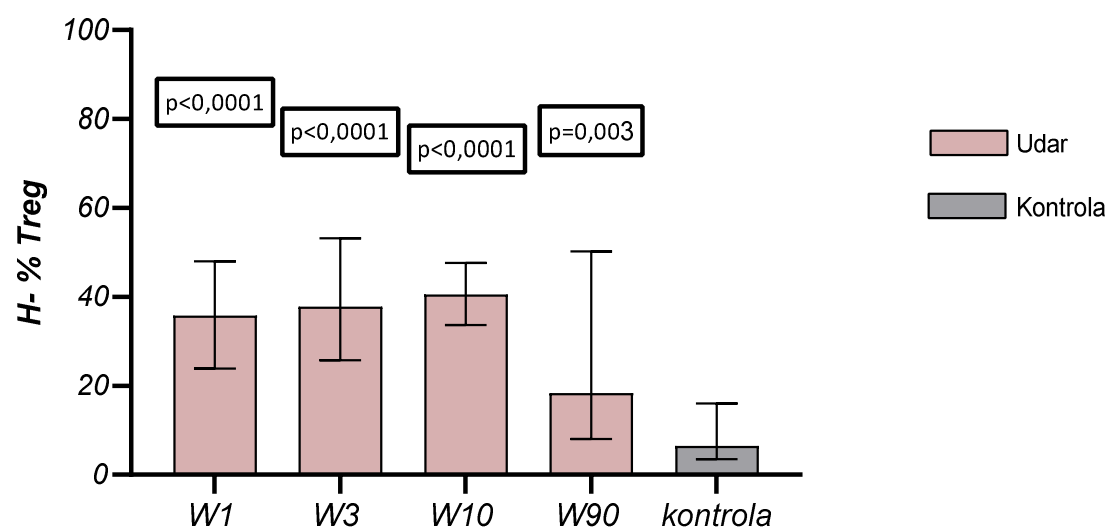
Rycina 9. Porównanie odsetka limfocytów Treg w kolejnych dobach udaru w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy

Odsetek limfocytów Treg Helios⁺ w populacji limfocytów Treg u chorych w 1., 3., 10., i 90. dobie po udarze mózgu był istotnie niższy niż ten obserwowany w grupie kontrolnej [W1: 69,1% (52,7-75,4) , p<0,0001; W3: 62,5% (49,6-76,6), p<0,0001; W10: 60,9% (56,5-72,9), p<0,0001; W90: 79,2% (50,2-91,7), p=0,014 vs GK: 92,7% (81,9-97,0)]. Wartości bezwzględne Treg Helios⁺ u chorych w 1., 3., 10. i 90. dobie po udarze nie różniły się istotnie statystycznie od obserwowanych w grupie kontrolnej (tabela 15). Natomiast zarówno wartości bezwzględne, jak i odsetek limfocytów Treg Helios⁻ w populacji limfocytów Treg u chorych w 1., 3., 10., i 90. dobie po udarze mózgu był istotnie wyższy od wartości wykazanych w grupie kontrolnej [W1: 35,8% (23,9-48,0), p<0,0001; W3: 37,8% (25,8-53,2), p<0,0001; W10: 40,5% (33,7-47,6), p<0,0001; W90: 18,4 % (8,0-50,2) vs GK: 6,5% (3,5-16,0); p=0,003] (rycina 10 a,b i 11).

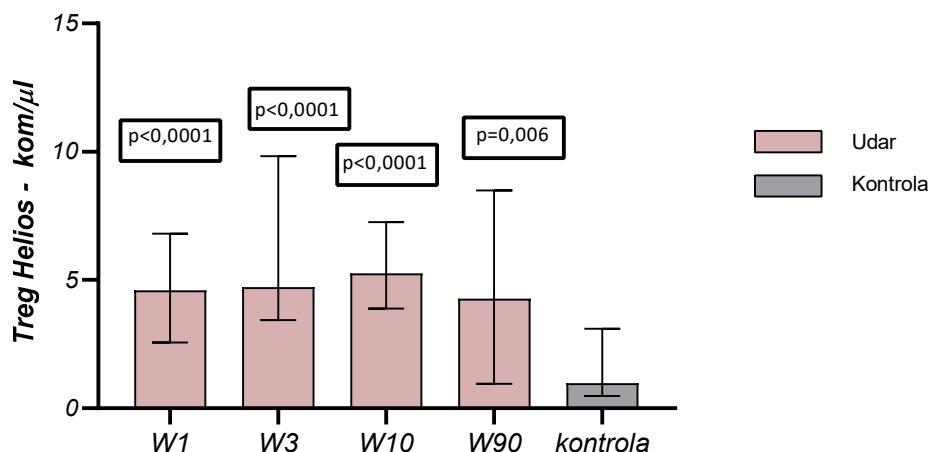
a



b



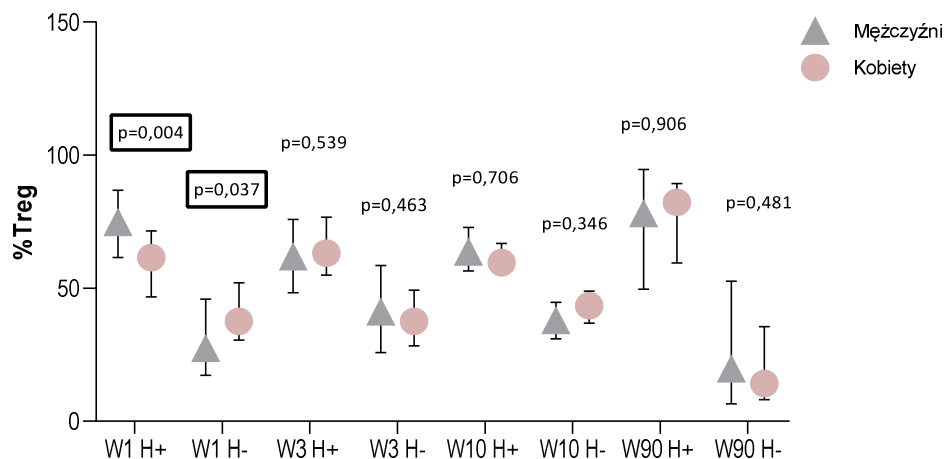
Rycina 10. Porównanie odsetka Helios⁺ (a) i Helios⁻ (b) w populacji limfocytów Treg u chorych z udarem w odniesieniu do grupy kontrolnej w każdym z ocenianych punktów w czasie. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy



Rycina 11. Porównanie wartości bezwzględnych limfocytów Treg Helios- u chorych z udarem w odniesieniu do grupy kontrolnej w każdym z ocenianych punktów w czasie. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy

Wartości badanych parametrów takich jak: wartości bezwzględne limfocytów Treg, odsetek limfocytów Treg w populacji limfocytów CD3+ nie zmieniały się istotnie statystycznie w czasie, jaki upłynął od udaru. Mimo obserwowanej tendencji do normalizacji proporcji limfocytów Treg H^+ / Treg H^- w 90. dobie, wartości te nie różniły się od notowanych w dobach od 1. do 10. po udarze.

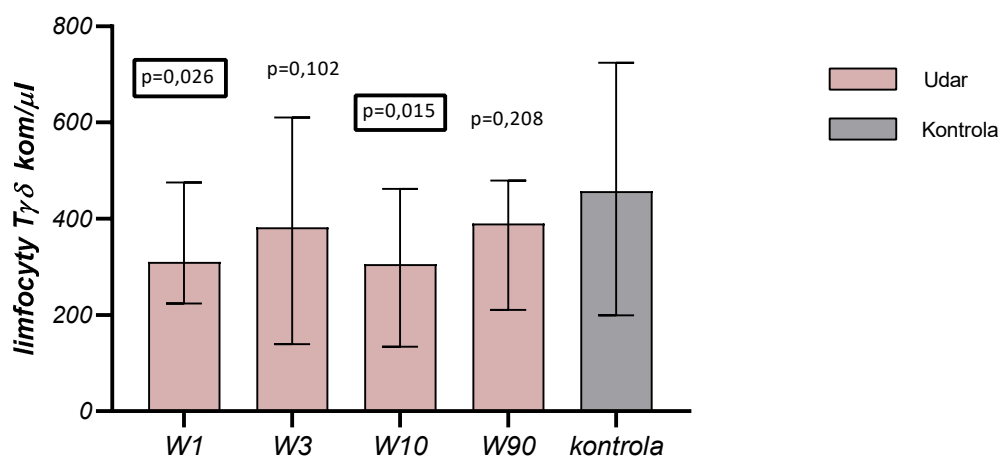
W 1. dobie po udarze odsetek limfocytów Treg H^+ w populacji limfocytów Treg był istotnie wyższy u mężczyzn niż u kobiet [odpowiednio: 74,7% (61,5-86,8) vs 61,5% (46,7-71,5); p=0,004], natomiast odsetek limfocytów Treg H^- był istotnie wyższy w grupie kobiet w porównaniu z wartościami obserwowanymi u mężczyzn [odpowiednio: 37,5% (30,4-52,0) vs 27,4% (17,3-45,9) ; p=0,037] (rycina 12). Różnicy tej nie stwierdzono w kolejnych dobach.



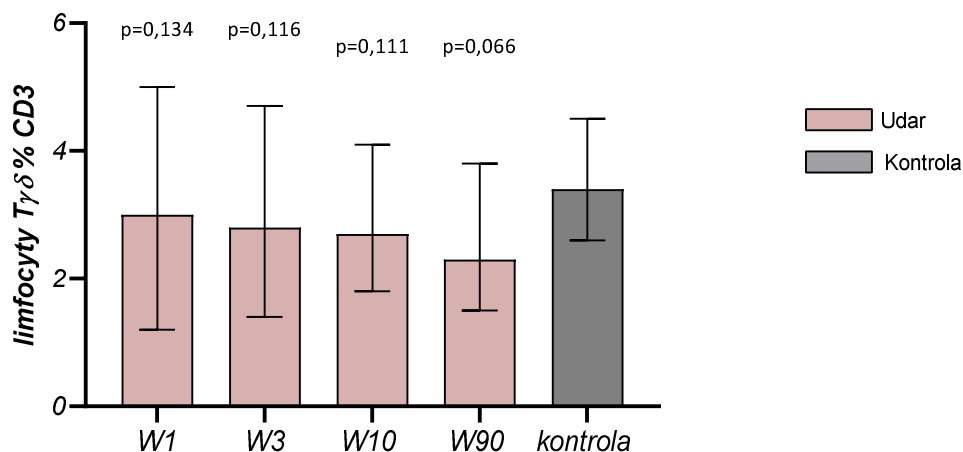
Rycina 12. Porównanie odsetka Helios⁺ oraz Helios⁻, w populacji limfocytów Treg z uwzględnieniem płci. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy

4.4.1.2 Ocena ilościowa limfocytów Tγδ

Badane wartości limfocytów Tγδ nie miały rozkładu normalnego. Wartości bezwzględne limfocytów Tγδ w 1. i 10. dobie po udarze były istotnie niższe niż w grupie kontrolnej (tabela 16, rycina 28). Odsetek limfocytów Tγδ w odniesieniu do populacji limfocytów CD3⁺ u chorych w 1., 3., 10., i 90. dobie po udarze mózgu nie różnił się od wartości obserwowanych w grupie kontrolnej i istotnie nie zmieniał się w czasie, jaki upłynął od udaru (rycina 13).

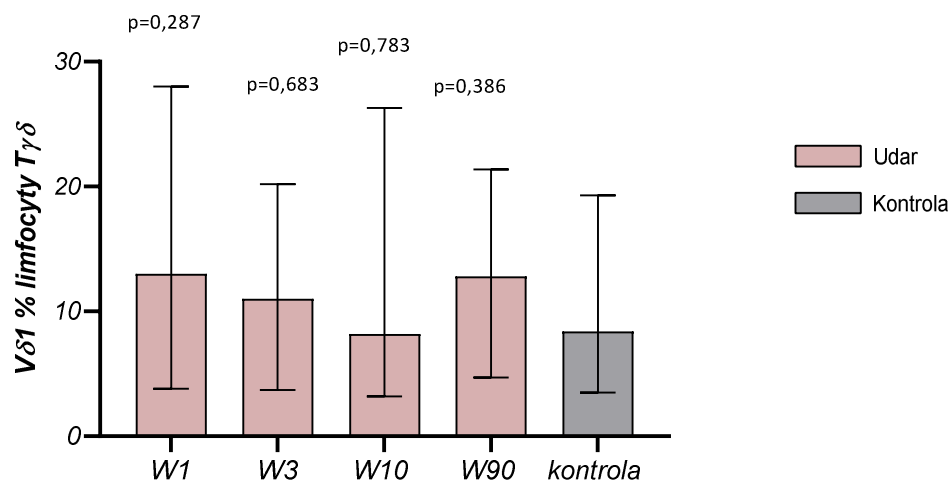


Rycina 13. Ocena ilościowa (wartości bezwzględne) limfocytów Tγδ w kolejnych dobach udaru w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy

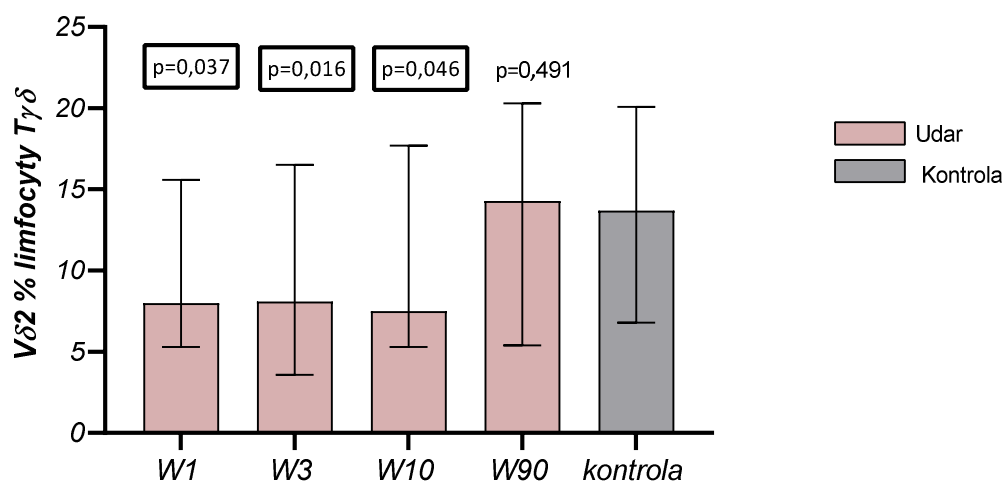


Rycina 14. Odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ w kolejnych dobach po udarze w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy

Wartości bezwzględne oraz odsetek limfocytów typu V δ 1 w populacji limfocytów T $\gamma\delta$ u chorych w 1., 3., 10., i 90. dobie po udarze mózgu nie różnił się od wartości uzyskanych w grupie kontrolnej i istotnie nie zmieniał się w czasie, jaki upłynął od udaru (tabela 15, rycina 15). Odsetek limfocytów typu V δ 2 w populacji limfocytów T $\gamma\delta$ u chorych w 1., 3. i 10. dobie udaru mózgu był istotnie mniejszy niż ten obserwowany w grupie kontrolnej [W1: 8,0% (5,3-15,6), $p=0,037$; W3: 8,1% (3,6-16,5), $p=0,016$; W10: 7,5% (5,3-17,7) vs GK: 13,7% (6,8-20,1), $p=0,046$], ale istotnie nie zmieniał się w czasie, jaki upłynął od udaru (rycina 30). W żadnym z punktów czasowych nie wykazano istotnych statystycznie różnic między wartościami bezwzględnymi limfocytów typu V δ 2 w grupie po udarze w odniesieniu do kontroli (tabela 15).



Rycina 15. Odsetek typu Vδ1 w populacji limfocytów Tγδ w grupie chorych w kolejnych dobach po udarze w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy

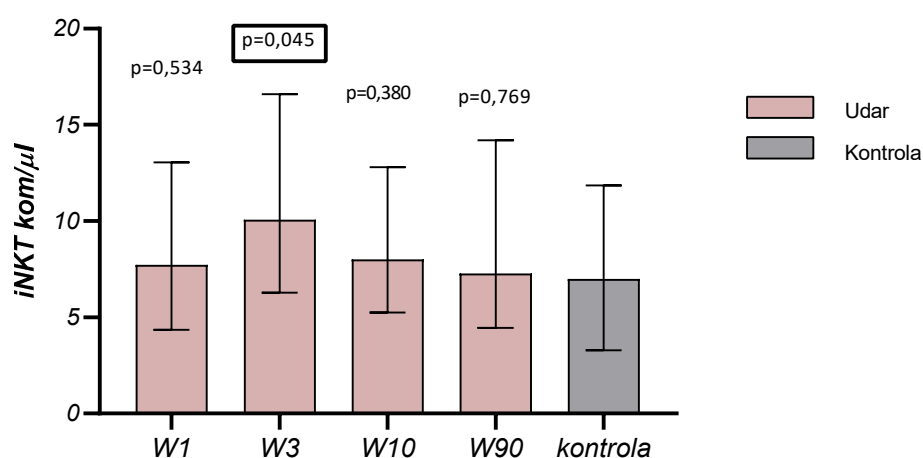


Rycina 16. Odsetek typu Vδ2 w populacji limfocytów Tγδ w grupie chorych w kolejnych dobach po udarze w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy

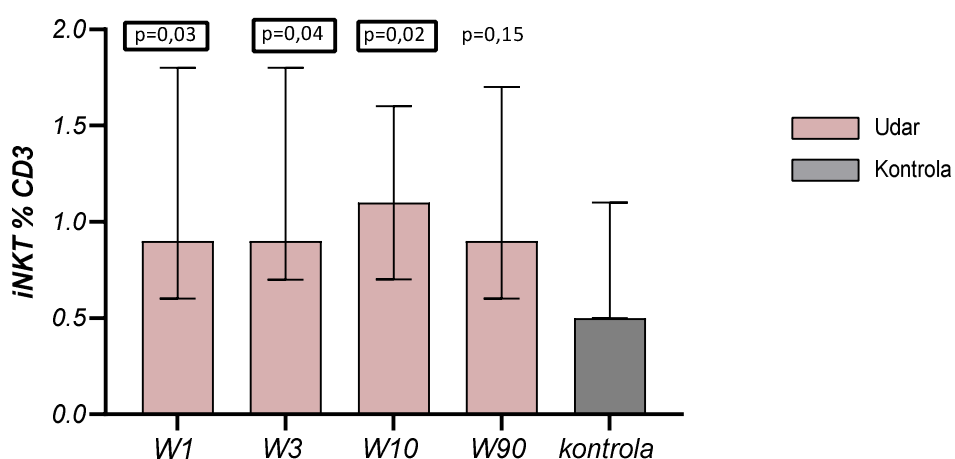
4.4.1.3 Ocena ilościowa limfocytów iNKT

Badane wartości limfocytów iNKT nie miały rozkładu normalnego. Wartości bezwzględne limfocytów iNKT w 3. dobie po udarze były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej (tabela 16, rycina 17a). Odsetek limfocytów iNKT w odniesieniu do populacji limfocytów CD3⁺ u chorych w 1., 3. i 10. dobie udaru niedokrwinnego mózgu był istotnie wyższy niż w grupie kontrolnej [W1: 0,9% (0,6-1,8), p=0,03; W3: 0,9% (0,7-1,8), p=0,04; W10: 0,9% (0,6-1,8) vs GK: 0,5% (0,5-1,1), p=0,02] (rycina 17b).

a



b

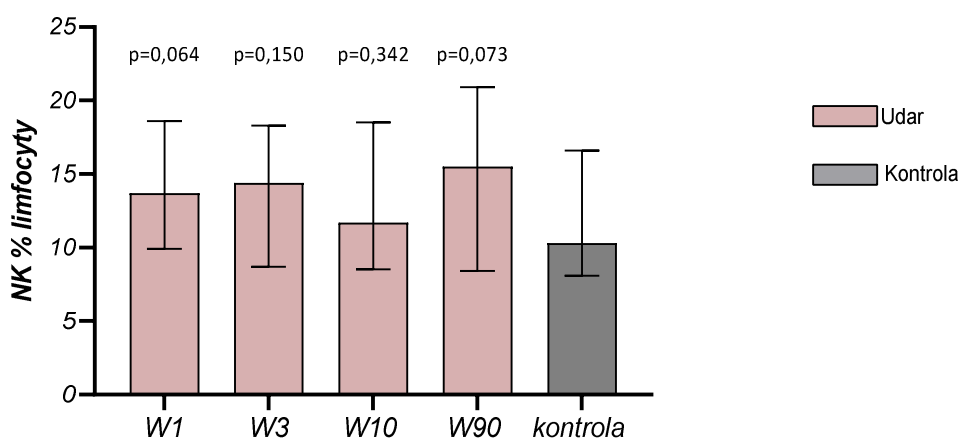


Rycina 17 a i b. Wartości bezwzględne (a) i odsetek limfocytów iNKT (b) w populacji limfocytów CD3⁺ w grupie chorych w kolejnych dobach po udarze w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartyłowy

Nie wykazano różnic między wartościami bezwzględnymi limfocytów iNKT w 1., 10., i 90. dobie po udarze a grupą kontrolną, ani między odsetkiem limfocytów iNKT w 90. dobie po udarze a grupą kontrolną. Wartości ocenianych parametrów nie zmieniały się istotnie statystycznie w czasie, jaki upłynął od udaru.

4.4.1.4 Ocena ilościowa komórek NK

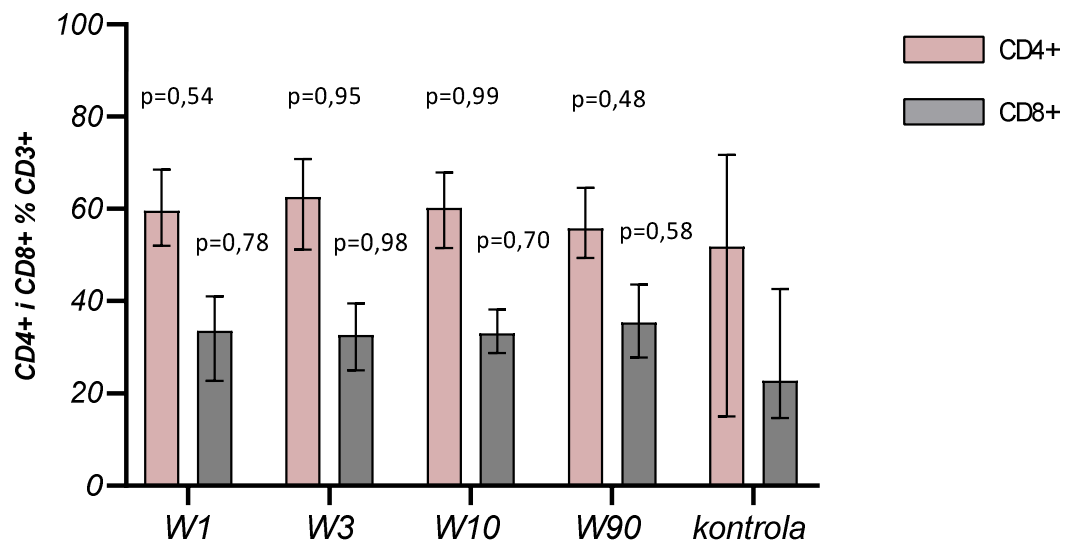
Badane wartości komórek NK nie miały rozkładu normalnego. Wartości bezwzględne i odsetek komórek NK w odniesieniu do populacji limfocytów u chorych w 1., 3., 10., i 90. dobie po udarze mózgu nie różnił się od wartości uzyskanych w grupie kontrolnej, nie zmieniał się też istotnie statystycznie w czasie, jaki upłynął od udaru (rycina 18).



Rycina 18. Odsetek komórek NK w populacji limfocytów w kolejnych dobach udaru w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy

4.4.1.5 Limfocyty CD4⁺ i limfocyty CD8⁺

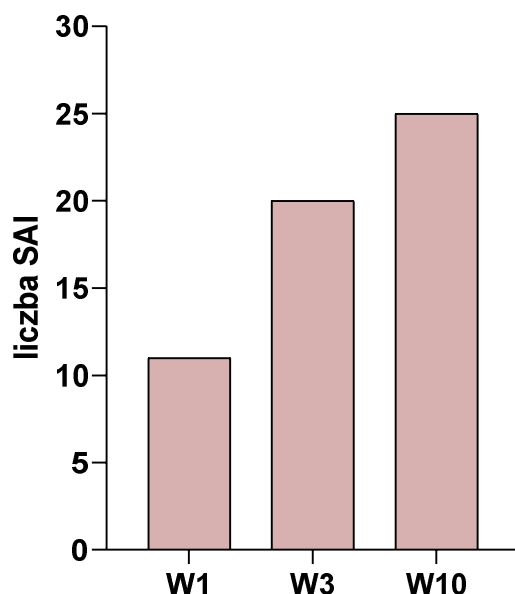
Badane wartości limfocytów CD4⁺ i CD8⁺, za wyjątkiem wartości bezwzględnej limfocytów CD4⁺ (tabela 15), nie miały rozkładu normalnego. Zarówno wartości bezwzględne jak i odsetek limfocytów CD4⁺ i limfocytów CD8⁺ w odniesieniu do populacji limfocytów CD3⁺ u chorych w 1., 3., 10. i 90. dobie po udarze mózgu nie różnił się od wartości uzyskanych w grupie kontrolnej. Wartości ocenianych parametrów nie zmieniały się też w czasie, jaki upłynął od udaru.



Rycina 19. Odsetek limfocytów CD4⁺ i limfocytów CD8⁺ w kolejnych dobach udaru w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy

4.5 Analiza stanu klinicznego chorych z uwzględnieniem infekcji związanej z udarem (SAI)

Pacjentów oceniano pod kątem objawów infekcji związanej z udarem (SAI) (definicja rozdział 3). Kryteria SAI spełniło łącznie 25 osób (48%), przy czym w 1. dobie udaru rozpoznano 11 przypadków SAI, w dobie 3-ciej liczba osób z SAI wynosiła 20, a w 10. dobie – 25. Liczbę odnotowanych infekcji okołoudarowych w kolejnych ocenianych dobach udaru przedstawia rycina 20.



Rycina 20. Liczba infekcji związanych z udarem (SAI) w kolejnych dobach udaru

Wykazano wyższe, istotnie statystycznie wartości CRP w grupie chorych z udarem w 1. i 3. dobie udaru w porównaniu z grupą kontrolną, a także istotnie niższe wartości CRP w 90. dobie w porównaniu z wartościami obserwowanymi w dobie 1., 3. i 10.

Tabela 16. Wartości CRP u chorych z udarem i w grupie kontrolnej

	CRP	p
W1	6,2 (2,0-8,4)	p_{W1 vs GK} = 0,011 p_{W3 vs GK} = 0,004 p_{W10 vs GK} = 0,074 p_{W90 vs GK} = 0,673 p_{W1 vs W3} = 0,548 p_{W1 vs W10} = 0,979 p_{W1 vs W90} = 0,023 p_{W3 vs W10} = 0,645 p_{W3 vs W90} = 0,001 p_{W10 vs W90} = 0,032
W3	6,3 (2,8-16)	
W10	4,0 (1,4-15,7)	
W90	2,3 (0,9-5,2)	
grupa kontrolna (GK)	1,9 (0,6 -5,7)	

Wartości zostały wyrażone jako mediana i zakres międzykwartylowy (25-75 percentyl). Wartości istotne statystycznie ($p < 0,05$) oznaczono pogrubioną czcionką

Wartość CRP, liczba WBC oraz liczba bezwzględna i odsetek limfocytów w krwi obwodowej w 1., 3 i 10. dobie od udaru istotnie korelowały ze stanem klinicznym w ostrej i podostrej fazie udaru. Im wyższe wartości CRP w surowicy oraz więcej leukocytów i mniej limfocytów w krwi obwodowej, tym gorszy stan kliniczny (tabela 17).

Tabela 17. Korelacje wartości CRP ze stanem klinicznym chorych

	CRP W1	CRP W3	CRP W10
NIHSS W1	0,26	0,50	0,46
pSSS W1	-0,24	-0,45	-0,42
dSSS W1	-0,22	-0,46	-0,45
mRS W3	0,30	0,54	0,51
NIHSS W3	0,25	0,52	0,48
pSSS W3	-0,29	-0,53	-0,47
dSSS W3	-0,25	-0,52	-0,50
mRS W10	0,35	0,56	0,55
NIHSS W10	0,22	0,49	0,49
pSSS W10	-0,29	-0,49	-0,50
dSSS W10	-0,27	-0,53	-0,52
mRS W90	-0,08	0,05	0,16
NIHSS W90	-0,09	-0,03	-0,03
dSSS W90	0,07	0,07	-0,08

p<0,05; p<0,01; p<0.001; p≥0,05

korelacje opisuje współczynnik korelacji rang Spearmana (rS)

Tabela 18. Korelacje liczby WBC oraz liczby bezwzględnej i odsetka limfocytów ze stanem klinicznym chorych

	WBC W1 [kom/μl]	Limfocyty W1 [kom/μl]	Limfocyty W1 [%]	WBC W3 [kom/μl]	Limfocyty W3 [kom/μl]	Limfocyty W3 [%]	WBC W10 [kom/μl]	Limfocyty W10 [kom/μl]	Limfocyty W10 [%]
NIHSS W1	0,32	-0,29	-0,48	0,31	-0,36	-0,51	0,20	-0,43	-0,43
pSSS W1	-0,30	0,28	0,48	-0,25	0,36	0,49	-0,16	0,41	0,41
dSSS W1	-0,35	0,24	0,44	-0,35	0,36	0,54	-0,28	0,37	0,40
mRS W3	0,32	-0,24	-0,45	0,36	-0,31	-0,50	0,33	-0,36	-0,45
NIHSS W3	0,29	-0,28	-0,46	0,31	-0,41	-0,57	0,27	-0,38	-0,43
pSSS W3	-0,36	0,23	0,46	-0,36	0,30	0,51	-0,34	0,34	0,42
dSSS W3	-0,35	0,21	0,43	-0,38	0,37	0,57	-0,35	0,34	0,41
mRS W10	0,33	-0,25	-0,48	0,36	-0,30	-0,55	0,34	-0,43	-0,52
NIHSS W10	0,27	-0,28	-0,44	0,33	-0,35	-0,55	0,31	-0,38	-0,46
pSSS W10	-0,34	0,30	0,50	-0,34	0,30	0,50	-0,31	0,40	0,49
dSSS W10	-0,31	0,30	0,48	-0,37	0,36	0,61	-0,35	0,41	0,50
mRS W90	0,05	-0,27	-0,16	-0,12	-0,23	-0,16	-0,02	-0,35	-0,18
NIHSS W90	-0,13	-0,24	-0,02	-0,20	-0,23	-0,06	0,03	-0,25	-0,17
dSSSW90	-0,09	0,12	0,10	0,05	0,18	0,15	-0,01	0,30	0,22

p<0,05; p<0,01; p<0.001; p≥0,05

korelacje opisuje współczynnik korelacji rang Spearmana (rS)

Tabela 19. Porównanie WBC, limfocytów i CRP w zależności od infekcji związanej z udarem SAI+/SAI-

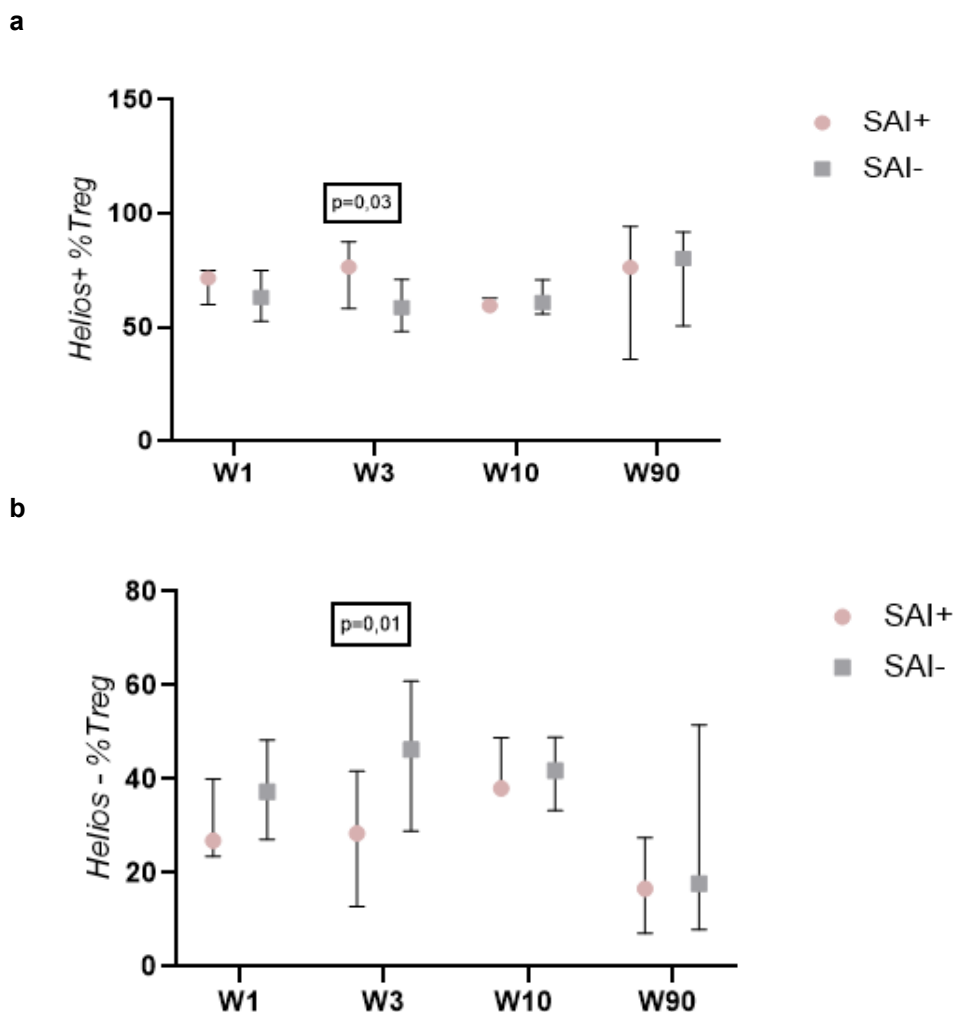
	SAI+	SAI-	p
WBC $\times 10^3/\mu\text{l}$ W1	10,3 (7,2-12,5)	7,3 (6,0-8,6)	<0,0001
Limfocyty $\times 10^3/\mu\text{l}$ W1	1,8 (1,2-2,4)	1,8 (1,4-2,1)	0,96
Limfocyty [%] W1	16,5 (9,0-25,0)	25,5 (20,0-31,0)	<0,0001
CRP mg/l W1	7,7 (4,0-23,2)	3,0 (1,4-6,9)	<0,0001
WBC $\times 10^3/\mu\text{l}$ W3	9,7 (7,4-12,0)	7,2 (6,1-7,9)	0,03
Limfocyty $\times 10^3/\mu\text{l}$ W3	1,6 (1,3-2,3)	1,9 (1,6-2,3)	<0,0001
Limfocyty [%] W3	19,5 (13,5-25,0)	28,0 (22,0-33,0)	<0,0001
CRP mg/l W3	23,0 (8,1-72,0)	3,4 (1,2-7,9)	<0,0001
WBC $\times 10^3/\mu\text{l}$ W10	8,0 (7,2-10,6)	6,9 (5,6-7,7)	<0,0001
Limfocyty $\times 10^3/\mu\text{l}$ W10	1,7 (1,6-2,3)	2,0 (1,5-2,2)	0,49
Limfocyty [%] W10	24,0 (18,0-28,0)	28,0 (23,0-34,0)	0,01
CRP mg/l W10	18,4 (3,6-38,2)	2,4 (0,8-5,9)	<0,0001

Wyniki wyrażono jako medianę i rozkład międzykwartylowy. Wartości istotne statystycznie ($p < 0,05$) oznaczono pogrubioną czcionką.

U chorych, u których rozwinęła się infekcja związana z udarem, w porównaniu z chorymi bez SAI, stwierdzono w krwi obwodowej wyższe wartości WBC (w 1., 3. i 10 dobie), mniejsze wartości limfocytów zarówno bezwzględne (w 3. dobie) jak i odsetkowe (w 1., 3. i 10 dobie) oraz większe stężenie CRP (w 1., 3. i 10 dobie), co przedstawia tabela 19.

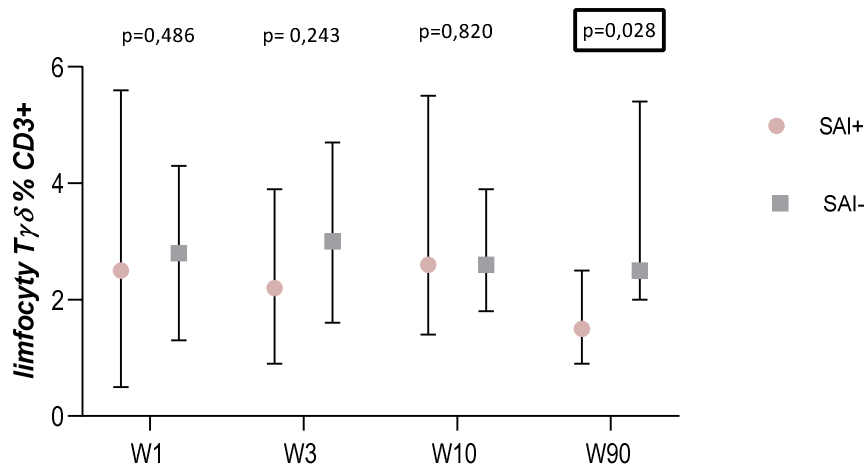
4.6 Ocena ilościowa subpopulacji limfocytów z uwzględnieniem infekcji związanej z udarem

W 3. dobie udaru, wykazano u chorych SAI+ w porównaniu z chorymi, którzy nie rozwinęli SAI, istotnie większy odsetek limfocytów Treg H^+ oraz istotnie mniejszy odsetek limfocytów Treg H^- [Treg H^+ : 76,6% (58,3-87,7) vs 58,8% (48,2-71,2), $p=0,03$ oraz Treg H^- : 28,4% (12,8-41,2) vs 46,3% (29,3-60,9), $p=0,01$].



Rycina 21. Porównanie odsetka Helios⁺ (a) oraz Helios⁻ (b) w populacji limfocytów Treg u pacjentów SAI+/SAI-. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy

W 90. dobie po udarze niedokrwinnym odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ w populacji limfocytów CD3⁺ był istotnie statystycznie mniejszy w grupie chorych, którzy rozwinęli infekcję związaną z udarem (SAI+) niż u chorych SAI- [1,5% (0,9-2,5) vs 2,5% (2,0-5,4); p=0,028] (rycina 22).



Rycina 22. Odsetek limfocytów Tγδ w populacji limfocytów CD3⁺ w 90. dobie udaru u pacjentów, którzy rozwinęli infekcję związaną z udarem (SAI+) i tych, którzy nie rozwinęli (SAI-). Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartyłowy

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic ilościowych w odsetku limfocytów Tγδ w innych punktach czasowych. Nie wykazano też istotnych statystycznie różnic ilościowych w odsetku limfocytów CD4⁺, CD8⁺, Treg, iNKT i komórek NK między grupą chorych SAI + a chorymi SAI-.

4.7 Ocena związku pomiędzy wykładnikami laboratoryjnymi stanu zapalnego a parametrami badanych subpopulacji limfocytów

4.7.1 Związek między CRP a parametrami Treg

Istnieje istotna statystycznie ($p < 0,05$) dodatnia korelacja pomiędzy odsetkiem limfocytów Treg w 1. dobie udaru a stężeniem białka CRP w 1., 3. i 10. dobie udaru (tabela 20). Nie wykazano istotnej statystycznie korelacji odsetka limfocytów Treg a stężeniem białka CRP w innych punktach czasowych badania, których nie ujęto w tabeli 20.

Tabela 20. Korelacje limfocytów Treg z CRP

	CRP W1	CRP W3	CRP W10
	rS	rS	rS
Treg%CD3 ⁺ W1	0,36	0,43	0,42

$p < 0,05$; rS- współczynnik korelacji rang Spearmana

4.7.2 Związek między CRP a limfocytami CD4⁺ i CD8⁺

Wykazano istotną dodatnią korelację między odsetkiem limfocytów CD8⁺ w 1. dobie udaru a stężeniem CRP w surowicy w 1., 3., i 10. dobie udaru. Korelację między odsetkiem limfocytów CD8⁺ a stężeniem CRP obserwowano również w grupie kontrolnej. Istotna ujemna korelacja zachodzi między odsetkiem limfocytów CD4⁺ w 1. dobie a stężeniem CRP w 10. dobie udaru. Związku tego nie wykazano w grupie kontrolnej (tabela 21).

Tabela 21. Korelacje limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ z CRP

	CRP W1		CRP W3		CRP W10		CRP kontrola	
	rS	p	rS	p	rS	p	rS	p
CD4 W1	0,21	ns	-0,21	ns	-0,33	<0,05	-0,21	ns
CD8 W1	0,37	<0,01	0,36	<0,05	0,46	<0,01	0,37	<0,05
CD4 W3	-0,16	ns	-0,07	ns	-0,20	ns	-	-
CD8 W3	0,19	ns	0,20	ns	0,25	ns	-	-
CD4 W10	0,06	ns	-0,08	ns	-0,05	ns	-	-
CD8 W10	0,09	ns	0,17	ns	0,09	ns	-	-
CD4 W90	0,13	ns	0,00	ns	0,09	ns	-	-
CD8 W90	-0,22	ns	0,01	ns	-0,14	ns	-	-

rS- współczynnik korelacji rang Spearmana; ns - korelacje nieistotne statystycznie
Wartości istotne statystycznie ($p < 0,05$) oznaczono pogrubioną czcionką.

Nie wykazano istotnych statystycznie korelacji między stężeniem CRP a odsetkiem limfocytów T $\gamma\delta$, iNKT oraz komórek NK w ocenianych punktach czasowych po udarze oraz w grupie kontrolnej.

4.8 Związek między stanem klinicznym ocenianym w skali NIHSS, SSS i mRS a badanymi parametrami wybranych subpopulacji limfocytów

4.8.1 Limfocyty Treg

W analizie korelacji rang Spearmana wykazano istotną statystycznie ($p < 0,001$) dodatnią korelację pomiędzy odsetkiem limfocytów Treg a stanem klinicznym ocenianym w skali NIHSS w 1. i 3. dobie po udarze [odpowiednio: współczynnik korelacji rang Spearmana (rS) = 0,51 ($p < 0,001$) i $rS = 0,37$ ($p < 0,01$)]. Stan kliniczny chorych w 1. dobie po udarze oceniany wg skali SSS koreluje ujemnie z odsetkiem limfocytów Treg [$rS = -0,41$ ($p < 0,01$)].

Asocjacje te wskazują na związek większego odsetka limfocytów Treg z gorszym stanem klinicznym (większy wynik w skali NIHSS, mniejszy wynik w skali SSS). Odnotowano również istotną statystycznie ($p<0,01$) dodatnią korelację pomiędzy stanem klinicznym ocenianym w skali NIHSS i mRS w 90. dobie od udaru niedokrwiennego a odpowiednio odsetkiem Treg H^+ w 3. dobie udaru ($rS=0,62$) i Treg H^+ w 90. dobie po udarze ($rS=0,47$), co oznacza, że większy odsetek krążących Treg H^+ zarówno w fazie ostrej jak i w fazie późnej udaru ma związek z gorszym stanem klinicznym w fazie rekonwalescencji. Wyniki przedstawia tabela 22.

Tabela 22. Korelacje parametrów limfocytów Treg ze stanem klinicznym

	NIHSS W1		pSSS W1		NIHSS W3		NIHSS W90		mRS W90	
	rS	p	rS	p	rS	p	rS	p	rS	p
Treg %CD3 W1	0,51	<0,001	-0,41	<0,01	0,37	<0,01	0,43	ns	0,25	ns
H+ %Treg W3	0,06	ns	-0,23	ns	0,23	ns	0,62	<0,01	0,41	ns
H+ %Treg W90	0,17	ns	0,00	ns	0,17	ns	0,29	ns	0,47	<0,01

rS- współczynnik korelacji rang Spearmana; ns - korelacje nieistotne statystycznie; wartości rS istotne statystycznie ($p<0,05$) oznaczono pogrubioną czcionką

Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji między odsetkiem Treg, H^+ , H^- a stanem klinicznym w pozostałych punktach czasowych, których nie ujęto w tabeli 22.

4.8.2 Limfocyty $T\gamma\delta$

Wykazano istotną korelację odsetka limfocytów $T\gamma\delta$ w 10. dobie udaru ze stanem klinicznym w 90. dobie udaru ocenianym w skali NIHSS ($rS=-0,61$; $p<0,001$) i skali SSS ($rS=0,51$; $p<0,001$). W 90. dobie po udarze odsetek $V\delta1$ w populacji limfocytów $T\gamma\delta$ koreluje ujemnie ze stanem klinicznym ocenianym w skali NIHSS w 1. dobie udaru ($rS=-0,4$; $p<0,05$), a odsetek $V\delta2$ w populacji $T\gamma\delta$ koreluje ujemnie z stanem klinicznym ocenianym w skali SSS w 3. dobie udaru ($rS=-0,38$; $p<0,05$). Oznacza to, że większy odsetek limfocytów $T\gamma\delta$ w fazie podostrej ma związek z lepszym stanem klinicznym w fazie rekonwalescencji. Natomiast lepszy stan kliniczny w ostrej fazie udaru wiąże się z większym odsetkiem krążących limfocytów $V\delta1$ i mniejszym odsetkiem $V\delta2$ w fazie rekonwalescencji.

4.8.3 Limfocyty iNKT

Odsetek limfocytów iNKT w populacji limfocytów CD3⁺ w 1. dobie udaru koreluje dodatnio ze stanem klinicznym ocenianym w skali NIHSS w 1. dobie i skali mRS w 10. dobie udaru, natomiast odsetek limfocytów iNKT w 10. dobie koreluje dodatnio z punktacją w skali NIHSS w 1. i punktacją w skali mRS w 10. dobie, a ujemnie z punktacją w skali SSS w 1. i 10. dobie udaru (tabela 23). Oznacza to, że większy odsetek krążących limfocytów iNKT w 1. i 10. dobie koreluje z gorszym stanem klinicznym w fazie ostrej i podostrej udaru. Nie wykazano korelacji stanu klinicznego z odsetkiem limfocytów iNKT w 3. i 90. dobie.

Tabela 23. Korelacje limfocytów iNKT ze stanem klinicznym

	NIHSS W1		pSSS W1		dSSS W10		mRS W10	
	rS	p	rS	p	rS	p	rS	p
iNKT% CD3 W1	0,29	<0,05	-0,25	ns	-0,18	ns	0,31	<0,05
iNKT%CD3 W3	0,20	ns	-0,02	ns	-0,13	ns	0,11	ns
iNKT%CD3 W10	0,41	<0,01	-0,40	<0,05	-0,33	<0,05	0,37	<0,05
iNKT%CD3 W90	0,04	ns	0,05	ns	-0,07	ns	0,03	ns

rS - współczynnik korelacji rang Spearmana; ns - korelacje nieistotne statystycznie; wartości rS istotne statystycznie (p<0,05) oznaczono pogrubioną czcionką

4.8.4 Komórki NK

Odsetek komórek NK w populacji limfocytów w 10. dobie udaru koreluje dodatnio ze stanem klinicznym ocenianym wg skali SSS w 1. i 3. dobie udaru, co przedstawia tabela 24 (p<0,05). Oznacza to, że lepszy stan kliniczny w fazie ostrej ma związek z większym odsetkiem krążących komórek NK w fazie podostrej. Nie wykazano korelacji ze stanem klinicznym odsetka komórek NK w 1., 3. i 90. dobie udaru.

Tabela 24. Korelacje komórek NK ze stanem klinicznym

	dSSS W1	pSSS W3
	rS	rS
NK% W1	0,22	0,17
NK% W3	0,14	0,12
NK% W10	0,33	0,36
NK% W90	0,07	-0,03

rS – współczynnik korelacji rang Spearmana; wartości rS istotne statystycznie (p<0,05) oznaczono pogrubioną czcionką

4.8.5 Limfocyty CD4⁺ i CD8⁺

W korelacji rang Spearmana wykazano istotny statystycznie związek pomiędzy stanem klinicznym ocenianym w skali SSS, NIHSS i mRS a odsetkiem limfocytów CD4⁺ i CD8⁺. Odsetek limfocytów CD4⁺ w 1., 3. i 10. dobie udaru mózgu koreluje dodatnio ze stanem klinicznym ocenianym w skali SSS w 1., 3 i 10. dobie udaru, a ujemnie ze stanem klinicznym ocenianym w skali mRS i NIHSS w 3. i 10. dobie. Natomiast odsetek limfocytów CD8⁺ w tych samych punktach czasowych i skalach koreluje odwrotnie (tabela 25). Oznacza to, że większy odsetek krążących limfocytów CD4⁺ i mniejszy odsetek limfocytów CD8⁺ koreluje z lepszym stanem klinicznym w ostrej i podostrej fazie udaru. Nie wykazano korelacji limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ ze stanem klinicznym w fazie rekonwalescencji.

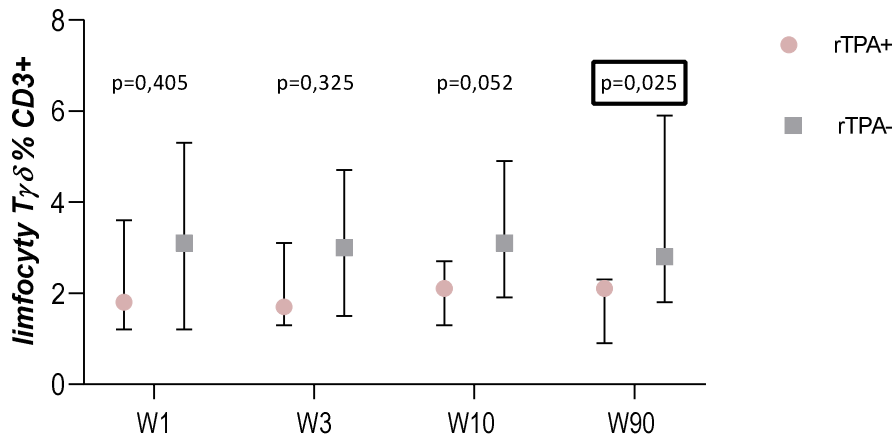
Tabela 25. Korelacje limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ ze stanem klinicznym

	dSSS W1		dSSS W3		mRS W3		mRS W10		NIHSS W10		dSSS W10	
	rS	p	rS	p	rS	p	rS	p	rS	p	rS	p
CD4 W1	0,41	<0,01	0,37	<0,01	-0,39	<0,01	-0,41	<0,01	-0,29	<0,05	0,36	<0,05
CD8 W1	-0,31	<0,05	-0,27	<0,05	0,31	<0,05	0,33	<0,05	0,22	ns	-0,28	<0,05
CD4 W3	0,34	<0,05	0,29	<0,05	-0,28	<0,05	-0,32	<0,05	-0,17	ns	0,26	ns
CD8 W3	-0,34	<0,05	-0,30	<0,05	0,35	<0,01	0,34	<0,05	0,22	ns	-0,29	<0,05
CD4 W10	0,36	<0,05	0,32	<0,05	-0,19	ns	-0,13	ns	-0,15	ns	0,20	ns
CD8 W10	-0,37	<0,05	-0,21	ns	0,09	ns	0,16	ns	0,12	ns	-0,20	ns

rS – współczynnik korelacji rang Spearmana; ns – związek nieistotny statystycznie
wartości rS istotne statystycznie (p<0,05) oznaczono pogrubioną czcionką

4.9 Ocena ilościowa badanych parametrów subpopulacji limfocytów z uwzględnieniem leczenia trombolitycznego

W 90. dobie po udarze niedokrwiennym odsetek limfocytów Tγδ w populacji limfocytów CD3⁺ był istotnie statystycznie mniejszy w grupie chorych, którzy otrzymali leczenie trombolityczne (rTPA+) w porównaniu do tych nieleczonych trombolitycznie (rTPA-) [2,1 (0,9-2,3) vs 2,8 (1,8-5,9); p= 0,025] (rycina 23).



Rycina 23. Odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ w populacji limfocytów CD3⁺ w 90. dobie udaru u pacjentów, u których zastosowano leczenie trombolityczne (rTPA+) i tych, którzy nie otrzymali tego typu leczenia (rTPA-). Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy

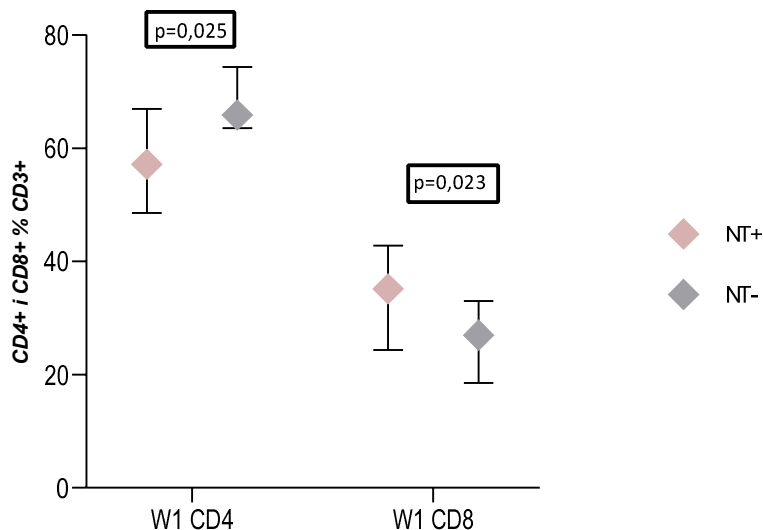
Nie wykazano istotnych statystycznie różnic ilościowych w odsetku limfocytów T $\gamma\delta$ w innych punktach czasowych. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic ilościowych w odsetku limfocytów Treg, iNKT i komórek NK między grupą chorych rTPA+ a chorymi rTPA-.

4.10 Analiza parametrów badanych subpopulacji limfocytów z uwzględnieniem klasyfikacji udaru oraz czynników ryzyka udaru niedokrwinnego

Nie wykazano różnic w badanych parametrach wybranych subpopulacji komórkowych (odsetek limfocytów: Treg, T $\gamma\delta$, iNKT i komórek NK) w zależności od płci oraz klasyfikacji TOAST i OSCP, jak również między chorymi obciążonymi hiperlipidemią, migotaniem przedsionków lub paleniem papierosów, a chorymi bez tych obciążeń, zarówno w grupie po udarze jak i w grupie kontrolnej.

4.10.1 Nadciśnienie tętnicze

U chorych z nadciśnieniem tętniczym w 1. dobie udaru wykazano istotnie większy odsetek limfocytów CD8⁺, a mniejszy CD4⁺ niż u pacjentów bez nadciśnienia [CD8⁺: 35% (24-43) vs 27% (19-33), p= 0,023; CD4⁺: 57% (49-67) vs 66% (64-74), p=0,025] (rycina 24). Różnicy takiej nie wykazano w pozostałych ocenianych punktach czasowych ani między osobami NT+ a NT- w grupie kontrolnej.

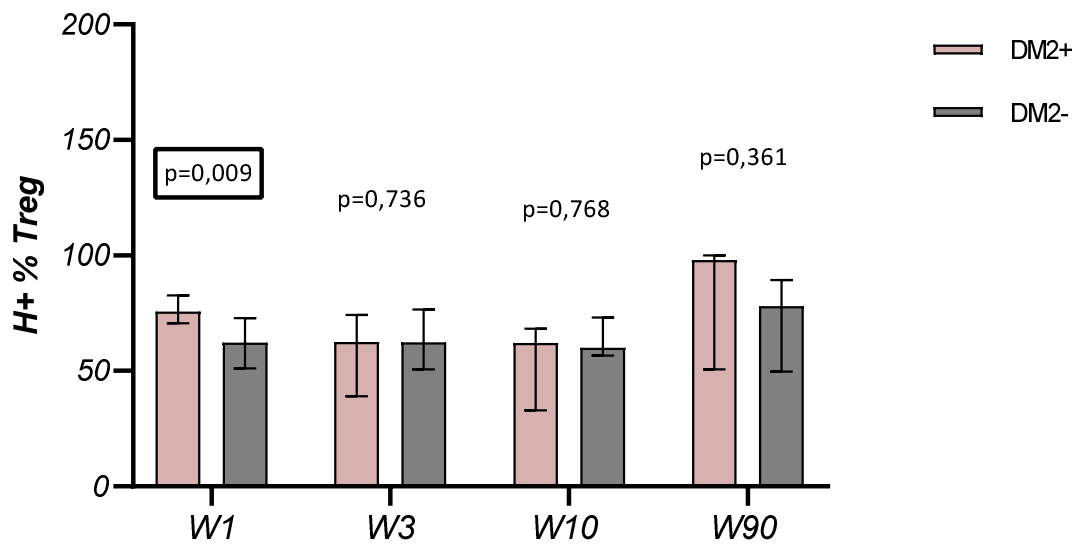


Rycina 24. Odsetek limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ w 1. dobie udaru u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (NT+) i bez nadciśnienia (NT-). Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy

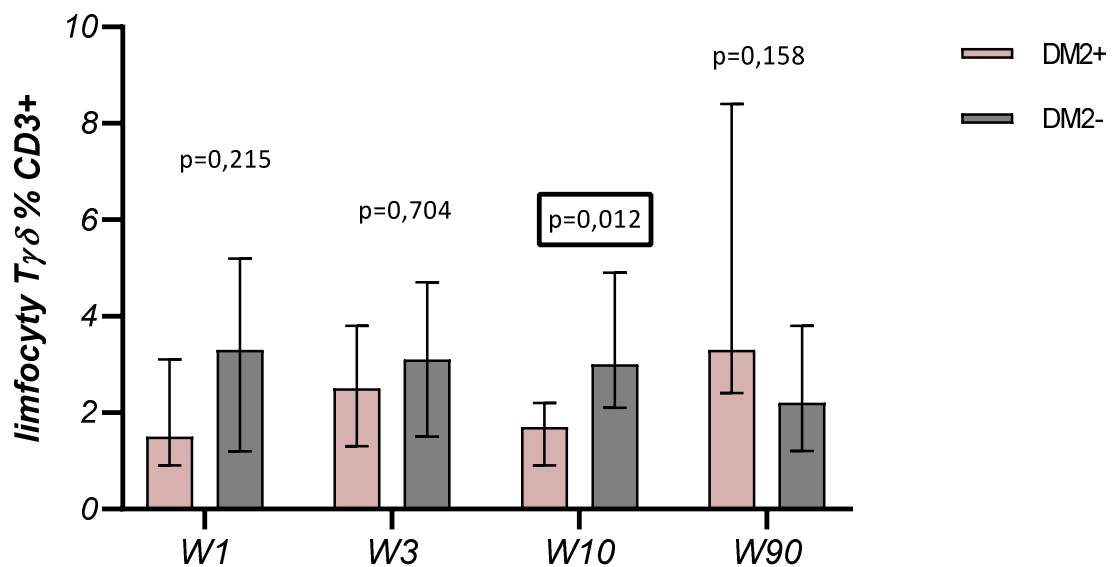
4.10.2 Cukrzyca

W 1. dobie udaru u chorych z cukrzycą typu 2 (DM2+) wykazano istotnie większy odsetek limfocytów Treg H⁺ niż u pacjentów bez cukrzycy (DM2-) [odpowiednio: 76% (71-83) vs 62% (51-73), $p=0,009$] (rycina 25). W pozostałych ocenianych punktach czasowych po udarze nie wykazano różnic w zakresie tego parametru. Różnicy takiej nie wykazano również w grupie kontrolnej.

W 10. dobie udaru u chorych DM2+ wykazano istotnie mniejszy odsetek limfocytów Tγδ niż u chorych bez cukrzycy [odpowiednio: 1,7% (0,9-2,2) vs 3,0% (2,1- 4,9); $p=0,012$] (rycina 26). W pozostałych ocenianych punktach czasowych po udarze nie wykazano różnic w zakresie tego parametru. Różnicy takiej nie wykazano również w grupie kontrolnej.



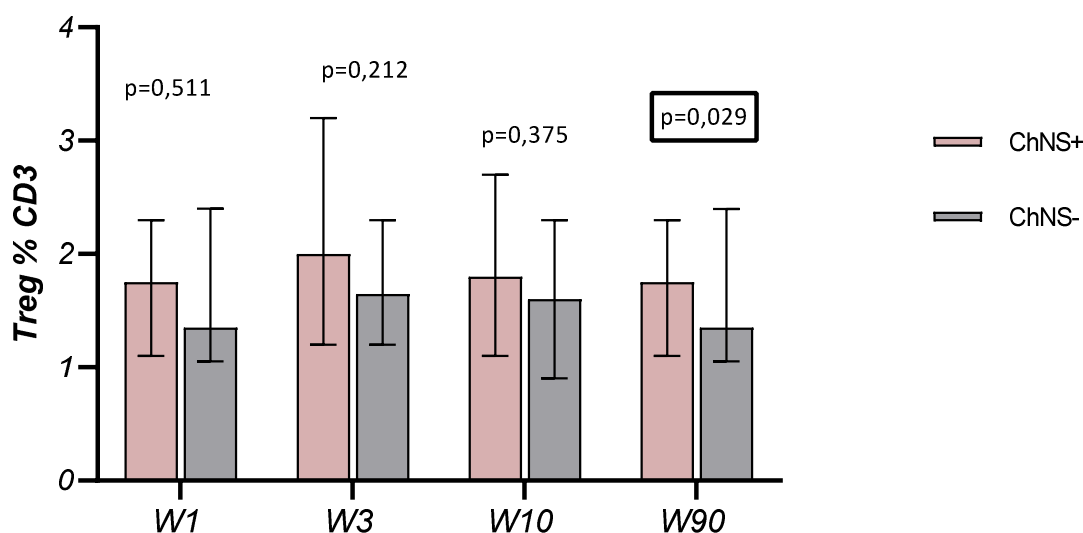
Rycina 25. Odsetek typu Helios+ w populacji limfocytów Treg w 1. dobie udaru u pacjentów chorych z rozpoznąną i bez rozpoznanej przed udarem cukrzycy. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy



Rycina 26. Odsetek limfocytów Tγδ w 10. dobie udaru u chorych z cukrzycą i bez cukrzycy w wywiadzie. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy

4.10.3 Choroba niedokrwienna serca

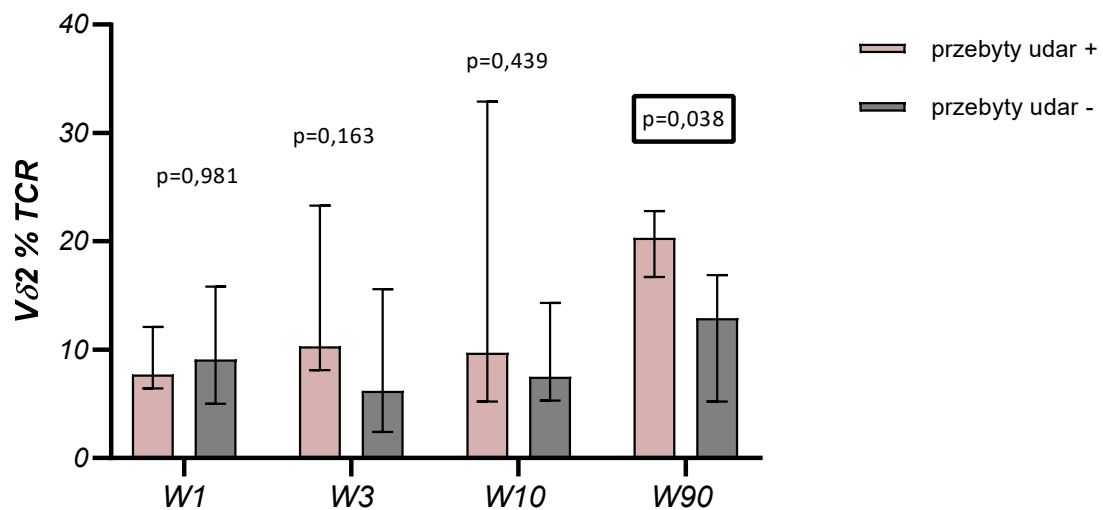
U osób z chorobą niedokrwienną serca (ch.n.s) w porównaniu z chorymi bez ch.n.s. odnotowano istotnie większy odsetek Treg w 90. dobie po udarze [odpowiednio: 1,8% (1,1-2,3) vs 1,4% (1,1-2,4); $p=0,03$] (rycina 27). W pozostałych ocenianych punktach czasowych po udarze nie wykazano różnic w zakresie tego parametru. Różnicy takiej nie wykazano również w grupie kontrolnej.



Rycina 27. Odsetek limfocytów Treg w populacji $CD3^+$ w 90. dobie udaru u pacjentów z (ChNS+) i bez (ChNS-) wywiadu choroby niedokrwiennej serca. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy

4.10.4 Przebyty udar niedokrwienny

Ponadto w 90. dobie udaru u chorych po przebytych w przeszłości udarach niedokrwinnym wykazano istotnie większy odsetek typu $V\delta 2$ w populacji limfocytów $T\gamma\delta$ niż u chorych bez tego czynnika ryzyka w wywiadzie [20,3 (16,7-22,8) vs 12,9 (5,2-16,9); $p=0,039$] (rycina 28). W pozostałych ocenianych punktach czasowych po udarze nie wykazano różnic w zakresie tego parametru. Różnicy takiej nie wykazano również w grupie kontrolnej.



Rycina 28. Odsetek typu Vδ2 w populacji limfocytów Tγδ w 90. dobie udaru u pacjentów z przebyłym udarem niedokrwiennym mózgu w wywiadzie i bez tego czynnika ryzyka. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy

5. DYSKUSJA

W prezentowanym badaniu podjęto próbę zbadania odpowiedzi wybranych subpopulacji limfocytów i komórek NK na ostre niedokrwienie ośrodkowego układu nerwowego. Oceniano zmiany w parametrach morfologicznych krwi, z oceną ilościową limfocytów Treg, T $\gamma\delta$, iNKT, limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ oraz komórek NK. Podjęto próbę analizy zmian ilościowych w kontekście deficytu neurologicznego ocenianego wg walidowanych skal, wystąpienia infekcji związanej z udarem i obecności czynników ryzyka udaru niedokrwinnego. Przedstawione wyniki dotyczą prospektywnego badania przeprowadzonego w warunkach *in vivo* u pacjentów z udarem niedokrwinnym oraz w grupie osób z czynnikami ryzyka chorób naczyniowych.

Szereg wcześniejszych badań i obserwacji wskazuje na istotny udział układu immunologicznego w przebiegu udaru niedokrwinnego. Większość z nich to badania eksperymentalne, przeprowadzone na modelach zwierzęcych. Pomimo rosnącej liczby obserwacji oceniających przebieg reakcji immunologicznych w trakcie udaru niedokrwinnego u ludzi w warunkach klinicznych, nadal nie uzyskano jednoznacznych danych na temat poszczególnych subpopulacji limfocytów. Niektórych aspektów opisanych w niniejszej pracy nie oceniano dotychczas w żadnym badaniu. Co więcej, w prezentowanej pracy zaobserwowano różnice istotne statystycznie w zakresie badanych subpopulacji komórek układu odpornościowego zarówno pomiędzy grupą z udarem niedokrwinnym a grupą kontrolną, jak i w obrębie grup.

Leukocyty, monocyty i granulocyty

W badaniu własnym wykazano zmienność wartości WBC w czasie jaki upłynął od początku udaru. W pierwszych dobach obserwowano zwiększenie liczby leukocytów, z najwyższymi wartościami w 3-ciej dobie, a następnie zmniejszenie ich liczby, z najniższymi wartościami w 90-tej dobie od udaru, jednak statystycznie istotna jest jedynie różnica między 1. a 90. dobą po udarze. Nie odnotowano różnic ilościowych między WBC chorych po udarze a grupą kontrolną. Wykazano także istotne statystycznie zmniejszenie odsetka monocytów i eozynofili w grupie chorych z udarem oraz zwiększenie odsetka neutrofilii w pierwszych dobach udaru w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki prezentowanego badania są w przeważającej części zbieżne z dotychczasowymi doniesieniami. Jak podają liczne w tym zakresie źródła – w pierwszych dobach udaru

niedokrwienego we krwi obwodowej obserwuje się leukocytozę z przewagą neutrofilii i monocytów [34,152-154]. W pionierskim badaniu Akopova i wsp. [155] przy użyciu badania SPECT wykazano intensywną akumulację wielojądrzastych leukocytów w obszarze niedokrwienia oraz jej związek z zwiększeniem obszaru uszkodzenia mózgu i gorszym przebiegiem udaru. Zbieżne wyniki uzyskali w badaniach o podobnej metodyce Pozilli i wsp. [156] oraz Wang i wsp. [157]. Wyniki te potwierdza także niemała liczba badań eksperymentalnych, w których infiltracje neutrofilii i innych komórek zapalnych do obszaru niedokrwienia obserwowano stosując zróżnicowaną metodykę: m.in. badania histologiczne [158-168], ocenę aktywacji mieloperoksydazy [158,159,169-171] czy radioaktywne znakowanie neutrofilii [172]. Ponadto w szeregu badań na materiale zwierzęcym prowokowana neutropenia prowadziła do zmniejszenia obszaru uszkodzenia niedokrwienego mózgu [166,173-178]. Dyskusję w tym temacie podjęli w 2002 roku Emerich i wsp. Podali oni w wątpliwość hipotezę traktującą obecność leukocytów, w tym neutrofilii w obszarze niedokrwienia, jako dowód na ich negatywny wpływ na przebieg udaru i na powiększenie ogniska niedokrwienia [179]. Zaprzeczyli także możliwości wysunięcia prostych wniosków płynących z badań eksperymentalnych, w których neutropenia była prowokowana za pomocą drastycznych metod farmakologicznych. W badaniach opartych na obserwacjach klinicznych odnotowano wyższy odsetek neutrofilii i monocytów u chorych z udarem w momencie przyjęcia do szpitala, a także wyższe bezwzględne wartości neutrofilii [154]. Wyniki podsumowano stwierdzeniem, iż leukocytoza, neutrofilia oraz aktywacja monocytów są dowodem na zapalną reakcję we krwi obwodowej w przebiegu udaru mózgu. Chamorro i wsp. wskazują na wzrost ilości krwinek białych u pacjentów z ciężkim udarem niedokrwinnym, zarówno monocytów jak i neutrofilii, tuż przed rozwinięciem objawów infekcji [136,141]. Z kolei Heusler i wsp. odnotowali znaczący wzrost WBC oraz granulocytów w udarze, przy braku różnic w liczbie monocytów [53]. Również Jiang i wsp. wśród chorych z udarem odnotowali wzrost liczby WBC w pierwszych dobach udaru [51]. Także Vogelgesang i wsp. stwierdzają, że po udarze wzrasta całkowita bezwzględna liczba leukocytów (wzrost w porównaniu z grupą kontrolną we wszystkich badanych punktach czasowych), jak również bezwzględna liczba oraz odsetek neutrofilów [49]. Adamski i wsp. opisują zwiększenie liczby neutrofilii, przy braku istotnego statystycznie zwiększenia liczby WBC oraz niezmięnionej liczbie monocytów [180]. Kaźmierski i wsp. odnotowali związek pomiędzy leukocytozą stwierdzaną przy przyjęciu do szpitala pacjenta z udarem a wewnątrzszpitalną śmiertelnością [149]. Natomiast Jickling i wsp. wykazali, że zwiększona

liczba neutrofili we krwi obwodowej wiąże się z ciężkim stanem klinicznym i rozległością ogniska niedokrwienia [181].

Najmniej doniesień istnieje na temat eozynofili w udarze niedokrwiennym. W badaniu O'Connella i Chang odnotowano zmniejszenie ich liczby w pierwszych godzinach udaru [50]. Guo i wsp. w badaniu klinicznym, którego celem było ustalenie roli granulocytów kwasochłonnych w udarze, podzielili pacjentów na grupy pod względem liczby eozynofili w czasie trwania udaru – m.in. na tych z wartościami w zakresie normy, podwyższonymi i obniżonymi – co ukazuje spektrum możliwych zmian liczby eozynofili w udarze [182]. Wyniki badania wskazywały na lepszy stan kliniczny w trzecim miesiącu od epizodu naczyniowego u tych chorych, którzy wykazywali wyższe wartości eozynofili w czasie udaru, w porównaniu z dwoma pozostałymi grupami. Z kolei w badaniu Wang i wsp. odnotowano ujemną korelację pomiędzy liczbą i odsetkiem eozynofili a oceną deficytu neurologicznego wyrażonego w skali NIHSS, uznając tym samym zwiększenie liczby granulocytów kwasochłonnych za czynnik prognozujący gorszy przebieg kliniczny udaru [183].

Zatem wyniki badania własnego nie odbiegają zasadniczo od dotychczasowych doniesień w przypadku ogólnej liczby leukocytów oraz neutrofili. Odnotowana zmienność liczby WBC w czasie jaki upłynął od udaru wskazuje na zaistnienie odpowiedzi pod postacią wzmożonej proliferacji leukocytów u pacjentów z udarem. Brak różnic ilościowych pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną może mieć związek z relatywnie niewysokimi wartościami liczby WBC w badanej grupie chorych (mediana w grupie chorych w 1. dobie $7,1 \times 10^3/\mu\text{l}$, w 3. dobie $7,6 \times 10^3/\mu\text{l}$, w grupie kontrolnej $6,8 \times 10^3/\mu\text{l}$).

W przypadku monocytów badacze częściej stwierdzali zwiększenie ich liczby oraz wzmożoną aktywację w pierwszych dobach udaru (z wyjątkiem jednego z przytoczonych badań, w którym nie odnotowano różnicy względem grupy kontrolnej [53]). Brak zwiększenia odsetka monocytów w przedstawionym badaniu może tłumaczyć opisywane zjawisko intensywnej infiltracji monocytów do obszaru niedokrwienia, stąd względnie mniejsza ich liczba mierzona we krwi obwodowej. Nieliczne doniesienia na temat eozynofili w udarze nie pozwalają na rzetelne porównanie badań własnych z wynikami innych badaczy. Zmniejszenie ich liczby może mieć związek z ich migracją do obszaru niedokrwienia i

toczącego się zapalenia, jako że coraz lepiej poznana jest ich aktywna rola w procesie zapalnym [184].

Limfocyty

W przedstawionym badaniu wykazano, że w fazie ostrej i podostrej udaru maleje liczba bezwzględna limfocytów krwi obwodowej oraz odsetek limfocytów względem WBC w porównaniu z wartościami obserwowanymi w grupie kontrolnej. Natomiast liczba bezwzględna i odsetek limfocytów $CD4^+$ i $CD8^+$ w odniesieniu do limfocytów $CD3^+$ ani nie różnił się od wartości uzyskanych w grupie kontrolnej, ani nie zmieniał istotnie w czasie, jaki upłynął od udaru. W badaniach na modelach zwierzęcych Prass i wsp. [66] oraz Offner i wsp. [109] odnotowali nagłą, zachodzącą w ciągu kilku godzin od początku udaru niedokrwienego, apoptozę limfocytów prowadzącą do zmniejszenia ich liczby we krwi obwodowej i w obwodowych narządach limfatycznych. W badaniach klinicznych limfopenię w zakresie limfocytów T ($CD3^+$) pojawiającą się w ciągu kilku godzin od początku udaru obserwowali m.in. Chamorro i wsp. [152], Ross i wsp. [154], Haeusler i wsp. [53], Klehmet i wsp. [185] oraz Adamski i wsp. [180], przy czym Adamski i wsp. nie odnotowali istotnego statystycznie zmniejszenia liczby $CD4^+$ i $CD8^+$, natomiast Haeusler i wsp., Klehmet i wsp. oraz Vogelgesang i wsp. obserwowali szybko pojawiające się zmniejszenie w zakresie limfocytów T $CD4^+$, przy braku istotnej różnicy w zakresie limfocytów T $CD8^+$ [49,53,185]. Zaobserwowana przez nich limfopenia $CD4^+$ pojawiła się w pierwszych godzinach udaru i trwała przez co najmniej 6 dni. Chao Jiang i wsp. wykazali zmniejszenie odsetka limfocytów T $CD4^+$ i $CD8^+$ w populacji limfocytów $CD3^+$ w ostrej fazie udaru [51]. Prass i wsp. wskazali na przesunięcie proporcji w populacji limfocytów $CD4^+$ w kierunku Th2. Liesz i wsp. [110] wykazali jednocześnie zmniejszenie liczby limfocytów $CD4^+$ i $CD8^+$. Natomiast Hug i wsp. odnotowali niezmienny status ilościowy w zakresie limfocytów $CD4^+$ [112].

Wyniki badań własnych są tylko częściowo spójne z dotychczasowymi doniesieniami. Niemniej w badaniu własnym potwierdzono związek poudarowej leukocytozy i limfopenii z gorszym stanem klinicznym, jak również wykazano niższy odsetek limfocytów oraz większą liczbę leukocytów w ostrej i podostrej fazie udaru u chorych, którzy rozwinęli SAI. Wykazano również istotny związek pomiędzy stanem klinicznym a odsetkiem limfocytów $CD4^+$ i $CD8^+$. Większy odsetek limfocytów T pomocniczych $CD4^+$ w fazie ostrej i podostrej udaru mózgu koreluje z lepszym stanem klinicznym chorych w tym okresie, podczas gdy większy odsetek limfocytów T cytotoksycznych $CD8^+$ ma związek z gorszym stanem

neurologicznym. Związek pomiędzy głębokością limfocytopenii a ryzykiem rozwinięcia infekcji związanej z udarem opisywali także Vogelgesang i wsp. obserwując u osób z poprawą kliniczną znaczącą limfocytopenię (wyrażoną w liczbie bezwzględnej i odsetku), jak i wzrost bezwzględnej liczby limfocytów $CD4^+$ u pacjentów w lepszym stanie klinicznym w porównaniu z tymi w gorszym stanie klinicznym [186]. Biorąc pod uwagę zachodzące w udarze niedokrwiennym zmiany proporcji limfocytów, z dominacją $CD4^+$, a pośród nich przewagi neuroprotekcyjnego typu Th2, uzyskany wynik potwierdza korzyść płynącą z tego zjawiska. Należy tu nadmienić, że brak różnic ilościowych w populacji limfocytów $CD4^+$ i $CD8^+$ może wynikać z doboru grupy kontrolnej, która w niniejszym badaniu była obciążona czynnikami ryzyka podczas gdy w cytowanych publikacjach grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy. Zatem wyniki badania własnego, w świetle których limfopenia ma charakter odpowiedzi na udar niedokrwienny, korespondują z licznymi dotychczasowymi doniesieniami naukowymi. Z kolei przedstawione powyżej dotychczasowe doniesienia dotyczące wartości limfocytów $CD4^+$ i $CD8^+$ nie są jednoznaczne, a potwierdzony w niniejszym badaniu brak różnic ilościowych w tym zakresie wpisuje się w spektrum dotychczasowych rozbieżności.

Ponadto wykazano istotną dodatnią korelację między stężeniem CRP ocenianym w 1., 3. i 10. dobie udaru a odsetkiem limfocytów $CD8^+$ w 1. dobie udaru, co wskazuje na niekorzystny wpływ limfocytów $CD8^+$, przyczyniający się do rozwoju infekcji w przebiegu udaru. Istotna ujemna korelacja zachodzi między odsetkiem limfocytów $CD4^+$ w 1. dobie a stężeniem CRP w 10. dobie udaru. To dodatkowo ukazuje, iż zaburzenie proporcji $CD4^+/CD8^+$ na niekorzyść tych pierwszych, przyczynia się do rozwoju stanu zapalnego w udarze. Niemniej w badaniu własnym nie potwierdzono, by chorzy z SAI różnili się pod względem liczby krążących limfocytów $CD4^+$ i $CD8^+$. Z drugiej strony wykazana korelacja wskazuje na możliwy bezpośredni wpływ CRP na poszczególne populacje limfocytów T w udarze. Bezpośrednią interakcją białka ostrej fazy z komórkami odpowiedzi nabytej zajmowano się od wielu lat i w oparciu o patologię różnych jednostek chorobowych poszukiwano elementu mediującego, tj. komórek pośredniczących lub receptorów dla CRP na limfocytach T [187-189]. Jak ukazano w badaniu Yoshidy i wsp. w przypadku pacjentów z czerniakiem istnieje możliwość wiązania się CRP z aktywowanymi limfocytami $CD4^+$ i $CD8^+$ oraz hamowania ich proliferacji, ekspansji (limfocytów $CD8^+$) i zdolności prezentacji antygeny [190]. A badanie Zhanga i wsp. wykazuje, iż bezpośrednio wiązanie CRP do

dziewiczych limfocytów $CD4^+$ wpływa na proporcje Th1/ Th2 i powoduje supresję Th1, a co za tym idzie reguluje zdolność odpowiedzi na tworzący się stan zapalny [191].

Zwiększenie odsetka limfocytów $CD8^+$ i zmniejszenie limfocytów $CD4^+$ odnotowano także w ostrej fazie udaru u chorych z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu z grupą chorych bez nadciśnienia. Udział układu immunologicznego w nadciśnieniu tętniczym jest coraz szerzej poznany, a w przypadku limfocytów T, to właśnie limfocytom $CD8^+$ przypisuje się niekorzystną i promującą nadciśnienie tętnicze rolę [192]. Niemniej inni badacze obserwowali zmniejszenie liczby $CD8^+$ w udarze u chorych z rozpoznaniem nadciśnienia tętniczym, przy braku różnicy limfocytów $CD4^+$, a także zmniejszenie limfocytów $CD8^+$ w przypadku osób z nadciśnieniem w grupie kontrolnej w porównaniu z tymi, bez rozpoznanego nadciśnienia tętniczego [180]. Wydaje się, że nie tylko zmiany ilościowe, ale przede wszystkim zwiększona aktywność komórek $CD8^+$ stwierdzona w badaniach eksperymentalnych, stanowi argument za ich patologicznym wpływem [193]. Stąd wniosek, iż limfocyty $CD8^+$ u chorych obciążonych nadciśnieniem tętniczym, aktywowane i produkujące cytokiny prozapalne mogą przyczyniać się do promocji stanu zapalnego w ostrej fazie udaru.

Limfocyty Treg

W niniejszym badaniu nie stwierdzono różnic pomiędzy liczbą bezwzględną i odsetkiem limfocytów Treg w odniesieniu do populacji limfocytów $CD3^+$ u chorych po udarze mózgu w porównaniu z grupą kontrolną, nie wykazano również zmiany badanego parametru w czasie, jaki upłynął od udaru. Wyniki uzyskane w badaniach eksperymentalnych wskazują na zwiększenie liczby limfocytów Treg we krwi obwodowej w fazie ostrej udaru [109,110]. Niemniej badania kliniczne nie są źródłem już tak jednoznacznych doniesień. Rezultaty spójne z eksperymentalnymi przedstawili Jiang i wsp. oraz Yan i wsp., którzy zwiększenie odsetka limfocytów Treg w populacji limfocytów $CD4^+$ wykazali w 1., 3. i 7. i 21. dobie po udarze [51,113,114]. Z kolei inni badacze raportowali u chorych ze świeżym udarem niedokrwiennym zmniejszenie liczby limfocytów Treg w populacji limfocytów $CD4^+$ [52,87,111]. Największa redukcja dotyczyła liczby aktywowanych limfocytów Treg $CD39^+$ [87]. Możliwe, że rozbieżności pojawiające się w dotychczasowych doniesieniach wynikają z odrębności metodologicznych (zróżnicowane definiowanie funkcjonalne subpopulacji limfocytów), niejednorodnych grup kontrolnych (są to zdrowi ochotnicy lub chorzy obciążeni

ostrymi chorobami naczyniowymi (TIA, zawał mięśnia sercowego), a także biologiczną różnorodnością funkcji poszczególnych subpopulacji limfocytów Treg.

W przedstawionym badaniu po raz pierwszy zaobserwowano w ostrej i podostrej fazie udaru stopniowe zmniejszenie odsetka krążących limfocytów Treg Helios⁺ w populacji limfocytów Treg i jednocześnie sukcesywne zwiększanie, zarówno wartości bezwzględnych, jak i odsetka limfocytów Treg Helios⁻. Wartości te, badane w 90. dobie, nie różniły się od obserwowanych w kontroli, jednak ze względu na lukę czasową między 10. a 90. dobą nie wiadomo, w którym momencie zaczęły się normalizować.

Limfocyty Treg Helios⁺ oraz Helios⁻ są aktualnie przedmiotem intensywnych badań, a dzielące je różnice fenotypowe oraz funkcjonalne nie zostały ostatecznie poznane. Analiza ekspresji genów wykazała, że te dwie populacje różni około 1 tysiąc genów. Przy czym nie można wykluczyć, że Helios⁻ są populacją prekursorową, która pod wpływem czynnika aktywującego nabywa cech typowych dla Helios⁺. Wydaje się, że limfocyty Treg Helios⁺ mimo, że fenotypowo zbliżone do Helios⁻, to jednak posiadają więcej antygenów powierzchniowych charakterystycznych dla aktywowanych limfocytów Treg o właściwościach supresorowych. Z kolei subpopulacja limfocytów Treg H⁻ wydziela więcej IFN- γ . W dużym uproszczeniu przyjmuje się, że limfocyty Treg H⁺ pełnią funkcję przede wszystkim supresorową, podczas gdy subpopulacja Treg H⁻ ma charakter bardziej prozapalny. Co interesujące, limfocyty Treg H⁺, wytwarzane są z komórek dziewiczych, ale w warunkach limfopenii mogą przyjmować fenotyp o niskiej ekspresji czynnika Helios, a także charakteryzować się mniejszą stabilnością i utratą czynnika FoxP3 [80]. Limfopenia jest cechą ostrej fazy udaru, zatem obserwowane w niniejszym badaniu zwiększenie liczby Treg H⁻ i zmniejszenie Treg H⁺ jak najbardziej potwierdza obserwowane w innych sytuacjach klinicznych zachowanie limfocytów Treg pod względem ekspresji tego czynnika transkrypcyjnego. Ponadto, wydaje się na podstawie własnej obserwacji, że przesunięcie między subpopulacjami Treg H⁺ i H⁻ może mieć znaczenie kliniczne. Wykazano bowiem, że większy odsetek krążących limfocytów Treg H⁺ w fazie ostrej i późnej udaru ma związek z gorszym stanem klinicznym w fazie rekonwalescencji, a chorzy, którzy rozwinęli SAI mieli w 3. dobie udaru istotnie większy odsetek Treg H⁺ i istotnie mniejszy odsetek Treg H⁻ niż osoby SAI-. Nie możemy oczywiście określić co jest przyczyną, a co skutkiem, ale wydaje się, że to przede wszystkim funkcja supresorowa limfocytów Treg jest klinicznie niekorzystna, a

zwiększenie odsetka „prozapalnych” limfocytów Treg H^- w obliczu limfopenii może mieć znaczenie kompensujące ten niekorzystny efekt.

Ponadto, w 1. dobie po udarze u kobiet stwierdzono statystycznie istotne przesunięcie limfocytów Treg w kierunku prozapalnego fenotypu H^- , a w grupie mężczyzn – przesunięcie limfocytów Treg w kierunku prosupresorowego fenotypu H^+ . Dotychczasowe doniesienia w zakresie aktywności supresorowej limfocytów Treg w udarze nie były spójne [112,114]. Stwierdzano jednak różnice odpowiedzi Treg związane z płcią w innych sytuacjach klinicznych [194,195]. W jednym z badań odnotowującym zwiększenie liczby limfocytów Treg we krwi obwodowej po udarze, zauważono, że efekt ten dotyczy mężczyzn, jednocześnie wykazując u kobiet zredukowane zdolności supresorowe limfocytów Treg [42]. Również w badaniu własnym stwierdzono u kobiet w 1. dobie po udarze statystycznie istotne przesunięcie limfocytów Treg w kierunku prozapalnego fenotypu H^- , a w grupie mężczyzn – przesunięcie limfocytów Treg w kierunku prosupresorowego fenotypu H^+ . Łącząc powyższe informacje z doniesieniami na temat gorszego przebiegu udaru u kobiet w porównaniu z mężczyznami [196], uzasadnione wydaje się uwzględnienie płci jako czynnika istotnie różnicującego odpowiedź limfocytów Treg w udarze. Wydaje się, że prezentowane badanie stanowi istotny głos w dyskusji na temat janusowego oblicza limfocytów Treg w ostrej fazie udaru, z argumentami na rzecz ich negatywnej i uszkadzającej roli. W dostępnych danych z piśmiennictwa brak jest informacji na temat zmian ekspresji markera Helios w limfocytach Treg w udarze – w tej materii przedstawione badanie należy uznać za pionierskie.

W badaniu własnym zaobserwowano w ostrej fazie udaru większy odsetek limfocytów Treg w populacji limfocytów $CD3^+$ u chorych z głębszym deficytem neurologicznym. Różnice w odpowiedzi immunologicznej w zależności od nasilenia objawów klinicznych udaru odnotowywano już wcześniej [74], jednakże uzyskane wyniki były zróżnicowane; zarówno Urrea i wsp. [52] jak i Ruhnau i wsp. [87] nie odnotowali związku pomiędzy nasileniem neurologicznego deficytu po udarze a liczbą limfocytów Treg. Natomiast w badaniu Santamarii-Cadavid i wsp. potwierdzono zwiększenie liczby krążących limfocytów Treg w 48. godzinie od udaru, co wiązało się z lepszym stanem funkcjonalnym [197]. Ponadto u pacjentów z niższymi wartościami limfocytów Treg w 2. dobie udaru częściej dochodziło do wczesnego pogorszenia stanu neurologicznego i większe było ryzyko poudarowej infekcji, podczas gdy u chorych z wyższymi wartościami limfocytów Treg w 48., 72. godzinie i 7. dobie udaru stwierdzano mniejszą niepełnosprawność ruchową (niższy

wynik w skali mRS) w 3 miesiące po udarze. Rozbieżności mogą wynikać z odmiennej metodologii. W badaniu Santamarii-Cadavid i wsp. do grupy badanej rekrutowano chorych zarówno z udarem niedokrwiennym, jak i krwotocznym, a w badaniu Urry i wsp. z grupy badanej wykluczono chorych prezentujących objawy infekcji.

Odnotowano również zwiększenie odsetka limfocytów Treg H^+ w ostrej fazie udaru u chorych z cukrzycą typu 2 w porównaniu z pacjentami bez cukrzycy. Nie wykazano różnic w zakresie tego parametru w kolejnych fazach udaru oraz w grupie kontrolnej. Zwiększona liczba prosupresorowych limfocytów Treg u cukrzyków może świadczyć o ich funkcji ochronnej, w przebiegu zarówno samej choroby, łączącej się z przewlekłym zapaleniem, jak i współistniejącego udaru niedokrwiennego [198]. I choć w cukrzycy typu 2 zakładano podobny, ochronny efekt limfocytów Treg jak w cukrzycy typu 1, dotychczasowe badania nie potwierdzają tej hipotezy [199]. Co więcej, w badaniu, w którym podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmu stojącego za zwiększonym ryzykiem choroby niedokrwiennej serca u osób z cukrzycą typu 2, nie stwierdzono zwiększonej liczby limfocytów Treg we krwi obwodowej [198].

Jednak w badaniu własnym w grupie osób z udarem i rozpoznaną cukrzycą przeważali mężczyźni (80%), a to właśnie w grupie mężczyzn stwierdzono w 1-szej dobie wyżej opisane przesunięcie w kierunku limfocytów Treg H^+ . Zatem nie można wykluczyć, że czynnikiem wpływającym na tę różnicę jest płeć. Niestety liczebność grupy badanej nie pozwala na przeprowadzenie analiz statystycznych, wskazujących na ile płeć czy obciążenie cukrzycą, niezależnie od siebie i innych czynników ryzyka chorób naczyniowych, ma związek ze stanem ilościowym limfocytów Treg po udarze, co stanowi jedno z ograniczeń niniejszego badania.

U osób z chorobą niedokrwinną serca w porównaniu z chorymi nieobciążonymi tym schorzeniem, odnotowano zwiększenie odsetka Treg w fazie rekonwalescencji. W pozostałych ocenianych punktach czasowych po udarze nie wykazano różnic w zakresie tego parametru. Różnicy takiej nie wykazano również w grupie kontrolnej. Wyniki te są zbieżne z dotychczasowymi badaniami, które donoszą o ochronnej funkcji limfocytów Treg w przebiegu miażdżycy, leżącej u podłoża choroby niedokrwiennej serca [200,201], oraz wskazują na związek pomiędzy redukcją liczby limfocytów Treg a wystąpieniem ostrego epizodu niedokrwinnego [202,203]. Co prawda w przytoczonych badaniach opisywano zwiększenie ryzyka zawału serca jako ostrego epizodu

niedokrwiennego, a nie potwierdzono takiego efektu dla udaru mózgu, niemniej jednak, różnice ilościowe w badaniu własnym pokrywają się z opisywanymi trendami. Niemniej, również i w tym zakresie, wyniki badań są niespójne. W dużym prospektywnym badaniu kohortowym, do którego nie włączono chorych z cukrzycą, osoby z niską proporcją limfocytów Treg do ogólnej puli limfocytów krwi obwodowej cechowały się mniejszym ryzykiem zawału serca [204]. Związek ten, tracił jednak statystyczną istotność, gdy do modelu włączono inne czynniki ryzyka chorób naczyniowych, co ponownie pokazuje, że jednoznaczne wskazanie takiego czynnika, który miałby niepodważalny, ścisły związek z liczbą krążących limfocytów Treg nie jest oczywiste. Jak dotąd nie potwierdzono też związku między liczbą krążących komórek Treg a miażdżycą tętnic szyjnych i wieńcowych [205].

Nie wykazano różnic w wartościach badanych parametrów limfocytów Treg między chorymi obciążonymi migotaniem przedsionków, nadciśnieniem tętniczym, hiperlipidemią, paleniem papierosów, przebytym udarem mózgu, a chorymi bez tych obciążeń, zarówno w grupie po udarze, jak i w grupie kontrolnej. Podobnie Yan i wsp. nie stwierdzili u chorych z udarem wpływu nadciśnienia tętniczego, cukrzycy lub palenia papierosów, na liczbę limfocytów Treg krwi obwodowej [113].

Limfocyty $T\gamma\delta$

W badaniu własnym nie wykazano różnic odsetka limfocytów $T\gamma\delta$ w odniesieniu do populacji limfocytów $CD3^+$ u chorych po udarze mózgu w porównaniu z grupą kontrolną, ani różnic w czasie, jaki upłynął od udaru. Niemniej jednak odnotowano istotne statystycznie zmniejszenie liczby bezwzględnej limfocytów $T\gamma\delta$ w fazie ostrej i podostrej udaru oraz zmniejszenie odsetka podtypu V δ 2 w populacji limfocytów $T\gamma\delta$ u chorych w fazie ostrej i podostrej udaru mózgu w porównaniu z grupą kontrolną, a to właśnie podtyp V δ 2 dominuje ilościowo u osób dorosłych oraz w krwi obwodowej, podczas gdy V δ 1 jest w przewadze zaraz po urodzeniu oraz występuje przede wszystkim w błonach śluzowych i w wątrobie. Wynik ten koresponduje z wynikami badania Adamskiego i wsp., które wykazało zmniejszenie liczby krążących limfocytów $T\gamma\delta$ w udarze w porównaniu z grupą kontrolną, jednocześnie wykazując zwiększenie aktywności ich produktu, IL-17A [180]. Dla odmiany Hu i wsp. wraz ze zwiększeniem ilości IL-17A opisali zwiększenie liczby krążących limfocytów $T\gamma\delta$ w 7. i 28. dobie udaru [68]. Możliwe, że uwzględnienie subpopulacji limfocytów $T\gamma\delta$ byłoby odpowiedzią na rozbieżności wynikające z dotychczasowych doniesień.

Biorąc pod uwagę wyniki badań eksperymentalnych, stwierdzających obecność limfocytów T $\gamma\delta$ w obszarze *penumbry* oraz badań pośmiertnych chorych z udarem, w których potwierdzono obecność limfocytów T $\gamma\delta$ w oponach mózgowych, wykazane zmniejszenie liczby tych komórek we krwi obwodowej może oznaczać ich zaangażowanie w lokalizacji ośrodkowej [116,123,206].

Badania eksperymentalne, w których ograniczenie liczby limfocytów T $\gamma\delta$ prowadziło do redukcji obszaru niedokrwienia i korzystnie wpływało na ostateczny stan kliniczny chorych, potwierdziły niekorzystną, prozapalną funkcję limfocytów T $\gamma\delta$ w udarze niedokrwiennym, wynikającą przede wszystkim z syntezy prozapalnej IL-17A [59,123,124].

Co więcej, w badaniu własnym również wykazano, iż mniejszy odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej w fazie podostrej udaru ma związek z gorszym stanem klinicznym pacjentów w fazie rekonwalescencji, co może potwierdzać hipotezę, że mniejsza liczba limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej wynika z przemieszczenia ich do strefy udaru i ich niekorzystnego działania ośrodkowego. Wiadomo, że komórki dendrytyczne bardzo wcześnie napływające do strefy niedokrwienia są źródłem IL-23, poprzez którą stymulują aktywację limfocytów T $\gamma\delta$, pobudzając je do syntezy prozapalnej IL-17 i intensywnej rekrutacji neutrofili do obszaru zawału. Wydaje się, że jest to podstawowa sekwencja odpowiedzi wrodzonej, która ściśle wiąże limfocyty T $\gamma\delta$ z destrukcją tkanki nerwowej.

Chociaż we wcześniejszych publikacjach nie określano wpływu limfocytów T $\gamma\delta$ na stan kliniczny i deficyt neurologiczny, to wyniki badania własnego mogą wskazywać na ich znaczenie również w długofalowej odpowiedzi na udar niedokrwienny [180]. Potwierdzeniem tego efektu jest obserwacja, iż u chorych z wywiadem przebytego w przeszłości udaru niedokrwiennego wykazano istotny statystycznie wzrost odsetka typu V δ 2 w populacji limfocytów T $\gamma\delta$ w fazie rekonwalescencji w stosunku do chorych bez tego czynnika ryzyka w wywiadzie.

Nie bez znaczenia pozostaje wpływ czynników ryzyka chorób naczyniowych na odpowiedź limfocytów T $\gamma\delta$. W przedstawionym badaniu wykazano istotne statystycznie zmniejszenie ich odsetka w fazie podostrej udaru u chorych z cukrzycą typu 2 w porównaniu z chorymi bez cukrzycy. W jednym z nielicznych, dotychczasowych badań klinicznych oceniających udział limfocytów T $\gamma\delta$ w chorobach stanowiących czynniki ryzyka udaru wykazano zmniejszenie liczby limfocytów T $\gamma\delta$ u osób powyżej 60 r.ż., z chorobą

niedokrwienną serca w wywiadzie, a przede wszystkim u chorych z nadciśnieniem tętniczym [180]. Wiadomo, że limfocyty $T\gamma\delta$ syntetyzują cząstki o potwierdzonej roli we włóknieniu ściany naczyń i tym samym w rozwoju nadciśnienia tętniczego jak: wymieniana wcześniej IL-17, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ czy CCL5. Niewykluczone, że to zaangażowanie limfocytów $T\gamma\delta$ w patologię powyższych chorób, będących jednocześnie czynnikami ryzyka chorób naczyniowych stanowi wyjaśnienie wykazanej korelacji. I choć powiązanie układu immunologicznego z nadciśnieniem tętniczym, miażdżycą naczyń czy cukrzycą, nie jest już dziś zaskakujące, to dokładne mechanizmy i role poszczególnych populacji nie są dobrze poznane [192,198].

Limfocyty iNKT

W badaniu własnym obserwowano istotne statystycznie zwiększenie odsetka krążących limfocytów iNKT w odniesieniu do populacji limfocytów $CD3^+$ u chorych w fazie ostrej i podostrej udaru niedokrwiennego mózgu w porównaniu z grupą kontrolną.

W jedynym dotychczasowym badaniu klinicznym Wong i wsp. nie odnotowali zmiany liczby iNKT we krwi obwodowej, ale potwierdzili znaczące zwiększenie aktywacji iNKT w przebiegu udaru, skorelowane dodatnio z nasileniem deficytu neurologicznego oraz z immunosupresją [1]. Na taką rolę limfocytów iNKT w udarze niedokrwiennym wskazuje także badanie przeprowadzone na materiale zwierzęcym przez tę samą grupę badaczy w 2011 [128]. Pozostałe prace eksperymentalne w tym zakresie, jedynie odnotowują obecność limfocytów NKT w obszarze niedokrwienia, wskazując na konieczność dookreślenia ich roli w udarze [45, 55, 135].

Wynik badania własnego nie koresponduje w pełni z rezultatami uzyskanymi przez Wong i wsp., należy jednak podkreślić liczne różnice w metodologii obu badań, które nie pozwalają na precyzyjne porównanie prac. Wong i wsp. z grupy badanej wykluczyli chorych z cukrzycą i limfopenią w wywiadzie. Takiego kryterium nie przyjęto w przedstawionym badaniu, a chorzy z rozpoznaną cukrzycą stanowili prawie 20% grupy badanej. Różnica dotyczy także grupy kontrolnej, która w badaniu własnym składała się z osób z rozpoznanymi czynnikami ryzyka chorób naczyniowych, natomiast w przypadku badania Wong i wsp. utworzono dwie grupy kontrolne, przy czym jedna stanowiła grupę osób zdrowych, druga – grupę osób hospitalizowanych z powodu objawów “udaropodobnych”, u których ostatecznie nie rozpoznano udaru, ani innej konkretnej

jednostki nozologicznej. Odmienny był też sposób bramkowania limfocytów iNKT. Niemniej jednak, zarówno zwiększenie odsetka limfocytów iNKT, jak i zwiększenie ich aktywacji, nasuwa zbieżne interpretacje dotyczące ich niekorzystnej roli w udarze. Tym bardziej, że podobnie jak w badaniu Wong i wsp., w przedstawionym badaniu wykazano związek między większą liczbą krążących limfocytów iNKT, a większym deficytem neurologicznym i niesprawnością.

Komórki NK

W badaniu własnym nie stwierdzono różnic odsetka komórek NK w odniesieniu do populacji limfocytów u chorych po udarze mózgu w stosunku do grupy kontrolnej, nie stwierdzono także zmian w czasie, jaki upłynął od udaru. Wynik ten pokrywa się z częścią przeprowadzonych do tej pory badań. Vogelgesang i wsp. nie stwierdzili różnic liczby bezwzględnej, jak i odsetka komórek NK w populacji limfocytów, u chorych po udarze mózgu w stosunku do osób zdrowych [49]. Podobne wyniki uzyskali Haeusler i wsp. [53], Urrea i wsp. [52], Yan i wsp. [113] oraz Xiao i wsp. [207]. De Raedt i wsp. opisali zwiększenie liczby komórek NK we krwi krążącej, ale tylko w grupie chorych rozwijających objawy poudarowej infekcji, a liczba komórek NK dodatnio korelowała z obszarem niedokrwienia [54]. Natomiast O'Connell i Chang odnotowali znaczące zmniejszenie liczby krążących we krwi komórek NK, najbardziej zaznaczone pomiędzy 5. a 24. godziną od początku objawów [50]. Podobnie Jiang i wsp. odnotowali zmniejszenie liczby komórek NK w pierwszym tygodniu od wystąpienia udaru [51]. Mimo, że w większości prac klinicznych, podobnie jak w badaniu własnym, różnice liczby komórek NK w krwi obwodowej w odniesieniu do grupy kontrolnej nie osiągały istotności statystycznej, to wydzielane przez komórki NK cytokiny zmieniają się istotnie, uczestnicząc przede wszystkim w poudarowej immunodepresji. Prace eksperymentalne wskazują na obecność komórek NK w strefie *penumbry* i zwiększenie ich liczby w niedokrwionej parenchymie, potwierdzając ich udział w powiększaniu tego obszaru poprzez promowanie martwicy neuronów [45,46,208].

W badaniu własnym, lepszy stan kliniczny w ostrej fazie koreluje z wyższym odsetkiem komórek NK krwi obwodowej w fazie podostrej udaru. Możliwe, że u chorych z udarem o lżejszym przebiegu klinicznym, zaangażowanie komórek NK w miejscu niedokrwienia jest mniejsze, zatem zwiększa się ich liczba we krwi obwodowej w fazie podostrej. Dotychczasowe hipotezy sugerowały szkodliwy wpływ komórek NK na przebieg udaru, a badania funkcjonalne komórek NK potwierdziły nagłą, zmniejszoną

wewnątrzkomórkową ekspresję prozapalnego IFN- γ i perforyny, co może zwiększać podatność na poudarowe infekcje [209]. Gan i wsp. [208] oraz De Raedt i wsp. [54] potwierdzili, że zwiększenie liczby krążących komórek NK w pierwszych godzinach po udarze, wiązało się z większą częstością infekcji związanej z udarem, sugerując przy tym ewentualną wartość predykcyjną komórek NK w kontekście wystąpienia SAI. W badaniu własnym takiego związku z SAI nie wykazano. Przy czym duża zmienność międzyosobnicza liczby krążących komórek NK przy braku danych na temat wartości tego parametru przed udarem, zasadniczo wyklucza zastosowanie go jako predyktora SAI. Opisywano także rozległą infiltrację komórek NK do obszaru niedokrwienia. Tak więc, przy licznych, potwierdzonych eksperymentalnie przesłankach teoretycznych na temat negatywnej roli komórek NK w udarze, nie zostało ustalone w badaniach klinicznych, czy efekt ten bardziej wynika z lokalnego działania tych komórek w obrębie niedokrwionej tkanki nerwowej, czy z ich dysfunkcji skutkującej ograniczoną obroną przed infekcjami.

Zarówno w badaniu własnym, jak i w pracy Any i wsp. nie wykazano różnic ilościowych w zakresie komórek NK między osobami obciążonymi typowymi czynnikami ryzyka chorób naczyniowych, a osobami bez tych obciążeń, zarówno w grupie po udarze jak i w grupie kontrolnej [113]. Może to świadczyć o tym, że dokumentowany w warunkach eksperymentalnych wpływ aktywacji komórek NK na rozwój m.in. nadciśnienia tętniczego czy cukrzycy, przy rozbieżnych wynikach badań klinicznych, może nie być czynnikiem tak kluczowym, aby można było wykazać jego rolę w liczącej kilkadziesiąt osób populacji [210].

Parametry subpopulacji limfocytów a typ etiologiczny i lokalizacja udaru określone wg klasyfikacji TOAST i OCSF

Zaskakujące jest, że nie wykazano różnic w zakresie badanych subpopulacji komórkowych w zależności od etiologicznego typu udaru czy lokalizacji ogniska. Przyjmując założenie, że procesy immunologiczne czasowo wyprzedzają wystąpienie objawów klinicznych, na co wskazuje towarzyszące wczesnej fazie udaru uruchomienie pełnej odpowiedzi nabytej, której można byłoby się spodziewać dopiero po ok. 7 dniach niedokrwienia, wydaje się uzasadnione, by spodziewać się istotnych różnic między udarem o etiologii zatorowej, w którym niedrożność naczynia następuje w sposób nagły, a udarem w przebiegu choroby dużych naczyń, gdzie krytyczne ograniczenie przepływu trwa dłużej, a samo naczynie objęte jest przewlekłym, zaawansowanym procesem zapalnym jakim jest miażdżyca. W badaniu własnym nie wykazano jednak różnic w zakresie badanych

subpopulacji w zależności od etiologii niedokrwienia ani lokalizacji ogniska. I w tym zakresie dotychczasowe doniesienia nie są spójne. Niemniej wydaje się, że w przeważającej części wskazują one na związek immunodepresji i podatności na infekcje, przede wszystkim, z objętością strefy niedokrwienia, a nie z konkretną lokalizacją [211]. Jest to zagadnienie o tyle frapujące, że w latach 80-tych i 90-tych ubiegłego wieku opisywano zjawisko większej poudarowej depresji układu współczulnego w przypadku niedowładów prawostronnych czy zajęcia kory wyspy, co spowodowane jest asymetryczną inervacją współczulną pólkul mózgowych [212,213]. Szlaki adrenergiczne łączące struktury ośrodkowe z obwodowymi odgrywają istotną rolę w unerwieniu immunokompetentnych narządów mięszowych i mobilizacji układu immunologicznego, co ma wpływ na poudarową odpowiedź zapalną. Niemniej, w niniejszej pracy nie oceniano różnic w subpopulacjach limfocytów przy uwzględnieniu lateralizacji ogniska i deficytu neurologicznego.

Infekcja związana z udarem (SAI)

W przedstawionym badaniu infekcję związaną z udarem rozwinęło 48% chorych. Uzyskany wynik wpisuje się w zakres przedstawiany w piśmiennictwie. W licznych badaniach klinicznych liczbę chorych z SAI określano w przedziale od 5% do 56% [49,51-53,214-219]. Tak znaczne rozbieżności wynikają przede wszystkim ze stosowania odmiennych definicji infekcji związanej z udarem.

W badaniu własnym wykazano istotny statystycznie wzrost stężenia CRP w grupie chorych w pierwszych dobach udaru w porównaniu z grupą kontrolną, a obserwacja ta potwierdza dotychczasowe doniesienia [51,53,150]. Ponadto, u pacjentów w gorszym stanie klinicznym obserwowano istotnie wyższe wartości CRP i liczby leukocytów oraz niższy odsetek i liczbę bezwzględną limfocytów we krwi obwodowej, co także jest zgodne z dotychczasowymi ustaleniami. Wg innych badaczy, m.in. Di Napoli i wsp. większe stężenie CRP oznaczało nie tylko większy deficyt neurologiczny i z tym związane większe ryzyko niepełnosprawności, ale także większe ryzyko śmierci lub komplikacji pod postacią kolejnych epizodów naczyniowo-sercowych w ciągu roku od udaru [150,221]. Autorzy zaproponowali wykorzystanie stężenia CRP jako wskaźnika kwalifikacji pacjentów do grup o wyższym lub niższym ryzyku niepomyślnego przebiegu udaru [222]. W badaniu Muir i wsp. stężenie CRP w surowicy w 72 godzinie od początku udaru okazało się być niezależnym predyktorem przeżycia [151].

W badaniu własnym wyższe wartości CRP i leukocytów, a niższe wartości limfocytów, występowały u chorych rozwijających infekcję (SAI+). Podobnych obserwacji dokonywali inni badacze [51], a zaprezentowanie powyższych wyników własnych jako zgodnych z powszechnymi naukowymi trendami stanowi swoistego rodzaju uwierzytelnienie pozostałych, pionierskich aspektów przeprowadzonego badania.

W badaniu własnym wykazano dodatnią korelację o umiarkowanie silnym związku pomiędzy odsetkiem limfocytów Treg w populacji CD3⁺ w 1. dobie udaru a CRP w 1., 3. i 10. dobie udaru. Do podobnych wniosków doszedł zespół Jiang i wsp. [51] wykazując związek pomiędzy infekcją, a podwyższonym odsetkiem limfocytów Treg oraz podwyższonym stężeniem CRP w surowicy. Z jednej strony obecność stanu zapalnego sama w sobie jest czynnikiem zmieniającym dynamikę odpowiedzi komórkowej w kierunku mechanizmów supresorowych, mających na celu wyciszenie reakcji immunologicznej, zatem spodziewamy się wzrastającej liczby subpopulacji limfocytów za to odpowiadającej (Treg), z drugiej strony korelacja markerów zapalnych z liczbą limfocytów Treg potwierdza zjawisko immunosupresji ułatwiającej rozwinięcie infekcji po udarze. Pozostaje zatem otwarte pytanie, która z obserwowanych zmiennych jest przyczyną, a która skutkiem. Należałoby w tym miejscu ponownie wspomnieć o możliwej bezpośredniej interakcji CRP z limfocytami T, a w tym i limfocytami T regulatorowymi, wzorując się na hipotezach formowanych w badaniach w dziedzinie onkologii [223]. I choć nadal nie daje to jasnej odpowiedzi na pytanie co było pierwsze, to z całą pewnością wskazuje na udział limfocytów Treg w zapaleniu związanym z udarem.

W prezentowanym badaniu wykazano, że w grupie chorych, którzy w związku z udarem rozwinęli infekcję (SAI+), istotnie statystycznie różnice w porównaniu z grupą SAI- także dotyczyły populacji limfocytów Treg. U chorych SAI+ w 3. dobie udaru wykazano istotnie większy odsetek limfocytów Treg Helios⁺ oraz istotnie mniejszy odsetek Treg Helios⁻. Co więcej, obserwując dynamikę zmian liczby komórek Treg H⁺ w czasie, zauważa się w fazie ostrej u pacjentów SAI-, że liczba komórek do 3. doby nieznacznie zmniejsza się, by zwiększyć się w kolejnych punktach czasowych, podczas gdy u pacjentów SAI+, tendencja jest początkowo wzrostowa (3. doba), a zmniejszenie liczby limfocytów Treg H⁺ następuje z opóźnieniem (10. doba), by w 90. dobie ponownie wzrosnąć (rycina 21). Tendencje zmienności liczby Treg H⁻ również zostają zaburzone w wyniku infekcji związanej z udarem, gdyż w odróżnieniu od pacjentów nieinfekcyjnych, u których liczba Treg Helios⁻ początkowo

zwiększa się (3. doba), by w fazie podostrej i rekonwalescencji stopniowo się zmniejszać, u pacjentów SAI+ wzrost występuje z opóźnieniem, bo dopiero w 10. dobie. Ta, jakoby opóźniona odpowiedź obu podtypów limfocytów Treg, pozwala nam, jak już wcześniej wspomniano, na dopatrywanie się szkodliwej i proinfekcyjnej roli w „supresorowym” typie H^+ limfocytów Treg, i pewnego rodzaju wyrównawczego efektu typu „prozapalnego” (H^-). Taki wynik nie został jeszcze zaprezentowany przez żadnego z badaczy, pomimo prowadzonych licznych obserwacji w temacie limfocytów Treg w infekcji związanej z udarem. Urrea i wsp. nie wykazali różnic w zakresie limfocytów Treg porównując pacjentów SAI+/SAI- (2., 7. i 90. doba) [52]. Z kolei Jiang i wsp. wykazali wyższy odsetek limfocytów Treg u pacjentów SAI+, w porównaniu z chorymi bez infekcji związanej z udarem, a wynik ten dotyczył 3. doby udaru [51]. Wyniki przeciwne, wskazujące na korelację mniejszej liczby krążących limfocytów Treg w 2. dobie udaru z większym ryzykiem infekcji u pacjentów z udarem uzyskano w badaniu Santamarii-Cadavid i wsp. [197]. W żadnym z wymienionych badań nie badano jednak limfocytów Treg z podziałem opartym o ekspresję markera Helios, co z punktu widzenia przedstawionych wyników wydaje się zmienną istotną.

Różnice statystycznie istotne wykazano także w przypadku limfocytów $T\gamma\delta$. Zmniejszenie ich odsetka w populacji limfocytów $CD3^+$ w fazie rekonwalescencji po udarze obserwowano w grupie chorych, którzy rozwinęli infekcję związaną z udarem (SAI+). Żadne z dotychczas opublikowanych badań nie odnosi się do liczby limfocytów $T\gamma\delta$ w związku z infekcją związaną z udarem.

Podobny efekt, a zatem istotne statystycznie zmniejszenie odsetka limfocytów $T\gamma\delta$ w populacji limfocytów $CD3^+$ w fazie rekonwalescencji obserwowano w grupie chorych, którzy otrzymali leczenie trombolityczne (rTPA+) w porównaniu z tymi nieleczonymi (rTPA-). Obserwacje innych badaczy sugerują kontrowersyjny, acz możliwy udział rTPA w uszkodzeniu bariery krew-mózg i promocji neurotoksyczności oraz jego znaczenie w aktywacji i wzmacnianiu odpowiedzi zapalnej, nasilającej wtórne uszkodzenie mózgu [50, 224]. Zmniejszenie odsetka $T\gamma\delta$ w populacji limfocytów $CD3^+$ w fazie rekonwalescencji w obu grupach chorych (SAI+ i rTPA+) wskazuje nie tylko na znaczącą rolę tej populacji w aspekcie zapalnym udaru niedokrwinnego, ale także na rolę limfocytów $T\gamma\delta$ w długofalowej odpowiedzi na udar.

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic ilościowych w odsetku limfocytów Treg, iNKT i komórek NK między grupami rTPA+ a rTPA-. W badaniu Mao i wsp.

wykazano, że zmniejszona liczba limfocytów Treg w krwi obwodowej utrzymuje się dłużej u osób leczonych rTPA, a ich eksperymentalne dożylne podanie po opóźnionym leczeniu trombolitycznym, dzięki wzmocnieniu bariery krew-mózg, zmniejsza powikłania krwotoczne i poprawia stan kliniczny w ocenie długoterminowej [115]. Natomiast Komurcu i wsp. [225] opisali obecność dynamicznych zmian m.in. w zakresie limfocytów i neutrofilii u pacjentów z udarem niedokrwinnym po leczeniu rTPA i/lub trombektomii mechanicznej, co wskazuje na istotność dalszych badań wpływu metod leczenia udaru na powiązane z nim zjawiska immunologiczne.

Wyniki dotychczasowych prac nad zagadnieniem udziału układu immunologicznego w patofizjologii udaru mózgu nie są spójne i jednoznaczne. Niewiele z nich można uznać za w pełni udowodnione, jeszcze mniej za aksjomatyczne. Jesteśmy jednak wciąż na początku tej trudnej, ale jak pokazują wstępne dane, niezwykle ważnej i interesującej drogi, zmierzającej ku wyjaśnieniu sekwencji zdarzeń w początkowych etapach udaru, które oddziałują na dalsze losy chorych, również w okresie rekonwalescencji.

5.1 Ograniczenia pracy

Opisane wyżej wyniki należy interpretować mając na uwadze szereg ograniczeń przedstawionego badania. Do najważniejszych z nich należy zaliczyć:

1. Jednoośrodkowy charakter przeprowadzonej obserwacji.
2. Niewielka liczebność grup uniemożliwiająca przeprowadzenie wieloczynnikowych analiz statystycznych, które pozwoliłyby potwierdzić niezależność wykazanych korelacji.
3. Dysproporcja grupy kontrolnej pod kątem jednego z czynników ryzyka- migotania przedsionków- spowodowana włączeniem do grupy kontrolnej głównie pacjentów stosujących kwas acetylosalicylowy, który przy prawidłowo prowadzonym leczeniu chorych z migotaniem przedsionków i innymi czynnikami ryzyka chorób naczyniowych jest znacznie rzadziej stosowany niż doustne leki przeciwkrzepliwe. Z uwagi na brak wykazanych różnic w zależności od obecności migotania przedsionków czy typu etiologicznego udaru wydaje się, że rozbieżność ta nie wpłynęła istotnie na przeprowadzone analizy.
4. Ocena parametrów laboratoryjnych jedynie w krwi obwodowej oraz zastosowanie tylko jednej metody oceny populacji limfocytów ograniczone do oceny ilościowej, bez oceny funkcjonalnej. Niemniej wybór metody był podyktowany przede wszystkim jej dostępnością i możliwością implementacji w codziennej praktyce klinicznej, w sytuacji, gdyby wyniki uzyskały istotną wartość predykcyjną.

6. WNIOSKI

1. Odpowiedź limfocytów T regulatorowych na udar niedokrwienny ma związek z ekspresją wewnątrzkomórkowego czynnika transkrypcyjnego Helios, cechuje się odmiennością w zależności od płci, a jej niekorzystny efekt wynika z przesunięcia ilościowego w kierunku typu Helios⁻ (prozapalnego), szczególnie u kobiet.
2. Wyciszająca się z opóźnieniem supresorowa funkcja limfocytów Treg (zwiększony odsetek Helios⁺) i opóźniona prozapalna aktywność (zmniejszony odsetek Helios⁻) może być przyczyną rozwinięcia SAI. Związek limfocytów Treg z SAI potwierdza dodatnia korelacja ich liczby w krwi obwodowej z wartościami laboratoryjnych wykładników zapalenia.
3. Rola limfocytów T $\gamma\delta$ w udarze wydaje się mieć charakter długofalowy, a niekorzystne efekty kliniczne widoczne są zarówno w fazie ostrej, jak i kilka miesięcy po przebytych udarze, i mogą być związane z ośrodkową aktywnością podtypu V δ 2. Na odległe w czasie zmiany ilościowe limfocytów T $\gamma\delta$ ma wpływ przebyty udar, przebyta infekcja związana z udarem oraz leczenie trombolityczne.
4. Możliwa jest niekorzystna rola limfocytów iNKT w udarze, gdyż zwiększenie ich liczby w krwi obwodowej w początkowym okresie udaru przekłada się na pogorszenie stanu klinicznego chorych, jednak mechanizm tej asocjacji pozostaje nieznany.
5. Dominacja limfocytów CD4⁺ w udarze jest korzystna i wiąże się z lepszym stanem klinicznym, podczas gdy przesunięcie proporcji w kierunku limfocytów CD8⁺ koreluje z gorszym stanem klinicznym i rozwojem SAI.

Badanie było finansowane ze środków na działalność statutową Katedry Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz z grantu NCN (nr 2014/15/B/NZ4/00736).

7. SPIS RYCIN

Rycina 1. Przykład oceny odsetka limfocytów Treg. A. limfocyty w układzie FSC/SSC, B. identyfikacja populacji limfocytów w oparciu o ekspresję CD3, C. limfocyty w oparciu o ekspresję CD4 ⁺ 25 ⁺ high, D. limfocyty w oparciu o ekspresję FoxP3, E. limfocyty w oparciu o ekspresję Helios	43
Rycina 2. Przykład oceny odsetka limfocytów Tγδ. A. limfocyty w układzie FSC/SSC, B. identyfikacja populacji limfocytów w oparciu o ekspresję CD3, C. limfocyty z TCRγδ, D. limfocyty Tγδ: Vδ1 i Vδ2	44
Rycina 3. Przykład oceny odsetka limfocytów iNKT. A. limfocyty w układzie FSC/SSC, B. identyfikacja populacji limfocytów w oparciu o ekspresję CD3, C. limfocyty Va24.....	45
Rycina 4. Przykład oceny odsetka komórek NK. A. limfocyty w układzie FSC/SSC, B. identyfikacja populacji komórek NK w oparciu o brak ekspresji CD3	46
Rycina 5. Przykład oceny odsetka limfocytów CD4 ⁺ /CD8 ⁺ . A. limfocyty w układzie FSC/SSC, B. identyfikacja populacji limfocytów w oparciu o ekspresję CD3, C. limfocyty CD4 ⁺ i CD8 ⁺	47
Rycina 6. Schemat klasyfikacji chorych do badania	49
Rycina 7. Schemat liczby chorych uczestniczących w kolejnych punktach czasowych badania	50
Rycina 8. Wartości WBC w ocenianych punktach czasowych w grupie chorych z udarem w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy.....	54
Rycina 9. Porównanie odsetka limfocytów Treg w kolejnych dobach udaru w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy	57
Rycina 10. Porównanie odsetka Helios ⁺ (a) i Helios ⁻ (b) w populacji limfocytów Treg u chorych z udarem w odniesieniu do grupy kontrolnej w każdym z ocenianych punktów w czasie. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy	58
Rycina 11. Porównanie wartości bezwzględnych limfocytów Treg Helios ⁻ u chorych z udarem w odniesieniu do grupy kontrolnej w każdym z ocenianych punktów w czasie. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy.....	59
Rycina 12. Porównanie odsetka Helios ⁺ oraz Helios ⁻ , w populacji limfocytów Treg z uwzględnieniem płci. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy	60

Rycina 13. Ocena ilościowa (wartości bezwzględne) limfocytów $T\gamma\delta$ w kolejnych dobach udaru w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy.....	60
Rycina 14. Odsetek limfocytów $T\gamma\delta$ w kolejnych dobach po udarze w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy	61
Rycina 15. Odsetek typu V δ 1 w populacji limfocytów $T\gamma\delta$ w grupie chorych w kolejnych dobach po udarze w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy	62
Rycina 16. Odsetek typu V δ 2 w populacji limfocytów $T\gamma\delta$ w grupie chorych w kolejnych dobach po udarze w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy	62
Rycina 17 a i b. Wartości bezwzględne (a) i odsetek limfocytów iNKT (b) w populacji limfocytów $CD3^+$ w grupie chorych w kolejnych dobach po udarze w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy	63
Rycina 18. Odsetek komórek NK w populacji limfocytów w kolejnych dobach udaru w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy.....	64
Rycina 19. Odsetek limfocytów $CD4^+$ i limfocytów $CD8^+$ w kolejnych dobach udaru w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy.....	65
Rycina 20. Liczba infekcji związanych z udarem (SAI) w kolejnych dobach udaru	66
Rycina 21. Porównanie odsetka Helios $^+$ (a) oraz Helios $^-$ (b) w populacji limfocytów Treg u pacjentów SAI+/SAI-. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy.....	69
Rycina 22. Odsetek limfocytów $T\gamma\delta$ w populacji limfocytów $CD3^+$ w 90. dobie udaru u pacjentów, którzy rozwinęli infekcję związaną z udarem (SAI+) i tych, którzy nie rozwinęli (SAI-). Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy	70
Rycina 23. Odsetek limfocytów $T\gamma\delta$ w populacji limfocytów $CD3^+$ w 90. dobie udaru u pacjentów, u których zastosowano leczenie trombolityczne (rTPA+) i tych, którzy nie otrzymali tego typu leczenia (rTPA-). Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy.....	75
Rycina 24. Odsetek limfocytów $CD4^+$ i $CD8^+$ w 1. dobie udaru u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (NT+) i bez nadciśnienia (NT-). Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartylowy.....	76

Rycina 25. Odsetek typu Helios+ w populacji limfocytów Treg w 1. dobie udaru u pacjentów chorych z rozpoznaną i bez rozpoznanej przed udarem cukrzycy. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartyłowy	77
Rycina 26. Odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ w 10. dobie udaru u chorych z cukrzycą i bez cukrzycy w wywiadzie. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartyłowy	77
Rycina 27. Odsetek limfocytów Treg w populacji CD3 ⁺ w 90. dobie udaru u pacjentów z (ChNS+) i bez (ChNS-) wywiadu choroby niedokrwiennej serca. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartyłowy	78
Rycina 28. Odsetek typu V δ 2 w populacji limfocytów T $\gamma\delta$ w 90. dobie udaru u pacjentów z przebyłym udarem niedokrwinnym mózgu w wywiadzie i bez tego czynnika ryzyka. Wartości wyrażono jako medianę i zakres międzykwartyłowy	79

8.SPIS TABEL

Tabela 1. Funkcje limfocytów Treg.....	17
Tabela 2. Mechanizmy działania limfocytów Treg	19
Tabela 3. Etiologiczna klasyfikacja udaru mózgu TOAST	31
Tabela 4. Wykaz procedur badawczych w poszczególnych punktach czasowych.....	33
Tabela 5. Skala oceny deficytów neurologicznych NIHSS	35
Tabela 6. Skandynawska Skala Udaru SSS	36
Tabela 7. Zmodyfikowana skala Rankin	37
Tabela 8. Charakterystyka przeciwciał użytych do oceny cytometrycznej	39
Tabela 9. Charakterystyka zastosowanych odczynników.....	41
Tabela 10. Populacje badanych komórek oraz sposób ich identyfikacji	42
Tabela 11. Charakterystyka chorych po udarze i grupy kontrolnej (GK).....	51
Tabela 12. Charakterystyka stosowanego leczenia w grupie chorych po udarze i w grupie kontrolnej	52
Tabela 13. Ocena deficytu neurologicznego i stopnia niepełnosprawności w wyznaczonych punktach czasowych	53
Tabela 14. Porównanie morfologii komórek krwi obwodowej w kolejnych ocenianych punktach czasowych w grupie chorych z udarem oraz w grupie kontrolnej (GK).....	55
Tabela 15. Porównanie wartości bezwzględnych badanych subpopulacji w kolejnych ocenianych punktach czasowych w grupie chorych z udarem oraz w grupie kontrolnej.....	56
Tabela 16. Wartości CRP u chorych z udarem i w grupie kontrolnej	66
Tabela 17. Korelacje wartości CRP ze stanem klinicznym chorych	67
Tabela 18. Korelacje liczby WBC oraz liczby bezwzględnej i odsetka limfocytów ze stanem klinicznym chorych.....	67
Tabela 19. Porównanie WBC, limfocytów i CRP w zależności od infekcji związanej z udarem SAI+/SAI-.....	68
Tabela 20. Korelacje limfocytów Treg z CRP.....	70
Tabela 21. Korelacje limfocytów CD4 ⁺ i CD8 ⁺ z CRP	71
Tabela 22. Korelacje parametrów limfocytów Treg ze stanem klinicznym	72
Tabela 23. Korelacje limfocytów iNKT ze stanem klinicznym	73
Tabela 24. Korelacje komórek NK ze stanem klinicznym	73
Tabela 25. Korelacje limfocytów CD4 ⁺ i CD8 ⁺ ze stanem klinicznym.....	74

9. WYKAZ SKRÓTÓW

α -GalCer	α -galaktozyloceramid
ACS	ostry zespół wieńcowy (<i>acute coronary syndrome</i>)
ADC	rzeczywisty współczynnik dyfuzji (<i>apparent diffusion coefficient</i>)
ADCC	cytotoksyczność komórek zależna od przeciwciał (<i>Ab-dependant cellular cytotoxicity</i>)
APC	komórki prezentujące antygen (<i>antigen presenting cells</i>)
APTT	czas kaolinowo-kefalinowy (<i>activated partial thromboplastin time</i>)
ASA	kwas acetylosalicylowy (<i>acetylosalicylic acid</i>)
ATP	adenozynotrifosforan
AQP4	akwaporyna 4
BCR	receptor komórek B (<i>B-cell receptor</i>)
BLIMP-1	czynn timeranskrypcji BLIMP-1 (<i>B lymphocyte-induced maturation protein-1</i>)
BMI	wskaźnik masy ciała (<i>body mass index</i>)
CCL	ligand chemokin posiadający motyw CC (<i>C-C motif chemokine ligand</i>)
CCR	receptor chemokin posiadających motyw CC (<i>C-C Motif Chemokine Receptor</i>)
CE	sercowo-naczyniowy (<i>cardioembolic</i>)
ChNS	choroba niedokrwienna serca
CM T $\gamma\delta$	komórki T $\gamma\delta$ pamięci centralnej (<i>central memory T$\gamma\delta$</i>)
CMV	cytomegalowirus (<i>cytomegalovirus</i>)
cNK	konwencjonalne komórki NK (<i>conventional NK cells</i>)
CRP	białko stanu zapalnego (<i>C-reactive protein</i>)
CTLA-4	antygen 4 cytotoksycznych limfocytów (<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>)
CXCL	białko należące do chemokin (<i>C-X-C motif ligand</i>)
DAMP	cząstki wzorca molekularnego związanego z zagrożeniem (<i>danger associated molecular patterns</i>)
DC	komórki dendrytyczne (<i>dendritic cells</i>)
DCLN	głębokie szyjne węzły chłonne (<i>deep cervical lymph nodes</i>)
DM	cukrzyca (<i>diabetes mellitus</i>)
DWI	obrazowanie zależne od dyfuzji (<i>diffuse-weighted imaging</i>)
EBV	wirus mononukleozy (<i>Epstein-Barr virus</i>)
EAE	eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu (<i>experimental autoimmune encephalitis</i>)
FACS	cytometria fluorescencyjna (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FASL	ligand apoptotycznego receptora Fas (<i>fas receptor ligand</i>)
FLAIR	odzyskiwanie inwersyjne osłabione przez płyn (<i>fluid -attenuated inversion recovery</i>),
FoxP3	czynn timeranskrypcyjny FoxP3 (<i>forkhead/winged-helix transcription factor box P3</i>)
GATA-3	czynn timeranskrypcyjny GATA-3 (<i>GATA binding protein 3</i>)
GD3	disialogangliozyd
GITR	receptor indukowanego glukokortykoidami czynn timerantwirocy nowotworu (<i>glucocorticoid induced tumour necrosis factor receptor related protein</i>)
GM-CSF	czynn timerstimulujący tworzenie koloni granulocytów i monocytów (<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HBV	wirus zapalenia wątroby typu B (<i>hepatitis B virus</i>)
HCV	wirus zapalenia wątroby typu C (<i>hepatitis C virus</i>)
HIV	ludzki wirus upośledzenia odporności (<i>human immunodeficiency virus</i>)
HLA-DR	ludzkie antygeny leukocy tarne (<i>human leukocyte antigen complex</i>)
HMGB1	białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej (<i>High-Mobility Group Box-1</i>)

HSC /HSPC	komórka macierzysta krwiotworzenia (<i>hematopoietic stem/progenitor cell</i>)
HSV-1 i 2	wirus opryszczki (<i>Herpes Simplex Virus</i>)
IFN	interferon(<i>interferon</i>)
iGb3	izoglobotrihexozyloceramid
ILC	wrodzone komórki limfoidalne (<i>innate lymphoid cells</i>)
IL	interleukina(<i>interleukin</i>)
INR	międzynarodowy współczynnik znormalizowany (<i>international normalized ratio</i>)
IP	proteina
IPEX	(<i>immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome</i>)
IRF-	czynniki regulacji interferonu (<i>interferon regulatory factor</i>)
ITAM	motyw aktywacji receptora oparty na tyrozynie (<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>)
iTreg	indukowane limfocyty T regulatorowe (<i>induced Treg</i>)
KSHV	herpesvirus związany z mięsakiem Kaposiego (<i>Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus</i>)
LACI	zespół kliniczny zawału lakunarnego (<i>lacunar infarction</i>)
LAG-3	gen aktywujący limfocyty (<i>lymphocyte activation gene-3</i>)
LEC	komórki nabłonka chłonnego (<i>lymphatic endothelial cells</i>)
LVD	choroba dużych naczyń (<i>large vessel disease</i>)
MDSC	mieloidalne komórki supresorowe (<i>myeloid-derived suppressor cells</i>)
MG	miastenia (<i>myasthenia gravis</i>)
MHC	antygeny głównego kompleksu zgodności tkankowej (<i>major histocompatibility complex</i>)
MICA	sekwencja A związana z polipeptydem MHC klasy I (<i>MHC class I polypeptide-related sequence A</i>)
MICB	sekwencja B związana z polipeptydem MHC klasy I (<i>MHC class I polypeptide-related sequence B</i>)
MIP-1 β	białko zapalne makrofagów (<i>macrophage inflammatory proteins</i>)
MMP8	metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 8(<i>matrix metalloproteinase8</i>)
MN	metanefryna
MR	tomografia rezonansu magnetycznego głowy (<i>Magnetic Resonance</i>)
mRS	zmodyfikowana skala Rankin, mRankin (<i>modified Rankin Scale</i>)
MZS	młodzieńcze zapalenie stawów
NALT	tkanka chłonna jamy nosowej (<i>nasal lymphoid tissue</i>)
NCAM	cząsteczka adhezji komórek nerwowych (<i>neural cell adhesion molecule</i>)
NIHSS	skala oceny deficytów neurologicznych (<i>National Institutes Of Health Stroke Scale</i>)
NK	komórki naturalni zabójcy (<i>natural killer cells</i>)
NKR	receptor komórek NK (<i>natural killer receptor</i>)
NKT	komórki naturalni zabójcy T (<i>Natural Killer T</i>)
NLPZ	niesteroidowe leki przeciwzapalne
NMN	normetanefryna
NOAC	nowe doustne leki przeciwkrzepliwe (<i>new oral anticoagulants</i>)
NSC	komórki neuronalna progenitorowa (<i>neural stem cell</i>)
nTreg	naturalne limfocyty T regulatorowe (<i>natural Treg</i>)
OCSF	kliniczny podział zespołów udarowych (<i>Oxfordshire Community Stroke Project</i>)
OE	inna etiologia (<i>other etiology</i>)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy

PACI	zespół kliniczny zawału w części przedniego kręgu unaczynienia (<i>partial anterior circulation infarct</i>)
PAMP	cząstki wzorca molekularnego związanego z patogenami (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PD -1;-2	receptor programowanej śmierci -1;-2 (<i>programmed death -1;-2</i>)
PD-L1;-2	ligand receptora programowanej śmierci -1;-2 (<i>programmed death ligand -1;-2</i>)
PDGF	płytkopochodny czynnik wzrostu (<i>platelet-derived growth factor</i>)
PGE2	prostaglandyna 2
PLT	liczba płytek krwi (<i>platelet</i>)
PMR	płyn mózgowo-rdzeniowy
POCI	zespół kliniczny zawału w tylnym kręgu unaczynienia (<i>posterior circulation infarct</i>)
PRR	receptory rozpoznające wzorce (<i>receptor pattern recognition</i>)
PSGL-1	ligand glikoproteinowy selektyny P (<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>)
pTreg	limfocyty T regulatorowe pochodzenia obwodowego (<i>peripheral Treg</i>)
RBC	liczba erytrocytów w krwi obwodowej (<i>Red Blood cell Count</i>)
ROR γ t	pokrewny z RAR receptor sierocy gamma (<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>)
rTPA	rekombinowany aktywator plazminogenu, alteplaza
RZS	reumatologiczne zapalenie stawów
SAH	krwotok podpajęczynówkowy (<i>subarachnoid heamorrhage</i>)
SAI	infekcja związana z udarem (<i>stroke associated infection</i>)
Satb1	modyfikator chromatyny Satb1 (<i>super-enhancer, chromatin remodeler</i>)
SIDS	immunosupresja wywołana udarem (<i>stroke induced immunodepression syndrome</i>)
SLA	stwardnienie zanikowe boczne (<i>sclerotic lateral atrophy</i>)
SLE	toczeń układowy (<i>systemic lupus erythromatosus</i>)
SSS	Skandynawska Skala Udaru (<i>Scandinavian Stroke Scale</i>)
SWI	obrazowanie podatności magnetycznej (<i>susceptibility-weighted imaging</i>)
SVD	choroba małych naczyń (<i>small vessel disease</i>)
S1P1	receptor dla sfingozyny (<i>Sphingosine-1-phosphate receptor 1</i>)
TACI	zespół kliniczny zawału w całym przednim kręgu unaczynienia (<i>total anterior circulation infarct</i>)
TAM's	makrofagi związane z guzem (<i>tumor-associated macrophages</i>)
Tc	limfocyty T cytotoksyczne (<i>cytotoxic T cells</i>)
TCR	receptor komórek T (<i>T-cell receptor</i>)
TFAM	mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A (<i>mitochondrial transcription factor A</i>)
TGF β	transformujący czynnik wzrostu β (<i>transforming growth factor β</i>)
Th	T pomocnicze (<i>helper T-cells limfocyty</i>)
TIA	przemijające niedokrwienie mózgu (<i>transient ischemic attack</i>)
TIM-3	immunoglobulina limfocytów T i domena mucyny 3 (<i>T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>)
TK	tomografia komputerowa
TLR	receptory Toll-podobne (<i>Toll-like receptors</i>)
TNF α	czynnik martwicy nowotworów (<i>tumor necrosis factor</i>)
TOAST	etiologiczna klasyfikacja udaru (<i>Trial of ORG 10172 in acute stroke treatment</i>)
TRAIL	kompleks indukujący apoptozę (<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
trNK	komórki NK tkankowo specyficzne (<i>tissue restricted NK</i>)
Tr1	limfocyty T regulatorowe typu 1 (<i>T regulatory cells type 1</i>)
tTreg	limfocyty T regulatorowe pochodzenia grasiczego (<i>thymus-derived Treg</i>)
TWEAK	TNF-podobny słaby induktor apoptozy (<i>tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis</i>)

UE	nieustalona etiologia (<i>undetermined etiology</i>)
WBC	liczba leukocytów w krwi obwodowej (<i>White Blood cell Count</i>)
VCAM	molekuła adhezyjna naczyń (<i>vascular cell adhesion molecule</i>)
VEGF	czynn timer wzrostu śródbłona naczyniowego (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VLA-4	integryna 4 (<i>very late integrin 4</i>)
VZV	wirus ospy i półpaśca (<i>Varicella Zoster Virus</i>)
ZUM	zakażenie układu moczowego
ZZSK	zesztywniające zapalenie stawów

10.BIBLIOGRAFIA

- [1] Wong CHY, Jenne CN, Tam PP, Léger C, Venegas A, Ryckborst K, et al. Prolonged activation of invariant Natural Killer T cells and TH2-skewed immunity in stroke patients. *Front Neurol* 2017; 8: 6.
- [2] Planas AM. Role of immune cells migrating to the ischemic brain. *Stroke* 2018; 49(9): 2261–2267.
- [3] Dirnagl U, Klehmet J, Braun JS, Harms H, Meisel C, Ziemssen T, et al. Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance. *Stroke* 2007; 38: 770–3.
- [4] Gill D, Veltkamp R. Dynamics of T cell responses after stroke. *Curr Opin Pharmacol* 2016; 26: 26–32.
- [5] Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2012; 12(9): 623–635.
- [6] Carson MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol Rev* 2006; 213:48-65.
- [7] Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol* 2007; 28(1): 12–18.
- [8] Pachter JS, de Vries HE, Fabry ZJ. The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62(6): 593-604.
- [9] Weller RO, Engelhardt B, Phillips MJ. Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. *Brain Pathol* 1996; 6(3): 275-88.
- [10] Wekerle H. Breaking ignorance: the case of the brain. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 305: 25–50.
- [11] Sochocka M, Diniz BS, Leszek J. Inflammatory response in the CNS: friend or foe? *Mol Neurobiol* 2016; 54(10): 8071–8089.
- [12] Louveau A. Meningeal immunity, drainage, and tertiary lymphoid structure formation. *Methods Mol Biol* 2018; 1845: 31-45.
- [13] Rua R, McGavern DB. Advances in meningeal immunity. *Trends Mol Med* 2018; 24(6): 542–559.
- [14] Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 2010; 330(6005): 841–845.
- [15] Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nature Neurosci* 2011; 14: 1142–1149.
- [16] Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature Neurosci* 2007; 10: 1538–1543.
- [17] Ransohoff RM. Microglia and monocytes: ‘tis plain the twain meet in the brain. *Nature Neurosci* 2011; 14: 1098–1100.
- [18] Trebst C, Lykke Sørensen T, Kivisäkk P, Cathcart MK, Hesselgesser J, Horuk R, et al. CCR1+/CCR5+ mononuclear phagocytes accumulate in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2001; 159: 1701–1710.
- [19] McMahon EJ, Bailey SL, Miller SD. CNS dendritic cells: critical participants in CNS inflammation? *Neurochem Int* 2006; 49: 195–203.
- [20] McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med* 2005; 11:335–339.

- [21] Giunti D, Borsellino G, Benelli R, Marchese M, Capello E, Valle MT, et al. Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 584–590.
- [22] Stuve O, Marra CM, Bar-Or A, Niino M, Cravens PD, Cepok S, et al. Altered CD4+/CD8+ T-cell ratios in cerebrospinal fluid of natalizumab-treated patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2006; 63: 1383–1387.
- [23] De Graaf MT, Smitt PA ES, Luitwieler RL, van Velzen C, van den Broek PDM, Kraan J et al. Central memory CD4+ T cells dominate the normal cerebrospinal fluid. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; 80B(1): 43–50.
- [24] Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nature Rev Immunol* 2003; 3: 569–581.
- [25] Prodinger C, Bunse J, Krüger M, Schiefenhövel F, Brandt C, Laman JD, et al. CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system. *Acta Neuropathol* 2011; 121: 445–458.
- [26] Bulloch K, Miller MM, Gal-Toth J, Milner TA, Gottfried-Blackmore A, Waters EM, et al. CD11c/EYFP transgene illuminates a discrete network of dendritic cells within the embryonic, neonatal, adult, and injured mouse brain. *J Comp Neurol* 2008; 508: 687–710.
- [27] Rasmussen MK, Mestre H, Nedergaard M. The glymphatic pathway in neurological disorders. *Lancet Neurol* 2018; 17(11): 1016–1024.
- [28] Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med* 2012; 4(147).
- [29] Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 2015; 523(7560): 337–341.
- [30] Benakis C, Llovera G, Liesz A. The meningeal and choroidal infiltration routes for leukocytes in stroke. *Ther Adv Neurol Disord* 2018; 11.
- [31] Llovera G, Benakis C, Enzmann G, Cai R, Arzberger T, Ghasemigharagoz A, et al. The choroid plexus is a key cerebral invasion route for T cells after stroke. *Acta Neuropathol* 2017; 134(6): 851–868.
- [32] Hersh J, Yang SH. Glia-immune interactions post-ischemic stroke and potential therapies. *Exp Biol Med* 2018; 0: 1–11.
- [33] Chen C, Ai QD, Chu SF, Zhang Z, Chen NH. NK cells in cerebral ischemia. *Biomed Pharmacother* 2019; 109: 547–554.
- [34] Łukasik M, Immunologiczne aspekty udaru mózgu, W: *Neuroimmunologia kliniczna*. wyd 2, pod redakcją Jacka Losego, Wydawnictwo Czelej, 2015, 159-179.
- [35] Martins PA da C, van Gils JM, Mol A, Hordijk PL, Zwaginga JJ. Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of $\beta 1$ and $\beta 2$ integrins. *J Leukoc Biol* 2006; 79(3): 499–507.
- [36] Zaremba J, Losy J. Interleukin-18 in acute ischaemic stroke patients. *Neurol Sci* 2003; 24: 117–124.
- [37] Zaremba J, Ilkowski J, Losy J. Serial measurements of levels of the chemokines CCL2, CCL3 and CCL5 in serum of patients with acute ischaemic stroke. *Folia Neuropathol* 2006; 44(4): 282-9.
- [38] Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T. *Immunologia*, PWN 2019.
- [39] Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J & Caligiuri MA. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity* 2017; 47(5): 820–833.
- [40] Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22(11): 633–640.

- [41] Bonaccorsi I, Spinelli D, Cantoni C, Barillà C, Pipitò N, De Pasquale C, et al. Symptomatic carotid atherosclerotic plaques are associated with increased infiltration of Natural Killer (NK) cells and higher serum levels of NK activating receptor ligands. *Front Immunol* 2019; 10: 1503.
- [42] Meza Guzman LG, Keating N, Nicholson SE. Natural Killer cells: tumor surveillance and signaling. *Cancers* 2020; 12(4): 952.
- [43] Long EO, Sik Kim H, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling Natural Killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* 2013; 31(1): 227–258.
- [44] Goldszmid RS, Caspar P, Rivollier A, White S, Dzutsev A, et al. NK cell-derived interferon- γ orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity* 2012; 36:1047–59.
- [45] Lehmann J, Hartig W, Seidel A, Fuldner C, Hobohm C, Grosche J, et al. Inflammatory cell recruitment after experimental thromboembolic stroke in rats. *Neuroscience* 2014; 279: 139–154.
- [46] Zhang Y, Gao Z, Wang D, Zhang T, Sun B, Mu L, et al. Accumulation of natural killer cells in ischemic brain tissues and the chemotactic effect of IP-10, *Neuroinflammation* 2014; 11: 79.
- [47] Gomez-Nicola D, Valle-Argos B, Pita-Thomas DW, Nieto-Sampedro M. Interleukin 15 expression in the CNS: blockade of its activity prevents glial activation after an inflammatory injury. *Glia* 2008; 56 (5): 494–505.
- [48] Lee GA, Lin TN, Chen CY, Mau SY, Huang WZ, Kao YC, et al. Interleukin 15 blockade protects the brain from cerebral ischemia-reperfusion injury, *Brain Behav Immun* 2018; 73: 562–570.
- [49] Vogelgesang A, Witt C, Heuer C, Schulze J, Gellrich J, von Sarnowski B, et al. Clinical improvement following stroke promptly reverses post-stroke cellular immune alterations. *Front Neurol* 2019; 10: 414.
- [50] O’Connell GC, Chang JHC. Analysis of early stroke-induced changes in circulating leukocyte counts using transcriptomic deconvolution. *Transl Neurosci* 2018; 9(1): 161–166.
- [51] Jiang C, Kong W, Wang Y, Ziai W, Yang Q, Zuo F, et al. Changes in the cellular immune system and circulating inflammatory markers of stroke patients. *Oncotarget* 2017; 8: 3553-3567.
- [52] Urra X, Cervera Á, Villamor N, Planas AM, Chamorro Á. Harms and benefits of lymphocyte subpopulations in patients with acute stroke. *Neurosci* 2009; 158(3): 1174–1183.
- [53] Haeusler KG, Schmidt WUH, Föhring F, Meisel C, Helms T, Jungehulsing GJ, et al. Cellular immunodepression preceding infectious complications after acute ischemic stroke in humans. *Cerebrovasc Dis* 2008; 25(1-2): 50–58.
- [54] De Raedt S, De Vos A, Van Binst AM, De Waele M, Coomans D, Buyl R, et al. High natural killer cell number might identify stroke patients at risk of developing infections, *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation* 2015; 2 (2): e71.
- [55] Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, et al. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* 2009; 40: 1849–1857.
- [56] Ma Q, Ineichen BV, Detmar M, Proulx ST. Outflow of cerebrospinal fluid is predominantly through lymphatic vessels and is reduced in aged mice. *Nat Commun* 2017; 8(1): 1434.
- [57] Bartholomäus I, Kawakami N, Odoardi F, Schläger C, Miljkovic D, Ellwart JW, et al. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* 2009; 462(7269): 94-98.

- [58] Miró-Mur F, Urra X, Gallizioli M, Chamorro A, Planas AM. Antigen presentation after stroke. *Neurotherapeutics* 2016; 13: 719–28.
- [59] Gelderblom M, Gallizioli M, Ludewig P, Thom V, Arunachalam P, Rissiek B, et al. IL-23 (Interleukin-23)-producing conventional dendritic cells control the detrimental IL-17 (interleukin-17) response in stroke. *Stroke* 2018; 49: 155–164.
- [60] Grønberg NV, Johansen FF, Kristiansen U, Hasseldam H. Leukocyte infiltration in experimental stroke. *J Neuroinflammation* 2013; 10.
- [61] Stevens SL, Bao J, Hollis J, Lessov NS, Clark WM, Stenzel-Poore MP. The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 2002; 932(1-2): 110–9.
- [62] Liesz A, Zhou W, Mracsko E, Karcher S, Bauer H, Schwarting S, et al. Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke. *Brain* 2011; 134: 704–20.
- [63] Doyle KP, Quach LN, Sole M, Axtell RC, Nguyen TV V, Soler-Llavina GJ, et al. B-lymphocyte-mediated delayed cognitive impairment following stroke. *J Neurosci* 2015; 35(5): 2133–2145.
- [64] Meng H, Zhao H, Cao X, Hao J, Zhang H, Liu Y, et al. Double-negative T cells remarkably promote neuroinflammation after ischemic stroke. *Proc Natl Acad Sci* 2019; 116(12): 5558–5563.
- [65] Salas-Perdomo A, Miró-Mur F, Urra X, Justicia C, Gallizioli M, Zhao Y, et al. T cells prevent hemorrhagic transformation in ischemic stroke by P-selectin binding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018; 38(8): 1761–1771.
- [66] Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, et al. Stroke- induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med* 2003; 198: 725–736.
- [67] Zhang SR, Piepke M, Chu HX, Broughton BRS, Shim R, Wong CHY, et al. IL-33 modulates inflammatory brain injury but exacerbates systemic immunosuppression following ischemic stroke. *JCI Insight* 2018; 3(18).
- [68] Hu Y, Zheng Y, Wu Y, Ni B, Shi S. Imbalance between IL-17A-producing cells and regulatory T cells during ischemic stroke. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 1–8.
- [69] Selvaraj UM, Poinatte K, Torres V, Ortega SB, Stowe AM. Heterogeneity of B cell functions in stroke-related risk, prevention, injury, and repair. *Neurotherapeutics* 2016; 13(4), 729–747.
- [70] Ren XF, Akiyoshi K, Dziennis S, Vandenbark AA, Herson PS, Hurn PD, et al. Regulatory B cells limit CNS inflammation and neurologic deficits in murine experimental stroke. *J Neurosci* 2011; 31(23): 8556–8563.
- [71] Bodhankar S, Chen Y, Vandenbark AA, Murphy SJ, Offner H. Treatment of experimental stroke with IL-10-producing B-cells reduces infarct size and peripheral and CNS inflammation in wild- type B-cell-sufficient mice. *Metab Brain Dis* 2014; 29(1): 59–73.
- [72] Bodhankar S, Chen Y, Vandenbark AA, Murphy SJ, Offner H. IL- 10-producing B-cells limit CNS inflammation and infarct volume in experimental stroke. *Metab Brain Dis* 2013; 28(3): 375–386.
- [73] Doyle KP, Quach LN, Sole M, Axtell RC, Nguyen TV, Soler-Llavina GJ, et al. B-lymphocyte-mediated delayed cognitive impairment following stroke. *J Neurosci* 2015; 35(5): 2133–2145.
- [74] Liesz A, Hu X, Kleinschnitz C, Offner H. Functional role of regulatory lymphocytes in stroke: facts and controversies. *Stroke* 2015; 46(5): 1422–1430.
- [75] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of

- a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995; 155: 1151–1164.
- [76] Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 2009; 70(4): 326–336.
- [77] Falcão PL, Campos TPR de. The role of regulatory T cells, interleukin-10 and in vivo scintigraphy in autoimmune and idiopathic diseases – therapeutic perspectives and prognosis. *Rev Assoc Méd Bras* 2017; 63(12): 1090–1099.
- [78] Dolati S, Ahmadi M, Khalili M, Taheraghdam AA, Siahmansouri H, Babaloo Z. Peripheral Th17/Treg imbalance in elderly patients with ischemic stroke. *Neurol Sci* 2018; 39(4): 647–654.
- [79] Liesz A, Kleinschnitz C. Regulatory T cells in post-stroke immune homeostasis. *Transl Stroke Res* 2016; 7(4): 313–321.
- [80] Thornton AM, Lu J, Korty PE, Kim YC, Martens C, Sun PD, Shevach EM. Helios⁺ and Helios[−] Treg subpopulations are phenotypically and functionally distinct and express dissimilar TCR repertoires. *Eur J Immunol* 2019; 49(3): 398–412.
- [81] Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V, et al. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med* 2002; 196(3): 379–8.
- [82] Zabransky DJ, Nirschl CJ, Durham NM, Park BV, Ceccato CM, Bruno TC, et al. Phenotypic and functional properties of Helios⁺ regulatory T cells. *PLoS One* 2012; 7: e34547.
- [83] Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert E, Murray PE, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol* 2010; 184:3433–41.
- [84] Getnet D, Grosso JF, Goldberg MV, Harris TJ, Yen H-R, et al. A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Mol Immunol* 2010; 47: 1595–600.
- [85] Danese S, Rutella S. The Janus face of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in cancer and autoimmunity. *Curr Med Chem* 2007; 14(6): 649–666.
- [86] Harris NM, Roy-O'Reilly M, Ritzel RM, Holmes A, Sansing LH, O'Keefe LM, et al. Depletion of CD4 T cells provides therapeutic benefits in aged mice after ischemic stroke. *Exp Neurol* 2020; 326: 113202.
- [87] Ruhnau J, Schulze J, von Sarnowski B, Heinrich M, Langner S, Pötschke C, et al. Reduced numbers and impaired function of regulatory T cells in peripheral blood of ischemic stroke patients. *Mediat Inflamm* 2016; 1–9.
- [88] Schroeter M, Jander S, Witte O, Stoll G. Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. *J Neuroimmunol* 1994; 55(2): 195–203.
- [89] Xie L, Choudhury GR, Winters A, Yang SH, Jin K. Cerebral regulatory T cells restrain microglia/macrophage-mediated inflammatory responses via IL-10. *Eur J Immunol* 2014; 45(1): 180–191.
- [90] Stubbe T, Ebner F, Richter D, Engel OR, Klehmet J, Rojl G, et al. Regulatory T cells accumulate and proliferate in the ischemic hemisphere for up to 30 days after MCAO. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 33(1): 37–47.
- [91] Liesz A, Zhou W, Na SY, Hammerling GJ, Garbi N, Karcher S, et al. Boosting regulatory T cells limits neuroinflammation in permanent cortical stroke. *J Neurosci* 2013; 33(44): 17350–17362.
- [92] Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, Doerr H, Sommer C, Rivest S, et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nature Med* 2009; 15(2): 192–199.

- [93] Xie L, Sun F, Wang J, Mao X, Xie L, Yang SH, et al. mTOR signaling inhibition modulates macrophage/microglia-mediated neuroinflammation and secondary injury via regulatory T cells after focal ischemia. *J Immunol* 2014; 192(12): 6009–6019.
- [94] Li P, Gan Y, Sun BL, Zhang F, Lu B, Gao Y, et al. Adoptive regulatory T-cell therapy protects against cerebral ischemia. *Ann Neurol* 2013; 74(3): 458–471.
- [95] Chen Y, Ruetzler C, Pandipati S, Spatz M, McCarron RM, Becker K et al. Mucosal tolerance to E-selectin provides cell-mediated protection against ischemic brain injury. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100(25): 15107–15112.
- [96] Gee JM, Kalil A, Thullberg M, Becker KJ. Induction of immunologic tolerance to myelin basic protein prevents central nervous system autoimmunity and improves outcome after stroke. *Stroke* 2008; 39(5): 1575–1582.
- [97] Ishibashi S, Maric D, Mou Y, Ohtani R., Ruetzler C, Hallenbeck JM. Mucosal tolerance to E-selectin promotes the survival of newly generated neuroblasts via regulatory T-cell induction after stroke in spontaneously hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 29(3): 606–620.
- [98] Li P, Mao L, Liu X, Gan Y, Zheng J, Thomson AW, et al. Essential role of program death 1-ligand 1 in regulatory T-cell-afforded protection against blood-brain barrier damage after stroke. *Stroke* 2014; 45(3): 857–864.
- [99] Li P, Mao L, Zhou G, Leak RK, Sun BL, Chen J, Hu X. Adoptive regulatory T-cell therapy preserves systemic immune homeostasis after cerebral ischemia. *Stroke* 2013; 44(12): 3509–3515.
- [100] Brea D, Agulla J, Rodríguez-Yáñez M, Barral D, Ramos-Cabrera P, Campos F, et al. Regulatory T cells modulate inflammation and reduce infarct volume in experimental brain ischaemia. *J Cell Mol Med* 2014; 18(8): 1571–1579.
- [101] Na SY, Mracsko E, Liesz A, Hunig T, Veltkamp R. Amplification of regulatory T cells using a CD28 superagonist reduces brain damage after ischemic stroke in mice. *Stroke* 2014; 46(1): 212–220.
- [102] Wang J, Xie L, Yang C, Ren C, Zhou K, Wang B, et al. Activated regulatory T cell regulates neural stem cell proliferation in the subventricular zone of normal and ischemic mouse brain through interleukin 10. *Front Cell Neurosci* 2015; 9.
- [103] Ren X, Akiyoshi K, Vandenbark AA, Hurn PD, Offner H. CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T-cells in cerebral ischemic stroke. *Metab Brain Dis* 2010; 26(1): 87–90.
- [104] Kleinschnitz C, Kraft P, Dreykluft A, Hagedorn I, Gobel K, Schuhmann MK, et al. Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature. *Blood* 2012; 121(4): 679–691.
- [105] Schuhmann MK, Kraft P, Stoll G, Lorenz K, Meuth SG, Wiendl H, et al. CD28 superagonist-mediated boost of regulatory T cells increases thrombo-inflammation and ischemic neurodegeneration during the acute phase of experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014; 35(1): 6–10.
- [106] Walsh JT, Zheng J, Smirnov I, Lorenz U, Tung K, Kipnis J. Regulatory T cells in central nervous system injury: a double-edged sword. *J Immunol* 2014; 193(10): 5013–5022.
- [107] Liu X, Hu R, Pei L, Si P, Wang C, Tian X, et al. Regulatory T cell is critical for interleukin-33-mediated neuroprotection against stroke. *Exp Neurol* 2020; 328: 113233.
- [108] Facciabene A, Motz GT, Coukos G. T-Regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res* 2012; 72(9): 2162–2171.
- [109] Offner H, Subramanian S, Parker SM, Wang C, Afentoulis ME, Lewis A, et al. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *J Immunol* 2006; 176(11): 6523–6531.

- [110] Liesz A, Hagmann S, Zschoche C, Adamek J, Zhou W, Sun L. The spectrum of systemic immune alterations after murine focal ischemia: immunodepression versus immunomodulation. *Stroke* 2009; 40(8): 2849–2858.
- [111] Li Q, Wang Y, Yu F, Wang YM, Zhang C, Hu C, et al. Peripheral Th17/Treg imbalance in patients with atherosclerotic cerebral infarction. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6(6):1015-1027.
- [112] Hug A, Liesz A, Muerle B, Zhou W, Ehrenheim J, Lorenz A, et al. Reduced efficacy of circulating costimulatory cells after focal cerebral ischemia. *Stroke* 2011; 42:3580–3586.
- [113] Yan J, Greer JM, Etherington K, Cadigan GP, Cavanagh H, Henderson RD, et al. Immune activation in the peripheral blood of patients with acute ischemic stroke. *J Neuroimmunol* 2009; 206(1-2): 112–117.
- [114] Yan J, Read SJ, Henderson RD, Hull R, O’Sullivan JD, McCombe PA, et al. Frequency and function of regulatory T cells after ischaemic stroke in humans. *J Neuroimmunol* 2012; 243: 89–94.
- [115] Mao L, Li P, Zhu W, Cai W, Liu Z, Wang Y. Regulatory T cells ameliorate tissue plasminogen activator-induced brain haemorrhage after stroke. *Brain* 2017; 140(7): 1914–1931.
- [116] Brea D, Poon C, Murphy M, Lubitz G, Iadecola C, Anrather J. Ablation of nasal-associated lymphoid tissue does not affect focal ischemic brain injury in mice. *PLoS One* 2018; 13(10): e0205470.
- [117] Prinz I, Silva-Santos B, Pennington DJ. Functional development of $\gamma\delta$ T cells. *Eur J Immunol* 2013; 43(8): 1988–1994.
- [118] Fonseca S, Pereira V, Lau C, Teixeira M dos A, Bini-Antunes M, Lima M. Human peripheral blood gamma delta T cells: report on a series of healthy caucasian portuguese adults and comprehensive review of the literature. *Cells* 2020; 9(3): 729.
- [119] Caccamo N, Todaro M, Sireci G, Meraviglia S, Stassi G, Dieli F. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of human $\gamma\delta$ T cells. *Cell Mol Immunol* 2012; 10(1): 30–34.
- [120] Kalyan, S, Kabelitz D. Defining the nature of human $\gamma\delta$ T cells: A biographical sketch of the highly empathetic. *Cell Mol Immunol* 2013; 10: 21–29.
- [121] Spada FM, Grant EP, Peters PJ, Sugita M, Melián A, Leslie DS, Lee HK, van Donselaar E, Hanson DA, Krensky AM, et al. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: Implications for innate immunity. *J Exp Med* 2000; 191: 937–948.
- [122] Gelderblom M, Arunachalam P, Magnus T. $\gamma\delta$ T cells as early sensors of tissue damage and mediators of secondary neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* 2014; 8.
- [123] Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, Velden J, Arunachalam P, Steinbach K, et al. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood* 2012; 120(18): 3793–3802.
- [124] Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takada I, et al. Pivotal role of cerebral interleukin-17–producing $\gamma\delta$ T cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med* 2009; 15(8): 946–950.
- [125] Cui Y, Wan Q. NKT cells in neurological diseases. *Front Cell Neurosci* 2019; 13.
- [126] Godfrey DI, Stankovic S, and Baxter AG. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol* 2010; 11: 197–206.
- [127] Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 297-336.
- [128] Wong CHY, Jenne CN, Lee WY, Leger C, Kubes P. Functional innervation of hepatic iNKT cells is immunosuppressive following stroke. *Science* 2011; 334: 101–105.
- [129] Nishioka Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. CD1d-restricted type II NKT cells reactive with endogenous hydrophobic peptides. *Front Immunol* 2018; 9: 548.

- [130] Chang PP, Barral P, Fitch J, Pratama A, Ma CS, Kallies A, et al. Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. *Nat Immunol* 2011; 13: 35–43.
- [131] Engel I, Seumois G, Chavez L, Samaniego-Castruita D, White B, Chawla A, et al. Innate-like functions of natural killer T cell subsets result from highly divergent gene programs. *Nat Immunol* 2016; 17: 728–739.
- [132] Shimizu H, Matsuguchi T, Fukuda Y, Nakano I, Hayakawa T, Takeuchi O, et al. Toll-like receptor 2 contributes to liver injury by *Salmonella* infection through Fas ligand expression on NKT cells in mice. *Gastroenterology* 2002; 123: 1265–1277.
- [133] Paget C, Mallevaey T, Speak AO, Torres D, Fontaine J, Sheehan KC, et al. Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids. *Immunity* 2007; 27: 597–609.
- [134] Finkelstein A, Kunis G, Seksenyan A, Ronen A, Berkutzki T, Azoulay D, et al. Abnormal changes in NKT cells, the IGF-1 axis, and liver pathology in an animal model of ALS. *PLoS One* 2011; 6: e22374.
- [135] Wang ZK, Xue L, Wang T, Wang XJ, & Su ZQ. Infiltration of invariant natural killer T cells occur and accelerate brain infarction in permanent ischemic stroke in mice. *Neurosci Lett* 2016; 633: 62–68.
- [136] Chamorro Á, Amaro S, Vargas M, Obach V, Cervera Á, Gómez-Choco M, et al. Catecholamines, infection, and death in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 2007; 252(1), 29–35.
- [137] Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 775–86.
- [138] Ostrowski RP, Schulte RW, Nie Y, Ling T, Lee T, Manaenko A, et al. Acute splenic irradiation reduces brain injury in the rat focal ischemic stroke model. *Transl Stroke Res* 2012; 3(4): 473–481.
- [139] Ay I, Sorensen A.G, Ay H. Vagus nerve stimulation reduces infarct size in rat focal cerebral ischemia: An unlikely role for cerebral blood flow, *Brain Res* 2011; 1392: 110–115.
- [140] Liesz A, Rüger H, Purucker J, Zorn M, Dalpke A, Möhlenbruch M, et al. Stress mediators and immune dysfunction in patients with acute cerebrovascular diseases. *PLoS One* 2013; 8(9): e74839.
- [141] Chamorro A, Urra X, Planas AM. Infection after acute ischemic stroke: a manifestation of brain-induced immunodepression. *Stroke* 2007; 38: 1097–103.
- [142] Urra X, Obach V, Chamorro A. Stroke induced immunodepression syndrome: from bench to bedside. *Curr Mol Med* 2009; 9: 195–202.
- [143] Lindsberg PJ, Grau AJ. Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke. *Stroke* 2003; 34: 2518–2532.
- [144] van der Wal AC, Das PK, Bentz van de Berg D, van der Loos CM, Becker AE. Atherosclerotic lesions in humans: in situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab Invest* 1989; 61: 166–170.
- [145] Mattila KJ, Valtonen VV, Nieminen MS, Asikainen S. Role of infection as a risk factor for atherosclerosis, myocardial infarction, and stroke. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 719–734.
- [146] Maass M, Krause E, Engel PM, Kruger S. Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* in patients with hemodynamically effective carotid artery stenosis. *Angiology* 1997; 48: 699–706.
- [147] Wimmer ML, Sandmann-Strupp R, Saikku P, Haberl RL. Association of chlamydial infection with cerebrovascular disease. *Stroke* 1996; 27: 2207–2210.
- [148] Gillum RF, Ingram DD, Makuc DM. White blood cell count and stroke incidence and death: the NHANES I epidemiologic follow-up study. *Am J Epidemiol* 1994; 139: 894–902.

- [149] Kaźmierski R, Guzik P, Ambrosius W, Ciesielska A, Moskal J, Kozubski W. Predictive value of white blood cell count on admission for in-hospital mortality in acute stroke patients. *Clin Neurol Neurosurg* 2004; 107: 38-43.
- [150] Di Napoli M, Papa F, Bocola V. C-reactive protein in ischemic stroke: an independent prognostic factor. *Stroke* 2001; 32: 917-924.
- [151] Muir KW, Weir CJ, Alwan W, Squire IB, Lees KR. C-reactive protein and outcome after ischemic stroke. *Stroke*. 1999; 30: 981-985.
- [152] Chamorro A, Amaro S, Vargas M, Obach V, Cervera A, Torres F, Planas AM. Interleukin 10, monocytes and increased risk of early infection in ischaemic stroke. *J Neurol, Neurosurg Psychiatry* 2006; 77(11): 1279-1281.
- [153] Pozzilli C, Lenzi GL, Argentino C, Bozzao L, Rasura M, Giubilei F, Fieschi C. Peripheral white blood cell count in cerebral ischemic infarction. *Acta Neurol Scand* 1985; 71:396 – 400.
- [154] Ross AM, Hurn P, Perrin N, Wood L, Carlini W, Potempa, K. Evidence of the peripheral inflammatory response in patients with transient ischemic attack. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2007; 16(5): 203-207.
- [155] Akopov SE, Simonian NA, Grigorian GS. Dynamics of poly- morphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. *Stroke* 1996; 27:1739-1743.
- [156] Pozzilli C, Lenzi G, Argentino C, Carolei A, Rasura M, Signore A, et al. Imaging of leukocyte infiltration in human cerebral infarcts. *Stroke* 1985, 16: 251-255.
- [157] Wang PY, Kao CH, Mui MY, Wang SJ. Leukocyte infiltration in acute hemispheric stroke. *Stroke* 1993; 24: 236-240.
- [158] Barone F, Hillegass L, Tzimas M, Schmidt D, Foley J, White R, et al. Time-related changes in myeloperoxidase activity and leukotrine B4 receptor binding reflect leukocyte influx in cerebral focal stroke. *Mol Chem Neuropathol* 1995; 24: 13-30.
- [159] Barone F, Schmidt D, Hillegass L, Price W, White R, Feuerstein G, et al. Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 receptor binding in rat focal ischemia. *Stroke* 1992; 23: 1337-1348.
- [160] Clark R, Lee E, Fish C, White R, Price W, Jonak Z. Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: An immunohistochemical and quantitative planimetric study. *Brain Res Bull* 1993; 31: 565-572.
- [161] Clark R, Lee E, White R, Jonak Z, Feuerstein Z, Barone F. Reperfusion following focal stroke hastens inflammation and resolution of ischemic injured tissue. *Brain Res Bull* 1994; 35: 387-392.
- [162] Dereski M, Chopp M, Knight R, Chen H, Garcia J. Focal cerebral ischemia in the rat: Temporal profile of neutrophil responses. *Neurosci Res Commun* 1992; 11: 179-186.
- [163] Garcia J, Liu K, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del Zoppo G. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol* 1994; 144: 188-199.
- [164] Kato H, Kogure K, Liu XH, Araki T, Itoyama Y. Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leukocytes following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 1996; 734: 203-212.
- [165] Lehrmann E, Christensen T, Zimmer J, Diemer N, Finsen B. Microglial and macrophage reactions mark progressive changes and define the penumbra in the rat neocortex and striatum after transient middle cerebral artery occlusion. *J Comp Neurol* 1997; 386: 461-476.
- [166] Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T, Kogure K. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat: effects of neutrophil depletion. *Stroke* 1994; 25: 1469-1475.

- [167] Schroeter M, Jaonder S, Witte O, Stoll G. Local immune responses in the rat cerebral cortex after middlecerebral artery occlusion. *J. Neuroimmunol* 1994; 55: 195–203.
- [168] Zhang RL, Chopp M, Chen H, Garcia J. Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response, and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci* 1994; 125: 3–10.
- [169] Ahmed SH, He Y, Nassief A, Xu J, Xu X, Hsu C. Effects of lipopolysaccharide priming on acute ischemic brain injury. *Stroke* 2000; 31: 193–199.
- [170] Bednar M, Dooley R, Zamani M, Howard D, Gross C. Neutrophil and platelet activity and quantification following delayed tPA therapy in a rabbit model of thromboembolic stroke. *J Thromb Thrombolysis* 1995; 1: 179–185.
- [171] Yamasaki Y, Matsuo Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, et al. Interleukin-1 as a pathogenic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke* 1995; 26: 676–681.
- [172] Hallenbeck J, Dutka A, Tanishima T, Kochanek P, Kumaroo K, Thompson C, et al. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke* 1986; 17: 246–253.
- [173] Jiang N, Moyle M, Soule HR, Rote WE, Chopp M. Neutrophil inhibitory factor is neuroprotective after focal ischemia in rats. *Ann Neurol* 1995; 38:935–942.
- [174] Chen H, Chopp M, Bodzin G. Neutropenia reduces the volume of cerebral infarct after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurosci Res Commun* 1992; 11: 93–99.
- [175] Dutka A, Kochanek P, Hallenbeck J. Influence of granulocytopenia on canine cerebral ischemia induced by air embolism. *Stroke* 1989; 20: 390–395.
- [176] Kitagawa K, Matsumoto M, Mabuchi T, Yagita Y, Ohtsuki T, Hori M, et al. Deficiency of intercellular adhesion molecule-1 attenuates microcirculatory disturbance and infarction size in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 1336–1345.
- [177] Lopez O, Lanthorn T. Anti-neutrophil antiserum reduces infarct volume after mouse permanent middle cerebral artery occlusion without producing neutropenia. *Neurosci Res Commun* 1993; 13: 45–53.
- [178] Shimakura A, Kamanaka Y, Ikeda Y, Kondo K, Suzuki Y, Umemura K. Neutrophil elastase inhibition reduces cerebral ischemic damage in the middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 2000; 858: 55–60.
- [179] Emerich DF, Dean RL, Bartus RT. The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct? *Exp Neurol* 2002; 173(1): 168–181.
- [180] Adamski MG, Li Y, Wagner E, Yu H, Seales-Bailey C, Durkin H, et al. Pre-existing hypertension dominates $\gamma\delta$ T cell reduction in human ischemic stroke. *PLoS ONE* 2014; 9(5): e97755.
- [181] Jickling GC, Liu D, Ander BP, Stamova B, Zhan X, Sharp FR. Targeting neutrophils in ischemic stroke: translational insights from experimental studies. *J Cereb Blood Flow Metabol* 2015; 35(6): 888–901.
- [182] Guo L-B, Liu S, Zhang F, Mao G-S, Sun L-Z, Liu Y. The role of eosinophils in stroke: a pilot study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19: 3643–8.
- [183] Wang J, Ma L, Lin T, Li S-J, Chen L-L, Wang D-Z. The significance of eosinophils in predicting the severity of acute ischemic stroke. *Oncotarget* 2017; 8.
- [184] Davoine F, Lacy P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Front Immunol* 2014; 5.
- [185] Klehmet J, Harms H, Richter M, Prass K, Volk HD, Dirnagl U, et al. Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial. *Neuroscience* 2009; 158: 1184–1193.

- [186] Vogelgesang A, Grunwald U, Langner S, Jack R, Broker BM, Kessler C, et al. Analysis of lymphocyte subsets in patients with stroke and their influence on infection after stroke. *Stroke* 2008; 39: 237–241.
- [187] Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 34–47.
- [188] Li D, Romain G, Flamar AL, Duluc D, Dullaers M, Li XH, et al. Targeting self- and foreign antigens to dendritic cells via DC-ASGPR generates IL-10-producing suppressive CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 2012; 209: 109–121.
- [189] Du Clos TW. Pentraxins: structure, function, and role in inflammation. *ISRN Inflamm* 2013; 2013: 379040.
- [190] Yoshida T, Ichikawa J, Giuroiu I, Laino AS, Hao Y, Krogsaard M, et al. C reactive protein impairs adaptive immunity in immune cells of patients with melanoma. *J ImmunoTher Cancer* 2020; 8(1): e000234.
- [191] Zhang L, Liu SH, Wright TT, Shen ZY, Li HY, Zhu W, et al. C- reactive protein directly suppresses Th1 cell differentiation and alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2015; 194: 5243–52.
- [192] Drummond, GR, Vinh A, Guzik TJ, Sobey CG. Immune mechanisms of hypertension. *Nat Rev Immunol* 2019; 19: 517–532.
- [193] Trott DW, Thabet SR, Kirabo A, Saleh MA, Itani H, Norlander AE, et al. Oligoclonal CD8⁺ T cells play a critical role in the development of hypertension. *Hypertension* 2014; 64: 1108–1115.
- [194] Dinesh RK, Hahn BH, Singh RP. Gender and sex hormones influence CD4 regulatory T cells and their expression of FoxP3 in healthy people and in SLE. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 1257.
- [195] McCombe PA, Greer JM, Mackay IR. Sexual dimorphism in autoimmune disease. *Curr Mol Med* 2009; 9: 1058–1079.
- [196] Silva GS, Lima FO, Camargo EC, Smith WS, Lev MH, Harris GJ, et al. Gender differences in outcomes after ischemic stroke: role of ischemic lesion volume and intracranial large-artery occlusion. *Cerebrovasc Dis* 2010; 30: 470–475.
- [197] Santamaría-Cadavid M, Rodríguez-Castro E, Rodríguez-Yáñez M, Arias-Rivas S, López-Dequidt I, Pérez-Mato M, et al. Regulatory T cells participate in the recovery of ischemic stroke patients. *BMC Neurology* 2020; 20(1).
- [198] Rattik S, Engelbertsen D, Wigren M, Ljungcrantz I, Östling G, Persson M, et al. Elevated circulating effector memory T cells but similar levels of regulatory T cells in patients with type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diab Vasc Dis Res* 2018; 16(3): 270–280.
- [199] Wang M, Chen F, Wang J, Zeng Z, Yang Q, Shao S. Th17 and Treg lymphocytes in obesity and type 2 diabetic patients. *Clin Immunol* 2018; 197: 77–85.
- [200] Nilsson J, Wigren M, Shah PK. Regulatory T cells and the control of modified lipoprotein autoimmunity-driven atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2009; 19(8): 272–276.
- [201] Wigren M, Nilsson J, Kolbus D. Lymphocytes in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2012; 413(19–20): 1562–1568.
- [202] Mor A, Luboshits G, Planer D, Keren G, George J. Altered status of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2006; 27(21): 2530–2537.
- [203] Han S, Liu P, Zhang W, Bu L, Shen M, Li H. The opposite-direction modulation of CD4⁺CD25⁺ Tregs and T helper 1 cells in acute coronary syndromes. *Clin Immunol* 2007; 124(1): 90–97.

- [204] Barth SD, Kaaks R, Johnson T, Katzke V, Gellhaus K, Schulze JJ, et al. The ratio of regulatory (FOXP3+) to total (CD3+) T cells determined by epigenetic cell counting and cardiovascular disease risk: a prospective case-cohort study in non-diabetics. *EBioMedicine* 2016; 11: 151–156.
- [205] Ammirati E, Cianflone D, Banfi M, Vecchio V, Palini A, De Metrio M, et al. Circulating CD4+CD25hiCD127lo regulatory T-cell levels do not reflect the extent or severity of carotid and coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 1832–1841.
- [206] Benakis C, Brea D, Caballero S, Faraco G, Moore J, Murphy M, et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal $\gamma\delta$ T cells. *Nat Med* 2016; 22(5): 516–523.
- [207] Xiao J, Qiu Q, Qin C, Tao R, Qiao S, Chen M, et al. Dynamic changes of peripheral blood lymphocyte subsets in acute ischemic stroke and prognostic value. *Brain Behav* 2020; 11(1).
- [208] Gan Y, Liu Q, Wu W, Yin JX, Bai XF, Shen R, et al. Ischemic neurons recruit natural killer cells that accelerate brain infarction, *Proc Natl Acad Sci* 2014; 111 (7): 2704 –2709.
- [209] Peterfalvi A, Molnar T, Banati M, Pusch G, Miko E, Bogar L et al. Impaired function of innate T lymphocytes and NK cells in the acute phase of ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2009; 28 (5) : 490-498.
- [210] Kossmann S, Schwenk M, Hausding M, Karbach SH, Schmidgen MI, Brandt M, et al. Angiotensin II- induced vascular dysfunction depends on interferon- gamma-driven immune cell recruitment and mutual activation of monocytes and NK- cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33: 1313–1319.
- [211] Shim R, Wen SW, Wanrooy BJ, Rank M, Thirugnanachandran T, Ho L, et al. Stroke severity, and not cerebral infarct location, increases the risk of infection. *Transl Stroke Res* 2020; 11(3):387-401.
- [212] Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6(10): 775–786.
- [213] Tarkowski E, Jensen C, Ekholm S, Ekelund P, Blomstrand C, Tarkowski A. Localization of the brain lesion affects the lateralization of T-lymphocyte dependent cutaneous inflammation. Evidence for an immunoregulatory role of the right frontal cortex–putamen region. *Scand J Immunol* 1998; 47: 30–36.
- [214] Johnston KC, Li JY, Lyden PD, Hanson SK, Feasby TE, Adams RJ, et al. Medical and neurological complications of ischemic stroke: experience from the RANTTAS trial. RANTTAS Investigators. *Stroke* 1998; 29:447–453.
- [215] Grau AJ, Bugge F, Schnitzler P, Spiel M, Li- chy C, Hacke W. Fever and infection early after ischemic stroke. *J Neurol Sci* 1999;171: 115–120.
- [216] Langhorne P, Stott DJ, Robertson L, Mac- Donald J, Jones L, McAlpine C, et al. Medical complications after stroke: a multicenter study. *Stroke* 2000; 31:1223–1229.
- [217] Hilker R, Poetter C, Findeisen N, Sobesky J, Jacobs A, Neveling M, Heiss WD. Nosocomial pneumonia after acute stroke: implications for neurological intensive care medicine. *Stroke* 2003; 34:975–981.
- [218] Weimar C, Roth MP, Zillesen G, Glahn J, Wimmer ML, Busse O, Haberl RL, Diener HC. Complications following acute ischemic stroke. *Eur Neurol* 2002; 48:133–140.
- [219] Aslanyan S, Weir CJ, Diener HC, Kaste M, Lees KR. Pneumonia and urinary tract infection after acute ischaemic stroke: a tertiary analysis of the GAIN International trial. *Eur J Neurol* 2004; 11:49–53.
- [220] Di Napoli M. Early inflammatory response in ischemic stroke. *Thromb Res* 2001; 103: 261–264.

- [221] Di Napoli M, Papa F, Bocola V. Prognostic influence of increased C-reactive protein and fibrinogen levels in ischemic stroke. *Stroke* 2001; 32: 133–138.
- [222] Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 1971; 21:903–14.
- [223] Madondo MT, Tuyaerts S, Turnbull BB, Vanderstraeten A, Kohrt H, Narasimhan B, et al. Variability in CRP, regulatory T cells and effector T cells over time in gynaecological cancer patients: a study of potential oscillatory behaviour and correlations. *J Transl Med* 2014; 12(1): 179.
- [224] Goto H, Fujisawa H, Oka F, Nomura S, Kajiwara K, Kato S, et al. Neurotoxic effects of exogenous recombinant tissue-type plasminogen activator on the normal rat brain. *J Neurotrauma* 2007; 24:745–752.
- [225] Kömürçü HF, Gözke E, Doğan Ak, P, Kalyoncu Aslan I, Salt I, Özgenç Bi er Çİ. Changes in neutrophil, lymphocyte, platelet ratios and their relationship with NIHSS after rtPA and/or thrombectomy in ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2020; 29(8): 105004.

11. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 139/18

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U. z 2017, poz. 135 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad poradywstwa i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 488); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2016, poz. 2142 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 843); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2016 r. i w sprawie zgłaszania niepodzielonego całkowitego niepodzielanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. i w sprawie wzajemie wniosków przysługujących z badaniami klinicznymi wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 288); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017r. poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 8 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194, poz. 1298); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1719); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 499); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzajemie składowania produktów leczniczych oraz w sprawie wysokości i sposobu wnoszenia opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 6, poz. 491); w sprawie o Deklaracji Hebeity - Zespoły Etycznego Postępowania w Ekspertyzowaniu Medycznym i Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 01 lutego 2018 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu: dr hab. n. med. Maria Łukasik

Miejsce prowadzenia badań:

**Klinika Neurologii i Chorób Naczyniowych OUN Katedry Neurologii
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz: lek. med. Magdalena Telec

Członkowie zespołu

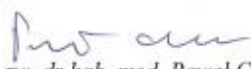
**badawczego: prof. dr hab. med. Radosław Kaźmierski,
prof. dr hab. med. Grzegorz Dworacki, dr hab. n. med. Sławomir
Michalak, dr n. biol. Magdalena Frydrychowicz, lek. med. Magdalena
Telec, lek. med. Maria Kamieniarz, lek. med. Natalia Andrzejewska,
lek. med. Jacek Anioła, mgr Krystyna Osztynowicz, mgr Aleksandra
Bednarczyk, prof. dr hab. med. Wojciech Kozubski**

Temat badań:

**„Znaczenie krążących limfocytów Treg, komórek NK oraz nieswoistych
limfocytów T w klinicznym przebiegu udaru mózgu”.**

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Przewodniczący Komisji


prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

12. STRESZCZENIE

Udar niedokrwienny mózgu wywołuje uruchomienie kaskady procesów immunologicznych, które nie pozostają bez wpływu na przebieg i ostateczny wynik patologii (obszar uszkodzenia, deficyt neurologiczny). W reakcję układu immunologicznego zaangażowana jest odpowiedź wrodzona oraz odpowiedź nabyta, z nietypową aktywacją niekonwencjonalnych limfocytów T (T $\gamma\delta$, iNKT) i limfocytów T regulatorowych. Znaczenie kliniczne tych subpopulacji w rozwoju stanu zapalnego i infekcji związanej z udarem (SAI), może przyczynić się do zrozumienia patomechanizmów udaru niedokrwiennego mózgu. Celem pracy były: 1) prospektywna ocena ilościowa krążących subpopulacji limfocytów T (Treg, T $\gamma\delta$, iNKT) oraz komórek NK u chorych z udarem niedokrwiennym w fazie ostrej (1. i 3. doba udaru), podostrej (10. doba) oraz w fazie rekonwalescencji (90. doba) w odniesieniu do grupy kontrolnej, dobranej pod względem proporcji płci, wieku i czynników ryzyka, 2) odniesienie ewentualnych zmian ilościowych w badanych populacjach komórkowych do stanu klinicznego chorych ze szczególnym uwzględnieniem SAI, metody terapii oraz czynników ryzyka udaru niedokrwiennego.

Do badania włączono 52 chorych z udarem niedokrwiennym, w tym 25 kobiet i 27 mężczyzn, spełniających określone w badaniu kryteria włączenia i nie podlegającym kryteriom wykluczenia oraz 34 osoby z grupy kontrolnej. Zebrano dane demograficzne, określono czynniki ryzyka chorób naczyniowych i stosowane leki. Chorych oceniono wg skal neurologicznych (TOAST, OCSP, NIHSS, skala skandynawska, mRS), monitorowano wykładniki stanu zapalnego, zdefiniowano chorych pod kątem SAI i dokonano analizy ilościowej badanych populacji komórkowych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.

U chorych z udarem w fazie ostrej stwierdzono limfocytopenię. Wyższe wartości CRP, WBC i niższe wartości limfocytów korelowały z gorszym stanem klinicznym chorych, a różnice związane z tymi parametrami wykazano także w przypadku chorych SAI+/SAI-. Ocena ilościowa subpopulacji limfocytów Treg wykazała dominację ilościową podtypu prozapalnego Helios⁻ i niższy odsetek prosupresorowego Helios⁺, szczególnie u kobiet. Wykazano zależność odpowiedzi limfocytów Treg od czynników ryzyka chorób naczyniowych w wywiadzie (cukrzycy, choroby niedokrwiennej serca). Zwiększenie ilości limfocytów Treg koreluje z gorszym stanem klinicznym chorych i wzrostem wartości CRP w udarze, a u pacjentów SAI+ wykazano zwiększenie odsetka Treg Helios⁺ w fazie ostrej. Większy odsetek Treg Helios⁺ w 3. dobie jest związany z gorszym stanem klinicznym w

fazie rekonwalescencji. Ocena ilościowa subpopulacji limfocytów T $\gamma\delta$ wykazała zmniejszenie ich wartości bezwzględnej oraz podtypu V δ 2 w ostrej fazie udaru, co wiązało się z gorszym stanem klinicznym chorych. Stwierdzono zmniejszenie liczby limfocytów T $\gamma\delta$ w fazie rekonwalescencji u pacjentów po przebytej infekcji SAI oraz po zastosowanym leczeniu trombolitycznym. Odsetek podtypu V δ 2 w fazie rekonwalescencji korelował dodatnio z wywiadem przebytego wcześniej udaru mózgu, a ujemnie z lepszym stanem klinicznym w fazie ostrej udaru. Zmniejszenie limfocytów T $\gamma\delta$ towarzyszyło także fazie podostrej chorych z rozpoznaną cukrzycą. Ocena ilościowa limfocytów iNKT wykazała zwiększenie ich odsetka w fazie ostrej udaru, związane z gorszym stanem klinicznym chorych. Ze zwiększeniem ilości komórek NK w fazie podostrej związany był lepszy stan kliniczny w fazie ostrej udaru. Wykazano związek dominacji limfocytów CD4⁺ z lepszym stanem klinicznym, a przewagi CD8⁺ z gorszym stanem klinicznym oraz większym stężeniem CRP w fazie ostrej i podostrej udaru. Większy odsetek CD8⁺, a mniejszy CD4⁺ wykazano także u chorych obciążonych nadciśnieniem tętniczym. Uzyskane wyniki pozwoliły na wysunięcie wniosków:

1. Odpowiedź limfocytów T regulatorowych na udar niedokrwienny ma związek z ekspresją wewnątrzkomórkowego czynnika transkrypcyjnego Helios⁻, cechuje się odmiennością w zależności od płci, a jej niekorzystny efekt wynika z przesunięcia ilościowego w kierunku typu Helios⁻ (prozapalnego), szczególnie u kobiet.
2. Wyciszająca się z opóźnieniem supresorowa funkcja limfocytów Treg (zwiększony odsetek Helios⁺) i opóźniona prozapalna aktywność (zmniejszony odsetek Helios⁻) może być przyczyną rozwinięcia SAI. Związek limfocytów Treg z SAI potwierdza dodatnia korelacja ich ilości z wartościami laboratoryjnych wykładników zapalenia.
3. Rola limfocytów T $\gamma\delta$ w udarze ma charakter długofalowej odpowiedzi, której efekty widoczne są kilka miesięcy po przebytym udarze i jest w dużej mierze związana z aktywnością podtypu V δ 2. Na odległe w czasie zmiany ilościowe limfocytów T $\gamma\delta$ ma wpływ przebyty udar, przebyta infekcja związana z udarem oraz leczenie trombolityczne.
4. Rola limfocytów iNKT w udarze jest niekorzystna i wiąże się ze zwiększeniem ich ilości w krwi obwodowej w początkowym okresie udaru, co przekłada się na pogorszenie stanu klinicznego chorych.
5. Dominacja limfocytów CD4⁺ w udarze jest korzystna i wiąże się z lepszym stanem klinicznym, podczas gdy przesunięcie proporcji w kierunku CD8⁺ koreluje z gorszym stanem klinicznym i przyczynia się do rozwoju SAI.

13. SUMMARY

Ischemic stroke triggers a cascade of immunological processes that play an important role in the evolution, pathophysiology, and final stroke outcome (size of injury and clinical status). Both, innate and adaptive immunity, are participating in the immunological response to stroke, with atypical activation of unconventional lymphocytes (T $\gamma\delta$, iNKT) and T regulatory cells. Targeting the clinical role of these subpopulations in the development of inflammation and stroke associated infection (SAI), may help to understand pathophysiology of ischemic stroke.

In this prospective study, we examined levels of NK cells and T lymphocytes subpopulations (Treg, T $\gamma\delta$, iNKT) circulating in the blood of patients, in the various phases of stroke (acute, subacute and recovery), and investigated whether these parameters differ in patients according to clinical status, thrombolytic treatment and SAI.

Fifty-two patients (25 women and 27 men) and 32 controls with risk factors of cardiovascular diseases were recruited. Demographic data, medical history, concomitant drugs were collected, general and neurological status were assessed (NIHSS, SSS, mRS scales), and type of stroke was defined (TOAST, OCSF). Blood samples in 1., 3., 10. and 90. days after stroke onset were obtained to measure inflammatory indicators and to detect T lymphocytes subpopulations and NK cells levels with flow cytometry analysis.

Stroke patients presented lymphocytopenia in the acute phase. Higher levels of CRP, WBC and lower levels of circulating lymphocytes correlated with deteriorated conditions and SAI diagnosis. Helios marker found to be important in differentiating Treg cells response; Treg Helios⁻ cells level was increased, and Treg Helios⁺ level was decreased in stroke patients, especially in women. Diabetic patients exhibited a higher level of Treg Helios⁺ in the acute phase. Patients with chronic ischemic heart disease revealed higher levels of Treg cells 90 days after stroke. Higher circulating Treg levels correlated with deteriorating clinical conditions and higher levels of CRP, while SAI+ patients presented a higher percentage of Treg Helios⁺ in the acute phase. Increased level of Helios⁺ 3 days after stroke correlated with increased neurological deficit 90 days after stroke. Decreased number of T $\gamma\delta$ and decreased percentage of V δ 2 in the acute phase was correlated with neurological deterioration. Patients with SAI and treated with rTPa exhibited a lower level of T $\gamma\delta$ in 90 days follow-up. There was a positive correlation between the percentage of V δ 2 and previous stroke in medical

history and a negative correlation with neurological improvement in the acute phase. Diabetic patients revealed lower levels of T $\gamma\delta$ cells in the subacute stroke phase. Lymphocytes iNKT were increased in the acute phase, which correlated with clinical deterioration. Better clinical conditions were connected with an increased level of NK cells in the subacute phase. Higher levels of CD4⁺ lymphocytes were connected with neurological improvement, contrary to CD8⁺ levels correlated positively to clinical deterioration and increased CRP serum concentration. CD8⁺ shift was observed in patients with hypertension.

Conclusions:

1. Regulatory T cells response to ischemic stroke is connected with Helios marker intracellular expression. It is gender-dependent, and its deleterious effect is due to the proinflammatory Helios⁻ type shift, especially in women.
2. Time-shifted suppressive Treg function (increased Helios⁺ percentage) and delayed proinflammatory activity (decreased Helios⁻ percentage) may lead to SAI development. Treg levels and inflammatory indicators correlation confirms Treg and SAI connection.
3. T $\gamma\delta$ lymphocytes have a long-lasting role in ischemic stroke and are related to V δ 2 type activity. Few months shifted changes of T $\gamma\delta$ levels correlate with previous ischemic stroke history, SAI diagnosis and thrombolytic treatment.
4. The detrimental role of iNKT lymphocytes is related to their increased level in the acute phase of stroke connected with clinical deterioration.
5. CD4⁺ shift is beneficial and correlated to neurological improvement, while CD8⁺ shift correlates with neurological deterioration and SAI development.