

# Αυξημένη παραγωγή της κυτταροκίνης ακτιβίνης-A σε νεογνικές λοιμώξεις

**Ξάνθου Μαριέττα, Φωτόπουλος Σπύρος, Πετράκου Ευτυχία, Ανατολίτου Φανή, Μουχτούρη Αλεξία, Αναγνωστάκου Μαρίνα**

Εργαστήριο Νεογνικής Ανοσοβιολογίας, Βαθ Νεογνικό Τμήμα Νοσοκομείου παιδών «Η Αγία Σοφία», Αθήνα.

Αλληλογραφία: Μαριέττα Ξάνθου, Υφηγήτρια Παιδιατρικής, Εργαστήριο Νεογνικής Ανοσοβιολογίας,  
Β' Νεογνικό Τμήμα Νοσοκομείου παιδών «Η Αγία Σοφία»  
Θηβών & Λειβαδιάς 1, Γουδί 11527 Αθήνα  
Τηλ.: 210-6712761, Fax: 210-6741608  
E-mail: xanthoumaria@yahoo.com

## Περίληψη

**Εισαγωγή:** Η κυτταροκίνη ακτιβίνη-A συμμετέχει σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Σκοπός της μελέτης ήταν να μετρηθούν τα επίπεδα της ακτιβίνης-A στις νεογνικές λοιμώξεις και να συγκριθούν με αυτά της προ-φλεγμονώδους χημοκίνης, CXCL-8. **Ασθενείς και Μέθοδοι:** Μελετήθηκαν 37 νεογνά με νοσοκομειακή λοίμωξη: 16 με ΒΓ < 1500 γρ., 11 με ΒΓ = 1.500-2.800 γρ. και 10 με ΒΓ > 2.800 γρ. Τριανταεπτά υγιή νεογνά χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Δείγματα περιφερικού αίματος ελήφθησαν την 1η, 3η και 5η ημέρα από τη διάγνωση της λοίμωξης. Τα επίπεδα της ακτιβίνης A και CXCL8 μετρήθηκαν στον ορό χρησιμοποιώντας ELISA. **Αποτελέσματα:** Συγκριτικά με τα υγιή, τα σηψαιμικά νεογνά με ΒΓ < 1500γρ, είχαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα ακτιβίνης-A κατά την 1η, 3η και 5η μέρα μετά τη λοίμωξη. Τα νεογνά με ΒΓ = 1500-2800γρ είχαν αυξημένα επίπεδα ακτιβίνης-A την τρίτη και την πέμπτη μέρα. Αντίθετα, τα επίπεδα της χημοκίνης CXCL-8 ήταν σημαντικά αυξημένα στα πρόωρα με ΒΓ = 1500-2800γρ και στα τελειόμηνα νεογνά. **Μελέτες κινητικής έδειξαν** ότι τα επίπεδα της ακτιβίνης-A αυξάνουν μεταξύ 1ης, 3ης και 5ης μέρας μετά τη λοίμωξη ενώ της IL-8 μειώνονται κατά την ίδια χρονική περίοδο. **Συμπεράσματα:** Η ακτιβίνη-A είναι αυξημένη στις νεογνικές λοιμώξεις και ιδιαίτερα στα πρόωρα νεογνά. Οι διαφορές στην κινητική έκφρασης της ακτιβίνης-A και της CXCL-8 μπορεί να υποδηλώνουν ένα διαφορετικό μηχανισμό δράσης: η έκφραση της CXCL-8 νωρίτερα κατά τη λοίμωξη υποδηλώνει ένα προ-φλεγμονώδη ρόλο, ενώ η αύξηση της ακτιβίνης-A σε μεταγενέστερο στάδιο υποδεικνύει αντι-φλεγμονώδη δράση, προστατευτική στην παθολογία των λοιμώξεων.

*Λέξεις κλειδιά:* νεογνό, πρόωρο, τελειόμηνο, νεογνική λοίμωξη, ακτιβίνη-A, CXCL-8

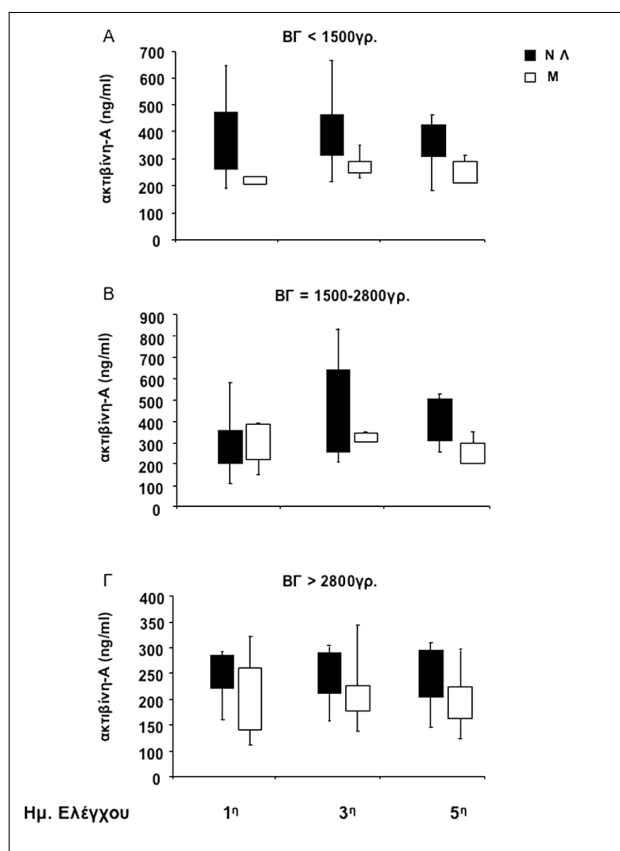
## Εισαγωγή

Η μελέτη των φλεγμονωδών μεσολαβητών με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση των νεογνικών λοιμώξεων, αποτελεί ενδιαφέρον πεδίο έρευνας αφού η νοσηρότητα και η θνητότητα των νεογνών από τις βαριές λοιμώξεις παραμένει σημαντική, παρά την πρόοδο στην νεογνολογία και την χρήση νεότερων αντιβιοτικών<sup>1</sup>. Κατά τη διάρκεια των νεογνικών λοιμώξεων, αναπτύσσεται μια φλεγμονώδης ανοσολογική αντίδραση τόσο στο σημείο της φλεγμονής όσο και στον ορό η οποία ενεργοποιεί την άμυνα του οργανισμού έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών<sup>2,3</sup>. Η αντίδραση αυτή χαρακτηρίζεται από έκκριση προ-φλεγμονωδών παραγόντων όπως είναι οι κυτταροκίνες, π.χ. οι ιντερλευκίνες (IL) -1 $\beta$ , IL-6, ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF)- $\alpha$ , και οι χημοκίνες, όπως η CXCL8 και η CCL2. Ταυτόχρονα, εκκρίνονται αντι-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως οι IL-4, IL-10 και ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (TGF)- $\beta$ 1, που στόχο έχουν να περιορίσουν την υπέρμετρη φλεγμονώδη απάντηση που μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη ιστών και οργάνων<sup>1</sup>.

Η ακτιβίνη-Α, είναι μια κυτταροκίνη, που ανήκει στην υπερικογενεία του TGF- $\beta$ 1 και συμμετέχει σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις, διαδικασίες ανάπτυξης των ιστών και στην ίνωση<sup>4</sup>. Η δράση της ακτιβίνης-Α αναστέλλεται από μια πρωτεΐνη συνδεδεμένη σε αυτήν, τη φολιστατίνη. Η ακτιβίνη-Α παράγεται από διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα.

Πρόσφατες μελέτες *in vitro* και με πειραματόζωα έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της ακτιβίνης-Α αυξάνονται κατά τη διάρκεια των λοιμώξεων. Η χορήγηση βακτηριδιακής ενδοτοξίνης σε πρόβατα οδηγεί σε ταχεία, συγχρόνως με αυτή του TNF- $\alpha$ , έκκριση της ακτιβίνης-Α στον ορό<sup>5,6</sup>. Οι Michel και συνεργάτες<sup>7</sup> έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις της ακτιβίνης-Α και της φολιστατίνης στον ορό ασθενών με σηψαιμία αυξάνονται σε σχέση με υγιείς μάρτυρες. Τέλος, σε μοντέλο βακτηριδιακής μηνιγγίτιδας σε κουνέλια καθώς και σε ασθενείς με μηνιγγίτιδα, παρατηρήθηκε ότι η αυξημένη παραγωγή ακτιβίνης-Α στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) συνδέεται με την ενεργοποίηση της μικρογλοίας μέσω του υποδοχέα της βακτηριδιακής ενδοτοξίνης, TLR4<sup>8,9</sup>.

Οι υπάρχουσες μελέτες αναφορικά με την έκφραση της ακτιβίνης-Α κατά την περιγεννητική περίοδο, έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα στον μητρικό ορό, στον πλακούντα και στον ορό εμβρύων σε



**Εικόνα 1.** Αύξηση της ακτιβίνης-Α σε πρόωρα σηψαιμικά νεογνά.

Τα επίπεδα της ακτιβίνης-Α στον ορό των νεογνών με λοίμωξη με BG < 1500g, ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα από εκείνα των υγιών μαρτύρων ( $p < 0,043$ ,  $p < 0,03$  και  $p < 0,035$  για την 1<sup>η</sup>, 3<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> ημέρα, αντίστοιχα). Τα σηψαιμικά νεογνά με BG = 1500-2800g, είχαν στατιστικά αυξημένα επίπεδα ακτιβίνης-Α στον ορό τους συγκρινόμενα με τα υγιή την 3<sup>η</sup> ( $p < 0,05$ ) και 5<sup>η</sup> ( $p < 0,05$ ) ημέρα. Τα επίπεδα της ακτιβίνης-Α σε σηψαιμικά νεογνά με BG > 2800g, δεν διέφεραν στατιστικά από τα επίπεδα των υγιών μαρτύρων.

κνήσεις με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης<sup>10-13</sup>.

Οι Florio και συν.<sup>14</sup> έδειξαν ότι πρόωρα νεογνά με στοιχεία περιγεννητικής υποξίας κατά τη γέννηση παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα ακτιβίνης-Α στον ορό, υποδηλώνοντας ότι η κυτταροκίνη αυτή είναι ένας δείκτης ενδομήτριας ασφυξίας<sup>14</sup>. Η αύξηση της ακτιβίνης-Α στο ENY τελειομένων ασφυκτικών νεογνών έχει βρεθεί επίσης να συνδέεται με την εκδήλωση υποξικής ισχαιμικής εγκεφαλοπάθειας<sup>15</sup>.

Μελέτες προσδιορισμού των επιπέδων της ακτιβί-

νης-A σε νεογνά με λοιμώξεις δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα δημοσιευμένες στην ελληνική ή τη διεθνή βιβλιογραφία. Σκοπός της μελέτης μας ήταν: α) να ερευνήσουμε την παραγωγή της ακτιβίνης-A στον ορό πρόωρων και τελειόμηνων νεογνών με νοσοκομειακή λοίμωξη και β) να συσχετίσουμε την κινητική των επιπέδων της ακτιβίνης-A σε διαφορετικές χρονικές περιόδους της λοίμωξης με την κινητική της γνωστής προ-φλεγμονώδους χημοκίνης, CXCL-8.

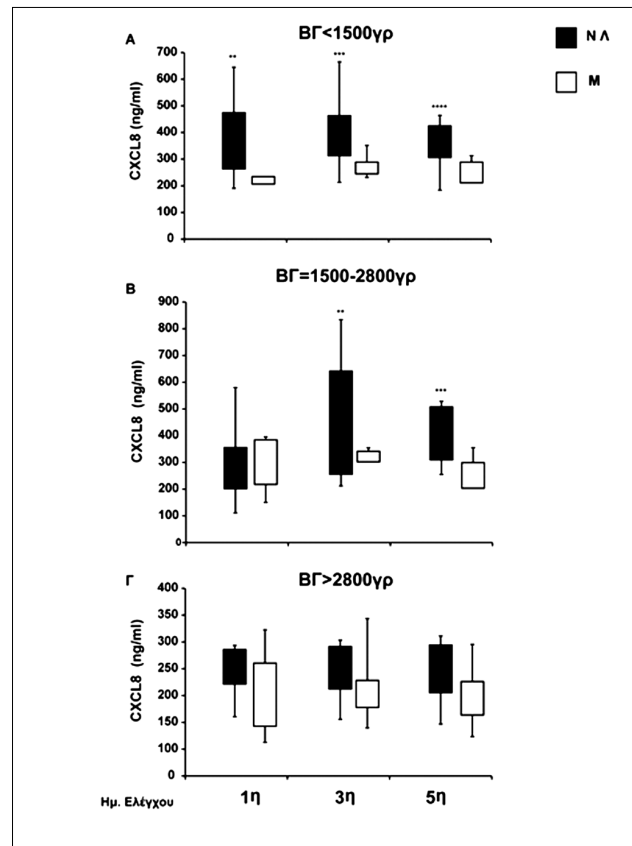
## Υλικό και Μεθοδολογία

### Νεογνά

Μελετήσαμε τριάντα επτά (37) πρόωρα και τελειόμηνα νεογνά με νοσοκομειακή λοίμωξη. Τα 16 είχαν βάρος γέννησης (ΒΓ) < 1500γρ. (1117 ± 196γρ.), 11 είχαν ΒΓ = 1500-2800γρ. (2002 ± 463γρ.) και τα υπόλοιπα 10 είχαν ΒΓ > 2800γρ. (3353 ± 428 γρ.). Οι ηλικίες κύησης ήταν 28,9 ± 1,3 εβδ., 33,6 ± 2,5 εβδ. & 38,2 ± 1,3 εβδ., αντίστοιχα. Τριανταεπτά υγιή νεογνά ίδιου ΒΓ και ηλικιών κύησης χωρίς νοσοκομειακή λοίμωξη χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Νοσοκομειακή θεωρήθηκε κάθε λοίμωξη που εκδηλωνόταν μετά το 3ο 24ωρο της ζωής. Η λοίμωξη χαρακτηριζόταν “βέβαιη” όταν στην καλλιέργεια αίματος ή στο ΕΝΥ αναπτύσσονταν παθογόνος μικροοργανισμός και συγχρόνως υπήρχε συμβατή κλινική και εργαστηριακή εικόνα λοίμωξης. Η λοίμωξη χαρακτηριζόταν “πιθανή” όταν υπήρχαν τρία κλινικά σημεία και τουλάχιστον δύο παθολογικά εργαστηριακά ευρήματα<sup>16</sup>. Νεογνά με μείζονες συγγενείς ανωμαλίες, σύμφυτες διαταραχές του μεταβολισμού και νεογνά που είχαν υποβληθεί σε ανοσοθεραπεία αποκλείονταν από τη μελέτη. Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του νοσοκομείου και δόθηκε έγγραφη συγκατάθεση από τους γονείς.

### Μεθοδολογία

Δείγματα περιφερικού αίματος ελήφθησαν από νεογνά με λοιμώξεις κατά την 1η, 3η και 5η ημέρα από τη διάγνωση. Στις ίδιες χρονικές περιόδους πάρθηκαν δείγματα και από τα υγιή νεογνά-μάρτυρες. Το αίμα διατηρούνταν σε πάγο για 2 ώρες, στη συνέχεια φυγοκεντρώνταν και ο συλλεγόμενος ορός φυλάσσονταν στους -20°C. Τα επίπεδα της ακτιβίνης-A και της CXCL-8 προσδιορίστηκαν στον ορό των νεογνών με τη μέθοδο ELISA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Quantikine R & D Systems). Τα κατώτερα επίπεδα ανίχνευσης ήταν: 31,2 pg/ml για την CXCL-8 και 7,8 pg/ml για την ακτιβίνη-A.



**Εικόνα 2.** Παραγωγή της CXCL8 σε σηψαιμικά νεογνά. Τα επίπεδα της CXCL8 στον ορό σηψαιμικών νεογνών με ΒΓ < 1500γρ. δεν διέφεραν στατιστικά από τα αντίστοιχα επίπεδα των υγιών μαρτύρων. Τα σηψαιμικά νεογνά με ΒΓ = 1500-2800γρ. είχαν στατιστικά αυξημένα επίπεδα CXCL8 στον ορό τους συγκρινόμενα με τα υγιή την 3η ( $p < 0,05$ ) και 5η ( $p < 0,005$ ) ημέρα της λοίμωξης. Τα επίπεδα της CXCL8 σε σηψαιμικά νεογνά με ΒΓ > 2800γρ. ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα συγκρινόμενα με εκείνα των μαρτύρων σε όλες τις περιόδους ελέγχου [ $p = 0,001$ , 3η ( $p = 0,003$ ) και 5η ( $p = 0,001$ ) ημέρα].

### Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μη παραμετρικούς ελέγχους. Ο έλεγχος Mann-Whitney χρησιμοποιήθηκε για τις συγκρίσεις των επιπέδων της ακτιβίνης-A και της CXCL8 μεταξύ των δύο ομάδων νεογνών και η μη παραμετρική μέθοδος σύγκρισης επανειλημμένων μετρήσεων (Friedman test) χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της κινητικής των κυτταροκινών.

## Αποτελέσματα

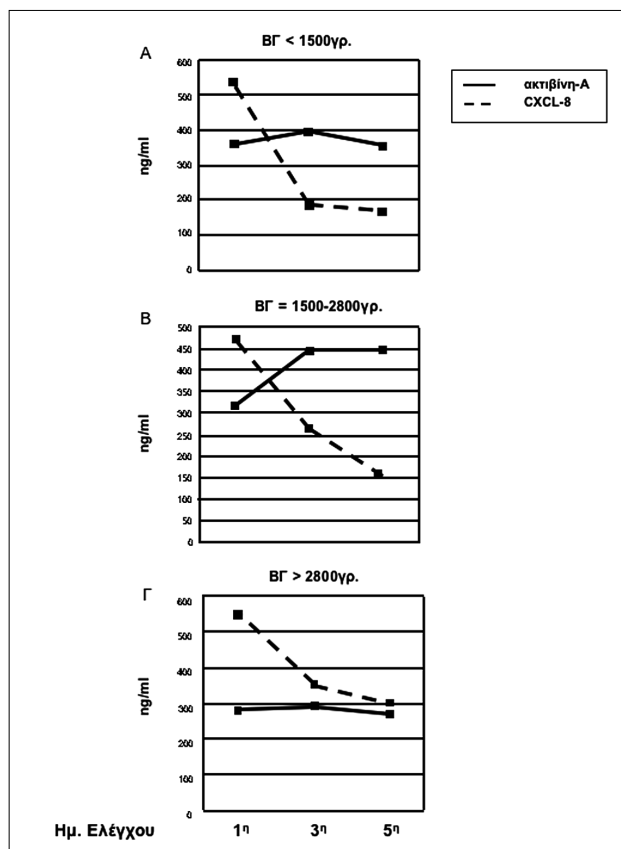
### Αύξηση της παραγωγής της ακτιβίνης-A σε πρόωρα νεογνά με λοιμώξεις

Οι μελέτες μας έδειξαν ότι τα επίπεδα της ακτιβίνης-A στον ορό των νεογνών με λοίμωξη που είχαν ΒΓ < 1500γρ. ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα από εκείνα των υγιών μαρτύρων και στις τρεις χρονικές περιόδους ελέγχου [(1η  $p < 0,043$ , 3η  $p < 0,03$  και 5η  $p < 0,035$  ημέρα), Εικόνα 1Α]. Τα σηψαιμικά νεογνά με ΒΓ = 1500-2800γρ. είχαν αυξημένα επίπεδα ακτιβίνης-A στον ορό τους συγκρινόμενα με τα υγιή, οι διαφορές όμως ήταν στατιστικά σημαντικές μόνο την 3η ( $p < 0,05$ ) και 5η ( $p < 0,05$ ) ημέρα από την έναρξη της λοίμωξης (Εικόνα 1Β). Αντίθετα, τα επίπεδα της ακτιβίνης-A σε σηψαιμικά νεογνά με ΒΓ > 2800γρ. δεν διέφεραν στατιστικά από τα επίπεδα των υγιών, ιδίου βάρους γέννησης, νεογνών σε καμία χρονική περίοδο ελέγχου (Εικόνα 1Γ).

Τα επίπεδα της CXCL8 στον ορό σηψαιμικών νεογνών με ΒΓ < 1500γρ. δεν διέφεραν στατιστικά από τα αντίστοιχα επίπεδα των υγιών μαρτύρων (Εικόνα 2Α). Τα σηψαιμικά νεογνά με ΒΓ = 1500-2800γρ. είχαν αυξημένα επίπεδα CXCL8 στον ορό συγκρινόμενα με τα υγιή, οι διαφορές όμως ήταν στατιστικά σημαντικές την 3η ( $p < 0,05$ ) και 5η ( $p < 0,005$ ) ημέρα από την έναρξη της λοίμωξης (Εικόνα 2Β). Επιπλέον, αντίθετα από ότι παρατηρήθηκε για την παραγωγή της ακτιβίνης-A, τα επίπεδα της CXCL8 σε σηψαιμικά νεογνά με ΒΓ > 2800γρ. ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα συγκρινόμενα με εκείνα των μαρτύρων και στις τρεις χρονικές περιόδους ελέγχου [1η ( $p = 0,001$ ), 3η ( $p = 0,003$ ) και 5η ( $p = 0,001$ ) ημέρα], (Εικόνα 2Γ).

### Η παραγωγή της ακτιβίνης-A παρουσιάζει αντίθετη κινητική σε σχέση με αυτήν της CXCL-8

Στη συνέχεια μελετήσαμε την κινητική των επιπέδων της ακτιβίνης-A καθώς και της CXCL-8 στον ορό των νεογνών με λοιμώξεις στις τρεις χρονικές περιόδους ελέγχου. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι στα νεογνά με ΒΓ < 1500γρ., τα επίπεδα της ακτιβίνης-A αυξάνονταν μεταξύ της 1ης και της 3ης ημέρας από τη διάγνωση της λοίμωξης, αλλά η αύξηση δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3Α). Αντίθετα, τα επίπεδα της CXCL-8 ελαττώνονταν μεταξύ της 1ης και της 3ης ημέρας, αλλά η ελάττωσή τους δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3Α). Στην ομάδα των νεογνών με ΒΓ μεταξύ 1500-2800γρ. παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της 1ης, 3ης και 5ης ημέρας από



**Εικόνα 3.** Κινητική συσχέτιση της έκφρασης της ακτιβίνης-A και της CXCL8 στις νεογνικές λοιμώξεις.

Τα επίπεδα της ακτιβίνης-A στον ορό των νεογνών με ΒΓ = 1500-2800γρ. αυξάνονταν μεταξύ της 1ης και της 3ης και της 1ης και της 5ης ημέρας ( $p < 0,014$  και  $p < 0,014$ , αντίστοιχα). Αντίθετα, τα επίπεδα της CXCL-8 μειώνονταν μεταξύ της 1ης και της 3ης ημέρας ( $p < 0,012$ ), μεταξύ της 1ης και της 5ης ( $p < 0,012$ ) ημέρας καθώς και μεταξύ της 3ης και της 5ης ( $p < 0,012$ ) ημέρας.

τη διάγνωση της λοίμωξης τόσο στην ακτιβίνη-A όσο και στην CXCL-8 (Εικόνα 3B). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της ακτιβίνης-A στον ορό των νεογνών αυξάνονταν μεταξύ της 1ης και της 3ης και της 1ης και της 5ης ημέρας ( $p < 0,014$  και  $p < 0,014$ , αντίστοιχα). Αντίθετα, τα επίπεδα της CXCL-8 μειώνονταν μεταξύ της 1ης και της 3ης ημέρας ( $p < 0,012$ ), μεταξύ της 1ης και της 5ης ( $p < 0,012$ ) ημέρας καθώς και μεταξύ της 3ης και της 5ης ( $p < 0,012$ ) ημέρας. Τέλος, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα επίπεδα της ακτιβίνης-A στον ορό των νεογνών με ΒΓ > 2800γρ. δε διέφεραν μεταξύ τους στις τρεις χρονικές περιόδους ελέγχου (Εικόνα 3Γ). Επίσης, τα επίπεδα της CXCL-8 ελαττώνονταν μεταξύ της



1ης και της 3ης ημέρας και μεταξύ της 1ης και της 5ης ημέρας, αλλά όχι στατιστικά σημαντικά.

## Συζήτηση

Στη μελέτη αυτή δείξαμε, για πρώτη φορά, ότι η ακτιβίνη-A αυξάνεται στον ορό των νεογνών, και κυρίως των προώρων, κατά τη διάρκεια των λοιμώξεων. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της ακτιβίνης-A είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα των σηψαιμικών προώρων με Β.Γ. <1500γρ. σε σχέση με εκείνα των υγιών μαρτύρων σε όλες τις χρονικές περιόδους ελέγχου. Στα πρόωρα μεγαλύτερου βάρους γέννησης, τα επίπεδα της ακτιβίνης-A είναι υψηλότερα την 3η και 5η ημέρα μετά τη λοίμωξη σε σχέση με τους μάρτυρες. Τέλος, τα σηψαιμικά τελειόμηνα νεογνά δεν είχαν διαφορά στα επίπεδα ακτιβίνης-A σε σύγκριση με τα υγιή. Από τα ευρήματά μας αυτά, φαίνεται ότι η παραγωγή της ακτιβίνης-A στον ορό των σηψαιμικών νεογνών αυξάνεται αντιστρόφως ανάλογα με το βάρος γέννησης.

Η αύξηση της ακτιβίνης-A στην ομάδα των σηψαιμικών χαμηλού ΒΓ προώρων μπορεί να είναι αποτέλεσμα έντονης φλεγμονώδους αντίδρασης, υποδηλώνοντας έτσι ένα προ-φλεγμονώδη ρόλο για την κυτταροκίνη αυτή παρόμοιο με άλλων προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών. Από την άλλη μεριά, η αύξηση της ακτιβίνης-A στην ομάδα των σηψαιμικών χαμηλού ΒΓ προώρων μπορεί να έχει ως σκοπό την προφύλαξη τους από υπέρμετρες φλεγμονώδεις αντιδράσεις που απαντούν συχνά στα νεογνά αυτά<sup>17,18</sup>. Η υπόθεση αυτή προϋποθέτει ένα αντι-φλεγμονώδη/προφυλακτικό ρόλο για την ακτιβίνη-A.

Σήμερα υπάρχει διάσταση απόψεων αναφορικά με τη δράση της ακτιβίνης-A: δεν έχει διευκρινιστεί εάν αποτελεί προ-φλεγμονώδη ή αντι-φλεγμονώδη κυτταροκίνη. Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ένα προ-φλεγμονώδη ρόλο για την ακτιβίνη-A. Συγκεκριμένα, έρευνες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της ακτιβίνης-A αυξάνονται ταχύτατα στην κυκλοφορία του αίματος μετά από ενεργοποίηση με βακτηριακή ενδοτοξίνη, η δε αύξηση της παραγωγής της ακτιβίνης-A γίνεται μέσω ενεργοποίησης του TLR-4<sup>19</sup>. Επιπλέον, η χορήγηση του αναστολέα της ακτιβίνης-A, φολιστατίνης, μειώνει τις κυτταροκίνες TNF-α και IL-1β και αυξάνει την IL-6. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει το ότι η χορήγηση μιας και μόνο δόσης φολιστατίνης, αυξάνει την επιβίωση των πειραματόζωων μετά από θανατηφόρα δόση βακτηριακής ενδοτοξίνης<sup>19</sup>.

Σχετικά με την προ-φλεγμονώδη δράση της ακτιβίνης-A, μελέτες in vitro έχουν δείξει ότι η ακτιβίνη-

A παράγεται από τα μονοκύτταρα μετά από ενεργοποίηση με T λεμφοκύτταρα ή/και με TNF-α και IL-1β<sup>20</sup>, ενώ η παραγωγή της αναστέλλεται από τα κορτικοστεροειδή<sup>21</sup>. Επιπλέον, η ακτιβίνη-A ενεργοποιεί την παραγωγή των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1β, IL-6 και TNF-α<sup>22</sup>.

Αντίθετα, άλλες μελέτες προσδιορίζουν την ακτιβίνη-A ως μια αντι-φλεγμονώδη κυτταροκίνη που παράγεται από την μικρογλοία<sup>23</sup>. Συγκεκριμένα, οι Sugama και συν.<sup>23</sup> βρήκαν ότι η ακτιβίνη-A αναστέλλει την έκφραση της κασπάσης-1 και των κυτταροκινών που εξαρτώνται από αυτήν, IL-18 και IL-6, στην μικρογλοία ποντικών in vitro και in vivo<sup>23</sup>. Σε ενίσχυση των ανωτέρω, οι Sulyok και συν.<sup>24</sup> θεωρούν ότι η ακτιβίνη-A παίζει νευροπροφυλακτικό ρόλο στις οξείες εγκεφαλικές βλάβες, υποβοηθώντας την επιβίωση των νευρώνων του μεσεγκεφάλου και του ιπποκάμπου in vitro<sup>25</sup> και μειώνοντας την ισχαιμική εγκεφαλική βλάβη σε ποντίκια<sup>26</sup>.

Άλλες in vitro μελέτες επιβεβαιώνουν την αντι-φλεγμονώδη δράση της ακτιβίνης-A μια και έχουν δείξει ότι η χορήγηση της ακτιβίνης-A καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T και B κυττάρων, τη φαγοκυττάρωση των μονοκυττάρων και την παραγωγή πρωτεϊνών οξειάς φάσης<sup>27-29</sup>. Ακόμη βρέθηκε ότι η ακτιβίνη-A: α) ελαττώνει την-εξαρωόμενη από το CD40 συνδέτη-παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημοκινών από ανθρώπινα μονοκύτταρα και δένδριτικά κύτταρα περιφερικού αίματος<sup>30</sup>, β) ελαττώνει την έκκριση της IL-1β και του νιτρικού οξέος και μειώνει τη φαγοκυτταρική ικανότητα των μακροφάγων από πειραματόζωα<sup>31</sup> και γ) καταστέλλει ορισμένες δράσεις των κυττάρων 'natural killer' (κύτταρα φυσικοί φονείς) του ανθρώπινου περιφερικού αίματος<sup>32</sup>. Τέλος, μια πολύ ενδιαφέρουσα πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η ακτιβίνη-A συμμετέχει στη δημιουργία T ρυθμιστικών κυττάρων, τα οποία είναι απαραίτητα για την καταστολή υπέρμετρων φλεγμονωδών αντιδράσεων<sup>33</sup>.

Από όλα τα παραπάνω, φαίνεται ότι η ακτιβίνη-A έχει προ-φλεγμονώδεις αλλά και αντι-φλεγμονώδεις δράσεις, οι οποίες εξαρτώνται από τη χρονική περίοδο δράσης της κατά τη διάρκεια μιας φλεγμονής, αλλά και από τα κύτταρα στα οποία επιδρά<sup>34, 6</sup>. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν επίσης ότι τα επίπεδα της προ-φλεγμονώδους χημοκίνης CXCL-8 στον ορό των μεγαλύτερου βάρους προώρων είναι σημαντικά αυξημένα την 3η και 5η μέρα σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Τη μέγιστη αύξηση είχαν οι τιμές της CXCL-8 στα τελειόμηνα νεογνά. Σε συμφωνία με τα ευρήματά μας, αύξηση της CXCL-8 έχει πα-

ρατηρηθεί σε πολλές μελέτες σε πρόωρα και τελειόμηνα σηψαιμικά νεογνά<sup>35-38</sup> και η CXCL-8 έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης λοίμωξης<sup>39</sup>.

Θέλοντας να βγάλουμε περισσότερα συμπεράσματα αναφορικά με το ρόλο της ακτιβίνης-Α στις νεογνικές λοιμώξεις, κάναμε συσχέτιση της κινητικής της έκφρασης της ακτιβίνης-Α καθώς και της προφλεγμονώδους CXCL-8 στον ορό των σηψαιμικών νεογνών σε διάφορες χρονικές στιγμές από τη διάγνωση της λοίμωξης. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η παραγωγή της ακτιβίνης-Α στον ορό σηψαιμικών πρόωρων νεογνών ακολουθεί αντιστρόφως ανάλογη κινητική σε σχέση με αυτήν της CXCL-8. Συγκεκριμένα, δείξαμε ότι τα επίπεδα της ακτιβίνης-Α αυξάνονται στον ορό των νεογνών από την 1η μέχρι και την 5η ημέρα. Αντίθετα, τα επίπεδα της CXCL-8 μειώνονται κατά τη διάρκεια της λοίμωξης από την 1η μέχρι και την 5η ημέρα. Από τα παραπάνω μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι, δεδομένου του προ-φλεγμονώδους ρόλου της CXCL-8, η αύξηση της ακτιβίνης-Α σε μεταγενέστερα στάδια κατά τη λοίμωξη μπορεί να έχει ως στόχο την ελάττωση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημοκινών και ως εκ τούτου την προστασία του νεογνού από μια υπέρμετρη φλεγμονώδη αντίδραση. Η υπόθεση αυτή αποδίδει έναν αντιφλεγμονώδη ρόλο για την ακτιβίνη-Α κατά τη διάρκεια των λοιμώξεων τουλάχιστον σε ότι αφορά τα πρόωρα. Το συμπέρασμα αυτό είναι σύμφωνο με τις μελέτες που υποστηρίζουν το νευροπροστατευτικό ρόλο της ακτιβίνης σε εγκεφαλικές βλάβες.

Συμπερασματικά, οι μελέτες μας έδειξαν για πρώτη φορά την αύξηση της παραγωγής της κυτταροκίνης ακτιβίνης-Α σε λοιμώξεις πρόωρων νεογνών. Επιπλέον, μελέτες συσχέτισης της κινητικής της ακτιβίνης-Α και της CXCL-8 υποδεικνύει μια προστατευτική δράση για την ακτιβίνη-Α στα νεογνά κατά τη διάρκεια των λοιμώξεων. Για τον καθορισμό της ακριβούς δράσης της ακτιβίνης-Α στα νεογνά χρειάζεται επιπλέον έρευνα με την οποία ασχολούμαστε σήμερα. Με τον προσδιορισμό της δράσης της ίσως καταστεί δυνατή η μελλοντική χορήγησή της σε νεογνά με σκοπό τη ρύθμιση των τόσο επικίνδυνων γι'αυτά φλεγμονωδών αντιδράσεων.

#### Ευχαριστίες

Ευχαριστούμε το νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία» για την οικονομική υποστήριξη της ερευνητικής εργασίας και την Άννα Νικολαΐδου για γραμματειακή υποστήριξη.

## Increased production of the cytokine Activin-A in neonatal infections

Xanthou M., Fotopoulos S., Petrakou E., Anatolitou F., Mouchtouri A., Anagnostakou M.

2nd Neonatal Department «H Agia Sofia» Hospital, Athens

Correspondence: M. Xanthou

2nd Neonatal Department Hospital  
«H Agia Sofia», Athens

1 Thivon & Livadias, Goudi 11527 Athens

Tel.: +30 210-6712761, Fax: 210-6741608

E-mail: xanthoumaria@yahoo.com

### Summary

**Introduction:** The cytokine activin A is involved in immune responses and its expression has been associated with inflammatory processes. The aim of this study was to investigate the expression of activin A in neonates with nosocomial infection and to compare activin-A levels with those of the pro-inflammatory chemokine, CXCL-8. **Patients and methods:** 37 infected neonates were studied: 16 with birth weight (BW) <1500g, 11 with BW=1500-2800g and 10 with BW < 1500-2800g. 37 healthy neonates were used as controls. Peripheral blood samples were obtained on the 1st, 3rd and 5th days following infection. Cytokine and chemokine levels were measured in the serum by ELISA. **Results:** Septicemic neonates with BW < 1500g had significantly increased activin-A levels on the 1st, 3rd and 5th days as compared to controls. Neonates with BW=1500-2800g had significantly increased activin A levels on the 3rd and on the 5th day. In contrast, levels of CXCL-8 were significantly increased in preterms with BW=1500-2800g and in full term neonates. Kinetic studies showed that activin-A levels increased between the 1st, 3rd and 5th days following infection while IL-8 levels decreased during the same time period. **Conclusion:** Activin-A is increased during neonatal infection in premature neonates and its expression is inversely correlated with the birth weight, especially in preterms. The distinct pattern of expression between CXCL-8 and activin-A may suggest a different mechanism of action: early CXCL-8 expression points to a pro-inflammatory effect, while increased activin-A production at a later time point suggests an anti-inflammatory role, protective against pathogenic neonatal infections.

**Key words:** neonates, preterm, full term, neonatal infection, activin-A, CXCL8

## Βιβλιογραφία

1. Lam H.S, Pak C.NG. Biochemical markers of neonatal sepsis. *Pathology* 2008; 40(2):141-148
2. Fotopoulos S, Mouchtouri A, Xanthou G, Lipson N, Petrakou E, Xanthou M. Inflammatory chemokines expression in the peripheral blood of neonates with perinatal asphyxia and perinatal or nosocomial infections. *Acta Paediatr* 2005;94: 800-806
3. Xanthou M. Proinflammatory cytokines and chemokines in neonatal brain damage. *Current Pediatr* 2006; Rev 2:3-15
4. Werner S, Alzheimer C. Roles of activin in tissue repair, fibrosis and inflammatory disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17:157-71.
5. Jones KL, Brauman JN, Groome NP, de Kretser DM & Phillips DJ. Activin A release into the circulation is an early event in systemic inflammation and precedes the release of follistatin. *Endocrinology* 2000;141:1905-8
6. Jones KL, de Kretser DM, Clakre IJ, Scheerlinck JPY and Phillips DJ. Characterisation of the rapid release of Activin-A following acute lipopolysaccharide challenge in the ewe. *J Endocrinol* 2004;182:69-80
7. Michel U, Ebert S., Phillips D. and Nau R. Serum concentrations of activin and follistatin are elevated and run in parallel in patients with septicaemia. *Eur J Endocrinol* 2003;148:559-564
8. Michel U, Gerber JE, O'Connor A, Bunkowski S, Bruch W, Nau R et al. Increased activin levels in cerebrospinal fluid of rabbits with bacterial meningitis are associated with activation of microglia. *J Neurochem* 2003;86:238-45
9. Ebert S, Phillips DJ, Jenzewski P, Nau R, O'Connor AE, Michel U. Activin-A concentrations in human cerebrospinal fluid are age-dependent and elevated in meningitis. *J Neurol Sci* 2006; 250:50-7
10. Barkehall - Thomas A, Tong S, Baker LS, Edwards A and Wallace EM. Maternal serum activin-A and the prediction of intrauterine growth restriction. *Aust NZ J Obstet Gynecol* 2006;46:97-101.
11. Mylonas I, Schiessl B, Jeschke U, Vogl J, Makrigianakis A, Kuhn C. et al. Expression of Inhibin/activin Subunits alpha (-alpha), beta A (- beta A) and beta B (- beta B) in Placental Tissue of Normal and Intrauterine Growth Restricted (IUGR) Pregnancies. *J Mol Histol* 2006; 37: 43-52.
12. Morpurgo P.S., Cetin I, Borgato S, Cortelazzi D, Nobile-Desantis MS, Vaghi I et al. Circulating levels of inhibin A, inhibin B and activin A in normal and intrauterine growth restricted (IUGR) fetuses. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;117:38-44
13. Farina A, Lambert-Messerlian GM, Canick JA, Banzola I, Carletti A, Concu M. et al. Total activin A in maternal blood as a marker of preterm delivery in low-risk asymptomatic patients. *Prenat Diagn* 2006;26:277-81
14. Florio P, Perrone S, Luisi S., Longini M, Tanganelli D, Petraglia F. et al. Activin-A plasma levels at birth: an index of fetal hypoxia in preterm newborn. *Pediatr Res* 2003;54:696-700
15. Florio P, Luisi S, Bruschetini M, Grutzfeld D, Dobrzanska A, Bruschetini P. et al. Cerebrospinal fluid activin a measurement in asphyxiated full-term newborns predicts hypoxic ischemic encephalopathy. *Clin Chem* 2004;50:2386-9.
16. Klein JO, Marcy SM. Bacterial sepsis and meningitis. In: Renington JS, Klein JO, editors. *Infectious diseases of the fetus and the newborn infants*. PA: WB Saunders. 1995; p.835-990.
17. Zhao J, Kim KD, Yang X, Auh S, Fu Y-X, Tang H. et al. Hyper-innate responses in neonates lead to increased morbidity and mortality after infection. *PNAS* 2008 USA21:7528-7533.
18. Levy E, Xanthou G, Petrakou E, Zacharioudaki V, Tsatsanis C, Fotopoulos S, Xanthou M. et al. Distinct roles of TLR4 and CD14 in LPS- induced inflammatory responses in neonates. *Ped Res* 2009;66(2) in Press.
19. Jones KL, Mansell A, Patella S, Scott BJ, Hedger MP, de Kretser DM et al. Activin A is a critical component of the inflammatory response, and its binding protein, follistatin, reduces mortality in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ;104:16239-44
20. Abe M, Shintani Y, Eto Y, Harada K, Kosaka M and Matsumoto T. Potent induction of Activin-A secretion from monocytes and bone marrow stromal fibroblasts by cognate interaction with activated T cells. *J Leukoc Biol* 2002;72: 347-352.
21. Yu J, Shao LE, Frigon NL Jr, Lofgren J. and Schwall R. Induced expression of the new cytokine, Activin-A, in human monocytes: inhibition by glucocorticoids and retinoic acid. *Immunology* 1996; 88:368-374.
22. Yamashita N, Nakajima T, Takahashi H, Kaneoka H, Mizushima Y, Sakane T. Effects of activin A on IgE synthesis and cytokine production by human peripheral mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 1993;94:214-9.
23. Sugama S, Takenouchi T, Kitani H, Fujita M, Hashimoto M. Activin as an anti-inflammatory cytokine produced by microglia. *Journal of Neuroimmunology* 2007;192:31-39.
24. Sulyok S, Wankell M, Alzheimer C, Werner S. Activin: an important regulator of wound repair, fibrosis, and neuroprotection. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004;225;127-132.
25. Iwahore Y, Saito H, Torij K, Nishivana N. Activin exerts a neurotrophic effect on cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 1997;760:52-58
26. Wu DD, Lei M, Hughes PE, Sirimanne E, Gluckman P.D., Williams C.E. Expression of the activin axis and neuronal rescue effects of recombinant activin-A fol-

- lowing hypoxic-ischemic brain injury in the infant rat. *Brain Res* 1999;835: 369-378
27. Ohguchi M, Yamato K, Ishihara Y, Koide M, Ueda N, Okahashi N. et al. Activin-A regulates the production of mature interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 receptor antagonist in human monocytic cells. *J Interferon Cytokine Res* 1998;18:491-8.
  28. Hedger MP, Phillips DJ, de Kretser DM. Divergent cell-specific effects of activin-A on thymocyte proliferation stimulated by phytohemagglutinin, and interleukin 1- $\beta$  or interleukin 6 in vitro. *Cytokine* 2000;12:595-602.
  29. Yu EW, Dolter KE, Shao L-E, Yu J. Suppression of IL-6 biological activities by activin A and implications for inflammatory arthropathies. *Clin Exp Immunol* 1998;112:126-32.
  30. Robson NC, Phillips DJ, McAlpine T, Shin A, Svobodova S, Toy T, et al. Activin-A: a novel dendritic cell derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand specific cytokine and chemokine production. *Blood* 2008;111:2733-2743.
  31. Wang SY, Tai GX, Zhang PY, Mu DP, Zhang XJ, Liu ZH. Inhibitory effect of activin-A on activation of lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW254.7 cells. *Cytokine* 2008;42:85-91
  32. Robson NC, Wei H, McAlpine T, Kirkpatrick N, Cebon J, Maraskovsky E. Activin-A attenuates several human natural killer cell functions. *Blood* 2009;113(14):3218-25.
  33. Huber S, Stahl FR, Schrader J, Lüth S, Presser K, Carambia A. et al. Activin-A promotes the TGF-beta-induced conversion of CD4+CD25- T cells into Foxp3+ induced regulatory T cells. *J Immunol* 2009;15:182(8):4633-40.
  34. Phillips DJ, de Kretser DM. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Frontiers in Neuroendocrinology* 1998;19:287-322
  35. Franz AR, Bauer K, Schalk A. Measurement of interleukin-8 in combination with C-reactive protein reduced unnecessary antibiotic therapy in newborn infants : a multicenter, randomized, controlled trial. *Paediatrics* 2004; 114:1-8.
  36. Horisberger T, Harbarth S, Nadal D, Baenziger O, Fischer GE. G-CSF and IL-8 for early diagnosis of sepsis in neonates and critically ill children-safety and cost effectiveness of a new laboratory prediction model: study protocol of a randomized controlled trial. *Crit Care* 2004;8:443-50.
  37. Dembinski J, Behrendt D, Heep A, Dorn C, Reinsberg J, Bartmann P. Cell-associated interleukin-8 in cord blood of term and preterm infants. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:320-3
  38. Orlikowsky TW, Neunhoeffler F, Goelz R, Eichner M, Henkel C, Zwirner M. et al. Evaluation of IL-8 concentrations in plasma and lysed EDTA-blood in healthy neonates and those with suspected early onset bacterial infection. *Pediatr Res* 2004; 56:804-9.
  39. Berner R, Tuxen B, Clad A, Forster J, Brandis M. Elevated gene expression of interleukin-8 in cord blood is a sensitive marker for neonatal infection. *Eur J Pediatr* 2000;159(3):205-10

#### Κατάλογος συντομογραφιών

ΒΓ: βάρος γέννησης, IL: ιντερλευκίνη, TNF- $\alpha$ : παράγοντας νέκρωσης των όγκων, TGF- $\beta$ 1: αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού, TLR: υποδοχέας toll