

Grażyna Bugaj<sup>1</sup>, Anna Mania<sup>1</sup>, Magdalena Frydrychowicz<sup>2</sup>, Agnieszka Górna<sup>3</sup>,  
Karol Lubarski<sup>1</sup>, Katarzyna Mazur-Melewska<sup>1</sup>, Magdalena Figlerowicz<sup>1</sup>

Received: 05.05.2023  
Accepted: 02.06.2023  
Published: 31.10.2023

## Analysis of selected pro-inflammatory cytokines: IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, and TNF- $\alpha$ in children with seizure disorders during acute infection. Is there a specific pro-inflammatory cytokine profile in these patients?

Analiza stężenia wybranych cytokin prozapalnych – IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, TNF- $\alpha$  u dzieci ze stanami napadowymi w przebiegu ostrej infekcji. Czy u badanych pacjentów występuje specyficzny profil cytokin prozapalnych?

<sup>1</sup> Department of Infectious Diseases and Child Neurology, Poznan University of Medical Sciences, Poznań, Poland

<sup>2</sup> Department of Immunology, Poznan University of Medical Sciences, Poznań, Poland

<sup>3</sup> Department of Bioinformatics and Computational Biology, Poznan University of Medical Sciences, Poznań, Poland

Correspondence: Grażyna Bugaj, Department of Infectious Diseases and Child Neurology, Poznan University of Medical Sciences, Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań, Poland, e-mail: grazyna.bugaj@op.pl

<sup>1</sup> Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej, Instytut Pediatrii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań, Polska

<sup>2</sup> Zakład Immunologii, Katedra Patomorfologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań, Polska

<sup>3</sup> Zakład Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej, Katedra Patomorfologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań, Polska

Adres do korespondencji: Grażyna Bugaj, Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej, Instytut Pediatrii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań, e-mail: grazyna.bugaj@op.pl

### ORCID iDs

1. Grażyna Bugaj  <https://orcid.org/0000-0003-3054-1580>

2. Anna Mania  <https://orcid.org/0000-0003-0141-2560>

3. Magdalena Frydrychowicz  <https://orcid.org/0000-0002-9428-9583>

4. Agnieszka Górna  <https://orcid.org/0000-0001-5109-3188>

5. Karol Lubarski  <https://orcid.org/0000-0003-2354-4484>

6. Katarzyna Mazur-Melewska  <https://orcid.org/0000-0003-2695-4649>

7. Magdalena Figlerowicz  <https://orcid.org/0000-0003-4731-0658>

### Abstract

**Introduction and objective:** This study aimed to analyse the levels of selected pro-inflammatory cytokines in children with seizures during acute infection. **Materials and methods:** The study was conducted in the Department of Infectious Diseases and Child Neurology of the Poznan University of Medical Sciences from 19 January 2017 to 5 December 2020. Pro-inflammatory cytokines were measured in 64 patients with febrile seizures and 11 patients after an epileptic seizure in generalised epilepsy. The control group comprised 46 patients with delayed development. Serum pro-inflammatory cytokines were determined using the BioLegend's ELISA MAX™ Deluxe Set. Pathogens were detected by standard diagnostic methods. Total white blood cell count, C-reactive protein and procalcitonin were determined using standard diagnostic methods. **Results:** Significantly higher levels of all analysed pro-inflammatory cytokines were found in patients with simple and simple plus febrile seizures; interleukin 6, CXCL-8 in those with complex febrile seizures; interleukin 6, CXCL-8, tumour necrosis factor  $\alpha$  following epileptic seizure. The intensity of the inflammatory response in simple and simple plus febrile seizure patients corresponded to significantly higher levels of all pro-inflammatory cytokines and inflammatory markers. Pro-inflammatory profiles differed depending on the aetiology of the infection. Significantly higher levels interleukin 6, CXCL-8, tumour necrosis factor  $\alpha$  were found in simple and simple plus febrile seizure patients infected with human herpesvirus-6 compared to the control group. **Conclusions:** In patients with febrile seizures and epileptic seizures, the involvement of interleukin 1 $\beta$ , interleukin 6, CXCL-8, and tumour necrosis factor  $\alpha$  was confirmed in the inflammatory process, with a different distribution in the analysed groups. Pro-inflammatory cytokine profiles varied depending on the infectious aetiology.

**Keywords:** pro-inflammatory cytokines, febrile seizures, generalised epilepsy, infection, human herpesvirus-6

## Streszczenie

**Cel badania:** Prezentowane badanie miało na celu analizę stężenia wybranych cytokin prozapalnych u dzieci z drgawkami w przebiegu ostrej infekcji. **Materiał i metody:** Badanie przeprowadzono w Klinice Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej w Poznaniu w okresie od 19 stycznia 2017 do 5 grudnia 2020 roku. Grupa badana obejmowała 75 pacjentów hospitalizowanych po napadzie drgawek. Analizowano stężenia cytokin prozapalnych u 64 chorych z drgawkami gorączkowymi i 11 chorych po napadzie padaczkowym w padaczkę uogólnioną. Grupa kontrolna obejmowała 46 pacjentów z opóźnionym rozwojem. Stężenia cytokin prozapalnych w surowicy krwi oznaczono za pomocą zestawów ELISA MAX™ Deluxe Set firmy BioLegend. Patogeny chorobotwórcze zidentyfikowano standardowymi metodami diagnostycznymi. Zbadano wskaźniki reakcji zapalnej: całkowitą liczbę leukocytów, białko C-reaktywne, prokalcytoninę. **Wyniki:** Stwierdzono istotnie wyższe stężenia: wszystkich cytokin prozapalnych u pacjentów z drgawkami gorączkowymi prostymi i prostymi plus; interleukiny 6, chemokiny CXCL-8 u pacjentów z drgawkami gorączkowymi złożonymi; interleukiny 6, chemokiny CXCL-8, czynnika martwicy nowotworu  $\alpha$  u pacjentów po napadzie padaczkowym. Intensywność reakcji zapalnej u pacjentów z drgawkami gorączkowymi prostymi odpowiadała istotnie wyższym stężeniom wszystkich badanych cytokin prozapalnych i wskaźnikom zapalenia. Profile cytokin prozapalnych różniły się w zależności od etiologii infekcji. U chorych z drgawkami gorączkowymi prostymi i prostymi plus oraz zakażeniem ludzkim wirusem herpes typu 6 odnotowano istotnie wyższe stężenia interleukiny 6, chemokiny CXCL-8 i czynnika martwicy nowotworu  $\alpha$  w porównaniu z grupą kontrolną. **Wnioski:** W procesie zapalnym u pacjentów z drgawkami gorączkowymi i napadami padaczkowymi potwierdzono udział badanych cytokin prozapalnych o różnym profilu, zależnym od etiologii infekcji.

**Słowa kluczowe:** cytokiny prozapalne, drgawki gorączkowe, padaczka uogólniona, reakcja zapalna, ludzki wirus herpes typu 6

## INTRODUCTION

**P**ro-inflammatory cytokines (PICs), which are mediators of inflammation, play an important role in the pathogenesis of febrile seizures (FS), epilepsy and epileptic seizures (ES). Imbalances between PICs and anti-inflammatory cytokines (AICs) cause abnormalities in the inflammatory response and contribute to an adverse course of seizures. By measuring cytokine levels, it is possible to investigate the network of cytokines involved in the pathogenesis of seizures and the relationship between cytokines and the occurrence of FS or febrile status epilepticus (FSE), as well as to assess the activity of the inflammatory process.

Inflammation affects the process of epileptogenesis. The risk of developing epilepsy in children with FS is 2–7% (Mahyar et al., 2014; Pavlidou and Panteliadis, 2013). Prolonged FS or FSE have been associated with mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) due to acute hippocampal damage (Choy et al., 2014; Gallentine et al., 2017). In acute infection with FS, pyrogenic and seizure-promoting PICs, such as interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6), and tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), are released as a result of immune system excitation. Increased cytokine levels are referred to as the “cytokine storm” (Choy et al., 2014; Kim et al., 2017). Gallentine et al. (2017) found an imbalance between PICs (IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL-8, also known as interleukin 8) and AICs, an interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra), in patients with FSE. IL-1 $\beta$ -mediated IL-1Ra induction is an important component of anti-inflammatory autoregulation (Gallentine et al., 2017). Kim et al. (2017) reported elevated levels of interleukin 10 (IL-10) and IL-1Ra, which reduce the duration of time or prevent FS. Inflammatory mediations involved in epileptogenesis include multiple PICs and factors: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL-8, interleukin 2 (IL-2), transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), vascular endothelial growth

## WPROWADZENIE

**W**patogenezie drgawek gorączkowych (*febrile seizures*, FS), padaczki i napadów padaczkowych (*epileptic seizures*, ES) istotną rolę odgrywiają cytokiny prozapalne (*pro-inflammatory cytokines*, PICs), będące mediatorami stanu zapalnego. Zaburzenia równowagi między PICs a cytokinami przeciwzapalnymi (*anti-inflammatory cytokines*, AICs) są przyczyną nieprawidłowego przebiegu reakcji zapalnej i wpływają na niekorzystny przebieg drgawek. Dzięki pomiarowi stężenia cytokin można zbadać sieć cytokin zaangażowanych w patogenezę stanów napadowych i związek między cytokinami a występowaniem FS czy gorączkowego stanu padaczkowego (*febrile status epilepticus*, FSE), jak również ocenić aktywność procesu zapalnego.

Stan zapalny wpływa na proces epileptogenezy. Ryzyko rozwoju padaczki u dzieci z FS wynosi 2–7% (Mahyar et al., 2014; Pavlidou i Panteliadis, 2013). Przedłużające się FS lub FSE mogą mieć wpływ na wystąpienie padaczki przyśrodkowego płata skroniowego (*mesial temporal lobe epilepsy*, MTLE) wskutek ostrego uszkodzenia hipokampa (Choy et al., 2014; Gallentine et al., 2017). W ostrej infekcji z FS w wyniku wzbudzenia układu odpornościowego uwalniane są PICs o działaniu pirogennym i prodrgawkowym: interleukina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukina 6 (IL-6), czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (*tumour necrosis factor  $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ). Zwiększone stężenie cytokin określa się mianem burzy cytokinowej (Choy et al., 2014; Kim et al., 2017). Gallentine i wsp. (2017) stwierdzili w FSE zaburzoną równowagę między PICs (IL-1 $\beta$ , IL-6 i chemokiną CXCL-8, czyli interleukiną 8) a AICs – antagonistą receptora interleukiny 1 (IL-1Ra). Indukcja IL-1Ra pod wpływem IL-1 $\beta$  jest istotnym elementem autoregulacji przeciwzapalnej (Gallentine et al., 2017). Kim i wsp. (2017) wskazali na podwyższone stężenie interleukiny 10 (IL-10) i IL-1Ra, które skracają

factor (VEGF), high mobility group box protein 1 (HMGB1), prostaglandins, platelet-activating factor (PAF), adhesion molecules (CD44), matrix metalloproteinases 9 (MMP-9), chemokines, and Toll-like receptors (TLR 1, 2, 3).

Inflammatory pathways are interconnected, and multiple reactions result in functional changes in neurons, glial cells and astrocytes, increasing susceptibility to seizures. The pro-epileptogenic effects of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  include increased excitatory neurotransmission of glutamic acid, increased expression of *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDA-R) (IL-1 $\beta$ ) and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA-R) (TNF- $\alpha$ ), as well as decreased inhibitory neurotransmission of  $\gamma$ -aminobutyric acid. IL-6 and CXCL-8 contribute to an environment that promotes epileptogenesis (Choy et al., 2014; Korff and Dale, 2017; Rana and Musto, 2018).

In the present study, we measured selected PICs (IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, TNF- $\alpha$ ) in children with FS and after an ES in generalised epilepsy (GE) in the course of acute infection. The levels of PICs were also assessed by the type of infection (viral, bacterial, undetermined aetiology). We analysed PIC levels in patients infected with human herpesvirus 6 (HHV-6), the most common aetiological agent of paediatric infections presenting with FS and ES.

## MATERIALS AND METHODS

The study was conducted from January 19, 2017 to December 5, 2020, at the Department of Infectious Diseases and Child Neurology in Poznań, Poland. The study included 121 patients aged 5–188 months. A total of 64 and 11 patients were hospitalised after FS and ES, respectively. The control group (CG) consisted of 46 children with developmental disorders admitted for diagnosis. FS and a history of epilepsy and signs of infection were CG exclusion criteria. The presence of infection in controls was assessed based on follow-up examinations with measurement of inflammatory markers. Additionally, the clinical condition of patients was checked daily for 3 days of hospital stay. Exclusion criteria for the FS group included central nervous system (CNS) infection, acute metabolic or electrolyte disturbances accompanied by seizures, and a history of non-febrile seizures. Known immunodeficiency was the exclusion criterion for the total study group. Seizures occurring in the setting of body temperature  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  and age 6–60 months were inclusion criteria for the FS group.

For FS, a cutoff point of 10 minutes was used to distinguish between simple and complex seizures (Millichap, 2022). Seizure semiology and frequency within 24 hours, as well as simple febrile seizures plus (SFS+), a new type proposed by Grill and Ng in 2013, were included (Grill and Ng, 2013; Millichap, 2022). Complex febrile seizures (CFS) were defined as focal seizures lasting  $\geq 10$  minutes, with more than 1 seizure during a febrile episode within 24 hours (Grill and Ng, 2013). The following groups were distinguished: patients with simple febrile seizures (SFS), patients with SFS+, and patients

czas trwania FS lub im zapobiegają. Do mediatorów stanu zapalnego uczestniczącego w epileptogenezie należy wiele PICs i czynników: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL-8, interleukina 2 (IL-2), transformujący czynnik wzrostu (*transforming growth factor- $\beta$ 1*, TGF- $\beta$ 1), czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej (*high mobility group protein 1*, HMGB1), prostaglandyny, czynnik aktywujący płytki (*platelet-activating factor*, PAF), cząsteczki adhezyjne (*adhesion molecules*, CD44), metaloproteinaza macierzy 9 (*matrix metalloproteinases 9*, MMP-9), chemokiny, receptory Toll-podobne (*Toll-like receptors*, TLR 1, 2, 3). Szlaki zapalne są ze sobą powiązane, a wskutek licznych reakcji dochodzi do zmian funkcjonalnych neuronów, komórek glejowych i astrocytów, co wzmacnia podatność na występowanie drgawek. Proepileptogenne działanie IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  polega na nasileniu neurotransmisji pobudzającej kwasu glutaminowego, zwiększeniu ekspresji receptora *N*-metylo-D-asparaginowego (NMDA-R) (IL-1 $\beta$ ) i kwasu  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego (AMPA-R) (TNF- $\alpha$ ) oraz zmniejszeniu neurotransmisji hamującej kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego. IL-6 i CXCL-8 przyczyniają się do powstania środowiska sprzyjającego epileptogenezie (Choy et al., 2014; Korff i Dale, 2017; Rana i Musto, 2018).

W niniejszej pracy uwzględniono wybrane PICs – IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, TNF- $\alpha$  u dzieci z FS i po ES w padaczkę uogólnioną (*generalised epilepsy*, GE) w przebiegu ostrej infekcji. Zbadano stężenie PICs w zależności od rodzaju infekcji (wirusowa, bakteryjna, o nieustalonej etiologii). Przeanalizowano stężenie PICs u pacjentów zakażonych ludzkim wirusem herpes typu 6 (*human herpesvirus 6*, HHV-6), najczęstszym czynnikiem etiologicznym infekcji związanej z występowaniem FS i ES u badanych dzieci.

## MATERIAŁ I METODY

Badanie przeprowadzono w Klinice Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej w Poznaniu w okresie od 19 stycznia 2017 do 5 grudnia 2020 roku. Badaniem objęto 121 pacjentów w wieku 5–188 miesięcy. Po napadzie FS hospitalizowano 64 chorych, po ES – 11. Grupę kontrolną (GK) tworzyło 46 dzieci z zaburzeniami rozwoju przyjętych w celu diagnostyki. Kryteriami wykluczającymi z GK były FS i padaczka w wywiadzie oraz objawy infekcji. Obecność infekcji w GK oceniano na podstawie kontrolnych badań z pomiarem wskaźników zapalenia. Ponadto stan kliniczny pacjentów sprawdzano codziennie przez 3 doby hospitalizacji. Kryteria wykluczające z grupy FS to zakażenie ośrodkowego układu nerwowego (*central nervous system*, CNS), ostre zaburzenia metaboliczne lub elektrolitowe przebiegające z drgawkami, drgawki bezgorączkowe w wywiadzie. Kryterium wykluczające z badania dla wszystkich grup stanowił zdiagnozowany niedobór odporności. Kryteriami włączającymi do grupy FS były drgawki związane z temperaturą  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  i wiek 6–60 miesięcy.

Parameter Parametr	Number Liczba	Mean $\pm$ SD Średnia $\pm$ SD	M (median) M (mediana)	IQR
Age [months] Wiek [miesiące]		41.41 $\pm$ 37.47	29	17–48
Sex – F/M Płeć – K/M	55/66			
BT [°C] TC [°C]		37.80 $\pm$ 1.20	38.00	36.60–38.90
WBC [G/L] WBC [G/l]		10.39 $\pm$ 5.61	8.65	6.48–12.98
CRP [mg/dL] CRP [mg/dl]		1.43 $\pm$ 2.58	0.24	0.2–1.3
PCT [ng/mL] PCT [ng/ml]		0.63 $\pm$ 1.94	0.09	0.03–0.36
IL-1 $\beta$ [pg/mL] IL-1 $\beta$ [pg/ml]		4.11 $\pm$ 0.79	4.12	3.72–4.74
IL-6 [pg/mL] IL-6 [pg/ml]		41.59 $\pm$ 24.68	40.00	17.42–65.35
CXCL-8 [pg/mL] CXCL-8 [pg/ml]		46.94 $\pm$ 24.45	45.58	27.97–62.84
TNF- $\alpha$ [pg/mL] TNF- $\alpha$ [pg/ml]		27.87 $\pm$ 15.57	31.25	12.33–41.88
<p><b>F</b> – female; <b>M</b> – male; <b>BT</b> – body temperature; <b>WBC</b> – white blood cells; <b>CRP</b> – C-reactive protein; <b>PCT</b> – procalcitonin; <b>IL-1<math>\beta</math></b> – interleukin 1<math>\beta</math>; <b>IL-6</b> – interleukin 6; <b>CXCL-8</b> – chemokine (interleukin 8); <b>TNF-<math>\alpha</math></b> – tumour necrosis factor <math>\alpha</math>; <b>SD</b> – standard deviation; <b>IQR</b> – interquartile range.  <b>K</b> – kobiety; <b>M</b> – mężczyźni; <b>TC</b> – temperatura ciała; <b>WBC</b> – white blood cells, całkowita liczba leukocytów; <b>CRP</b> – C-reaktywne, białko C-reaktywne; <b>PCT</b> – procalcitonin, prokalcitonina; <b>IL-1<math>\beta</math></b> – interleukina 1<math>\beta</math>; <b>IL-6</b> – interleukina 6; <b>CXCL-8</b> – chemokina (interleukina 8); <b>TNF-<math>\alpha</math></b> – tumour necrosis factor <math>\alpha</math>, czynnik martwicy nowotworu <math>\alpha</math>; <b>SD</b> – standard deviation, odchylenie standardowe; <b>IQR</b> – interquartile range, zakres międzykwartylowy.</p>				

Tab. 1. Characteristics of the study group, n = 121

Tab. 1. Charakterystyka badanej grupy, n = 121

with CFS. The GE group included patients diagnosed with epilepsy (genetic or unknown aetiology) after an ES in the course of acute infection. Body temperature (BT) was measured by caregivers during FS and ES episodes. In the absence of data, BT on hospital admission (°C) was considered. Total white blood cells (WBC) count (G/L), C-reactive protein (CRP – mg/dL), procalcitonin (PCT – ng/mL), PICs (IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, TNF- $\alpha$  – pg/mL) and the aetiology of infection were investigated. Blood samples for PICs measurement were collected on the first day after hospital admission; the serum was frozen and stored at –70°C until assays.

The characteristics of the study group are shown in Tab. 1. Serum PICs (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL-8) were measured using ELISA MAX™ Deluxe Set (BioLegend), according to the manufacturer's instructions. The sensitivity of the tests was: >0.5 pg/mL for IL-1 $\beta$ , >2 pg/mL for TNF- $\alpha$ , >4 pg/mL for IL-6, >8 pg/mL for CXCL-8. Absorbance values were read at 450 nm using a Multiskan Bichromatic ELISA reader (Labsystems).

WBC, CRP and PCT were assessed by standard laboratory diagnostic methods. Infections with HHV-6, influenza virus, respiratory syncytial virus (RSV) and human coronavirus HKU1 (HCoV-HKU1) were confirmed by qualitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) performed on blood, nasopharyngeal swab or respiratory tract secretions. Rotavirus/adenovirus infections were diagnosed with a rapid qualitative faecal immunochromatography cassette test. Bacterial respiratory and urinary infections were

W przypadku FS przyjęto punkt odcięcia 10 minut odróżniający drgawki proste od złożonych (Millichap, 2022). Uwzględniono semiologię i częstotliwość drgawek w ciągu 24 godzin oraz drgawki gorączkowe proste plus (*simple febrile seizures plus*, SFS+) – nowy typ zaproponowany przez Grill i Nga w 2013 roku (Grill i Ng, 2013; Millichap, 2022). Drgawki gorączkowe złożone (*complex febrile seizures*, CFS) zdefiniowano jako drgawki ogniskowe o czasie trwania  $\geq$ 10 minut, z więcej niż 1 napadem drgawek w trakcie epizodu gorączkowego w ciągu 24 godzin (Grill i Ng, 2013). Wyróżniono następujące grupy: pacjenci z drgawkami gorączkowymi prostymi (*simple febrile seizures*, SFS), pacjenci z SFS+, pacjenci z CFS. W grupie GE znaleźli się chorzy z rozpoznaną padaczką (etiologia genetyczna lub nieznaną) po ES w przebiegu ostrej infekcji.

Temperatura ciała (TC) była mierzona przez opiekunów w trakcie FS i ES, a w przypadku braku danych uwzględniano TC przy przyjęciu do szpitala (°C). Badano całkowitą liczbę leukocytów (*white blood cells*, WBC – G/l), białko C-reaktywne (*C-reactive protein*, CRP – mg/dl), prokalcitoninę (*procalcitonin*, PCT – ng/ml), stężenia PICs (IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, TNF- $\alpha$  – pg/ml) i etiologię infekcji. Próbkę krwi, w których oznaczano stężenia PICs, pobierano w pierwszej dobie po przyjęciu do szpitala; surowicę zamrażano i przechowywano w temperaturze –70°C do czasu badania.

Charakterystykę grupy przedstawiono w tab. 1.

Stężenia PICs (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL-8) oznaczono w surowicy za pomocą zestawów ELISA MAX™ Deluxe

Parameter Parametr	SFS n = 43 M (IQR)	SFS+ n = 10 M (IQR)	CFS n = 11 M (IQR)	GE n = 11 M (IQR)	CG n = 46 M (IQR)	p*	p* (Dunn's test with Benjamini–Hochberg correction) p* (test Dunna z korektą Benjaminiego–Hochberga)
Age [months] Wiek [miesiące]	22 (15–38)	17 (12–32)	22 (13–42)	124 (72–156)	37 (22–68)	<b>0.0001</b>	SFS vs. GE 0.002 SFS+ vs. GE 0.002 CFS vs. GE 0.07
Sex – F/M Płeć – K/M	20/23; 46.5%/53.5% p* = 0.509	2/8; 20%/80% p* = 0.007	9/2; 81.8%/18.2% p* = 0.003	8/3; 72.7%/27.3% p* = 0.035	16/30; 35%/65% p* = 0.004	<b>0.007</b>	
BT [°C] TC [°C]	38.90 (38.00–39.50)	38.90 (38.50–39.00)	38.00 (38.00–38.40)	36.70 (36.60–38.30)	36.60 (36.60–36.60)	<b>0.0006</b>	SFS vs. CG 0.000005 SFS+ vs. CG 0.000005 CFS vs. CG 0.001333 GE vs. CG 0.0525
WBC [G/L] WBC [G/l]	9.38 (16.18–16.48)	7.34 (5.1–12.52)	13.9 (7.09–18.54)	8.68 (6.16–10.97)	8.29 (6.77–11.32)	0.463	-
CRP [mg/dL] CRP [mg/dl]	1.07 (0.37–4.75)	1.01 (0.28–3.52)	0.53 (0.2–2.92)	0.2 (0.2–1.35)	0.2 (0.2–0.2)	<b>0.00001</b>	SFS vs. CG 0.00001 SFS+ vs. CG 0.005 CFS vs. CG 0.123333
PCT [ng/mL] PCT [ng/ml]	0.32 (0.13–0.67)	0.27 (0.09–1.02)	0.17 (0.05–0.22)	0.03 (0.02–0.1)	0.03 (0.02–0.05)	<b>0.00001</b>	SFS vs. CG 0.00001 SFS+ vs. CG 0.001 CFS vs. CG 0.016 SFS vs. GE 0.016
IL-1 $\beta$ [pg/mL] IL-1 $\beta$ [pg/ml]	4.70 (4.12–4.92)	4.78 (4.64–5.00)	3.52 (3.40–4.14)	3.94 (3.60–4.34)	3.93 (3.40–4.08)	<b>0.000001</b>	SFS vs. CG 0.00002 SFS vs. CFS 0.003333 SFS+ vs. CG 0.0025 SFS+ vs. CFS 0.0075
IL-6 [pg/mL] IL-6 [pg/ml]	65.45 (53.44–75.79)	66.29 (65.35–68.80)	42.16 (39.90–48.82)	29.33 (27.00–45.08)	15.16 (12.80–17.91)	<b>0.000001</b>	SFS vs. CG 0.000005 SFS+ vs. CG 0.000005 CFS vs. CG 0.0075 GE vs. CG 0.0075
CXCL-8 [pg/mL] CXCL-8 [pg/ml]	59.74 (46.96–73.53)	73.72 (59.39–88.74)	59.74 (54.21–66.99)	47.65 (33.49–57.67)	25.55 (14.85–29.70)	<b>0.000001</b>	SFS vs. CG 0.000005 SFS+ vs. CG 0.000005 CFS vs. CG 0.000007 GE vs. CG 0.005
TNF- $\alpha$ [pg/mL] TNF- $\alpha$ [pg/ml]	39.12 (34.86–43.47)	41.98 (40.07–43.05)	12.54 (11.80–14.14)	51.87 (48.15–57.40)	11.90 (10.95–13.00)	<b>0.00001</b>	SFS vs. CG 0.000003 SFS+ vs. CG 0.000003 SFS vs. CFS 0.0016 SFS+ vs. CFS 0.003333 CFS vs. GE 0.000003 GE vs. CG 0.000003

\* p < 0.05.  
**SFS** – simple febrile seizures; **SFS+** – simple febrile seizures plus; **CFS** – complex febrile seizures; **GE** – generalised epilepsy; **CG** – control group; **M (IQR)** – median (interquartile range); **F** – female; **M** – male; **BT** – body temperature; **WBC** – white blood cells; **CRP** – C-reactive protein; **PCT** – procalcitonin; **IL-1 $\beta$**  – interleukin 1 $\beta$ ; **IL-6** – interleukin 6; **CXCL-8** – chemokine (interleukin 8); **TNF- $\alpha$**  – tumour necrosis factor  $\alpha$ .  
**SFS** – simple febrile seizures, **drgawki gorączkowe proste**; **SFS+** – simple febrile seizures plus, **drgawki gorączkowe proste plus**; **CFS** – complex febrile seizures, **drgawki gorączkowe złożone**; **GE** – generalised epilepsy, **padaczka uogólniona**; **GK** – grupa kontrolna; **M (IQR)** – mediana (interkwartylowy zakres międzykwartylowy); **K** – kobiety; **M** – mężczyźni; **TC** – temperatura ciała; **WBC** – white blood cells, **całkowita liczba leukocytów**; **CRP** – C-reactive protein, **białko C-reaktywne**; **PCT** – procalcitonin, **prokalcytonina**; **IL-1 $\beta$**  – interleukina 1 $\beta$ ; **IL-6** – interleukina 6; **CXCL-8** – chemokina (interleukina 8); **TNF- $\alpha$**  – tumour necrosis factor  $\alpha$ , **czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$** .

Tab. 2. Comparison of inflammatory markers and pro-inflammatory cytokines across the study groups

Tab. 2. Porównanie wskaźników stanu zapalnego i cytokin prozapalnych w analizowanych grupach

confirmed by microbiological testing of throat swab, tracheal aspirate, and urine culture. Stool culture or culture and latex agglutination were used to confirm bacterial gastrointestinal infections. Cytomegalovirus (CMV) and Epstein–Barr virus (EBV) infections were diagnosed by blood immunochemical test.

### Statistical analysis

Statistical calculations were performed using Statistica version 13 software (Dell Inc., 2016, Tulsa, USA). The level of

Set (BioLegend), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta.

Czułość testów wynosiła: >0,5 pg/ml dla IL-1 $\beta$ , >2 pg/ml dla TNF- $\alpha$ , >4 pg/ml dla IL-6, >8 pg/ml dla CXCL-8. Wartości absorbancji odczytano przy długości fali 450 nm z użyciem czytnika płytek ELISA Multiskan Bichromatic (Labsystems).

WBC, CRP i PCT zbadano standardowymi metodami diagnostyki laboratoryjnej. Zakażenia HHV-6, wirusem grypy, wirusem syncytium nabłonka oddechowego (*respiratory syncytial virus*, RSV) i ludzkim koronawirusem HKU1

statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Quantitative variables were expressed as median (lower quartile and upper quartile), mean values and standard deviations. For quantitative variables, the compliance of the distribution with the Gauss curve was checked. A non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA test was performed for multiple groups due to the lack of compliance with normal distribution. When differences were detected, the Dunn test with Benjamini–Hochberg correction was used. The chi-square test and the test between two structure coefficients were used to compare the percentage of sexes. The age of patients in the GE group was compared using the non-parametric Mann–Whitney  $U$  test.

The study was approved by the Bioethics Committee at the Poznan University of Medical Sciences (No. 1281/18). The patients' parents/legal guardians gave written informed consent to participate in the study.

## RESULTS

### Study groups

The SFS, SFS+, CFS and GE groups included 43, 10, 11, and 11 patients, respectively. The gender of patients differed significantly in each group, except for the SFS group. Significant male predominance was observed in the SFS+ group and controls, while females predominated in CFS and GE groups. SFS and SFS+ patients were significantly younger than those after ES, with SFS+ patients being the youngest group (median: 17 months). The GE group included 2 patients aged <24 months (7 months and 22 months). Nine patients aged >60 months were hospitalised. GE patients were significantly older compared to controls (124 vs. 37 months;  $p = 0.002$ ). FS patients were found to have a significantly higher BT than controls. The highest BT was observed in the SFS and SFS+ groups. CRP levels significantly differed in SFS and SFS+ patients, while PCT levels were significantly different across all patients with FS compared to controls. The highest CRP and PCT levels were found in the SFS and SFS+ groups. CRP and PCT levels in GE patients were not significantly different from those in controls (Tab. 2).

Seizures were convulsive across all groups. Seizure duration was as follows: in SFS – ≤5 min – 31 patients, 6–9 min – 12; in SFS+ (total seizure time) – 2–15 min; in CFS – ≥10 min – 7 patients (10–20 min – 4, =10 min – 3), <10 min – 4; in GE – 1–22 min.

### Serum pro-inflammatory cytokines

SFS and SFS+ patients had higher levels of all PICs than controls. IL-6 and CXCL-8 were higher in CFS patients than in controls. IL-6, CXCL-8 and TNF- $\alpha$  were higher in ES patients. The highest levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL-8 were observed in SFS+ patients, while the highest levels of TNF- $\alpha$  were found in GE patients (Tab. 2).

(*human coronavirus HKU1*, HCoV-HKU1) potwierdzono jakościowym testem reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (*real-time polymerase chain reaction*, RT-PCR) we krwi albo wymazie z nosogardła lub wydzielinie z dróg oddechowych. Zakażenia rotawirusami/adenowirusami zdiagnozowano szybkim jakościowym testem kasetowym metodą immunochromatografii w kale. Zakażenia bakteryjne dróg oddechowych i układu moczowego potwierdzono w badaniach mikrobiologicznych metodą posiewu wymazu z gardła, aspiratu tchawiczego, moczu. Posiew kału lub posiew i test lateksowy posłużyły do potwierdzenia zakażeń bakteryjnych przewodu pokarmowego. Zakażenia wirusami cytomegalii (*cytomegalovirus*, CMV) i Epsteina–Barr (*Epstein–Barr virus*, EBV) rozpoznano za pomocą testu immunochemicznego w próbkach krwi.

## Analiza statystyczna

Obliczenia statystyczne wykonano w programie Statistica ver. 13 (Dell Inc., 2016, Tulsa, USA). Jako poziom istotności statystycznej wyników przyjęto  $p < 0,05$ . Wyniki analiz zmiennych wyrażonych w skali ilościowej przedstawiono za pomocą mediany (kwartyła dolnego i kwartyła górnego) oraz wartości średnich i odchyłeń standardowych. Dla zmiennych ilościowych sprawdzono zgodność rozkładu z krzywą Gaussa. Z powodu braku zgodności z rozkładem normalnym przeprowadzono nieparametryczny test ANOVA Kruskala–Wallisa dla wielu grup. W przypadku wykrycia różnic stosowano test Dunna z korektą Benjaminiego–Hochberga. Do porównania odsetka płci posłużyły test chi-kwadrat i test między dwoma wskaźnikami struktury. Wiek pacjentów w grupie GE porównano nieparametrycznym testem  $U$  Manna–Whitneya. Badanie przeprowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu – nr 1281/18. Opiekunowie pacjentów wyrazili pisemnie świadomą zgodę na badanie.

## WYNIKI

### Badane grupy

Grupa SFS obejmowała 43 osoby, SFS+ – 10, CFS – 11, GE – 11. Płeć pacjentów w poszczególnych grupach, oprócz grupy SFS, różniła się istotnie. Istotną przewagę płci męskiej zaobserwowano w SFS+ i GK, a żeńskiej – w CFS i GE. Chorzy z SFS i SFS+ byli istotnie młodsi niż ci po ES, najmłodsi okazali się pacjenci z SFS+ (mediana: 17 miesięcy). W grupie GE znalazło się 2 chorych w wieku <24 miesięcy (7 miesięcy i 22 miesiące). Hospitalizowano 9 osób w wieku >60 miesięcy. Pacjenci z GE byli istotnie starsi w porównaniu z GK (124 vs 37 miesięcy;  $p = 0,002$ ). TC u osób z FS okazała się istotnie wyższa niż w GK. Najwyższą TC zaobserwowano w grupach SFS i SFS+. Stężenia CRP różniły się istotnie w SFS i SFS+, a PCT – u wszystkich pacjentów z FS w porównaniu z GK. Najwyższe CRP i PCT stwierdzono w grupach SFS i SFS+. Stężenia CRP i PCT u badanych

PICs	SFS VI n = 24 M (IQR)	SFS+ VI n = 6 M (IQR)	CFS VI n = 4 M (IQR)	GE VI n = 4 M (IQR)	CG n = 46 M (IQR)	p*	p* (Dunn's test with Benjamini-Hochberg correction) p* (test Dunna z korektą Benjaminiego-Hochberga)
IL-1 $\beta$ [pg/mL] IL-1 $\beta$ [pg/ml]	4.71 (4.14-4.91)	4.90 (4.70-5.12)	3.49 (3.43-3.55)	3.89 (3.61-4.27)	3.93 (3.40-4.08)	0.00001	SFS vs. CFS 0.049 SFS+ vs. CFS 0.016667 SFS vs. CG 0.003 SFS+ vs. CG 0.015
IL-6 [pg/mL] IL-6 [pg/ml]	65.75 (51.53-77.71)	66.29 (65.35-68.80)	42.69 (41.08-53.11)	28.40 (24.76-35.04)	15.16 (12.80-17.91)	0.004	SFS vs. CG 0.00001 SFS+ vs. CG 0.0005
CXCL-8 [pg/mL] CXCL-8 [pg/ml]	52.66 (43.85-71.48)	83.57 (65.61-88.74)	63.71 (60.78-67.68)	42.30 (35.22-52.14)	25.55 (14.85-29.70)	0.02	SFS vs. CG 0.00001 SFS+ vs. CG 0.0005 CFS vs. CG 0.006667
TNF- $\alpha$ [pg/mL] TNF- $\alpha$ [pg/ml]	36.25 (33.59-42.73)	42.20 (41.88-48.26)	12.12 (11.70-14.57)	50.12 (46.45-55.75)	11.90 (10.95-13.00)	0.0002	CFS vs. GE 0.1 SFS vs. CG 0.00001 SFS+ vs. CG 0.0003 GE vs. CG 0.000333

\* p < 0.05.  
**PICs** – pro-inflammatory cytokines; **SFS** – simple febrile seizures; **SFS+** – simple febrile seizures plus; **CFS** – complex febrile seizures; **GE** – generalised epilepsy; **CG** – control group; **VI** – viral infection; **M (IQR)** – median (interquartile range); **IL-1 $\beta$**  – interleukin 1 $\beta$ ; **IL-6** – interleukin 6; **CXCL-8** – chemokine (interleukin 8); **TNF- $\alpha$**  – tumour necrosis factor  $\alpha$ .  
**PICs** – pro-inflammatory cytokines, *cytokiny prozapalne*; **SFS** – simple febrile seizures, *drgawki gorączkowe proste*; **SFS+** – simple febrile seizures plus, *drgawki gorączkowe proste plus*; **CFS** – complex febrile seizures, *drgawki gorączkowe złożone*; **GE** – generalised epilepsy, *padaczka uogólniona*; **GK** – grupa kontrolna; **IB** – infekcja wirusowa; **M (IQR)** – mediana (interquartile range, zakres międzykwartylowy); **IL-1 $\beta$**  – interleukina 1 $\beta$ ; **IL-6** – interleukina 6; **CXCL-8** – chemokina (interleukina 8); **TNF- $\alpha$**  – tumour necrosis factor  $\alpha$ , *czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$* .

Tab. 3. Comparison of pro-inflammatory cytokine levels in the analysed groups with viral infection

Tab. 3. Porównanie stężenia cytokin prozapalnych w analizowanych grupach z infekcją wirusową

### Levels of pro-inflammatory cytokines depending on the type of infection

The type of infection was determined based on clinical symptoms and additional tests. Patients with viral (VI) and bacterial infections (BI) were distinguished. If no aetiological agent was detected, patients were classified into the group with infection of unknown aetiology (UAI). The patients were classified as follows: SFS – VI = 24, BI = 4, UAI = 16; SFS+ – VI = 6, BI = 0, UAI = 4; CFS – VI = 4, BI = 0, UAI = 7; GE – VI = 4, BI = 2, UAI = 5.

z GE nie różniły się istotnie od stężeń odnotowanych w GK (tab. 2).

We wszystkich grupach napady miały charakter drgawkowy. Czas trwania drgawek wynosił: SFS –  $\leq 5$  min – 31 pacjentów, 6–9 min – 12; SFS+ (łączny czas napadów) – 2–15 min; CFS –  $\geq 10$  min – 7 pacjentów (10–20 min – 4, =10 min – 3), <10 min – 4; GE – 1–22 min.

### Stężenia cytokin prozapalnych w surowicy

U badanych z SFS i SFS+ stężenia wszystkich PICs były wyższe niż w GK. U pacjentów z CFS wyższe niż w GK okazały się

PICs	SFS BI n = 4 M (IQR)	SFS+ BI n = 0 M (IQR)	CFS BI n = 0 M (IQR)	GE BI n = 2 M (IQR)	CG n = 46 M (IQR)	p*	p* (Dunn's test with Benjamini-Hochberg correction) p* (test Dunna z korektą Benjaminiego-Hochberga)
IL-1 $\beta$ [pg/mL] IL-1 $\beta$ [pg/ml]	4.54 (4.23-4.84)	-	-	4.68 (4.34-5.02)	3.93 (3.40-4.08)	0.06	-
IL-6 [pg/mL] IL-6 [pg/ml]	59.45 (50.05-70.62)	-	-	58.76 (45.08-72.44)	15.16 (12.80-17.91)	0.0004	SFS vs. CG 0.009
CXCL-8 [pg/mL] CXCL-8 [pg/ml]	63.36 (58.53-73.38)	-	-	75.11 (57.67-92.54)	25.55 (14.85-29.70)	0.0004	SFS vs. CG 0.009 GE vs. CG 0.06
TNF- $\alpha$ [pg/mL] TNF- $\alpha$ [pg/ml]	41.67 (37.63-43.69)	-	-	55.28 (51.55-59.00)	11.90 (10.95-13.00)	0.0004	SFS vs. CG 0.012 GE vs. CG 0.045

\* p < 0.05.  
**PICs** – pro-inflammatory cytokines; **SFS** – simple febrile seizures; **SFS+** – simple febrile seizures plus; **CFS** – complex febrile seizures; **GE** – generalised epilepsy; **CG** – control group; **BI** – bacterial infection; **M (IQR)** – median (interquartile range); **IL-1 $\beta$**  – interleukin 1 $\beta$ ; **IL-6** – interleukin 6; **CXCL-8** – chemokine (interleukin 8); **TNF- $\alpha$**  – tumour necrosis factor  $\alpha$ .  
**PICs** – pro-inflammatory cytokines, *cytokiny prozapalne*; **SFS** – simple febrile seizures, *drgawki gorączkowe proste*; **SFS+** – simple febrile seizures plus, *drgawki gorączkowe proste plus*; **CFS** – complex febrile seizures, *drgawki gorączkowe złożone*; **GE** – generalised epilepsy, *padaczka uogólniona*; **GK** – grupa kontrolna; **IB** – infekcja bakteryjna; **M (IQR)** – mediana (interquartile range, zakres międzykwartylowy); **IL-1 $\beta$**  – interleukina 1 $\beta$ ; **IL-6** – interleukina 6; **CXCL-8** – chemokina (interleukina 8); **TNF- $\alpha$**  – tumour necrosis factor  $\alpha$ , *czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$* .

Tab. 3a. Comparison of pro-inflammatory cytokine levels in the analysed groups with bacterial infection

Tab. 3a. Porównanie stężenia cytokin prozapalnych w analizowanych grupach z infekcją bakteryjną

PICs	SFS UAI n = 16 M (IQR)	SFS+ UAI n = 4 M (IQR)	CFS UAI n = 7 M (IQR)	GE UAI n = 5 M (IQR)	CG n = 46 M (IQR)	p*	p* (Dunn's test with Benjamini-Hochberg correction) p* (test Dunna z korektą Benjaminiego-Hochberga)
IL-1β [pg/mL] IL-1β [pg/ml]	4.67 (4.05–4.94)	4.52 (4.18–4.79)	3.72 (3.30–4.52)	3.86 (3.60–3.94)	3.93 (3.40–4.08)	0.000001	SFS vs. CG 0.008
IL-6 [pg/mL] IL-6 [pg/ml]	66.24 (61.52–71.26)	66.39 (62.75–69.00)	40.45 (39.00–48.82)	29.04 (27.00–35.53)	15.16 (12.80–17.91)	0.0005	SFS vs. CG 0.00001 SFS+ vs. CG 0.01 CFS vs. CG 0.01
CXCL-8 [pg/mL] CXCL-8 [pg/ml]	62.16 (50.94–73.20)	60.25 (58.01–77.52)	55.94 (52.14–66.99)	36.60 (33.49–52.14)	25.55 (14.85–29.70)	0.000001	SFS vs. CG 0.00001 SFS+ vs. CG 0.01 CFS vs. CG 0.0025
TNF-α [pg/mL] TNF-α [pg/ml]	39.44 (37.41–45.17)	40.18 (38.90–41.67)	12.54 (11.80–14.14)	51.87 (50.06–53.78)	11.90 (10.95–13.00)	0.000001	SFS vs. CG 0.00001 SFS+ vs. CG 0.03 GE vs. CG 0.00025 CFS vs. GE 0.075

\* p < 0.05.

**PICs** – pro-inflammatory cytokines; **SFS** – simple febrile seizures; **SFS+** – simple febrile seizures plus; **CFS** – complex febrile seizures; **GE** – generalised epilepsy; **CG** – control group; **UAI** – infection of unknown aetiology; **M (IQR)** – median (interquartile range); **IL-1β** – interleukin 1β; **IL-6** – interleukin 6; **CXCL-8** – chemokine (interleukin 8); **TNF-α** – tumour necrosis factor α.

**PICs** – pro-inflammatory cytokines, *cytokiny prozapalne*; **SFS** – simple febrile seizures, *drgawki gorączkowe proste*; **SFS+** – simple febrile seizures plus, *drgawki gorączkowe proste plus*; **CFS** – complex febrile seizures, *drgawki gorączkowe złożone*; **GE** – generalised epilepsy, *padaczka uogólniona*; **CG** – grupa kontrolna; **INE** – infekcja o nieustalonej etiologii; **M (IQR)** – mediana (interkwartylowy zakres); **IL-1β** – interleukina 1β; **IL-6** – interleukina 6; **CXCL-8** – chemokina (interleukina 8); **TNF-α** – tumour necrosis factor α, *czynnik martwicy nowotworu*.

Tab. 3b. Comparison of pro-inflammatory cytokine levels in the analysed groups with infections of unknown aetiology  
Tab. 3b. Porównanie stężenia cytokin prozapalnych w analizowanych grupach z infekcją o nieustalonej etiologii

In the case of **viral infections**, the levels of all PICs were significantly higher in SFS and SFS+ patients compared to controls, while the levels of CXCL-8 and TNF-α were significantly higher in the CFS and GE groups, respectively. IL-1β, IL-6 and CXCL-8 were highest in SFS+ patients, while TNF-α levels were highest in GE patients (Tab. 3). In the case of **bacterial infections**, significantly higher levels of IL-6, CXCL-8 and TNF-α were observed in SFS vs. controls. TNF-α levels were higher in the GE group than in controls, and also the highest among all groups (Tab. 3a). For **infections of unknown aetiology**, SFS patients had

stężenia IL-6 i CXCL-8, a u chorych po ES – IL-6, CXCL-8 i TNF-α. Najwyższe stężenia IL-1β, IL-6 i CXCL-8 zaobserwowano u osób z SFS+, a najwyższe stężenia TNF-α – u pacjentów z GE (tab. 2).

### Stężenia cytokin prozapalnych w zależności od rodzaju infekcji

Rodzaj infekcji określono na podstawie objawów klinicznych i wyników badań dodatkowych. Wyróżniono pacjentów z infekcją wirusową (IW) i z infekcją bakteryjną (IB).

PICs	SFS n = 43 (+) n = 15	SFS+ n = 10 (+) n = 5	CFS n = 11 (+) n = 3	GE n = 11 (+) n = 2	CG n = 44 (-) n = 38	p*	p* (Dunn's test with Benjamini-Hochberg correction) p* (test Dunna z korektą Benjaminiego-Hochberga)
IL-1β [pg/mL] IL-1β [pg/ml]	4.70 (4.12–5.16)	4.80 (4.70–5.00)	3.52 (3.46–3.58)	4.02 (3.64–4.40)	3.95 (3.50–4.26)	0.0004	SFS vs. CG 0.1 SFS+ vs. CG 0.1
IL-6 [pg/mL] IL-6 [pg/ml]	69.19 (55.61–78.64)	66.14 (65.35–66.44)	43.21 (42.16–63.00)	34.11 (27.46–40.75)	15.16 (12.40–18.21)	0.000001	SFS vs. CG 0.00001 SFS+ vs. CG 0.001
CXCL-8 [pg/mL] CXCL-8 [pg/ml]	51.45 (44.54–74.59)	81.84 (65.61–88.74)	61.81 (59.74–69.75)	45.06 (33.49–56.63)	26.59 (18.65–29.70)	0.000001	SFS vs. CG 0.00001 SFS+ vs. CG 0.001 CFS vs. CG 0.066667
TNF-α [pg/mL] TNF-α [pg/ml]	36.56 (31.25–43.47)	42.09 (41.88–42.30)	11.80 (11.59–12.44)	52.08 (44.75–59.41)	11.90 (10.74–13.00)	0.000001	SFS vs. CG 0.0001 SFS+ vs. CG 0.0045 GE vs. CG 0.1

\* p < 0.05.

**PICs** – pro-inflammatory cytokines; **SFS** – simple febrile seizures; **SFS+** – simple febrile seizures plus; **CFS** – complex febrile seizures; **GE** – generalised epilepsy; **CG** – control group; **(+)** – HHV-6-positive; **(-)** – HHV-6-negative; **IL-1β** – interleukin 1β; **IL-6** – interleukin 6; **CXCL-8** – chemokine (interleukin 8); **TNF-α** – tumour necrosis factor α.

**PICs** – pro-inflammatory cytokines, *cytokiny prozapalne*; **SFS** – simple febrile seizures, *drgawki gorączkowe proste*; **SFS+** – simple febrile seizures plus, *drgawki gorączkowe proste plus*; **CFS** – complex febrile seizures, *drgawki gorączkowe złożone*; **GE** – generalised epilepsy, *padaczka uogólniona*; **CG** – grupa kontrolna; **(+)** – HHV-6-dodatni; **(-)** – HHV-6-ujemny; **IL-1β** – interleukina 1β; **IL-6** – interleukina 6; **CXCL-8** – chemokina (interleukina 8); **TNF-α** – tumour necrosis factor α, *czynnik martwicy nowotworu*.

Tab. 4. Comparison of pro-inflammatory cytokines in the analysed groups with HHV-6 infection

Tab. 4. Porównanie stężenia cytokin prozapalnych w analizowanych grupach z zakażeniem HHV-6



significantly higher levels of all PICs than CG patients. IL-6, CXCL-8 and TNF- $\alpha$  were significantly higher in the SFS+ group, IL-6 and CXCL-8 in the CFS group, while only TNF- $\alpha$  levels were higher in the GE group. The highest IL-6, CXCL-8, and TNF- $\alpha$  levels were observed in SFS+, SFS, and GE groups, respectively (Tab. 3b).

The PICs profile differed in the FS and GE groups depending on the type of infection. A similar PICs network was found in patients with VI and UAI. Patients with SFS and those after ES had the same PICs profile in VIs and UAIs.

### Levels of pro-inflammatory cytokines in HHV-6-positive patients

The levels of PICs in HHV-6-infected patients in the FS and GE groups did not differ significantly compared to uninfected subjects. Significantly higher levels of IL-6, CXCL-8 and TNF- $\alpha$  were observed in SFS and SFS+ vs. CG (-) patients. The highest IL-6 level was found in SFS patients, whereas the highest CXCL-8 and TNF- $\alpha$  levels were observed in SFS+ patients (Tab. 4).

## DISCUSSION

Available publications indicate the involvement of cytokines in FS, FSE, ES and acute encephalopathy, as well as their role in epileptogenesis (e.g. MTLE after FSE). Many researchers have identified the cytokine network and the association with the development of specific seizure disorders or neurological complications (Andrzejczak, 2011; Asano et al., 2010; Choy et al., 2014; Gallentine et al., 2017; Gao et al., 2017; Haspolat et al., 2002; Ichiyama et al., 2009; Kawabe et al., 2010; Kim et al., 2017; Mahyar et al., 2014; Millichap and Millichap, 2006; Mittal, 2014; Rana and Musto, 2018; Talebian et al., 2020; Virta et al., 2002). Research findings vary, with the involvement of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of FS being most controversial.

In the study presented in this paper, we evaluated the levels of PICs (IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, TNF- $\alpha$ ) in different types of FS and in patients with GE after ES in the course of acute infection. We also assessed the profile and levels of PICs depending on the infectious aetiology.

The GE group included 9 patients aged >60 months and 2 patients aged <24 months. Patients with SFS and SFS+ were significantly younger than those after ES, with SFS+ patients found to be the youngest. There was a significant male predominance in the SFS+ group, and a female predominance in the CFS and GE groups. Mahyar et al. (2014) and Virta et al. (2002) showed that the gender of FS patients did not differ significantly. In contrast to Mahyar et al. (2014), our study found a significant difference in BT between FS and CG patients. The highest BT in SFS and SFS+ patients corresponded with high levels of CRP and PCT.

Significantly higher levels of all PICs (IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8 and TNF- $\alpha$ ) were confirmed in SFS and SFS+ patients

Badani, u których nie wykryto czynnika etiologicznego, zostali zakwalifikowani do grupy z infekcją o niestalonej etiologii (INE). Podział pacjentów wyglądał następująco: SFS – IW = 24, IB = 4, INE = 16; SFS+ – IW = 6, IB = 0, INE = 4; CFS – IW = 4, IB = 0, INE = 7; GE – IW = 4, IB = 2, INE = 5. W przypadku **zakażeń wirusowych** u chorych z SFS i SFS+ stężenia wszystkich PICs były istotnie wyższe w porównaniu z GK, w grupach CFS i GE istotnie wyższe okazały się odpowiednio stężenia CXCL-8 i TNF- $\alpha$ . Stężenia IL-1 $\beta$ , IL-6 i CXCL-8 były najwyższe u pacjentów z SFS+, a stężenia TNF- $\alpha$  – u pacjentów z GE (tab. 3). W przypadku **zakażeń bakteryjnych** u chorych z SFS zaobserwowano istotnie wyższe stężenia IL-6, CXCL-8 i TNF- $\alpha$  w porównaniu z GK. W grupie GE wyższe niż w GK – i zarazem najwyższe spośród wszystkich grup – okazały się stężenia TNF- $\alpha$  (tab. 3a). W przypadku **zakażeń o niestalonej etiologii** u badanych z SFS odnotowano istotnie wyższe stężenia wszystkich PICs niż w GK. W SFS+ istotnie wyższe były stężenia IL-6, CXCL-8 i TNF- $\alpha$ , w CFS – IL-6 i CXCL-8, z kolei w GE – tylko TNF- $\alpha$ . Najwyższe stężenie IL-6 zaobserwowano u pacjentów z SFS+, najwyższe stężenie CXCL-8 – z SFS, a TNF- $\alpha$  – z GE (tab. 3b). Profil PICs różnił się w grupach FS i GE w zależności od rodzaju infekcji. Zbliżoną sieć PICs stwierdzono u pacjentów z IW i INE. U chorych z SFS i po ES profil PICs w IW i INE był taki sam.

### Stężenie cytokin prozapalnych u pacjentów zakażonych HHV-6

Stężenie PICs u osób zakażonych HHV-6 z grup FS i GE nie różniło się istotnie w porównaniu z osobami niezakażonymi. Zaobserwowano istotnie wyższe stężenia IL-6, CXCL-8 i TNF- $\alpha$  u pacjentów z SFS i SFS+ w porównaniu z GK (-). Stężenie IL-6 było najwyższe w SFS, stężenia CXCL-8 i TNF- $\alpha$  – w SFS+ (tab. 4).

## OMÓWIENIE

Dostępne publikacje wskazują na udział cytokin w występowaniu FS, FSE, ES i ostrej encefalopatii oraz rolę w epileptogenezie (przykładowo MTLE po FSE). W licznych badaniach identyfikowano sieć cytokin i związek z rozwojem określonych stanów napadowych czy powikłań neurologicznych (Andrzejczak, 2011; Asano et al., 2010; Choy et al., 2014; Gallentine et al., 2017; Gao et al., 2017; Haspolat et al., 2002; Ichiyama et al., 2009; Kawabe et al., 2010; Kim et al., 2017; Mahyar et al., 2014; Millichap i Millichap, 2006; Mittal, 2014; Rana i Musto, 2018; Talebian et al., 2020; Virta et al., 2002). Wyniki badań są różne, a najwięcej kontrowersji budzi udział IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  w patogenezie FS.

W badaniu prezentowanym w niniejszej pracy oceniono stężenia PICs – IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, TNF- $\alpha$  w poszczególnych typach FS i u pacjentów z GE po ES w przebiegu ostrej infekcji. Zbadano też profil i stężenie PICs w zależności od etiologii infekcji.

compared to controls. The highest levels of PICs were observed in SFS+ patients. IL-6 and CXCL-8 levels were significantly higher in CFS, while BT, CRP and PCT levels were lowest in FS, which may indicate a less intense inflammatory response. The lower cytokine levels in CFS compared with SFS and SFS+ patients (significantly lower for IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) may be related to the degree to which CFS patients met the criterion of seizure duration (<10 min in 4 patients, one criterion present – focal seizures), and the number of seizures during a febrile episode (only 3 patients had more than 1 seizure). It is difficult to clearly interpret the lower level of IL-1 $\beta$  in CFS vs. CG. This may be influenced by both the size of the group and the time of blood sample collection. Although the other groups had similar limitations, the cytokine levels were higher. In our study, CFS accounted for 17.2% of FS, which may be due to the lower incidence of this type of seizures. Patients with ES had significantly higher levels of IL-6, CXCL-8 and TNF- $\alpha$  and normal inflammatory markers. The levels of PICs may have been influenced here by other additional factors, such as seizure activity, chronic disease process or ongoing neurogenic inflammation. Also, antiseizure medications (ASMs) and the duration of seizures affect the levels of cytokines (Andrzejczak, 2011; Gao et al., 2017). Authors of research papers point to the time of blood sampling, the severity and duration of fever and the type of infection (Gallentine et al., 2017; Gao et al., 2017; Mahyar et al., 2014; Virta et al., 2002). According to the researchers, the optimal period from the onset of symptoms to blood sampling is a few hours or so. In our study, blood samples were taken within 24 hours of hospital admission, a time that takes into account the criterion for the diagnosis of SFS+, i.e. >1 generalised seizure/day. Mahyar et al. (2014) did not confirm a relationship between the levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and FS. Virta et al. (2002) assessed serum PICs (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) and AICs (IL-10 and IL-1Ra) in patients with FS (in cerebrospinal fluid – CSF 16 patients) to demonstrate the relationship between cytokines and FS. A high IL-1Ra/IL-1 $\beta$  ratio and high serum IL-6 levels were significantly correlated with FS (Virta et al., 2002). Kim et al. (2017) assessed plasma levels of PICs (IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, INF- $\gamma$ , IL-2) and AICs (IL-1Ra, IL-10) in FS patients and observed them to have elevated levels of IL-6, CXCL-8, INF- $\gamma$ , IL-1Ra and IL-10. However, they did not demonstrate the role of IL-1 $\beta$  in the pathomechanism of FS (Kim et al., 2017). Haspolat et al. (2002) assessed IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and nitrite levels in blood and CSF in FS children. They confirmed the hypothesis that increased IL-1 $\beta$  production in the CNS or diffusion across the blood-brain barrier is involved in the pathogenesis of FS. They did not demonstrate the role for TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of FS (Haspolat et al., 2002). Talebian et al. (2020) investigated the relationship between IL-1 $\beta$  and interleukin 22 (IL-22) and FS. IL-22, unlike IL-1 $\beta$ , had no effect on FS (Talebian et al., 2020). Our study confirmed the different profiles of PICs in FS, with significantly higher levels of all PICs in SFS and SFS+, and significantly higher levels of

W grupie GE znalazło się 9 osób w wieku >60 miesięcy i 2 osoby w wieku <24 miesięcy. Chorzy z SFS i SFS+ byli istotnie młodsi niż ci po ES, najmłodsi okazali się pacjenci z SFS+. W grupie SFS+ zaobserwowano istotną przewagę płci męskiej, a w grupach CFS i GE – żeńskiej. W badaniach Mahyara i wsp. (2014) oraz Virty i wsp. (2002) płeć pacjentów z FS nie różniła się istotnie. W przeciwieństwie do pracy Mahyara i wsp. (2014) nasze badanie wykazało istotną różnicę TC u osób z FS w porównaniu z GK. Najwyższa TC u pacjentów z SFS i SFS+ odpowiadała wysokim stężeniom CRP i PCT.

U chorych z SFS i SFS+ potwierdzono istotnie wyższe stężenia wszystkich PICs – IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8 i TNF- $\alpha$  w porównaniu z GK. Najwyższe stężenia PICs zaobserwowano u pacjentów z SFS+. W CFS odnotowano istotnie wyższe stężenia IL-6 i CXCL-8, natomiast TC, stężenia CRP i PCT były najniższe w FS, co może świadczyć o mniejszym natężeniu reakcji zapalnej. Niższy poziom cytokin w CFS w zestawieniu z SFS i SFS+ (istotnie niższy dla IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ ) może być związany ze stopniem, w jakim pacjenci z CFS spełniali kryterium czasu trwania drgawek (u 4 osób – <10 min, obecne 1 kryterium – drgawki ogniskowe), oraz z liczbą napadów w trakcie epizodu gorączkowego (tylko 3 badanych miało więcej niż 1 napad). Trudno jednoznacznie zinterpretować niższy poziom IL-1 $\beta$  w CFS w porównaniu z GK. Mogą na to wpływać zarówno liczebność grupy, jak i czas pobrania próbek krwi – choć podobne ograniczenia miały pozostałe grupy, a poziomy cytokin były wyższe. W naszym badaniu CFS stanowiły 17,2% FS, co może wynikać z mniejszej częstości występowania drgawek tego typu. U pacjentów po ES zaobserwowano istotnie wyższe stężenia IL-6, CXCL-8 i TNF- $\alpha$  oraz prawidłowe wskaźniki zapalenia. Wpływ na stężenie PICs mogły mieć tu inne, dodatkowe czynniki: aktywność drgawkowa, przewlekły proces chorobowy, toczące się zapalenie na podłożu neurogennym. Także leki przeciwdrgawkowe (*antiseizure medications*, ASMs) i czas trwania napadów wpływają na stężenie cytokin (Andrzejczak, 2011; Gao et al., 2017). Autorzy prac badawczych zwracają uwagę na czas pobrania próbki krwi, nasilenie i czas trwania gorączki oraz rodzaj infekcji (Gallentine et al., 2017; Gao et al., 2017; Mahyar et al., 2014; Virta et al., 2002). Według badaczy optymalny okres od wystąpienia objawów do pobrania krwi to kilka-kilkanaście godzin. W naszym badaniu próbki krwi pobierano w ciągu 24 godzin od przyjęcia do szpitala – w czasie uwzględniającym kryterium rozpoznania SFS+, czyli >1 uogólniony napad/dobę.

Mahyar i wsp. (2014) nie potwierdzili związku między stężeniami IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  a występowaniem FS. Virta i wsp. (2002) zbadali w surowicy pacjentów z FS (u 16 osób – w płynie mózgowo-rdzeniowym, *cerebrospinal fluid*, CSF) stężenie PICs – IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  i dodatkowo AICs – IL-10 i IL-1Ra w celu wykazania związku między cytokinami a FS. Wysoki wskaźnik IL-1Ra/IL-1 $\beta$  i wysokie stężenie IL-6 w surowicy były istotnie związane z obecnością FS (Virta et al., 2002). Kim i wsp. (2017) zbadali w osoczu chorych z FS

IL-6 and CXCL-8 in CFS. We also assessed the levels of PICs in children with GE after ES in the course of acute infection. The involvement of IL-6, CXCL-8, TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of ES was demonstrated. Gao et al. (2017) investigated IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-10, and interleukin 17A (IL-17A) after and between seizures in adult epileptic patients. They noted a significant increase in IL-6, IL-17A, INF- $\gamma$ , and did not confirm significant changes in cytokine levels depending on the type of ES, epilepsy and ASMs (Gao et al., 2017). Asano et al. (2010) investigated CSF and serum levels of 17 cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL-8 and others) in children with acute encephalopathy, FS and fever without seizures. The CSF levels of CXCL-8 were significantly elevated in children with acute encephalopathy. There were no significant differences in CSF levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  between the study groups (Asano et al., 2010). Virta et al. (2002) and Mahyar et al. (2014) divided the infections in FS subjects into viral and bacterial. According to Virta et al., viral infections presented with fever and low CRP and did not require antibiotics. Local bacterial infections and septic conditions were managed with antibiotics. Mahyar et al. diagnosed the aetiology of infection based on clinical findings. They found no significant difference between groups by the type of infection (Mahyar et al., 2014; Virta et al., 2002). In our study, the PICs profiles differed depending on the type of infection. In patients with VI after SFS and SFS+, the levels of all PICs were significantly higher compared to CG, highest in patients with SFS+. CXCL-8 and TNF- $\alpha$  levels were significantly higher after a CFS and ES episodes, respectively. The profile of PICs in UAI appeared similar to that in VI (the same in the SFS and GE groups), which may suggest a viral aetiology of infection in the UAI group. In bacterial infections, the profile of PICs differed from that in VI and UAI, with BI present only in the SFS and GE groups. IL-6, CXCL-8 and TNF- $\alpha$  levels in the SFS group, and TNF- $\alpha$  levels in the GE group were significantly higher than in the CG.

Ichiyama et al. (2009) and Kawabe et al. (2010) investigated CSF and serum cytokine levels in patients with acute encephalopathy associated with HHV-6 infection. The first author suggests that the cytokines IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  mediate the pathogenesis of acute encephalopathy associated with HHV-6 infection, and that elevated levels of IL-6, soluble TNF receptor 1 in serum and IL-6 in CSF are important for predicting neurological complications (Ichiyama et al., 2009). Kawabe et al., on the other hand, investigating the levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, TNF- $\alpha$ , IL-10, interleukin 12p70 and MMP-9, showed that the mean CSF and serum levels of IL-6, CXCL-8, as well as serum levels of IL-10 and MMP-9 were elevated compared to normal levels in healthy subjects. According to researchers, high CSF level of CXCL-8 may be associated with the pathogenesis of encephalopathy (Kawabe et al., 2010). In our study, we evaluated PICs in patients with HHV-6 infection after FS and ES. Similar to Ichiyama et al. (2009), no significant differences were observed in the levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8

stężenia PICs – IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, interferonu  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), IL-2 i AICs – IL-1Ra, IL-10. Zaobserwowali podwyższone stężenia IL-6, CXCL-8, INF- $\gamma$ , IL-1Ra i IL-10 u pacjentów z FS. Nie wykazali natomiast roli IL-1 $\beta$  w patomechanizmie FS (Kim *et al.*, 2017). Haspolat i wsp. (2002) badali stężenia IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i azotynów we krwi i CSF u dzieci z FS. Potwierdzili hipotezę, że w patogenezie FS biorą udział zwiększona produkcja IL-1 $\beta$  w CNS lub dyfuzja przez barierę krew-mózg. Nie wykazali roli TNF- $\alpha$  w patogenezie FS (Haspolat *et al.*, 2002). Talebian i wsp. (2020) zbadali związek między stężeniem IL-1 $\beta$  i interleukiny 22 (IL-22) a występowaniem FS. IL-22, w przeciwieństwie do IL-1 $\beta$ , nie miała wpływu na FS (Talebian *et al.*, 2020). W naszym badaniu potwierdzono różne profile PICs w FS – istotnie wyższe stężenia wszystkich PICs w SFS i SFS+ oraz istotnie wyższe stężenia IL-6 i CXCL-8 w CFS. Analizowano także stężenie PICs u dzieci z GE po ES w przebiegu ostrej infekcji. Wykazano udział IL-6, CXCL-8, TNF- $\alpha$  w patogenezie ES. Gao i wsp. (2017) badali stężenie IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-10, interleukiny 17A (IL-17A) po napadach i między napadami u dorosłych pacjentów z padaczką. Odnotowali istotny wzrost stężenia IL-6, IL-17A, INF- $\gamma$ , nie potwierdzili zaś istotnych zmian w stężeniu cytokin w zależności od typu ES, padaczki i ASMs (Gao *et al.*, 2017). Asano i wsp. (2010) badali stężenie 17 cytokin (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL-8 i innych) w CSF i surowicy u dzieci z ostrą encefalopatią, FS i gorączką bez drgawek. Stężenie CXCL-8 w CSF było istotnie podwyższone u dzieci z ostrą encefalopatią. Nie zaobserwowano istotnych różnic w stężeniach IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  w CSF między badanymi grupami (Asano *et al.*, 2010).

Virta i wsp. (2002) oraz Mahyar i wsp. (2014) podzielili infekcje obecne u badanych z FS na wirusowe i bakteryjne. Według Virty i wsp. infekcje wirusowe przebiegały z gorączką i niskim CRP i nie wymagały stosowania antybiotyków. Infekcje bakteryjne miejscowe i stany septyczne leczono antybiotykami. Mahyar i wsp. rozpoznawali etiologię infekcji na podstawie wyników badań klinicznych. Badacze nie stwierdzili istotnej różnicy między grupami wyodrębnionymi na podstawie rodzaju infekcji (Mahyar *et al.*, 2014; Virta *et al.*, 2002). W naszym badaniu profile PICs różniły się w zależności od rodzaju infekcji. U pacjentów z IW po napadzie SFS i SFS+ stężenia wszystkich PICs były istotnie wyższe w porównaniu z GK, najwyższe u pacjentów z SFS+. Po napadzie CFS istotnie wyższe okazało się stężenie CXCL-8, po ES – TNF- $\alpha$ . Profil PICs w INE okazał się zbliżony do profilu w IW (taki sam w grupach SFS i GE), co może sugerować wirusową etiologię infekcji w grupie INE. W IB profil PICs różnił się od profilu w IW i INE – IB występowały tylko w grupach SFS i GE. W grupie SFS stężenia IL-6, CXCL-8 i TNF- $\alpha$ , a w grupie GE – stężenie TNF- $\alpha$  były istotnie wyższe niż w GK.

Ichiyama i wsp. (2009) oraz Kawabe i wsp. (2010) badali stężenia cytokin w CSF i surowicy u chorych z ostrą encefalopatią związaną z zakażeniem HHV-6. Pierwszy z wymienionych zespołów sugeruje w swojej pracy, że cytokiny IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  pośredniczą w patogenezie ostrej encefalopatii

and TNF- $\alpha$  in FS and GE groups between HHV-6-infected and uninfected patients.

In the present study, the PICs profile of SFS and SFS+ children was characterised by significantly higher levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8 and TNF- $\alpha$ . The results have shown that the PICs were involved to a varying extent in the inflammatory process in patients with seizure disorders. The involvement of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , the most controversial inflammatory mediators, in the pathogenesis of FS with the exception of CFS was confirmed. The involvement of IL-6 and CXCL-8 in seizures has been demonstrated. The literature data cited and our findings indicate that cytokine profiles are not always a constant element of an inflammatory response. The PICs profile in the cytokine storm in our patients was characterised the highest levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL-8 occurred in the SFS+ group, and TNF- $\alpha$  in the GE group. In post-epileptic seizure patients, IL-1 $\beta$  was the only PIC the level of which did not differ significantly. This may have been influenced by the time of blood sampling and the short half-life of the cytokine. As reported by Kawabe et al. (2010), HHV-6 infection has different effects on the inflammatory response and cytokine production, which could also be seen in our patients. In the GE group, fever was not a prerequisite for ES in children with acute infection. In this group, IL-6 and CXCL-8 levels were significantly higher, and TNF- $\alpha$  level was the highest among the study groups. On the other hand, there is an individual seizure threshold for body temperature in FS, depending on the child's age and CNS maturity (Millichap and Millichap, 2006). In addition to the cytokine response, genetic factors play an important role in the pathogenesis of FS (Millichap and Millichap, 2006; Mittal, 2014; Yu et al., 2018).

We realise that the conclusions were formulated based on the results obtained for a small sample. Nevertheless, this pilot study provides opportunities for further investigations.

## CONCLUSIONS

1. We found significantly higher levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8 and TNF- $\alpha$  in the SFS and SFS+ groups; IL-6 and CXCL-8 in the CFS group; IL-6, as well as CXCL-8 and TNF- $\alpha$  in the GE group.
2. The intensity of inflammatory response in SFS and SFS+ patients corresponded to significantly higher levels of all assessed PICs and inflammatory markers.
3. Significantly higher IL-6, CXCL-8 and TNF- $\alpha$  with normal inflammatory markers were observed in patients with ES in the course of acute infection.
4. Compared to controls, PICs were significantly higher in patients with symptoms of infection regardless of the aetiology.
5. IL-6, CXCL-8 and TNF- $\alpha$  were significantly higher in the SFS group with BI, and TNF- $\alpha$  was higher in the GE group than in controls.
6. The levels of IL-6, CXCL-8 and TNF- $\alpha$  in HHV-6-infected patients with SFS and SFS+ were significantly higher than in controls.

związanej z zakażeniem HHV-6, a podwyższone stężenia IL-6, rozpuszczalnego receptora typu 1 dla czynnika martwicy nowotworu w surowicy i IL-6 w CSF są istotne dla przewidywania powikłań neurologicznych (Ichiyama *et al.*, 2009). Z kolei Kawabe i wsp., badając stężenia IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, TNF- $\alpha$ , IL-10, interleukiny 12p70 i MMP-9, wykazali, że średnie stężenia IL-6, CXCL-8 w CSF i surowicy, jak również IL-10 i MMP-9 w surowicy były podwyższone w porównaniu z normalnymi poziomami u osób zdrowych. Według badaczy wysokie stężenie CXCL-8 w CSF może być związane z patogenezą encefalopatii (Kawabe *et al.*, 2010). W naszym badaniu oceniono stężenia PICs u pacjentów z zakażeniem HHV-6 po napadach FS i ES. Podobnie jak w pracy Ichiyamy i wsp. (2009), nie zaobserwowano istotnych różnic w stężeniach IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8 i TNF- $\alpha$  w poszczególnych grupach FS i GE między pacjentami zakażonymi HHV-6 i niezakażonymi.

W niniejszej pracy u dzieci z SFS i SFS+ w profilu PICs stwierdzono istotnie wyższe stężenia IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8 i TNF- $\alpha$ . Wyniki pokazują, że PICs były w różnym zakresie zaangażowane w proces zapalny u pacjentów ze stanami napadowymi. Potwierdzono udział IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , najbardziej kontrowersyjnych mediatorów zapalenia, w patogenezie FS z wyjątkiem CFS. Wykazano udział IL-6 i CXCL-8 w stanach napadowych. W świetle przytoczonych danych z piśmiennictwa i naszych wyników profile cytokin nie zawsze są stałymi elementami reakcji zapalnej. W profilu PICs w burzy cytokinowej u naszych pacjentów najwyższe stężenia IL-1 $\beta$ , IL-6 i CXCL-8 odnotowano w grupie SFS+, a TNF- $\alpha$  – w GE. U pacjentów po napadzie padaczkowym IL-1 $\beta$  była jedyną PIC, w której stężeniu nie zaobserwowano istotnych różnic. Mogły na to wpłynąć czas pobrania próbek krwi i krótki okres półtrwania cytokiny. Jak podają Kawabe i wsp. (2010), zakażenie HHV-6 ma różny wpływ na odpowiedź zapalną i produkcję cytokin, co można stwierdzić także na przykładzie naszych pacjentów. W grupie GE gorączka nie była warunkiem koniecznym wystąpienia ES u dzieci z ostrą infekcją. W powyższej grupie odnotowano istotnie wyższe stężenia IL-6 i CXCL-8, a stężenie TNF- $\alpha$  było najwyższe spośród badanych grup. Z kolei w odniesieniu do FS wskazuje się na indywidualny próg drgawkowy dla temperatury, zależny od wieku dziecka i dojrzałości CNS (Millichap i Millichap, 2006). W patogenezie FS oprócz odpowiedzi cytokinowej ważną rolę odgrywają czynniki genetyczne (Millichap i Millichap, 2006; Mittal, 2014; Yu *et al.*, 2018).

Autorzy zdają sobie sprawę, że wnioski sformułowano na podstawie wyników uzyskanych w grupach o małej liczebności. Niemniej jednak to pilotażowe badanie stwarza możliwość prowadzenia dalszych prac.

## WNIOSKI

1. Stwierdzono istotnie wyższe stężenia: IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8 i TNF- $\alpha$  w grupach SFS i SFS+; IL-6 i CXCL-8 w grupie CFS; IL-6, CXCL-8 i TNF- $\alpha$  w grupie GE.

### Conflict of interest

The authors report no financial or personal relationships with other individuals or organisations that could adversely affect the content of the publication and claim ownership of this publication.

### Source of funding

The study was funded by the Poznan University of Medical Sciences.

### Author contributions

Original concept of study: GB, AM. Collection, recording and/or compilation of data: GB, MF. Analysis and interpretation of data: GB, MF, AG, KL. Writing of manuscript: GB. Critical review of manuscript: AM, KMM, MF. Final approval of manuscript: GB, MF.

### References

- Andrzejczak D: [Epilepsy and pro-inflammatory cytokines. Immunomodulating properties of antiepileptic drugs]. *Neurol Neurochir Pol* 2011; 45: 275–285.
- Asano T, Ichiki K, Koizumi S et al.: IL-8 in cerebrospinal fluid from children with acute encephalopathy is higher than in that from children with febrile seizure. *Scand J Immunol* 2010; 71: 447–451.
- Choy MK, Dubé CM, Ehrenguber M et al.: Inflammatory processes, febrile seizures, and subsequent epileptogenesis. *Epilepsy Curr* 2014; 14 (Suppl): 15–22.
- Gallentine WB, Shinnar S, Hesdorffer DC et al.; FEBSTAT Investigator Team: Plasma cytokines associated with febrile status epilepticus in children: a potential biomarker for acute hippocampal injury. *Epilepsia* 2017; 58: 1102–1111.
- Gao F, Gao Y, Zhang SJ et al.: Alteration of plasma cytokines in patients with active epilepsy. *Acta Neurol Scand* 2017; 135: 663–669.
- Grill MF, Ng YT: “Simple febrile seizures plus (SFS+)”: more than one febrile seizure within 24 hours is usually okay. *Epilepsy Behav* 2013; 27: 472–476.
- Haspolat Ş, Mihçi E, Coşkun M et al.: Interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , and nitrite levels in febrile seizures. *J Child Neurol* 2002; 17: 749–751.
- Ichiyama T, Ito Y, Kubota M et al.: Serum and cerebrospinal fluid levels of cytokines in acute encephalopathy associated with human herpesvirus-6 infection. *Brain Dev* 2009; 31: 731–738.
- Kawabe S, Ito Y, Ohta R et al.: Comparison of the levels of human herpesvirus 6 (HHV-6) DNA and cytokines in the cerebrospinal fluid and serum of children with HHV-6 encephalopathy. *J Med Virol* 2010; 82: 1410–1415.
- Kim K, Kwak BO, Kwon A et al.: Analysis of plasma multiplex cytokines and increased level of IL-10 and IL-1Ra cytokines in febrile seizures. *J Neuroinflammation* 2017; 14: 200.
- Korff CM, Dale RC: The immune system in pediatric seizures and epilepsies. *Pediatrics* 2017; 140: e20163534.
- Mahyar A, Ayazi P, Orangpour R et al.: Serum interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in febrile seizures: is there a link? *Korean J Pediatr* 2014; 57: 440–444.
- Millichap JG, Millichap JJ: Role of viral infections in the etiology of febrile seizures. *Pediatr Neurol* 2006; 35: 165–172.

2. Intensywność reakcji zapalnej u pacjentów z SFS i SFS+ odpowiadała istotnie wyższym stężeniom wszystkich badanych PICs i wskaźnikom zapalenia.
3. U chorych z ES w przebiegu ostrej infekcji zaobserwowano istotnie wyższe stężenia IL-6, CXCL-8 i TNF- $\alpha$  przy prawidłowych wskaźnikach zapalenia.
4. Stężenia PICs u pacjentów z objawami infekcji – niezależnie od etiologii – były istotnie wyższe niż w GK.
5. Stężenia IL-6, CXCL-8 i TNF- $\alpha$  w grupie SFS z IB oraz stężenie TNF- $\alpha$  w grupie GE były istotnie wyższe niż w GK.
6. Stężenia IL-6, CXCL-8 i TNF- $\alpha$  u pacjentów zakażonych HHV-6 z SFS i SFS+ były istotnie wyższe niż w GK.

### Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają żadnych finansowych ani osobistych powiązań z innymi osobami lub organizacjami, które mogłyby negatywnie wpłynąć na treść publikacji oraz rościć sobie prawo do tej publikacji.

### Źródło finansowania

Badanie finansowane ze środków Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

### Wkład autorów

Koncepcja i projekt badania: GB, AM. Gromadzenie i/lub zestawianie danych: GB, MF. Analiza i interpretacja danych: GB, MF, AG, KL. Napisanie artykułu: GB. Krytyczne zrecenzowanie artykułu: AM, KMM, MF. Zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu: GB, MF.

- Millichap JJ: Clinical features and evaluation of febrile seizures [online]. Evidence-Based Clinical Decision Support System UpToDate. 2022. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-features-and-evaluation-of-febrile-seizures> [cited: 22 July 2022].
- Mittal R: Recent advances in febrile seizures. *Indian J Pediatr* 2014; 81: 909–916.
- Pavlidou E, Panteliadis C: Prognostic factors for subsequent epilepsy in children with febrile seizures. *Epilepsia* 2013; 54: 2101–2107.
- Rana A, Musto AE: The role of inflammation in the development of epilepsy. *J Neuroinflammation* 2018; 15: 144.
- Talebian A, Hassani F, Nikouinejad H et al.: Investigating the relationship between serum levels of interleukin-22 and interleukin-1beta with febrile seizure. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2020; 19: 409–415.
- Virta M, Hurme M, Helminen M: Increased plasma levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in patients with febrile seizures. *Epilepsia* 2002; 43: 920–923.
- Yu X, Zhang N, Liu S et al.: Polymorphisms in the interleukin-1 $\beta$  (*IL-1B*) and interleukin-1 $\alpha$  (*IL-1A*) genes on risk of febrile seizures: a meta-analysis. *Neurol Sci* 2018; 39: 1529–1536.