



Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Hradci Králové
Ústav klinické imunologie a alergologie



KARDIOCHIRURGICKÁ OPERACE JAKO MODEL ZÁNĚTOVÉ ODPOVĚDI

Mgr. Manuela Trojáčková Kudlová

Autoreferát dizertační práce
Doktorský studijní program: lékařská imunologie
Hradec Králové
2007

Dizertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu lékařská imunologie na Ústavu klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Uchazečka: Mgr. Manuela Trojáčková Kudlová
Ústav klinické imunologie a alergologie
Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlovy v Praze a Fakultní nemocnice
v Hradci Králové

Školitelka: Prim. MUDr. Irena Krčmová, CSc.
Ústav klinické imunologie a alergologie
Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlovy v Praze a Fakultní nemocnice
v Hradci Králové.

Oponenti: Doc. MUDr. Petr Němec, CSc.
přednosta
Centrum kardiiovaskulární a transplatační chirurgie
Pekařská 53, Brno ~~602 00~~ 658 91

Prof. MUDr. Ivo Hána, CSc.
Profesor emeritus

Stanovisko k dizertační práci vypracovala oborová rada oboru lékařská imunologie.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT č. MSM0021620812.

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, Hradec Králové

Prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.
Předseda komise pro obhajobu dizertačních prací
v doktorském studijním programu lékařská imunologie

OBSAH

1. ÚVOD.....	4
2. CÍL PRÁCE.....	7
3. METODIKA.....	8
3.1. Soubor nemocných (demografická a klinická data)	8
3.2. Operační postupy.....	9
3.3. Odběr vzorků	9
3.4. Stanovení buněčných parametrů (průtoková cytometrie).....	10
3.5. Stanovení humorálních parametrů (ELISA, nefelometrie).....	12
3.6. Statistické hodnocení.....	12
4. SOUHRN VÝSLEDKŮ	13
5. ZÁVĚR.....	16
6. SUMMARY	18
7. POUŽITÁ LITERATURA	21
8. PUBLIKACE UCHAZEČKY	22
8.1. Původní vědecké práce přímo se vztahující k tématu dizertační práce	22
8.2. Další vědecké práce ve vědeckých časopisech.....	22
8.3. Abstrakta.....	23
8.4. Přednášky	24

Obhajoba se koná před komisí pro obhajoby
disertačních prací v doktorském studijním programu
Lékařská imunologie
v pondělí 14. dubna 2008 od 11.00 hodin,
v seminární místnosti Ústavu klinické imunologie
a alergologie ve FN v HK, budova č. 17, 1.podlaží

1. ÚVOD

Nemoci oběhové soustavy, zejména ischemická choroba srdeční a cévní onemocnění mozku, představují vždy zásadní snížení kvality zdraví a jsou také nejčastější příčinou smrti ve všech evropských zemích (1). Patogeneze nemocí oběhového systému a srdce nebyla až do nedávné doby dávána do souvislosti s funkcemi imunitního systému. V současné době je však na mnohé patofyziologické situace spojené s poruchami kardiovaskulárního systému pohlíženo jako na zánětlivý proces, v němž velkou roli hraje nepochybně imunitní systém (1, 2). Přestože se nemoci oběhového systému vyskytují v různých formách, společným jmenovatelem mnoha z nich, zejména těch nejčastějších a nejzávažnějších (ischemická choroba srdeční a cévní mozková příhoda), je ateroskleróza. Chronický zánět hraje významnou úlohu v patogenезi aterosklerózy a ukazatele zánětu jsou považovány za rizikový faktor pro vznik ischemické choroby srdeční (3). Svědčí pro to přítomnost zánětlivých buněk v poškozené arteriální stěně, systémové projevy zánětu, které předcházejí delší dobu vzniku akutních koronárních syndromů, častější výskyt některých chronických infekcí současně s aterosklerózou i častější výskyt koronární aterosklerózy u jedinců s geneticky determinovaným prozánětlivým fenotypem.

Projevy ischemické choroby srdeční lze příznivě ovlivnit řadou léků a minimalizováním rizikových faktorů vhodnou úpravou životního stylu. V případě pacientů s trombem, způsobujícím uzávěr lumen cévy, je konzervativním terapeutickým zákrokem trombolytická léčba popř. mechanická reperúze pomocí perkutánních kardiologických intervencí. Léčebným postupem těžkých forem ischemické choroby srdeční je chirurgická léčba v podobě přemostění zúženého místa na věnčité tepně provedením tzv. bypassové operace (4).

Kardiochirurgické zákroky jsou v současnosti prováděny dvěma odlišnými způsoby. Tradiční kardiochirurgický přístup představují operace na srdci, které je vyřazeno z činnosti a jeho funkci přebírá podpůrné zařízení, které zajišťuje cirkulaci krve v mimotělním oběhu (*cardiopulmonary bypass*, CPB) a její oksylíčení v oxygenátoru. Novějším přístupem jsou kardiochirurgické operace, které jsou prováděny na bijícím srdci (*off-pump coronary artery bypass*, OPCAB), které s minimálním omezením vykonává své fyziologické funkce (5). S cílem co nejšetnějšího přístupu jsou do klinické praxe zaváděny i další postupy, které eliminují negativní vliv mimotělního oběhu, manipulace s ascendentní aortou a sternotomie. Patří mezi ně zejména operace z minimálně invazivního

přístupu z malého řezu na hrudníku (*minimally invasive direct coronary artery bypass*, MIDCAB) a použití miniinvasivního mimotělního oběhu (mini-CPB).

Kardiochirurgická operace je mimořádně náročným výkonem, který se promítne do deregulace homeostázy a vede k iniciaci zánětové kaskády. Kardiochirurgická operace představuje pro člověka komplexní stresovou situaci, při které je narušena integrita tkání rozsáhlým chirurgickým výkonem a tkáně jsou poškozeny hypotermií, hypoxií a sníženou krevní perfúzí (6). Následkem je masivní aktivace humorálních a buněčných složek přirozené imunity, ke které dochází jak expozicí uvolněným endogenním "nebezpečným vzorům", tak kontaktní aktivací v podpůrných přístrojích. Dalšími imunomodulačními faktory jsou aplikace krve a krevních preparátů, anestézie, případně medikace, včetně podání kortikoidů.

Reakci na kardiochirurgickou operaci je komplexní zánětová odpověď, ve které sehrává nejvýznamnější úlohu imunitní systém. Rozvoj zánětové reakce u kardiochirurgických nemocných má zajistit obranu před infekčním agens endogenního i exogenního původu, podílet se na eliminaci poškozených vlastních struktur a v neposlední řadě se zúčastnit i procesu hojení a reparace tkání. Prospěšné účinky každé zánětové reakce jsou však neoddělitelně spojeny také s poškozujícími prvky (7). Zánětová reakce provázející kardiochirurgickou operaci nemá u většiny nemocných bezprostřední ani dlouhodobé účinky na zdraví pacientů. I přes terapeutické zásahy působící preventivně na rozvoj nežádoucích zánětových reakcí, stále zůstává malé procento kardiochirurgických nemocných, u kterých dojde k deregulaci zánětové reakce v takové míře, že subklinická forma systémové zánětové odpovědi (SIRS) přechází v orgánovou dysfunkci (MODS) a často i k orgánovému selhání (MOFS) s následkem smrti (8). S cílem zabránit takovým nežádoucím situacím jsou dlouhodobě hledány optimální operační postupy a je optimalizována podpora nemocných v průběhu operace i v pooperačním období. Na změnách parametrů imunitního systému v průběhu kardiochirurgické operace se podílí mnoho proměnných faktorů, které zásadním způsobem ovlivňují výslednou zánětovou odpověď. Řada klinických studií dokumentuje změny jednotlivých složek přirozené i adaptivní imunity. Dokumentovány jsou kvantitativní i kvalitativní změny parametrů jak buňkami zprostředkované, tak humorální imunity.

Z pohledu rozvoje zánětové reakce převládá názor, že operace na tepajícím srdci vede k menší systémové zánětové odpovědi (9, 10) a je tak pro nemocného většinou méně zatěžující. Jednoznačné důkazy podporující toto tvrzení však dosud nejsou k dispozici.

Je také potřeba získat údaje zejména o imunitní odpovědi pacientů, u kterých dochází k rozvoji vážných, život ohrožujících pooperačních komplikací. Důležitým podkladem pro správné terapeutické zásahy je zhodnocení stupně aktivace nebo suprese imunitního systému.

V rozsáhlých klinických studiích byl ověřen význam mnohých ukazatelů imunitního systému, popisujících zánětovou odpověď, jako biomarkerů s prediktivní vahou určující klinické komplikace aterosklerózy. Jsou jimi zejména zvýšené hladiny prozánětových cytokinů (IL-6, IL-1, IL-18, TNF α), látek uvolňovaných degranulací buněk zánětu (myeloperoxidáza, metaloproteázy), solubilní formy regulačních membránových molekul (sCD40L), solubilní formy adhezních molekul leukocytů i endotelových buněk (sVCAM-1, P-selektin, E-selektin, ICAM-1), fibrinogen, či adipokiny nebo leptin (11, 12, 13). Nalezení dalších parametrů imunitního systému, na základě kterých by bylo možno provádět klinická rozhodnutí, je předmětem výzkumu řady experimentálních i klinických studií.

Nejvýznamnějším zdrojem nových poznatků o vzniku, průběhu a ukončení zánětové reakce jsou experimentální *in vitro* či *in vivo* studie. Při těchto studiích jsou využívány přesně definované experimentální systémy - tkáňové kultury či zvířecí modely. Jsou obvykle používány geneticky plně definované buněčné linie nebo kmeny experimentálních zvířat. Je možné přesné kvantifikování i časování vyvolávajících podnětů. Nic z toho není k dispozici v klinických studiích. Zde se vždy jedná o geneticky vysoce heterogenní skupiny jedinců, které se vyznačují individuálním průběhem zánětové reakce. Zcela neznámé je časování, kombinace a intenzita vyvolávajících podnětů. Je opakovaně prokázáno, že převod výsledků studia zánětu, získaných v *in vitro* či *in vivo* experimentech využívajících zvířecí modely do klinických aplikací, je možný pouze nepřímě. Z těchto důvodů je mimořádně žádoucí sledovat zánět v klinické situaci, na co nejlépe definovaném modelu. Kardiochirurgická operace má v tomto ohledu mnoho výhod. Za největší je možné považovat znalost časování výchozího inzultu. Rovněž noxy, které provádějí kardiochirurgickou operaci jsou podrobně definovány. S ohledem na univerzálnost zánětové odpovědi lze výsledky získané v tomto modelu přenášet i do jiných klinických situací.

2. CÍL PRÁCE

Předkládaná práce je zaměřena na sledování dynamiky a intenzity produkce vybraných parametrů imunitního systému v průběhu kardiochirurgické operace. Cílem práce je zhodnotit vliv rozdílných operačních přístupů na rozvoj zánětové odpovědi.

Studie je zaměřena na zhodnocení vybraných parametrů imunitního systému v průběhu kardiochirurgické operace a následném týdenním pooperačním období. Námi získané údaje by měly prohloubit současné poznatky o vlivu komplexní zátěže na imunitní systém s důrazem na ozřejnění úlohy aktivace složek přirozené imunity. Konečné zhodnocení závislosti mezi parametry imunitního systému a klinickými ukazateli získanými během operace a v pooperačním období by mohlo vést k nalezení v klinické praxi rutinně použitelných parametrů, které by predikovaly pacienty s abnormálním průběhem onemocnění a umožnily včasné zahájení imunomodulační terapie.

Práce si klade za cíl zejména:

1. sledovat vybrané parametry imunitního systému u pacientů podstupujících kardiochirurgickou operaci v průběhu operace a následném pooperačním období
2. zhodnotit vliv použití mimotělního oběhu na dynamiku a intenzitu změn parametrů imunitního systému, a to zejména s ohledem na rozvoj zánětlivé odpovědi
3. nalezení parametrů, které by určily nemocné ohrožené rozvojem nežádoucí imunopatologické reakce po kardiochirurgické operaci

3. METODIKA

3.1. Soubor nemocných (demografická a klinická data)

Soubor nemocných zahrnutých do studie tvoří 40 pacientů, kterým byl poprvé proveden aortokoronární bypass. Nemocní podstoupili konvenční myokardiální revaskularizaci, buď s použitím kardiopulmonálního bypassu, nebo byli operováni na tepajícím srdci.

Obě skupiny pacientů se statisticky nelišily věkem, ani zastoupením jednotlivých pohlaví. Mezi oběma skupinami nebyl statistický rozdíl v počtu provedených anastomóz, ani v hodnotě ejekční frakce. Základní charakteristiky jednotlivých skupin pacientů uvádí tabulka (Tab. 1).

Tab. 1: Charakteristika operovaných pacientů

	Operace s CPB	Operace bez CPB
Počet	n = 20	n = 20
Pohlaví	5 ♀, 15 ♂	4 ♀, 16 ♂
Průměrný věk	66±10 let	69±7 let
Ejekční frakce	65 %	65 %
Průměrný počet anastomóz	2	2

Ze studie byli vyřazeni pacienti léčení protizánětlivými přípravky (steroidy nebo NSAID), nemocní s hodnotou sérového kreatininu $\geq 130 \mu\text{mol/l}$ nebo poruchou jaterních funkcí. Žádný pacient netrpěl maligním onemocněním, ani nebyl ve stavu akutní infekce.

Studie byla schválena Etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Každý pacient poskytl informovaný souhlas se svou účastí ve studii.

3.2. Operační postupy

Operační postupy a postupy vedení mimotělního oběhu byly obdobné pro všechny pacienty. U všech pacientů byla vedena anestézie podle současného protokolu používaného na Kardiochirurgické klinice FN v Hradci Králové.

Pooperační péče byla zajišťována na JIP kardiochirurgické kliniky, ze které byli pacienti v závislosti na zdravotním stavu překládáni na standardní oddělení. Všichni pacienti prodělali následné zotavení bez pooperačních komplikací.

3.3. Odběr vzorků

K analýze vybraných buněčných a humorálních parametrů byly odebírány vzorky arteriální a žilní krve.

Krevní vzorky byly u každého pacienta odebírány (1) při úvodu do anestézie, (2) po ukončení operace, (3) první, (4) třetí a (5) sedmý pooperační den z periferní žíly. U pacientů operovaných s použitím mimotělního oběhu byly navíc provedeny odběry vzorků v průběhu operace: (1a) před naložením svorky na aortu, (1b) po uvolnění svorky na aortu a (1c) po ukončení mimotělního oběhu (Tab. 2).

Tab. 2: Odběrové schéma v průběhu operace a pooperačním období

Operace s CPB	Operace bez CPB
1 úvod do anestézie	1 úvod do anestézie
1a po naložení svorky na aortu	
1b po sejmutí svorky z aorty	
1c po ukončení mimotěl. oběhu	
2 po ukončení operace	2 po ukončení operace
3 1. pooperační den	3 1. pooperační den
4 3. pooperační den	4 3. pooperační den
5 7. pooperační den	5 7. pooperační den

V průběhu operace a první pooperační den byl prováděn odběr centrální žilní krve z *arteria pulmonalis* či pravé síně, při úvodu do anestézie a následném pooperačním období periferní venózní krev z antebrachiální žíly. Arteriální krev (*arteria radialis*) byla odebírána dle možnosti od úvodu do anestézie až do prvního pooperačního dne.

Odběr krve byl proveden do odběrových zkumavek firmy Saarstedt (SRN). V každém odběrovém intervalu byl proveden odběr nesrážlivé heparinizované krve pro analýzu buněčných parametrů. Pro vyšetření sérových parametrů byl odebrán vzorek srážlivé krve. Ta byla po koagulaci centrifugována a odebrané sérum bylo do doby následných analýz uloženo v alikvotních objemech při - 40°C.

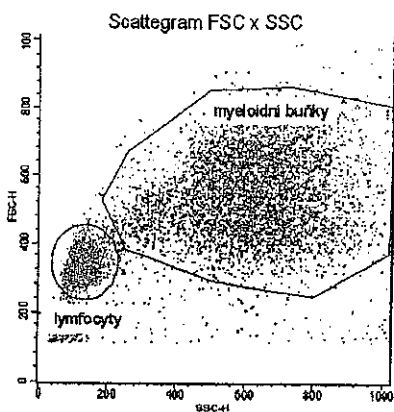
3.4. Stanovení buněčných parametrů (průtoková cytometrie)

Hodnocení parametrů buněčné imunity bylo provedeno imunofluorescenční analýzou na průtokovém cytometru. Průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM) je metoda, která umožňuje simultánní měření a analýzu fyzikálních a chemických vlastností buňky nebo jiných biologických částic během jejich průchodu laserovým paprskem. Nejčastěji měřenými parametry jsou rozptyl světla v malém úhlu, tzv. forward scatter (je přímo úměrný velikosti částic), rozptyl světla v 90° úhlu, tzv. side scatter (je ovlivněn granularitou) a fluorescence různé vlnové délky.

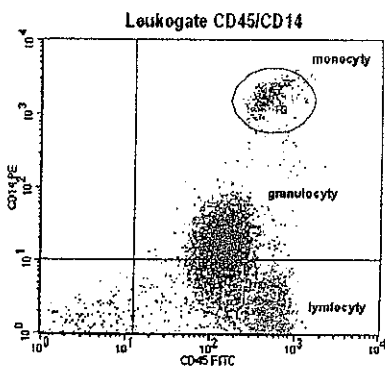
Imunofluorescenční analýza byla prováděna pomocí průtokového cytometru FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, USA) opatřeným vzduchem chlazeným argonovým laserem. K ovládání cytometru, akvizici, uchování a následné analýze dat byl použit softwarový program CELLQuest™ verze 3.3.

K detekci byla použita dvoubarevná analýza s využitím monoklonálních protilátek proti povrchovým epitopům, přímo konjugovaných s FITC nebo PE (*Beckman Coulter, Serotec*). Na základě stanovení exprese vybraných povrchových znaků byly detekovány jednotlivé leukocytární subpopulace a hodnocena přítomnost povrchových aktivačních znaků souvisejících s časnou a pozdní fází zánětové reakce. Pomocí monoklonálních protilátek byla hodnocena exprese následujících povrchových znaků: CD3+ (*Immunotech*), CD4+ (*Immunotech*), CD5+ (*Immunotech*), CD8+ (*Immunotech*), CD18+ (*Serotec*), CD19+ (*Immunotech*), CD56+ (*Immunotech*), TLR2+ (*Serotec*), TLR4+ (*Serotec*), CD38+ (*Serotec*), CD64 a CD163 (*Leuko64 kit, Trillium Diagnostics*).

Cytometrická analýza byla provedena ze vzorku plné krve (venózní i arteriální) odebrané do heparinu (Saarstedt, SRN). Zpracování vzorků bylo provedeno ihned po náběru. Značení monoklonálními protilátkami bylo provedeno standardním postupem: 25 μ l krve inkubováno s 3 μ l nefeděné protilátky při laboratorní teplotě po dobu 20 minut. Následovala lýza erytrocytů (OptiLyseC Lysing Solution, Beckman Coulter) a 1x promytí ve fyziologickém roztoku (1200ot/8minut). Takto připravené vzorky byly nejpozději do 2 hodin po jejich zpracování analyzovány standardním způsobem pomocí průtokového cytometru. Bylo analyzováno vždy minimálně 5 000 leukocytů.



Obr. 1: Scattergram periferní krve
Odišení lymfocytů a myeloidních buněk na základě odlišné hodnoty parametrů FSC (velikost) a SSC (granularita).



Obr. 2: Leukogate periferní krve
Oddělení populace lymfocytů, monocytů a granulocytů na základě rozdílu v expresi pan leukocytární molekuly CD45 a molekuly CD14

Průtokově cytometrickou analýzou byla hodnocena dynamika změn jak v relativním (%) a absolutním (počet buněk/l) zastoupení jednotlivých leukocytárních populací, tak v intenzitě fluorescence hodnocením indexu MFI (mean fluorescence index). K detekci CD64 a CD163 pozitivních myeloidních buněk byl použit komerčně dostupný kit Leuko64 (Trillium Diagnostics, IQ Products, Nizozemí) vybavený vlastním analyzačním softwarem pro kvantifikaci dat.

Stanovení počtu leukocytů pro vyjádření absolutního počtu buněk bylo provedeno obarvením leukocytů ředícím Türkovým roztokem s následným mikroskopickým zhodnocením počítáním v Bürkerově komůrce.

3.5. Stanovení humorálních parametrů (ELISA, nefelometrie)

Vyšetřované humorální parametry byly zjišťovány ve vzorku nesrážlivé krve odebírané do odběrových zkumavek firmy Saarstedt (SRN). Krev byla koagulována a po centrifugaci bylo sérum rozděleno do alikvotů. Do doby analýzy byly vzorky skladovány při - 40°C. Vzorky byly zmrazeny a rozmrazeny pouze jednou.

Sérové hladiny vybraných cytokinů byly stanoveny komerčně dostupnými ELISA kity. Výsledné hodnoty byly odečteny na spektrofotometru (Photometer Multiscan) při vlnové délce doporučené výrobcem soupravy a analyzovány softwarem Genesis. C-reaktivní protein byl hodnocen imunonefelometricky na analyzátoru IMAGE 800 (Beckman Coulter, USA). Hladiny PTX3 byly stanoveny za pomoci detekčního setu (Alexis, Switzerland) obsahujícího vazebnou monoklonální protilátku PTX3 (700 ng/ml), sekundární polyklonální protilátku PTX (25ng/ml) a rekombinantní lidský standard PTX3.

3.6. Statistické hodnocení

Změny buněčných i sérových parametrů a rozdíly mezi oběma skupinami pacientů byly statisticky vyhodnoceny analýzou variance a následným mnohonásobným porovnáním. Všechny testy byly prováděny při $\alpha=0,05$. Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí statistického softwaru Statistica 5.5 (StatSoft, USA).

4. SOUHRN VÝSLEDKŮ

U jednotlivých skupin pacientů byla sledována změna vybraných parametrů vzhledem k předoperačním hodnotám. Rovněž bylo provedeno vzájemné porovnání obou skupin pacientů.

V důsledku kardiochirurgických operací dochází k výrazné leukocytóze, maximálního počtu leukocytů bylo dosaženo u obou skupin pacientů první pooperační den. Nárůst absolutního počtu leukocytů je způsobován zvýšeným podílem neutrofilních granulocytů. Zvýšené procentuálního zastoupení granulocytů bylo pozorováno již po ukončení operace. Statisticky významně vyšších hodnot relativního počtu granulocytů bylo dosahováno ve skupině pacientů operovaných s použitím CPB. Změny relativního počtu monocytů vykazovaly v celém sledovaném období pouze minimální změny.

Již v průběhu operace a zejména v pooperační období byla pozorována významná leukopenie, a to zejména v subsetu CD3+CD4+. Statisticky významně vyšší pokles jak celkového počtu lymfocytů, tak v subsetu CD3+CD4+ byl zaznamenán ve skupině pacientů operovaných s použitím CPB. Populace CD19+ lymfocytů byla naopak pooperačně signifikantně zvýšená. Relativní počet CD19+ lymfocytů byl v celém pooperačním období statisticky významně vyšší ve skupině pacientů operovaných s CPB. V průběhu operace až do prvního pooperačního byl zaznamenán postupný nárůst relativního počtu CD8-CD56+ lymfocytů následovaný opětovným poklesem k výchozím hodnotám.

Kardiochirurgické operace vedly k signifikantnímu poklesu relativního počtu CD18+ myeloidních buněk v průběhu operace a časném pooperačním období. Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v expresi aktivační molekuly CD18 mezi pacienty operovanými s CPB a operovanými na tepajícím srdci.

Jak u pacientů operovaných s CPB, tak u pacientů operovaných na bijícím srdci bylo v porovnání s předoperačními hodnotami pozorováno signifikantně významné zvýšení CD38+ myeloidních buněk již v průběhu operace. Použití mimotělního oběhu vedlo k signifikantně vyšší expresi CD38 v pooperačním období. Statisticky významně vyšší podíl CD38+ myeloidních buněk u pacientů s CPB byl pozorována první a sedmý pooperační den.

Jak u pacientů operovaných s CPB, tak u pacientů operovaných na bijícím srdci bylo v porovnání s předoperačními hodnotami pozorováno snížení relativního počtu TLR-2+ i TLR4+ myeloidních buněk. Signifikantně významné snížení bylo zaznamenáno

již v průběhu operace. V pooperačním období byla zaznamenána statisticky významně vyšší exprese TLR-2 i TLR-4 na myeloidních buňkách u obou skupin pacientů. Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v expresi ani TLR-2, ani TLR-4 mezi pacienty operovanými s CPB a pacienty operovanými na bijícím srdci.

Kardiochirurgická operace je provázena významnou dynamikou exprese aktivačních markerů CD64 a CD163. U obou skupin pacientů dochází v pooperačním období k signifikantnímu zvýšení monocytárního i granulocytárního CD64 indexu, přičemž nárůst exprese CD64 na monocytech je řádově vyšší a časově předchází zvýšené expresi tohoto znaku na granulocytech. U obou skupin pacientů je v pooperačním období pozorován rovněž statisticky významný nárůst hodnoty indexu CD163. Signifikantní vyšší hodnoty CD163 indexu u pacientů operovaných s použitím CPB v porovnání s pacienty operovanými na bijícím srdci byly zjištěny první pooperační den v monocytární populaci. Rozdíly v expresi povrchového antigenu CD163 v populaci granulocytů jsou mezi jednotlivými skupinami pacientů v celém sledovaném období statisticky nevýznamné. Hodnota CD163 indexu v populaci monocytů byla, stejně jako v případě indexu CD64, řádově vyšší, než hodnota tohoto indexu u granulocytů.

Sérová hladiny IL-6 vykazovala výraznou dynamiku v průběhu operace i následném pooperačním období. Provedení kardiochirurgické operace vedlo k statisticky významnému zvýšení hladiny IL-6 u obou skupin pacientů. Maximální produkce IL-6 byla u pacientů operovaných s použitím CPB naměřena po ukončení operace. U pacientů operovaných bez CPB bylo vrcholu dosaženo až první pooperační den. Bezprostředně po operaci byla hladina IL-6 významně vyšší u nemocných s CPB. Za originální nález lze považovat skutečnost, že v prvním pooperačním dnu byla statisticky významně vyšší hladina IL-6 prokázána naopak u nemocných operovaných na bijícím srdci.

Provedení kardiochirurgické operace vedlo u obou skupin pacientů k statisticky významnému nárůstu hladiny IL-10 již v průběhu operačního výkonu. Prokázali jsme odlišnou dynamiku a významně zvýšenou tvorbu protizáněťového cytokinu IL-10 u pacientů operovaných s použitím CPB. Maximální hodnoty dosažené u pacientů s CPB byly až řádově vyšší než u pacientů operovaných na bijícím srdci.

Sérové hladiny cytokinu IL-13 byly na hranici detekovatelnosti, nevykazují časovou závislost a neodlišují se mezi nemocnými operovanými s použitím a bez použití CPB.

U obou skupin pacientů jsme prokázali signifikantní nárůst sérové hladiny PTX3 s maximem dosažným první pooperační den. U pacientů operovaných s CPB byla v porovnání s pacienty operovanými bez CPB zjištěna statisticky významně vyšší hladina PTX3 po ukončení operace.

V žádné skupině pacientů nebyla zaznamenána změna hladiny CRP v průběhu operačního výkonu. K nárůstu koncentrace dochází u obou skupin pacientů až první pooperační den. Porovnáním hodnot CRP v séru pacientů operovaných s použitím CPB a bez použití CPB nebyl mezi oběma skupinami zjištěn statisticky významný rozdíl.

V průběhu operačního výkonu a v bezprostředním pooperačním období nebyla zaznamenána signifikantní změna koncentrace Hsp60. V žádném ze sledovaných intervalů nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v koncentraci Hsp60 mezi skupinou pacientů operovaných s CPB nebo bez CPB. V celém sledovaném období byly v porovnání s předoperačními hodnotami pozorovány u obou skupin pacientů pouze minimální změny koncentrace Hsp70. Výjimkou byl odběr po ukončení operace, kdy byla prokázána statisticky významně vyšší koncentrace Hsp70 u kardiochirurgických pacientů operovaných s použitím CPB oproti pacientům operovaných na bijícím srdci.

Jak u pacientů operovaných s CPB, tak u pacientů operovaných na bijícím srdci byly pozorovány pooperačně zvýšené sérové hladiny LBP a sCD14. Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi pacienty operovanými s CPB a pacienty operovanými na bijícím srdci.

Na základě provedených analýz nebyl u žádného ze sledovaných parametrů zjištěn signifikantní rozdíl mezi vzorky venózní a arteriální krve.

5. ZÁVĚR

Cílem této dizertační práce bylo zhodnocení vlivu rozdílných kardiochirurgických operačních přístupů na dynamiku a intenzitu změn parametrů imunitního systému.

Soubor nemocných, zahrnutých do studie, tvořilo 40 pacientů, kterým byl poprvé proveden aortokoronární bypass. Nemocní podstoupili konvenční myokardiální revaskularizaci, buď s použitím mimotělního oběhu nebo byli operováni na tepajícím srdci. Obě skupiny pacientů se statisticky nelišily věkem, ani zastoupením jednotlivých pohlaví. Mezi oběma skupinami nebyl statistický rozdíl v počtu provedených anastomóz, ani v hodnotě ejekční frakce.

K analýze vybraných buněčných a humorálních parametrů byly odebrány vzorky arteriální a žilní krve. Odběr vzorků byl prováděn jak v průběhu operace, tak v následném sedmidenním pooperačním období. Hodnocení parametrů buněčné imunity bylo provedeno dvoubarevnou imunofluorescenční analýzou na průtokovém cytometru FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, USA). Sérové hladiny vybraných cytokinů byly stanoveny komerčně dostupnými ELISA kity.

I přes všeobecně přijímanou hypotézu, že operace s použitím CPB jsou, v porovnání s operacemi na bíjícím srdci, spojeny s rozsáhlejší aktivací buněk imunitního systému, neprokázali jsme u většiny buněčných parametrů statisticky významný rozdíl mezi sledovanými skupinami pacientů. Signifikantní rozdíl mezi skupinami pacientů operovaných s CPB a bez použití CPB byl zjištěn pouze v monocytární expresi aktivačního znaku CD38 a vychytávací molekuly CD163. Prokázali jsme statisticky významně vyšší podíl aktivovaných monocytů u pacientů operovaných s použitím CPB. U obou znaků byl rozdíl mezi skupinami pacientů pozorován první pooperační den, v případě znaku CD38 také sedmý den po operaci. Rozdíly v expresi dalších sledovaných znaků, tj. CD18, TLR-2, TLR-4 a CD64, byly mezi skupinou pacientů operovaných s použitím CPB a bez CPB nesignifikantní.

V případě humorálních parametrů byly rozdíly mezi skupinami pacientů pozorovány mnohem častěji. V naší studii jsme našli významný rozdíl v tvorbě IL-6, IL-10, PTX3 a Hsp70.

Již bezprostředně po ukončení operace jsme pozorovali signifikantně vyšší koncentrace těchto parametrů u nemocných operovaných s použitím CPB. Za originální nález naší práce lze považovat skutečnost, že bezprostředně po operaci jsme prokázali významně vyšší hladinu IL-6 u nemocných operovaných s použitím CPB, zatímco

v dalším období dochází k úplnému přesmyku a v první pooperační den je hladina IL-6 signifikantně vyšší u nemocných operovaných bez použití CPB.

Naše výsledky, které dokládají rozdíly v hladinách prozáněťových i protizáněťových cytokinů mezi kardiochirurgickými nemocnými operovanými s použitím a bez použití CPB, nelze jednoznačně interpretovat. S jistými omezeními lze ovšem shrnout, že dynamika protizáněťového cytokinu IL-10 zhruba kopíruje dynamiku tvorby prozáněťových cytokinů (IL-6), nebo jejich produkci spíše předchází. Z našich výsledků lze také implikovat, že IL-13 pravděpodobně nesehrává významnější úlohu v průběhu kardiochirurgické operace. Na základě provedených korelací lze rovněž konstatovat, že molekuly LBP a sCD14 nepůsobí u kardiochirurgických pacientů jako proteiny akutní fáze. Naše výsledky zároveň potvrdily skutečnost, že je důležité sledovat dynamiku tvorby cytokinů, nikoliv se zaměřit pouze na jejich izolované stanovení.

Z našich výsledků by se dalo shrnout, že sledované parametry prodělávají během operace významné změny a vykazují obdobnou dynamiku u obou skupin pacientů. U většiny sledovaných parametrů jsme prokázali významné změny v průběhu operace i následném pooperačním období. Prokázali jsem, že kvantitativní i kvalitativní změny buněčných a humorálních parametrů, ke kterým dochází v různém odstupu od zákroku, jsou odlišné u jednotlivých skupin pacientů. Tento nálezn dokazuje, že rozdílný kardiochirurgický přístup vede k zásadně jinému průběhu záněťové reakce.

Podrobná znalost kvalitativních a kvantitativních změn parametrů záněťové reakce spoju s jejich dynamikou, ke které dochází na základě odlišných kardiochirurgických postupů, a jejich podrobnou korelací s klinickými perioperačními i pooperačními ukazateli by mohla vést k identifikování specifických markerů, jejichž sledování by mělo prediktivní sílu určit rozvoj abnormální, deregulované záněťové odpovědi v pooperačním období. V kombinaci s rozšiřující se znalostí geneticky podmíněných odlišností, které určují parametry záněťové reakce (polymorfismus v TLR a pod.), by tyto ukazatele mohly napomoci i výběru optimálního kardiochirurgického postupu s co nejmenším dopadem na zdraví pacienta.

6. SUMMARY

Introduction

Cardiovascular diseases, especially ischemic heart disease and vascular brain diseases substantially impair quality of life of affected people and are the most frequent cause of both morbidity and mortality in European countries.

The longterm chronic inflammatory reaction has been reported to be implicated in the pathogenesis of atherosclerosis. The presence of inflammatory markers detected in peripheral blood are recognized as risk factors of a development of ischemic heart disease. There are overwhelming evidences based both on the presence of inflammatory cells in the damaged arterial cell wall, and systemic presentation of this inflammatory reaction which precede the onset of acute coronary syndromes. Furthermore, there is an association of some chronic infections caused e.g. Chlamydia species with more frequent incidence of coronary arteries atherosclerosis in patients with genetically determined proinflammatory phenotypes.

The clinical presentation of ischemic heart disease is positively modulated by both minimalisation of adverse effects of risk factors during life and by the administration of various drugs. To reanalyse coronary artery occluded by thrombus during acute coronary event either thrombolytic therapy or invasive percutaneous cardiological interventions are highly effective. Severe forms of ischemic heart disease are treated by cardiac surgery using aortocoronary bypass to overpass stenosis of a coronary artery. Classical approach to such cardiac surgeries is exploiting cardiopulmonary bypass. Novel approach which is based on so called beating-heart surgery is avoiding proinflammatory effect of cardiopulmonary bypass.

There is a substantial complex disturbance of body integrity and homeostasis during cardiac surgical operation and in the early postoperative period ultimating in the development of severe and in some cases overwhelming inflammatory response. Numerous so called "danger patterns" of both endogenous and exogenous origin are raised during cardiac surgery. Identification of the danger pattern by the innate immunity via pattern recognition receptors are stimulating intracellular activation pathway, especially NF κ B transcription factor. The enhanced transcription of many genes coding for factors regulating inflammatory response is in the end of this highly sophisticated cascade.

The spectrum of danger patterns, qualitative and quantitative parameters, and dynamics of inflammation are different in patients operated either using cardiopulmonary bypass or surged on the beating heart. Many doubts remain which surgical approach is superior concerning the outcome of cardiac surgery. It is generally claimed that "beating-heart" surgery is activating an inflammatory response in a lesser magnitude compared to surgery using cardiopulmonary bypass. To reconcile this new data describing inflammatory response during cardiac surgical operations are exagerately warranted. Amongst other, it is essential to identify parameters of immune system which are displaying not only proinflammatory activities but also regulatory (homeostatic) and termination parameters of inflammatory reaction raised by cardiac surgical operation.

This thesis is summarising the results of the complex study focusing on the intensity and dynamics of selected parameters of the immune system in the representative group of cardiac surgical patients operated either with or without the use of cardiopulmonary bypass.

Patients and Methods

Forty patients referred to first-time coronary artery bypass grafting (CABG) were enrolled in this study. Patients underwent either conventional myocardial revascularization with cardiopulmonary bypass and cardioplegic arrest of the heart ("on-pump", n=20, 16 male, 4 females, mean age 69 \pm 7) or beating heart surgery ("off-pump", n=20, 15 males, 5 females, mean age 66 \pm 10). Patients in both groups were comparable in age, preoperative left ventricular ejection

fraction (median 0.65 in "on-pump", 0.65 in "off-pump" patients, respectively) and the number of performed coronary anastomoses (median 2.0 in "on-pump", 2.0 in "off-pump", respectively). Both venous blood (peripheral venous blood from an antibrachial vein) and arterial blood was withdrawn. In "on-pump" patients, blood was withdrawn at (1) introduction to anaesthesia (in both groups represented the baseline or reference value for all parameters measured thereafter), (1a) before cross-clamping of the aorta, (1b) after aortic cross-clamp release (1c) after termination of CPB, (2) after termination of the operation, (3) the first postoperative day, (4) the third postoperative day and (5) the seventh postoperative day. Samples 1a, 1b and 1c were not available in „off-pump" patient for obvious reasons.

Serological parameters were quantitatively detected by commercially available ELISA kits. Double immunofluorescence standard whole blood staining method was used to determine surface expression of selected markers. Measurements were performed using FACSCalibur flow cytometer and data acquired by CellQuest software (BD Bioscience, NY, USA).

Statistical analysis was performed with Statistica 5.5 software (StatSoft, USA). Probability values of < 0.05 were considered statistically significant.

Aim of the study

The aim of this thesis was to assess the changes of selected immunological parameters in cardiac surgical patients who underwent coronary artery bypass grafting (CABG) either using or avoiding cardiopulmonary bypass (CPB).

The principal aims of this study were:

1. to exploit cardiac surgical operations as a clinical model of an inflammatory response
2. to add new original data to reconcile which surgical approach, "on-pump" versus "off-pump" is superior regarding development of inflammation in cardiac surgical patients

Results

In spite of nowadays generally accepted hypothesis that "on-pump" surgery is associated with more profound inflammatory response we did not find any statistically significant differences between "on-pump" and "off-pump" cardiac patients in majority of cell-mediated parameters tested. We only found significantly higher expression of scavenger CD163 receptor and activation molecule CD38 on monocytes in "on-pump" patients compared to "off-pump" patients on the 1st postoperative day. There were no significant differences in the expression of pattern recognition receptors TLR-2 and TLR-4, CD64 high affinity receptor for IgG (FcγRI), and activated form of integrin β₂ chain CD18 recognized MEM-148 monoclonal antibody between "on-pump" and "off-pump" patients.

In the case of humoral immune parameters the significant differences between "on-pump" and "off-pump" surgery were much more frequent. Such differences were found for the levels of IL-6, IL-10 interleukins, long pentraxin PTX3 and Hsp70 stress proteins, respectively. We found significantly higher concentration of these parameters at the finishing of surgery. As original finding it could be recognized the fact that the IL-6 concentration is significantly higher in "on-pump" patients, whereas there is a total switch in IL-6 level at the 1st postoperative day being significantly higher in "off-pump" patients.

Conclusion

Our results documenting the differences between "on-pump" and "off-pump" patients have not been equivocally interpreted. It could be summarized with some limitations the dynamics of an antiinflammatory (homeostatic) IL-10 is copying the dynamics of proinflammatory IL-6 cytokine or is preceding IL-6 production. It could be implicated from our results that the role of IL-13 seems to be neglected in cardiac surgery. Based on the lack of correlation between the levels

of sCD14 and LBP and IL-6, C-reactive protein and long pentraxin PTX3 concentration the former parameters are not produced as acute phase proteins in cardiac surgery. It could be delineated from our results that it is necessary to follow the dynamics of humoral parameters rather than single point measurement.

We found significant changes of both humoral and cellular parameters of the immune system which are different regarding timing and different surgical approaches. It could be implicated from our findings that different cardiac surgical strategies are responsible for different inflammatory responses during surgery and in the postoperative period.

Detailed knowledge of changes of both qualitative and quantitative parameters of the inflammatory response induced by cardiac surgical operation and their careful correlations with perioperative and postoperative clinical parameters could ultimate into the identification of the specific markers with a strong predictive value to identify the development of the deregulated harmful inflammatory response associated with the poor outcome of patients.

These markers in combination with the knowledge of genetically determined factor influencing the characteristics of the inflammatory response (e.g. TLR polymorphism) could be useful in the selection of the best individual cardiac surgery approach with the minimum of adverse effects for the patients.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Šponar J., Vitovec J.: Ischemická choroba srdeční, Grada, 2003 (online www.zdravcentra.cz)
2. Krejsek J., Kopecký J.: Klinická imunologie, Nucleus, 2004, s. 681-701.
3. Ross R.: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.*, 1999, 340(2), s. 115-126.
4. Dominik J. Kardiochirurgie. Grada, 1998.
5. Khan N.E., de Souza A., Mister R. et al.: A randomized comparison of off-pump and on-pump multivessel coronary-artery bypass surgery. *N. Engl. J. Med.*, 2004, 350, s. 21-28.
6. Royston D.: The inflammatory response and extracorporeal circulation. *J Cardiothor Vasc Anesth*, 1997, 11(3), s. 341-354.
7. Ascione R., Lloyd C.T., Underwood M.J. et al.: Inflammatory response after coronary revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann. Thorac. Surg.*, 200, 69, s 1198-1204.
8. Rumalla V., Calvano S.E., Spotnitz A.J. et al.: The effects of glucocorticoid therapy on inflammatory response to coronary artery bypass graft surgery. *Arch. Surg.*, 2001, 136, s.1039-1044.
9. Franke A., Lante W., Fackeldey V., et al.: Pro-inflammatory cytokines after different kinds of cardio-thoracic surgical procedures: is what we see what we know? *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2005, 28, s. 569-575.
10. Levy J. H., Tanaka K. A.: Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann. Thorac. Surg.*, 2003, 75, s. 715-720.
11. Kapoor M.Ch., Ramachandran T.R.: Inflammatory response to cardiac surgery and strategies to overcome it. *Ann Card Anaesth*, 2004, 7, s. 113-128.
12. Krejsek J.: Ateroskleróza – důsledek dlouhodobé poškozující zánětové reakce. *Sanquis*, 2007, 49, s.20-22.
13. Hall R.I., Smith M.S., Rocker G.: The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutical and pharmacological considerations. *Anesth Analg*, 1997, 85, s. 766-782.

8. PUBLIKACE UCHAZEČKY

8.1. Původní vědecké práce přímo se vztahující k tématu dizertační práce

KUDLOVÁ M., KOLÁČKOVÁ M., KUNEŠ P., ANDRÝS C., JANKOVIČOVÁ K., MANĎÁK J., LONSKÝ V., KREJSEK J. Kardiochirurgická operace a její vliv na sérovou hladinu protizánětlivého cytokinu IL-10. Čas. Lék. Čes. 2007, 146(1): 48-55.

KUDLOVÁ M., KOLÁČKOVÁ M., KUNEŠ P., LONSKÝ P., MANĎÁK J., ANDRÝS C., KREJSEK J.: Expression of an activated form of integrin β_2 chain CD18 in cardiac surgical operations. Acta Medica (Hradec Králové) 2007, 50(3): 187-193.

KUDLOVÁ M., KUNEŠ P., KOLÁČKOVÁ M., LONSKÝ V., MANĎÁK J., ANDRÝS C., JANKOVIČOVÁ K., KREJSEK J.: Lipopolysaccharide binding protein and sCD14 are not produced as acute phase proteins in cardiac surgery. Mediators of Inflammation 2007 (přijato do tisku) IF=0,819

KUNEŠ P., LONSKÝ V., MANĎÁK J., BRŤKO M., KOLÁČKOVÁ M., ANDRÝS C., KUDLOVÁ M., KREJSEK J.: The long pentraxin PTX3 in cardiac surgery: distinct responses in „on-pump“ and „off-pump“ patients. Essential PTX3 biology (not only) for cardiac surgeons. Scand Cardiovasc J. 2007, 41(3), 171-179. IF=1,037

KUNEŠ P., LONSKÝ V., MANĎÁK J., BRŤKO M., KOLÁČKOVÁ M., ANDRÝS C., KUDLOVÁ M., KREJSEK J.: Essential PTX3 biology (not only) for cardiologists and cardiac surgeons. Acta Medica (Hradec Králové) 2007, 50(1): 29-33.

JANKOVIČOVÁ K., KUDLOVÁ M., KOLÁČKOVÁ M., KUNEŠ P., ANDRÝS C., MANĎÁK J., LONSKÝ V., KREJSEK J.: Stresové proteiny Hsp60 a Hsp70 u kardiochirurgických pacientů. Core et Vasa 2007, 49(10): 356-361.

KOLÁČKOVÁ M., KUDLOVÁ M., KUNEŠ P., LONSKÝ V., MANĎÁK J., ANDRÝS C., JANKOVIČOVÁ K., KREJSEK J.: Early expression of Fc γ RI (CD64) on monocytes of cardiac surgical patients and higher density of monocyte antiinflammatory scavenger CD163 receptor in „on-pump“ patients. Mediators of Inflammation 2007 (přijato do tisku) IF=0,819

8.2. Další vědecké práce ve vědeckých časopisech

KREJSEK J., KUDLOVÁ M., KOLÁČKOVÁ M.: Imunitní systém a stárnutí. Čes Ger Rev 2005, 3(4), 39-45.

KREJSEK J., KUNEŠ P., ANDRÝS C., HOLICKÁ M., NOVOSAD J., KUDLOVÁ M., KOLÁČKOVÁ M.: Přirozená imunita, receptory pro exogenní a endogenní nebezpečné vzory v imunopatogenezi aterosklerózy I. část: Přirozená imunita, rozlišení signálů nebezpečí. Čas Lék Čes. 2005, 144, 785-789.

KREJSEK J., KUNEŠ P., ANDRÝS C., HOLICKÁ M., NOVOSAD J., KUDLOVÁ M., KOLÁČKOVÁ M.: Přirozená imunita, receptory pro exogenní a endogenní nebezpečné vzory v imunopatogenezi aterosklerózy II. část: Receptory TLR, význam polymorfizmu receptorů pro nebezpečné vzory. Čas Lék Čes. 2005, 144, 790-794.

NOVOSAD J., KUDLOVÁ M., LOUDOVÁ M., HOLICKÁ M., KREJSEK J.: Funkční model aktivace a infekce makrofágů in vitro. Alergie 2006, 3: 249-253.

8.3. Abstrakta

KREJSEK J., HOLICKÁ M., NOVOSAD J., LOUDOVÁ M., KUDLOVÁ M., ANDRÝS C.: Influence of Simultaneous Stimulation by Lps and Interferon Gamma and *Francisella tularensis* Infection on Production of IL-6, IL-10, IL-12 and TNFalfa by Macrophage J774 Cells. In *3rd International Conference on Innate Immunity*, Crete, Greece, 2004.

ČERVINKA M., KREJSEK J., RUDOLF E., ANDĚLOVÁ H., HOLICKÁ M., NOVOSAD J., LOUDOVÁ M., KUDLOVÁ M.: Proteome centre for the study of intracellular parasitism. In *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2005, 48(2), s. 102.

KREJSEK J., KUDLOVÁ M., KOLÁČKOVÁ M.: Přirozená imunita, identifikace nebezpečných vzorů a rozvoj zánětové odpovědi. In *Biolab 2006*, Česká společnost klinické biochemie, Praha, 2006, s. 25-26.

KREJSEK J., KOLÁČKOVÁ M., KUDLOVÁ M., KUNEŠ P., MANDÁK J., ANDRÝS C.: TLR-2 and TLR-4 expression in patients undergoing cardiac surgery. In *4th International Innate Immunity Conference*, Corfu, Greece, 2006, vol. 23, s. 144.

KUDLOVÁ M., HOLICKÁ M., NOVOSAD J., KREJSEK J.: In vitro infekce myši monocytomakrofágové linie J774.2 patogenní bakterií *F. tularensis* LVS a její experimentální ovlivnění ve smyslu efektivní eliminace infekce. In *Alergie*, 2006, 8, suppl.2, s. 12.

KOLÁČKOVÁ M., KUDLOVÁ M., ANDRÝS C., KUNEŠ P., KREJSEK J.: Vliv kardiochirurgického zákroku na zvýšení hladin cytokinů v séru. In *Alergie*, 2006, 8, suppl.2, s. 92-93.

VOKURKOVÁ D., KUDLOVÁ M., SMOLEJ L., BORSKÁ L., PUDIL R., BLÁHA M., FILIP S., HAMÁKOVÁ K., ŘEHÁČEK V., FIALA Z., VOJÁČEK J.: Sledování cirkulujících endotelových mikropartikul v periferní krvi jako marker aktivního onemocnění. In *Alergie*, 2006, 8, suppl.2, s. 103-104.

KUNEŠ P., KUDLOVÁ M., KOLÁČKOVÁ M., LONSKÝ V., MANDÁK J., ANDRÝS C., JANKOVIČOVÁ K., KREJSEK J.: Kardiochirurgické operace jako model pro studium zánětové odpovědi. In *XI. vědecká konference*, Lékařská fakulta UK v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové, 2007.

KUDLOVÁ M., KOLÁČKOVÁ M., KUNEŠ P., LONSKÝ V., MANDÁK J., ANDRÝS C., JANKOVIČOVÁ K., KREJSEK J.: The long pentraxin PTX in cardiac surgery: distinct response in "on-pump" and "off-pump" patients. In *2nd International Conference on Crossroads between Innate and Adaptive Immunity*, Crete, Greece, 2007, Vol. 31, s.78.

KREJSEK J., KUNEŠ P., KOLÁČKOVÁ M., KUDLOVÁ M.: The number of Toll-like receptor 2 and 4 expressing immune cells is changed during cardiac surgical operation (poster a abstrakt). In *2nd International Conference on Crossroads between Innate and Adaptive Immunity*, Crete, Greece, 2007, Vol. 31, s.76.

KOLÁČKOVÁ M., KUDLOVÁ M., KUNEŠ P., LONSKÝ V., MANDÁK J., ANDRÝS C., JANKOVIČOVÁ K., KREJSEK J.: Changes in expression of CD64 and CD163 in cardiac surgical patients (poster a abstrakt). In *2nd International Conference on Crossroads between Innate and Adaptive Immunity*, Crete, Greece, 2007, Vol. 31, s.79-80.

KOLÁČKOVÁ M., KUDLOVÁ M., ANDRÝS C., KUNEŠ P., LONSKÝ V., KREJSEK J.: The impact of interleukin-10 on CD38 expression in cardiac surgical patients. In *International Conference Analytical cytometry IV*, Bruo, 2007.

8.4. Přednášky

KUDLOVÁ M., HOLICKÁ M., NOVOSAD J., KREJSEK J.: In vitro interakce *Francisella tularensis* LVS s buňkami monocyto-makrofágové linie J774.2 (přednáška). Výroční zasedání Ústavu molekulární patologie FVZ UO Hradec Králové, Malá Úpa, 2.-3.12.2004.

NOVOSAD J., LOUDOVA M., HOLICKÁ M., KUDLOVÁ M.: Průtokově cytometrická analýza molekulární patogeneze infekce *F. tularensis* (přednáška). Výroční zasedání Ústavu molekulární patologie FVZ UO Hradec Králové, Malá Úpa, 2.-3.12.2004.

KUDLOVÁ M., HOLICKÁ M., NOVOSAD J., KREJSEK J.: The impact of stimulation and *Francisella tularensis* LVS infection on in vitro production of Fas and FasL by murine macrophage-like cell line J774.2 (přednáška). Mezinárodní konference Discussion Forum 2005: Host-Pathogen Interaction, Valtice, 25.-28.4.2005.

KUDLOVÁ M., HOLICKÁ M., NOVOSAD J., KREJSEK J.: Phenotype profile of murine macrophage-like cell line J774.2 after stimulation by LPS derived from *E.coli* and *F. tularensis* LVS (přednáška). Mezinárodní konference Discussion Forum 2006: Host-pathogen interaction, Hradec Králové, 2.-5.5.2006

NOVOSAD J., KUDLOVÁ M., LOUDOVA M., HOLICKÁ M., KREJSEK J.: Funkční model aktivace a infekce makrofágů in vitro (přednáška). XI. Rožnovské alergo-imunologické dny, 19.-20.5.2006

KUDLOVÁ M., KOLÁČKOVÁ M., KUNEŠ P., MANDÁK J., KREJSEK J.: The influence of cardiac surgery on the serum level of anti-inflammatory cytokin IL-10 (přednáška). Fakultní konference studentů doktorského studia, LF HK, 24.10.2006.

KUDLOVÁ M., KOLÁČKOVÁ M., KUNEŠ P., ANDRÝS C., KREJSEK J.: Kardiochirurgická operace – dynamika produkce cytokinů (přednáška). Seminář Cytokiny a jiné signální molekuly 2007 - Biotechnika 2007, IKEM, 10.5.2007.