

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**



**Zánětová odpověď indukovaná kardiochirurgickou operací  
v mimotělním oběhu; vliv metylprednisolonu v náplni oběhu**

**Martina Koláčková**

**Autoreferát disertační práce**

**Doktorský studijní program Lékařská imunologie**

**Hradec Králové**

**2014**

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Lékařské imunologie na Ústavu klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Martina Koláčková  
Ústav klinické imunologie a alergologie,  
Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové  
a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel: Prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.  
Ústav klinické imunologie a alergologie,  
Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové  
a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Oponenti: jména se všemi tituly včetně uvedení pracoviště

*Prostor pro doplnění místa konání a termínu obhajoby (4-6 cm k následujícímu textu) – doplní student po stanovení místa a termínu konání – před tiskem finálního počtu výtisků pro rozeslání.*

Tato práce vznikla za podpory grantů MZČR NR/9090-4, MŠMT MSM0021620812 a programu PRVOUK

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.  
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu Lékařská imunologie

# 1 OBSAH

1	OBSAH.....	3
2	SOUHRN.....	5
3	SUMMARY.....	6
4	ÚVOD.....	7
4.1	CD163, vychytávací receptor pro haptoglobin-hemoglobin (Hp-Hb).....	8
4.2	FcγRI (CD64), vysoce afinní receptor 1 pro Fc fragment IgG.....	8
4.3	Toll-like receptor 2 (TLR2) a Toll-like receptor 4 (TLR4).....	8
4.4	Fas (CD95).....	9
4.5	Interleukin-10 (IL-10).....	9
4.6	Interleukin-6 (IL-6).....	10
5	CÍLE.....	11
6	METODY.....	12
6.1	Pacienti.....	12
6.2	Operace s mimotělním oběhem.....	12
6.3	Analýza vzorků.....	13
6.4	Statistické hodnocení.....	13
7	VÝSLEDKY.....	14
7.1	Detekované parametry.....	14
7.2	Počet leukocytů.....	14
7.3	Procento monocytů a granulocytů.....	14
7.4	Povrchová exprese proteinů.....	15
7.4.1	Exprese CD163.....	15
7.4.1.1	<i>Exprese CD163 na monocytech (Leuko64 kit)</i> .....	15
7.4.2	Exprese FcγRI (CD64).....	15
7.4.2.1	<i>Exprese FcγRI na monocytech (Leuko64 kit)</i> .....	15
7.4.2.2	<i>Exprese FcγRI na granulocytech (Leuko64 kit)</i> .....	16
7.4.3	Exprese TLR2 (CD282).....	16
7.4.3.1	<i>Exprese TLR2 na monocytech</i> .....	16
7.4.3.2	<i>Exprese TLR2 na granulocytech</i> .....	17
7.4.4	Exprese TLR4 (CD284).....	17
7.4.4.1	<i>Exprese TLR4 na monocytech</i> .....	17
7.4.4.2	<i>Exprese TLR4 na granulocytech</i> .....	17
7.4.5	Exprese Fas (CD95).....	18
7.4.5.1	<i>Exprese Fas na monocytech</i> .....	18
7.4.5.2	<i>Exprese Fas na granulocytech</i> .....	18
7.5	Sérové parametry.....	19
7.5.1	Interleukin-10.....	19
7.5.2	Interleukin-6.....	19
7.6	Klinická data.....	20
7.7	Vztah parametrů k pre- a pooperačním charakteristikám skupin.....	20
7.7.1	Hodnoty CD163 a IL-10 u pacientů se selháním orgánů.....	20
7.7.2	Hodnoty CD163 a IL-10 u pacientů s diabetes mellitus.....	21
8	DISKUZE.....	24
8.1	Počet leukocytů.....	24

8.2	Procento monocytů .....	24
8.3	Procento granulocytů .....	24
8.4	Povrchová exprese proteinů .....	25
8.4.1	Expresa CD163 .....	25
8.4.1.1	<i>Expresa CD163 na monocytech .....</i>	25
8.4.2	Expresa FcγRI (CD64) .....	25
8.4.2.1	<i>Expresa FcγRI na monocytech .....</i>	25
8.4.2.2	<i>Expresa FcγRI na granulocytech .....</i>	25
8.4.3	Expresa TLR2 (CD282) .....	26
8.4.3.1	<i>Expresa TLR2 na monocytech .....</i>	26
8.4.3.2	<i>Expresa TLR2 na granulocytech .....</i>	26
8.4.4	Expresa TLR4 (CD284) .....	26
8.4.4.1	<i>Expresa TLR4 na monocytech .....</i>	26
8.4.4.2	<i>Expresa TLR4 na granulocytech .....</i>	26
8.4.5	Expresa Fas (CD95) .....	27
8.4.5.1	<i>Expresa Fas na monocytech .....</i>	27
8.4.5.2	<i>Expresa Fas na granulocytech .....</i>	27
8.5	Sérové parametry .....	27
8.5.1	Interleukin-10 .....	27
8.5.2	Interleukin-6 .....	28
9	ZÁVĚR .....	29
10	POUŽITÁ LITERATURA .....	30
11	PŘEHLED PUBLIKAČNÍ AKTIVITY .....	34
11.1	Původní články .....	34
11.2	Přehledové články .....	36
11.3	Odborné přednášky a postery .....	37

## 2 SOUHRN

Ischemická choroba srdeční (ICHS) postihuje většinu osob starších 60 let a stává se tak nejpravděpodobnější příčinou úmrtí v této věkové kategorii obyvatelstva. Revaskularizace srdečních tepen pomocí arteriálních nebo venózních štěpů (CABG) představuje standardní léčebnou metodu ICHS. Chirurgická revaskularizace je nejčastěji prováděna s použitím mimotělního oběhu, kdy přístup k srdci bývá zajištěn střední sternotomií. Přestože tento typ zákroku silně aktivuje jak humorální, tak buněčné složky imunitního systému, jen u malého procenta pacientů se objevují závažné pooperační komplikace, jako orgánové selhání, dehiscence rány, sepse.

Tato dizertační práce se věnuje změnám vybraných buněčných a sérových parametrů v důsledku kardiochirurgické operace. Jedná se o retrospektivní studii srovnávající imunitní odpověď u dvou skupin pacientů operovaných stejnými operačními týmy podobnou operační technikou, kdy rozdíl spočíval v použití a nepoužití 500 mg metylprednisolonu (MP) v primární náplni mimotělního oběhu.

Pacientům byly odebírány krevní vzorky před operací, po ukončení mimotělního oběhu, po ukončení operace, první, třetí a sedmý pooperační den. V krevních vzorcích byly sledovány početní změny leukocytů i změny procentuálního zastoupení myeloidní populace – monocytů a granulocytů. U těchto typů buněk byla pomocí průtokové cytometrie stanovena povrchová exprese proteinů: vychytávacího receptoru pro komplex haptoglobinu s hemoglobinem (CD163), vysoce afinního receptoru Ia pro Fc fragment IgG (FcγRI), Fas receptoru (Fas), Toll-like receptoru 2 a 4 (TLR2 a TLR4). Koncentrace solubilních parametrů, IL-10 a IL-6, byla měřena metodou ELISA.

Operace s mimotělním oběhem je provázána celkovým nárůstem počtu leukocytů, kde výrazný podíl na zvýšení mají granulocyty. V průběhu operace, po operaci a první pooperační den jsou ve velké míře produkovány protizáněťové složky reprezentované IL-10 a CD163. Přitom metylprednisolon má stimulační vliv na jejich další produkci. Navíc ve skupině s MP nejvyšší hodnoty IL-10 a CD163 vykazují pacienti s pooperačním selháváním orgánů. Extrémně zvýšené hodnoty CD163 se pak vyskytují u dvou septických pacientů v obou skupinách. To, že v průběhu operace převládá protizáněťová odpověď, popř. je potlačena odpověď buněk imunitního systému, dokládá i odštěpování receptorů typicky spojených se zánětem – TLR2 a TLR4. Exprese těchto receptorů stoupá v pooperačním období, podobně jako produkce IL-6, který je ve zvýšeném množství přítomen v séru pacientů, kde nebyl použit metylprednisolon.

Prekvapivě metylprednisolon neovlivňuje expresi FcγRI na granulocytech. Naopak metylprednisolon indukuje expresi receptoru Fas, který je spjatý s apoptózou buněk.

Použití metylprednisolonu zasahuje do regulačních mechanismů záněťové odpovědi kardiochirurgických pacientů a projevuje se zvýšením převážně protizáněťových složek. Přesto jeho použití pravděpodobně nevede k vyššímu či nižšímu výskytu pooperačních komplikací.

### 3 SUMMARY

#### **Inflammatory response induced by cardiac surgery with the use of cardiopulmonary bypass; the impact of methylprednisolone**

Most elderly people aged over 60 suffer from coronary artery disease (CAD), which can become very likely cause of death. Coronary artery bypass grafting (CABG) represents the standard way of treatment for CAD. CABG surgery is traditionally performed on an arrested heart with the use of cardiopulmonary bypass. The heart is usually accessed through a median sternotomy. Although this kind of surgery strongly stimulates both humoral and cell-mediated immunity, inflammatory response is self-terminating and only a small percentage of patients develop serious postoperative complications, such as organ failure, wound dehiscence, and sepsis.

This work focuses on regulatory mechanisms controlling inflammatory response in cardiac surgical patients. It is a retrospective study that follows changes of humoral and cell-mediated immunity induced by cardiac surgery in two different groups of patients. Both groups were operated with the same surgical approach, when identical devices and types of equipment were used; the only difference was the content of 500 mg of methylprednisolone (MP) in priming solution of cardiopulmonary bypass.

Blood samples were collected before surgery, after weaning from cardiopulmonary bypass, at the end of surgery, on the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup>, and 7<sup>th</sup> postoperative day. Changes in number of leukocytes and percentages of myeloid populations (monocytes and granulocytes) were statistically evaluated. Expression of cell-surface molecules in these populations was measured using flow cytometry. Analyzed molecules included scavenger receptor for haptoglobin-hemoglobin (CD163), high affinity receptor Ia for Fc fragment IgG (FcγRI), Fas receptor (Fas), and Toll-like receptor 2 and 4 (TLR2 and TLR4). Concentration of interleukins IL-10 and IL-6 was quantified by ELISA.

The surgery with cardiopulmonary bypass was followed by an increase in number of leukocytes, of which granulocytes represented prevailing population.

A large quantity of anti-inflammatory molecules IL-10 and CD163 was produced during surgery, after surgery, and on the 1<sup>st</sup> postoperative day. Moreover, methylprednisolone stimulated over-production of IL-10 and CD163. Patients with organ failure showed very high values of CD163, but the highest values were measured in septic patients.

A shedding of membrane receptors TLR2 and TLR4, which signaling is connected to proinflammatory response, was another indication that mostly anti-inflammatory mechanisms took part during surgery. Expression of these receptors was increased in postoperative period, similarly to IL-6, which serum level was more elevated in patients without MP than in patients with MP.

Surprisingly, methylprednisolone did not affect FcγRI expression on granulocytes. On the contrary, methylprednisolone induced expression of Fas.

Methylprednisolone impacts regulatory mechanisms of the inflammatory response of cardiac surgical patients. In spite of this fact, methylprednisolone is unlikely to decrease or increase frequency of postoperative complications.

## 4 ÚVOD

Ateroskleróza postihující koronární cévy vede k nepoměru mezi krevním zásobením a spotřebou kyslíku myokardem. Projevem aterosklerotického onemocnění věnčitých tepen je tak ischemická choroba srdeční, která se jednak stále umisťuje na vedoucí příčku úmrtí, a dále je i příčinou invalidity v produktivním věku. Jednou z možností léčby ischemické choroby srdeční je revaskularizace pomocí tepenných štěpů (*arteria radialis*, *arteria gastroepiploica dextra*), nebo přemostění s použitím *vena saphena magna* nebo *parva* anebo *arteria mammaria interna*. Přestože při revaskularizaci koronárních tepen (CABG) může chirurg volit i operaci na bijícím srdci, operace prováděné s mimotělním oběhem (kardiopulmonálním bypasseem) stále představují zlatý standard.

Mimotělní oběh zajišťuje fyziologickou podporu tím, že nahrazuje funkci srdce a plic a tak umožňuje provádění chirurgických zásahů v nehybném bezkrevném poli. Během chirurgického zákroku dochází ke změnám v endokrinním, nervovém a imunitním systému. Tyto změny jsou do velké míry spojeny s narušením různých typů tkání. V případech kardiochirurgické operace prováděné s mimotělním oběhem je přístup k srdci nejčastěji zajištěn středními sternotomií. Kromě epiteliální tkáně, svalové tkáně a endotelu, je u takové operace poškozena i kostní tkáň. Tato poškození vedou k silné aktivaci kaogulačního a fibrinolytického systému.

Vzhledem k narušení antitrombotického prostředí udržovaného endotelem je během operačního výkonu důležitá snaha o navození rovnováhy mezi krvácením a srážením. Přestože krvácení je závažný stav, tvorba trombů je obtížně léčitelná a mnohem nebezpečnější, může vést např. mozkové mrtvici či ledvinovému infarktu. Při operacích je k navození antitrombotického stavu využíváno heparinu, jehož účinek je v závěru zákroku antagonistován podáním protamin sulfátu. Průtok krve a tedy krevní zásobení orgánů je však ovlivněno ještě dalšími faktory. Kardiochirurgická operace indukuje endoteliální dysfunkci. Látky jako oxid dusnatý (NO), eikosanoidy a angiotensin mají vliv na tonus buněk hladké svaloviny v cévní stěně a jejich produkce určuje rovnováhu mezi vazodilatací a vazokonstrikcí. Při hemolýze provádějí operaci může ale nastat vazbou na volný hemoglobin vyčerpání přítomného NO (1-3).

Použití mimotělního oběhu, kde krevní elementy přicházejí do přímého styku se vzduchem, stejně jako s nehemokompatibilním povrchem zařízení, zesiluje odpověď imunitního systému. Další faktory, jako je použití kardiotoického sání, hemodiluce, hemolýza, nepulsatilní tok krve, endotoxemie a časová náročnost operací, přispívají k výskytu komplikací spojených s operací. Není překvapující, že zákrok bývá ve většině případů doprovázen systémovou zánětovou odpovědí (SIRS), která samovolně odezní bez vnějšího zásahu. Tato odpověď je charakteristická zvýšením C-reaktivního proteinu v séru, které je možné detekovat téměř u všech pacientů po kardiochirurgické operaci. U některých nemocných však zánětová odpověď může progredovat až k selhávání jednoho nebo více orgánů. Navzdory rozsahu kardiochirurgického zákroku s použitím mimotělního oběhu jsou operační a pooperační komplikace jen přechodné a úmrtnost v souvislosti se zákrokem je relativně nízká (4).

V průběhu imunitní odpovědi se u kardiochirurgických pacientů uplatňují jak prozánětové, tak protizánětové mechanismy.

#### 4.1 CD163, vychytávací receptor pro haptoglobin-hemoglobin (Hp-Hb)

CD163 patří do nadrodiny „cystein-rich“ scavenger receptorů (SRCR). Exprese CD163 je vysoká na makrofázích, v játrech a slezině v oblasti červené pulpy; v těchto místech končí většina komplexů Hb-Hp. Důležitými vychytávacími buňkami jsou ale i monocyty a jejich role je zřejmá při tkáňovém krvácení, kdy by jinak docházelo k výraznému poškození v důsledku přítomnosti volného hemoglobinu (5). Po vazbě Hb-Hp na CD163 je komplex internalizován, přičemž rychlost ostraňování Hb-Hp z plazmy je úměrná množství exprimovaného povrchového receptoru (6). Zvýšení exprese CD163 účinkem glukokortikoidů vede i ke zvýšení internalizovaného Hb-Hp. Recyklace hemu se účastní transportní protein HCP-1, který celý komplex směřuje do ER (7). Účinkem HO-1 dochází k degradaci hemoglobinu na biliverdin, oxid uhelnatý a železnatý kation (8). Receptor CD163 je recyklován. Bazální exprese CD163 na monocyttech je zvýšená v pozdní fázi zánětu a je spojená s uvolňováním protizáněťových produktů a ukončováním záněťové odpovědi (9).

LPS, resp. stimulace TLR4 je následována odštěpováním povrchového CD163 a tedy snížením exprese. Hladina solubilního CD163 (sCD163) pak negativně koreluje s povrchovou expresí CD163 na monocyttech. sCD163 je schopen vazby na Hb-Hp. Hodnoty solubilního CD163 jsou zvýšeny u obézních lidí a diabetiků (10).

#### 4.2 FcγRI (CD64), vysoce afinní receptor 1 pro Fc fragment IgG

FcγRI je silně glykosylovanou molekulou, která váže monomerní IgG1, IgG3 a IgG4. Za vazbu na receptor odpovídá pouze těžký řetězec v Fc části protilátkové molekuly (11). Stimulace TLR pozitivně ovlivňuje jak cytotoxicitu, tak fagocytózu zprostředkovanou FcγRI (12). C-reaktivní protein je dalším ligandem FcγRI.

Konstitutivně je FcγRI exprimován na buňkách monocyto-makrofágové linie, kde jeho exprese je zvýšená podáním IFN-γ a při diferenciaci monocytů (13, 14). IL-10 rovněž zvyšuje expresi FcRI na monocyttech, zatímco u neutrofilů podobný efekt nemá (14, 15). Za podmínek, kdy neprobíhá zánět, je bazální exprese FcγRI na neutrofilech velmi nízká. Inducibilní FcγRI se vyskytuje na neutrofilech po stimulaci IFN-γ a G-CSF, které prodlužují životnost neutrofilů a udržují je ve funkčně aktivním stavu (16). Efekt IFN-γ a G-CSF na zvýšení exprese FcγRI byl pozorován *in vitro* i *in vivo* (17-20). Naopak, kortikosteroidy mají inhibiční vliv jak na expresi receptoru, tak na indukci fagocytózy a cytotoxicity (17).

FcγRI je exprimován na endoteliálních buňkách (21). CRP je pak těmito buňkami internalizován (21). Výsledkem aktivace endoteliálních buněk je produkce IL-8, MCP-1, sekrece ICAM-1, VCAM-1 a LOX-1, tzn. molekul, které se účastní chemotaxe a adheze buněk (21, 22).

#### 4.3 Toll-like receptor 2 (TLR2) a Toll-like receptor 4 (TLR4)

TLR mají nezastupitelnou úlohu v odpovědi vrozené imunity na mikrobiální podnět. Ochrana funkce předurčila lokalizaci TLR, které jsou umístěny jak na cytoplazmatické membráně, tak endosomálních strukturách v cytoplazmě.

Toll-like receptory (TLR) patří do skupiny „pattern recognition“ receptorů, PRR. Rozpoznávají komplementární struktury „pathogen-associated molecular patterns“



(PAMP) jsou evolučně konzervované mikrobiální vzory vlastní jakýmkoliv mikroorganismům a virům (23). PRR pravděpodobně rozpoznávají také endogenní molekuly charakteristické pro hostitele. Tyto molekuly jsou zpravidla uvolňovány při setkání s mikroorganismy a slouží jako zesílené signály nebezpečí/poškození (DAMP)(24). PRR obvykle spouštějí signální dráhy vedoucí k protivirové a protimikrobiální odpovědi. TLR jsou exprimovány na rozmanitých buňkách, exprese se může lišit i v rámci různých subpopulací. TLR2 a TLR4 jsou exprimovány jak na monocytech, tak na granulocytech.

Hlavní funkcí TLR je indukce zánětu a aktivace adaptivní imunity. Ve většině případů je podporována diferenciací Th1 populace.

Přítomnost TLR2 a TLR4 průkazně ovlivňuje vznik ischemicko-reperfučního poškození, ke kterému dochází např. při infarktu myokardu, mrtvici, transplantacích nebo kardiokirurgických operacích s použitím mimotělního oběhu. Inhibice signalizace TLR2 a TLR4 vedla ke snížení ischemicko-reperfučního poškození u myšího modelu (25).

#### **4.4 Fas (CD95)**

Apoptóza je základní regulační proces, který má nezastupitelnou úlohu ve vývoji a odpovědi imunitního systému. Jeden z apoptotických mechanismů, které jsou zprostředkovány TNF receptory, zahrnuje interakci Fas-FasL (26). Apoptóza probíhající po aktivaci Fas se projevuje sraštěním buňky, tvorbou měchýřků z plazmatické membrány a fragmentací DNA. Proteiny FasL a Fas mají ústřední roli při udržení homeostázy imunitního systému.

Po vazbě ligandu na Fas dochází v intracelulárním prostoru k zformování komplexu proteinů, „death inducing signaling complex“ (DISC), kde jsou aktivovány kaspázy (27). Výsledkem aktivace apoptotické dráhy je programová smrt buňky bez imunitní odezvy, která by jinak nastala v případě nekrózy. Fas také iniciuje signální dráhy nesouvisějící s apoptózou. Tyto signální dráhy aktivují NF- $\kappa$ B a ERK1/2, které jsou spojeny např. s proliferací T lymfocytů a fibroblastů nebo s regenerací tkáně (28).

Fas existuje v glykosylované i neglykosylované formě a je přítomen na membráně buněk v lipidových raftech i mimo ně. Nachází se volný, ale i v preasociované podobě. Velké množství Fas se nachází v intracelulárním kompartmentu buňky. Transportem Fas umístěného v Golgi aparátu na povrch buňky je umožněna rychlá změna povrchové exprese bez nutnosti transkripce proteinu (29, 30). Fas je na buňkách ubikvitárně přítomný. Samotná exprese Fas je ovlivňována různými faktory. Zvýšená exprese Fas se objevuje na aktivovaných a apoptotických buňkách. Zvýšení exprese Fas je sice nezbytné pro regeneraci tkáně, ale Fas a FasL jsou také spojeny s progresí septického stavu a inhibice signalizace může vést k vyššímu přežití (31).

#### **4.5 Interleukin-10 (IL-10)**

IL-10 je považován za cytokin s antiinflamatorními účinky. Ty jsou zprostředkovány buňkami nesoucími IL-10 receptor. IL-10 inhibuje odpověď buněk na přítomné prozáněťové cytokiny. Takové buňky si stále uchovávají schopnost vyvolávat cytokiny z prostředí a celkově tak utlumí zánět (32).

IL-10 se v podobě homodimeru váže na R1 a R2 podjednotku IL-10 receptoru. R2 je zodpovědná za signalizaci. Výsledkem signalizace je inhibice signálních drah indukovaných např. LPS, IL-6 a TNF- $\alpha$ . IL-10 je schopný pozitivně regulovat vlastní expresi v monocyttech/ makrofágích a amplifikovat tak svou produkci. Expese *il-10* genu u monocytů/ makrofágů a myeloidních dendritických buněk je vyvolána stimulací TLR, hlavně TLR2, 4 (33-35). Nezávislá na TLR je produkce IL-10 po stimulaci NOD2, nebo DC-SIGN anebo dektinu-1 (36-38). TLR indukovaná expese IL-10 je inhibovaná účinkem IFN- $\gamma$ . IL-10 je produkován různými typy buněk, v největším množství pak monocyty, B a T lymfocyty, přičemž jak Th1, tak Th2 a Th17 subpopulace jsou schopné produkce IL-10 (39). IL-10R1 je téměř nedetekovatelná na neutrofilech zdravých lidí, ale inkubací izolovaných neutrofilů s LPS se expese podjednotky IL-10R1 zvyšuje (40). Podobně je expese IL-10R1 zvýšená na neutrofilech septických pacientů.

#### 4.6 Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 je časný prozáněťový cytokin, jenž je produkován celou řadou buněk hematopoetického i nehematopoetického původu. Patří zde monocyty/makrofágy, T lymfocyty, dendritické buňky, LPS stimulované neutrofile, fibroblasty, epiteliální buňky i astrocyty. Promotor *il-6* genu obsahuje místo pro vazbu transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B. K expresi genu proto dochází po stimulaci Toll-like receptorů LPS. *il-6* je exprimován také účinkem IL-1 $\beta$ , IL-2 a TNF- $\alpha$ . IL-6 je zpravidla produkován v akutní fázi zánětu, kdy indukuje v játrech sekreci proteinů akutní fáze jako je např.  $\gamma$ -fibrinogen nebo C-reaktivní protein (CRP).

IL-6 svou funkci vykonává po vazbě na receptorový komplex tvořený IL-6R a gp130. Specifita vazby je dána IL-6R, zatímco gp130 zodpovídá za signální transdukcí. Podjednotka gp130 je běžně exprimovaná na buňkách. Naproti tomu expese IL-6R je mnohem více regulovaná a tato podjednotka se vyskytuje jen na membráně leukocytů a hepatocytů. Nicméně IL-6R je produkován i jako solubilní forma, sIL-6R. Role solubilního receptoru spočívá ve vazbě IL-6 a následné interakci s volným membránovým gp130, který není součástí jiného receptorového komplexu. Proces se označuje jako trans-signalizace a umožňuje aktivaci buněk, které neexprimují IL-6R (41).

Zvýšená sérová hladina IL-6 bývá nalezena v souvislosti se septickým šokem, kardiogenním selháváním, multiorgánovou dysfunkcí i jako následek chirurgického trauma, kdy koncentrace cytokinu koreluje s rozsahem poranění v důsledku zákrku

## 5 CÍLE

Tato práce sledovala dynamiku imunitní odpovědi u kardiochirurgických pacientů operovaných pro ischemickou chorobu srdeční. Jako ukazatel zánětové reakce spojené s chirurgickým zákrokem a použitím mimotělního oběhu byly vybrány jak buněčné, tak solubilní parametry. Úkolem bylo stanovení těchto parametrů v plné krvi i v séru pacientů pomocí průtokové cytometrie a metody ELISA. Dalším cílem bylo porovnat imunitní odpověď u dvou skupin pacientů operovaných s použitím mimotělního oběhu. V prvním případě byl v náplni mimotělního oběhu pacientů použitý metylprednisolon, zatímco v druhé skupině byla náplň bez obsahu metylprednisolonu. Tato práce rovněž vyhodnotila vliv preexistujících klinických faktorů na vybrané ukazatele zánětu a pokusila se zhodnotit vliv zánětové reakce na pooperační komplikace.

## 6 METODY

### 6.1 Pacienti

Do dvou navazujících studiích byli zařazeni pacienti operovaní s mimotělním oběhem za účelem revaskularizace myokardu. První skupina pacientů byla operována v r. 2005 – 2006, druhá v r. 2006 – 2008. V první skupině bylo zahrnuto 20 účastníků, ve druhé skupině 22 účastníků. Skupiny pacientů byly porovnávány retrospektivně. Obě skupiny byly operovány stejným chirurgickým postupem za využití stejných systémů mimotělního oběhu. Anesteziologický postup a pooperační péče se u obou skupin rovněž nelišily. Jedinou změnou v protokolu bylo vyřazení metylprednisolonu z primární náplně u skupiny pacientů operovaných od r. 2006 do r.2008. Všichni pacienti byli informováni o účelu studie, zúčastnili se dobrovolně a svou účast potvrdili podpisem. Studie byly schváleny etickou komisí Fakultní nemocnice, Hradec Králové.

Tabulka I. Demografická a preoperační data

	s metylprednisolonem	bez metylprednisolonu	p
pacienti (n)	20	22	
věk (roky)	68	67	0.17
pohlaví ženy/muži (n)	4/16	5/17	1.00
BMI	28	30	0.12
ejekční frakce (%)	65	62	0.62
<i>diabetes mellitus</i> (n)	6	9	0.46
CHOPN (n)	5	4	0.71
předchozí infarkt myokardu (n)	10	10	0.77
anopyrin (n)	15	21	0.09
ACEI (n)	10	18	0.05
beta blokátory (n)	19	22	0.48
statiny (n)	15	21	0.09

Věk, BMI a ejekční frakce jsou uváděny jako medián, ostatní charakteristiky jsou vyjádřeny počtem pozitivních případů (n). Zkratky: BMI, body mass index; CHOPN, chronická obstrukční plicní nemoc; ACEI, Angiotensin-converting-enzyme inhibitors

### 6.2 Operace s mimotělním oběhem

U obou skupin pacientů bylo srdce zpřístupněno mediální sternotomií. Operace probíhala v celkové normotermii. Při operaci byl jako antikoagulans použitý heparin. Po ukončení mimotělního oběhu byl heparin vyvázáán protaminem sulfátem v poměru 1:1. Během uzavření aorty svorkou bylo srdce chráněno před ischemickým poškozením studenou krevní kardioplegií. Mimotělní oběh se skládal z membránového oxygenátoru s výměníkem tepla, rotační válečkové pumpy, kardiotoického-venózního rezervoáru s polyuretanovou pěnou krytou silikonovým olejem a arteriálním filtrem 40 µm. Hadice mimotělního oběhu byly z PVC bez hemokompatibilního povrchu. Primární náplň mimotělního oběhu obsahovala

krystaloidní a koloidní roztoky. V první skupině pacientů (r. 2005–2006, „s metylprednisolonem“) bylo součástí primární náplně i 500 mg methylprednisolonu.

### **6.3 Analýza vzorků**

Periferní krev byla sbírána při zavedení a ukončení mimotělního oběhu, po ukončení operace, první, třetí a sedmý pooperační den. Heparinizovaná krev byla ihned využita k analýze povrchových znaků pomocí průtokové cytometrie, zatímco krev ve zkumavkách bez heparinu byla koagulována cca 1 h při pokojové teplotě. Sérum bylo odděleno od krevních elementů centrifugací 10 min při 1000 g. Poté byly vzorky séra až do zpracování zamrazeny při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Sérové parametry byly stanoveny metodou ELISA.

### **6.4 Statistické hodnocení**

K zjištění dynamiky měřených parametrů byly jejich hodnoty během operace a po operaci porovnávány s předoperační hodnotou u každé skupiny pacientů. Hodnoty parametrů v odpovídajících odběrech byly rovněž porovnány mezi oběma skupinami pacientů. Testy byly prováděny na 5 % hladině významnosti. Programem použitým pro statistickou analýzu byla Statistica 9.

Všechny hodnoty jsou uvedeny jako mediány, není-li napsáno jinak. Grafy obsahují mediány, kvartily a rozsah neudlehlých hodnot.

## 7 VÝSLEDKY

### 7.1 Detekované parametry

U všech pacientů byl stanoven počet leukocytů a procentuální zastoupení populace monocytů a granulocytů. V obou těchto populacích byla měřena exprese povrchových proteinů: FcγRI, Fas, TLR2 a TLR4. CD163 byl měřen pouze na monocytech, protože není exprimován granulocyty. V séru byla kvantifikována koncentrace IL-10 a IL-6. U pacientů byly zaznamenány operační a pooperační charakteristiky včetně pooperačních komplikací. Hodnoty protizánětlivých markerů IL-10 a CD163 byly vyjádřeny ve vztahu k pooperačnímu selhání orgánů. Hodnoty těchto markerů byly vztaženy také k onemocněním diabetes mellitus, které se s vysokou frekvencí vyskytovalo v obou skupinách pacientů.

### 7.2 Počet leukocytů

Počet leukocytů byl u obou skupin zvýšený, **tabulka 1**.

Při porovnání obou skupin byl první pooperační den u pacientů s metylprednisolonem vyšší počet leukocytů než u pacientů bez metylprednisolonu ( $p < 0,05$ ).

**Tabulka 1:** Počet leukocytů ( $\times 10^9/l$ )

		před op.	po MO	po op.	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q2	70	155	139	173	137	106
	p	-	<0.001	<0.01	<0.001	<0.01	
pacienti bez MP	Q2	67	123	124	124	111	102
	p	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Porovnání počtu leukocytů v šesti odběrových časech u pacientů s metylprednisolonem a bez metylprednisolonu. Hodnoty během operace a po operaci byly vždy porovnány s výchozí (bazální) hodnotou. Statisticky významné změny jsou označeny dosaženou pravděpodobností.

Ve sloupcích je zobrazen medián (Q2) a pravděpodobnost (p), s jakou je výsledek statistického testu signifikantní.

### 7.3 Procento monocytů a granulocytů

Procento monocytů bylo během operace sniženo, první pooperační den vzrostlo nad bazální hodnotu, **tabulka 2**.

Když byly obě skupiny porovnány, procento monocytů bylo významně vyšší třetí pooperační den u pacientů bez metylprednisolonu než u pacientů s metylprednisolonem ( $p < 0,05$ ).

**Tabulka 2:** Procento monocytů

		před op.	po MO	po op.	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q2	5.5%	2.2%	2.5%	6.1%	4.6%	6.4%
	p	-	<0.001	<0.001			
pacienti bez MP	Q2	5.7%	4.2%	4.5%	6.5%	5.9%	6.1%
	p	-	<0.001	<0.01	<0.01		

Porovnání procenta monocytů v rámci skupiny pacientů. Popis viz tabulka 1.

Procento granulocytů bylo zvýšené po celé sledované období, **tabulka 3**.

Při porovnání obou skupin bylo u pacientů s metylprednisolonem zjištěno vyšší procento granulocytů než u pacientů bez metylprednisolonu třetí den po operaci ( $p < 0,01$ ).

**Tabulka 3:** Procento granulocytů

		před op.	po MO	po op.	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q2	53%	71%	79%	84%	78%	63%
	p	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
pacienti bez MP	Q2	55%	74%	79%	79%	69%	59%
	p	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

Porovnání procenta granulocytů v rámci skupiny pacientů. Popis viz tabulka 1.

## 7.4 Povrchová exprese proteinů

### 7.4.1 Exprese CD163

#### 7.4.1.1 Exprese CD163 na monocytech (*Leuko64 kit*)

Expresa CD163 na monocytech byla významně zvýšená a dosahovala maximálních hodnot první pooperační. Naopak během operace a sedmý pooperační den došlo u obou skupin ke statisticky významnému snížení exprese CD163, **tabulka 4**. Rozdíl mezi oběma skupinami pacientů byl pozorován první pooperační den, kdy skupina s metylprednisolonem dosahovala vyšších hodnot exprese než skupina bez metylprednisolonu ( $p < 0,05$ ).

**Tabulka 4:** CD163 na monocytech (indexMFI)

		před op.	po MO	po op.	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q2	10272	5172	4985	40449	12445	6268
	p	-	<0.001	<0.001	<0.001		<0.05
pacienti bez MP	Q2	10138	5929	4979	20995	12140	7083
	p	-	<0.001	<0.001	<0.001		<0.001

Porovnání exprese CD163 na monocytech v rámci skupiny pacientů. Popis viz tabulka 1.

### 7.4.2 Exprese FcγRI (CD64)

#### 7.4.2.1 Exprese FcγRI na monocytech (*Leuko64 kit*)

Expresa FcγRI na monocytech byla významně zvýšená první, třetí pooperační den a sedmý pooperační den u obou skupin pacientů, **tabulka 5**. Při porovnání obou skupin byl mezi oběma skupinami pacientů statisticky významný rozdíl v expresi FcγRI třetí pooperační den ( $p < 0,05$ ). Skupina pacientů bez metylprednisolonu dosahovala třetí pooperační den vyšších hodnot exprese FcγRI na monocytech než skupina s metylprednisolonem.

**Tabulka 5:** Fc $\gamma$ RI na monocytech (indexMFI)

		před op.	po MO	po op.	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q2	8.4	8.7	8.3	11.6	10.5	10.3
	p	-			<0.001	<0.01	<0.05
pacienti bez MP	Q2	7.9	7.9	7.5	11.5	11.9	9.4
	p	-			<0.001	<0.001	<0.05

Porovnání exprese Fc $\gamma$ RI na monocytech v rámci skupiny pacientů. Popis viz tabulka 1.

#### 7.4.2.2 Exprese Fc $\gamma$ RI na granulocytech (Leuko64 kit)

Ke zvýšení exprese Fc $\gamma$ RI na granulocytech došlo již po ukončení mimotělního oběhu a tyto hodnoty zůstaly zvýšené až do třetího pooperačního dne u obou skupin pacientů, **tabulka 6**. Při porovnání obou skupin však nebyl mezi oběma skupinami pacientů statisticky významný rozdíl v expresi Fc $\gamma$ RI na granulocytech.

**Tabulka 6:** Fc $\gamma$ RI na granulocytech (indexMFI)

		před op.	po MO	po op.	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q2	0.79	0.82	0.82	1.02	1.48	0.88
	p	-			<0.001	<0.001	
pacienti bez MP	Q2	0.82	0.89	0.88	0.87	1.33	0.79
	p	-				<0.001	

Porovnání exprese Fc $\gamma$ RI na granulocytech v rámci skupiny pacientů. Popis viz tabulka 1.

### 7.4.3 Exprese TLR2 (CD282)

#### 7.4.3.1 Exprese TLR2 na monocytech

Expres TLR2 na monocytech u obou skupin v průběhu operace klesla, první den, a v případě pacientů bez metylprednisolonu také třetí pooperační den, byla zvýšená, **tabulka 7**.

Při porovnání exprese TLR2 se obě skupiny pacientů lišily po ukončení mimotělního oběhu, třetí a sedmý pooperační den ( $p < 0,05$ ). V uvedené dny skupina s metylprednisolonem dosahovala nižších hodnot.

**Tabulka 7:** TLR2 na monocytech (MFI)

		před op.	po MO	po op.	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q2	32	15	14	64	27	16
	p	-	<0.01	<0.01	<0.05		
pacienti bez MP	Q2	42	26	17	50	53	37
	p	-	<0.001	<0.001			

Porovnání exprese TLR2 na monocytech v rámci skupiny pacientů. Popis viz tabulka 1.



### 7.4.3.2 Exprese TLR2 na granulocytech

U obou skupin došlo ke snížení exprese po ukončení mimotělního oběhu a po ukončení operace, **tabulka 8**. Obě skupiny pacientů dosahovaly maximálních hodnot TLR2 na granulocytech třetí den po operaci.

Expresce TLR2 na granulocytech se mezi oběma skupinami lišily první ( $p < 0,01$ ), třetí i sedmý den ( $p < 0,001$ ). Pacienti bez metylprednisolonu dosáhli vyšších hodnot než pacienti s metylprednisolonem.

**Tabulka 8:** TLR2 na granulocytech (MFI)

		před op.	po MO	po op.	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q2	8	5	5	6	11	8
	p	-	<0.001	<0.001	<0.05		
pacienti bez MP	Q2	14	10	10	13	20	13
	p	-	<0.001	<0.001		<0.001	

Porovnání exprese TLR2 na granulocytech v rámci skupiny pacientů. Popis viz tabulka 1.

### 7.4.4 Exprese TLR4 (CD284)

#### 7.4.4.1 Exprese TLR4 na monocytech

Hodnoty TLR4 na monocytech byly v průběhu operace sníženy, v pooperačním období se zvyšovaly, sedmý den došlo k poklesu, **tabulka 9**.

**Tabulka 9:** TLR4 na monocytech (MFI)

		před op.	po MO	po op.	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q2	5.7	4.1	4.0	12.3	7.1	3.4
	p	-					
pacienti bez MP	Q2	22	16	16	20	27	23
	p	-	<0.001	<0.001		<0.01	

Porovnání exprese TLR4 na monocytech v rámci skupiny pacientů. Popis viz tabulka 1.

#### *Porovnání exprese TLR4 na monocytech mezi skupinami pacientů*

První pooperační den byla neočekávaně vyšší exprese TLR4 na monocytech u pacientů s metylprednisolonem, která se tak lišila od skupiny bez metylprednisolonu ( $p < 0,05$ ).

#### 7.4.4.2 Exprese TLR4 na granulocytech

Stejně jako exprese TLR4 na monocytech, hodnoty TLR4 na granulocytech byly v průběhu operace sníženy, v pooperačním období se zvyšovaly a sedmý den došlo k poklesu, **tabulka 10**.

**Tabulka 10:** TLR4 na granulocytech (MFI)

		před op.	po MO	po op.	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q2	4.0	3.3	3.0	4.4	6.2	4.3
	p	-	<0.001	<0.001			

pacienti bez MP	Q2	13.5	10.0	10.9	12.6	15.9	13.3
	p	-	<0.01			<0.01	

Porovnání exprese TLR4 na granulocytech v rámci skupiny pacientů. Popis viz tabulka 1.

#### *Porovnání exprese TLR4 na granulocytech mezi skupinami pacientů*

Mezi oběma skupinami nebyl statisticky významný rozdíl v žádném odběrovém čase při porovnání exprese TLR4 na granulocytech.

### 7.4.5 Expresse Fas (CD95)

#### **7.4.5.1 Expresse Fas na monocytech**

U pacientů s metylprednisolonem se exprese zvyšovala již po ukončení mimotělního oběhu až do třetího pooperačního dne. U pacientů bez metylprednisolonu došlo ke zvýšení až první pooperační den, **tabulka 11**.

**Tabulka 11:** Fas na monocytech (MFI)

		před op.	po MO	po op.	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q2	61	72	69	88	85	67
	p	-			<0.05		
pacienti bez MP	Q2	17	18	17	18	24	20
	p	-				<0.001	<0.01

Porovnání exprese Fas na monocytech v rámci skupiny pacientů. Popis viz tabulka 1.

#### *Porovnání exprese Fas na monocytech mezi skupinami pacientů*

Skupina pacientů s metylprednisolonem dosahovala první pooperační den vyšších hodnot při porovnání Fas mezi skupinami ( $p < 0,001$ ).

#### **7.4.5.2 Expresse Fas na granulocytech**

U obou skupin pacientů byla exprese Fas na granulocytech zvýšená třetí pooperační den, **tabulka 12**

**Tabulka 12:** Fas na granulocytech (MFI)

		před op.	po MO	po op.	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q2	52	49	46	55	80	68
	p	-				<0.001	
pacienti bez MP	Q2	17	16	16	17	21	17
	p	-	<0.01			<0.001	

Porovnání exprese Fas na granulocytech v rámci skupiny pacientů. Popis viz tabulka 1.

#### *Porovnání exprese Fas na granulocytech mezi skupinami pacientů*

Obě skupiny se lišily sedmý pooperační den, kdy pacienti s metylprednisolonem dosahovali vyšších hodnot Fas na granulocytech ( $p < 0,01$ ).

## 7.5 Sérové parametry

### 7.5.1 Interleukin-10

Hladina IL-10 byla významně zvýšená u obou skupin pacientů po ukončení mimotělního oběhu, po ukončení operace a první pooperační den. Hodnoty IL-10 se mezi oběma skupinami lišily po ukončení operace ( $p < 0,01$ ), první pooperační den ( $p < 0,05$ ) a třetí pooperační den ( $p < 0,05$ ). Největší rozdíly v hodnotách IL-10 byly mezi oběma skupinami pozorovány po ukončení mimotělního oběhu a po ukončení operace, **tabulka 13**.

**Tabulka 13:** IL-10 v séru (pg/ml)

		před op.	po MO	po op.	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q2	2.8	262.8	441.2	19.1	8.5	4.3
	p	-	<0.001	<0.01	<0.001	<0.05	
pacienti bez MP	Q2	1.0	52.7	50.5	7.3	3.0	1.3
	p	-	<0.001	<0.001	<0.001		

Porovnání koncentrace IL-10 v rámci skupiny pacientů. Popis viz tabulka 1.

### 7.5.2 Interleukin-6

Hladina IL-6 byla významně zvýšená u obou skupin pacientů po ukončení mimotělního oběhu, po ukončení operace, první pooperační den a třetí pooperační den, **tabulka 14**. U pacientů s metylprednisolonem bylo nejvyššího zvýšení dosaženo po ukončení operace, u pacientů bez metylprednisolonu pak první pooperační den. Při porovnání obou skupin pacientů se hladina IL-6 lišila ve všech odběrech ( $p < 0,05$ ). Pacienti bez metylprednisolonu dosahovali výrazně vyšších hodnot IL-6 v séru než pacienti s metylprednisolonem. Protože do studie v r. 2006-2008 byli zařazeni pacienti, kteří měli již v počátku významně vyšší hladinu IL-6, byla hodnota IL-6 vyjádřena procentuální změnou (viz Materiál a metody). Tímto byly vyloučeny rozdíly v předoperačním odběru a bylo možné porovnat dynamiku IL-6 mezi skupinami. Srovnání pak ukázalo, že se obě skupiny liší po ukončení operace a první pooperační den, kdy pacienti bez metylprednisolonu dosahují vyšších hodnot než pacienti s metylprednisolonem ( $p < 0,05$ ).

**Tabulka 14:** IL-6 v séru (pg/ml)

		před op.	po MO	po op.	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q2	1	5	7	6	3	2
	p	-	<0.001	<0.001	<0.01	<0.01	
pacienti bez MP	Q2	2	21	96	102	23	7
	p	-	<0.05	<0.001	<0.001	<0.05	

Porovnání koncentrace IL-6 v rámci skupiny pacientů. Popis viz tabulka 1.

## 7.6 Klinická data

**Tabulka 15:** Operační a pooperační charakteristiky

	s MP	bez MP	p
pacienti (n)	20	22	
trvání operace (min)	208	240	0.08
trvání MO (min)	86	98	0.20
trvání klampáže aorty (min)	40	47	0.27
anastomózy (n)	2	3	0.21
sepsy (n)	1	1	1.00
renální nedostatečnost/selhání (n)	1	2	1.00
respirační selhání (n)	2	3	1.00
LCO/AMI (n)	3	5	1.00

Trvání operace, trvání MO, klampáže a počet anastomóz jsou uváděny jako medián, ostatní charakteristiky jsou vyjádřeny počtem pozitivních případů (n). Zkratky: AMI, akutní infarkt myokardu; LCO, nízký minutový srdeční výdej (nebo známky)

## 7.7 Vztah parametrů k pre- a pooperačním charakteristikám skupin

### 7.7.1 Hodnoty CD163 a IL-10 u pacientů se selháním orgánů

**Tabulka 16:** Expres CD163 na monocytech (indexMFI) první pooperační den

CD163 (n)	bez selhání (n)	jeden orgán (n)	dva a více orgánů (n)
pacienti s MP (20)	35354 (16)	31999 (2)	84773 (2)
pacienti bez MP (22)	21831 (16)	15012 (3)	22109 (3)

Obě skupiny pacientů byly rozděleny na základě pooperačního selhávání orgánů. Expres CD163 v každé podskupině je dána mediánovou hodnotou.

**Tabulka 17:** IL-10 v séru (pg/ml) po ukončení mimotělního oběhu

IL-10 (n)	bez selhání (n)	jeden orgán (n)	dva a více orgánů (n)
pacienti s MP (20)	213 (16)	595 (2)	613 (2)
pacienti bez MP (22)	50 (16)	54 (3)	102 (3)

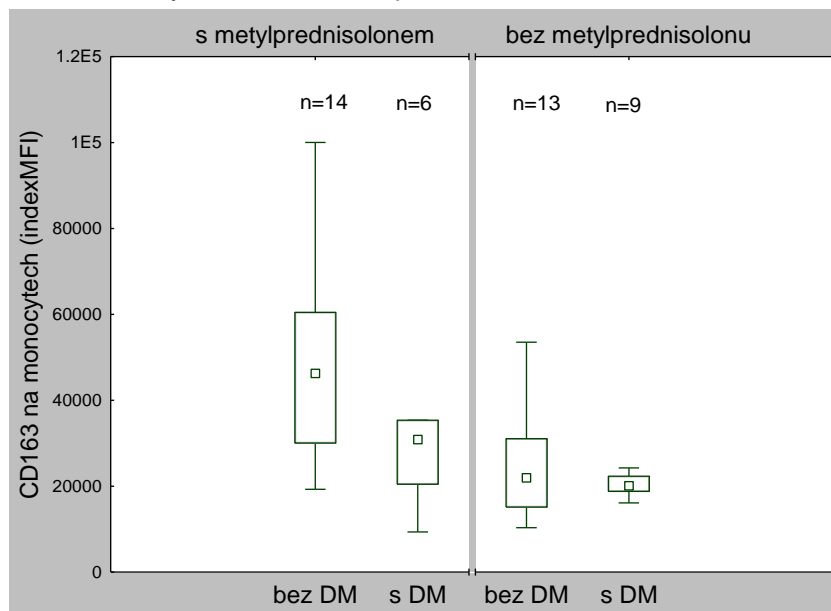
Popis viz tabulka 16. Koncentrace IL-10 v každé podskupině je dána mediánovou hodnotou.

**Tabulka 18:** IL-10 v séru (pg/ml) po ukončení operace

IL-10 (n)	bez selhání (n)	jeden orgán (n)	dva a více orgánů (n)
pacienti s MP (20)	428 (16)	1571 (2)	1154 (2)
pacienti bez MP (22)	30 (16)	49 (3)	163 (3)

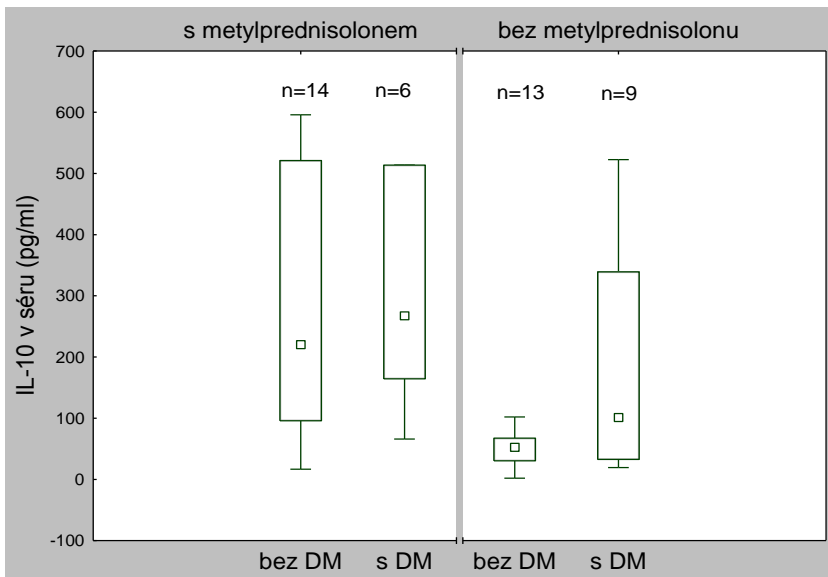
Popis viz tabulka 17.

## 7.7.2 Hodnoty CD163 a IL-10 u pacientů s diabetes mellitus

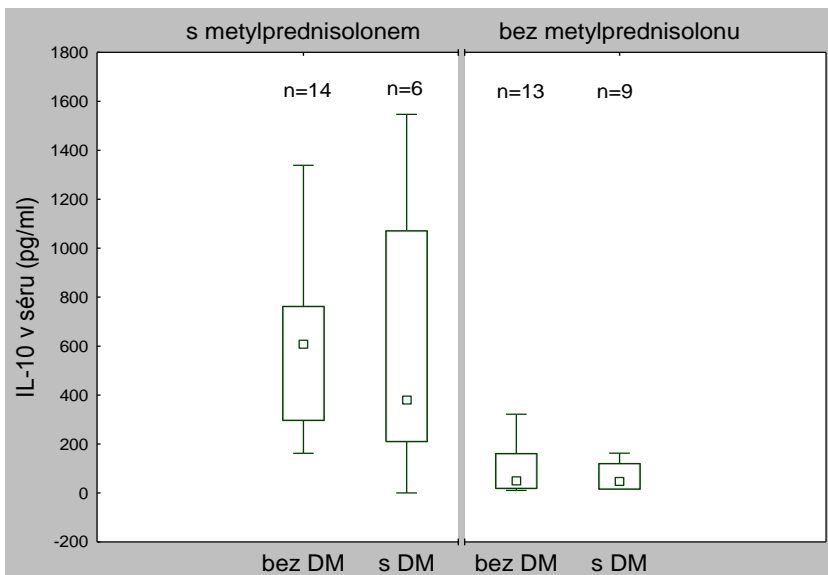


**Graf 1:** Porovnání hodnot CD163 na monocyttech první pooperační den u obou skupin pacientů podle přítomnosti nebo nepřítomnosti onemocnění diabetes mellitus, viz Materiál a metody, tabulka I.

Při použití metylprednisolonu byla pooperační exprese CD163 na monocyttech ovlivněná onemocněním diabetes mellitus. Hodnoty pacientů bez diabetu byly první pooperační den nevýznamně vyšší než u pacientů s diabetem. Vliv diabetu ukazuje i porovnání skupin s metylprednisolonem a bez - zatímco mezi pacienty s diabetem nebyly rozdíly v hodnotách CD163, při porovnání pacientů bez diabetu byla pooperační exprese CD163 významně ovlivněná použitím metylprednisolonu ( $p=0,008$ ), **graf 1**.



**Graf 2:** Porovnání hodnot IL-10 po ukončení mimotělního oběhu u obou skupin pacientů podle přítomnosti nebo nepřítomnosti onemocnění diabetes mellitus, viz Materiál a metody, tabulka I.



**Graf 3:** Porovnání hodnot IL-10 po ukončení operace u obou skupin, viz graf 2.

Při porovnání nediabetických pacientů v obou skupinách (s/bez metylprednisolonu) jsou sérové hodnoty IL-10 po ukončení mimotělního oběhu i po ukončení operace ve skupině s metylprednisolonem zvýšené ( $p < 0,025$  a  $p < 0,001$ ), **graf 2** a **3**. Podobné

zvýšení hladiny IL-10 je pozorováno i po ukončení operace u pacientů s diabetem ve skupině s metylprednisolonem při porovnání s pacienty s diabetem bez metylprednisolonu ( $p < 0,025$ ), **graf 3**. Rozdíly mezi pacienty s diabetem a bez diabetu v jednotlivých skupinách nebyly signifikantní. Počet pacientů s diabetem a bez diabetu je uveden výše v textu.

## 8 DISKUZE

Kardiochirurgická operace prováděná s mimotělním oběhem představuje výrazný podnět pro imunitní systém. Během operace i v pooperačním období jsou produkovány proteiny, které se účastní jak prozáněťové, tak protizáněťové odpovědi. Produkce proteinů je měřitelná a často dosahuje výrazných kvalitativních i kvantitativních změn při porovnání s předoperačními hodnotami.

### 8.1 Počet leukocytů

Změna počtu leukocytů je známkou probíhajícího zánětu. V kardiochirurgických studiích je popsáno, že k nárůstu počtu leukocytů dochází již při reperfuzi (42). Aktivované leukocyty jsou jednak zdrojem cytokinů podílejících se na zánětu a pak při přímém kontaktu stimulují jiné typy buněk. Proto byly mnohé studie věnovány efektu leukocytární deplece během operace s mimotělním oběhem. V našem souboru pacientů bylo překvapivě možné pozorovat u pacientů s metylprednisolonem výraznější zvýšení počtu leukocytů než u pacientů, jimž nebyl metylprednisolon podán, **tabulka 1**. Tento rozdíl mezi oběma skupinami byl dokonce statisticky významný první pooperační den. Nejpočetnější leukocytární populací jsou granulocyty, proto by rozdíl mohl být dán zvýšením počtu granulocytů účinkem metylprednisolonu.

### 8.2 Procento monocytů

Monocyty jsou důležitými fagocytárními buňkami, které díky expresi receptorů schopných rozpoznávat mikrobiální vzory citlivě reagují na přítomnost takových molekul. V literatuře je u kardiochirurgických pacientů uváděno operační snížení počtu monocytů s následnou monocytózou první pooperační den (43). Rápidní snížení procenta monocytů během operace jsme pozorovali u obou našich skupin pacientů, **tabulka 2**. Přestože rozdíl v průběhu operace není mezi oběma skupinami významný, u pacientů bez metylprednisolonu byla tendence k menšímu poklesu procenta monocytů než u pacientů s metylprednisolonem. Při porovnání obou skupin dosahují pacienti bez metylprednisolonu významně vyšších hodnot třetí pooperační den.

### 8.3 Procento granulocytů

Granulocyty představují další populaci fagocytujících buněk. Většinu granulocytů přitom tvoří neutrofilů. Zvýšení počtu neutrofilů provází záněťové stavy. Použití mimotělního oběhu je provázáno neutrofilii přetrvávající až do třetího pooperačního dne (44). V našich skupinách pacientů jsme detekovali zvýšené procento granulocytů již v průběhu operace, **tabulka 3**. Maxima bylo dosaženo první pooperační den. U pacientů bez metylprednisolonu se zvýšené procento vrací k výchozím hodnotám rychleji. Procento granulocytů bylo třetí pooperační den významně vyšší u pacientů s metylprednisolonem.



## 8.4 Povrchová exprese proteinů

### 8.4.1 Exprese CD163

#### 8.4.1.1 Exprese CD163 na monocytech

CD163 je vychytávací receptor pro komplex haptoglobinu s hemoglobinem. Změny exprese povrchového CD163 se vyskytují v souvislosti s krvácivými stavy. Proto i v souvislosti s použitím mimotělního oběhu dochází k výrazným změnám exprese CD163 a to jak ve smyslu snížení, tak zvýšení. Exprese se mění u obou skupin pacientů, **tabulka 4**. Operace s mimotělním oběhem indukuje snížení exprese CD163 na monocytech v průběhu operace. Snížení je dáno hlavně odštěpováním (shedding) povrchové formy CD163. Stejně jako skupina vedená Goldsteinem (2003) (45) i my jsme změřili významně zvýšenou expresi CD163 první pooperační den, u pacientů s metylprednisolonem pak mnohonásobně. V tomto odběrovém čase se obě skupiny významně liší, ( $p < 0,05$ ). Z toho lze vyvodit, že použití metylprednisolonu vede ke zvýšené expresi receptoru pro hemoglobin-haptoglobin na monocytech.

Hladina sCD163 je zvýšená u diabetiků a obézních lidí (46). Takovému zjištění odpovídá skutečnost, že hodnoty membránového CD163 jsou u těchto pacientů naopak snižené. U diabetických pacientů v našich skupinách (**graf 1**) je zřetelně vidět, že exprese CD163 je pooperačně zvýšená jako u ostatních pacientů. Účinek metylprednisolonu však expresi nezvyšuje, jako je tomu u pacientů bez diabetu.

U pacientů s multiorgánovým pooperačním selháváním se rozdíly v expresi CD163 projeví jen ve skupině s metylprednisolonem, **tabulka 16**.

### 8.4.2 Exprese FcγRI (CD64)

#### 8.4.2.1 Exprese FcγRI na monocytech

FcγRI váže s vysokou afinitou IgG, který může být posléze internalizován. FcγRI je exprimován na buňkách myeloidní řady a má důležitou funkci jak v buněčné, tak humorální odpovědi.

Exprese FcγRI se na monocytech zvyšuje první pooperační den a zůstává významně zvýšená do konce sledovaného období u obou skupin pacientů, **tabulka 5**. Na rozdíl od CD163 je exprese FcγRI na monocytech vyšší u pacientů bez metylprednisolonu ( $p < 0,05$ , třetí pooperační den). Protože exprese FcγRI na monocytech je regulovaná IL-10 a IFN- $\gamma$ , můžeme předpokládat, že produkce interferonu byla vyšší u pacientů bez metylprednisolonu (47, 48).

#### 8.4.2.2 Exprese FcγRI na granulocytech

Exprese tohoto znaku na granulocytech je minimální u zdravých jedinců. Exprese FcγRI se ale zvyšuje na kvantifikovatelnou úroveň při infekcích. Toho je využíváno např. při detekci sepse (49).

Exprese FcγRI na granulocytech byla ovlivněna chirurgickým zákrokem, kdy se při porovnání s výchozími hodnotami významně zvýšila třetí pooperační den u obou skupin, **tabulka 6**. Pooperační zvýšení FcγRI u všech pacientů znemožnilo detekovat pomocí tohoto znaku septické pacienty v našich souborech.

### 8.4.3 Exprese TLR2 (CD282)

#### 8.4.3.1 *Exprese TLR2 na monocytech*

TLR2 rozpoznává hlavně struktury PAMP na gram pozitivních bakteriích a kvasinkový zymosan. Lidské monocyty exprimují na svém povrchu TLR2 s vysokou intenzitou při porovnání s expresí TLR4. Přestože existuje několik publikací zabývajících se expresí TLR u pacientů operovaných s mimotělním oběhem, zdá se, že preoperační charakteristiky pacientů a operační protokol mohou podstatně ovlivnit expresi TLR na monocytech. My jsme v průběhu operace zaznamenali u obou skupin pacientů pokles exprese TLR2, **tabulka 7**. Je pravděpodobné, že ke snížení exprese TLR2 na monocytech dochází odštěpováním molekuly receptoru z povrchu. Stejně jako ve studii Dybdhal a kol. (2002) (50) bylo i u obou našich skupin první pooperační den zjištěno zvýšení exprese, ale jen u pacientů s metylprednisolonem bylo zvýšení statisticky významné.

#### 8.4.3.2 *Exprese TLR2 na granulocytech*

Lidské granulocyty exprimují TLR2 v mnohem nižších hodnotách než monocyty. Účinkem IL-10 je exprese TLR2 v obou populacích zvyšována, na granulocytech je ale efekt mnohem méně výrazný (51). Je proto možné, že se během operace produkovaný IL-10 také podílí na zvýšení exprese TLR2 u našich pacientů v pooperačním období. Toto zvýšení jsme pozorovali u obou skupin pacientů třetí pooperační den, **tabulka 8**. Rozdíl proti výchozím hodnotám byl statisticky významný jen u pacientů bez metylprednisolonu.

V průběhu operace bylo zaznamenáno snížení exprese také na granulocytech, je tedy pravděpodobné, že granulocyty vedle monocytů mohou dalším zdrojem solubilního receptoru TLR2.

### 8.4.4 Exprese TLR4 (CD284)

#### 8.4.4.1 *Exprese TLR4 na monocytech*

TLR4 tvoří receptorový komplex s CD14 a MD2 a v tomto komplexu rozpoznává LPS (lipid A), který je charakteristickým stavebním prvkem buněčné stěny gram-negativních bakterií. Přítomnost tohoto receptorového komplexu je typická pro monocyty a makrofágy. Shodně se studií Dybdhal a kol. (2002) (50) i my jsme naměřili snížení exprese TLR4 na monocytech v průběhu operace a krátce po ukončení operace, **tabulka 9**. První pooperační den byla exprese TLR4 na monocytech upregulována.

#### 8.4.4.2 *Exprese TLR4 na granulocytech*

Granulocyty stejně jako monocyty exprimují TLR4 a CD14. Oproti monocytům je však exprese obou molekul na granulocytech nižší. Nicméně i v granulocytární populaci jsme pozorovali změny exprese v průběhu operace a v pooperačním období. Podobně jako TLR2 na granulocytech i exprese TLR4 je snížena v průběhu operace, pravděpodobně díky odštěpování TLR4 z povrchu granulocytů, a nejvyšších hodnot je u obou skupin pacientů dosaženo třetí pooperační den, **tabulka 10**.

## 8.4.5 Exprese Fas (CD95)

### 8.4.5.1 Exprese Fas na monocytech

Fas rozpoznává Fas ligand, a u buněk nesoucích Fas dochází k navození programované buněčné smrti. Aktivovány ale mohou být i alternativní dráhy, které k apoptóze nutně vést nemusí. O spuštění signalizačních drah vedoucích k apoptóze po vazbě FasL rozhoduje jednak množství Fas molekul na buněčném povrchu a také přítomnost jiných molekul, jako je třeba DcR3. Signalizace Fas je také závislá na typu buněk, u kterého dochází ke stimulaci receptoru.

U našich pacientů jsme pozorovali stimulační vliv metylprednisolonu na pooperační zvýšení exprese Fas na monocytech, **tabulka 11, 16**. Obě skupiny pacientů se lišily první pooperační den, kdy pacienti s glukokortikoidy dosahovali vyšších hodnot ( $p < 0,05$ ).

### 8.4.5.2 Exprese Fas na granulocytech

Fas je exprimovaný celou řadou buněk včetně granulocytů. Protože podstatnou část granulocytů tvoří krátce žijící neutrofilů, dá se předpokládat, že Fas bude hrát významnou úlohu v regulaci počtu neutrofilů a bude se ve zvýšené míře objevovat na neutrofilech směřujících k apoptóze. Na rozdíl od monocytů exprese Fas na granulocytech během operace s mimotělním oběhem klesá a třetí pooperační den dosahuje maxima u obou skupin pacientů, **tabulka 12**. Je zajímavé, že také u granulocytů vede metylprednisolon k vyšší expresi Fas, která oproti skupině bez glukokortikoidů zůstává významně zvýšená i sedmý pooperační den.

## 8.5 Sérové parametry

### 8.5.1 Interleukin-10

Hlavním zdrojem IL-10 jsou monocyty, ze kterých je tento interleukin uvolňován po stimulaci receptorového komplexu TLR4/MD2/CD14. Důležitou úlohu IL-10 je utlumení zánětu, které probíhá několika různými mechanismy.

Není překvapující, že produkce IL-10 je zvyšována působením glukokortikoidů. Jak však bylo zjištěno u skupiny, kde nebyl použit metylprednisolon, IL-10 je uvolňován již při použití samotného mimotělního oběhu během kardiokirurgické operace. Koncentrace IL-10 přitom velmi rychle reaguje na typ chirurgického zákroku a hodnoty IL-10 se zvyšují již po ukončení mimotělního oběhu, **tabulka 13**. U pacientů s metylprednisolonem zůstává hladina IL-10 zvýšená až do třetího pooperačního dne. Hodnoty IL-10 ve skupině s metylprednisolonem jsou mnohem vyšší a významné rozdíly nacházíme od ukončení mimotělního oběhu až do prvního pooperačního dne.

U pacientů s metylprednisolonem je pooperační koncentrace IL-10 ovlivněná přítomností onemocnění diabetes mellitus. U diabetických pacientů pooperačně nenastává natolik výrazné zvýšení hladiny IL-10 jako je tomu u pacientů bez diabetu, **graf 3**.

Přestože data v **tabulkách 17 a 18** postrádají statistickou signifikanci pro malý počet pozorování, ukazují, že u pacientů s pooperačním selháváním orgánů byla koncentrace IL-10 vyšší už po ukončení mimotělního oběhu. Výrazně zvýšená

koncentrace pak byla změřena po ukončení operace v obou skupinách pacientů. Přitom však není jisté, jakou roli v pooperačních komplikacích IL-10 sehrává (52, 53).

### 8.5.2 Interleukin-6

Stejně jako IL-10 také IL-6 je produkován po stimulaci komplexu TLR4/MD2/CD14. K produkci IL-6 dochází také po stimulaci FcγRI (54). IL-6 je považován za převážně prozáněťový cytokin, nicméně jeho účinkem je indukována exprese rovněž protizáněťových molekul, jako je např. haptoglobin (55). Hlavním zdrojem IL-6 jsou buňky monocyto-makrofágové linie a endoteliální buňky (56).

Koncentrace IL-6 v séru během operace stoupá a nejvyšších hodnot dosahuje po ukončení operace a první pooperační den v obou skupinách pacientů, **tabulka 14**. Přitom se zdá, že použití i nízké dávky metylprednisolonu snižuje produkci IL-6. Mezi oběma skupinami pacientů je po ukončení operace a první pooperační den významný rozdíl v dosažených hodnotách IL-6, které jsou u pacientů bez metylprednisolonu značně vyšší. K podobnému výsledku dospěla i studie Kawamura a kol. (1995). V této studii však byly pacientům před zavedením mimotělního oběhu podávány vysoké dávky metylprednisolonu – 30 mg/kg (57).

## 9 ZÁVĚR

V důsledku kardiochirurgické operace prováděné s mimotělním oběhem dochází k nárůstu počtu leukocytů a zvýšení procenta granulocytů. Zároveň se mění produkce prozáněťových i protizáněťových proteinů. Největší nárůst ve smyslu kvantity je pozorován u proteinů považovaných za protizáněťové, IL-10 a CD163. Během operace a krátce po operaci stoupá hladina sérového IL-10, zatímco nejvyšší exprese CD163 byla naměřena první pooperační den. O snaze organismu tlumit záněťovou reakci svědčí i fakt, že v průběhu operace jsou z povrchu buněk odštěpovány povrchové receptory, které jsou úzce spojeny se zánětem, TLR2 a TLR4. Zajímavým poznatkem je, že odštěpován je také vychytávací receptor CD163. Naproti tomu u ostatních receptorů, Fc $\gamma$ RI a Fas, tento efekt pozorován nebyl.

V pooperačním období dochází ke zvýšení exprese TLR2, TLR4, Fas a Fc $\gamma$ RI, přičemž maxima je na monocytech dosaženo první nebo třetí pooperační den, na granulocytech pak třetí pooperační den.

Metylprednisolon zásadně ovlivňuje množství sekretovaného IL-10 stejně jako expresi CD163. Tyto proteiny jsou pak navíc v extrémně vysokých hodnotách detekovány u pacientů s pooperačními komplikacemi. I když metylprednisolon podporuje produkci zkoumaných protizáněťových parametrů, co se týká vlivu na proteiny zahrnuté spíše v prozáněťové odpovědi, TLR2 a TLR4, je jeho role nejasná. Jinak je tomu v případě IL-6, jehož sekrece je v přítomnosti metylprednisolonu potlačena.

V protikladu k jiným klinickým modelům není přítomnost pooperačních komplikací, včetně sepse, charakterizována zvýšením exprese Fc $\gamma$ RI na granulocytech kardiochirurgických pacientů. Navíc nebyl zjištěn ani účinek metylprednisolonu na expresi Fc $\gamma$ RI na granulocytech. Naproti tomu metylprednisolon vede k zvýšení exprese Fas. Tento protein se vyskytuje ve zvýšeném množství na granulocytech septických pacientů, ať byl použit metylprednisolon či ne.

I když metylprednisolon zasahuje do záněťové reakce, která vzniká jako odpověď na chirurgický zákrok, souvislost mezi jeho aplikací a vyšším nebo nižším výskytem pooperačních komplikací nebyla pozorována. A to přesto, že použití metylprednisolonu je provázeno nárůstem produkce či exprese typicky anebo alespoň částečně protizáněťových proteinů IL-10, CD163 a Fas, jejichž další navýšení lze pozorovat u pacientů s pooperačními komplikacemi. Třebaže by bylo možné tyto znaky v budoucnu využít jako prognostické markery u kardiochirurgických pacientů, deregulace záněťové odpovědi u pacientů s pooperačními komplikacemi pravděpodobně probíhá na jiné úrovni než se původně předpokládalo.

## 10 POUŽITÁ LITERATURA

- (1) Tidball J.G.: Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2005), 288 (2), R345-R353.
- (2) Esmon C.T.: The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol* (2005), 131 (4), 417-430.
- (3) Nakanishi K., Zhao Z.Q., Vinten-Johansen J., Lewis J.C., McGee D.S., Hammon J.W., Jr.: Coronary artery endothelial dysfunction after global ischemia, blood cardioplegia, and reperfusion. *Ann Thorac Surg* (1994), 58 (1), 191-199.
- (4) Singh S., Singh P., Singh G.: Systemic inflammatory response syndrome outcome in surgical patients. *Indian J Surg* (2009), 71 (4), 206-209.
- (5) Schaer D.J., Alayash A.I., Buehler P.W.: Gating the radical hemoglobin to macrophages: the anti-inflammatory role of CD163, a scavenger receptor. *Antioxid Redox Signal* (2007), 9 (7), 991-999.
- (6) Schaer D.J., Boretti F.S., Schoedon G., Schaffner A.: Induction of the CD163-dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Br J Haematol* (2002), 119 (1), 239-243.
- (7) Schaer C.A., Vallelian F., Imhof A., Schoedon G., Schaer D.J.: Heme carrier protein (HCP-1) spatially interacts with the CD163 hemoglobin uptake pathway and is a target of inflammatory macrophage activation. *J Leukoc Biol* (2008), 83 (2), 325-333.
- (8) Tenhunen R., Marver H.S., Schmid R.: Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* (1969), 244 (23), 6388-6394.
- (9) Zwadlo G., Voegeli R., Osthoff K.S., Sorg C.: A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process. *Exp Cell Biol* (1987), 55 (6), 295-304.
- (10) Fjeldborg K., Christiansen T., Bennetzen M., Ller J.M., Pedersen S.B., Richelsen B.R.: The Macrophage-Specific Serum Marker, Soluble CD163, Is Increased in Obesity and Reduced After Dietary-Induced Weight Loss. *Obesity (Silver Spring)* (2013).
- (11) Koolwijk P., Spierenburg G.T., Frasa H., Boot J.H., van de Winkel J.G., Bast B.J.: Interaction between hybrid mouse monoclonal antibodies and the human high-affinity IgG FcR, huFc gamma RI, on U937. Involvement of only one of the mIgG heavy chains in receptor binding. *J Immunol* (1989), 143 (5), 1656-1662.
- (12) van Vugt M.J., Van den Herik-Oudijk IE, van de Winkel J.G.: Fc gamma RIa-gamma-chain complexes trigger antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in CD5+ B cell/macrophage IIA1.6 cells. *Clin Exp Immunol* (1998), 113 (3), 415-422.
- (13) Coccia E.M., Del R.N., Stellacci E., Testa U., Marziali G., Battistini A.: STAT1 activation during monocyte to macrophage maturation: role of adhesion molecules. *Int Immunol* (1999), 11 (7), 1075-1083.
- (14) Wiener E., Allen D., Porter R.J., Wickramasinghe S.N., Porter J.B., Chinprasertsuk S., Siripanyaphinyo U., Pattanapanyasat K., Fucharoen S., Wanachiwanawin W.: Role of Fc gamma RI (CD64) in erythrocyte elimination and its up-regulation in thalassaemia. *Br J Haematol* (1999), 106 (4), 923-930.
- (15) Bovolenta C., Gasperini S., McDonald P.P., Cassatella M.A.: High affinity receptor for IgG (Fc gamma RI/CD64) gene and STAT protein binding to the IFN-gamma response region (GRR) are regulated differentially in human neutrophils and monocytes by IL-10. *J Immunol* (1998), 160 (2), 911-919.
- (16) Colotta F., Re F., Polentarutti N., Sozzani S., Mantovani A.: Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* (1992), 80 (8), 2012-2020.

- (17) Petroni K.C., Shen L., Guyre P.M.: Modulation of human polymorphonuclear leukocyte IgG Fc receptors and Fc receptor-mediated functions by IFN-gamma and glucocorticoids. *J Immunol* (1988), 140 (10), 3467-3472.
- (18) Erbe D.V., Collins J.E., Shen L., Graziano R.F., Fanger M.W.: The effect of cytokines on the expression and function of Fc receptors for IgG on human myeloid cells. *Mol Immunol* (1990), 27 (1), 57-67.
- (19) Goulding N.J., Knight S.M., Godolphin J.L., Guyre P.M.: Increase in neutrophil Fc gamma receptor I expression following interferon gamma treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (1992), 51 (4), 465-468.
- (20) Gericke G.H., Ericson S.G., Pan L., Mills L.E., Guyre P.M., Ely P.: Mature polymorphonuclear leukocytes express high-affinity receptors for IgG (Fc gamma RI) after stimulation with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *J Leukoc Biol* (1995), 57 (3), 455-461.
- (21) Devaraj S., Du Clos T.W., Jialal I.: Binding and internalization of C-reactive protein by Fc gamma receptors on human aortic endothelial cells mediates biological effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2005), 25 (7), 1359-1363.
- (22) Li L., Roumeliotis N., Sawamura T., Renier G.: C-reactive protein enhances LOX-1 expression in human aortic endothelial cells: relevance of LOX-1 to C-reactive protein-induced endothelial dysfunction. *Circ Res* (2004), 95 (9), 877-883.
- (23) Janeway C.A., Jr.: Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (1989), 54 Pt 1, 1-13.
- (24) Matzinger P.: The danger model: a renewed sense of self. *Science* (2002), 296 (5566), 301-305.
- (25) Arslan F., Keogh B., McGuirk P., Parker A.E.: TLR2 and TLR4 in ischemia reperfusion injury. *Mediators Inflamm* (2010), 2010, 704202.
- (26) Li-Weber M., Krammer P.H.: Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. *Semin Immunol* (2003), 15 (3), 145-157.
- (27) Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P.H., Peter M.E.: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* (1995), 14 (22), 5579-5588.
- (28) Tran S.E., Holmstrom T.H., Ahonen M., Kahari V.M., Eriksson J.E.: MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J Biol Chem* (2001), 276 (19), 16484-16490.
- (29) Sodeman T., Bronk S.F., Roberts P.J., Miyoshi H., Gores G.J.: Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2000), 278 (6), G992-G999.
- (30) Bennett M., Macdonald K., Chan S.W., Luzio J.P., Simari R., Weissberg P.: Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* (1998), 282 (5387), 290-293.
- (31) Chung C.S., Song G.Y., Lomas J., Simms H.H., Chaudry I.H., Ayala A.: Inhibition of Fas/Fas ligand signaling improves septic survival: differential effects on macrophage apoptotic and functional capacity. *J Leukoc Biol* (2003), 74 (3), 344-351.
- (32) D'Amico G., Frascaroli G., Bianchi G., Transidico P., Doni A., Vecchi A., Sozzani S., Allavena P., Mantovani A.: Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. *Nat Immunol* (2000), 1 (5), 387-391.
- (33) Hu X., Paik P.K., Chen J., Yarinina A., Kockeritz L., Lu T.T., Woodgett J.R., Ivashkiv L.B.: IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* (2006), 24 (5), 563-574.

- (34) Boonstra A., Rajsbaum R., Holman M., Marques R., Asselin-Paturel C., Pereira J.P., Bates E.E., Akira S., Vieira P., Liu Y.J., Trinchieri G., O'Garra A.: Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J Immunol* (2006), 177 (11), 7551-7558.
- (35) Jang S., Uematsu S., Akira S., Salgame P.: IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in response to *Mycobacterium tuberculosis* is predominantly dependent on TLR-mediated recognition. *J Immunol* (2004), 173 (5), 3392-3397.
- (36) Rogers N.C., Slack E.C., Edwards A.D., Nolte M.A., Schulz O., Schweighoffer E., Williams D.L., Gordon S., Tybulewicz V.L., Brown G.D., Reis e Sousa: Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* (2005), 22 (4), 507-517.
- (37) Geijtenbeek T.B., van Vliet S.J., Koppel E.A., Sanchez-Hernandez M., Vandenbroucke-Grauls C.M., Appelmek B., van K.Y.: *Mycobacteria* target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med* (2003), 197 (1), 7-17.
- (38) Moreira L.O., El Kasmi K.C., Smith A.M., Finkelstein D., Fillon S., Kim Y.G., Nunez G., Tuomanen E., Murray P.J.: The TLR2-MyD88-NOD2-RIPK2 signalling axis regulates a balanced pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory cytokine response to Gram-positive cell walls. *Cell Microbiol* (2008), 10 (10), 2067-2077.
- (39) Hawrylowicz C.M., O'Garra A.: Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* (2005), 5 (4), 271-283.
- (40) Crepaldi L., Gasperini S., Lapinet J.A., Calzetti F., Pinardi C., Liu Y., Zurawski S., de Waal M.R., Moore K.W., Cassatella M.A.: Up-regulation of IL-10R1 expression is required to render human neutrophils fully responsive to IL-10. *J Immunol* (2001), 167 (4), 2312-2322.
- (41) Romano M., Sironi M., Toniatti C., Polentarutti N., Fruscella P., Ghezzi P., Faggioni R., Luini W., van H., V., Sozzani S., Bussolino F., Poli V., Ciliberto G., Mantovani A.: Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* (1997), 6 (3), 315-325.
- (42) Diegeler A., Tarnok A., Rauch T., Haberer D., Falk V., Battellini R., Autschbach R., Hamsch J., Schneider P., Mohr F.W.: Changes of leukocyte subsets in coronary artery bypass surgery: cardiopulmonary bypass versus 'off-pump' techniques. *Thorac Cardiovasc Surg* (1998), 46 (6), 327-332.
- (43) Weerasinghe A., Athanasiou T., Philippidis P., Day J., Mandal K., Warren O., Anderson J., Taylor K.: Platelet-monocyte pro-coagulant interactions in on-pump coronary surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* (2006), 29 (3), 312-318.
- (44) Iwasaka H., Kitano T., Miyakawa H., Unoshima M., Shinguu C., Matsumoto S., Noguchi T.: Neutrophilia and granulocyte colony-stimulating factor levels after cardiopulmonary bypass. *Can J Anaesth* (2001), 48 (1), 81-84.
- (45) Goldstein J.I., Goldstein K.A., Wardwell K., Fahrner S.L., Goonan K.E., Cheney M.D., Yeager M.P., Guyre P.M.: Increase in plasma and surface CD163 levels in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Atherosclerosis* (2003), 170 (2), 325-332.
- (46) Fjeldborg K., Christiansen T., Bennetzen M., Moller J., Pedersen S.B., Richelsen B.: The macrophage-specific serum marker, soluble CD163, is increased in obesity and reduced after dietary-induced weight loss. *Obesity (Silver Spring)* (2013), 21 (12), 2437-2443.
- (47) Fanger N.A., Voigtlaender D., Liu C., Swink S., Wardwell K., Fisher J., Graziano R.F., Pfefferkorn L.C., Guyre P.M.: Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc gamma RI (CD64) expressed on human blood dendritic cells. *J Immunol* (1997), 158 (7), 3090-3098.
- (48) Li Y., Lee P.Y., Kellner E.S., Paulus M., Switanek J., Xu Y., Zhuang H., Sobel E.S., Segal M.S., Satoh M., Reeves W.H.: Monocyte surface expression of Fc gamma receptor RI (CD64), a biomarker reflecting type-I interferon levels in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* (2010), 12 (3), R90.



- (49) Hoffmann J.J.: Neutrophil CD64 as a sepsis biomarker. *Biochem Med (Zagreb)* (2011), 21 (3), 282-290.
- (50) Dybdahl B., Wahba A., Lien E., Flo T.H., Waage A., Qureshi N., Sellevold O.F., Espevik T., Sundan A.: Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation* (2002), 105 (6), 685-690.
- (51) Flo T.H., Halaas O., Torp S., Ryan L., Lien E., Dybdahl B., Sundan A., Espevik T.: Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J Leukoc Biol* (2001), 69 (3), 474-481.
- (52) Musleh G.S., Datta S.S., Yonan N.N., Grotte G.J., Prendergast B.A., Hasan R.I., Deyrania A.K.: Association of IL6 and IL10 with renal dysfunction and the use of haemofiltration during cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg* (2009), 35 (3), 511-514.
- (53) Dominguez R.A., Abreu G.P., Garcia Gonzalez M.J., Ferrer H.J.: [Association between serum interleukin 10 level and development of heart failure in acute myocardial infarction patients treated by primary angioplasty]. *Rev Esp Cardiol* (2005), 58 (6), 626-630.
- (54) Edberg J.C., Qin H., Gibson A.W., Yee A.M., Redecha P.B., Indik Z.K., Schreiber A.D., Kimberly R.P.: The CY domain of the FcγRIα alpha-chain (CD64) alters gamma-chain tyrosine-based signaling and phagocytosis. *J Biol Chem* (2002), 277 (43), 41287-41293.
- (55) Marinkovic S., Baumann H.: Structure, hormonal regulation, and identification of the interleukin-6- and dexamethasone-responsive element of the rat haptoglobin gene. *Mol Cell Biol* (1990), 10 (4), 1573-1583.
- (56) Majello B., Arcone R., Toniatti C., Ciliberto G.: Constitutive and IL-6-induced nuclear factors that interact with the human C-reactive protein promoter. *EMBO J* (1990), 9 (2), 457-465.
- (57) Kawamura T., Inada K., Okada H., Okada K., Wakusawa R.: Methylprednisolone inhibits increase of interleukin 8 and 6 during open heart surgery. *Can J Anaesth* (1995), 42 (5 Pt 1), 399-403.

# 11 PŘEHLED PUBLIKAČNÍ AKTIVITY

## 11.1 Původní články

Krejsek J., **Kolackova M.**, Mand'ak J., Kunes P., Holubcova Z., Holmannova D., AbuAttieh M., Andrys C.: TLR2 and TLR4 expression on blood monocytes and granulocytes of cardiac surgical patients is not affected by the use of cardiopulmonary bypass. *Acta Medica (Hradec Kralove)* (2013), 56 (2), 57-66.

**Kolackova M.**, Krejsek J., Svitek V., Kunes P., Mandak J., Holubcova Z., Lonsky V.: The effect of conventional and mini-invasive cardiopulmonary bypass on neutrophil activation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Mediators Inflamm* (2012), 2012, 152895, **IF = 3,882**.

Krejsek J., Mandak J., Kunes P., Lonsky V., **Kolackova M.**, Jankovicova K., Andrys C.: Impact of methylprednisolone in priming solution of cardiopulmonary bypass on anti-inflammatory CD163 receptor during cardiac surgery. *Perfusion* (2012), 27 (4), 284-291, **IF = 0,94**.

Jankovicova K., **Kolackova M.**, Kunes P., Holubcova Z., Krejsek J., Mandak J.: Interferon gamma receptor expression on granulocytes of cardiac surgical patients is modulated differently by the type of cardiopulmonary bypass used. *Perfusion* (2012), 27 (1), 49-55, **IF = 0,94**.

Krejsek J., **Kolackova M.**, Kunes P., Jankovicova K., Mandak J., Andrys C.: Expression of urokinase plasminogen activator receptor on monocytes and granulocytes is modulated by cardiac surgery. *Perfusion* (2011), 26 (2), 115-121, **IF = 0,94**.

Krejsek J., **Kolackova M.**, Mandak J., Kunes P., Jankovicova K., Vlaskova D., Svitek V., Andrys C.: Expression of CD200/CD200R regulatory molecules on granulocytes and monocytes is modulated by cardiac surgical operation. *Perfusion* (2010), 25 (6), 389-397, **IF = 0,94**.

Kunes P., Mandak J., Harrer J., **Kolackova M.**, Andrys C., Holicka M., Krejsek J.: Up-regulation of the Apo/Fas (CD95) complex on neutrophils harvested during cardiac surgery: distinct findings in patients operated on with or without the use of cardiopulmonary bypass. *Perfusion* (2010), 25 (1), 41-46, **IF = 0,94**.

Svitek V., Lonsky V., Mandak J., Krejsek J., **Kolackova M.**, Brzek V., Kubicek J., Volt M., Bartos M., Harrer J.: No clear clinical benefit of using mini-invasive extracorporeal circulation in coronary artery bypass grafting in low-risk patients. *Perfusion* (2009), 24 (6), 389-395, **IF = 0,94**.

**Kolackova M.**, Lonsky V., Trojackova K.M., Mandak J., Kunes P., Svitek V., Jankovicova K., Vlaskova D., Andrys C., Krejsek J.: Serum level of sCD163, a soluble receptor for hemoglobin, is influenced by cardiac surgery. *Perfusion* (2009), 24 (4), 263-269, **IF = 0,94**.

Krejsek J., **Kolackova M.**, Lonsky V., Kudlova M.T., Mandak J., Kunes P., Jankovicova K., Vlaskova D., Ctirad A.: RANK/RANKL expression is induced by cardiac surgical operation. *Acta Medica (Hradec Kralove)* (2009), 52 (4), 149-153.

Krejsek J., Kunes P., **Kolackova M.**, Kudlova M., Lonsky V., Mandak J., Andrys C.: Expression of Toll-like receptors 2 and 4 on innate immunity cells modulated by cardiac surgical operation. *Scand J Clin Lab Invest* (2008), 68 (8), 749-758, **IF = 1,294**.

**Kolackova M.**, Kudlova M.T., Lonsky V., Mand'ak J., Kunea P., Jankovicova K., Vlaskova D., Andrys C., Krejsek J.: The expression of CD38 ADP-ribosyl cyclase ectoenzyme in immune cells of cardiac surgical patients. *Acta Medica (Hradec Kralove)* (2008), 51 (1), 31-35.

Jankovicova K., Kudlova M.T., **Kolackova M.**, Kunes P., Mand'ak J., Lonsky V., Vlaskova D., Andrys C., Krejsek J.: The effect of cardiac surgery on peripheral blood lymphocyte populations. *Acta Medica (Hradec Kralove)* (2008), 51 (1), 25-29.

**Kolackova M.**, Kudlova M., Kunes P., Lonsky V., Mandak J., Andrys C., Jankovicova K., Krejsek J.: Early expression of FcγRI (CD64) on monocytes of cardiac surgical patients and higher density of monocyte anti-inflammatory scavenger CD163 receptor in "on-pump" patients. *Mediators Inflamm* (2008), 2008, 235461, **IF = 3,882**.

Kudlova M., Kunes P., **Kolackova M.**, Lonsky V., Mandak J., Andrys C., Jankovicova K., Krejsek J.: Lipopolysaccharide binding protein and sCD14 are not produced as acute phase proteins in cardiac surgery. *Mediators Inflamm* (2007), 2007, 72356, **IF = 3,882**.

Kudlova M., **Kolackova M.**, Kunes P., Lonsky V., Mand'ak J., Ctirad A., Krejsek J.: Expression of an activated form of integrin beta2 chain CD18 in cardiac surgical operations. *Acta Medica (Hradec Kralove)* (2007), 50 (3), 187-193.

Kunes P., Lonsky V., Mandak J., **Kolackova M.**, Andrys C., Kudlova M., Krejsek J.: The long pentraxin 3 in cardiac surgery: distinct responses in "on-pump" and "off-pump" patients. *Scand Cardiovasc J* (2007), 41 (3), 171-179, **IF = 0,819**.

## 11.2 Přehledové články

Kunes P., Mandak J., Holubcova Z., **Kolackova M.**, Krejsek J.: The long pentraxin PTX3: a candidate anti-inflammatory mediator in cardiac surgery. *Perfusion* (2013), 28 (5), 377-389.

Holmannova D., **Kolackova M.**, Krejsek J.: [Vitamin C and its physiological role with respect to the components of the immune system]. *Vnitr Lek* (2012), 58 (10), 743-749.

Holmannova D., **Kolackova M.**, Kondelkova K., Kunes P., Krejsek J., Ctirad A.: CD200/CD200R paired potent inhibitory molecules regulating immune and inflammatory responses; Part II: CD200/CD200R potential clinical applications. *Acta Medica (Hradec Kralove)* (2012), 55 (2), 59-65.

Holmannova D., **Kolackova M.**, Kondelkova K., Kunes P., Krejsek J., Andrys C.: CD200/CD200R paired potent inhibitory molecules regulating immune and inflammatory responses; Part I: CD200/CD200R structure, activation, and function. *Acta Medica (Hradec Kralove)* (2012), 55 (1), 12-17.

Kunes P., Holubcova Z., **Kolackova M.**, Krejsek J.: Pentraxin 3 (PTX 3): an endogenous modulator of the inflammatory response. *Mediators Inflamm* (2012), 2012, 920517.

Berglova I., Krejsek J., **Kolackova M.**, Slezak R.: B cell toll-like receptors with respect to the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Acta Medica (Hradec Kralove)* (2011), 54 (2), 51-57.

Kunes P., Holubcova Z., **Kolackova M.**, Krejsek J.: The counter-regulation of atherogenesis: a role for interleukin-33. *Acta Medica (Hradec Kralove)* (2010), 53 (3), 125-129.

Kunes P., Holubcova Z., **Kolackova M.**, Krejsek J.: Interleukin-33, a novel member of the IL-1/IL-18 cytokine family, in cardiology and cardiac surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* (2010), 58 (8), 443-449.

Onofre G., **Kolackova M.**, Jankovicova K., Krejsek J.: Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica (Hradec Kralove)* (2009), 52 (2), 57-61.

Kunes P., Mandak J., **Kolackova M.**, Krejsek J.: Mystery of pentraxin-3 not yet resolved: still a long way to its prime time in surgery. *Nephrol Dial Transplant* (2009), 24 (3), 1064-1065.

Krejsek J., Kudlova M., **Kolackova M.**, Novosad J.: [Mucosal immunity with emphasis on urinary tract immunity and diabetes]. *Vnitr Lek* (2008), 54 (5), 478-481.

Kunes P., Lonsky V., Mand'ak J., **Kolackova M.**, Kudlova M., Krejsek J.: [Transcription factor KLF2 (Kruppel-like factor 2) and natural defence of vascular endothelium]. *Cas Lek Cesk* (2007), 146 (12), 909-915.

Kunes P., Lonsky V., Mand'ak J., Brtko M., **Kolackova M.**, Andrys C., Kudlova M., Krejsek J.: The inflammatory response in cardiac surgery. An up-to-date overview with the emphasis on the role of heat shock proteins (HSPs) 60 and 70. *Acta Medica (Hradec Kralove)* (2007), 50 (2), 93-99.

Kunes P., Lonsky V., Mand'ak J., Brtko M., **Kolackova M.**, Andrys C., Kudlova M., Krejsek J.: Essential PTX3 biology (not only) for cardiologists and cardiac surgeons. *Acta Medica (Hradec Kralove)* (2007), 50 (1), 29-33.

Kudlova M., **Kolackova M.**, Kunes P., Andrys C., Jankovicova K., Mand'ak J., Lonsky V., Krejsek J.: [Cardiac surgery operations and their influence on serum level of antiinflammatory cytokine interleukin-10]. *Cas Lek Cesk* (2007), 146 (1), 48-55.

Krejsek J., Kunes P., Andrys C., Holicka M., Novosad J., Kudlova M., **Kolackova M.**: [Innate immunity, receptors for exogenous and endogenous danger patterns in immunopathogenesis of atherosclerosis--part II: TLR receptors, significance of genetic polymorphism of danger signals receptors]. *Cas Lek Cesk* (2005), 144 (12), 790-794.

Krejsek J., Kunes P., Andrys C., Holicka M., Novosad J., Kudlova M., **Kolackova M.**: [Innate immunity, receptors for exogenous and endogenous danger patterns in immunopathogenesis of atherosclerosis--part I: identification of danger signals by innate immunity]. *Cas Lek Cesk* (2005), 144 (12), 785-789.

Kunes P., Lonsky V., Mandak J., **Kolackova M.**, Andrys C., Kudlova M., Krejsek J.: The long pentraxin 3 in cardiac surgery: distinct responses in "on-pump" and "off-pump" patients. *Scand Cardiovasc J* (2007), 41 (3), 171-179.

### 11.3 Odborné přednášky a poster

Koláčková M.: Protizáněťová odpověď u pacientů po revaskularizaci myokardu. 19. Severočeská imunologická konference, Ústí nad Labem, 16.9.2011, přednáška

Koláčková M., Krejsek J., Svitek V., Kuneš P., Holubcová Z., Mand'ák J., Lonský V.: The Effect of Methylprednisolone on Interleukin-6 and Interleukin-10 in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting with Cardiopulmonary Bypass. 8<sup>th</sup> International Conference on Innate Immunity, Chania, 15.-20.6.2011, poster

Koláčková M., Krejsek J., Svitek V., Kuneš P., Holubcová Z., Mandřák J., Lonský V.: Expression of monocyte CD95 and CD38 in cardiac surgical patients. The Leukocyte in Cardiovascular Disease Conference, Geneva, 27.-28.1.2011, poster

Koláčková M.: Expression of CD95 and CD38 on monocytes of patients undergoing CABG surgery with cardiopulmonary bypass. 6<sup>th</sup> Postgraduate Medical Students Conference, Hradec Králové, 25.10.2010, přednáška

Koláčková M.: Early expression of Fc $\gamma$ RI (CD64) on monocytes of cardiac surgical patients and high density of monocyte scavenger receptor CD163 in on-pump patients. 3<sup>rd</sup> Postgraduate Medical Students Conference, Hradec Králové, 25.10.2007, přednáška

Koláčková M., Kuneš P., Kudlová M., Krejsek J.: Expression of Fc $\gamma$ RI and monocyte scavenger CD163 on monocytes of cardiac surgical patients. 2<sup>nd</sup> International Conference on Crossroads between Innate and Adaptive Immunity, Hersonissos, 17.-22.6.2007, poster

Koláčková M.: Changes in serum concentrations of Hsp60 and Hsp70 in on- and off-pump patients. 2<sup>nd</sup> Postgraduate Medical Students Conference, Hradec Králové, 24.10.2006, přednáška

Koláčková M., Kudlová M., Andrýs C., Kuneš P., Krejsek J.: Vliv kardiokirurgického zákroku na zvýšení hladin cytokinů v séru, XI. Kongres českých a slovenských imunologů, Hradec Králové, 25.-28.9.2006, poster