

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

**Změny v expresi membránových molekul CD200R, CD95, CD95L a
solubilního CD200R regulujících zánětlivou odpověď u pacientů
podstupujících kardiochirurgický zákrok**

Drahomíra Holmannová

Autoreferát dizertační práce

Doktorský studijní program: *Lékařská imunologie*

Hradec Králové

2017

Dizertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Lékařská imunologie na Ústavu klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Drahomíra Holmannová
Ústav klinické imunologie a alergologie
Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice v Hradci Králové

Školitel: prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.
Ústav klinické imunologie a alergologie
Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice v Hradci Králové

Oponenti:

doc. MUDr. Radim Brát, Ph.D., MBA
Kardiochirurgické centrum, Fakultní nemocnice Ostrava

doc. RNDr. Jaroslav Turánek, CSc.
Oddělení farmakologie a imunoterapie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Lékařská imunologie dne 25. 9. 2017 v Ústavu klinické imunologie FN, budova č. 17, seminární místnost 2. NP od 11,00 hod.

Tato práce vznikla za podpory projektů **UK PRVOUK P37/10, PROGRES Q40, SVV.**

S dizertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Předseda komise pro obhajoby dizertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská imunologie
Garant studijního programu: prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.

Obsah:

1. Souhrn	2
2. Úvod	4
3. Cíl práce	5
4. Postup a metody	5
4.1 Pacienti, demografická data, klinické aspekty	5
4.2 Popis operace.....	8
4.2.1 Vedení anestezie	8
4.3 Laboratorní metodiky	9
4.3.1 Odběr a zpracování krevních vzorků	9
4.3.2 Přístrojové a programové vybavení.....	10
4.4 Statistické vyhodnocení.....	10
5. Výsledky.....	10
5.1 Exprese znaku CD200R, CD95 a CD95L na granulocytech.....	11
5.2 Exprese sledovaných molekul CD200R a CD95 na monocytech	16
5.3 Sérová koncentrace solubilního receptoru CD200R	19
6. Diskuse	20
7. Závěr a zhodnocení přínosu studie a možnosti dalších kroků.....	23
8. Literatura	24
9. Publikované články	29

1. Souhrn

Srdeční operace jsou spojené s rozvojem komplexní fyziologické reakce s aktivací imunitního systému (SIRS), neurohormonální odpovědí, metabolickými změnami, koagulopatiemi atd. SIRS je spuštěna poškozením tkání, myokardiální ischemií a reperfuzí, použitím anestezie, kardioplegie, využitím mimotělního oběhu aj. Nadměrná aktivace imunitního systému je spojená s progresí SIRS, s rozvojem život ohrožujícího multiorgánové selhání, a tím i se zvýšenou morbiditou a mortalitou v postoperačním období. Odpověď imunitního systému je regulována a ukončována díky buněčným i humorálním regulačním a inhibičním mechanismům, mezi něž patří také změny exprese v naší studii monitorovaných molekul CD200R, sCD200R, CD95 a CD95L.

Metody: Studie zahrnovala měření exprese CD95, CD95L, CD200R, a sCD200R na povrchích granulocytů a monocytů ve vzorcích 30 pacientů, kteří se podrobili srdeční operaci s použitím mimotělního oběhu. Krevní vzorky byly odebírány v preoperačním, bezprostředně po operaci a dále pak 1., 3. a 7. den po operaci a analyzovány pomocí průtokové cytometrie a v případě sCD200R metodou ELISA.

Výsledky: Zjistili jsme, že okamžitě po operaci dochází k výraznému relativnímu nárůstu granulocytární populace exprimující protizánětlivou molekulu CD200R, a to z 5 % na 17,8 %. Dle toho, že tato populace je převážně CD200R⁺CD95⁻, tedy tyto buňky omezeně exprimují CD95, lze předpokládat i jejich nižší vnímavost k apoptóze. Pouze malé procento CD200R⁺ granulocytů zároveň exprimovalo i molekulu CD95. Nárůst této populace byl z 0,5 % na 2,06 %. U této granulocytární subpopulace bylo také zaznamenáno snížení exprese CD200R, což může znamenat, že ona je zdrojem solubilního CD200R, jehož koncentrace v séru vzrostla z 96 na 294 ng/ml. Kardiochirurgický zákrok ovlivňuje také expresi CD95L na monocytech. Relativní zastoupení CD200R⁺CD95L⁺ monocytů se zvýšilo 1. pooperační den z 30,6 na 49,4 %, 7. pooperační den pak hodnota klesla pod předoperační, a to z 30,6 na 19,8 %. Monocytární CD200R⁺ populace byla tvořena hlavně monocyty CD200R⁺CD95⁺, které společně s expresí CD200R zvýšily i expresi CD95. Rozdíl na hladině $p \leq 0,05$ byl považován za statisticky významný.

Závěr: Naše data ukazují, že kardiochirurgický zákrok mění expresi CD200R, CD95 a CD95L, stejně tak i koncentraci sCD200R a zároveň poukazuje na jejich zapojení do buněčné regulace v podobě inhibice či apoptózy, jež jsou spojeny s kardiochirurgickým zákrokem.

Abstract

Cardiac surgery is known to initiate a complex physiological response with the immune system activation (SIRS), neurohormonal response, metabolic changes, coagulopathies etc. SIRS is triggered by tissue injury, myocardial ischemia, reperfusion, use of anaesthesia, cardioplegia, extracorporeal circuit etc. Excessive immune system activation is associated with progression of SIRS, life-threatening multi-organ dysfunction (MOD), and increased morbidity/mortality in the postoperative period. The immune system response is regulated and terminated by both cellular and humoral regulatory and inhibitory mechanisms including changes in expression of in our study monitored molecules: CD200/CD200R, sCD200R and CD95/CD95L.

Methods: The study included the measurement the expression of CD95, CD95L, CD200R, and sCD200R molecules in granulocyte and monocyte populations in blood samples of 30 patients who underwent heart surgery using CPB. Samples collected before surgery, after surgery, and in the postoperative period (1st, 3rd, 7th day) were analysed by flow cytometry and sCD200R by ELISA.

Results: We discovered a significant increase in the percentage of granulocytes expressing inhibitory molecule CD200R (from 5% to 17.8%) instantly after surgery. It might be presumed that these cells are less susceptible to apoptosis, because they rarely expressed CD95, CD200R⁺CD95⁻ granulocyte subpopulation prevailed. Only a small percentage of granulocytes expressed both molecules CD200R and CD95 (from 0.5 to 2.06 %). This subpopulation of CD200R⁺CD95⁺ cells decreased expression of CD200R after surgery, and thus was likely to be a source of increased sCD200R in serum (from 96 to 294 ng/mL). CPB also affected the expression of CD95L on monocytes. The percentage of CD200R⁺CD95L⁺ monocytes rose on the 1th postoperative day (from 30.6 to 49.4 %) and decreased below the preoperative value on the 7th day after surgery (from 30.6 to 19.8 %). This population was constituted mainly by CD200R⁺CD95⁺ monocytes in which enhanced expression of CD95 was found (from 36,1 to 42,7). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Conclusion: Our data show that the expression of CD200R, CD95, and CD95L, as well as concentration of sDC200R was significantly influenced by cardiac surgery. This implies the role of these membrane molecules in the cell regulation – inhibition and apoptosis following cardiac surgery.

2. Úvod

Kardiochirurgické operace jsou spojené s rozvojem fyziologické komplexní systémové odpovědi, do které se zapojuje nejen imunitní systém, ale také systém nervový, endokrinní. Dochází k metabolickým změnám, změnám v koagulaci, aktivaci kininového systému atd. Imunitní systém stojí za rozvojem systémové zánětlivé odpovědi, která se projevuje jako SIRS různé intenzity. I nekomplikovaný zákrok je provázen aktivací imunitního systému, na čemž se podílí např. poranění tkání, kontakt krve s povrchy mimotělního oběhu, kardioplegie, ischemicko-reperfuzní poškození. Imunitní systém disponuje mechanismy, jež umožňují zajistit rovnováhu mezi pro- a protizánětlivými vlivy a tendencemi odpovědi na stimul a vliv mikroprostředí (aktivační, inhibiční - kompenzační), neboť právě excesivní aktivace imunitního systému může vyústit v SIRS spojený s multiorgánovým selháním i smrtí pacienta (1–6). Do SIRS se v počátku zapojuje hlavně vrozené složky imunity, humorální i buněčná. Zde jsou nejvíce aktivní neutrofilové a monocyty, u nichž dochází ke změnám produkce cytokinů, ROS i expresi membránových molekul (7–13). Pro jejich okamžitou odezvu na zákrok jsme zvolili právě tyto dvě buněčné populace a sledování změn exprese povrchových molekul, které souvisejí s inhibicí a ukončením zánětlivé odpovědi. Jedná se o molekuly CD200R, CD95 a CD95L, ty jsme doplnili o sCD200R.

CD200R je transmembránový glykoprotein typu I patřící do imunoglobulinové rodiny. Jeho exprese je omezena na imunitní buňky myeloidní a lymfoidní řady (14–21). Cytoplazmatická část receptoru nese motiv ITIM (inhibitory tyrosine immunomodulatory motif), který je typický pro inhibiční receptory, ale přenos signálu je zajištěn 3 tyrozinovými zbytky. Vazba CD200 s CD200R zahájí fosforylaci NPxY motivů tyrozinových zbytků, čímž umožní navázání PTB (phosphotyrosine-binding domain) adaptorových proteinů Dok1/2 (22, 23). Díky tomu dojde k vazbě SH2 motivu adaptorového proteinu s inositol fosfatázou (SHIP). Následující kroky (rekrutace RasGAP, inhibice MAPK, ERK atd.) vedou k inhibici NF- κ B, a tím i k inhibici syntézy mnoha prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , IL-6, TNF α). Naopak se zvýší syntéza protizánětlivých cytokinů IL-10 TGF- β . CD200R aktivace také posiluje diferenciaci T lymfocytů do Treg subsetu, aktivituIDO (Indol Dioxigenasy) atd. Interakce CD200R s CD200 je tedy zapojena do rezoluce zánětlivé odpovědi, udržení tolerance, snížení odpovědi na alergeny, dárcovské antigeny atd. Je zde však i negativní dopad, a to hlavně v případě rakovinného bujení. Zde interakce CD200/CD200R podporuje růst a metastazování, neboť rakovinné buňky často zvýšeně exprimují CD200 (24–30).

Vazba CD95 a CD95L spouští důležitou signální cestu, na jejímž konci může být apoptóza buňky, ale také její aktivace. CD95 patří do TNF α rodiny. CD95L je konstitučně exprimován v imunoprivilegovaných oblastech. Jeho exprese je zvýšená v případě ischemie, oxidačního stresu či zánětu i na dalších buňkách, včetně endotelu či buňkách imunitního systému. Jiná situace je u CD95, který je konstitučně exprimován na mnoha typech buněk, včetně aktivovaných leukocytů. Tím může dojít i k omezení jejich extravazace, neboť vazba CD95 na leukocytech s CD95L na endotelu navodí u imunitních buněk apoptózu, již předchází sestavení DISC (death-inducing signaling complex). DISC se skládá z receptoru CD95, adaptorových molekul FADD (Fas-associated with a death domain), prokaspázy 8 a 10 a cFLIP (FLICE-like inhibitory protein).

Navozením apoptózy imunitních buněk se oslabí a ukončuje zánětlivá odpověď. Vazba CD95 a CD95L však může mít i opačný dopad, tj. aktivaci buněk, zvýšení exprese

prozánětlivých cytokinů a zvýšení migrace. V takovém případě nejsou aktivovány kaspázy v DISC, k jehož sestavení ani nedochází. Jsou však aktivovány signální dráhy zahrnující ERK, MAPK a také NF- κ B (31–37).

Expresí CD200R, CD95, CD95L na imunitních buňkách pacientů podstupujících kardiochirurgický zákrok není dosud studována. Přitom tyto molekuly jsou zapojeny do následné imunitní odpovědi, která je pro další vývoj pacientova stavu velmi důležitá. My jsme zaznamenali změny exprese molekul CD200 a CD200R u pacientů po kardiochirurgické operaci a touto studií jsme doplnili a rozšířili poznatky o další důležitá fakta.

3. Cíl práce

1. stanovení exprese vybraných povrchových molekul na monocytech a granulocytech v daných časových bodech
2. zhodnocení dynamiky změn exprese v čase
3. stanovení koncentrace sCD200R v séru
4. zhodnocení dynamiky změn v koncentracích sCD200R v čase
5. posouzení vztahů mezi jednotlivými hodnotami
6. případné zhodnocení, zda intenzita odpovědi imunitního systému koreluje se změnami exprese sledovaných molekul.
7. zhodnocení přínosu studie a možnosti dalších kroků

4. Postup a metody

4.1 PACIENTI, DEMOGRAFICKÁ DATA, KLINICKÉ ASPEKTY

Studie byla schválena Etickou komisí Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Ve sledovaném souboru 30 pacientů (19 mužů a 11 žen), kteří byli před zařazením do studie ústně i písemně seznámeni se všemi náležitostmi a před zákrokem podepsali informovaný souhlas, jímž potvrdili svou účast ve studii. Mezi kritéria, která vylučovala pacienta ze zařazení do studie, patřila např. Předoperační infekce, jakýkoli jiný chirurgický zákrok v nedávné době, nádorové onemocnění, dysfunkce levé komory srdeční s ejekční frakcí nižší 30 %. Pacienti účastníci se studie podstoupili kardiochirurgický zákrok s použitím mimotělního oběhu.

Pacienti byly ve věku 52–84 let s mediánem EuroScore, tedy operačního rizika, 5,2; přičemž hodnoty 1–2 představují pacienty s nejnižším rizikem, střední riziko 3–5, vysoké riziko pak představují pacienti s hodnotou EuroScore nad 6. U EuroScore vyšším než 11 je mortalita udávána až 36,5 %, zatímco u EuroScore do 2 je 0,8 % (tab. 6; 449). U jednotlivých pacientů se lišila délka operačního zákroku, zaklampování aorty, krevní ztráty i doba hospitalizace po zákroku, a to dle závažnosti jejich předoperačního stavu a náročností operace

(tab. 1–5). Ačkoli všichni pacienti podstoupili operaci s použitím MO srdce, výkony na srdci samotném byly rozdílné. Byly prováděny chlopenní náhrady či plastiky, aortokoronární bypassy, léčba fibrilace síní operací MAZE aj. V žádném případě nebyla využita mechanická srdeční podpora. Někteří pacienti měli pooperační komplikace jako např. Síňové fibrilace, postižení plic, ledvin. Dva pacienti podstoupili operační revizi. Tito již předoperačně trpěli jinou vážnou chronickou nemocí (tab. 3). Počty hospitalizačních dní závisely na výskytu komplikací u pacientů a pochybovaly se od 7 do 58 dnů dle komplikací v pooperačním období.

Tab. 1 Demografická data pacientů

Pacienti (počet)	30
Muži/ženy	19/11
Věk (roky)	68,5 (52–84)
BMI	28,25 (22,7–39,1)
Ejekční frakce (%)	60 (15–75)
Diabetes mellitus (počet)	8
CHOPN (počet)	3
EuroSCORE (%)	5,2 (1,51–27,18)

Tab. 2 Data týkající se průběhu operace

Délka trvání MO (min)	106 (65–196)
Doba zaklamování aorty (min)	80 (43–137)
Celková krevní ztráta (ml/h)	575/44 (200–3300/41–72)
Pooperační pobyt v nemocnici (dny)	12 (7–58)

Tab. 3 Pooperační komplikace

Pooperační komplikace	Počet pacientů
Výrazný nárůst CRP	2
Síňová fibrilace	7
Chirurgická revize	2
Ledvinné selhání	1
Akutní respirační distress syndrom	2
Systémová zánětlivá reakce	1
Diseminované intravaskulární krvácení	1
Multiorgánové selhání	1
Kardiogenní šok	1
Reoperace	2

Tab. 4 Použití krevních náhrad

Typ krevní náhrady	Počet pacientů
Erytrocytární masa	25
Mražená krevní plazma	9
Trombocyty	3
Srážecí faktor – Protromplex	1
Fibrinogen	2

Tab. 5 Použitá medikace pre-, pooperačně

Doba podání medikace	Podaná medikace	Počet pacientů
Preop.	Statiny	13
	Fibráty	2
Poop.	Antibiotika	5
	Kortikoidy v důsledku operace	3
	Kortikoidy při zhoršení prvotního onemocnění	8
	Inotropní léky	28

Tab. 6 Mortalita dle Euroscore

EuroSkóre	Mortalita %
0–2	0,8
3–5	3
6–8	7,4
9–11	16,4
>11	36,5

(Rev Esp Cardiol. 2008;61:567-71. Vol. 61).

4.2 POPIS OPERACE

Všechny prováděné chirurgické zákroky byly prováděny s podporou konvenčního mimotělního oběhu. Krev byla odváděna (drénována) z těla společnou, tzv. two-stage kanylou odvádějící žilní krev z pravé síně a dolní duté žíly a krevní návrat zpět do těla byl zajištěn kanylou zavedenou do vzestupné aorty.

Mimotělní oběh sestával z těchto součástí: rotační pumpy (Stöckert Instrumente GmbH, München, Germany), membránového oxygenátoru s integrovaným skládacím zásobníkem, kardiotoického sání arteriální filtr 40 μ s odvodušňovací linkou (Dideco SrL, Mirandola, Italy). Systém mimotělního oběhu nebyl ošetřen hemokompatibilní substancí. Priming sestával z 500 ml roztoku Ringer laktátu, 500 ml reodextranu (Rheomacrodex), 5,000 IU heparin, 80 ml hydrogen uhličitanu sodného (NaHCO_3 8,4%), 20 ml 10% síranu hořečnatého a manitolu (1 g/kg váhy). Pacientům byl nitrožilně podán heparin v dávce 300 IU/kg, aby došlo k prodloužení aktivovaného částečného tromboplastinového času během operace minimálně na 480 s. Pacientům nebyl intravenózně podán žádný další lék, např. aprotinin nebo kortikosteroidy.

Kardiochirurgické zákroky byly prováděny v normotermii. Kardioplegické zastavení srdce bylo indukováno studeným krevním kardioplegickým roztokem, který složeným z krve a St. Thomasova roztoku (Ardeapharma, Sevetin, Czech Republic) v poměru 4:1. Tento byl aplikován antegrádně do kořene aorty. Opakován byl po 20 minutách. V průběhu napojení na mimotělní oběh byl průtok regulován pumpou tak, aby byla zajištěna perfuze tkání v hodnotách 2,4 l/min/m² povrchu těla a tlak byl na hodnotách mezi 50–60 mmHg. Po ukončení operace bylo podáno heparinové antidotum protamin sulfát v dávce 1:1.

4.2.1 VEDENÍ ANESTEZIE

Pacienti podstoupili anestezii v souladu s protokolem kardiochirurgického pracoviště, tj. anestezie byla zahájena podáním thiopentalu a midazolamu. Svalové relaxace se dosáhlo podáním cisakrakuria. Anestezie byla u pacientů dále udržována pomocí izofluranu, který byl

doplňován sufentanylem v daných časových rozestupech. V případě nutnosti byla přidána kontinuální infuze s propofolem. Byla monitorována oxygenace a saturace krve kyslíkem FiO_2 0,5, stejně tak byl udržován střední krevní tlak nad hodnotou 50 mm/Hg, v případě nutnosti zvýšit klesající tlak byl podán noradrenalin.

4.3 LABORATORNÍ METODIKY

K získání výsledků bylo využito těchto postupů:

- Flow cytometrie – ke zhodnocení exprese povrchových znaků
- ELISA – k určení sérového sCD200R

4.3.1 ODBĚR A ZPRACOVÁNÍ KREVNÍCH VZORKŮ

Krev z periferní žíly před, po, 1., 3., 7. den po operaci do vakuové odběrové soupravy s heparinem nebo trombinem (heparinized Vacutainer tubes a thrombin Vacutainer tubes BD; UK).

Koagulované krevní vzorky byly centrifugovány, aby došlo k oddělení séra a krevních buněk. Sérum bylo následně skladováno při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté použito k určení koncentrace solubilního receptoru CD200R pomocí ELISA kitu – ELISA Kit for CD200 Receptor 1 (CD200R1) – sandwich enzyme immunoassay (USCN; China) se senzitivitou 0,55 ng/ml. Výrobce bylo deklarováno, že při detekci sCD200R nedochází ke zkřížené reaktivitě s jinými podobnými proteiny, jako např. CD200R2.

Heparinizované krevní vzorky byly zpracovány okamžitě po odebrání. Do plné krve (50 μl) byly přidány značené protilátky (2,5 μl) a vzorky inkubovány při pokojové teplotě ve tmě po dobu 20 minut. Po uplynutí této doby bylo přidáno lyzační činidlo – 200 μl hypotonického roztoku NH_4Cl (OptiLyse, Immunotech, France) k lýze erytrocytů při pokojové teplotě v šeru po dobu 10 minut. Po této době byl přidán 0,5 ml PBS a vzorky byly zcentrifugovány (300 g po dobu 5 minut), promyty, supernatant resuspendován. Takto připravené vzorky byly analyzovány průtokovým cytometrem.

Veškeré použité značené protilátky byly myší izotypu IgG1 specifické pro lidské antigeny.

Anti-CD200R FITC (clone OX-108) (Serotec; UK); CD95L PE (clone 14C2) (Serotec; UK); anti-CD95 PE (clone UB2) (Beckman Coulter; CR); anti-CD14 (clone MEM-241) (Exbio; CR); izotypová kontrola myší IgG1 FITC a IgG1 PE (Caltag Laboratories; USA).

4.3.2 PŘÍSTROJOVÉ A PROGRAMOVÉ VYBAVENÍ

Data byla získána na FACS Calibur flow cytometer, jenž je pravidelně kalibrován pomocí CaliBRITE beads za použití FACSCComp software (BD; USA), za použití softwaru CellQuest (BD; USA) a výsledky byly vyhodnoceny programem FlowJo (Tree Star; USA).

Expresí povrchových molekul CD200R a CD95 na monocyttech a granulocytech je vyjádřena jako MFI (median fluorescence intensity) a zastoupení buněk exprimujících značený znak je vyjádřeno jako procento pozitivních CD200R⁺ a CD95⁺ z celkové populace zkoumaných buněk.

4.4 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

Výsledky byly hodnoceny statistickým softwarem Statistica 10 (Statsoft, USA) za využití těchto metod:

Shapiro-Wilkův test normality

Levenův test homogenity rozptylů

ANOVA

Friedmanova analýza pro znáhodněné bloky

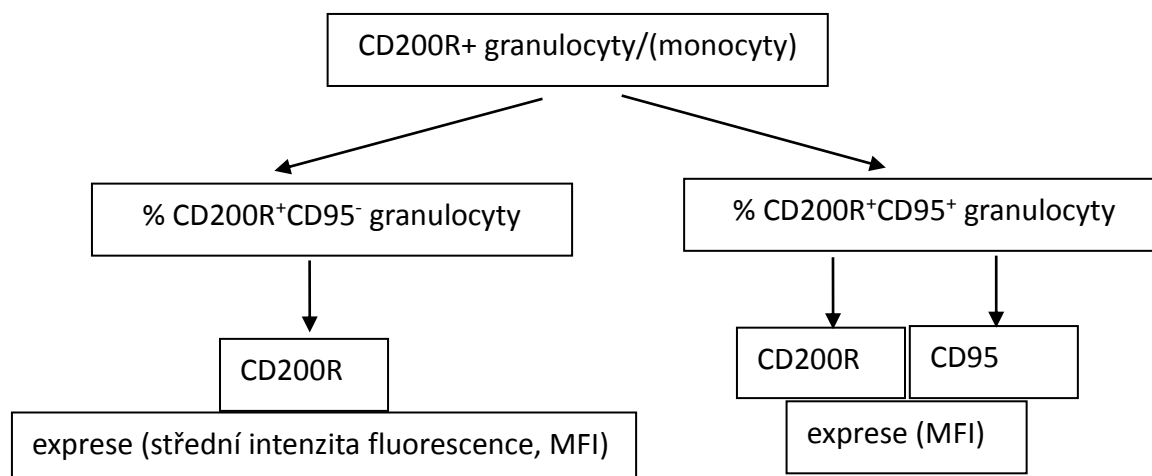
Post hoc analýza zahrnovala Dunnettův test či Wilcoxonův test.

Rozdíl na hladině $p \leq 0,05$ byl považován za statisticky významný.

Výsledkové hodnoty jsou uváděny jako medián, není-li uvedeno jinak. Grafy znázorňují medián, kvartil a rozsah neudlehlých hodnot.

5. Výsledky

Zkoumané znaky a populace a tabulka s přehledem naměřených hodnot (tab. 7).



Tab. 7 Přehled naměřených hodnot na granulocytech a monocytech

	před op.	po op.	1. den	3. den	7. den
granulo CD200R ⁺ %	5,0	17,8	14,9	14,6	13,1
granulo CD200R ⁺ CD95 ⁻ %	4,3	17,5	11,4	6,4	8,8
granulo CD200R ⁺ CD95 ⁺ %	0,51	0,23	0,60	2,06	1,15
granulo CD200R ⁺ CD95 ⁺ MFI CD95	47,1	46,2	44,8	46,7	45,5
granulo CD200R ⁺ CD95 ⁺ MFI CD200R	49,6	45,0	46,6	45,3	45,6
granulo CD200R ⁺ CD95L ⁺ MFI CD95L	57,8	50,2	59,3	80,3	60,1
mono CD200R ⁺ %	30,6	33,4	49,4	40,9	19,8
mono CD200R ⁺ CD95 ⁻ %	21,1	25,8	24,5	13,2	10,0
mono CD200R ⁺ CD95 ⁻ MFI CD200R	25,5	27,2	26,9	26,4	25,0
mono CD200R ⁺ CD95 ⁺ %	4,0	4,7	26,0	21,5	6,6
mono CD200R ⁺ CD95 ⁺ MFI CD200R	28,4	31,6	33,4	29,9	27,6
mono CD200R ⁺ CD95 ⁺ MFI CD95	36,1	36,4	42,7	40,8	38,6
koncentrace sCD200R1	96	294	105	78	93

5.1 EXPRESE ZNAKU CD200R, CD95 A CD95L NA GRANULOCYTECH

Předoperačně je relativní zastoupení granulocytů exprimujících CD200R v granulocytární populaci 5%. V pooperačním období však došlo k nárůstu a 1. den činilo relativní zastoupení CD200R⁺ granulocytů 17,8 %. V dalších odběrech byl patrný klesající trend, 7. pooperační den byla hodnota 13,1 % (graf 1). I přes zvýšení relativního zastoupení granulocytů nesoucích znak CD200R se však denzita exprese molekuly nezvýšila. U subpopulace CD95⁺CD200R⁺ došlo k jejímu poklesu.

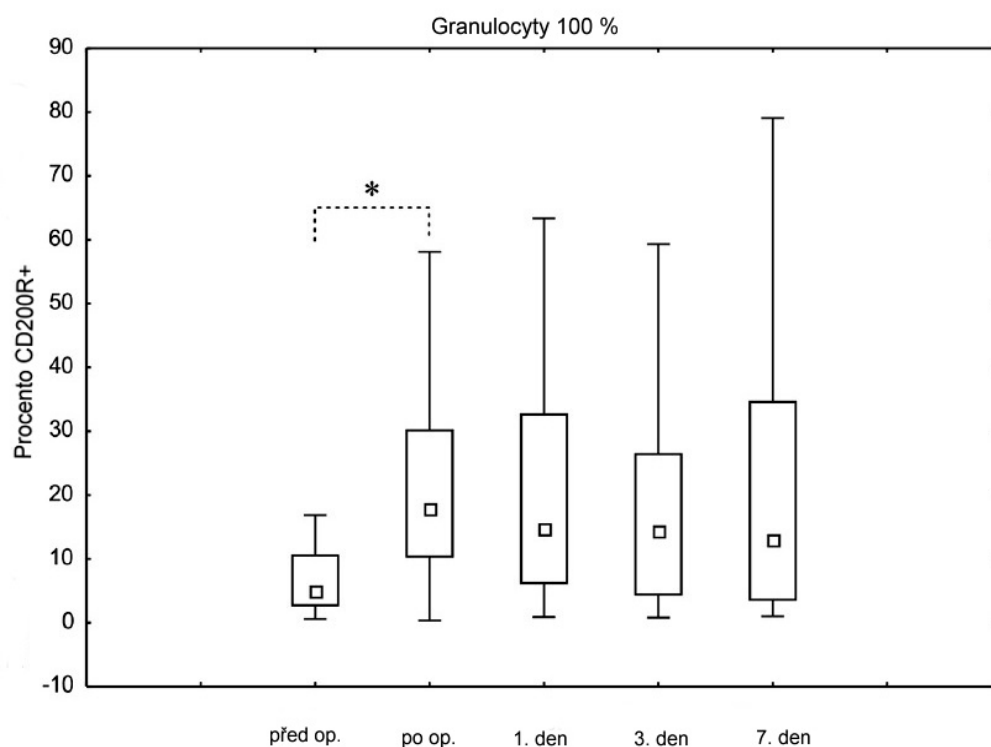
Molekula CD200R⁺ byla exprimována jak majoritní subpopulací granulocytů, tj. CD95⁻ (~ 90,6 % CD200R⁺ granulocytů, data nejsou zobrazena), tak subpopulací aktivovaných CD95⁺ granulocytů. Populace granulocytů nesoucích proapoptotickou CD95 je tedy značně malá, ačkoli by se dalo předpokládat, že dojde ke zvýšení její exprese na aktivovaných neutrofilech. Ani intenzita exprese CD95 na CD200R⁺ nerostla. Setkali jsme se

s opačným jevem, tedy poklesem exprese. Z předoperační hodnoty MFI CD95 47,1 došlo 3. den k poklesu na 44,8. Další sledované dny došlo k mírnému růstu hodnot, ale ty nedosáhly hodnoty výchozí a změny nebyly statisticky významné (graf 2).

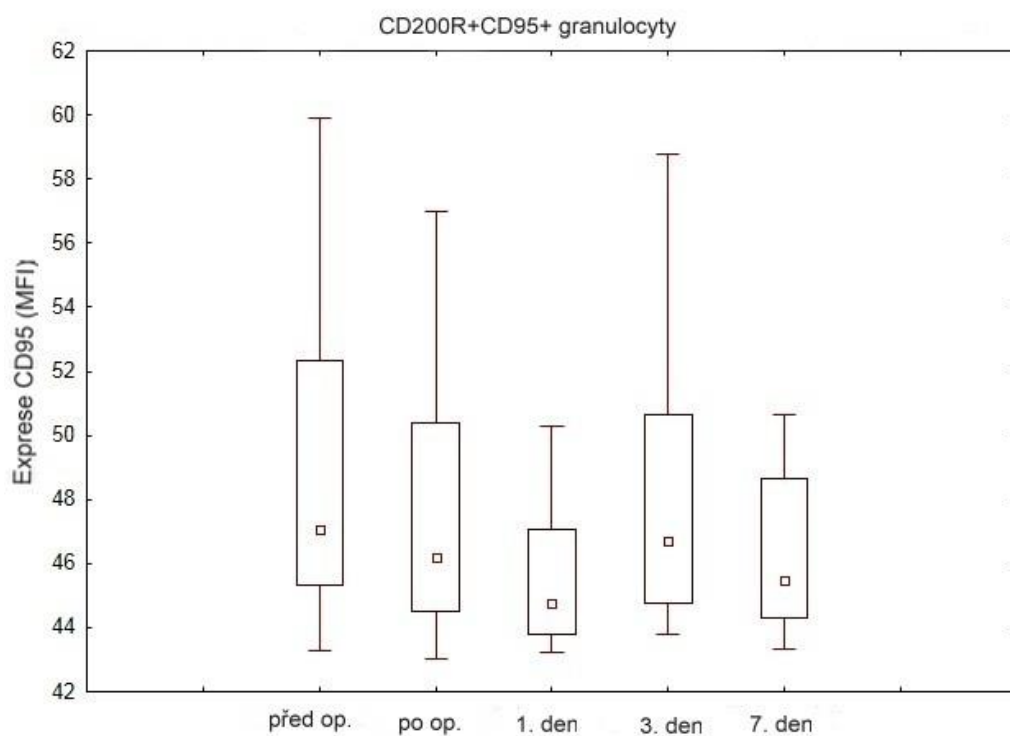
V případě subpopulace CD200R⁺CD95⁻ jsme zachytili výraznou dynamiku v relativním zastoupení. V předoperačních vzorcích činilo 4,3 %, zatímco pooperační hodnota byla 17,5 %, 3. pooperační den již byl patrný významný pokles na 6,4 % (graf 3). Jinou dynamiku změn jsme zdokumentovali u subpopulace CD200R⁺CD95⁺. Po zákroku došlo k poklesu hodnot z 0,51 na 0,23, s následným nárůstem a 3. pooperační den dosáhly hodnoty maxima, tj. 2,06 (graf 4). Intenzita exprese na CD200R na CD200R⁺CD95⁺ v prvním pooperačním měření poklesla ze 49,6 na 45,0 MFI (graf 5). V následujících měřeních sice došlo k nárůstu hodnot, ale ne na hodnoty předoperační.

Změny doznala exprese CD200R také na granulocytární subpopulaci CD200R⁺CD95⁻. Pooperační hodnota MFI CD200R poklesla ze 41,4 na 40,3. Další měření zachytilo nárůst hodnot, a to i nad baseline (graf 6).

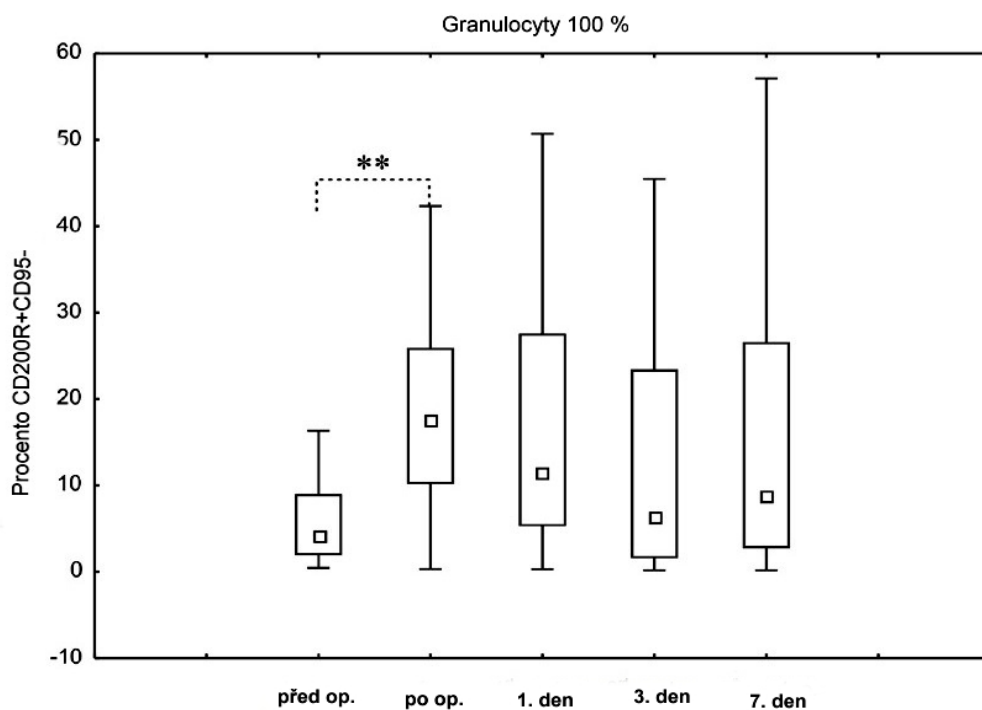
CD95L byla další sledovanou molekulou. Relativní zastoupení granulocytů CD200R⁺CD95L se během sledovaného období nezměnilo, stejně tak exprese CD200R. Významně se však změnila síla exprese CD95L. Po operaci došlo k poklesu z 57,8 na 50,2 následoval růst hodnot s maximem 3. pooperační den, kdy byla naměřena hodnota MFI 80,3. 7. den došlo k poklesu hodnotu blízkou výchozí, tj. na 60,1 (graf 7).



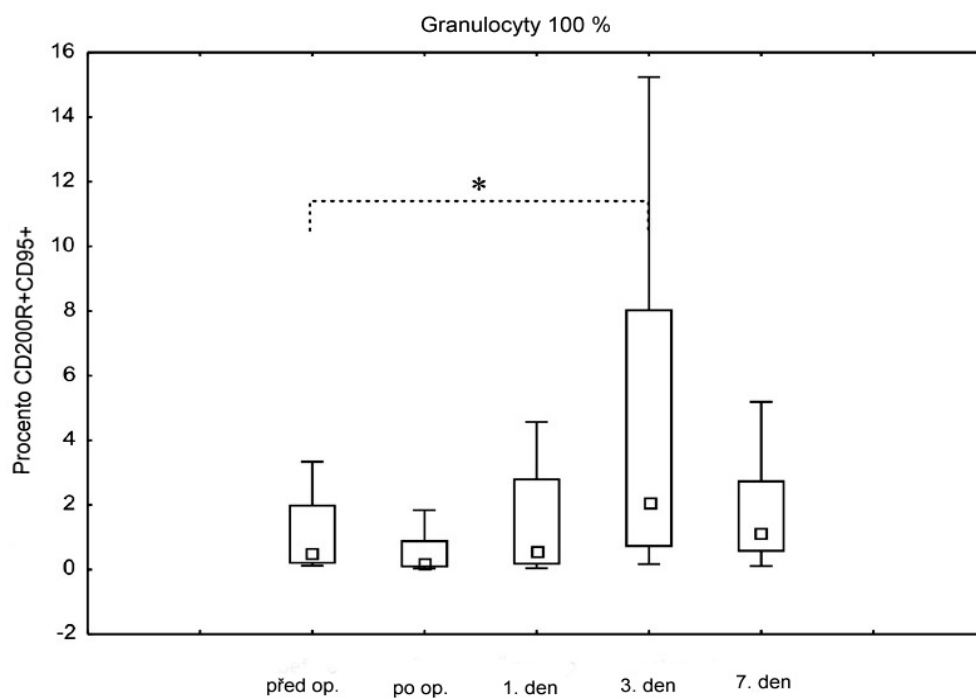
Graf 1: Relativní zastoupení CD200R⁺ granulocytů v granulocytární populaci
(* p < 0,05)



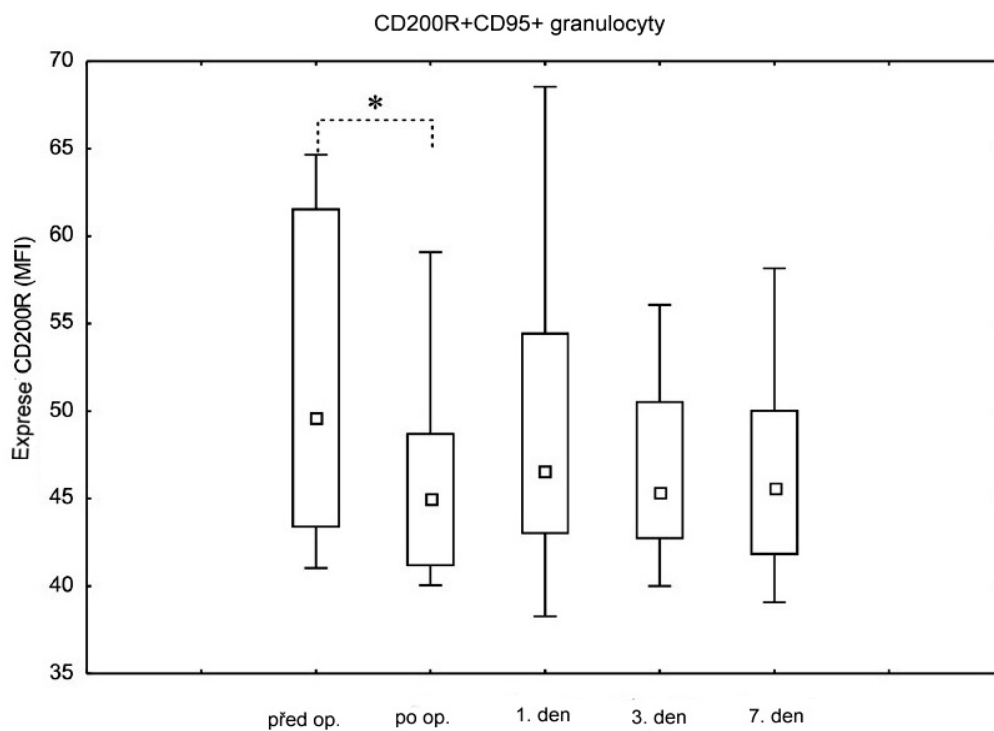
Graf 2: MFI hodnoty exprese CD95 na CD200R⁺CD95⁺ granulocytech



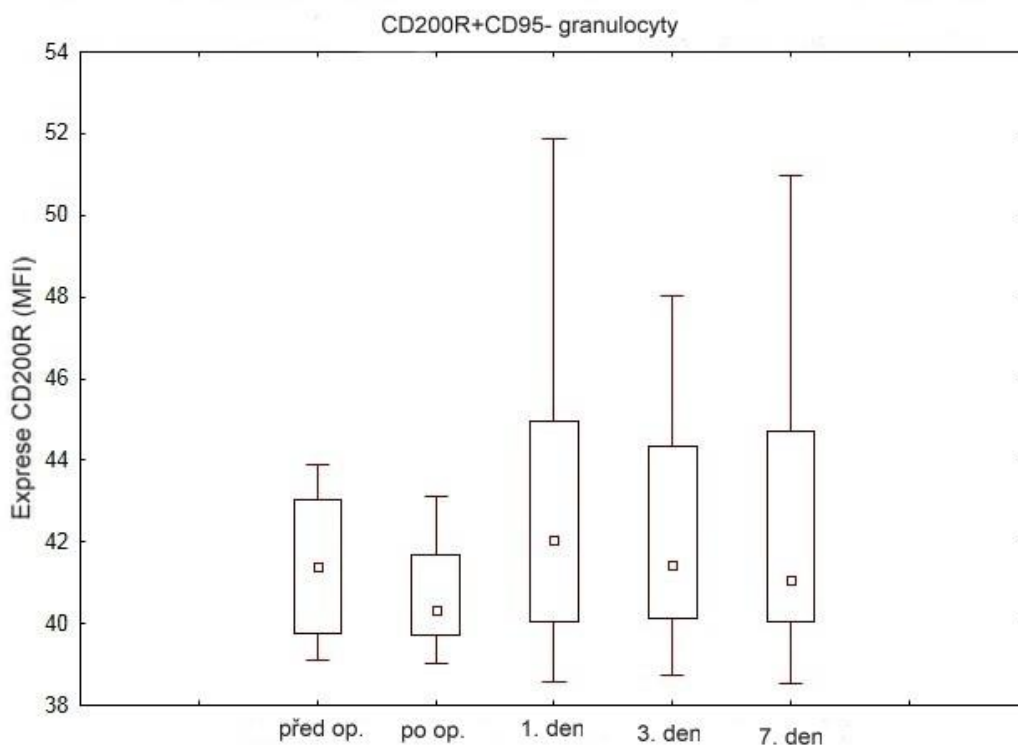
Graf 3: Relativní zastoupení CD200R⁺CD95⁻ granulocytů v granulocytární populaci (** p<0,01)



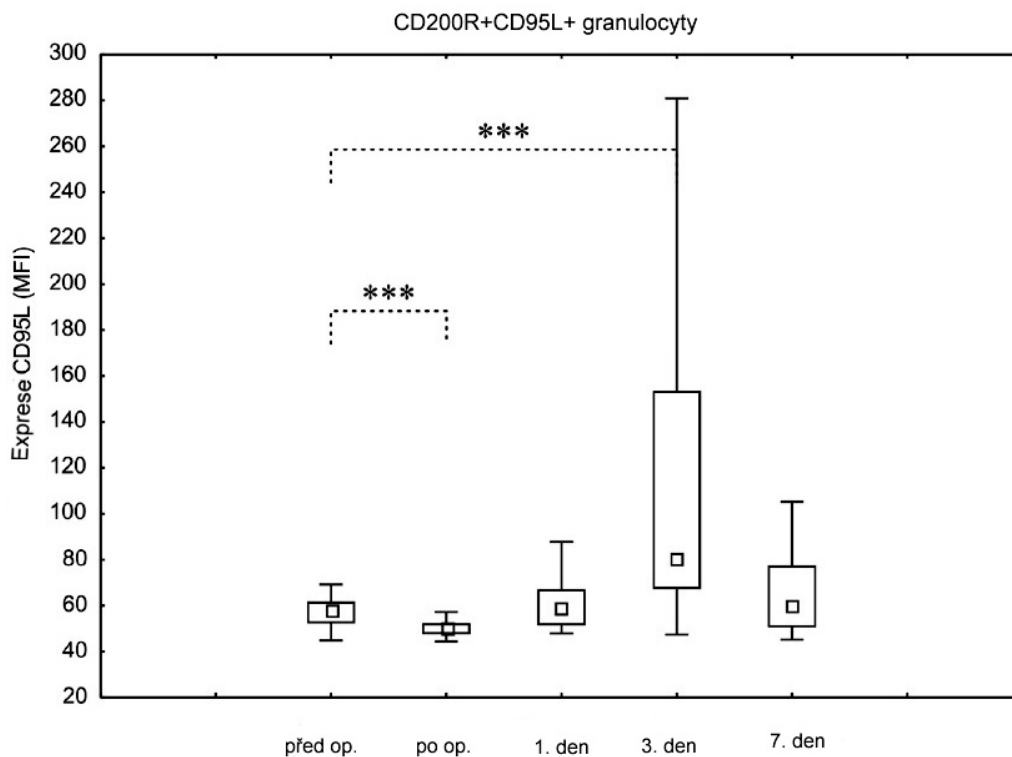
Graf 4: **Relativní zastoupení CD200R⁺CD95⁺granulocytů v granulocytární populaci**
 (* $p < 0,05$)



Graf 5: **MFI hodnoty exprese CD200R na CD200R⁺CD95⁺granulocytech**
 (* $p < 0,05$)



Graf 6: MFI hodnoty exprese CD200R na CD200R⁺CD95⁻ granulocytech

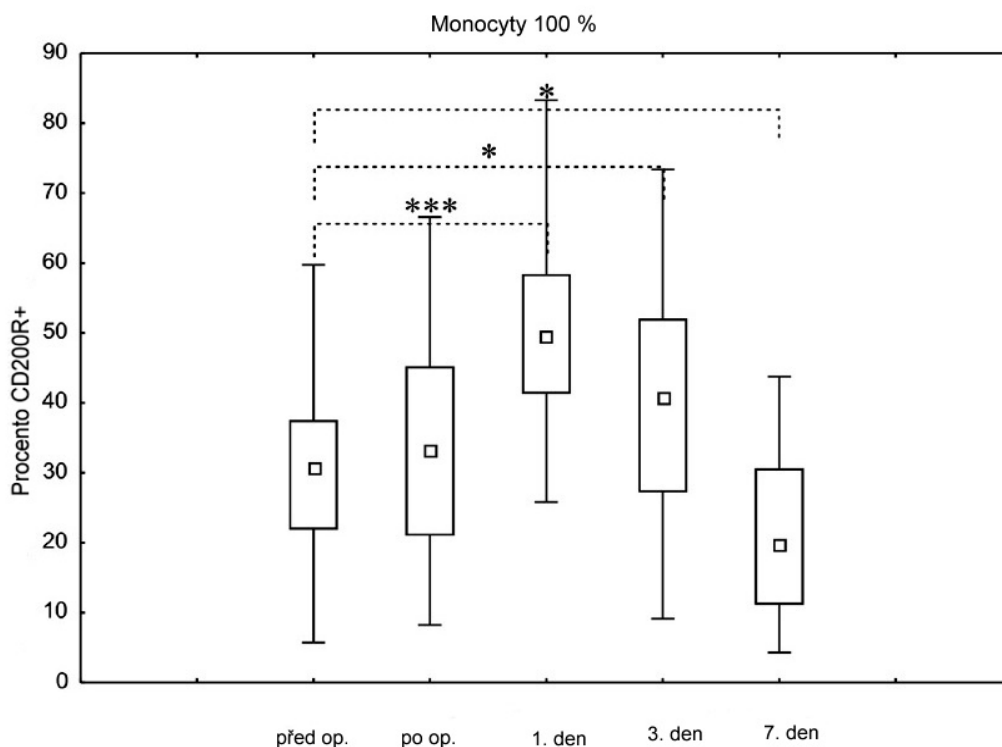


Graf 7: MFI hodnoty exprese CD95L na CD200R⁺CD95L⁺ granulocytech
 (***) $p < 0,00$

5.2 EXPRESE SLEDOVANÝCH MOLEKUL CD200R A CD95 NA MONOCYTECH

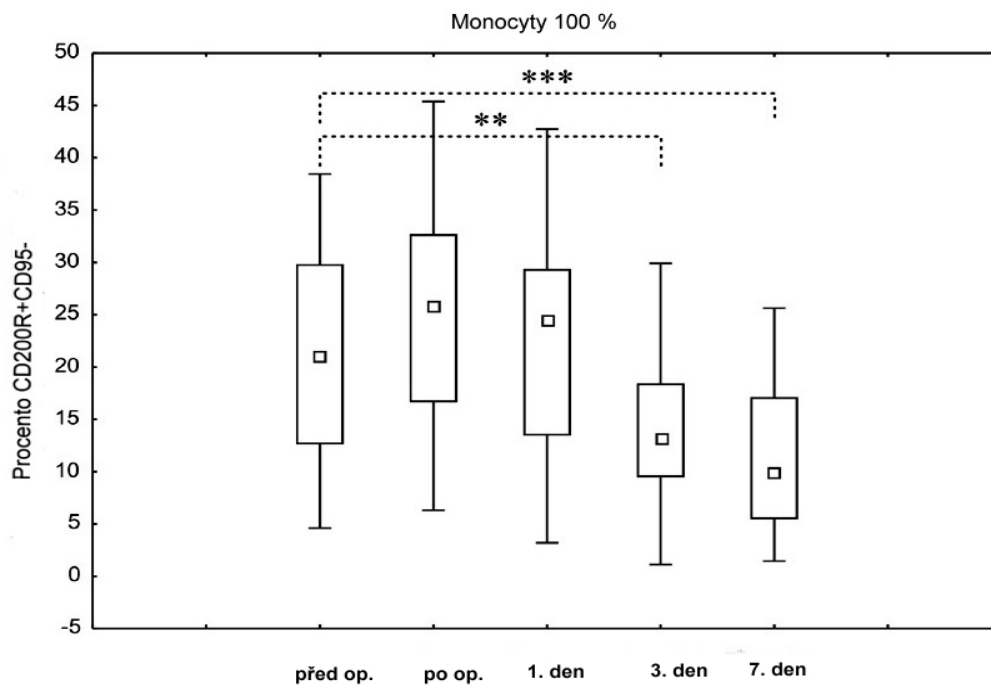
I v monocytární populaci jsme zachytili změny jak v relativním zastoupení jednotlivých subpopulací, tak v expresi sledovaných molekul. Relativní zastoupení CD200R⁺ monocytů výrazně vzrostlo během 3 dní z 30,6 na 49,4 %. Poté došlo k poklesu na 19,8 % (graf 8).

Stejně jako v granulocytární populaci v monocytární dominovala v předoperačním období subpopulace CD200R⁺CD95⁻. Relativní zastoupení této subpopulace v pooperačním období dále rostli, a to z 21,1 na 25,8 %. Mírný nárůst byl vystřídán propadem sledované hodnoty, které 7. den 10,0 % (graf 9). Krom těchto změn se také změnila MFI CD200R na CD95⁻ monocytech. Po nárůstu MFI bezprostředně po operaci z 25,5 na 27,2 hodnota klesala a 7. den se snížila pod předoperační hodnotu, a to na 25,0 (graf 10). Změny byly zaznamenány i v minoritní populaci CD200R⁺CD95⁺. Relativní zastoupení vzrostlo ze 4,0 na 26,0 % naměřených 3. pooperační den (graf 11). Tento nárůst byl provázen i zvýšením MFI CD200R a CD95. V případě MFI CD200R se hodnota zvýšila z předoperační 28,4 na 33,4 ve vzorku z 1. pooperačního dne. Sedmý den hodnota MFI CD200R klesla pod předoperační, a to na 27,6 (graf 12). MFI CD95 dosáhla maxima 3. den po operaci, došlo ke zvýšení z 36,1 na 42,7 (graf 13).



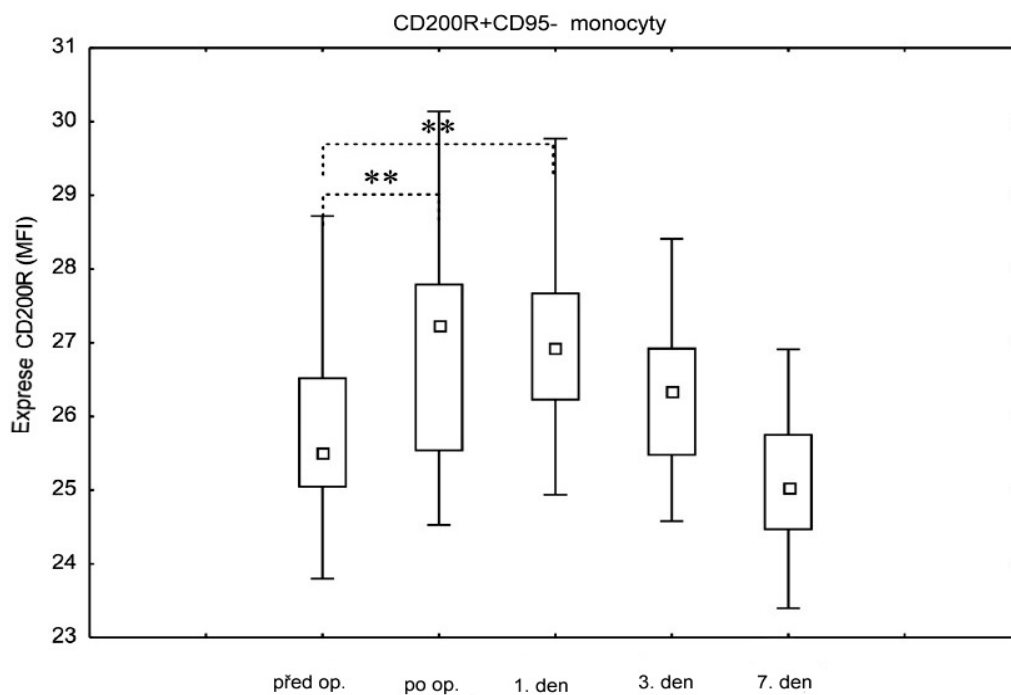
Graf 8: Relativní zastoupení CD200R⁺ monocytů v monocytární populaci

(* $p < 0,05$; *** $p < 0,00$)



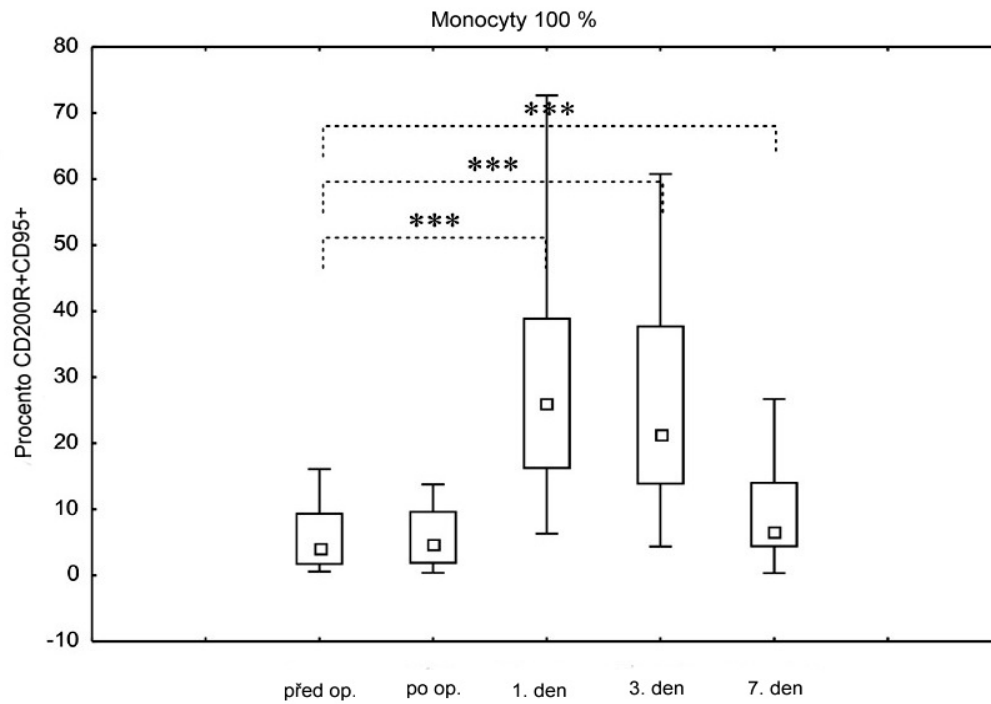
Graf 9: Relativní zastoupení CD200R⁺CD95⁻ monocytů

(** p<0,01; *** p<0,001)

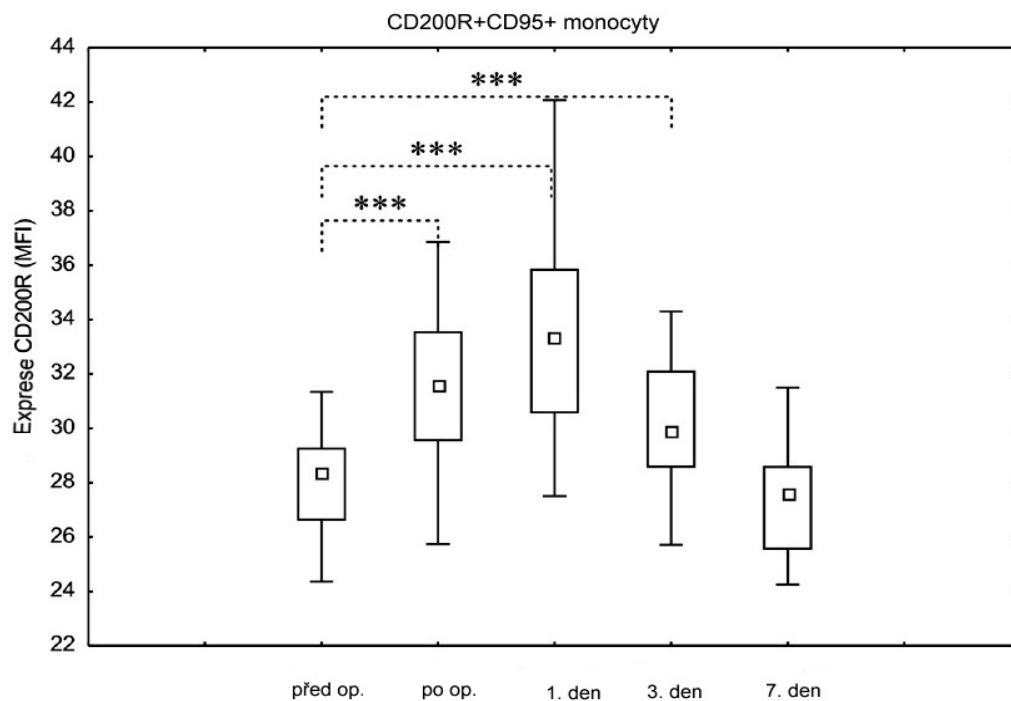


Graf 10: MFI hodnoty exprese CD200R na CD200R⁺CD95⁻ monocytech

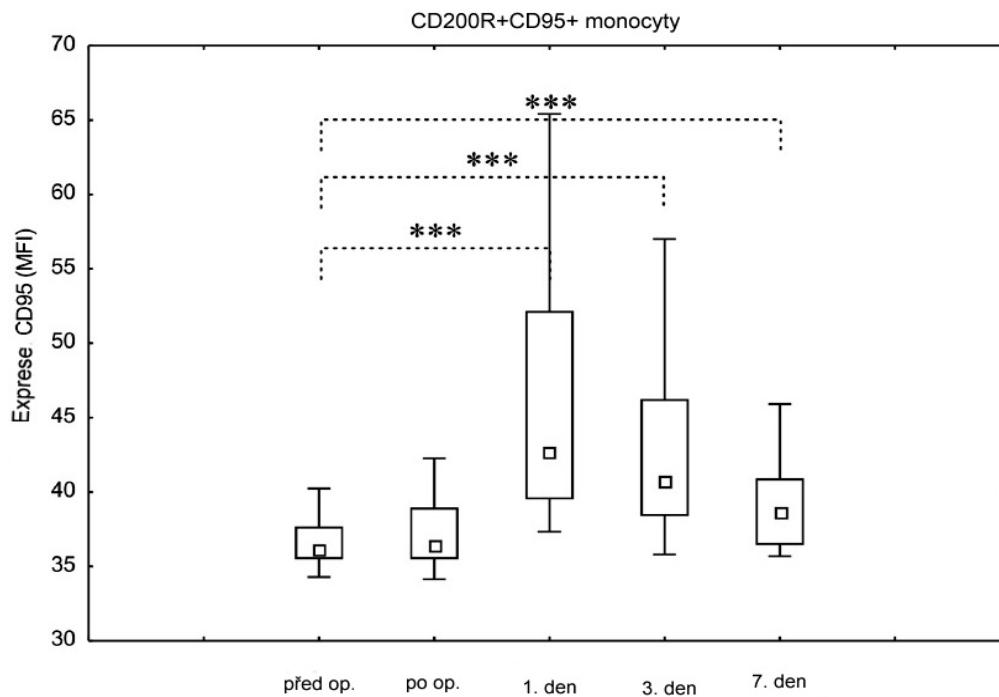
(** p<0,01)



Graf 11: Relativní zastoupení CD200R⁺CD95⁺ v monocytní populaci (***) p<0,001)



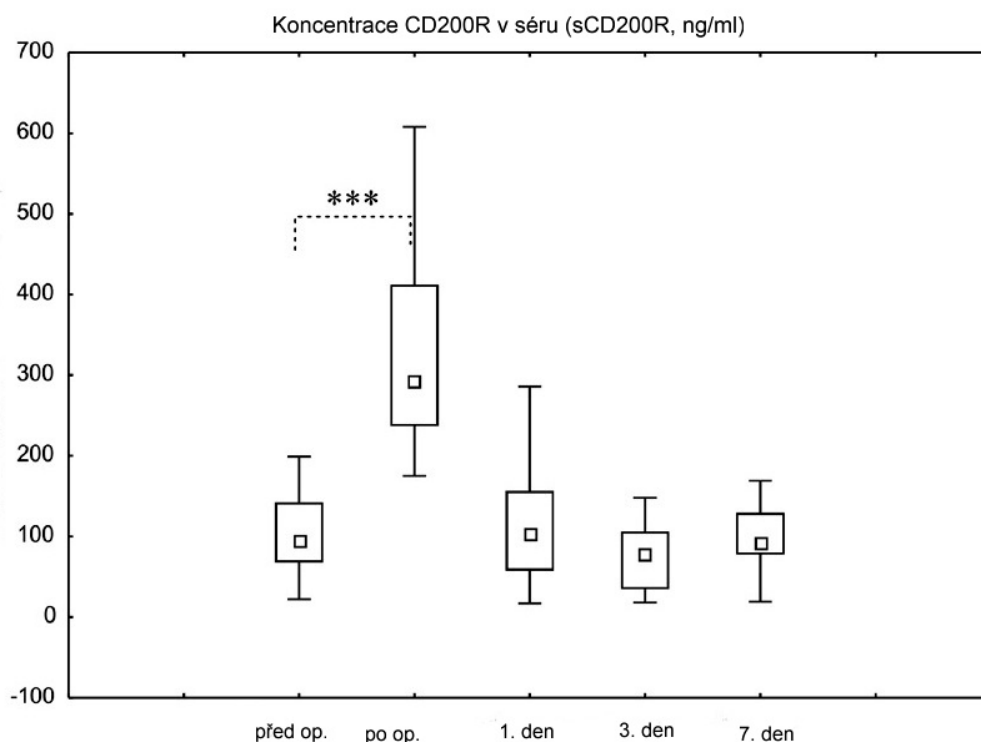
Graf 12: MFI hodnoty exprese CD200R na CD200R⁺CD95⁺ monocitech (***) p<0,001)



Graf 13: MFI hodnoty exprese CD95 na CD200R⁺CD95⁺ monocyttech
 (***) $p < 0,001$)

5.3 SÉROVÁ KONCENTRACE SOLUBILNÍHO RECEPTORU CD200R

Nejen hodnoty exprimovaných molekul byly operací ovlivněny. Ušetřen nezůstal ani receptor CD200R ve své solubilní podobě. Jeho koncentrace v séru prudce a výrazně stoupla okamžitě po operaci, a to z 96 na 294 ng/ml, přičemž snížení exprese CD200R byla zachycena jen u granulocytární subpopulace CD200R⁺CD95⁺. Další měřené hodnoty měly sestupný charakter, pouze poslední měřený den došlo opět k mírnému zvýšení oproti 3. dnu (graf 14). Dalo by se říci, že koncentrace sCD200R kopírovala v období po operaci a 1. den změny exprese CD200R u CD200R⁺CD95⁺.



Graf 14: Sérová koncentrace sCD200R

(*** $p < 0,001$)

6. Diskuse

Kardiochirurgický zákrok je vždy spojen s aktivací imunitního systému a rozvojem systémové zánětlivé odpovědi různé vážnosti, která může skončit i smrtí pacienta. Snížení peri- a pooperačních komplikací je hlavním cílem lékařského týmu. Ke snížení rizik může přispět volba operačního postupu. Dle dostupných dat se ukazuje, že např. off-pump či miniinvazivní zákroky vyvolávají menší odpověď, stejně tak může riziko snížit volba biomateriálů v mimotělním oběhu, druh anestezie či medikace (38–46). I přes mnohá preventivní a léčebná opatření není možné se SIRS zcela vyhnout. Operační zákrok může ovlivnit počty, fenotyp, tedy i aktivitu a funkce imunitních buněk.

V patogenezi SIRS, která je odpovědí na chirurgický zákrok, sehrávají velmi důležitou roli buňky vrozené imunity granulocyty a monocyty, které jsme vybrali pro naši studii. Sledovali jsme jak změny v zastoupení jednotlivých subpopulací nesoucích znaky CD200R, CD95, CD95, tak i změny intenzity v expresi zmíněných molekul, které mají inhibiční a imunoregulační charakter.

V pooperačním období docházelo ke zvýšení relativního zastoupení leukocytů nesoucích inhibiční receptor CD200R. Granulocytární populace odpověděla na zákrok rychleji. Maximální hodnoty byly zaznamenány již v prvním vzorku po operaci. U monocytů bylo maxima dosaženo 1. pooperační den. Relativní zastoupení granulocytů CD200R⁺CD95⁻ se zvýšilo, zatímco zastoupení populace CD200R⁺CD95⁺, která byla již před operací

menšinová, okamžitě po operaci dále pokleslo. U monocytů je situace jiná, rostou hodnoty obou populací, přičemž CD200R⁺CD95⁺ dosahuje 3. pooperační den vyšších hodnot než populace CD200R⁺CD95⁻.

Neutrofilů jsou považovány za hlavní iniciátory zánětlivé reakce po operačním zákroku. Jejich rychlejší reakce byla tedy očekávaná (47). Stejně jako tak se dalo očekávat, že bude převažovat populace CD95⁻, aby nedocházelo k velkým apoptotickým ztrátám neutrofilů, které jsou v této fázi odpovědi potřebné. Tato CD95 negativní populace je navíc také nositelem inhibiční molekuly CD200R. Dle všeho neutrofilů méně podléhají apoptóze, prodlužuje se jejich životnost, ale zároveň jsou také inhibovány přes CD200R, čímž se omezí jejich funkce a prozánětlivé působení. Je pravděpodobné, že i ony samy se pak zapojují do inhibice zánětlivé odpovědi. Snížení a oddálení apoptózy u granulocytů bylo potvrzeno v mnohých studiích, jedna z nich sleduje příčinnou souvislost mezi hladinami IL-6 a GM-CSF či IL-8, jejichž produkce se zvyšuje (48–52). Existují však i studie, např. Deloguova, které popisují zvýšení apoptózy neutrofilů během 24 hodin po operaci, za tímto jevem mohou stát zvýšené koncentrace cytokinů TNF α , IL-10 a také ROS (53).

U monocytů je situace jiná, zvyšuje se relativní zastoupení monocytů, které nesou proapoptotický receptor CD95. V jejich případě však nedochází ke zvýšení apoptózy, to může být dáno přítomností zatím přesně nepopsaných antiapoptotických sérových faktorů, změnami koncentrací cytokinů, přítomností LPS aj. (54–59). Není možné pominout ani fakt, že by se do procesu oddálení apoptózy mohl zapojit i receptor CD200R a jeho aktivace, a tím zapojení jiných signálních cest nutných pro přežití.

U granulocytární populace i přes mírný relativní nárůst subpopulace CD200R⁺CD95⁺ 1.–7. pooperační den dochází k poklesu exprese CD95 pod výchozí hodnotu. Zdá se tedy, že tato populace by mohla být zdrojem sCD95, který se odštěpuje z buněčné membrány. Dostupné studie popisují zvýšenou aktivitu metaloproteináz a také nárůst hodnot sCD95 v prvních hodinách po operaci (60–63).

Další sledovanou molekulou byla CD95L na granulocytární populaci exprimující CD200R. Od 1. pooperačního dne dochází k nárůstu exprese, s maximem 3. den, zatímco první pooperační měření zachycuje snížení. Tyto výsledky by tedy mohly být v souladu se studií Marsikové, která zachytila po operaci zvýšení koncentrace sCD95L. Námí zachycený pokles by mohl být způsobem odštěpením ligandu z membrány. Marsiková však sledovala hodnoty sCD95L pouze 24 hodin, zatímco my expresi CD95L 7 dní (64). Zvýšení exprese CD95L zachytil ve své studii také Papanthanasoglou. Zde však šlo o expresi na mononukleárech, jejíž zvýšení bylo provázeno zhoršením klinického stavu pacientů a rozvojem vážnější formy SIRS (55). Zvýšená intenzita exprese CD95L je provázena také zvýšenou apoptózou buněk nesoucích CD95. Působí tak protizánětlivě, u neutrofilů i samoregulačně. Je tu však další aspekt týkající se aktivace CD95. Nemusí vždy dojít k apoptóze, ale může být touto vaznou posílena migrace neutrofilů a tvorba ROS, IL-8 i TNF α (34, 65–67).

Na monocytární populaci je situace odlišná. Obě sledované buněčné populace CD200R⁺CD95⁻ i CD200R⁺CD95⁺ zvyšují své relativní zastoupení. Nárůst je však vystřídán poklesem relativního zastoupení CD200R⁺CD95⁻ monocytů, když hodnoty klesají až pod tu výchozí. Pokles CD200R⁺CD95⁺ je pomalejší. I když by se dalo spíše předpokládat, že tato populace, která je náchylnější k apoptóze, bude klesat rychleji a výrazněji. U monocytů pak

nedošlo jen k nárůstu relativního zastoupení CD200R⁺CD95⁺ monocytů, ale také ke zvýšení intenzity exprese CD95. Tento výsledek je v podstatě shodný se studiemi, které kultivují CD14⁺ monocyty se sérem pacientů se SIRS. V takovém prostředí zvyšují monocyty expresi CD95 (490). Toto zvýšení může být posíleno aktivací IRF-1 vlivem zvýšení hladin INF- γ v pooperačním období (68, 69).

Ačkoli by se dalo předpokládat, že dojde ke zvýšení exprese CD200R, když se zvýšilo i relativní zastoupení buněk, které ji nesou, nedošlo k tomu u neutrofilů. V literárních zdrojích je opakovaně zachycováno zvýšení exprese CD200R v důsledku zánětlivé reakce, což je v rozporu s našimi výsledky. Jen monocytární populace zvyšuje intenzitu exprese CD200R. 7. den se však hodnoty dostávají na hodnotu předoperační. Tuto rozdílnost v expresi CD200R na granulocytech a monocytech by bylo možné přičíst aktivitě C/EBP β . Studie provedená Dentesantem popisuje, že aktivita C/EBP β potlačuje expresi CD200R na aktivovaných mikrogliích, které jsou vlastně rezidentními makrofágy v centrální nervové soustavě. Tento protein, je-li aktivní, je pak zodpovědný za správnou granulocytózu a zrání neutrofilů, naopak u monocytů inhibuje proliferaci. Exprese tohoto transkripčního faktoru se zvyšuje v zánětlivém prostředí, vlivem zvýšené exprese IL-1 β , LPS, TNF α aj. (70–72).

Pokud bychom tedy generalizovali a vzali možnost, že zvýšená aktivita C/EBP β snižuje expresi CD200R i u dalších buněk imunitního systému, byla by v tomto ohledu odpovídající granulocytární populace, neboť C/EBP β podporuje i granulocytózu, což by odpovídalo zvýšení počtu neutrofilů a neměnné, či dokonce snížené intenzitě exprese CD200R. Monocytární populace, změny, které nastaly v námi sledovaném období, by tak Dentesantovým výsledkům nevyhovovala, ale je v souladu se studiemi potvrzujícími nárůst exprese CD200R v prozánětlivém prostředí (73–77). Udržení exprese CD200R na monocytech, navzdory možnému působení C/EBP β , by pak mohla být i pod taktovkou aktivace receptoru PPAR γ . Exprese tohoto receptoru se zvyšuje v prozánětlivém prostředí pod vlivem TNF α a IL-4 a má schopnost tlumit imunitní odpověď. Jedna ze studií dokládá, že právě stimulace tohoto receptoru vede k udržení exprese CD200R a CD200 na mikrogliích v centrální nervové soustavě (78–80).

Nezvýšení či přechodný pokles exprese CD200R na granulocytech může být ovšem způsoben také odštěpením molekuly CD200R za vzniku plazmatického sCD200R, jehož koncentrace se v séru pacientů pooperačně zvyšuje. První hodnoty poklesu exprese CD200R jsou ve shodě se zvýšením koncentrace sCD200R. Podobně jako je tomu u jiných solubilních receptorů, má i sCD200R antagonistickou povahu, což je dáno jeho vazbou na molekuly CD200, jimž tak zamezí vázat se na membránově vázané receptory a aktivovat je. I v tomto případě ovšem narážíme na nedostatek jiných pramenů, které by tento jev popisovaly. Jsou dostupné pouze studie týkající se kostního metabolismu, kdy u na lůžko upoutaných účastníků experimentu dochází ke zvýšení koncentrace sCD200R ve spojení se ztrátou kostní tkáně (81).

Vztah molekul CD95 a CD200R může být vzájemně se posilující co se inhibičního působení týká. CD95 mediovaná apoptóza může zastavit aktivaci signálních drah, které vedou před aktivaci ERK, PI3K, MAPK a NF- κ B (82). Stejně tak stimulace CD200R inhibuje zmíněné komponenty signálních cest, a to díky aktivaci RasGAP, čímž snižuje i riziko aktivace těch drah po stimulaci CD95, pokud by nedošlo k zahájení apoptotické signální cesty, která vede u buněk ke zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů (22, 23). CD200R by

tak mohla inhibovat jeden z mechanismů, který by mohl zastavit apoptotický proces. Je tedy možné, že koexprese obou molekul pomáhá udržet připravenost k apoptóze a zároveň inhibuje buněčnou aktivitu.

Podíváme-li se i na expresi dalších molekul, abychom získali širší obraz, odhaluje se, že monocyty jsou v pooperačním období spíše tlumené i tlumivé, klesá u nich exprese HLA, CD40, i kostimulačních molekul CD80, CD86, naproti tomu roste exprese CD95, CD200R, CD163 (13, 83). U neutrofilů se pak setkáváme s poklesem CD200R, CD95, naopak roste exprese CD166 a CD195, jež jsou zodpovědné za migraci a chemoatrakci těchto buněk do místa postižení (84). Možnost migrace společně se snížením citlivosti k apoptóze dává neutrofilů prozánětlivý potenciál.

Snažili jsme se též zhodnotit, zda síla změn exprese jednotlivých námi měřených molekul koreluje s tíží pooperačního stavu pacientů, tj. zda pacienti s prokázanými pooperačními komplikacemi vykazují výrazně vyšší či nižší expresi CD200R, CD95, CD95L či koncentraci sérového sCD200R. Tato korelace se nám však nepodařila zachytit. Nemůžeme ani vyjít či porovnat naše výsledky s jinými autory, neboť exprese těchto molekul u kardiochirurgických pacientů není v literatuře popsána.

7. Závěr a zhodnocení přínosu studie a možnosti dalších kroků

V naší studii se podařilo potvrdit, že kardiochirurgický zákrok má vliv na aktivitu imunitního systému. Zasahuje také buňky nespecifické imunity, které jsme sledovali, tj. monocyty a granulocyty. Obě buněčné populace u všech zúčastněných pacientů mění expresi námi sledovaných molekul i relativní zastoupení jednotlivých subpopulací. V pooperačním průběhu se také mění koncentrace sCD200R. Tyto změny tak reflektují reakci imunitního systému na stresovou situaci, kterou je právě operační zákrok. Sílu odpovědi, a tedy i nástup možných klinických komplikací u pacientů po operaci, však nelze pomocí těchto parametrů predikovat. Dynamika změn není u pacientů s komplikacemi v podobě SIRS, selhávání orgánů atd. jednotná. Tato studie pak má význam hlavně v kontextu s dalšími prováděnými studiemi, které sledují jiné imunitní parametry, které chirurgický zákrok ovlivňuje. Díky tomu je možné získat ucelený pohled na problematiku reakce imunitního systému na chirurgický zákrok. Tyto znalosti pak mohou být uplatněny i v klinické praxi.

Navíc je nutné zmínit, že neexistují studie (nepodařilo se nám najít žádnou), které by sledovaly právě expresi CD200R a CD95, CD95L u pacientů po kardiochirurgickém zákroku. V tomto ohledu lze práci prezentovat jako prioritní.

Studie měla své limitace hlavně v počtech pacientů, heterogenitě souboru (věk, pohlaví) i stavu pacientů před operací (komorbidita), lišily se provedené operační zákroky, jejich časová náročnost i personál, který se na operacích podílel.

Dalšími možnými kroky po této prezentované studii by pak mohlo být srovnání změn exprese molekul u různých typů operací, tj. off-pump, miniinvazivní operaci, větší homogenizaci skupiny pacientů. Zde se však naráží na počty pacientů a klinické indikace k daným typům operací, které plně náleží do rukou chirurgů, či připojit do zkoumání též expresi molekuly CD200. Ovšem je otázkou, zda by, vlivem široké distribuce a exprese na mnoha typech tělních buněk, změny její exprese byly dostatečně vypovídající.

8. Literatura

1. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost.* 2009;101(1):36-47.
2. Anselmi A, Abbate A, Girola F, et al. Myocardial ischemia, stunning, inflammation, and apoptosis during cardiac surgery: a review of evidence. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004;25(3):304-11.
3. Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol.* 2005;14(4):170-5.
4. P. Riedemann NC, Ward PA. Complement in Ischemia Reperfusion Injury. *Am J Pathol.* 2003;162(2): 363–367.
5. Santarpino G, Caroleo S, Onorati F, et al. Inflammatory response after cardiopulmonary bypass: a randomized comparison between conventional hemofiltration and steroids. *J Cardiovasc Surg.* 2009;50(4):555-64.
6. Vallely MP, Bannon PG, Bayeld MS, et al. Endothelial activation after coronary artery bypass surgery: Comparison between onpump and off-pump techniques. *Heart Lung Circ.* 2010;19(8):445-52.
7. Menger M, Vollmar B. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? *Langenbecks Arch Surg.* 2004; 389: 475-484.
8. Rossaint J, Berger C, Van Aken H, et al. Cardiopulmonary Bypass during Cardiac Surgery Modulates Systemic Inflammation by Affecting Different Steps of the Leukocyte Recruitment Cascade. *PLoS One.* 2012; 7(9): e45738.
9. Kolackova M, Krejsek J, Svitek V, et al. The Effect of Conventional and Mini-Invasive Cardiopulmonary Bypass on Neutrophil Activation in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting. *Mediators Inflamm* 2012;2012:152895.
10. Meadows JP, Tumlin JA, Clemens MG, et al. Changes in neutrophil activity following cardiovascular surgery. *Open Access Surgery* 2014;4:1-9.
11. Karu I, Taal G, Zilmer K, et al. Inflammatory/oxidative stress during the first week after different types of cardiac surgery. *Scand Cardiovasc J.* 2010;44(2):119-24.
12. Fink R, Al-Obaidi M, Grewal S, et al. Monocyte activation markers during cardiopulmonary bypass. *Perfusion.* 2003;18(2):83-6.
13. Kolackova M, Kudlova M, Kunes P, et al. 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.
14. Gorczynski RM, Chen Z, Kai Y, et al. CD200 is a ligand for all members of the CD200R family of immunoregulatory molecules. *J Immunol.* 2004;172(12):7744-9.
15. Gorczynski RM. CD200:CD200R-Mediated Regulation of Immunity. *ISRN Immunology*, vol. 2012, Article ID 682168, 18 pages, 2012.
16. Zhang S, Cherwinski H, Sedgwick JD, et al. Molecular mechanisms of CD200 inhibition of mast cell activation. *J Immunol.* 2004;173(11):6786-93.
17. Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, et al. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2(CD200). *Science* 2000;290:1768-1771.
18. Jenmalm MC, Cherwinski H, Bowman EP, et al. Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor. *J Immunol* 2006;176(1):191-9.
19. Wright GJ, Cherwinski H, Foster-Cuevas M, et al. Characterization of the CD200 receptor

- family in mice and humans and their interactions with CD200. *J Immunol.* 2003;171(6):3034-46.
20. Hatherley D, Lea SM, Johnson S, Barclay AN. Structures of CD200/CD200 receptor family and implications for topology, regulation, and evolution. *Structure.* 2013;21(5):820-32.
21. Torrero MN, Larson D, Hübner MP, et al. CD200R surface expression as a marker of murine basophil activation. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology.* 2009;39(3):361-369.
22. Mihrshahi R, Neil Barclay AN, Brown MH. Essential Roles for Dok2 and RasGAP in CD200 Receptor-Mediated Regulation of Human Myeloid Cells. *J Immunol.* 2009; 183(8):4879-4886.
23. Zhang A, S, Phillips JH. Identification of tyrosine residues crucial for CD200R-mediated inhibition of mast cell activation. *J Leukoc Biol.* 2006;79(2):363-8.
24. Gorczynski RM, Lee L, Boudakov I. Augmented Induction of CD4+CD25+ Treg using monoclonal antibodies to CD200R. *Transplantation.* 2005;79(9):1180-3.
25. Gorczynski RM, Chen Z, Lee L, Yu K, Hu J. Anti-CD200R ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *Clin Immunol.* 2002;104:256-264.
26. Memarian A, Nourizadeh M, Masoumi F, et al. Upregulation of CD200 is associated with Foxp3+ regulatory T cell expansion and disease progression in acute myeloid leukemia. *Tumour Biol.* 2013;34(1):531-42.
27. Rygiel TP, Karnam G, Goverse G, et al. CD200-CD200R signaling suppresses anti-tumor responses independently of CD200 expression on the tumor. *Oncogene.* 2012;31(24):2979-88.
28. Gorczynski RM, Cattral MS, Chen Z, et al. An immunoadhesin incorporating the molecule OX-2 is a potent immunosuppressant that prolongs allo- and xenograft survival. *J Immunol.* 1999;163:1654-60.
29. Hernangómez M, Carrillo-Salinas FJ, Mecha M, et al. Brain Innate Immunity in the Regulation of Neuroinflammation: Therapeutic Strategies by Modulating CD200-CD200R Interaction Involve the Cannabinoid System. *Current Pharmaceutical Design.* 2014;20(29):4707-4722.
30. Fraser SD, Sadofsky LR, Kaye PM, Hart SP. Reduced expression of monocyte CD200R is associated with enhanced proinflammatory cytokine production in sarcoidosis. *Scientific Reports.* 2016;6:38689.
31. Grosjean MB, Lenzlinger PM, Stahel PF, et al. Immunohistochemical characterization of Fas (CD95) and Fas Ligand (FasL/CD95L) expression in the injured brain: relationship with neuronal cell death and inflammatory mediators. *Histol Histopathol.* 2007;22(3):235-50.
32. Kawahito K, Misawa Y, Fuse K. Transient rise in serum soluble Fas (APO-1/CD95) in patients undergoing cardiac surgery. *Artif Organs.* 2000;24(8):628-31.
33. Kunes P, Mandak J, Harrer J, et al. 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):41-6.
34. Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):26-35.
35. Scholz M, Simon A, Berg M, et al. In vivo inhibition of neutrophil activity by a FAS (CD95) stimulating module: arterial in-line application in a porcine cardiac surgery model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127(6):1735-42.

36. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 2009;30:180-192.
37. Torre D, Tambini R, Manfredi M, et al. Circulating levels of FAS/APO-1 in patients with the systemic inflammatory response syndrome. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;45(4):233-6.
38. Anselmi A, Abbate A, Girola F, et al. Myocardial ischemia, stunning, inflammation, and apoptosis during cardiac surgery: a review of evidence. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 25(3): 304-11.
39. Kolackova M, Krejsek J, Svitek V, et al. The Effect of Conventional and Mini-Invasive Cardiopulmonary Bypass on Neutrophil Activation in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting. *Mediators of Inflammation.* 2012;2012:152895.
40. Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol* 2005; 14(4): 170-5.
41. Ng CS, Wan S. Limiting inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pharmaceutical strategies. *Curr Opin Pharmacol.* 2012;12(2):155-9.
42. McGuinness J, Bouchier-Hayes D, Redmond JM. Understanding the inflammatory response to cardiac surgery. *Surgeon.* 2008;6(3):162-71.
43. Vohra HA, Whistance R, Modi A, et al. The Inflammatory Response to Miniaturised Extracorporeal Circulation: A Review of the Literature. *Mediators of Inflammation.* 2009;2009:707042.
44. Aydin NB, Gercekoglu H, Aksu B, et al. Endotoxemia in coronary artery bypass surgery: A comparison of the off-pump technique and conventional cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;125(4):843-8.
45. Okubo N, Hatori N, Ochi M, et al. Comparison of m-RNA expression for inflammatory mediators in leukocytes between on-pump and off-pump coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;9(1):43-9.
46. El Azab SR, Doha N, Rady A, et al. The cytokine balance during CABG surgery with and without cardiopulmonary bypass. *Egyptian Journal of Anaesthesia.* 2010;26(4):281-286.
47. Kolackova M, Kudlova M, Kunes P, et al. 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.
48. Chello M, Mastroberto P, Quirino A, et al. Inhibition of neutrophil apoptosis after coronary bypass operation with cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2002;73(1):123-9.
49. Fanning NF, Porter J, Shorten GD, et al. Inhibition of neutrophil apoptosis after elective surgery. *Surgery.* 1999;126(3):527-34.
50. Kobayashi E, Yamauchi H. Interleukin-6 and a delay of neutrophil apoptosis after major surgery. *Arch Surg.* 1997;132(2):209-210.
51. Matsuda T, Saito H, Fukatsu K, et al. Cytokine-modulated inhibition of neutrophil apoptosis at local site augments exudative neutrophil functions and reflects inflammatory response after surgery. *Surgery.* 2001;129(1):76-85.
52. Suzuki R, Iwase M, Miyaoka K, et al. Modulation of neutrophil apoptosis in plasma of patients after orthognathic surgery. *J Surg Res.* 2006;130(1):110-8.
53. Delogu G, Moretti S, Famularo G, et al. Circulating neutrophils exhibit enhanced apoptosis associated with mitochondrial dysfunctions after surgery under general anaesthesia.

Acta Anaesthesiol Scand. 2001;45(1):87-94.

54. Sbrana S, Parri MS, De Filippis R, et al. Monitoring of monocyte functional state after extracorporeal circulation: a flow cytometry study. *Cytometry B Clin Cytom.* 2004;58(1):17-24.

55. Papathanassoglou ED, Moynihan JA, McDermott MP, et al. Expression of Fas (CD95) and Fas ligand on peripheral blood mononuclear cells in critical illness and association with multiorgan dysfunction severity and survival. *Crit Care Med.* 2001;29(4):709-18.

56. Park DR, Thomsen AR, Frevert CW, et al. Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol.* 2003;170(12):6209-16.

57. Liles WC, Kiener PA, Ledbetter JA, et al. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med.* 1996;184(2):429-40.

58. Perlman H, Pagliari LJ, Nguyen Net, et al. The Fas-FasL death receptor and PI3K pathways independently regulate monocyte homeostasis. *Eur J Immunol.* 2001;31(8):2421-30.

59. Park DR, Thomsen AR, Frevert CW, et al. Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol.* 2003;170(12):6209-16.

60. Mayers I, Hurst T, Puttagunta L, et al. Cardiac surgery increases the activity of matrix metalloproteinases and nitric oxide synthase in human hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;122(4):746-52.

61. Djebara S, Cauchie P, Alewaeters A, et al. CD64, a marker of leucocyte activation kinetics after uncomplicated cardiac surgery. *Critical Care.* 2010;14(Suppl 1):P16.

62. Iwase M, Kondo G, Watanabe H, et al. Regulation of Fas-mediated apoptosis in neutrophils after surgery-induced acute inflammation. *J Surg Res.* 2006;134(1):114-23.

63. Paunel-Görgülü A, Lögters T, Flohé S, et al. Stimulation of Fas signaling down-regulates activity of neutrophils from major trauma patients with SIRS. *Immunobiolog.* 2011;216(3):334-42.

64. Marsik C, Halama T, Cardona F, et al. Regulation of Fas (APO-1, CD95) and Fas ligand expression in leukocytes during systemic inflammation in humans. *Shock.* 2003;20(6):493-6.

65. Scholz M, Simon A, Berg M, et al. In vivo inhibition of neutrophil activity by a FAS (CD95) stimulating module: arterial in-line application in a porcine cardiac surgery model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127(6):1735-42.

66. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity.* 2009;30:180-192.

67. Lee KH, Feig C, Tchikov V, et al. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J.* 2006;25(5):1009-23.

68. Vaki I, Kranidioti H, Karagianni V, et al. An early circulating factor in severe sepsis modulates apoptosis of monocytes and lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2011;89(3):343-9.

69. Conte E, Manzella L, Zeuner A, et al. Involvement of interferon regulatory factor-1 in monocyte CD95 expression and CD95-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* 2003;10(5):615-7.

70. Cardinaux JR, Allaman I, Magistretti PJ. Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBPbeta and C/EBPdelta in astrocytes. *Glia.* 2000;29:91-97.

71. Xia L, Xie X, Liu Y, et al. Peripheral Blood Monocyte Tolerance Alleviates Intraperitoneal Lipopolysaccharides-Induced Neuroinflammation in Rats Via Upregulating the CD200R Expression. *Neurochem Res.* 2017 Jun 29.
72. Elshal MF, Aldahlawi AM, Saadah OI, et al. Expression of CD200R1 and its Ligand CD200 on T-helper Lymphocytes of Pediatric Patients with Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Clin Lab.* 2016;62(8):1521-1529.
73. Dentesano G, Straccia M, Ejarque-Ortiz A, Tusell JM, Serratoso J, Saura J, Solà C. Inhibition of CD200R1 expression by C/EBP β in reactive microglial cells. *J Neuroinflammation.* 2012;9:165.
74. Gutsch R, Kandemir JD, Pietsch D, et al. CCAAT/enhancer-binding protein beta inhibits proliferation in monocytic cells by affecting the retinoblastoma protein/E2F/cyclin E pathway but is not directly required for macrophage morphology. *J Biol Chem.* 2011;286(26):22716-29.
75. Hirai H, Zhang P, Dayaram T, et al. C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol.* 2006;7(7):732-9.
76. Huber R, Pietsch D, Panterodt T, Brand K. Regulation of C/EBP β and resulting functions in cells of the monocytic lineage. *Cell Signal.* 2012;24(6):1287-96.
77. Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E, et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.* 2007;6(2):137-43.
78. Reddy RC, Narala VR, Keshamouni VG, et al. Sepsis-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is mediated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Blood.* 2008;112(10):4250-8.
79. von Knethen A, Brüne B. PPARgamma--an important regulator of monocyte/macrophage function. *Arch Immunol Ther Exp. (Warsz).* 2003;51(4):219-26.
80. Dentesano G, Serratoso J, Tusell JM, et al. CD200R1 and CD200 expression are regulated by PPAR- γ in activated glial cells. *Glia.* 2014;62(6):982-98.
81. Kos O, Hughson RL, Hart DA, et al. Elevated serum soluble CD200 and CD200R as surrogate markers of bone loss under bed rest conditions. *Bone.* 2014;60:33-40.
82. Lee KH, Feig C, Tchikov V, et al. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J.* 2006;25(5):1009-23.
83. Holmannova D, Kolackova M, Kunes P, et al. Impact of cardiac surgery on the expression of CD40, CD80, CD86 and HLA-DR on B cells and monocytes. *Perfusion.* 2016;31(5):391-400.
84. Holmannova D, Kolackova M, Mandak J. et al. Effects of conventional CPB and mini-CPB on neutrophils CD162, CD166 and CD195 expression. *Perfusion.* 2017;32(2):141-150.

9. Publikované články

- Holmannova D, Kolackova M, Mandak J, Kunes P, Holubcova Z, Krejsek J, Vlaskova D, Andrys C. Inhibitory CD200R and proapoptotic CD95/CD95L molecules on innate immunity cells are modulated by cardiac surgery. *Perfusion*. 2015;30(7):543-55. IF **1.442**
- Holmannova D, Kolackova M, Kunes P, Krejsek J, Mandak J, Andrys C. Impact of cardiac surgery on the expression of CD40, CD80, CD86 and HLA-DR on B cells and monocytes. *Perfusion*. 2016;31(5):391-400. IF **1.442**
- Holmannova D, Kolackova M, Mandak J, Kunes P, Holubcova Z, Andrys C, Krejsek J. Effects of conventional CPB and mini-CPB on neutrophils CD162, CD166 and CD195 expression. *Perfusion*. 2017;32(2):141-150. IF **1.442**
- Holubcova Z, Kunes P, Mandak J, Vlaskova D, Kolackova M, Holmannova D, Andrys C, Krejsek J, Holubec T. Pentraxin 3 and other inflammatory biomarkers related to atrial fibrillation in cardiac surgery. *Perfusion*. 2016. pii: 0267659116679248, IF **1.442**
- Holmannová D, Koláčková M, Kondělková K, Kunes P, Krejsek J, Andrýs 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):12-7.
- Holmannová D, Koláčková M, Kondělková K, Kunes P, Krejsek J, Ctírad 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.
- Holmannová D, Koláčková M, Krejsek J. Fyziologická úloha vitamínu C ve vztahu ke složkám imunitního systému. *Vnitr Lek*. 2012;58(10): 743-749.
- Krejsek J, Koláčková M, Mand'ák J, Kunes P, Holubcová Z, Holmannová D, AbuAttieh M, Andrýs 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.
- Holmannová D, Koláčková M, Krejsek J. Resolviny, maresiny a 14, 21-dihydroxy DHA – lipidové mediátory s protizánětlivými a reparačními účinky vzniklé přeměnou ω -3 nenasycených mastných kyselin. *Alergie* 2012;14(4):262-265.
- Holmannova D. Imunomodulační proteiny z medicínálních hub. *Prakt. Lek*. 2016; 96(6):251-254.