

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Hradci Králové  
Ústav klinické imunologie a alergologie



# Kardiochirurgická operace jako model zánětové odpovědi

Dizertační práce

Hradec Králové 2007

Manuela TROJÁČKOVÁ KUDLOVÁ

Děkuji prof. RNDr. Janu Krejskovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a čas věnovaný této dizertační práci. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Martině Koláčkové za pomoc při statistickém zhodnocení získaných dat a paní Haně Kotlandové za úpravu grafických výstupů. Děkuji také MUDr. Pavlu Kunešovi, staniční sestře JIP KCH paní Bc. Daně Vláškové a perfusionistům Jaroslavu Kubíčkoví a Martinu Voltovi za pomoc při zajištění studie.

Velmi děkuji svým rodičům a blízkým za jejich lásku a podporu při studiu.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT č. MSM0021620812.

## OBSAH

|   |    |
|---|----|
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....  | 5  |
| ÚVOD .....  | 6  |
| 1. KARDIOVASKULÁRNÍ CHOROBY A IMUNITNÍ SYSTÉM.....                                  | 7  |
| 1.1. ATEROSKLERÓZA.....   | 7  |
| 1.1.1. Ateroskleróza a zánětová odpověď .....                                       | 7  |
| 1.1.2. Rizikové faktory aterosklerózy .....   | 8  |
| 1.1.3. Receptory pro nebezpečné vzory v rozvoji zánětové odpovědi .....             | 10 |
| 1.1.4. Vývoj aterosklerotické léze .....  | 11 |
| 1.2. KARDIOCHIRURGICKÁ OPERACE A ZÁNĚTOVÁ ODPOVĚĎ .....                             | 12 |
| 1.2.1. Vliv operačních postupů na rozvoj zánětové odpovědi .....                    | 14 |
| 1.2.2. Změny parametrů imunitního systému v průběhu kardiochirurgické operace ..... | 15 |
| 1.2.3. Biomarkery zánětu a ateroskleróza.....                                       | 17 |
| 1.2.4. Kardiochirurgická operace jako model zánětové odpovědi .....                 | 18 |
| 2. CÍLE .....   | 20 |
| 3. METODIKA .....   | 21 |
| 3.1. Soubor nemocných (demografická a klinická data).....                           | 21 |
| 3.2. Operační postupy.....  | 22 |
| 3.2.1. Operace s použitím mimotělního oběhu („on-pump“, s CPB).....                 | 22 |
| 3.2.2. Operace na bijícím srdci („off-pump“, bez CPB).....                          | 23 |
| 3.2.3. Vedení anestézie .....   | 23 |
| 3.3. Odběr vzorků.....  | 23 |
| 3.4. Stanovení buněčných parametrů (průtoková cytometrie).....                      | 24 |
| 3.5. Stanovení humorálních parametrů (ELISA, nefelometrie).....                     | 26 |
| 3.6. Statistika .....   | 27 |
| 4. VÝSLEDKY .....   | 28 |
| 4.1. Buněčné parametry.....   | 28 |
| 4.1.1. Změny v zastoupení leukocytárních subpopulací .....                          | 29 |
| 4.1.2. Dynamika exprese membránové molekuly CD18 .....                              | 36 |
| 4.1.3. Dynamika exprese membránové molekuly CD38 .....                              | 38 |
| 4.1.4. Dynamika exprese membránové molekuly TLR-2 a TLR-4 .....                     | 40 |
| 4.1.5. Změny exprese aktivační molekuly CD64 a vychytávací molekuly CD 163 .....    | 44 |

|  |    |
|--|----|
| 4.2. Humorální parametry .....                           | 50 |
| 4.2.1. Dynamika sérové hladiny IL-6, IL-10 a IL-13 ..... | 50 |
| 4.2.2. Dynamika sérové hladiny PTX3 a CRP .....          | 55 |
| 4.2.3. Dynamika sérové hladiny Hsp60 a Hsp70 .....       | 59 |
| 4.2.4. Dynamika sérové hladiny LBP a sCD14 .....         | 62 |
| 5. SHRNUÍ .....  | 66 |
| 6. DISKUZE .....   | 70 |
| 7. ZÁVĚR.....  | 80 |
| POUŽITÁ LITERATURA .....                                 | 82 |
| PUBLIKACE UCHAZEČKY.....                                 | 90 |
| PŘÍLOHY.....   | 93 |

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|               |   |
|---------------|---|
| CPB           | cardiopulmonary bypass, mimotělní oběh            |
| HMG-CoA       | 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A             |
| ICAM-1        | intercellular adhesion molecule 1                 |
| IFN           | interferon  |
| ICHS          | ischemická choroba srdeční                        |
| IL            | interleukin                                       |
| INOS          | inducibilní NO syntáza                            |
| LDL           | low density lipoprotein                           |
| MCP           | macrophage chemoattractant protein                |
| M-CSF         | macrophage colony-stimulating factor              |
| MIDCAB        | minimally invasive direct coronary artery bypass  |
| MMP           | matrix metalloproteinase                          |
| MODS          | multiple organ dysfunction syndrome               |
| MOFS          | multiple organ failure syndrom                    |
| NF $\kappa$ B | transkripční faktor                               |
| NK            | natural killer                                    |
| OPCAB         | off-pump coronary artery bypass                   |
| PDGF          | platelet-derived growth factor                    |
| PRR           | pattern recognition receptor                      |
| PTCA          | perkutánní transluminální koronární angioplastika |
| SIRS          | systemic inflammatory response syndrom            |
| TNF           | tumor necrosis factor                             |
| TLR           | Toll-like receptor                                |
| VCAM-1        | vascular cell adhesion molecule 1                 |

## ÚVOD

Nemoci oběhové soustavy, zejména ischemická choroba srdeční a cévní onemocnění mozku, představují vždy zásadní snížení úrovně zdraví a jsou také nejčastější příčinou smrti ve všech evropských zemích.

Chronický zánět hraje významnou úlohu v patogenezi aterosklerózy a zánětlivé markery jsou považovány za rizikový faktor pro vznik ischemické choroby srdeční. Svědčí pro to přítomnost zánětlivých buněk v poškozené arteriální stěně, systémové projevy zánětu, které předcházejí delší dobu vznik akutních koronárních syndromů, častější výskyt některých chronických infekcí současně s aterosklerózou i častější výskyt koronární aterosklerózy u jedinců s geneticky determinovaným prozáněťovým fenotypem.

Projevy ischemické choroby srdeční lze příznivě ovlivnit řadou léků a minimalizováním rizikových faktorů vhodnou úpravou životního stylu. V případě pacientů s trombem, způsobující uzavěr lumen cévy, je konzervativním terapeutickým zákrokem trombolytická léčba popř. mechanická reperfuze pomocí perkutánních kardiologických intervencí. Léčebným postupem těžkých forem ICHS je chirurgická léčba v podobě přemostění zúženého místa na věčité tepně provedením tzv. bypassové operace. Operace se provádí v celkové anestézii, v mimotělním oběhu a v celkovém podchlazení organismu. Stále častěji se tyto operace provádějí tzv. na „bijícím srdci“ tj. bez použití mimotělního oběhu. V průběhu kardiochirurgické operace dochází v důsledku působení četných faktorů k celé řadě změn parametrů imunitního systému. Tyto změny zásadním způsobem ovlivňují výslednou záněťovou odpověď. Z pohledu rozvoje záněťové reakce převládá názor, že operace na bijícím srdci vede k menší systémové záněťové odpovědi a je tak pro nemocného většinou méně zatěžující. Jednoznačné důkazy podporující toto tvrzení však dosud nejsou k dispozici.

Je potřeba získat údaje zejména o imunitní odpovědi pacientů, u kterých dochází k rozvoji vážných, život ohrožujících pooperačních komplikací. Důležitým podkladem pro správné terapeutické zásahy je zhodnocení stupně aktivace nebo suprese imunitního systému. Nalezení optimálních parametrů imunitního systému, na základě kterých by bylo možno provádět klinická rozhodnutí, je proto předmětem výzkumu řady experimentálních i klinických studií.

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

# 1. KARDIOVASKULÁRNÍ CHOROBY A IMUNITNÍ SYSTÉM

Imunitní systém je schopen prostřednictvím solubilních, biologicky aktivních látek, cytokinů a dalších mediátorů i přímým působením buněčných složek imunitní soustavy, pozitivně i negativně zasahovat do fungování všech tělních systémů. Představuje pro organismus jednu z rozhodujících integrujících soustav. Patogeneze nemocí oběhového systému a srdce nebyla až donedávne doby spojována s funkcemi imunitního systému, v současné době je však na mnohé patofyziologické situace spojené s poruchami kardiovaskulárního systému pohlíženo jako na zánětlivý proces, v němž velkou roli hraje nepochybně imunitní systém.

## 1.1. ATEROSKLERÓZA

Nemoci srdce a cév (tzv. kardiovaskulární choroby) jsou hlavní příčinou nemocnosti a předčasných úmrtí v průmyslově vyspělých zemích. Přestože se nemoci oběhového systému vyskytují v různých formách, společným jmenovatelem mnoha z nich, zejména těch nejčastějších a nejzávažnějších (ischemická choroba srdeční a cévní mozková příhoda), je ateroskleróza.

### 1.1.1. Ateroskleróza a zánětová odpověď

Ateroskleróza byla kdysi chápána jako mechanický proces prostého ukládání tuku do cévní stěny vedoucí k jejímu uzávěru. Na základě řady experimentálních i klinických studií se však tato představa zcela změnila. Dle současného pojetí je na aterosklerózu nahlíženo jako na chronický zánět, který je výsledkem interakcí mezi chemicky modifikovanými endogenními strukturami (lipoproteiny, produkty pokročilé glykace) a pravděpodobně, podle některých nepřímých důkazů, exogenními látkami mikrobiálního (infekčního) původu, s buňkami imunitního systému, zejména makrofágy, T lymfocyty a dalšími buněčnými elementy, jakými jsou endotelové buňky, buňky hladké svaloviny, fibroblasty, mastocyty a trombocyty (1). Tento zánětový proces vede v důsledcích k tvorbě komplexní léze nazývané aterosklerotický plát, který zasahuje do cévního lumen. Ruptura plátu a následná trombóza způsobující uzávěr lumen cévy vedoucí k akutní hypoxii, se všemi jejími důsledky pro tkáň. Mezi nejčastější klinické komplikace patří zejména akutní koronární syndromy (infarkt myokardu, nestabilní angina pectoris) a mozková mrtvice.

### 1.1.2. Rizikové faktory aterosklerózy

Ateroskleróza je důsledkem dlouhodobého procesu, který má několik fází. Doposud není zcela objasněna kauzální příčina jejího vzniku. Je však známa celá řada faktorů, které se na jejím vzniku podílejí, a které nazýváme rizikovými faktory. Jedná se o faktory, které poškozují cévní endotel a navozují první stádium rozvoje aterosklerózy – dysfunkci cévního endotelu (2). Jde o poškození, kdy není většinou porušena integrita endotelu, ale jsou alterovány jeho funkce. Zvyšuje se adhezivita endotelových buněk vzhledem k leukocytům a krevním destičkám, roste permeabilita cévní stěny pro některé molekuly, endotelie získávají prokoagulační vlastnosti, zvyšuje se produkce vazoaktivních molekul, cytokinů, chemokinů a růstových faktorů (1).

Endoteliální dysfunkci navozuje celá řada podnětů. Velmi významným faktorem, který sám o sobě tuto dysfunkci vyvolává, je akumulace lipidů (především LDL, *low density lipoprotein*) v cévním endotelu při jejich zvýšené koncentraci v krvi (2). Po navázání LDL částic popř. jiných lipoproteinů na složky mezibuněčné hmoty dochází k jejich velmi účinné chemické modifikaci. LDL částice jsou modifikovány buď enzymaticky, nebo oxidativně. Mimořádně potentním oxidantem jsou reaktivní kyslíkové radikály produkované endotelovými buňkami a makrofágy. K modifikaci dochází také působením NO syntázy a 15-lipooxygenázy. Na enzymatické modifikaci se podílí zejména myeloperoxidáza či sekreční fosfolipáza (3). LDL prodělávají rovněž modifikaci glykací, agregací, asociací s proteoglykany či inkorporací do imunitních komplexů (4). Akumulace modifikovaných forem LDL částic v intimě artérií, zejména v místech zvýšeného působení hemodynamických faktorů, je iniciačním krokem zánětlivé odpovědi navozující endoteliální dysfunkci.

K základním faktorům, které zvyšují riziko aterosklerózy, patří také hypertenze, diabetes mellitus a metabolický syndrom včetně inzulinové rezistence. Rizikovými faktory jsou rovněž zvýšená hladina homocysteinu, zvýšený oxidativní stres a přímý toxický vliv zplodin cigaretového kouře, obezita a nízká fyzická aktivita. Neovlivnitelnými rizikovými faktory jsou také věk (u mužů 45 let a vyšší, u žen 55 let a vyšší) a pohlaví (ochranný vliv estrogenů). Pozitivní rodinná anamnéza svědčí o vlivech genetických.

Přibývá rovněž údajů, že na vzniku a rozvoji lokální i systémové zánětlivé reakce typické pro aterosklerózu, se mohou podílet i chronické infekce virovými nebo bakteriálními agens. Ty mohou aktivovat imunitní systém a vést ke zvýšené tvorbě imunitních komplexů, které způsobují kromě dysfunkce endotelu i aktivaci zánětlivého procesu v cévní stěně se všemi jeho důsledky. Za možné etiologické agens jsou dnes považovány především *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, dále pak cytomegalovirus, jiné herpetické viry a další.



Na rozvoji aterosklerotického ložiska mají zásadní vliv také fyzikální faktory – tlakové a hemodynamické, smykové tření (*shear stress*), změny v charakteru a rychlosti proudění krve. Působení fyzikálních sil smykového tření působí aktivaci buněčných elementů, změny cytoskeletu a tvaru buněk. Obecně vede k zesílení proadhezních vlastností cévního endotelu. Důsledkem je akumulace buněk zánětu preferenčně v místech zvýšeného působení fyzikální noxy. Fyziologickou adaptací na některé fyzikální podněty může být zesílení intimy se zmnožením buněk hladké svaloviny. Pokročilé aterosklerotické léze se vyvíjejí často právě na místech tohoto adaptivního zesílení intimy. Jsou jimi především místa větvení artérií (2).

Při současném působení několika rizikových faktorů se jejich nepříznivý vliv násobí. Rozvojem aterosklerózy jsou proto ohroženi především pacienti, u kterých je přítomno několik rizikových faktorů současně. Kromě „klasických“ rizikových faktorů (Tab.1), jsou často uváděny i některé další a stále jsou studovány faktory nové. Jedná se především o různé laboratorní ukazatele zánětlivé aktivity, protrombotického stavu a další. Zvýšené zánětlivé markery jsou novým rizikovým faktorem pro výskyt komplikací aterosklerózy.

Tab. 1: Základní rizikové faktory aterosklerózy

| Ovlivnitelné rizikové faktory                      | Neovlivnitelné rizikové faktory  |
|--|----------------------------------|
| Hypercholesterolemie                               | Věk > 45 let muži, > 55 let ženy |
| Kouření  | Rodinná anamnéza předčasné ICHS  |
| Hypertenze   | Mužské pohlaví                   |
| Diabetes mellitus,<br>porušení glukózové tolerance |                                  |
| Fyzická inaktivita                                 |                                  |
| Obezita  |                                  |

### 1.1.3. Receptory pro nebezpečné vzory v rozvoji zánětové odpovědi

Jako důsledek aktivace endotelu, k níž jako první přispívají zejména krevní destičky (5), dochází ke zvýšené expresi adhezních molekul (VCAM-1, ICAM-1) na povrchu endotelových buněk. Následuje adherence leukocytů (zejména monocytů), jejich migrace do subendotelové vrstvy a prohloubení zánětlivé reakce v důsledku lokálně produkovaných prozánětových mediátorů (TNF, IFN). Cytokiny a růstové faktory indukují diferenciaci monocytů na makrofágy. Vedou také ke zvýšené expresi povrchových PRR (*pattern-recognition receptor*) receptorů přirozené imunity, jejichž prostřednictvím jsou identifikovány endogenní i exogenní (mikrobiální) nebezpečné vzory. Za mimořádně významné, s ohledem na vznik a rozvoj aterosklerotického procesu, jsou považovány povrchové molekuly z rodiny vychytávacích (*scavenger*) receptorů a tzv. TLR (*Toll like receptors*) receptory.

Vychytávací („scavenger“) receptory účinně váží, kromě fragmentů apoptotických buněk, zejména chemicky modifikované oxLDL (5). Vstup modifikovaných LDL částic cestou scavengerových receptorů však neaktivuje zpětnou vazbu, která by bránila jejich dalšímu příjmu (2). Modifikované LDL se proto v makrofázích neomezeně hromadí (nejčastěji v podobě esterů lipidů) a indukují tak přeměnu makrofágů na pěnové buňky (*foamy cells*), které dominují zvláště v časných fázích aterosklerózy (1).

Prostřednictvím TLR receptorů jsou identifikovány mimořádně rozmanité podněty. Rozeznávají jsou především nebezpečné vzory patogenních mikroorganismů a nebezpečné signály, které vznikají patologicky ve vnitřním prostředí těla (6). Těmi jsou také např. stresové proteiny hsp (*heat shock proteins*) či modifikované molekuly mezibuněčné hmoty, produkované v důsledku prohlubující se aterosklerotické léze (3). Identifikace nebezpečných vzorů prostřednictvím receptorů TLR vede k iniciaci nitrobuněčných signálních drah. Centrální úlohu při buněčné transdukci signálů odpovídajících na aterogenní stimuly hraje dráha transkripčního faktoru NF $\kappa$ B. Ten je ve své aktivní formě translokován do jádra, kde se váže na regulační sekvence a navozuje transkripci řady genů, jejichž produkty mají prozánětové účinky a podílejí se na rozvoji imunitní reakce. Jsou to zejména geny, které kódují cytokiny s převážně prozánětovou aktivitou (IL-1, TNF $\alpha$ ), chemokiny (IL-8, MCP-1), adhezní molekuly (ICAM, VCAM), dále geny kódující molekuly regulující aktivaci buňky a buněčný cyklus (7, 8, 9).

#### 1.1.4. Vývoj aterosklerotické léze

Na základě morfologie (dané podílem nebuněčné a buněčné složky a převažujícím typem buněk v plátu), lze dle konsenzu *American Heart Association Committee on Vascular Lesions* rozlišit tři základní stupně rozvoje aterosklerotické léze.

Časně stádium aterosklerózy je charakterizováno ukládáním lipidových proužků (*fatty streak*) v endotelu velkých artérií. Tukové proužky se objevují již v dětském věku a místa lokalizace tukových proužků u dětí jsou místy lokalizace pokročilejších typů lézí u dospělých jedinců. Tukové proužky proto zcela nepochybně představují iniciální stupeň aterosklerózy (10). Jsou tvořeny převážně makrofágy, tzv. pěnovými buňkami, s intracelulárně akumulovanými lipidy. V menším množství jsou zde nacházeny také hladké svalové buňky, které rovněž mohou obsahovat kapénky lipidů. Ojedinele mohou být přítomny také T-lymfocyty (2). Lipidy (nejčastěji estery cholesterolu) jsou lokalizovány především intracelulárně. Přítomny jsou však i extracelulární lipidové kapénky. Tukové proužky nejsou stabilní, může docházet k jejich regresi až úplnému vymizení.

Další vývoj aterosklerotické léze z počátečního tukového proužku do pokročilejších vývojových stádií, je výsledkem interakcí mezi makrofágovými elementy a T lymfocyty, které se akumulují v místě poškození (1). Druhý stupeň vývoje aterosklerotické léze je charakterizován výrazným ztluštěním intimy (*diffuse intimal thickening*). Vzniká ložisko které může uvnitř nekrotizovat a postupně i kalcifikovat. K zesílení cévní stěny dochází v důsledku migrace a proliferace buněk hladké svaloviny. Dochází k jejich aktivaci a zvýšené syntéze extracelulární matrix. V postižené cévní stěně také přibývá množství volně uložených lipidů a dochází k hromadění depozit z rozpadlých pěnových buněk (11). Zesílení cévní stěny je nejprve kompenzováno dilatací a lumen cévy zůstává zpočátku nezměněno (tzv. fenomén remodelace). Aktivace hromadících se makrofágů a T-lymfocytů vede k dalšímu uvolňování cytokinů ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-1), chemokinů (MCP-1), proteolytických enzymů (MMP) a růstových faktorů (M-CSF, PDGF), které navozují další poškození, eventuelně způsobují nekrózu.

Postupující akumulace monocytů/makrofágů, migrace a proliferace buněk hladké svaloviny, tvorba fibrózní tkáně a hromadění extracelulárních lipidů, pravděpodobně v důsledku rozpadu pěnových buněk, vede k progresi do dalšího stupně, označovaného jako fibrózní plát (*fibrous plaque, atheroma*). Tyto typy lézí jsou již charakterizovány přítomností jádra a fibrózního obalu. Protrombogenní jádro je tvořeno buňkami (makrofágy, lymfocyty, buňky hladké svaloviny, ve větším množství pěnové buňky), vazivovou tkání a velkým množstvím extracelulárně uložených lipidů (10). Fibrózní obal (*fibrous cap*), izolující trombogenní lipidové jádro od cirkulující krve, se sestává z buněk hladkého svalstva a jimi tvořenými kolagenními vlákny (2). Tyto typy plátů již často vyčnívají do lumen

cévy, a tím zhoršují průtok krve cévou. V případě, že se jedná o plát se silnou a neporušenou čepičkou, hovoříme o plátu stabilním. Takovýto aterosklerotický plát většinou neohrožuje pacienta na životě akutní koronární příhodou. Manifestuje se zpravidla ischemickými příznaky, např. stabilní anginou pectoris (2). Za většinu akutních koronárních syndromů jsou zodpovědné nestabilní tzv. vulnerabilní pláty. Tento typ plátu obsahuje velké množství zánětlivých buněk, tenký fibrózní kryt a má velké lipidové jádro. Většina imunokompetentních buněk přítomných v této lézi vykazuje známky aktivace a produkuje řadu mediátorů, které se podílejí na destabilizaci plátu (5). Na procesu destabilizace dosud stabilního plátu se významně podílí makrofágy. Aktivované makrofágy produkují řadu proteolytických enzymů ze skupiny matrixových metaloproteáz MMP (kolagenázy, elastázy a stromelysiny), jejich působením dochází k rozpouštění kolagenní matrix. Monocyty dále napomáhají destrukci ateromových plátů a aktivaci trombinu pomocí aktivace tvorby tkáňového faktoru. Na oslabení fibrózního krytu se podílí také prozánětlivé cytokiny (především IFN- $\gamma$ , produkovány aktivovanými T lymfocyty), které inhibují syntézu kolagenu buňkami hladkého svalstva. Dojde-li k ruptuře plátu, jsou krevním složkám vystaveny subendoteliální struktury a je tak aktivována koagulační kaskáda a agregace trombocytů s tvorbou trombu. Některé tromby neokludují artérii a jsou inkorporovány do aterosklerotické léze. Pokud ale trombus narůstá a uzavírá průsvit arterie, rozvíjí se ischemie s klinickým obrazem akutního koronárního syndromu (2).

## 1.2. KARDIOCHIRURGICKÁ OPERACE A ZÁNĚTOVÁ ODPOVĚĚ

Projevy ischemické choroby srdeční lze příznivě ovlivnit řadou léků (antiagregační léčba,  $\beta$ -blokátory, hypolipidemika) a minimalizováním rizikových faktorů vhodnou úpravou životního stylu. V medikamentózní léčbě aterosklerózy dominuje řešení její hlavní příčiny, tj. vysoké hladiny cholesterolu. Standardní součástí léčby pacientů s ischemickou chorobou srdeční nebo jinou manifestací aterosklerózy jsou statiny. Základem účinku statinů je kompetitivní inhibice klíčového enzymu biosyntézy cholesterolu, HMG-CoA reduktázy. Působením statinů dochází ke snížení koncentrace LDL cholesterolu v plazmě a minimalizaci jeho negativního vlivu na další průběh aterosklerózy. Vedle hypolipidemického účinku je dokumentována také řada nelipidových tzv. pleiotropních účinků statinů. Mezi nejdůležitější bývá řazena na lipidech nezávislá modulace endoteliální funkce, antioxidační, protizánětlivé, antiproliferační a antitrombogenní účinky (12).

V případě pacientů, u kterých trombóza způsobuje uzavěr lumen cévy, je konzervativním terapeutickým zákrokem trombolytická léčba popř. mechanická reperfuze pomocí perkutánní

transluminální koronární angioplastiky (PTCA). Výhodou PTCA je minimální zatížení, krátký pobyt v nemocnici a menší riziko komplikací. Problémem však zůstávají restenózy po PTCA, které se objevují asi u 30 % takto ošetřených nemocných v průběhu prvního roku po zákroku. Procento výskytu restenóz po PTCA se snižuje katetrizačně zaváděnými stenty (13).

Léčebným postupem pro nemocné s nejzávažnějším a mnohočetným postižením koronárního řečiště je chirurgická léčba v podobě přemostění koronárních stenóz zúženého místa na věnčité tepně tzv. bypassové operace. Operace se provádí v celkové anestézii, v mimotělním oběhu a v celkovém podchlazení organismu. Stále častěji se ale tyto operace provádějí tzv. na „bijícím srdci“ tj. bez použití mimotělního oběhu.

Většina operačních výkonů na srdci je v dospělosti prováděna u osob, u kterých dlouhodobě probíhá aterosklerotický proces. Nemocní jsou doporučeni ke kardiochirurgické operaci nejčastěji ze dvou důvodů. K řešení ischemické choroby srdeční (k revaskularizaci myokardu – bypassové operaci) nebo k operaci srdeční chlopně. Někdy může jít o kombinovaný výkon.

Kardiochirurgická operace je mimořádně náročným výkonem. Představuje závažné narušení tělní integrity, které se promítne do deregulace homeostázy a vede k iniciaci stresové kaskády. Kardiochirurgická operace představuje komplexní stresovou situaci. Mezi hlavní příčiny aktivace imunitního systému v důsledku kardiochirurgické operace patří zejména chirurgické poškození, mechanická manipulace na srdci, kontakt krevních komponent s umělým povrchem mimotělního oběhu, přechodná endotoxemie a ischemicko-reperfuzní poškození srdce a plic (14).

Reakcí na kardiochirurgickou operaci je komplexní zánětová odpověď, ve které sehraává nejvýznamnější úlohu imunitní systém. Rozvoj zánětové reakce u kardiochirurgických nemocných má zajistit obranu před infekčním agens endogenního i exogenního původu, podílet se na eliminaci poškozených vlastních struktur a v neposlední řadě se zúčastnit i procesu hojení a reparace tkání. Zánětová reakce provázející kardiochirurgickou operaci nemá u většiny nemocných bezprostřední ani dlouhodobé účinky na zdraví pacientů.

Prospěšné účinky každé zánětové reakce jsou však neoddělitelně spojeny také s poškozujícími prvky (15). I přes terapeutické zásahy působící preventivně na rozvoj nežádoucí zánětové reakce stále zůstává malé procento kardiochirurgických nemocných, u kterých dojde k deregulaci zánětové reakci v takové míře, že subklinická forma systémové zánětové odpovědi (SIRS) přechází v následnou orgánovou dysfunkci (MODS) a často i k orgánovému selhání (MOFS) s následkem smrti (16). S cílem zabránit takovým nežádoucím situacím jsou dlouhodobě hledány optimální operační postupy a je optimalizována podpora nemocných v průběhu operace i v pooperačním období.

### 1.2.1. Vliv operačních postupů na rozvoj zánětové odpovědi

Kardiochirurgické zákroky jsou v současnosti prováděny dvěma odlišnými způsoby. Tradiční kardiochirurgický přístup představují operace na srdci, které je vyřazeno z činnosti a jehož funkci přebírá podpůrné zařízení, které zajišťuje cirkulaci krve v mimotělním oběhu (CPB, *cardiopulmonary bypass*) a její okysličení v oxygenátoru. Novějším přístupem jsou kardiochirurgické operace, které jsou prováděny na bijícím srdci (OPCAB, *off-pump coronary artery bypass*), které s minimálním omezením vykonává své fyziologické funkce (17). S cílem co nejšetnějšího přístupu jsou do klinické praxe zaváděny i další postupy, které eliminují negativní vliv mimotělního oběhu, manipulace s ascendentní aortou a sternotomií. Patří mezi ně zejména operace z miniinvazivního přístupu z malého řezu na hrudníku (MIDCAB, *minimally invasive direct coronary artery bypass*) a použití miniinvazivního mimotělního oběhu (mini-CPB).

Z pohledu rozvoje zánětové reakce převládá názor, že operace na bijícím srdci vede k menší systémové zánětové odpovědi. Důvody pro tuto skutečnost jsou zřejmé. Při použití mimotělního oběhu dochází k masivní aktivaci humorálních i buněčných složek imunitního systému kontaktem s umělými povrchy oxygenátoru a systému trubic, kterým je krev vedena (18). Proudění krve je nejčastěji nepulzatilní. Důsledkem je částečná ischemie orgánů, která se nejvýznamněji projevuje v trávicím traktu. Dochází zde zejména k negativnímu ovlivnění slizniční bariéry ve smyslu možnosti prostupu biologicky aktivních látek mikrobiálního původu a s tím spojeného rizika systémové endotoxemie (8).

U pacientů operovaných na bijícím srdci je rovněž pozorováno nižší poškození v důsledku ischemicko-reperfúzní reakce. Součástí ischemicko-reperfúzního poškození je těžký oxidativní stres spojený s tvorbou stresových proteinů a produkcí reaktivních forem kyslíku (19). Ty zapříčiňují řadu funkčních, strukturálních a metabolických změn v organismu, zejména poškození membrány v důsledku peroxidace lipidů. Volné kyslíkové radikály, produkované ve zvýšené míře u pacientů operovaných s CPB, zodpovídají za systémovou zánětlivou odpověď a jsou považovány za jednu z nejvýznamnějších poškozujících složek při kardiochirurgickém výkonu, a to zejména z důvodu jejich podílu na rozvoji pooperačních komplikací (20).

### 1.2.2. Změny parametrů imunitního systému v průběhu kardiochirurgické operace

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

Expozice nežádoucím podnětům je v průběhu kardiochirurgické operace tak velká, že musí být spuštěny kompenzační tlumivé imunitní mechanismy, které zabrání nepřiměřené, poškozující aktivitě přirozené imunity. Následně dochází i k depresi specifické, buňkami zprostředkovanými odpovědi. Pooperační útlum imunity musí být přiměřený a neměl by zvyšovat riziko infekčních komplikací v pooperační období. Na změnách parametrů imunitního systému v průběhu kardiochirurgické operace se podílí řada proměnných faktorů, které zásadním způsobem ovlivňují výslednou zánětovou odpověď. Z pohledu rozvoje zánětové reakce převládá názor, že operace na bijícím srdci vede k menší systémové zánětové odpovědi (21, 22).

Řada klinických studií dokumentuje změny jednotlivých složek přirozené i adaptivní imunity. Dokumentovány jsou kvantitativní i kvalitativní změny parametrů jak buňkami zprostředkované, tak humorální imunity. Počátek těchto alterací je zaznamenáván již před zahájením vlastního chirurgického výkonu, bezprostředně po úvodu do anestézie (23).

V důsledku kardiochirurgické operace dochází k leukocytóze. Zvýšení absolutního počtu leukocytů je zapříčiněno zvýšeným podílem neutrofilních granulocytů (23, 24). Statisticky významné jsou také změny v počtu jednotlivých lymfocytárních subpopulací. Pozorována je relativní a absolutní lymfopenie způsobena poklesem populace CD3+ T lymfocytů, a to zejména v subpopulaci CD4+ T- lymfocytů. Zastoupení CD8+ T-lymfocytů bývá nezměněno nebo nepatrně zvýšeno. Je tak ovlivněn i CD4+/CD8+ poměr. Relativní podíl i absolutní počet B lymfocytů je zvýšen (24, 25). Těsně po operaci vykazuje většina buněk fenotypové známky aktivace, bez výraznější dodatečné alterace u pacientů operovaných s CPB. Tato pozorování naznačují, že aktivace lymfocytů je podmíněna převážně samotným chirurgickým výkonem a efekt CPB je pouze minimální (26). Bezprostředně po operaci dochází ke zvýšení zastoupení NK buněk, které je následováno jejich deplecí v pozdějším období (24, 27). Zvýšení počtu NK buněk v periferní krvi je způsobeno jejich mobilizací působením stresových hormonů nadledvinek, především kortizolu. Funkční aktivita NK buněk v pooperačním období není zpravidla ovlivněna (28).

Zcela zásadní úlohu v rozvoji zánětové reakce u nemocných s kardiochirurgickou operací sehrávají buňky monocyto-makrofágové linie. Jejich počet v krvi je pooperačně snížen (24) nebo zůstává nezměněn (23). Buňky monocyto-makrofágové linie nejefektivněji identifikují signály nebezpečí prostřednictvím dozorových receptorů a reagují na ně mimo jiné tvorbou pluripotentních prozánětových cytokinů. V mnoha experimentech i v klinických studiích je popsáno zvýšení krevní hladiny pluripotentních prozánětových cytokinů, především TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, ke kterému dochází již v průběhu operace s dosažením maxima obvykle první den po provedené operaci (29). Důsledky působení pluripotentních prozánětových cytokinů jsou velmi rozmanité. Stimulují kostní dřeň ke zvýšené produkci myeloidních elementů, aktivují endotelové buňky a leukocyty ke změně z antiadhezního do proadhezního fenotypu a indukují v nich tvorbu cytokinů. Stimulují produkci prozánětových působků tvořených z kyseliny arachidonové inducibilní cyklooxygenázou COX-2. Zesílením aktivity oxidázového systému a iNOS zvyšují hladinu reaktivních produktů kyslíkového a dusíkového metabolismu. Jsou odpovědné za uvolnění biologicky aktivních působků (např. elastázy) z neutrofilních granulocytů. Modulují funkci buněk prezentujících antigen a tak ovlivňují specifickou imunitní odpověď (30).

Intenzita aktivačních podnětů, zejména v případě operace s použitím CPB, je tak vysoká, že rozvíjející se zánětové reakce musí být zároveň negativně regulována, aby nepřevládaly její poškozující složky (31). Spolu s produkcí prozánětlivých cytokinů je tak zároveň zahájena také tvorba cytokinů s protizánětlivými až imunosupresivními účinky. Za klíčový regulační cytokin je považován zejména IL-10. Údaje o dynamice a kvantitě produkce jednotlivých cytokinů u pacientů podstupujících kardiochirurgické operace jsou však v rozporuplné a doposud v mnohém kontroverzní.

V průběhu kardiochirurgické operace je rovněž masivně aktivován koagulační a fibrinolytický systém krve, zvláště při použití CPB kontaktem složek krve s umělými povrchy přístrojů. Produkty krevní koagulace a fibrinolýzy aktivují endotelové výstelky. Vzniklý trombin, ale i Faktor IXa mají schopnost regulovat chemotaxi monocytů a neutrofilů. Samotné endotelové buňky zvyšují expresi adhezních molekul a tvoří prozánětové cytokiny (32). Trombin zvyšuje expresi adhezních molekul P-selektinu na endotelových buňkách. To umožní účinnou adhezi neutrofilních granulocytů, které po aktivaci uvolňují působky poškozující endotelie. Prostřednictvím trombinu může docházet i k aktivaci a degranulaci žírných buněk se všemi fyziologickými i patofyziologickými důsledky. V mononukleárních buňkách dochází k tvorbě tkáňového faktoru, který zodpovídá za aktivaci vnější cesty krevní koagulace (30).

Nepochybnou úlohu ve změnách imunitní reaktivity u nemocných se zátěží kardiochirurgické operace sehrává také apoptóza. Apoptóza je indukována v kardiomyocytech, buňkách plicního parenchymu, endotelových buňkách a dalších buňkách nehematopoetického původu



hypoxií, působením volných radikálů kyslíku a dusíku. Apoptózou budou procházet rovněž buňky imunitního systému, buď v důsledku nepřiměřené aktivace nebo jako součást fyziologických regulací imunitní odpovědi (33).

### 1.2.3. Biomarkery zánětu a ateroskleróza

V rozsáhlých klinických studiích byl ověřen význam mnohých ukazatelů imunitního systému, popisujících zánětovou odpověď, jako biomarkerů s prediktivní vahou určující klinické komplikace aterosklerózy. Jsou jimi zejména zvýšené hladiny prozáněťových cytokinů (IL-6, IL-1, IL-18, TNF $\alpha$ ), látek uvolňovaných degranulací buněk zánětu (myeloperoxidáza, metaloproteinázy), solubilní formy regulačních membránových molekul (solubilní CD40L), solubilní formy adhezních molekul leukocytů i endotelových buněk (sVCAM-1, P-selektin, E-selektin, ICAM-1), fibrinogen, či adipokiny nebo leptin (3).

Uvedené biomarkery jsou tvořeny různými buněčnými typy, které se podílejí v patogenezi aterosklerózy. Zdrojem nejsou pouze buňky imunitního systému, ale i jiné buněčné typy, např. endotelové buňky, buňky hladké svaloviny, a především hepatocyty. Hepatocyty jsou nejvýznamnějším zdrojem bílkovin akutní fáze, které se zde tvoří po ovlivnění prozáněťovými cytokiny, zvláště IL-6. Z bílkovin akutní fáze má nepochybně největší význam pentraxinová molekula CRP. C-reaktivní protein je prokazatelný v aterosklerotických placích, kde se váže na chemicky modifikované LDL lipoproteiny. Svou vazbou, jako solubilního receptoru PRR, stimuluje aktivaci komplementové kaskády a zesilují akumulaci monocytových elementů. Navíc CRP snižuje tvorbu oxidu dusnatého v endotelových buňkách a zesiluje tvorbu chemokinů v buňkách hladké svaloviny a endotelových buňkách. Postupně jsou získávány údaje o významu dalších pentraxinových molekul, zvláště dlouhého pentraxinu 3. Jeho zdrojem, na rozdíl od CRP, jsou tkáňově lokalizované makrofágy. Dostupné výsledky však zatím neumožňují definitivně zhodnotit význam pentraxinu PTX3 jako biomarkeru aterosklerózy (7).

#### 1.2.4. Kardiochirurgická operace jako model zánětové odpovědi

Zánět je jedinečným a fylogeneticky nejstarším typem obranné a reparační reakce, kterou organismus odpovídá na poškození nejrůznějšími noxami. Deregulované funkce imunitního systému, jako hlavní složky zánětové odpovědi, mají mimořádný potenciál narušit integritu vnitřního prostředí jedince a být příčinou morbidit a mortality. Intenzita systémové zánětlivé odpovědi (SIRS) závisí na velikosti inzultu. Při překročení určité hranice intenzity zánětlivé odpovědi se mění zánět z obranného na autoagresivní a dochází k rozvoji sekundární multiorgánové dysfunkce (sekundární MODS) a často i k orgánovému selhání (MOFS) s následkem smrti. Hluboké poznání zánětu na úrovni genů, signálních drah, subcelulárních struktur, buněk, tkání, orgánů a celého organismu umožňuje lepší chápání patogeneze mnohých nemocí. To je předpokladem cílených terapeutických zásahů do zánětu.

Nejvýznamnějším zdrojem nových poznatků o vzniku, průběhu a ukončení zánětové reakce jsou experimentální *in vitro* či *in vivo* studie. Při těchto studiích jsou využívány přesně definované experimentální systémy - tkáňové kultury či zvířecí modely. Jsou obvykle používány geneticky plně definované buněčné linie nebo kmeny experimentálních zvířat. Je možné přesné kvantifikování i časování vyvolávajících podnětů.

Nic z toho není k dispozici v klinických studiích. Zde se vždy jedná o geneticky vysoce heterogenní skupiny jedinců, které se vyznačují individuálním průběhem zánětové reakce. Zcela neznámé je časování, kombinace a intenzita vyvolávajících podnětů. Je opakovaně prokázáno, že převod výsledků studia zánětu, získaných v *in vitro* či *in vivo* experimentech do klinických aplikací, je možný pouze nepřímo. Z těchto důvodů je mimořádně žádoucí sledovat zánět v klinické situaci, na co nejlépe definovaném modelu. Kardiochirurgická operace má v tomto ohledu mnoho výhod. Za největší je možné považovat znalost časování výchozího inzultu. Rovněž noxy, které provázejí kardiochirurgickou operaci jsou podrobně definovány. S ohledem na univerzálnost zánětové odpovědi lze výsledky získané v tomto modelu přenášet i do jiných klinických situací.

Několik desetiletí trvajících úsilí o zlepšení operačních postupů i intenzivní podpory nemocných v pooperačním období vedlo k tomu, že kardiochirurgická operace nepředstavuje ve velké většině případů přímé ohrožení života. Stále však zůstává mnoho nezodpovězených otázek. Zřejmě prioritní je rozhodnout, zda operace na bijícím srdci či operace využívající modifikovaný mimotělní oběh (mini-CPB), jsou výhodnější s ohledem na intenzitu rozvoje zánětové reakce během operace a v pooperačním období. Pokud by se nově zaváděné postupy ukázaly jako výhodnější, byla by jim dávaná přednost, a to nejen z důvodu většího benefitu pro pacienta, ale i s ohledem na jejich ekonomickou výhodu v porovnání se standardním přístupem. Podrobné poznání dynamiky zánětové

odpovědi ve složce prozáněťových ukazatelů i kompenzatorních protizánětlivých ukazatelů by mohlo vést k včasné identifikaci nemocných, kteří jsou ohroženi nepřiměřeným rozvojem zánětové reakce, ve které převládnu poškozující prvky. U takovýchto nemocných by mohlo být časně klinicky intervenováno. Informace, které jsou v současné době shromažďovány v oblasti *in vitro* a *in vivo* experimentech na zvířecích modelech, ukazují, že charakteristiky zánětové odpovědi jsou vysoce individuální a jsou v nemalé míře určeny genetickou dispozicí člověka. Zvláště polymorfismy v některých složkách přirozené imunity, např. systém molekul TLR, určují dynamiku i intenzitu zánětové odpovědi. V současnosti již není předčasné uvažovat i o vyhledávání rizikových nemocných indikovaných ke kardiochirurgické operaci ještě před zahájením vlastní operace analýzou genetického profilu (polymorfismu), který určuje individuální reaktivitu jedince. Poznatky, získané v klinickém modelu kardiochirurgické operace nepochybně povedou v neposlední řadě i k terapeutickým intervencím biopreparáty, které jsou schopny modifikovat zánětovou reakci. Těmito biopreparáty jsou např. monoklonální protilátky, které inhibují imunologicky významné subtypy buněk zánětu nebo biopreparáty, které neutralizují biologicky aktivní solubilní faktory s prozáněťovým účinkem. Perspektivně se bude jednat o biopreparáty, které budou nahrazovat nebo mimikovat působení cytokinů s protizáněťovým účinkem.

## 2. CÍLE

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

Práce si klade za cíl zejména:

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

### 3. METODIKA

#### 3.1. Soubor nemocných (demografická a klinická data)

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

Obě skupiny pacientů se statisticky nelišily věkem, ani zastoupením jednotlivých pohlaví. Mezi oběma skupinami nebyl statistický rozdíl v počtu provedených anastomóz, ani v hodnotě ejekční frakce. Základní charakteristiky jednotlivých skupin pacientů uvádí tabulka (Tab. 2).

Tab. 2: Charakteristika pacientů

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

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

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

### 3.2. Operační postupy

Operační postupy a postupy vedení mimotělního oběhu byly obdobné pro všechny pacienty. Pooperační péče byla zajišťována na JIP kardiochirurgické kliniky, ze které byli pacienti v závislosti na zdravotním stavu překládáni na standardní oddělení. Všichni pacienti prodělali následné zotavení bez pooperačních komplikací.

#### 3.2.1. Operace s použitím mimotělního oběhu („on-pump“, s CPB)

Přístroj pro mimotělní oběh (CPB, cardiopulmonary bypass) nahrazuje po dobu vlastního chirurgického výkonu na srdci funkci srdce a plic. Zajišťuje tedy jak krevní oběh, tak i oxygenaci krve. Žilní krev je v oxygenátoru (historický bublinkový, dnes prakticky výhradně membránový) zbavena CO<sub>2</sub> a současně nasycen O<sub>2</sub>. V současné době jsou používány převážně rotační pumpy, které zajišťují nepulzní průtok krve přístrojem pro mimotělní oběh. Mimotělní oběh musí zajistit po dobu srdeční zástavy dostatečnou perfúzi všech tkání a orgánů okysličenou krví.

Mimotělní oběh (CPB) byl u všech pacientů zaváděn za použití dvouetážové venózní linky s návratem do vzestupné aorty. Součástí CPB byla peristaltická pumpa (S3 Stöcker®, Stöcker Instrumente GmbH, München, Germany) a membránový oxygenátor (Dideco Avant 903®, Dideco Mirandola, Italy) v uzavřené modifikaci s odsávacím zařízením, rezervoárem a arteriálním filtrem o velikosti pórů 40 µm (Dideco Micro 40®, Mirandola, Italy). Vnitřní povrch mimotělního oběhu nebyl ošetřen žádnou hemokompatibilní látkou (heparin). Složení proplachovacího roztoku bylo následující: 500 ml Ringerova laktátu, 500 ml Rheodextranu, manitol (1g/kg tělesné hmotnosti), 5000 IU heparin, 500 000 IU aprotinin, 80 ml 8,4% Na HCO<sub>3</sub>, 20 ml 10% sulfátu hořčíku a 500 mg methylprednisolon.

Objem proplachovacího roztoku byl korigován tak, aby byl dosažen hematokrit nad 0,22. Intravenózně byl podán heparin v dávce 300 IU/kg hmotnosti, aby byl udržován koagulační čas (ACT – activated clotting time) nad 480 s v průběhu celého mimotělního oběhu. U žádného z pacientů nebyly intravenózně aplikovány aprotinin ani kortikosteroidy. Průtok krve byl udržován na průměrné hodnotě 2,4 l/min/m<sup>2</sup> tělního povrchu s tlakem mezi 50-60 mmHg. Nemocní byli operováni v normotermii. Kardioplegie bylo dosaženo za pomoci 800-1000 ml krystaloidního kardioplegického roztoku (St. Thomas), který byl podán antegrádně do aortálního kořene. Pokud bylo zapotřebí, byly podávány dodatečné dávky 200-300 ml každých 30 minut. Všem pacientům byla našita mamární artérie (*a. mammaria interna*) na levou přední sestupnou koronární tepnu. Centrální (aortální)

anastomózy venózních štěpů byly našity v průběhu reperfúzní fáze mimotělního oběhu na bijícím srdci. Antikoagulační působení heparinu bylo po ukončení mimotělního oběhu vyvázáno podáním protamin sulfátu v dávce 1:1. Průměrná doba uzavěru aorty svorkou byla ve studované skupině 49 minut. Trvání mimotělního oběhu bylo v průměru 84 minut.

### **3.2.2. Operace na bijícím srdci („off-pump“, bez CPB)**

Všechny operace byly realizovány ze střední (mediální) sternotomie. Na postero-laterálním perikardiu byly založeny 2-3 trakční sutury. Regionální stabilizace myokardu bylo dosaženo komerčně dostupnými podtlakovými stabilizátory. Nebyl prováděn preconditioning. Operovaná koronární tepna byla zachycena silikonovou žilní smyčkou proximálně k místu anastomózy. Během našívání anastomóz byl použit intra-koronární shunt (zkrat). První (a v mnoha případech jedinou) anastomózou byla u všech nemocných anastomóza levé mamární tepny k levé přední sestupné koronární aortě. Centrální (aortální) anastomózy venózních štěpů byly našity s částečnou okluzí vzestupné aorty. U nemocných operovaných bez CPB byl intravenózně podán heparin v dávce 200 IU/kg tělesné hmotnosti, aby bylo dosaženo ACT > 300 s. Po ukončení poslední anastomózy byl účinek heparinu vyvázáno protaminem sulfátem v dávce 1:1.

### **3.2.3. Vedení anestézie**

U všech pacientů byla vedena anestézie podle současného protokolu používaného na Kardiochirurgické klinice FN v Hradci Králové. Anestézie byla zahájena podáním thiopentalu a midazolamu. Svalové relaxace bylo dosaženo aplikací cisatrankurie. Anestézie byla udržována pomocí izofuranu a intermitentně sulfentanylem. Pokud bylo zapotřebí, byl kontinuálně podáván propofol. Nemocní byli na objemově řízené ventilaci s hodnotami FiO<sub>2</sub> 0,50. Průměrný arteriální tlak byl udržován nad 50 mmHg, pokud bylo zapotřebí aplikací noradrenalinu.

### **3.3. Odběr vzorků**

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

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

naložením svorky na aortu, (1b) po uvolnění svorky na aortu a (1c) po ukončení mimotělního oběhu (Tab. 3)

Tab. 3: Odběrové schéma v průběhu operace a pooperačním období

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

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

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

#### 3.4. Stanovení buněčných parametrů (průtoková cytometrie)

Hodnocení parametrů buněčné imunity bylo provedeno imunofluorescenční analýzou na průtokovém cytometru. Průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM) je metoda, která umožňuje simultánní měření a analýzu fyzikálních a chemických vlastností buňky nebo jiných biologických částic během jejich průchodu laserovým paprskem. Nejčastěji měřenými parametry jsou rozptyl světla



v malém úhlu, tzv. forward scatter (je přímo úměrný velikosti částic), rozptyl světla v 90° úhlu, tzv. side scatter (je ovlivněn granularitou) a fluorescence různé vlnové délky (18).

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

K detekci byla použita dvoubarevná analýza s využitím monoklonálních protilátek proti povrchovým epitopům, přímo konjugovaných s FITC nebo PE (*Beckman Coulter, Serotec*). Na základě stanovení exprese vybraných povrchových znaků byly detekovány jednotlivé leukocytární subpopulace a hodnocena přítomnost povrchových aktivačních znaků souvisejících s časnou a pozdní fází zánětové reakce. Pomocí monoklonálních protilátek byla hodnocena exprese následujících povrchových znaků: CD3+ (*Immunotech*), CD4+ (*Immunotech*), CD5+ (*Immunotech*), CD8+ (*Immunotech*), CD56+ (*Immunotech*), CD69+ (*Immunotech*), CD18+ (*Serotec*), CD19+ (*Immunotech*), TLR2+ (*Serotec*), TLR4+ (*Serotec*), CD38+ (*Serotec*), CD64 a CD163 (*Leuko64 kit, Trillium Diagnostics*).

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

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

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

### 3.5. Stanovení humorálních parametrů (ELISA, nefelometrie)

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

Sérové hladiny vybraných cytokinů (Tab. 4) byly stanoveny komerčně dostupnými ELISA kity. Výsledné hodnoty byly odečteny na spektrofotometru (Photometer Multiscan) při vlnové délce doporučené výrobcem soupravy a analyzovány softwarem Genesis. C-reaktivní protein byl hodnocen imunonefelometricky na analyzátoru IMMAGE 800 (Beckman Coulter, USA). Hladiny PTX3 byly stanoveny za pomoci detekčního setu (Alexis, Switzerland) obsahujícího vazebnou monoklonální protilátku PTX3 (700 ng/ml), sekundární polyklonální protilátku PTX (25ng/ml) a rekombinantní lidský PTX3 standard.

Tab. 4: Vyšetřované humorální parametry

| Paramter     | Diagnostický ELISA kit                         |
|--------------|--|
| IL-6         | Human IL-6 Immunoassay, R&D Systems            |
| IL-10        | Human IL-10 Immunoassay, R&D Systems           |
| IL-13        | Human IL-13 Immunoassay, R&D Systems           |
| sCD14        | BioSource sCD-14 EASIA kit, BioSource          |
| LBP          | Human LBP ELISA Kit, HyCult biotechnology      |
| Hsp60, Hsp70 | Hsp60/Hsp70 ELISA kit, Stressgen Bioreagents   |
| Cu/Zn SOD    | Human Cu/ZnSOD ELISA, Bender MedSystems        |
| PMN elastáza | Human PMN elastase ELISA, Bender MedSystems    |
| P-selektin   | Human sP-selectin Immunoassay, R&D Systems     |
| PTX3         | PTX (human) detection Set, Alexis Biochemicals |
| CRP          | Immunoassay reagents, Beckman Coulter          |

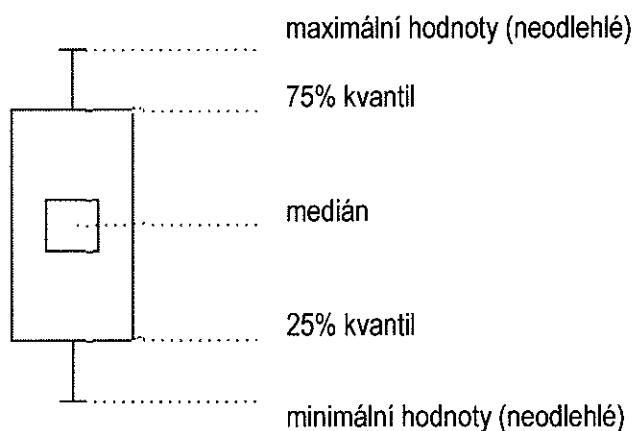
### 3.6. Statistika

Změny jak buněčných, tak sérových parametrů a rozdíly mezi oběma skupinami pacientů byly statisticky vyhodnoceny analýzou variance a následným mnohonásobným porovnáním. Výsledky jsou v krabicových grafech vyjádřeny jako medián a kvantily. Rozsah dosažených hodnot bez odlehlých a extrémních hodnot je vyznačen vertikální čarou.

Byla zhodnocena dynamika a kvantitativní změna jednotlivých parametrů v rámci sledované skupiny pacientů. Změny v průběhu operace a následném pooperačním období byly hodnoceny porovnáním vzhledem k hodnotám naměřeným při úvodu do anestézie. Bylo provedeno vzájemné porovnání obou skupin pacientů. Graficky znázorněné jsou pouze hodnoty naměřené ve venózní krvi.

Všechny testy byly prováděny při  $\alpha=0,05$ . Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí statistického softwaru Statistica 5.5 (StatSoft, USA).

Vysvětlivky ke grafům:



Dosažené hladiny významnosti

|     |              |
|-----|--------------|
| *   | 0,05 - 0,01  |
| **  | 0,01 - 0,001 |
| *** | < 0,001      |

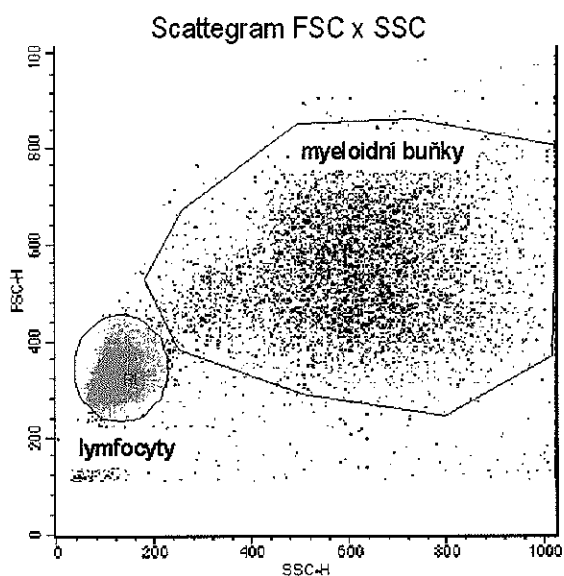
## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Buněčné parametry

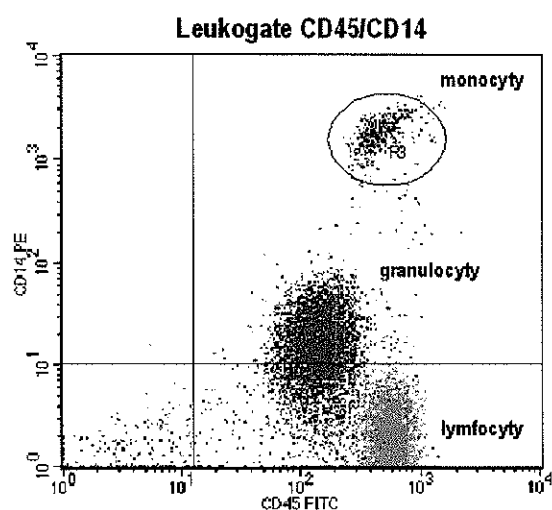
Hodnocení parametrů buněčné imunity bylo provedeno imunofluorescenční analýzou na průtokovém cytometru FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, USA). Na základě velikosti a morfologie buněk (Obr.1) a stanovení exprese vybraných povrchových znaků byly detekovány jednotlivé leukocytární subpopulace (Obr. 2) a hodnocena přítomnost povrchových aktivačních znaků souvisejících s časnou a pozdní fází zánětové reakce.

Byla provedena analýza vzorků arteriální i venózní krve. Exprese na buňkách lymfoidní nebo myeloidní linie byla vyjádřena jako relativní nebo absolutní počet pozitivních buněk exprimujících daný znak. U vybraných znaků byla intenzita exprese vyjádřena také v podobě MFI indexu (mean fluorescence intensity).

U jednotlivých skupin pacientů byla sledována změna v expresi vybraných povrchových znaků vzhledem k předoperačním hodnotám. Bylo provedeno vzájemné porovnání obou skupin pacientů. Graficky znázorněné jsou pouze hodnoty naměřené ve vzorcích venózní krvi.



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



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

#### 4.1.1. Změny v zastoupení leukocytárních subpopulací

Imunitní reakce jsou zajišťovány mnoha různými druhy buněk a molekul a jejich vzájemnými interakcemi. Buněčnou složku imunity tvoří bílé krvinky - neboli **leukocyty**. Průměrné množství leukocytů u dospělého člověka je  $4-9 \cdot 10^9/l$  krve. Buňky imunitního systému se vyvíjejí v krvetvorných orgánech diferenciací pluripotentních kmenových buněk. Dělením kmenových buněk vznikají dvě základní linie – myeloidní a lymfoidní.

Všechny druhy myeloidních buněk (monocyty, granulocyty, dendritické buňky) tvoří základ nespecifické části imunitního systému. Většina z nich je nadána schopností fagocytózy a jsou producenty cytokinů a dalších rozpustných mediátorů. Působí také jako velmi důležité buňky prezentující antigen (APC, antigen presenting cells) T-lymfocytům.

Z lymfoidní linie se diferencují T- a B- lymfocyty. T-lymfocyty jsou nezbytné pro antigenně specifické buněčně zprostředkované i protilátkové imunitní reakce. Na základě exprese povrchových koreceptorů je populace T-lymfocytů rozdělena na subpopulaci pomocných induktorových  $CD4^+$  T- lymfocytů (rozpoznávají antigenní fragment prezentovaný molekulami HLA II. třídy) a subpopulaci tlumivých cytotoxických  $CD8^+$  T-lymfocytů (rozpoznávají antigenní fragment prezentovaný molekulami HLA I. třídy).

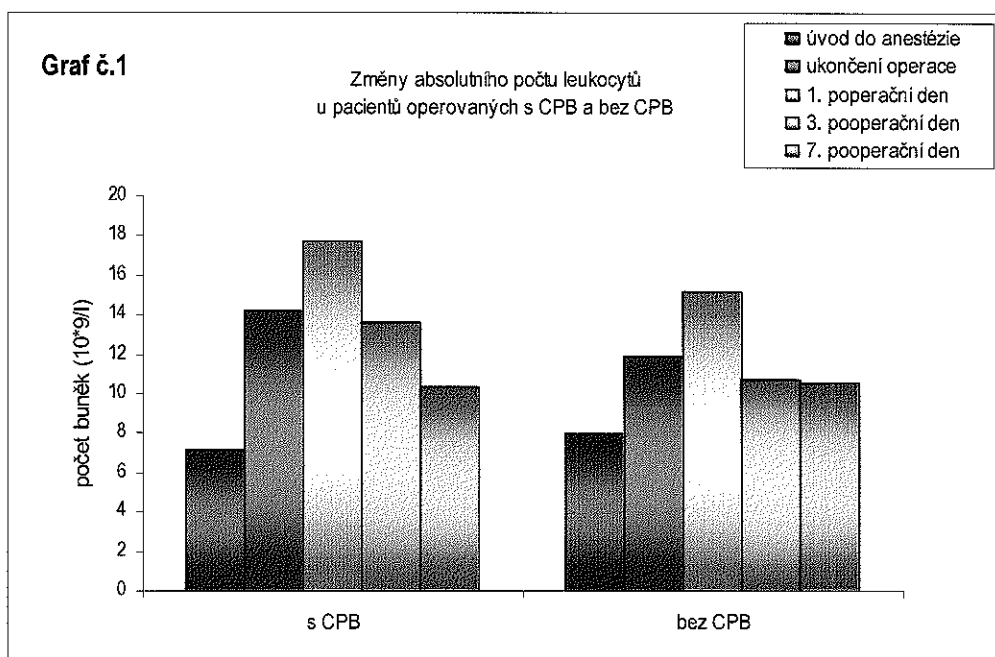
Buněčným základem specifické humorální imunity jsou B-lymfocyty, exprimující specifický membránový znak  $CD19^+$ . Populaci B-lymfocytů lze rozlišit na dvě subpopulace, označované jako B1 a B2. B lymfocyty subsetu B1 jsou charakteristické koexpresí molekuly CD5. Protilátková aktivita B1 B-lymfocytů vede k tvorbě tzv. přirozených protilátek. Není přitom závislá na regulační podpoře T-lymfocytů. Přirozené protilátky představují první bariéru protilátkové imunity a funkčně stojí na rozhraní přirozené a specifické imunity. Vazba přirozených protilátek spolu s navázaným CRP usnadňuje odstraňování apoptotických tělísek bez rozvoje nežádoucí zánětové odpovědi. Tyto vlastnosti přirozených protilátek jsou významné např. v inhibici nežádoucích zánětvých procesů v cévní stěně, mající za následek rozvoj aterosklerotického plátu (1). Znak CD5 se s vysokou densitou objevuje také na všech zralých T-lymfocytech. CD5 receptor se podílí na přenosu signálu prostřednictvím TcR a BcR.

Všechny buňky, které jsou schopné zprostředkovat non-TcR cytotoxicitu (tj. cytotoxicita nezávislá na přítomnosti receptoru T-lymfocytů) v periferní krvi, mají na svém povrchu exprimovanou molekulu CD56. Tato subpopulace obsahuje jak NK buňky ( $CD3^-/CD56^+$ ), tak malou subpopulaci T-lymfocytů ( $CD3^+/CD56^+$ ) tzv. NK-T buňky. Znak CD56 není exprimován na ostatních populacích T- nebo B- lymfocytů, monocytů, granulocytů nebo erytrocytů.

## VÝSLEDKY

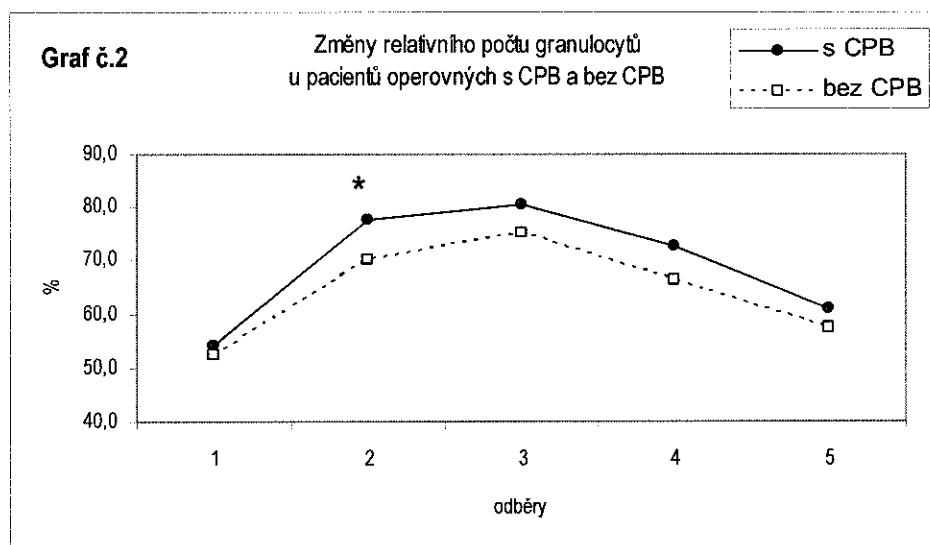
Bylo sledováno zastoupení jednotlivých leukocytárních a lymfocytárních subpopulací u nemocných podstupujících kardiochirurgickou operaci s použitím mimotělního oběhu (s CPB, n=20 osob) nebo operovaných na bijícím srdci (bez CPB, n=20 osob).

V důsledku kardiochirurgické operace dochází u obou skupin pacientů k výrazné leukocytóze. Maximálních hodnot absolutního počtu **leukocytů** v krvi ( $17,7 \times 10^9$  bb./l u pacientů s CPB resp.  $15,2 \times 10^9$  bb./l u pacientů bez CPB) bylo dosaženo první pooperační den (graf č.1).

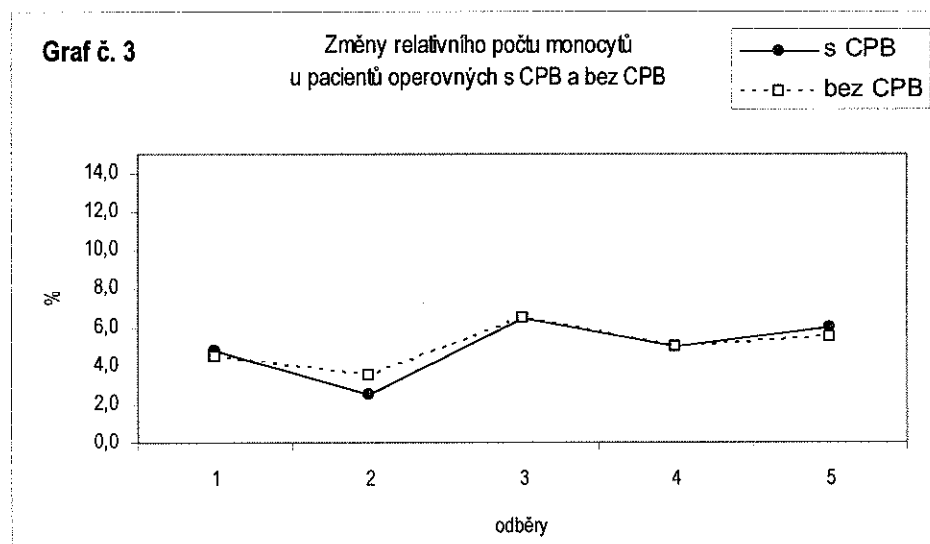


Nárůst absolutního počtu leukocytů je způsoben zvýšeným podílem neutrofilních granulocytů. Zvýšené procentuálního zastoupení **granulocytů** je pozorováno již v průběhu operace. U pacientů operovaných s CPB je tento nárůst z 54,3 % (při úvodu do anestézie) na 77,8 % (po ukončení operace), u pacientů operovaných bez CPB z 52,3 % na 70,3 %. Maxima je u obou skupin pacientů dosaženo první pooperační den (80,3 % u pacientů s CPB resp. 75,0 % u pacientů bez CPB), v dalším pooperačním období dochází k normalizaci na výchozí hodnoty. Zvýšený podíl granulocytů

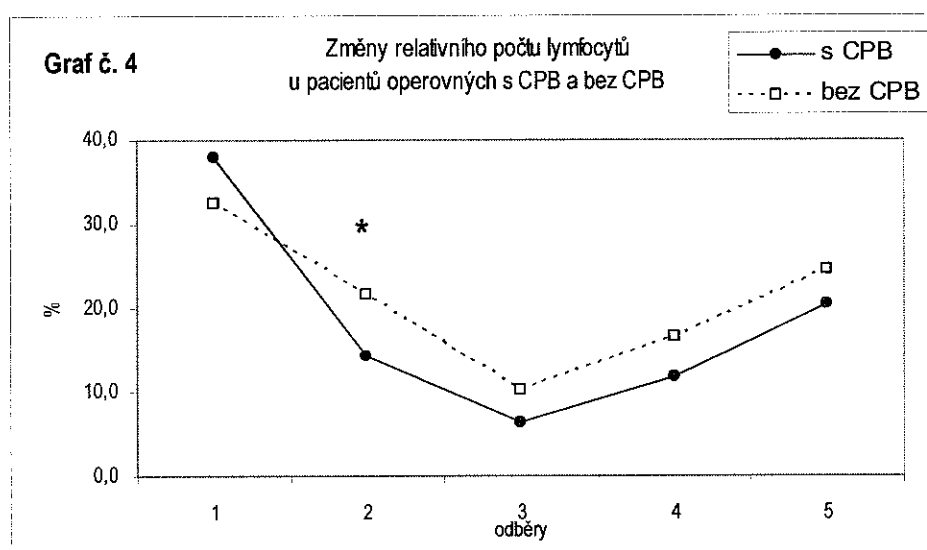
byl obdobný u obou skupin pacientů. Statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi pacienty operovanými s CPB a bez CPB byl zaznamenán pouze bezprostředně po ukončení operace (graf č.2).



Změny relativního počtu **monocytů** (CD14+) jsou pouze minimální a v celém sledovaném období se u obou skupin pacientů pohybují v rozmezí 2,5 – 6,5 %. Nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi pacienty operovanými s CPB a bez CPB (graf č.3).



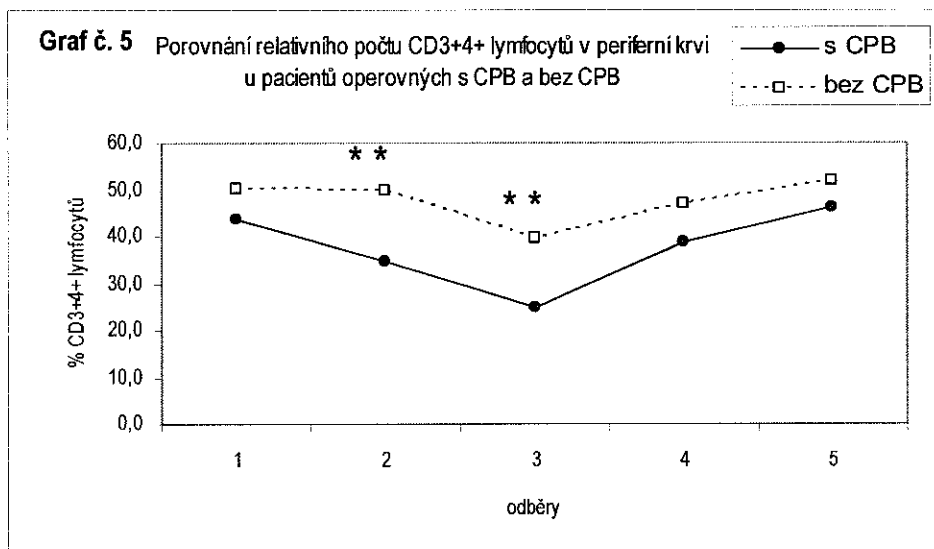
Kardiochirurgické operace jsou provázeny poklesem relativního počtu **lymfocytů**. Výrazná lymfopenie je u obou skupin pacientů pozorována již po ukončení operace, u pacientů operovaných s CPB dochází k poklesu z výchozích 38,0 % na 14,3 % resp. z 32,0 % na 21,5 % u pacientů bez CPB. Minimálních hodnot je dosaženo první pooperační den (6,3 % u pacientů s CPB resp. 10,3 % u pacientů bez CPB). V následném pooperačním období dochází opět k postupnému nárůstu relativního počtu lymfocytů. Snížený podíl lymfocytů v důsledku kardiochirurgických operací byl obdobný u obou skupin pacientů. Statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi pacienty operovanými s CPB a bez CPB byl zaznamenán pouze bezprostředně po ukončení operace (graf č.4).



U kardiochirurgických pacientů byly sledovány také změny v zastoupení vybraných lymfocytárních subpopulací. U obou skupin pacientů byl zaznamenán statisticky významný pokles lymfocytárního subsetu **CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>**. Pokles z výchozí hodnoty 43,5 % u pacientů s CPB resp. 50,0 % u pacientů operovaných s CPB je statisticky významný ( $p < 0,001$ ) u pacientů bez CPB již během operace, u pacientů bez CPB první pooperační den. Minimálních hodnot bylo u obou skupin pacientů dosaženo první pooperační den (24,8 % u pacientů s CPB resp. 29,5 % u pacientů bez CPB). Třetí a sedmý den bylo pozorováno opětovné zvýšení relativního počtu CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> lymfocytů.

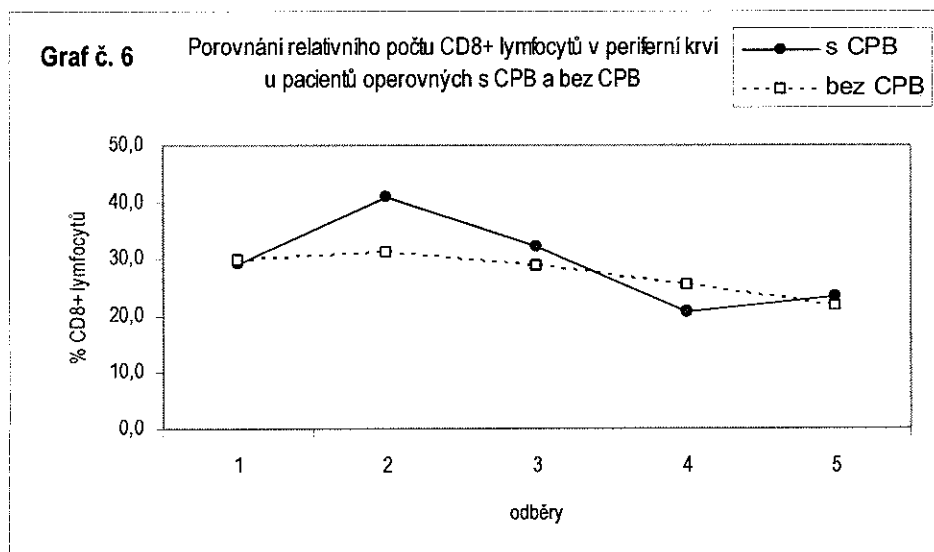


Statisticky významný rozdíl mezi skupinou pacientů operovaných s použitím CPB a operovaných bez CPB byl zjištěn po ukončení operace ( $p < 0,01$ ) a 1. pooperační den ( $p < 0,01$ ). V ostatních sledovaných intervalech nebyl rozdíl mezi skupinami statisticky významný (graf č.5).



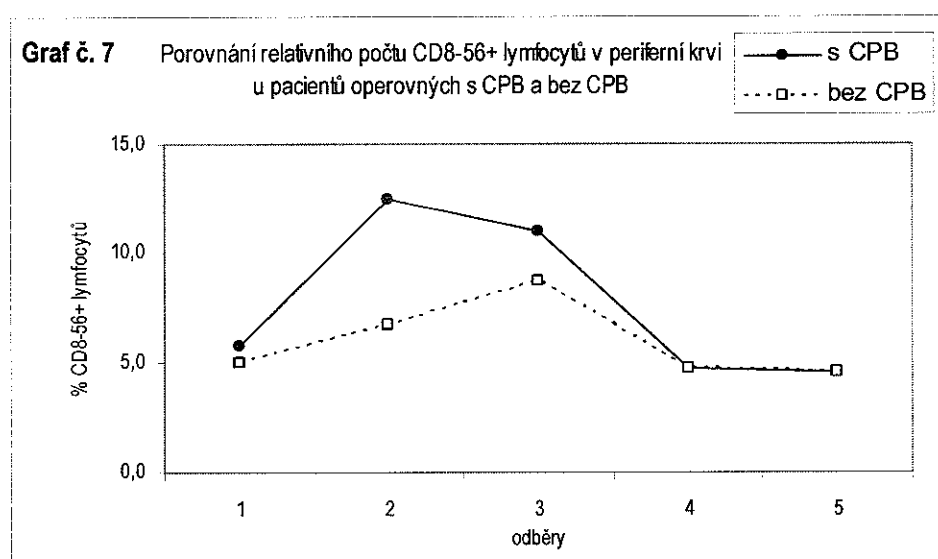
Relativní počet **CD8+** pozitivních lymfocytů vykazuje plynulý pokles v celém pooperačním období, a to u pacientů s CPB z výchozích 29,0 % na 23,8 % resp. z 29,8 % na 21,8 % u pacientů bez CPB. U pacientů operovaných s použitím mimotělního oběhu předchází tomuto poklesu statisticky významné zvýšení ( $p < 0,001$ ) CD8+ pozitivních lymfocytů po ukončení operace (41,0 %).

Mezi skupinou pacientů operovaných s použitím CPB a bez použití CPB nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v relativním počtu CD8+ pozitivních lymfocytů (graf č. 6).



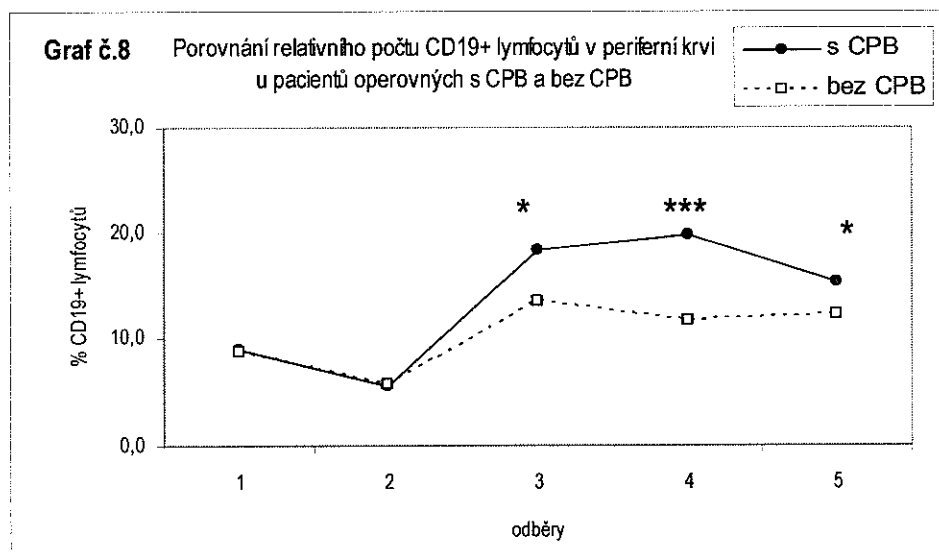
Relativní počet **CD8<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>** lymfocytů vykazuje obdobnou dynamiku u obou skupin pacientů. V průběhu operace až do prvního pooperačního dne dochází k postupnému nárůstu relativního počtu CD8-CD56<sup>+</sup> lymfocytů. Maxima je dosaženo u pacientů operovaných bez použití CPB první pooperační den (8,8 %), u pacientů operovaných s použitím mimotělního oběhu již po ukončení mimotělního oběhu (12,5 %). V pooperačním období je u obou skupin pozorován pokles k výchozím předoperačním hodnotám (5,8 % u pacientů s CPB resp. 5,0 % u pacientů bez CPB).

Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v relativním počtu CD8-56<sup>+</sup> pozitivních lymfocytů mezi skupinou pacientů operovaných s použitím CPB a bez použití CPB (graf č.7).



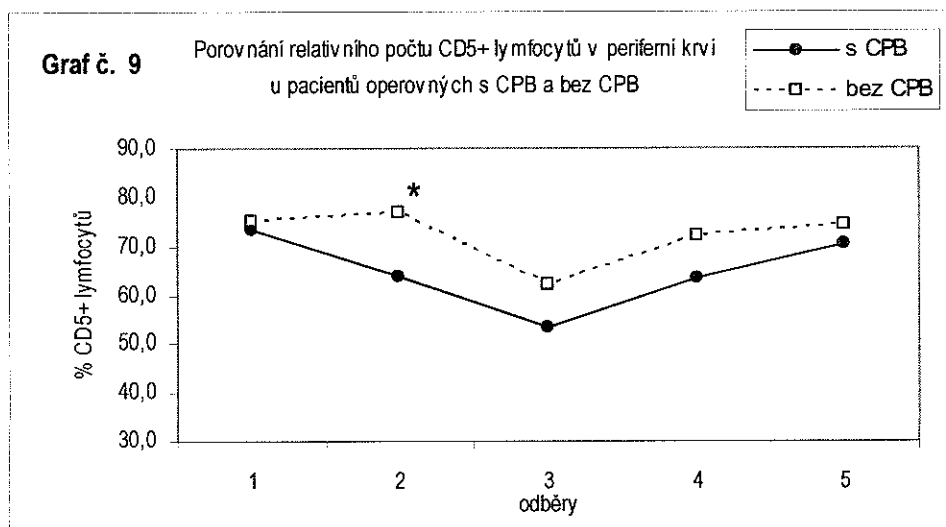
U obou skupin pacientů je pozorován pokles **CD19<sup>+</sup>** lymfocytů (z 9,0 % na 5,5 % u pacientů s CPB resp. z 8,8 % na 5,8 % u pacientů bez CPB), který je v pozdějším pooperačním období následován signifikantním zvýšením (1. pooperační den  $p < 0,001$  resp. 3. a 7. pooperační den  $p < 0,01$ ). Maximálních hodnot bylo dosaženo u pacientů s CPB třetí pooperační den (19,8 %), u pacientů bez CPB bylo maxima (13,5 %) dosaženo již první den po operaci.

Relativní počet CD19<sup>+</sup> lymfocytů byl v celém pooperačním období statisticky významně vyšší ve skupině pacientů operovaných s CPB (graf č.8).



V průběhu operace je pozorován pokles relativního počtu CD5+ lymfocytů. U obou skupin bylo minimálních hodnot dosaženo první pooperační den (53,1 % u pacientů s CPB resp. 62,0 % u pacientů bez CPB). Tento statisticky významný ( $p < 0,001$ ) pokles v porovnání s předoperačními hodnotami (73,5% u pacientů s CPB resp. 75,3 % u pacientů bez CPB) je následován opětovným vzestupem v celém pooperačním období.

Při porovnání jednotlivých skupin pacientů byl po ukončení operace zaznamenán signifikantní vyšší podíl CD5+ lymfocytů ve skupině pacientů operovaných bez CPB (graf č. 9).



#### 4.1.2. Dynamika exprese membránové molekuly CD18

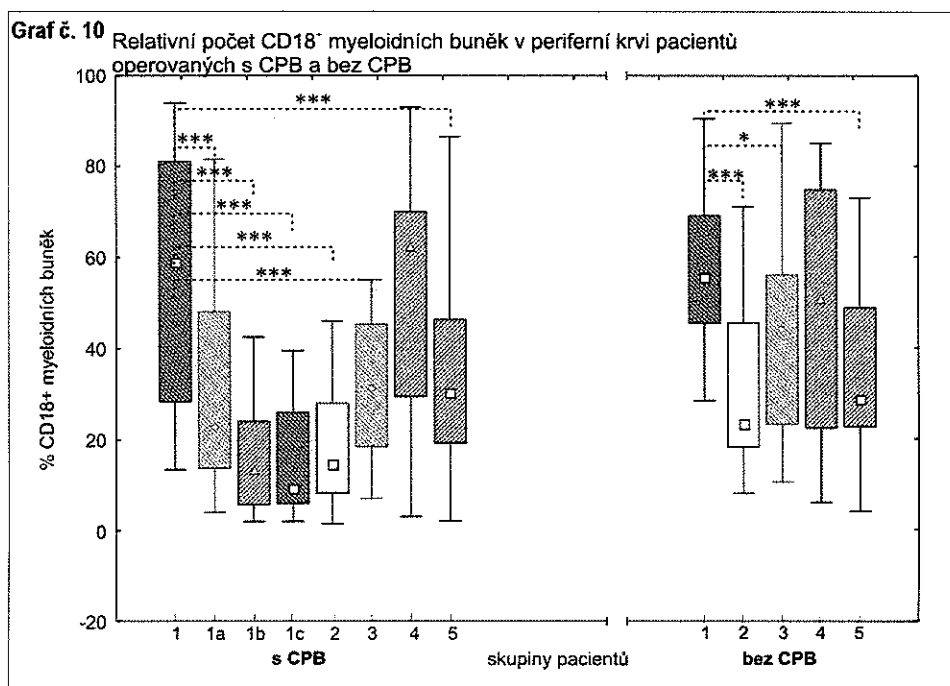
Molekula CD18, leukocytární adhezni  $\beta_2$  integrinová molekula asociována s  $\alpha$  integriny CD11a, b nebo c, se zapojuje do adhezni interakci leukocytů. Zodpovídá za pevné přilnutí leukocytů k endotelové výstelce a jejich migraci do subendoteliálního prostoru. Adheze leukocytárních elementů, zvláště monocytů a T lymfocytů, na aktivovanou endotelovou výstelku je podmínkou rozvoje zánětové reakce v arteriální stěně v procesu aterosklerózy (1). Zvýšená exprese integrinových molekul je spojena s aktivací buňky a je nalézána u pacientů s ischemickou chorobou srdeční.

K analýze exprese CD18 byla použita protilátka MEM-148, která specificky rozpoznává zkrácenou formu CD18  $\beta_2$  integrinového řetězce. Tato forma je ve zvýšené míře exprimovaná na aktivovaných monocytech a neutrofilech (34).

#### VÝSLEDKY

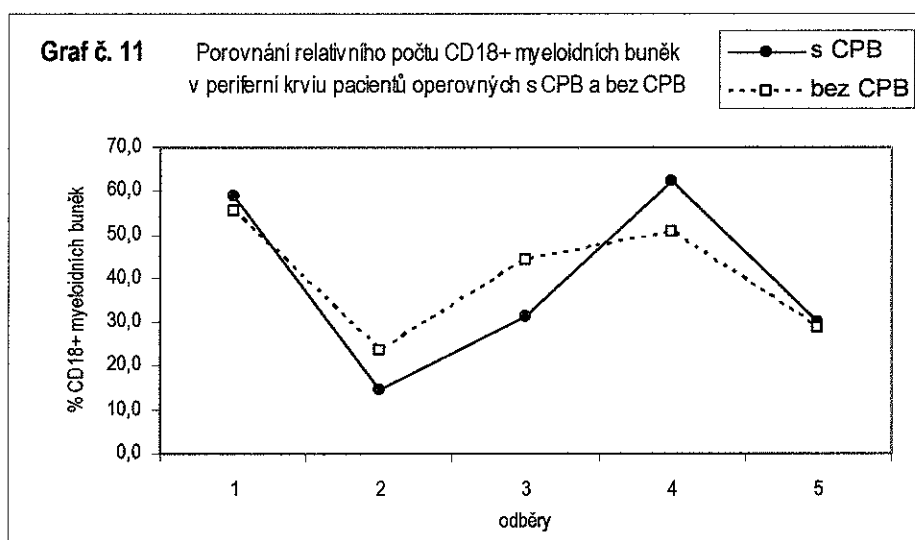
Byla sledována povrchová exprese molekuly CD18 (MEM-148) u nemocných podstupujících kardiokirurgickou operaci s použitím mimotělního oběhu (CPB, n=20 osob) nebo operovaných na bijícím srdci (n=20 osob).

Změny relativního počtu myeloidní buněk exprimujících aktivační molekulu CD18 (MEM-148) vykazovaly obdobný průběh u obou skupin pacientů (graf č. 10).



Jak u pacientů operovaných s CPB, tak u pacientů operovaných na bijícím srdci bylo v porovnání s předoperačními hodnotami (58,8 % u pacientů s CPB resp. 55,5 % u pacientů bez CPB) pozorováno signifikantní snížení již v průběhu operace až po první pooperační den (31,3% u pacientů s CPB resp. 44,3 % u pacientů bez CPB). Třetí pooperační den následovala normalizace k výchozím hodnotám a sedmý pooperační den došlo opět k signifikantně významnému ( $p < 0,001$ ) snížení relativního počtu CD18+ lymfocytů.

Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v relativním počtu CD18+ myeloidních buněk mezi pacienty operovanými s použitím CPB a operovanými na bijícím srdci (graf č. 11).



Publikace výsledků:

**Kudlová M.,** Koláčková M., Kuneš P., Lonský P., Mandák J., Andrýs C., Krejsek J.: Expression of an activated form of integrin  $\beta_2$  chain CD18 in cardiac surgical operations. *Acta Medica*, 2007, 50(3): 187-193.

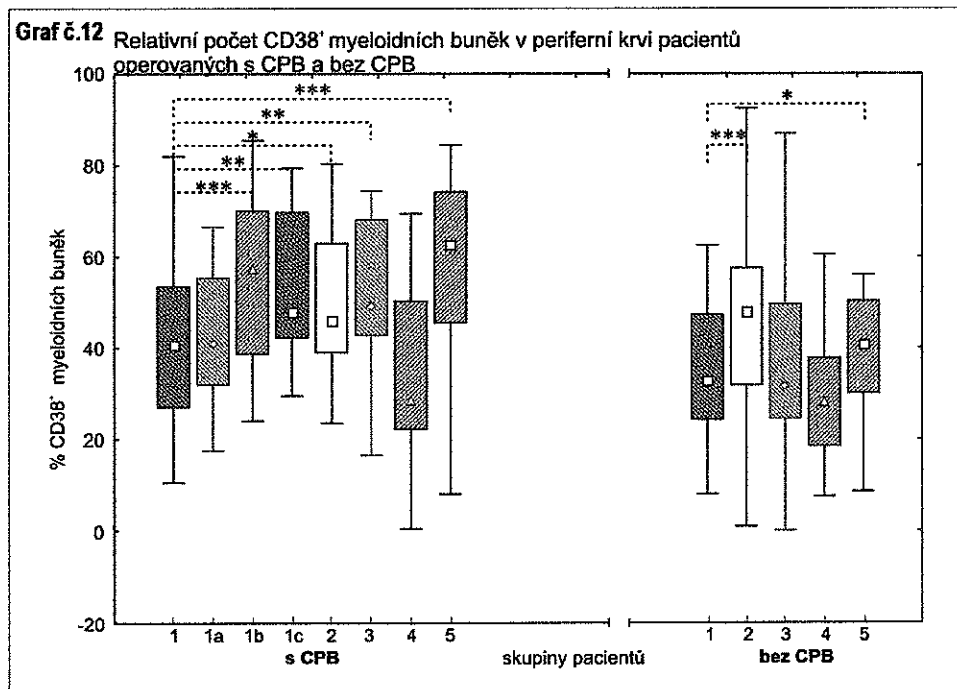
#### 4.1.3. Dynamika exprese membránové molekuly CD38

Molekula CD38, integrální membránový glykoprotein typu II, je exprimován v různé denzitě na většině hematopoetických buněk, převážně během časně diferenciaci a dále po aktivaci. Je silně exprimován na plazmatických buňkách. CD38 se uplatňuje jako ektoenzym s ADP-ribosyl-cyklázovou aktivitu a vykazuje řadu imunoregulačních funkcí. Podílí se na regulaci buněčné aktivace a proliferace, adhezi leukocytů k endotelovým buňkám, indukuje sekreci cytokinů, aktivaci kináz a fosforylaci řady buněčných proteinů (35).

#### VÝSLEDKY

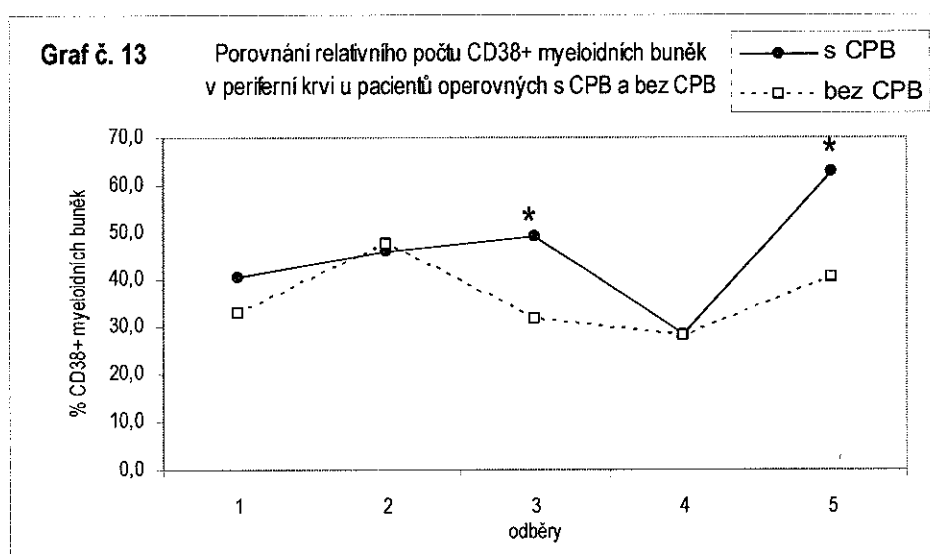
Byla sledována povrchová exprese molekuly CD38 u nemocných podstupujících kardiokirurgickou operaci s použitím mimotělního oběhu (CPB, n=20 osob) nebo operovaných na bijícím srdci (n=20 osob).

Změny relativního počtu myeloidní buněk exprimujících molekulu CD38 vykazovaly obdobný průběh u obou skupin pacientů (graf č. 10).



Jak u pacientů operovaných s CPB, tak u pacientů operovaných na bijícím srdci bylo v porovnání s předoperačními hodnotami (40,5 % u pacientů s CPB resp. 32,8 % u pacientů bez CPB) pozorováno zvýšení relativního počtu CD38+ myeloidních buněk, signifikantně významné zvýšení bylo zaznamenáno již v průběhu (u pacientů s CPB) a po ukončení operace. První pooperační den byl statisticky významně vyšší počet CD38+ myeloidních buněk pozorován již pouze u pacientů operovaných s použitím CPB (49,3 %), u pacientů operovaných na bijícím srdci bylo naopak pozorován pokles pod hodnoty naměřené při úvodu do anestézie (31,5 %). Nejnižších hodnot bylo u obou skupin dosaženo třetí pooperační den (28,3 % u pacientů s CPB resp. 28,0 u pacientů bez CPB), tento pokles však nebyl vzhledem k předoperačním hodnotám statisticky významný. K signifikantnímu zvýšení relativního počtu CD38+ myeloidních buněk (62,8 % u pacientů s CPB resp. 40,5 % u pacientů bez CPB) došlo opět až sedmý pooperační den.

Při porovnání jednotlivých skupin pacientů byl zjištěn signifikantně významně ( $p < 0,05$ ) vyšší podíl CD38+ myeloidních buněk u pacientů operovaných s použitím CPB, a to první a sedmý pooperační den (graf č. 13).



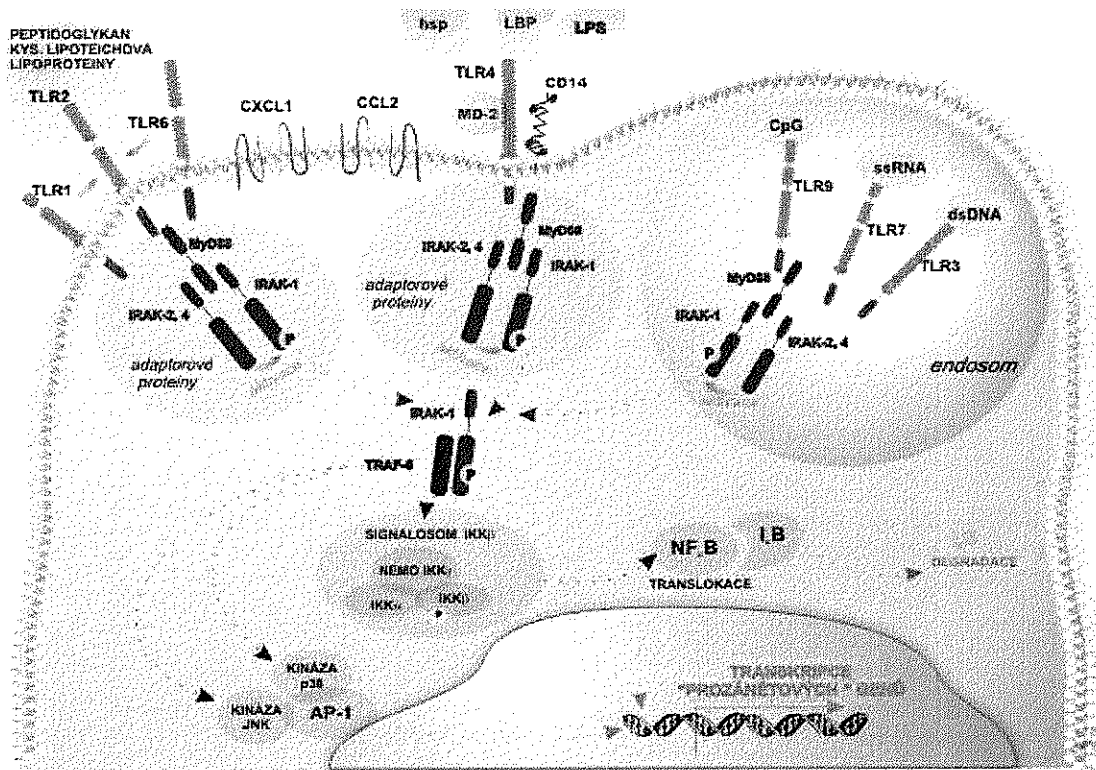
#### Publikace výsledků:

Koláčková M., Kudlová M., Andrýs C., Kuneš P., Lonský V., Krejsek J.: The impact of interleukin-10 on CD38 expression in cardiac surgical patients (poster a abstrakt). International Conference of Analytical Cytometry IV, Brno, 23.-26.6.2007.

#### 4.1.4. Dynamika exprese membránové molekuly TLR-2 a TLR-4

Prostřednictvím TLR receptorů jsou identifikovány mimořádně rozmanité podněty exogenního i endogenního původu, které obvykle pro organismus představují signály nebezpečí. Membránové receptory TLR identifikují signály nebezpečí extracelulárně lokalizovaných patogenů. Jsou v největší míře vyjádřeny na klíčových buňkách přirozené imunity tj. na dendritických buňkách a makrofázích. V menší míře jsou přítomny také na epitelových a endotelových buňkách, adipocytech či kardiomyocytech. Nitrobuněčné receptory TLR jsou zaměřeny na identifikování nebezpečných vzorů intracelulárních patogenů a jsou lokalizovány v endozomálním kompartmentu. Prostřednictvím TLR receptorů jsou rozeznávány především nebezpečné vzory patogenních mikroorganismů a nebezpečné signály, které vznikají patologicky ve vnitřním prostředí těla (6). Těmi jsou např. stresové proteiny hsp, modifikované molekuly mezibuněčné hmoty či oxidativně nebo enzymaticky modifikované lipoproteiny vznikající v důsledku prohlubující se aterosklerotické léze (3).

Identifikace nebezpečných vzorů prostřednictvím receptorů TLR vede k iniciaci nitrobuněčných signálních drah, které stimulují přepis genů kódujících látky s prozánětovými účinky podílejícími se na rozvoji zánětové reakce (obr. 3). Opakovaně byla prokázána úloha polymorfismu TLR v progresi aterosklerózy rezultující ve zvýšenou incidenci kardiovaskulárních příhod (36).



Obr. 3: Aktivace makrofágů prostřednictvím receptorů TLR



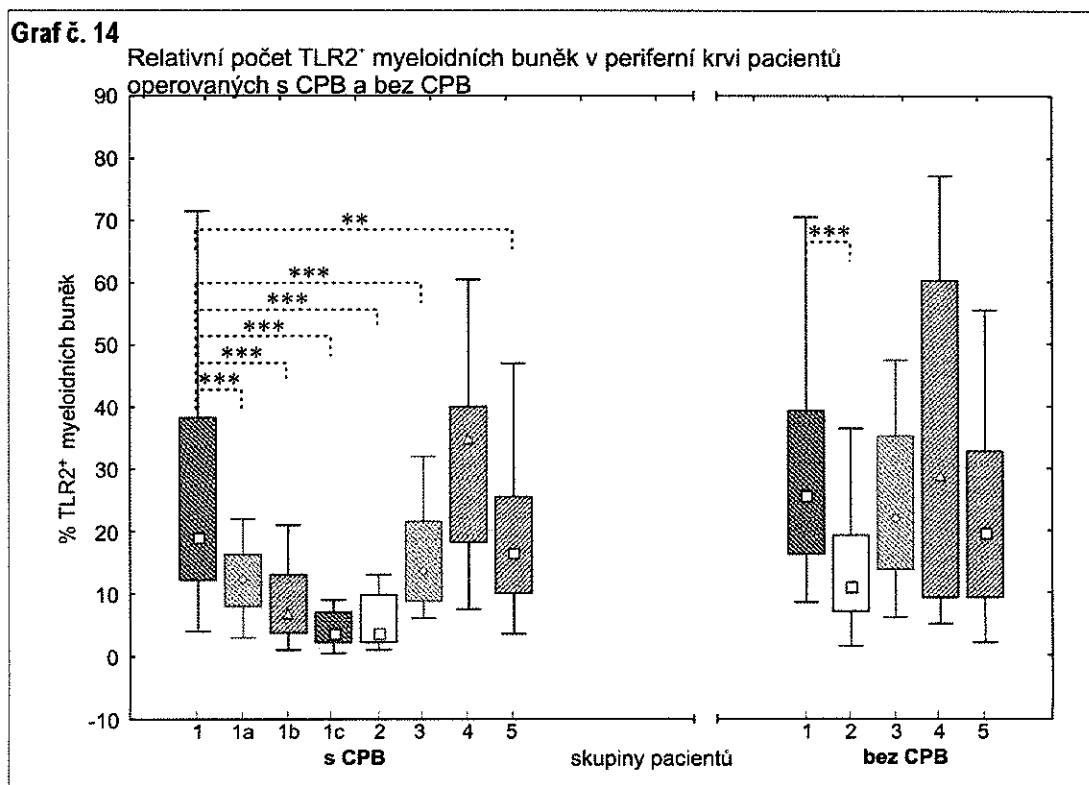
Nejširší reaktivitu má TLR-2, který je hlavním receptorem rozpoznávajícím patogenní vzory Gram-pozitivních bakterií. Receptor TLR-2 může vytvářet heterodimery s TLR-1 a TLR-6. Jako ligandy receptoru TLR-2 byly prokázány peptidoglykany, lipoteichoová kyselina, lipoarabinomanan a další bakteriální glykolipidy, glykoproteiny a lipoproteiny (6).

Nejlépe prozkoumaným receptorem ze skupiny Toll-like receptorů je receptor TLR-4. Váže řadu ligandů, z nich nejdůležitější je lipopolysacharid Gram-negativních bakterií. TLR-4 zprostředkovává rovněž odpověď na některé endogenní signály, jako je stresový protein Hsp60, který se uvolňuje z vlastních poškozených buněk, fibrinogen nebo oligosacharidy vznikající degradací hyaluronanu (37).

## VÝSLEDKY

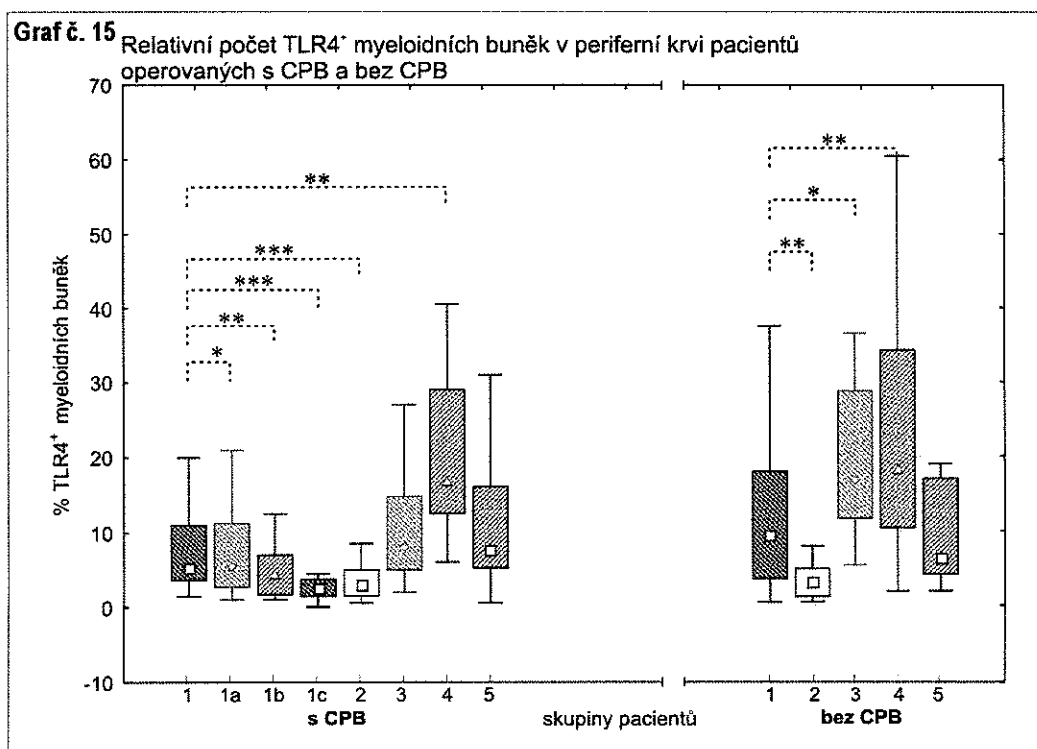
Byla sledována povrchová exprese receptoru TLR-2 a TLR-4 u nemocných podstupujících kardiologickou operaci s použitím mimotělního oběhu (CPB, n=20 osob) nebo operovaných na bijícím srdci (n=20 osob).

Byly pozorovány obdobné změny exprese TLR-2 a TLR-4 receptorů na myeloidních buňkách u obou skupin pacientů.

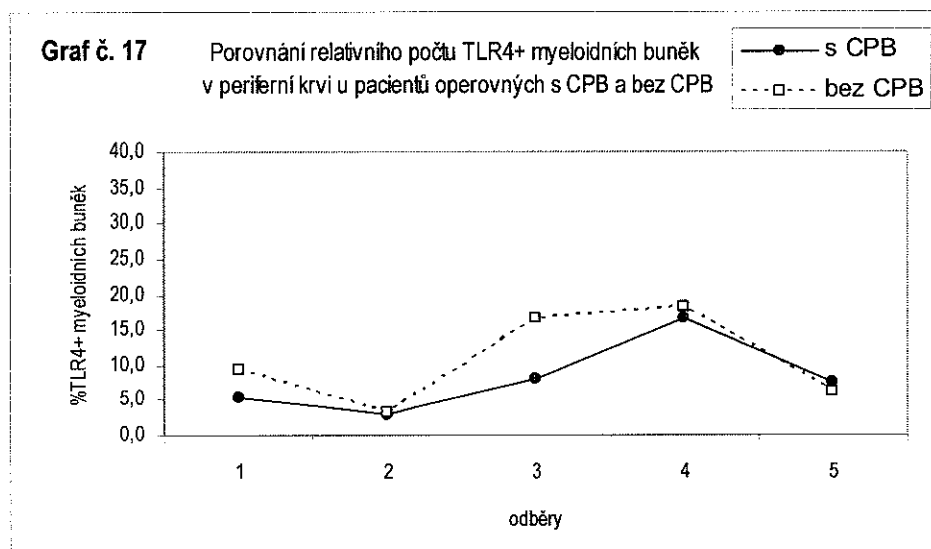
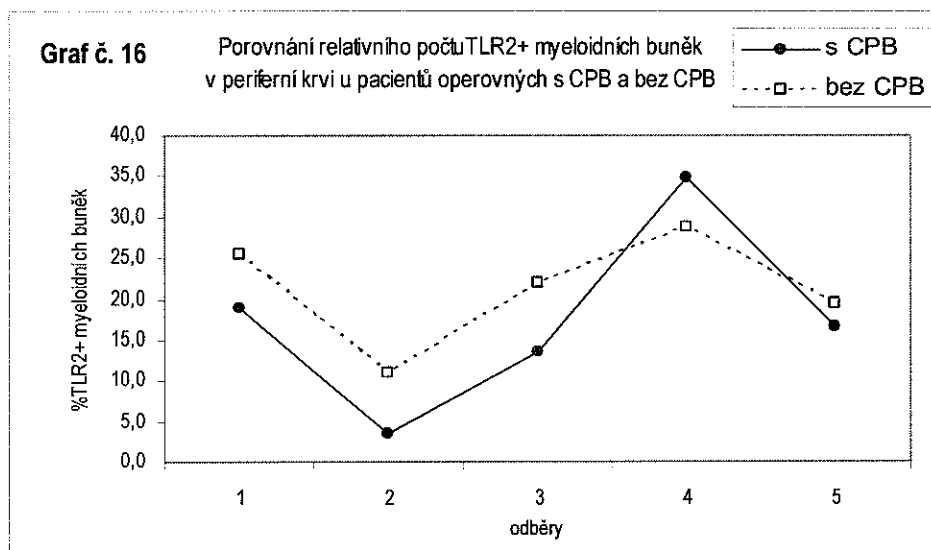


Jak u pacientů operovaných s CPB, tak u pacientů operovaných na bijícím srdci bylo v porovnání s předoperačními hodnotami (19,0 % u pacientů s CPB resp. 25,5 % u pacientů bez CPB) pozorováno snížení relativního počtu TLR-2<sup>+</sup> myeloidních buněk (graf č. 14), signifikantně významné snížení bylo zaznamenáno již v průběhu (u pacientů s CPB) a po ukončení operace. Nejnižších hodnot (3,5 % u pacientů s CPB resp. 11,0 % u pacientů bez CPB) bylo dosaženo u obou skupin pacientů po ukončení operace. Pooperační období bylo naopak provázeno zvýšenou expresí TLR-2 receptorů. Toto zvýšení bylo u pacientů operovaných s použitím CPB statisticky významné první a sedmý pooperační den. U pacientů operovaných na bijícím srdci byly pooperační změny statisticky nevýznamné.

Expresí TLR4<sup>+</sup> receptorů na myeloidních buňkách vykazuje obdobnou dynamiku jako expresí receptorů TLR2<sup>+</sup>. Jak u pacientů operovaných s CPB, tak u pacientů operovaných na bijícím srdci bylo v porovnání s předoperačními hodnotami (5,3 % u pacientů s CPB resp. 9,5 % u pacientů bez CPB) pozorováno snížení relativního počtu TLR-4<sup>+</sup> myeloidních buněk, signifikantně významné snížení bylo zaznamenáno již v průběhu (u pacientů s CPB) a po ukončení operace. Nejnižších hodnot (3,0 % u pacientů s CPB resp. 3,3 % u pacientů bez CPB) bylo dosaženo u obou skupin pacientů po ukončení operace. Pooperační období bylo naopak provázeno zvýšenou expresí TLR-4 receptorů. V porovnání s předoperačními hodnotami bylo toto zvýšení u obou skupin pacientů statisticky významně vyšší první a třetí pooperační den (graf č. 15).



Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v expresi ani receptorů TLR-2 (graf č.16), ani TLR-4 (graf č. 17) mezi pacienty operovanými s CPB a operovanými na bijícím srdci.



#### Publikace výsledků:

Krejsek J., Koláčková M., **Kudlová M.**, Kuneš P., Mandák J., Andrys C.: *TLR-2 and TLR-4 expression in patients undergoing cardiac surgery* (poster a abstrakt). 4th International Innate Immunity Conference, Corfu, Greece, 4.-9.6.2006

Krejsek J., Kuneš P., Koláčková M., **Kudlová M.**: *The number of Toll-like receptor 2 and 4-expressing immune cells is changed during cardiac surgical operation* (poster a abstrakt). 2<sup>nd</sup> International Conference on Crossroads between Innate and Adaptive Immunity, Crete, Greece, 17.-22.6.2007

#### **4.1.5. Změny exprese aktivační molekuly CD64 a vychytávací molekuly CD 163 v průběhu kardiologické operace**

CD64 (FcγR1) je receptor pro IgG. Vyskytuje se na dendritických buňkách, NK buňkách, buňkách kostní dřeně, aktivovaných makrofázích a monocytech a aktivovaných granulocytech. Prozáznětlivé faktory jako INF-γ a G-CSF zvyšují jeho expresi na buňkách. Zvýšená exprese CD64 na neutrofilech je používána jako indikátor zánětu a sepse (38).

CD163 je scavengerový receptor pro hemoglobin. Vyskytuje se na aktivovaných monocytech a makrofázích. Je uvolňován jako solubilní sCD163 do plazmy. V menší míře se vyskytuje rovněž na lymfocytech a granulocytech. Jeho exprese je indukována IL-6 a glukokortikoidy. Je exprimován hlavně ve střední a pozdní fázi zánětu. Má obecně protizánětlivý účinek. Podobně jako zvýšená exprese CD64 na neutrofilech, zvýšená exprese CD163 na monocytech a makrofázích a vysoká koncentrace v plazmě může sloužit jako indikátor zánětu a sepse.

Leuko64 kit představuje komerčně dostupný diagnostický set ke stanovení povrchové exprese CD64 (FITC) a CD163 (PE) na jednotlivých leukocytárních populacích za účelem diferenciální diagnostiky bakteriální sepse a určení zánětlivé odpovědi jiné etiologie. Součástí kitu jsou fluorescenčně značené „beads“, které jsou určeny ke kalibraci přístroje a slouží zároveň jako kvantifikační fluorescenční standard. Expresí antigenu v příslušné populaci buněk je vyjádřena ve formě indexu. Vzhledem k vysoké stabilitě a reprodukovatelnosti, je možné perspektivní použití tohoto testu jako rutinního klinického nástroje pro sledování zánětlivé odpovědi.

#### **VÝSLEDKY**

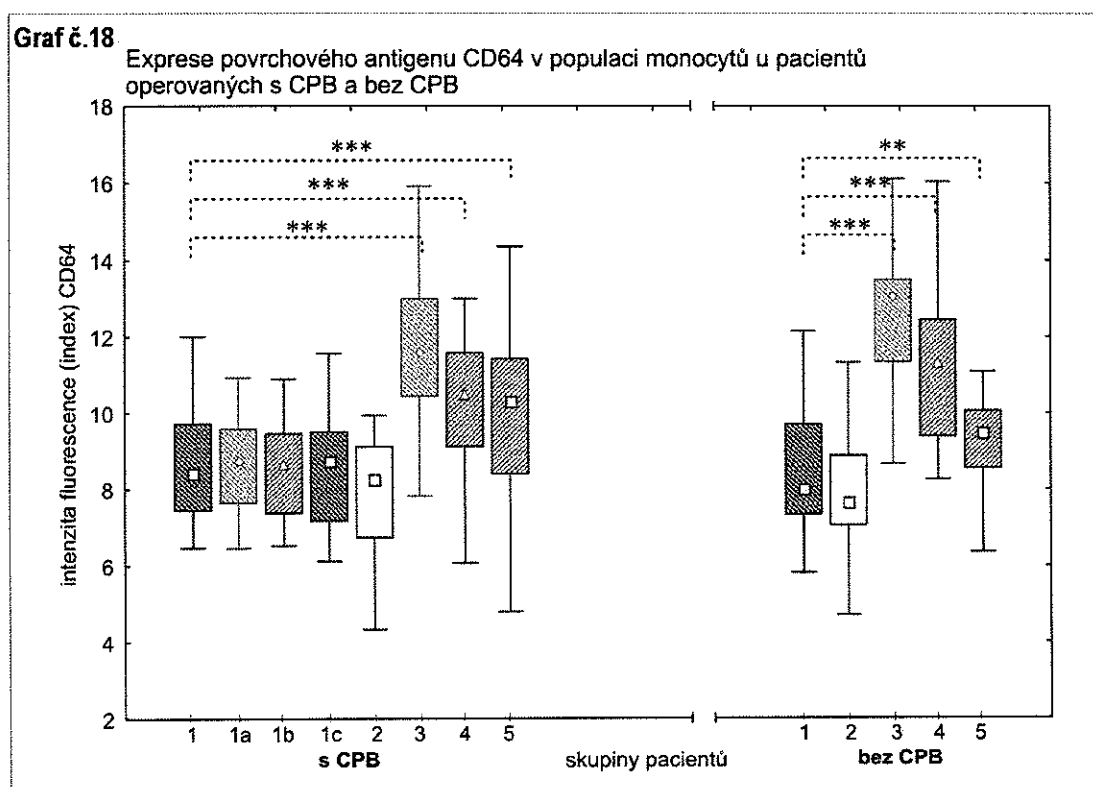
Byla sledována povrchová exprese CD64 a CD163 u nemocných podstupujících kardiologickou operaci s použitím mimotělního oběhu (CPB, n=20 osob) nebo operovaných na bijícím srdci (n=20 osob).

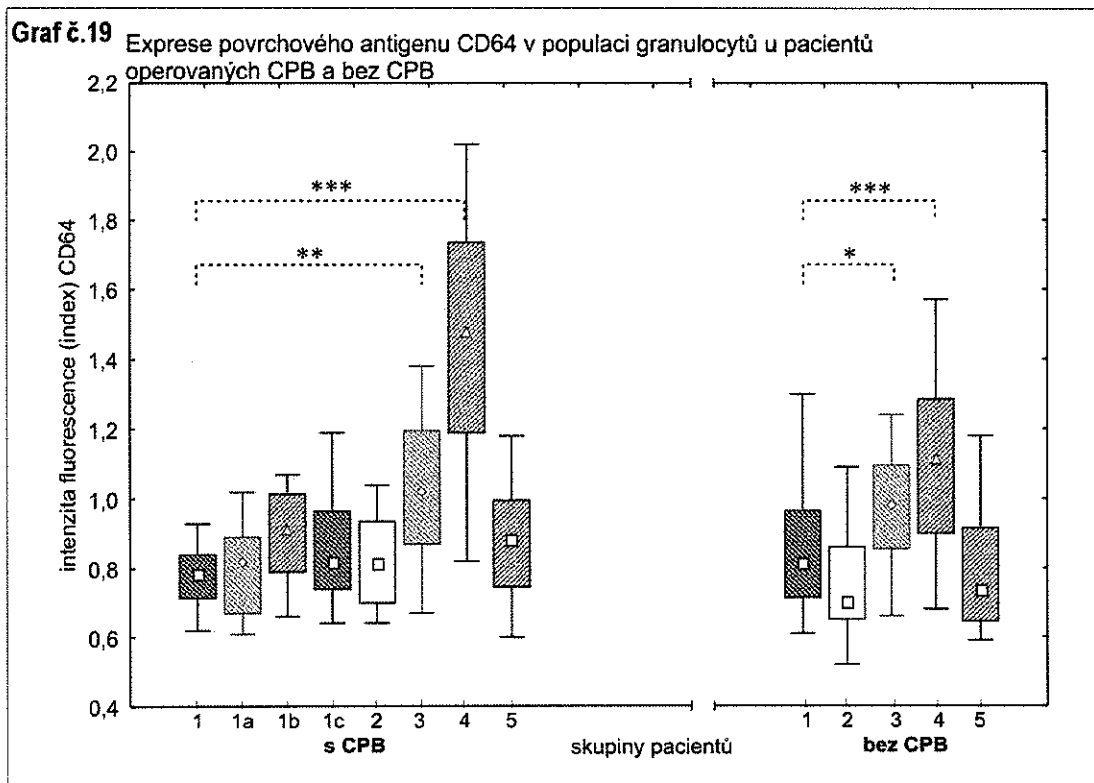
Povrchová exprese sledovaných znaků byla vyjádřena v podobě CD64 indexu a CD163 indexu zvláště pro populaci monocytů a granulocytů.

Kardiochirurgické operace jsou provázeny významnou dynamikou exprese obou sledovaných aktivačních markerů.

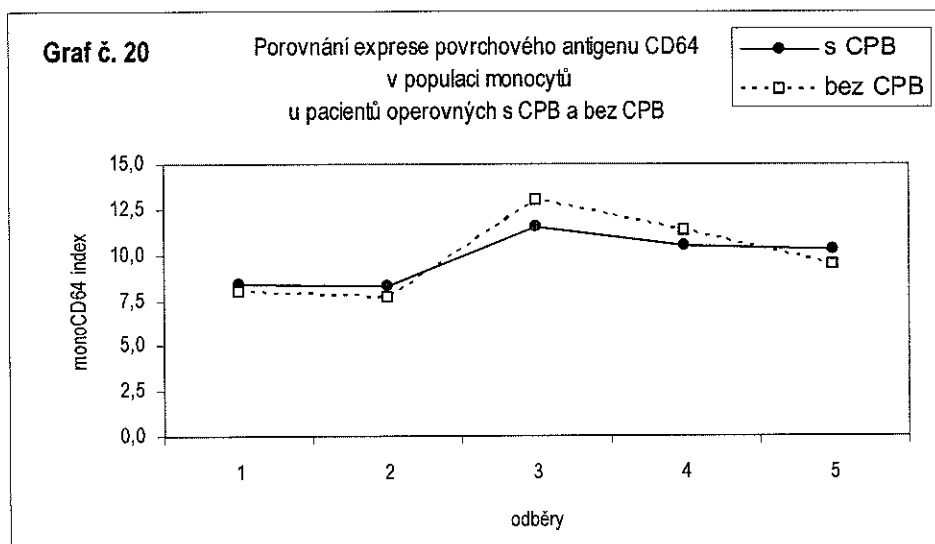
V průběhu operace nebyly zaznamenány statisticky významné změny v expresi znaku **CD64**. K signifikantnímu zvýšení monocytárního (graf č. 18) i granulocytárního (graf č. 19) CD64 indexu v porovnání s předoperačními hodnotami dochází u obou skupin pacientů až v pooperačním období. Nejvyšších hodnot monocytárního CD64 indexu (11,6 u pacientů s CPB resp. 13,0 u pacientů bez CPB) bylo u obou skupin pacientů dosaženo první pooperační den. Toto zvýšení je u obou skupin pacientů statisticky významné ještě také třetí a sedmý pooperační den. Nejvyšších hodnot granulocytárního CD64 indexu (1,5 u pacientů s CPB resp. 1,1 u pacientů bez CPB) bylo u obou skupin pacientů dosaženo třetí pooperační den.

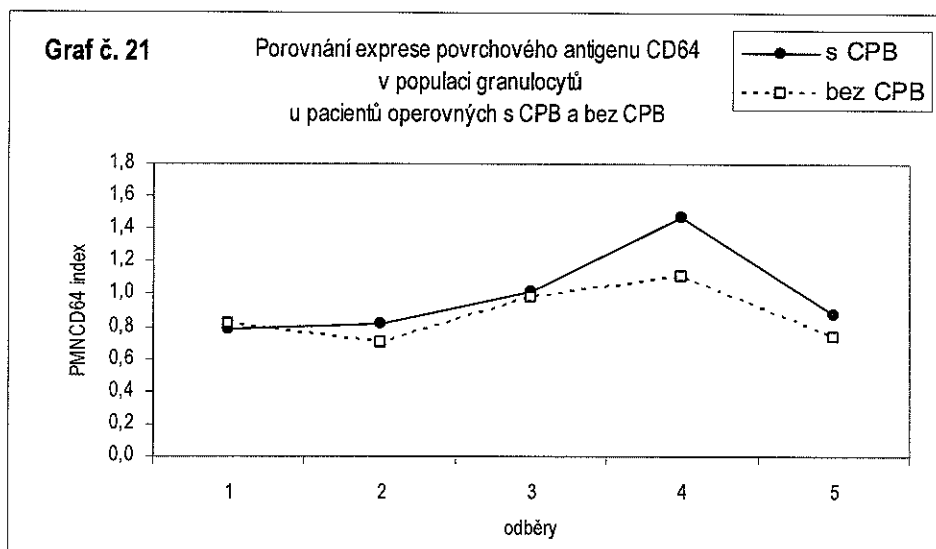
Hodnota CD64 indexu v populaci monocytů byla řádově vyšší, než hodnota tohoto indexu u granulocytů. Zároveň nárůst exprese CD64 na monocytech (1. pooperační den) časově předchází zvýšené expresi tohoto znaku na granulocytech (3. pooperační den).



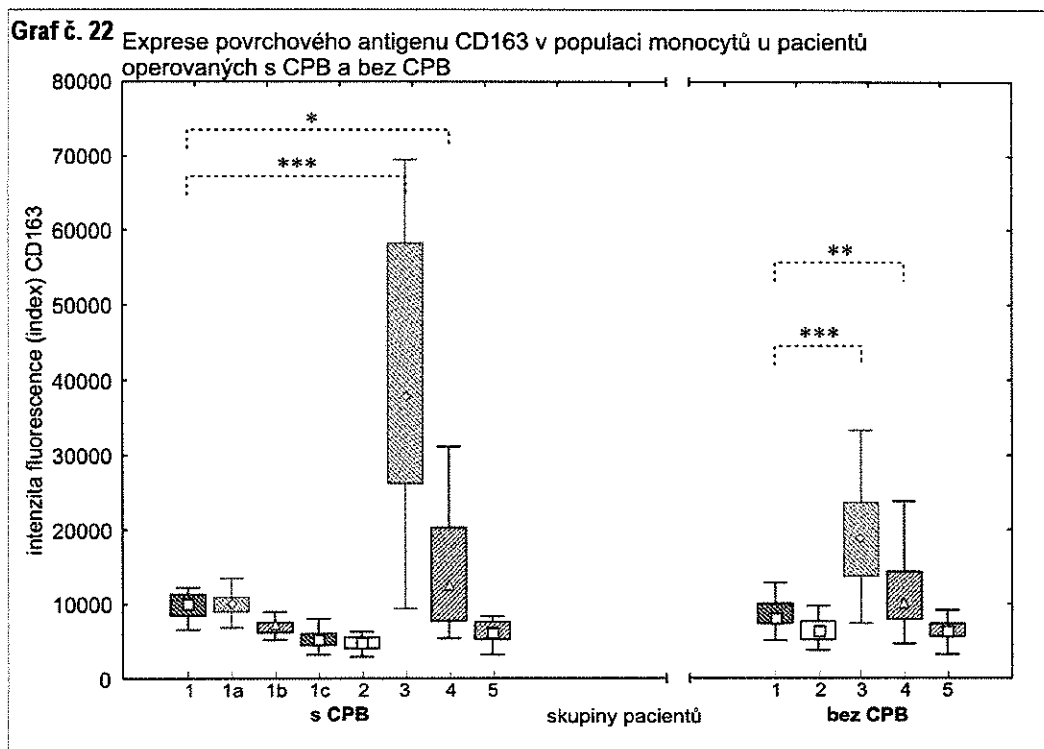


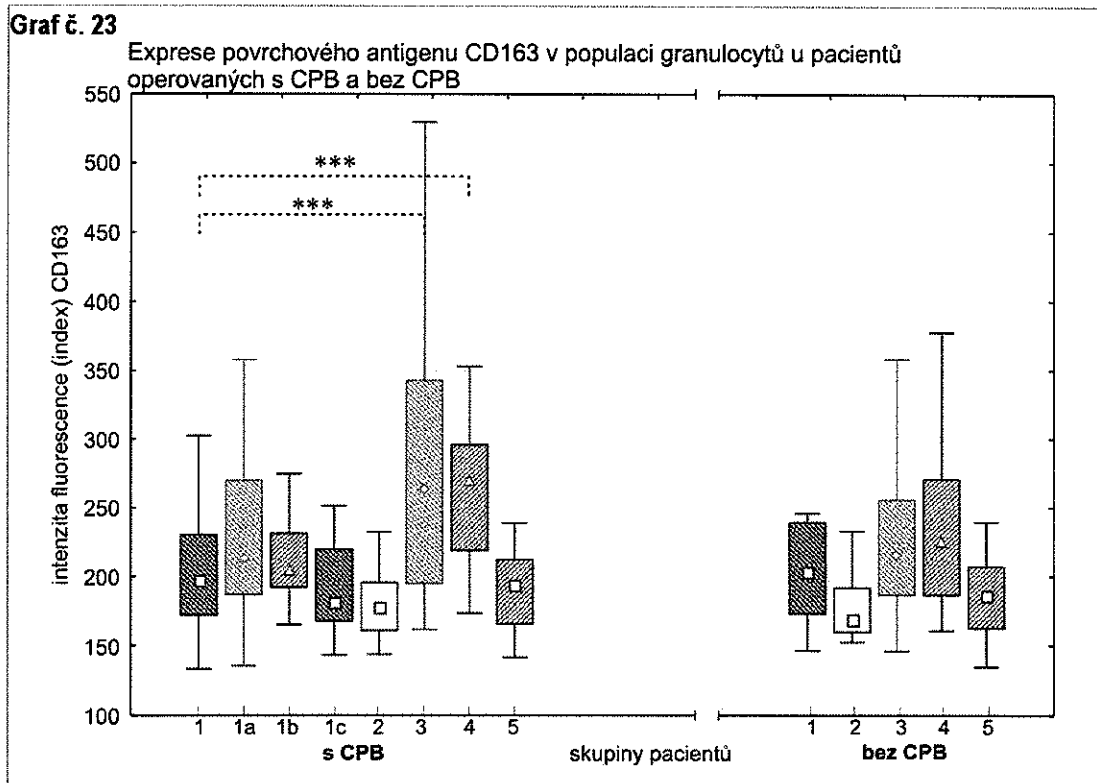
Mezi skupinou pacientů operovaných s použitím CPB a bez použití CPB nebyl v žádné z buněčných populací zjištěn signifikantní rozdíl v hodnotách CD64 indexu (graf č. 20 a 21).





Expresе znaku **CD163** na monocytech (graf. č 22) a granulocytech (graf č. 23) vykazuje obdobnou dynamiku jako expresе znaku CD64. V průběhu operace a po jejím ukončení je zaznamenáván v obou buněčných populacích statisticky nevýznamný pokles intenzity fluorescence znaku CD163. Nárůst hodnoty indexu CD163 je pozorován opět až v pooperačním období.



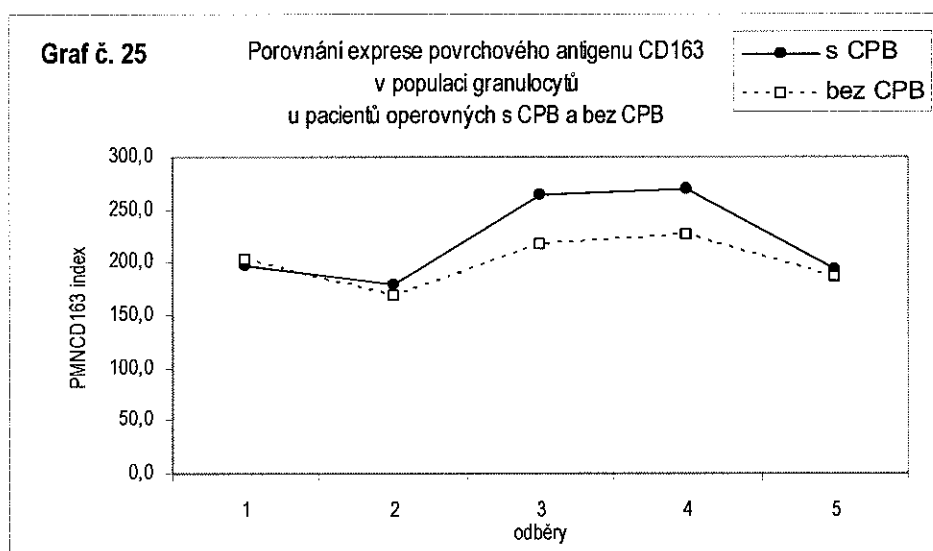
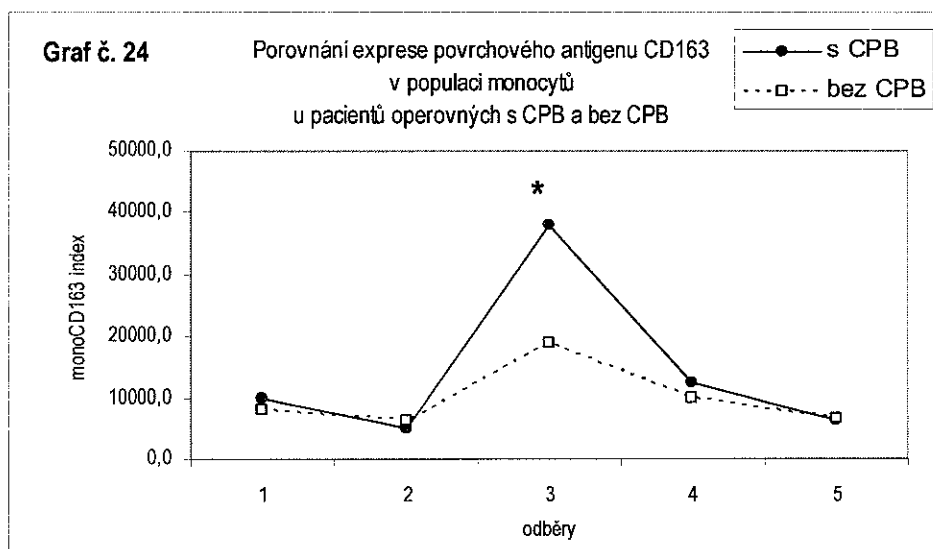


Signifikantně vyšší hodnoty monocytárního i granulocytárního CD163 indexu v porovnání s předoperačními hodnotami jsou u pacientů operovaných s použitím CPB zjištěny první a třetí pooperační den. U pacientů operovaných na bijícím srdci jsou ve stejném časovém intervalu statisticky významně vyšší hodnoty pozorovány pouze v populaci monocytů. Změny v expresi povrchového antigenu CD163 v populaci granulocytů u pacientů operovaných bez použití CPB byly v celém sledovaném období statisticky nevýznamné.

Hodnota CD163 indexu v populaci monocytů byla, stejně jako v případě indexu CD64, řádově vyšší, než hodnota tohoto indexu u granulocytů.

Signifikantní rozdíl v hodnotě CD163 indexu mezi skupinou pacientů operovaných s použitím CPB a bez použití CPB byl zjištěn první pooperační den v populaci monocytů (graf č. 24). V populaci granulocytů (graf č. 25) byl rozdíl mezi skupinami statisticky nevýznamný.





**Publikace výsledků:**

Kolářková M., Kudlová M., Kuneš P., Lonský V., Mandák J., Andrýs C., Jankovičová K., Krejsek J.: Early expression of FcγRI on monocytes of cardiac surgical patients and higher density of monocyte scavenger CD163 receptor in “on-pump” patients. *Mediators of Inflammation* (přijato do tisku). IF= 0,819

Kolářková M., Kudlová M., Kuneš P., Lonský V., Mandák J., Andrýs C., Jankovičová K., Krejsek J.: *Changes in expression of CD64 and CD163 in cardiac surgical patients* (poster a abstrakt). 2<sup>nd</sup> International Conference on Crossroads between Innate and Adaptive Immunity, Crete, Greece, 17.-22.6.2007

## 4.2. Humorální parametry

Vyšetřované humorální parametry byly zjišťovány ve vzorku srážlivé krve odebírané do heparinizovaných odběrových zkumavek firmy Saarnstedt (SRN). Koagulovaná krev byla centrifugována a sérum rozděleno do alikvotů. Sérové hladiny vybraných cytokinů byly stanoveny komerčně dostupnými ELISA kity. Výsledné hodnoty byly odečteny na spektrofotometru (Photometer Multiscan) při vlnové délce doporučené výrobcem soupravy a analyzovány softwarem Genesis. C-reaktivní protein byl hodnocen imunonefometricky na analyzátoru IMMAGE 800 (Beckman Coulter, USA).

Graficky znázorněné jsou pouze hodnoty naměřené ve venózní krvi

### 4.2.1. Dynamika sérové hladiny IL-6, IL-10 a IL-13

**Interleukin-6** (IL-6), produkovaný řadou buněk při odpovědi na prozánětlivé stimuly, je pleiotropní cytokin, jehož klíčovou rolí je indukce (za podpory IL-1 a TNF $\alpha$ ) proteinů akutní fáze v hepatocytech. Působí dále jako signál při aktivaci T-lymfocytů a neutrofilů (39). Přispívá k terminální diferenciaci a sekreci protilátek B-lymfocyty a stimuluje hematopoézu (9). Zvýšená hladina cirkulujícího IL-6 se používá jako prognostický marker u sepse a srdečního selhávání. Vysoké hladiny jsou přítomné v souvislosti s dysfunkcí jater a ledvin. Zvýšená hladina IL-6 je detekována již 60 minut po operačním výkonu, a to úměrně jejímu rozsahu (8).

**Interleukin 10** (IL-10) je multifunkční cytokin s převládajícími protizánětlivými účinky, který je zásadním způsobem zapojen do regulací lokální a systémové zánětlivé reakce. V monocytomakrofágových buňkách potlačuje produkci prozánětlivých cytokinů, tvorbu kyslíkových radikálů a oxidu dusnatého. Negativně ovlivňuje prezentaci antigenu sníženou expresí HLA molekul a kostimulačních molekul. V rámci specifické imunity tlumí aktivitu Th1 subsetu a stimuluje rozvoj protilátkové odpovědi. Nepřiměřený rozvoj protizánětlivých reakcí, včetně nadbytečné tvorby IL-10, vede k útlumu obranných reakcí. Je spojen s rizikem pooperační infekce a úmrtím v důsledku sepse.

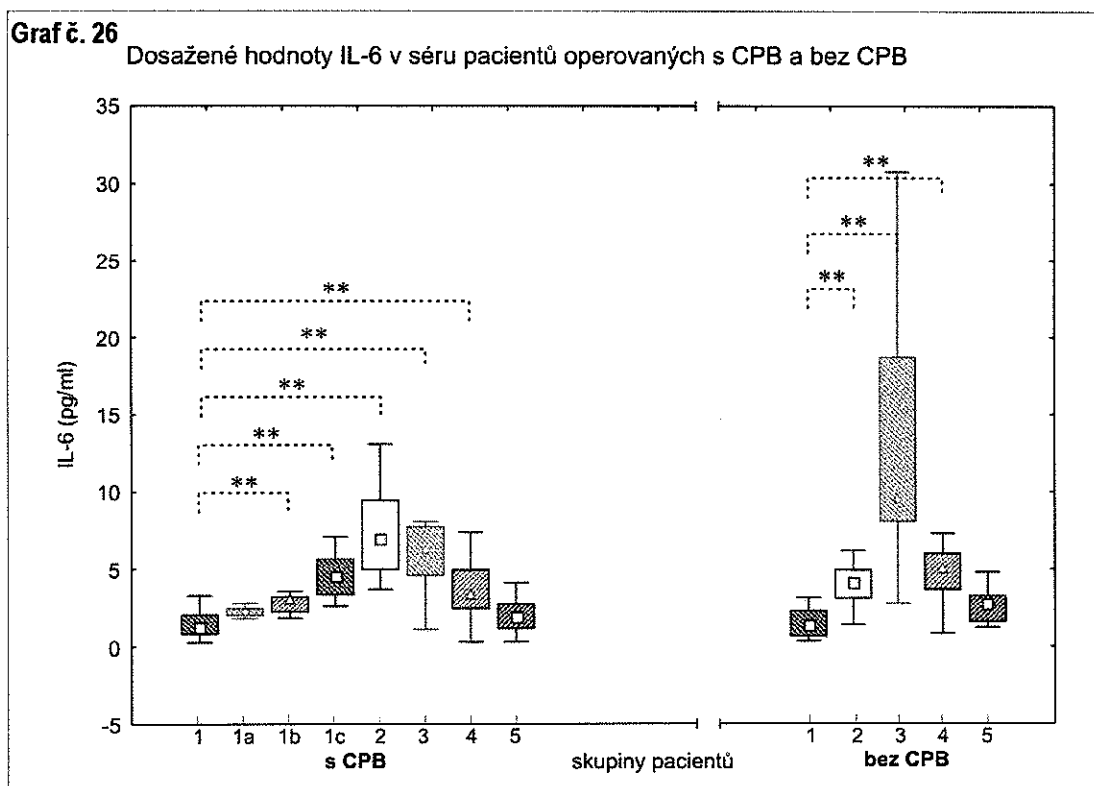
**Interleukin 13** (IL-13), produkován zejména subsetem Th2 lymfocytů, bazofily a mastocyty. Stimuluje produkci IgE, který je klíčovým mediátorem alergického zánětu. Spolu s interleukinem 4 moduluje funkce makrofágů, negativně ovlivňuje produkci NO a expresi prozánětlivých cytokinů (39).

## VÝSLEDKY

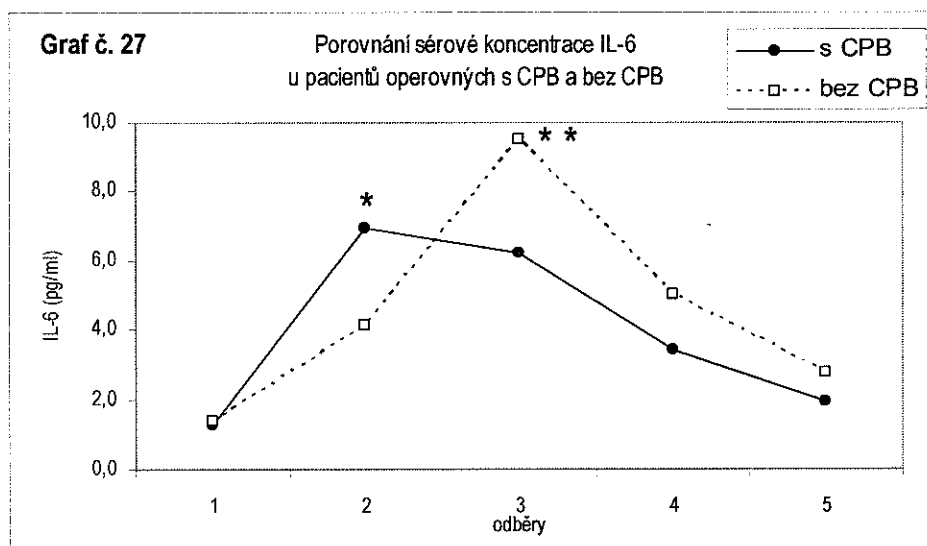
Porovnali jsme sérové hladiny cytokinů IL-6, IL-10, a IL-13 u nemocných podstupujících kardiokirurgickou operaci s použitím mimotělního oběhu (CPB, n=17 osob) nebo operovaných na bijícím srdci (n=17 osob).

### Koncentrace IL-6

Koncentrace IL-6 v séru se pohybovala v celém sledovaném období mezi 0,3 - 30,8 pg/ml (graf č. 26). Statisticky významné zvýšení ( $p < 0,01$ ) bylo prokázáno u pacientů operovaných s CPB již po odstranění aortální svorky (odběr 1b), u pacientů operovaných bez CPB po ukončení operace. Nejvyšší koncentrace sérového IL-6 byly naměřeny u pacientů operovaných s CPB bezprostředně po ukončení operace (6,9 pg/ml), v případě pacientů operovaných na bijícím srdci první pooperační den (9,5 pg/ml). Statisticky významné ( $p < 0,01$ ) zvýšení hladiny IL-6 v porovnání s předoperační hladinou přetrvává u obou skupin pacientů ještě první a třetí pooperační den. Sedmý pooperační den je toto zvýšení již statisticky nevýznamné.

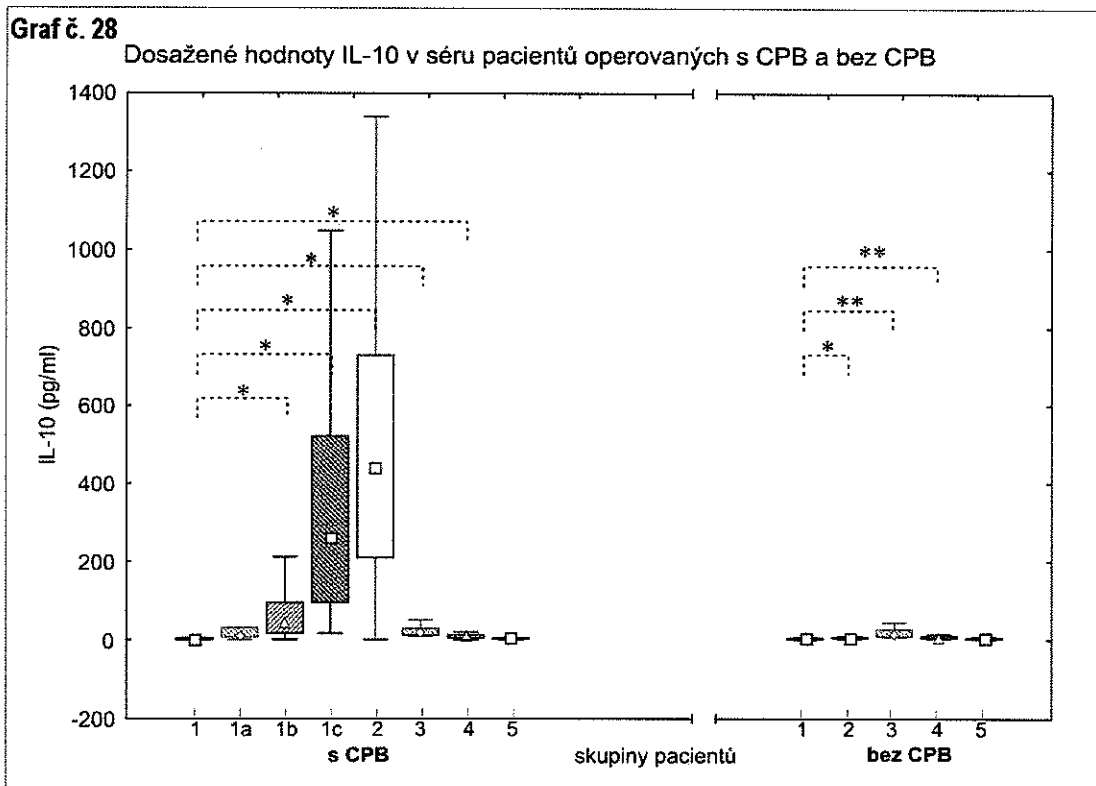


U nemocných s CPB je v porovnání s nemocnými bez CPB hladina IL-6 významně ( $p < 0,05$ ) vyšší bezprostředně po operaci. V první pooperační den je hladina IL-6 naopak významně ( $p < 0,01$ ) zvýšena u nemocných bez CPB. V ostatních sledovaných odběrových intervalech nejsou statisticky významné rozdíly v sérové hladině IL-6 mezi pacienty operovanými s použitím CPB a bez použití CPB (graf č. 27).

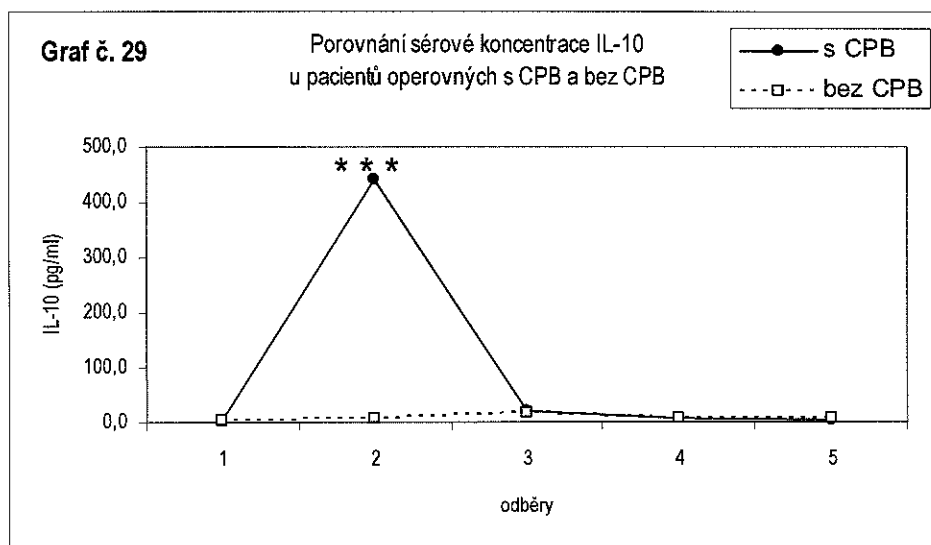


### Koncentrace IL-10

Koncentrace IL-10 v séru se pohybovala v celém sledovaném období mezi 0,3 – 1570,6 pg/ml (graf č. 28). U pacientů operovaných s použitím CPB jsme pozorovali postupný nárůst sérové hladiny IL-10 v průběhu celé operace. Statisticky významné ( $p < 0,05$ ) zvýšení hladiny IL-10 v porovnání s předoperační hodnotou bylo zjištěno již po sejmutí aortální svorky, maximálních hodnot (441,0 pg/ml) v produkci IL-10 bylo dosaženo po ukončení operace. Signifikantní zvýšení ( $p < 0,05$ ) v porovnání s předoperační hladinou přetrvává ještě první a třetí pooperační den. U pacientů operovaných na bijícím srdci bylo prokázáno statisticky významné zvýšení hladiny IL-10 v porovnání s předoperační hladinou již po ukončení operace. Vrcholu hladiny (15,8 pg/ml) u těchto nemocných bylo dosaženo první pooperační den. Statisticky významně zvýšená hladina IL-10 přetrvává ještě třetí pooperační den. Sedmý pooperační den již nebyly v žádné skupině pacientů zjištěny statisticky významné rozdíly v hladině IL-10 v porovnání s předoperační koncentrací.

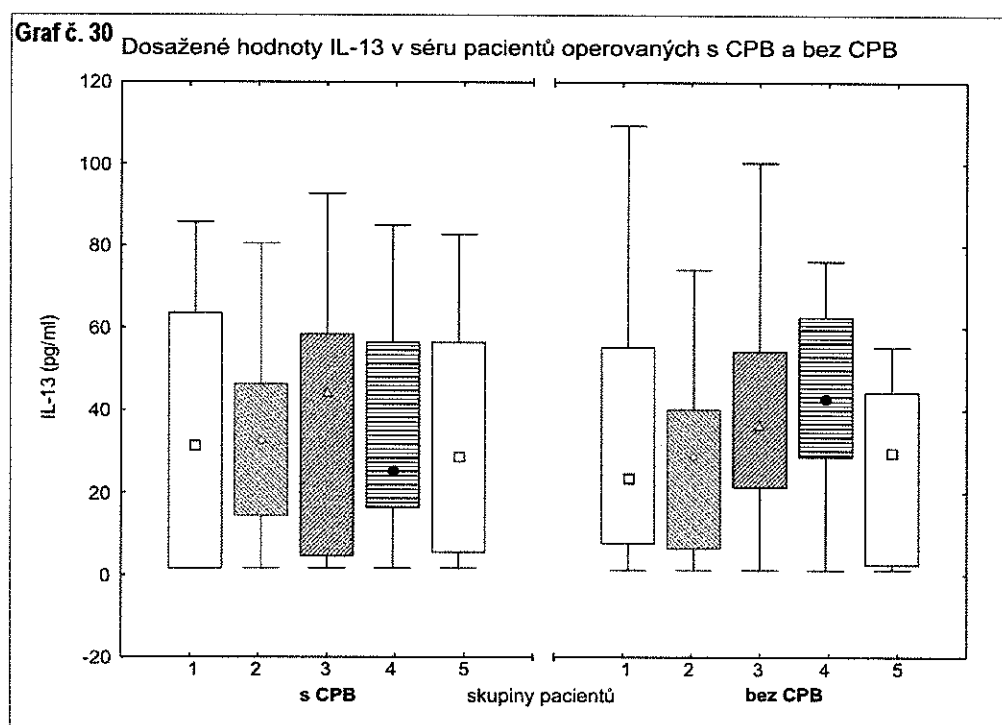


U nemocných s CPB je v porovnání s nemocnými bez CPB hladina IL-10 významně ( $p < 0,001$ ) vyšší bezprostředně po operaci. V ostatních sledovaných odběrových intervalech nejsou statisticky významné rozdíly v sérové hladině IL-10 mezi pacienty operovanými s použitím CPB a bez použití CPB (graf č. 29).

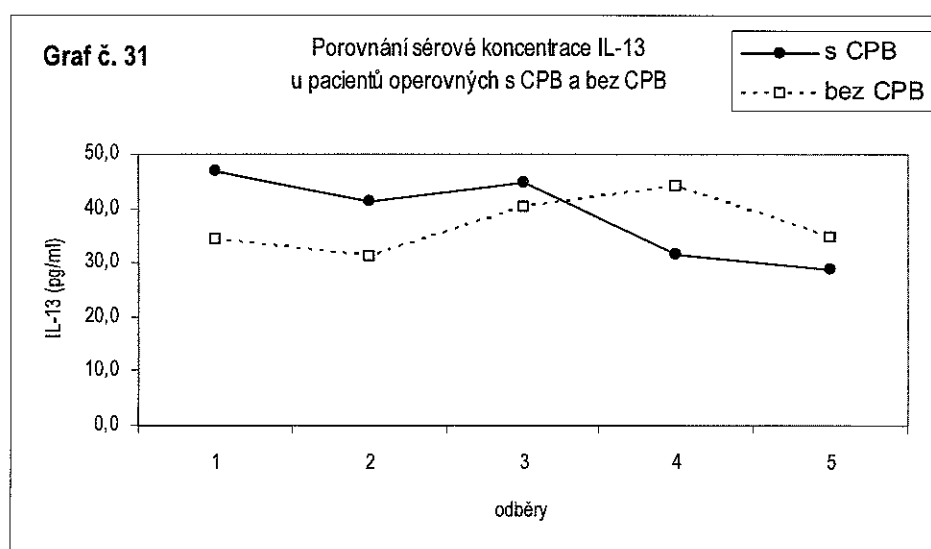


## Koncentrace IL-13

Koncentrace cytokinu IL-13 v séru se pohybovala mezi 1,2 – 157,4 pg/ml. Sérové hladiny cytokinu IL-13 byly u obou skupin pacientů na hranici detekovatelnosti a vykazují pouze minimální změny v celém sledovaném období (graf č. 30).



V žádném z odběrů nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi pacienty operovanými s použitím CPB a bez použití CPB (graf č. 31).



## Publikace výsledků:

**Kudlová M.**, Koláčková M., Kuneš P., Mandák J., Krejsek J.: The influence of cardiac surgery on the serum level of anti-inflammatory cytokin IL-10 (přednáška). Fakultní konference studentů doktorského studia, LF HK, 24.10.2006.

Koláčková M., **Kudlová M.**, Andrýs C., Kuneš P., Krejsek J.: Vliv kardiochirurgického zákroku na zvýšení hladin cytokinů v séru (poster a abstrakt). XXIII. Sjezd České a Slovenské společnosti alergologie a klinické imunologie a XI. Kongres českých a slovenských imunologů, Hradec Králové, 26.-28.10.2006

**Kudlová M.**, Koláčková M., Kuneš P., Andrýs C., Jankovičová K., Mandák J., Lonský V., Krejsek J. Kardiochirurgická operace a její vliv na sérovou hladinu protizánětlivého cytokinu IL-10. Čas. Lék. Čes. 2007, 146: 48-55.

**Kudlová M.**, Koláčková M., Kuneš P., Andrýs C., Krejsek J.: Kardiochirurgická operace – dynamika produkce cytokinů (přednáška). Seminář Cytokiny a jiné signální molekuly 2007 - Biotechnika 2007, IKEM, 10.5.2007.

### 4.2.2. Dynamika sérové hladiny PTX3 a CRP

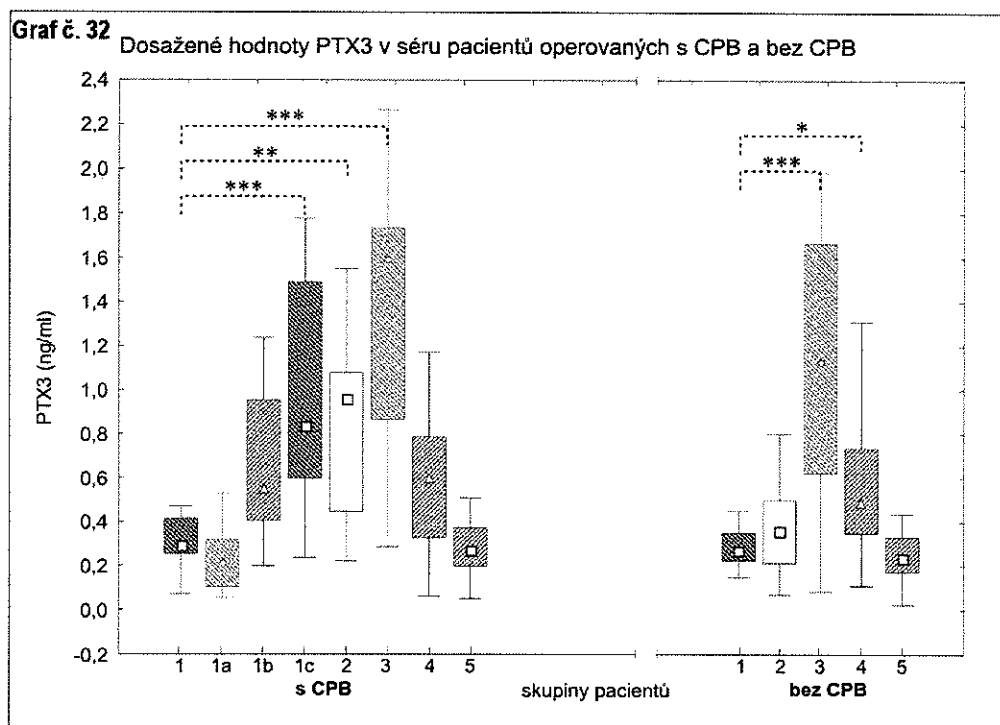
Pentraxin 3 (PTX3) je nově objeveným proteinem akutní fáze, který sdílí částečnou homologii s dlouho známým pentraxinem C-reaktivním proteinem (CRP). Zatímco v průběhu reakce akutní fáze je CRP vytvářen v játrech a působí na úrovni celého organismu, PTX3 vzniká přímo v zánětlivém ložisku a jeho působení je lokalizované do postižené tkáně. Společnou vlastností obou pentraxinů je aktivace komplementu klasickou cestou. Oba pentraxiny se podílejí na patogenezi některých zánětlivých onemocnění s autoimunitní složkou. Z tohoto pohledu se největší zájem soustředí na aterosklerózu a její komplikace. Jsou popsány účinky PTX3 v patogenezi revmatoidní artritidy, IgA nefropatie a aterosklerózy. Dokumentována je také prognostická výpovědní hodnota PTX3 u nemocných s akutním infarktem myokardu, nemocných v septickém šoku a nemocných s plicní tuberkulózou (40).

## VÝSLEDKY

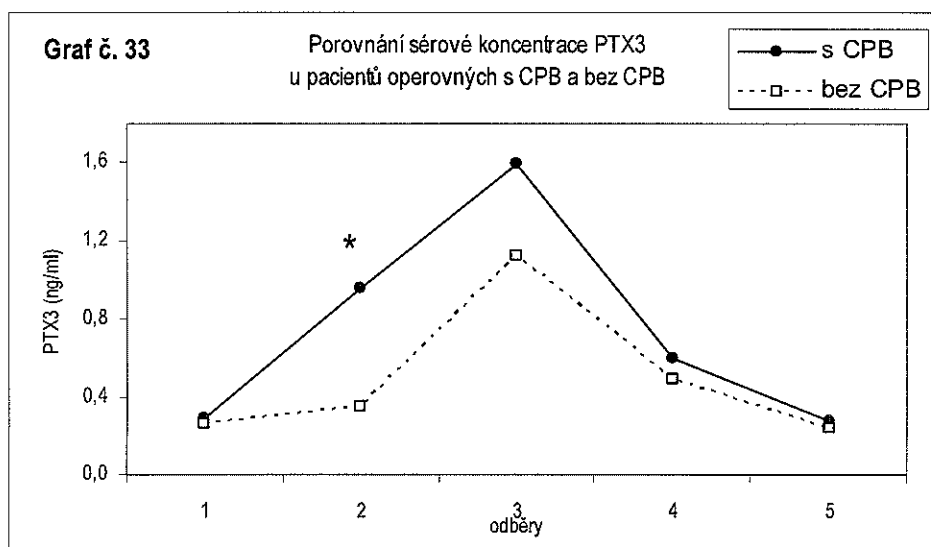
Porovnali jsme sérové koncentrace proteinů akutní fáze - pentraxinu 3 (PTX3) a CRP u nemocných podstupujících kardiochirurgickou operaci s použitím mimotělního oběhu (CPB, n=17 osob) nebo operovaných na bijícím srdci (n=17 osob).

Koncentrace PTX3 v séru se pohybovala mezi 0,04 - 2,55 pg/ml. Ve skupině pacientů operovaných s CPB i ve skupině pacientů operovaných na bijícím srdci byl zaznamenán signifikantní nárůst sérové hladiny PTX 3 (graf č. 32). U pacientů operovaných s použitím CPB byl zaznamenán signifikantní nárůst koncentrace PTX3 již po ukončení mimotělního oběhu (odběr 1c), maximálních hodnot (1,6 pg/ml) bylo dosaženo první pooperační den. U pacientů operovaných na bijícím srdci bylo

signifikantní zvýšení ( $p < 0,001$ ) a zároveň nejvyšší koncentrace (1,1 pg/ml) dosaženo až první pooperační den. Statisticky významně vyšší hladina PTX3 v porovnání s předoperační úrovní je u pacientů operovaných bez použití CPB zaznamenána ještě třetí pooperační den. Sedmý pooperační den dochází u obou skupin k poklesu sérové koncentrace PTX3 na předoperační úroveň.

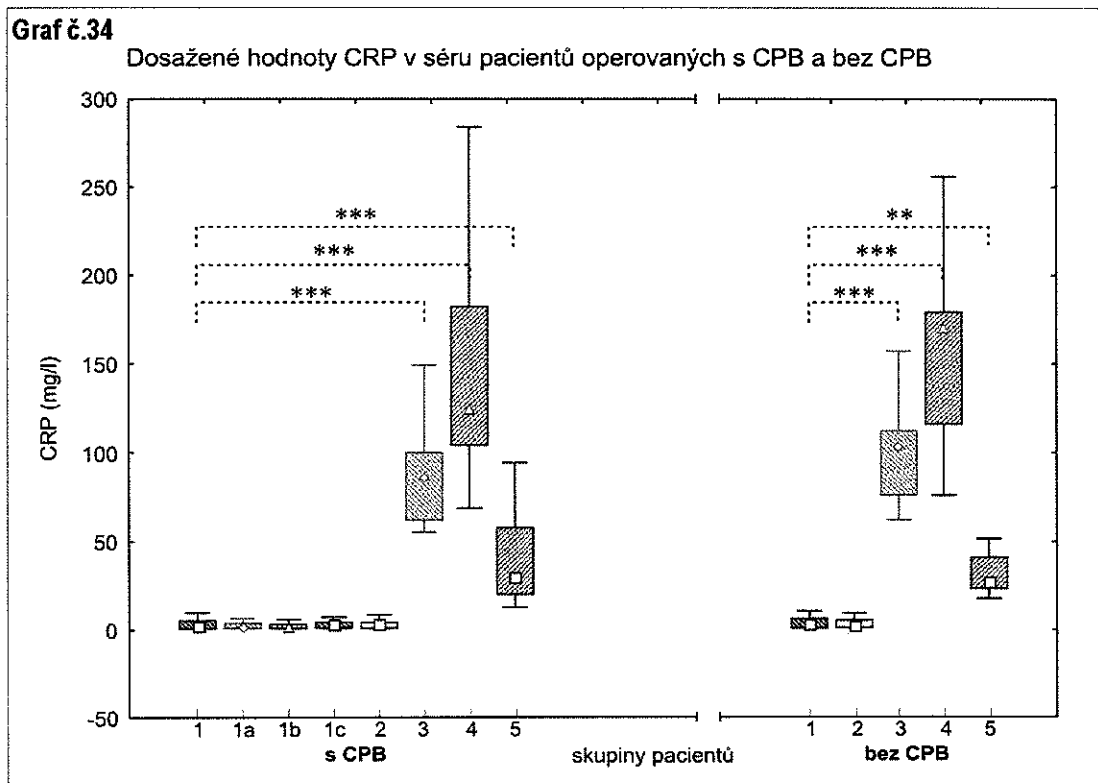


V naměřených hodnotách PTX3 byl mezi pacienty operovanými s použitím CPB a bez použití CPB zjištěn statisticky významný rozdíl po ukončení operace (graf č. 33).

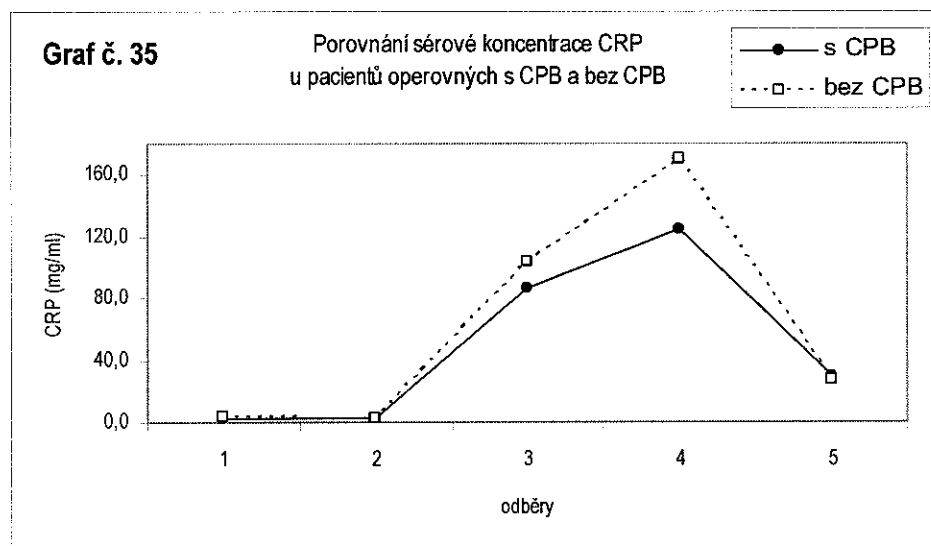




Koncentrace CRP v séru se pohybovala mezi 1,0 – 284,0 mg/l. Produkce CRP vykazovala obdobnou dynamiku u obou skupin pacientů (graf č. 34). V průběhu operačního výkonu nebyla zaznamenána zvýšená hladina CRP. K signifikantně významnému zvýšení ( $p < 0,001$ ) koncentrace CRP v séru dochází až první pooperační den. Maximálních hodnot (124,0 mg/l u pacientů s CPB resp. 170,0 mg/l u pacientů bez CPB) bylo u obou skupin pacientů dosaženo třetí pooperační den. Sedmý pooperační den je pozorován pokles sérové hladiny CRP, u obou skupin pacientů však v porovnání s předoperační hodnotou zůstává i nadále koncentrace CRP statisticky významně zvýšená.



V žádném ze sledovaných intervalů nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v koncentraci CRP mezi skupinou pacientů operovaných s použitím CPB nebo bez použití CPB (graf č.35). Je zajímavé, že trend v tvorbě CRP byl vyšší u nemocných operovaných bez použití CPB, u kterých se obecně předpokládá menší zátěž.



#### Publikace výsledků:

Kuneš P., Lonský V., Mandák J., Brtko M., Koláčková M., Andrýs C., **Kudlová M.**, Krejsek J.: The long pentraxin PTX3 in cardiac surgery: distinct responses in „on-pump“ and „off-pump“ patients. *Essential PTX3 biology (not only) for cardiac surgeons*. *Scand Cardiovasc J.* 2007, 41(3), 171-179. IF=1,037

Kuneš P., Lonský V., Mandák J., Brtko M., Koláčková M., Andrýs C., **Kudlová M.**, Krejsek J.: *Essential PTX3 biology (not only) for cardiologist and cardiac surgeons*. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2007, 50(1): 29-33.

**Kudlová M.**, Koláčková M., Kuneš P., Lonský V., Mandák J., Andrýs C., Jankovičová K., Krejsek J.: The long pentraxin PTX in cardiac surgery: distinct response in „on-pump“ and „off-pump“ patients (poster a abstrakt). *2<sup>nd</sup> International Conference on Crossroads between Innate and Adaptive Immunity, Crete, Greece, 17.-22.6.2007*

#### 4.2.3. Dynamika sérové hladiny Hsp60 a Hsp70

Proteiny teplotního šoku (*heat shock proteins*, Hsp) patří k evolučně starým proteinům, které jsou strukturně velmi konzervované napříč různými druhy prokaryotických i eukaryotických organismů. Jejich konstitutivní exprese je důležitým homeostatickým mechanismem, který napomáhá udržet stabilitu vnitřního prostředí organismu.

Zvýšená produkce Hsp je součástí komplexní stresové odpovědi vyvolané v důsledku působení řady faktorů zevního i vnitřního prostředí. Hsp jsou indukovány nejen zvýšenou teplotou, jak bylo zjištěno při prvotních experimentech, ale také řadou dalších stimulů, jako je působení virů, různých chemikálií, dále mechanickým stresem, anoxií a vystavením volným radikálům a prozáněťovým cytokinům (41, 42).

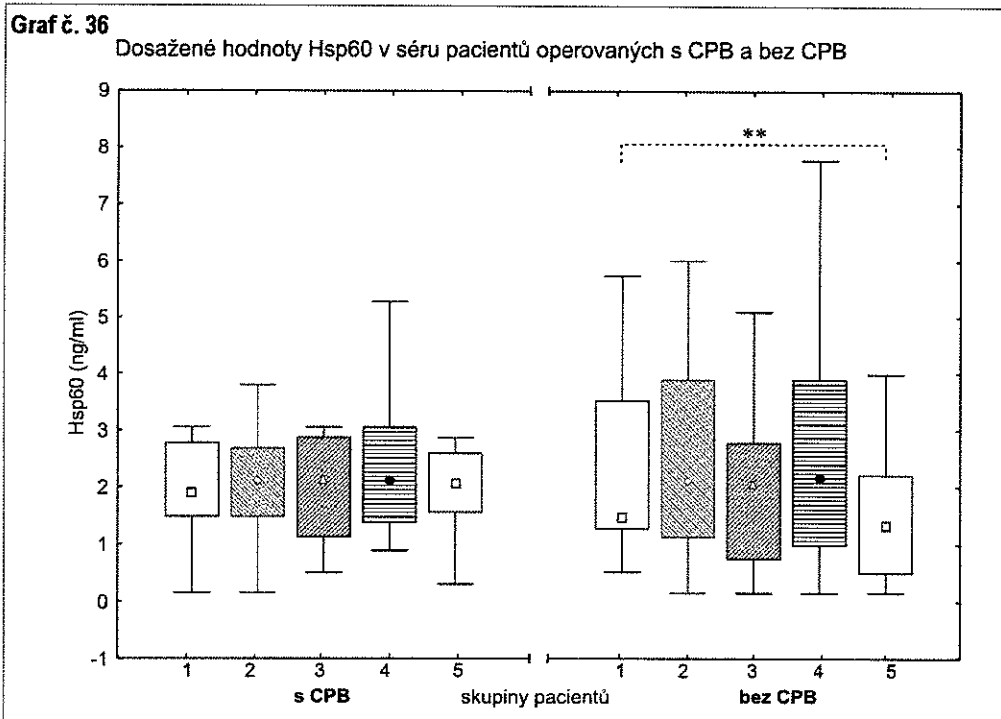
Funkce Hsp proteinů jsou velmi rozmanité. Podařilo se prokázat ochranné působení proti oxidačnímu poškození lipidů, bílkovin, složek cytoskeletu i nukleových kyselin. Podařilo se rovněž ozřejmit i ochranné působení u chorobných procesů s významnou účastí oxidačního poškození, např. při poškozujícím zánětu, kancerogenezi, ischemických poruchách a předčasném stárnutí (43).

Zvýšená exprese a reaktivita Hsp je dávana také do souvislosti s iniciací, či následným rozvojem aterosklerotického procesu. V řadě studií jsou prokazovány zvýšené hladiny protilátek proti Hsp v souvislosti s vaskulárním poškozením a přítomností časných aterosklerotických lézí (41).

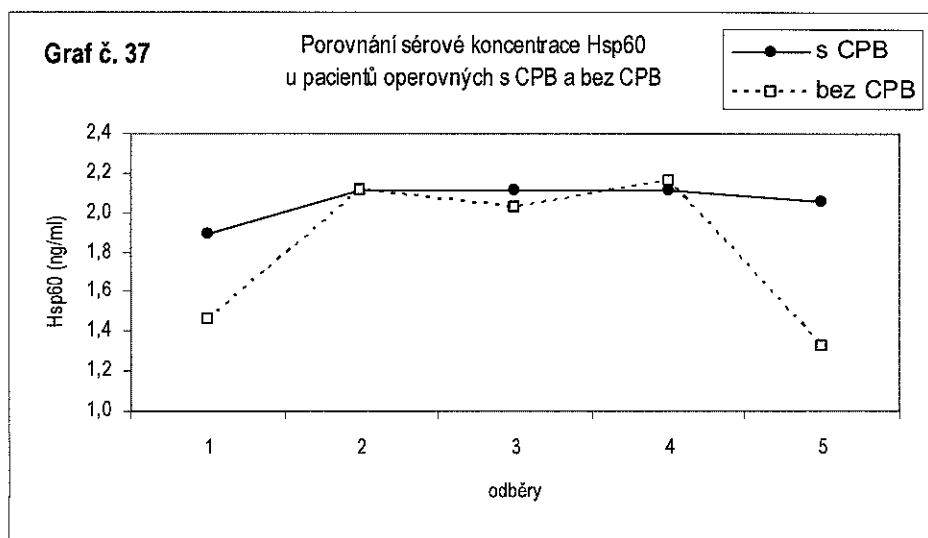
#### VÝSLEDKY

Porovnali jsme sérové koncentrace Hsp60 a Hsp70 u nemocných podstupujících kardiokirurgickou operaci s použitím mimotělního oběhu (CPB, n=17 osob) nebo operovaných na bijícím srdci (n=17 osob).

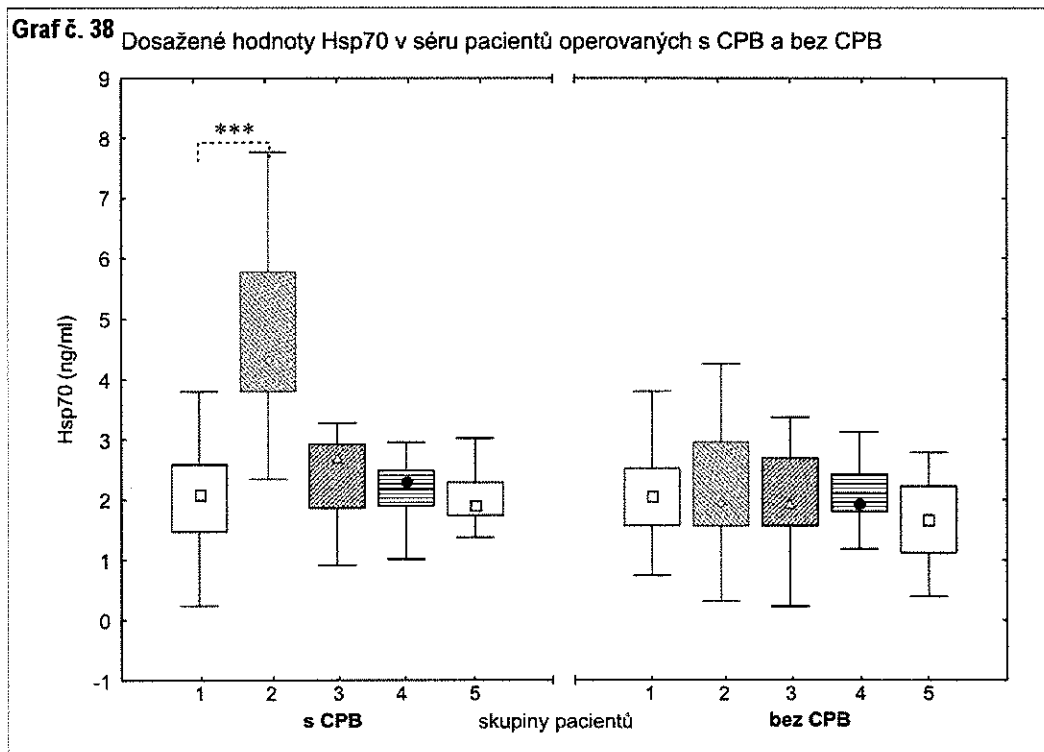
Koncentrace Hsp60 se pohybovaly v rozmezí 0,15 – 23,3 ng/ml. Byla pozorována obdobná dynamika v tvorbě Hsp60 u obou skupina pacientů (graf č. 36). V průběhu operačního výkonu a bezprostředním pooperačním období nebyla zaznamenána signifikantní změna koncentrace Hsp60. K statisticky významnému snížení ( $p < 0,01$ ) koncentrace Hsp60 dochází až sedmý pooperační den, a to pouze ve skupině pacientů operovaných bez použití CPB.



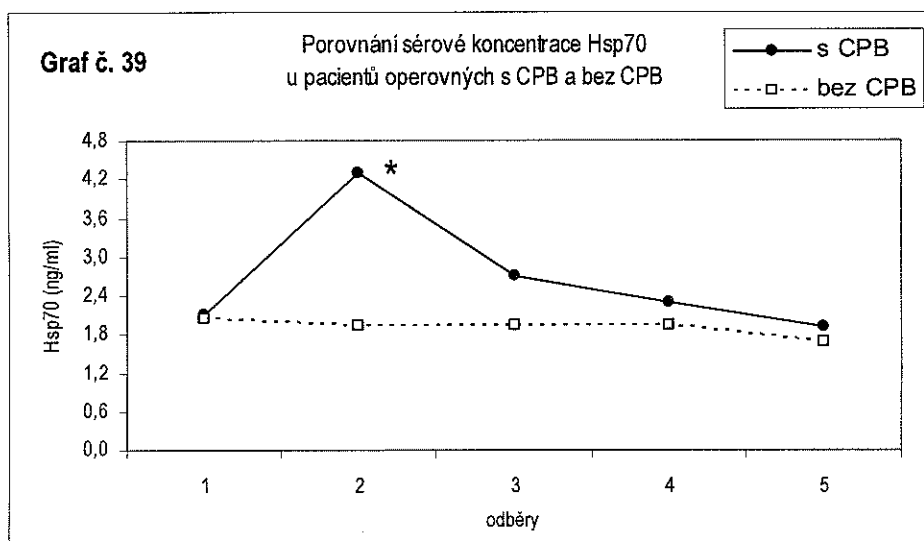
V žádném ze sledovaných intervalů nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v koncentraci Hsp60 mezi skupinou pacientů operovaných s použitím CPB nebo bez použití CPB (graf č. 37).



Koncentrace Hsp70 se pohybovaly v rozmezí 0,2 – 10,64 ng/ml. V celém sledovaném období byly v porovnání s předoperačními hodnotami pozorovány pouze minimální změny (graf č. 38). Statisticky významný ( $p < 0,001$ ) nárůst byl prokázán pouze u pacientů operovaných s použitím CPB, a to bezprostředně po ukončení operace.



Koncentrace Hsp70 se u pacientů operovaných s CPB a bez CPB významně ( $p < 0,05$ ) lišila bezprostředně po ukončení operačního zákroku, kdy u pacientů operovaných s CPB docházelo k výraznému nárůstu sérového Hsp70 v porovnání s pacienty operovanými na bijícím srdci.



Publikace výsledků:

Koláčková M., **Kudlová M.**, Kuneš P., Mandák J., Krejsek J.: Changes in serum concentrations of Hsp60 and Hsp70 in on- and off- pump patients (přednáška). Fakulní konference studentů doktorského studia, LF HK, 24.10.2006.

Jankovičová K., **Kudlová M.**, Koláčková M., Kuneš P., Andrýs C., Mandák J., Lonský V., Krejsek J.: Stresové proteiny Hsp60 a Hsp70 u kardiologických pacientů. *Core et Vasa* 2007, 49(10): 356-361.

#### 4.2.4. Dynamika sérové hladiny LBP a sCD14

Identifikace bakteriálních lipopolysacharidů (LPS) je komplikovaná a vyžaduje vazbu plazmatické bílkoviny LBP (*lipopolysaccharide binding protein*). Komplexy LPS a LBP se váží na molekulu CD14, která prostřednictvím extracelulární molekuly MD2 reaguje s TLR-4. TLR-4 je klíčovou molekulou v aktivaci buňky po působení LPS.

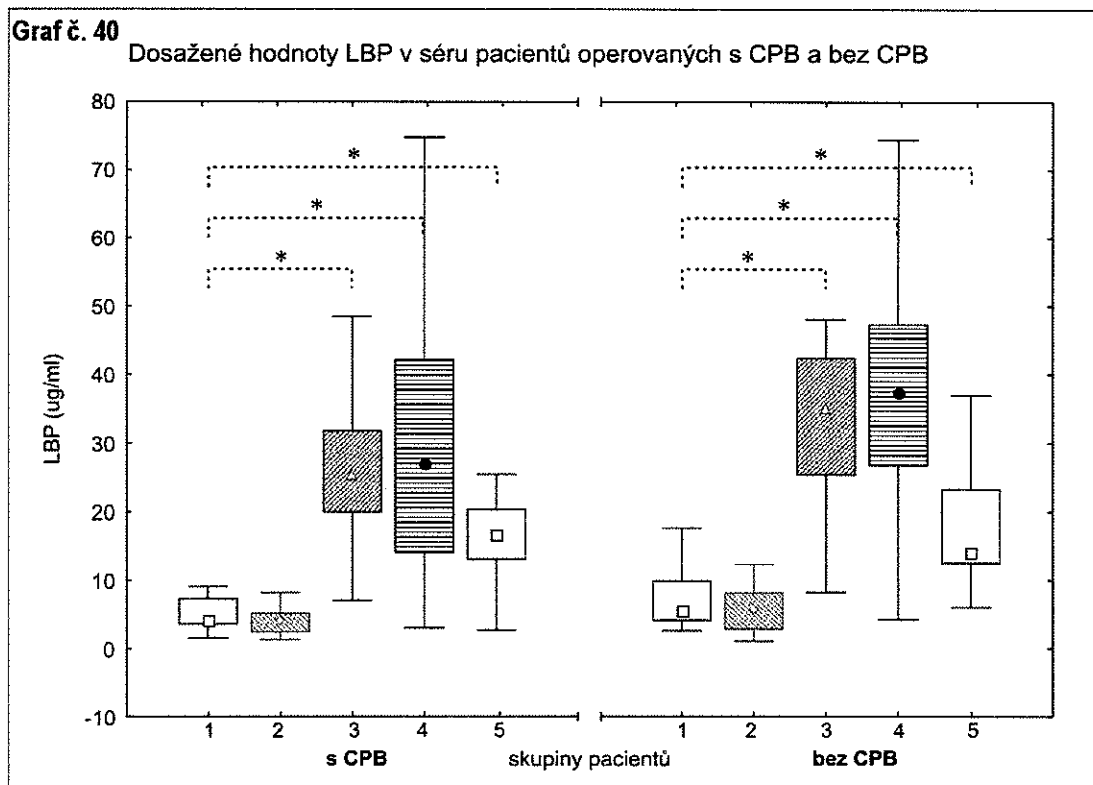
LBP, plazmatický protein syntetizovaný převážně v hepatocytech a plicích, váže s vysokou afinitou lipid A bakteriálních lipopolysacharidů a katalyzuje vazbu LPS na CD14 receptor. Plazmatická hladina LBP rychle vzrůstá v průběhu zánětové odpovědi (1).

Molekula CD14 je membránový protein, vázaný fosfatidylinositolovou (GPI) kotvou, který slouží jako vysokoafinní receptor pro vazbu komplexů LPS-LBP. Je exprimován na řadě buněk, zejména na povrchu monocytů/makrofágů a neutrofilních granulocytů. V tělních tekutinách se vyskytují také solubilní formy sCD14, které vznikají proteolytickým odštěpováním z povrchu buněk. Solubilní molekula sCD14 kompetitivně inhibuje vazbu LBP-LPS komplexu na membránově vázanou formou CD14. Takto negativně regulačně zasahuje do prozánětových procesů. Zároveň se v komplexu s LBP váže na povrch buněk, které neexprimují molekulu CD14, např. na povrchu endotelových buněk a buněk hladké svaloviny. Po vazbě komplexu dochází k aktivaci těchto buněk s následným uvolněním prozánětových působků (1). Z uvedeného je zřejmé, že sCD14 vykazuje z funkčního hlediska pozoruhodně protichůdné regulační úlohy.

#### VÝSLEDKY

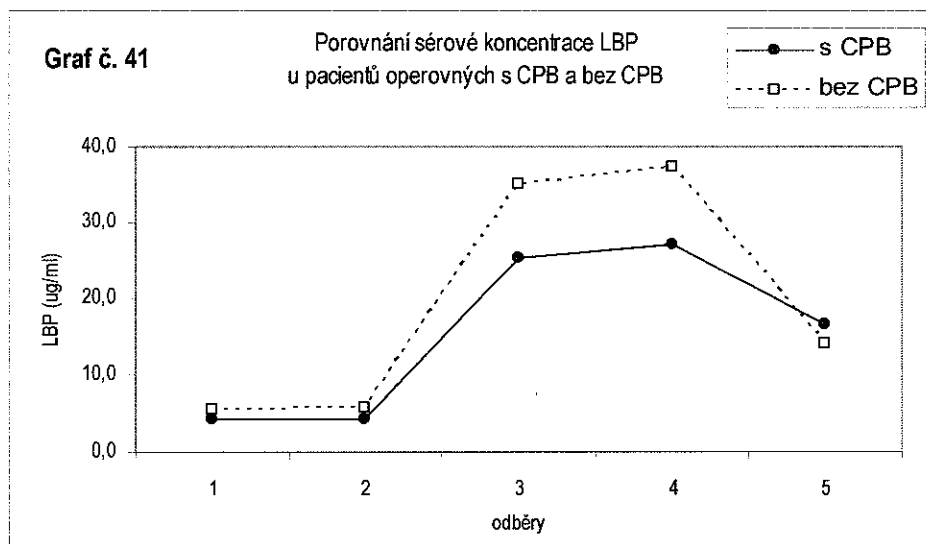
Porovnali jsme sérové koncentrace LBP a sCD14 u nemocných podstupujících kardiologickou operaci s použitím mimotělního oběhu (CPB, n=20 osob) nebo operovaných na bijícím srdci (n=20 osob).

Sérové koncentrace **LBP** se pohybovaly v rozmezí 1,4 – 74,8 µg/ml. Jak u pacientů operovaných s CPB, tak u pacientů operovaných na bijícím srdci byly pozorovány pooperačně zvýšené sérové hladiny LBP (graf č. 40).



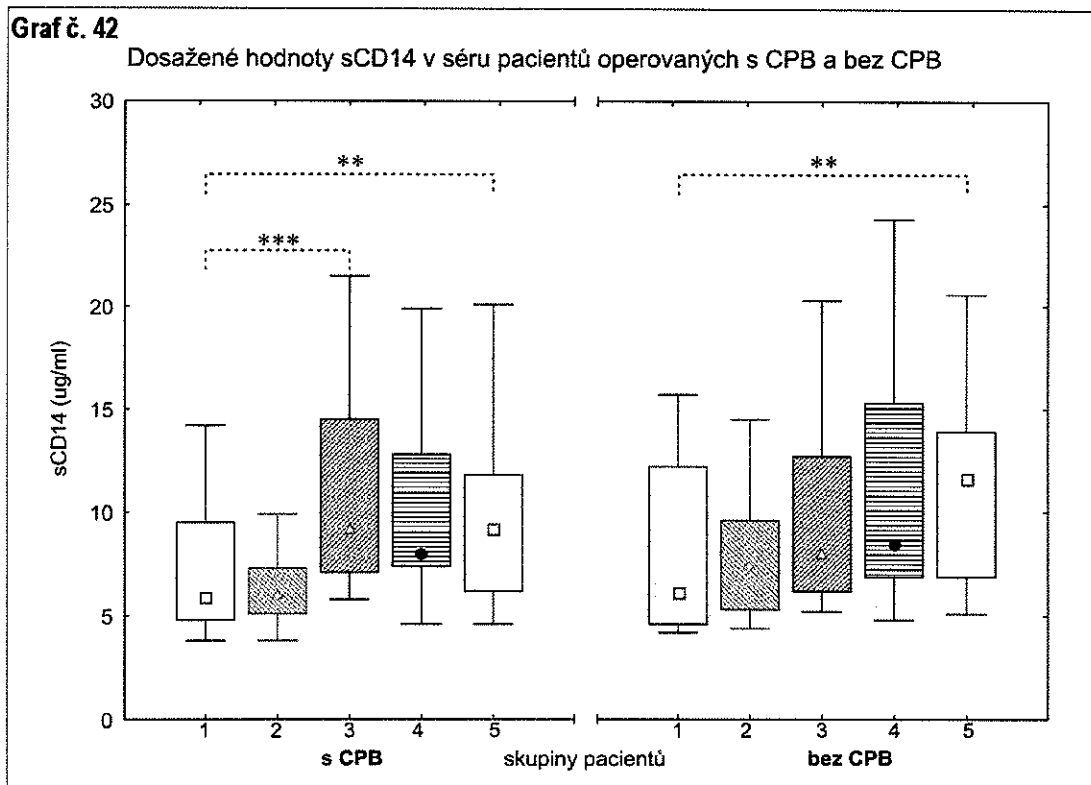
V porovnání s předoperační úrovní (4,2 µg/ml u pacientů s CPB resp. 5,6 µg/ml u pacientů bez CPB) bylo u obou skupin pacientů pozorováno statisticky významné ( $p < 0,05$ ) zvýšení první pooperační den. Maximálních koncentrací (27,1 µg/ml u pacientů s CPB resp. 37,3 µg/ml u pacientů bez CPB) bylo dosaženo třetí pooperační den a signifikantně vyšší hladiny byly naměřeny i sedmý den po operaci.

V žádném ze sledovaných intervalů nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v koncentraci LBP mezi skupinou pacientů operovaných s použitím CPB nebo bez použití CPB (graf č. 41).

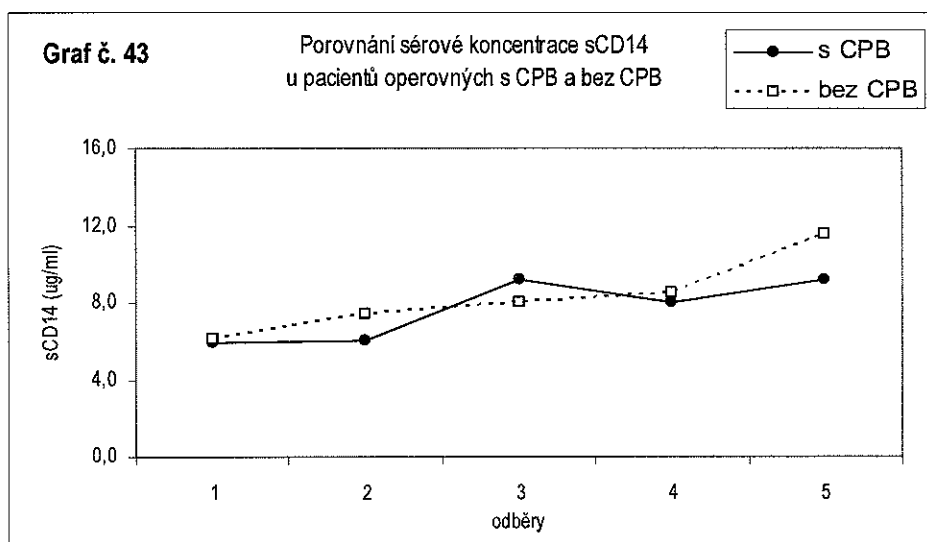


Sérové koncentrace **sCD14** se pohybovaly v rozmezí 3,8 -24,3  $\mu\text{g/ml}$ . Sérové koncentrace sCD14 vykazovaly odlišnou dynamiku mezi porovnávanými skupinami pacientů (graf č. 42). U pacientů operovaných s použitím CPB bylo dosaženo maximálních koncentrací (9,2  $\mu\text{g/ml}$ ) již první pooperační den. U pacientů operovaných na bijícím srdci byl zaznamenán postupný nárůst sérové hladiny sCD14 s maximem (11,6  $\mu\text{g/ml}$ ) dosaženým až sedmý pooperační den. Sedmý pooperační den přetrvávala statisticky významně ( $p < 0,01$ ) vyšší hladina sCD14 v porovnání s předoperační koncentrací i u pacientů operovaných s použitím CPB.





V žádném ze sledovaných intervalů nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v sérových koncentracích sCD14 mezi pacienty operovanými s CPB a pacienty operovanými na bijícím srdci (graf č. 43).



Publikace výsledků:

**Kudlová M., Kuneš P., Koláčková M. Lonský V., Mandák J., Andrys C., Jankovičová K., Krejsek J.:** Lipopolysaccharide binding protein and sCD14 are not produced as acute phase proteins in cardiac surgery. Mediator of Inflammation (přijato do tisku). IF= 0,819

## 5. SHRUTÍ

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

K analýze vybraných buněčných a humorálních parametrů byly odebírány vzorky arteriální a žilní krve. Odběr vzorků byl prováděn jak v průběhu operace, tak v následném sedmidenním pooperačním období.

Hodnocení parametrů buněčné imunity bylo provedeno dvoubarevnou imunofluorescenční analýzou na průtokovém cytometru FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, USA). K detekci CD64 a CD163 pozitivních myeloidních buněk byl použit komerčně dostupný kit Leuko64 (Trillium Diagnostics, IQ Products, Nizozemí) vybavený vlastním analyzačním softwarem pro kvantifikaci dat.

Sérové hladiny vybraných cytokinů byly stanoveny komerčně dostupnými ELISA kity. Výsledné hodnoty byly odečteny na spektrofotometru (Photometer Multiscan) při vlnové délce doporučené výrobcem soupravy a analyzovány softwarem Genesis. C-reaktivní protein byl hodnocen imunonefelometricky na analyzátoru IMAGE 800 (Beckman Coulter, USA). Hladiny PTX3 byly stanoveny za pomoci detekčního setu (Alexis, Switzerland).

U jednotlivých skupin pacientů byla sledována změna vybraných parametrů vzhledem k předoperačním hodnotám. Rovněž bylo provedeno vzájemné porovnání obou skupin pacientů. Změny jak buněčných, tak sérových parametrů a rozdíly mezi oběma skupinami pacientů byly statisticky vyhodnoceny analýzou variance a následným mnohonásobným porovnáním. Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí statistického softwaru Statistica 5.5 (StatSoft, USA).

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

Již v průběhu operace a zejména v pooperačním období byla pozorována významná leukopenie, a to zejména v subsetu **CD3+CD4+**. Statisticky významně vyšší pokles jak celkového

počtu lymfocytů, tak v subsetu CD3+CD4+ byl zaznamenán ve skupině pacientů operovaných s použitím CPB.

Populace **CD19+** lymfocytů byla naopak pooperačně signifikantně zvýšená. Relativní počet CD19+ lymfocytů byl v celém pooperačním období statisticky významně vyšší ve skupině pacientů operovaných s CPB. U žádného z pacientů nebylo pozorováno zvýšené procentuální zastoupení CD19+/CD5+ lymfocytů. Změny relativního počtu CD19+/CD5+ lymfocytů byly zároveň pod hranicí rozlišovací schopnosti přístroje a nebylo je tedy možno statisticky vyhodnotit.

V průběhu operace až do prvního pooperačního dne byl zaznamenán postupný nárůst relativního počtu **CD8-CD56+** lymfocytů následovaný opětovným poklesem k výchozím hodnotám.

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

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

Jak u pacientů operovaných s CPB, tak u pacientů operovaných na bijícím srdci bylo v porovnání s předoperačními hodnotami pozorováno snížení relativního počtu **TLR-2+** i **TLR4+** myeloidních buněk. Signifikantně významné snížení bylo zaznamenáno již v průběhu operace. V pooperačním období byla naopak zaznamenána statisticky významně vyšší exprese TLR-2 i TLR-4 na myeloidních buňkách u obou skupin pacientů. Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v expresi ani TLR-2, ani TLR-4 mezi pacienty operovanými s CPB a pacienty operovanými na bijícím srdci.

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

jednotlivými skupinami pacientů v celém sledovaném období statisticky nevýznamné. Hodnota CD163 indexu v populaci monocytů byla, stejně jako v případě indexu CD64, řádově vyšší, než hodnota tohoto indexu u granulocytů.

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

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

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

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

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

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

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

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

## 6. DISKUZE

Kardiochirurgické operace představují náročný výkon, který je spojen s vážným zásahem do tělní integrity, a i přes velké pokroky v této oblasti je mnohdy spojen s řadou pooperačních komplikací. V důsledku operačního traumatu, mechanické manipulace se srdcem, aktivace koagulačního a fibrinolytického systému krve, kontaktní aktivace buněčných i humorálních složek krve s umělým povrchem přístrojů, následné kaskády ischemicko-reperfúzních dějů aj., je kardiochirurgická operace provázena vznikem řady rozmanitých podnětů, svou povahou tzv. nebezpečných vzorů. Na jejich přítomnost tělo reaguje zánětovou reakcí, ve které významné postavení zaujímá imunitní soustava. Rozvoj zánětové reakce u kardiochirurgických nemocných má zajistit obranu před infekčními agens endogenního i exogenního původu, podílet se na eliminaci poškozených vlastních struktur a v neposlední řadě se zúčastnit i procesu hojení a reparace tkání. Prospěšné účinky každé zánětové reakce jsou však neoddelitelně spojeny také s poškozujícími prvky. Ty mohou být způsobeny nepřiměřenou aktivací imunitního systému a rozvojem syndromu systémové zánětlivé odpovědi (SIRS), či mohou být naopak důsledkem nadměrné kompenzační imunosuprese, která zvyšuje frekvenci pooperačních infekčních komplikací. Selhání regulačních mechanismů implikuje závažné poškození, či dokonce smrt operovaného pacienta. Kvalitativní i kvantitativní parametry i dynamika zánětové reakce proto musí být účinně regulovány. Z toho důvodu jsou diskutovány i možnosti imunomodulační intervence (44).

Na změnách parametrů imunitního systému v průběhu kardiochirurgické operace se podílí řada proměnných faktorů, které zásadním způsobem ovlivňují výslednou zánětovou odpověď. Řada klinických studií dokumentuje změny jednotlivých složek přirozené i adaptivní imunity. Popisovány jsou kvantitativní i kvalitativní změny parametrů jak buňkami zprostředkované, tak humorální imunity.

Kardiochirurgické operace bývají spojeny se změnami v imunitních reakcích v časném pooperačním období (45, 46). Uvádí se, že jakýkoliv operační zákrok a anestézie způsobuje potlačení buňkami zprostředkovaných imunitních reakcí a lymfopenii (47). Celková imunosuprese se projevuje u kardiochirurgických operací využívajících CPB výrazněji, v porovnání s jinými chirurgickými výkony. Kardiochirurgické operace s použitím CPB mohou být spojeny s některými pooperačními komplikacemi způsobenými změnami v imunitních reakcích.

V důsledku kardiochirurgických operací dochází k výrazné leukocytóze. Maximálního počtu leukocytů bylo dosaženo u obou skupin pacientů první pooperační den. Tato naše pozorování odpovídají publikovaným údajům (48, 49). V literatuře je zvýšený počet leukocytů spojován se zvýšeným rizikem výskytu infarktu myokardu (50), a také s vyšší pooperační mortalitou po revaskularizačním výkonu (48). V našem souboru pacientů byl nárůst absolutního počtu leukocytů

důsledkem zvýšeného podílu neutrofilních granulocytů. Zvýšené procentuální zastoupení granulocytů bylo pozorováno již po ukončení operace. Statisticky významně vyšších hodnot relativního počtu granulocytů bylo dosahováno ve skupině pacientů operovaných s použitím CPB. Tato naše pozorování jsou v souladu s publikovanými údaji (51). Změny relativního počtu monocytů vykazovaly v celém sledovaném období pouze minimální změny. Pozorováno bylo nevýznamné zvýšení třetí až sedmý pooperační den v porovnání s předoperační úrovní. Naše výsledky jsou částečně v souladu s údaji uváděnými v práci Weerasingheho a kol. (49), kteří popisují pooperační zvýšení relativního počtu monocytů, a to u pacientů operovaných s použitím CPB i bez použití CPB. Výraznější monocytóza je zde popisována ve skupině pacientů operovaných bez CPB. Na základě zmiňované studie zde byla míra pooperačního zvýšení počtu monocytů asociovaná také s vyšší hodnotou BMI (body mass index), diabetem, kouřením a věkem operovaných pacientů. V naší studii nebyly v relativním počtu monocytů zjištěny statisticky významné rozdíly mezi pacienty operovanými s CPB a bez CPB.

Pomocí průtokové cytometrie jsme sledovali jednotlivé subpopulace lymfocytů. K největším změnám docházelo první pooperační den u obou skupin pacientů. U pacientů operovaných s CPB byly změny výraznější. To naznačuje, že operace na bijícím srdci působí menší změny v subpopulacích lymfocytů než operace s použitím CPB. V souladu s publikovanými výsledky (52), jsme prokázali, že pooperačně dochází ke snížení počtu T-lymfocytů v periferní krvi. U obou skupin pacientů byly nejnižší hodnoty pozorovány první pooperační den. Jak u CD8<sup>+</sup> lymfocytů, které můžeme považovat za skupinu cytotoxických buněk zahrnující Tc/s lymfocyty a část NK buněk, tak u NK buněk samotných, jsme pozorovali pooperační pokles, avšak žádný rozdíl mezi skupinami pacientů. Na rozdíl od CD4<sup>+</sup> lymfocytů byl pokles relativního počtu CD8<sup>+</sup> lymfocytů velmi pozvolný a naměřené minimum bylo zaznamenáno až sedmý pooperační den. Z toho vyplývá, že v časném pooperačním období docházelo k poklesu imunoregulačního indexu, podobně jako je doloženo v jiných studiích (46, 53, 54, 55). Jako hlavní důvod změn v počtu cirkulujících lymfocytů bývá uváděna redistribuce T-lymfocytů mezi periferní krví a kostní dření (53, 56), ale i funkční změny lymfocytů. Studie uvádí zvýšené procento aktivovaných lymfocytů bezprostředně po operaci s CPB (27, 52, 54, 55).

Literatura se neshoduje v tom, zda operace na bijícím srdci způsobuje menší změny v počtu lymfocytů než operace s použitím mimotělního oběhu. Např. Akbas (57) a Gasz (58) dokládají, že u pacientů operovaných s použitím CPB dochází k větším změnám imunitní odpovědi, než u pacientů operovaných bez CPB. Jiní autoři uzavírají, že změny, které jsou po kardiochirurgické operaci patrné, jsou podobné u obou typů vedení operace a souvisí spíše s chirurgickým traumatem, než se

způsobem vedení operace (26, 59). Z našich výsledků by se dalo shrnout, že lymfocytární znaky, které vlivem operace prodělaly významné změny, vykazují obdobnou dynamiku u obou skupin pacientů, avšak u pacientů operovaných s použitím CPB byly tyto změny výraznější. U obou skupin pacientů byly největší změny pozorovány první pooperační den. Naše práce naznačuje, že alternativní přístup vedení kardiologické operace bez použití CPB by mohl zmírnit některé negativní procesy související se změnami počtu a funkce lymfocytů. Pochopení změn lymfocytárních funkcí v důsledku kardiologické operace je také důležitým předpokladem pro imunologické monitorování rejekčních reakcí při transplantacích srdce.

Adheze leukocytárních elementů, zvláště monocytů a T-lymfocytů, na aktivovanou endotelovou výstelku, je podmínkou rozvoje zánětové reakce v arteriální stěně. Klíčovými molekulami, které se účastní tohoto procesu, jsou adhezivní molekuly. Jejich zvýšená exprese na leukocytech i buňkách endotelu je vyvolána působením řady prozánětlivých stimulů. Hlavní adhezivní molekulou leukocytů jsou leukocytární integriny, které sdílejí společnou podjednotku **CD18** tzv.  $\beta_2$ -integriny. Existuje řada výzkumných studií dokládajících klíčové postavení  $\beta_2$ -integrinů v procesu zánětlivé odpovědi. V omezené míře lze nalézt také práce, které se věnují sledování exprese  $\beta_2$ -integrinů u kardiologických pacientů. Jejich výsledky jsou však nejednotné. Asimakopoulos a kol. (60) našli významně zvýšenou expresi  $\beta_2$ -integrinů CD11b/CD18 15 minut po zahájení mimotělního oběhu. Gessler a kol. (61) naproti tomu dokumentují redukovanou expresi CD11b/CD18 po ukončení mimotělního oběhu. Podobný pokles jsme pozorovali i ve skupině našich pacientů, a to jak v hodnotách relativního i absolutního počtu, tak v intenzitě exprese vyjádřené hodnotou MFI. U obou skupin pacientů bylo v porovnání s předoperačními hodnotami pozorováno významné snížení již v průběhu operace. Snížení přetrvávalo až do prvního pooperačního dne. Vysvětlením pro tento pokles, pozorovaný ve větším rozsahu zejména u pacientů operovaných s CPB, může být skutečnost, že aktivované buňky jsou ve zvýšené míře zachytávány na vnitřním povrchu trubic přístroje pro mimotělní oběh. Opětovné zvýšení CD18<sup>+</sup> myeloidních buněk na předoperační úroveň bylo pozorováno u obou skupin pacientů až třetí pooperační den, a to pravděpodobně v důsledku zvýšeného vyplavování granulocytů z kostní dřeně. Sedmý pooperační den byl provázen opětovným poklesem CD18<sup>+</sup> myeloidních buněk v periferní krvi, a to nejpravděpodobněji z důvodu zvýšené sekvestrace aktivovaných myeloidních buněk v zánětlivé tkáni.

Naše zjištění je zcela ve shodě s výsledky práce Tanroka a kol. (62), kteří popisují u pacientů operovaných s CPB sníženou expresi povrchové molekuly CD18 v průběhu kardiologické operace až do druhého pooperačního dne. I přes všeobecně přijímanou hypotézu, že operace s použitím CPB jsou, v porovnání s operacemi na bijícím srdci, spojeny s rozsáhlejší aktivací buněk imunitního



systemu, neprokázali jsme statisticky významné rozdíly v expresi aktivačního znaku CD18 mezi pacienty operovanými s použitím CPB nebo operovanými na bijícím srdci.

Vyšší podíl aktivovaných buněk u pacientů operovaných s CPB byl však pozorován v případě dalšího sledovaného aktivačního znaku, membránového glykoproteinu **CD38**. Při porovnání jednotlivých skupin pacientů byl zjištěn signifikantně významně vyšší podíl CD38<sup>+</sup> myeloidních buněk u pacientů operovaných s použitím CPB, a to první a sedmý pooperační den. Exprese znaku CD38 také ve srovnání s molekulou CD18 vykazovala odlišnou dynamiku. S výjimkou třetího pooperačního dne byl u obou skupin pacientů pozorován zvýšený podíl CD38<sup>+</sup> myeloidních buněk. Nepodařilo se nám nalézt literaturu popisující expresi znaku CD38 u pacientů podstupujících kardiochirurgickou operaci. Je však zmiňována zvýšená exprese CD38 u pacientů podstupujících koronární angioplastiku s katetrizačně zaváděnými stenty (63).

Mezi hlavní příčiny aktivace imunitního systému v důsledku kardiochirurgické operace patří zejména chirurgické poškození, mechanická manipulace na srdci, kontakt krevních komponent s umělým povrchem mimotělního oběhu, přechodná endotoxemie a ischemicko-reperfuční poškození srdce a plic. V důsledku těchto vlivů dochází v organismu k tvorbě řady rozmanitých podnětů endogenního i exogenního původu. Tyto představují pro organismus signály nebezpečí a jejich identifikaci je v dominantní míře zprostředkována prostřednictvím Toll-like receptorů (TLR). Celá řada podnětů, např. hypoxie, přítomnost prozáněťových cytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-6), chemokinů či mikrobiálních součástí, je schopna modulovat expresi těchto receptorů, a tak významným způsobem ovlivňovat charakter následné záněťové reakce. Nejlépe charakterizovanými ze skupiny TLR receptorů jsou receptory **TLR-2** a **TLR-4**. Jejich exprese byla sledována i ve skupině našich kardiochirurgických pacientů. Změny povrchové exprese TLR-2 a TLR-4 receptorů na myeloidních buňkách byly obdobné u obou skupin pacientů. Jak u pacientů operovaných s CPB, tak u pacientů operovaných na bijícím srdci, bylo v porovnání s předoperačními hodnotami pozorováno snížení relativního počtu TLR-2<sup>+</sup> i TLR4<sup>+</sup> myeloidních buněk. Signifikantně významné snížení bylo u obou skupin pacientů zaznamenáno již v průběhu a po ukončení operace. Podobný nálezn publikuje také Sbrana a kol. (64), kteří našli u pacientů, podstupujících kardiovaskulární zákrok s použitím CPB, signifikantní snížení exprese TLR4 na monocyttech v intervalu 24 h po ukončení operace. Toto snížení zde vysvětlují v souvislosti s dočasným funkčním útlumem cirkulujících monocytů. Ve skupině našich pacientů byl tento pokles, pozorovaný v průběhu operace, následně vystředán signifikantně zvýšenou expresí obou receptorů v pooperačním období. Tato dynamika exprese TLR-2 a TLR-4 u kardiochirurgických pacientů se podobá dynamice exprese TLR popsané v experimentální studii Whitteboleho a kol. (65), kteří sledovali soubor zdravých dobrovolníků, kterým byl intravenózně aplikován LPS. V naší prováděné studii jsme rovněž našli signifikantní korelaci v expresi TLR-2 a TLR-4. Tento nálezn je ve

shodě se skutečností, že za fyziologických podmínek je dynamika exprese obou znaků shodná. Naše pozorování, týkající se exprese TLR receptorů u kardiochirurgických pacientů, však není možné srovnávat s výsledky jiných autorů, neboť nebyly nalezeny žádné další práce věnující se této problematice.

Dalšími aktivačními znaky, který byly v naší studii sledovány u kardiochirurgických nemocných, byly aktivační molekula **CD64** (FcγRI) a vychytávací molekula **CD163**. Zvýšená exprese obou znaků slouží jako indikátor zánětu a sepse. Změny exprese obou znaků jsme sledovali pomocí Leuko64 kitu. Tento kit představuje komerčně dostupný diagnostický set ke stanovení povrchové exprese CD64 (FITC) a CD163 (PE) na jednotlivých leukocytárních populacích. Expese antigenu v příslušné populaci buněk je vyjádřena ve formě indexu. Stanovení tohoto indexu napomáhá v rozhodování, zda je příčinou zánětu bakteriální sepse, či se jedná o zánětovou odpověď jiné, tzn. neinfekční etiologie. Součástí kitu jsou fluorescenčně značené „beads“, které jsou určeny ke kalibraci přístroje a slouží zároveň jako kvantifikační fluorescenční standard. Tato skutečnost je nesporným kladem tohoto diagnostického setu, neboť umožňuje mezilaboratorní porovnání a je tak vhodným nástrojem pro rutinní klinické sledování. Kardiochirurgické operace jsou provázeny významnou dynamikou exprese obou sledovaných aktivačních markerů. V průběhu operace jsme v žádné skupině pacientů nezaznamenali statisticky významné změny v expresi znaku CD64, ani CD163. Signifikantní zvýšení v porovnání s předoperačními hodnotami bylo pozorováno první pooperační den. Výjimkou byla expese znaku CD163 v populaci granulocytů u pacientů bez CPB. Zde jsme v celém sledovaném období nepozorovali signifikantní změnu indexu vzhledem k předoperačním hodnotám. Hodnota obou indexů v populaci monocytů byla řádově vyšší, než hodnota tohoto indexu u granulocytů. Za originální nález naší práce lze považovat zjištění, že nárůst exprese CD64 na monocytech (1. pooperační den) časově předchází zvýšené expresi tohoto znaku na granulocytech (3. pooperační den). Signifikantní rozdíl mezi skupinami pacientů operovaných s použitím CPB a bez použití CPB byl zjištěn pouze v hodnotě monocytárního CD163 indexu, a to první pooperační den. Tento index tak pravděpodobně jako jediný odráží přímý dopad odlišného operačního přístupu. Existuje pouze málo prací, které se věnují sledování exprese CD64 nebo CD163 v průběhu kardiochirurgické operace. V souladu s výsledky naší práce jsou pozorování Goldsteina a kol. (66), kteří popisují signifikantně zvýšenou expresi CD163 na monocytech první pooperační den. V případě exprese znaku CD64 se naše závěry odlišují od studie Stefanoua a kol. (67), kteří u kardiochirurgických pacientů operovaných s CPB nezaznamenali zvýšenou indukci monocytární exprese CD64. Zmiňovaná studie však zahrnovala pouze 10 pacientů s určitými odlišnostmi ve vedení mimotělního oběhu. Srovnání s výsledky jiných studií má svá omezení také z důvodu odlišného způsobu vyjádření exprese sledovaného znaku.

Zcela zásadní úlohu v rozvoji zánětové reakce u kardiochirurgických nemocných sehrávají buňky monocyto-makrofágové linie. Ty nejefektivněji identifikují signály nebezpečí prostřednictvím dozorových receptorů a reagují na ně mimo jiné tvorbou pluripotentních prozánětových cytokinů. V mnoha experimentech i v klinických studiích je popsáno zvýšení krevní hladiny pluripotentních prozánětových cytokinů, především TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, ke kterému dochází již v průběhu operace s dosažením maxima obvykle první den po provedené operaci (29).

V naší studii jsme našli významný rozdíl v tvorbě **IL-6** mezi nemocnými operovanými s použitím CPB a nemocnými operovanými na bijícím srdci bezprostředně po operaci a první pooperační den. U nemocných s CPB bylo dosaženo vrcholu již bezprostředně po ukončení operace, u pacientů operovaných bez CPB v první pooperační den. Tyto naše výsledky jsou částečně v souladu s nálezy dalších autorů (18, 29, 68, 69). Za originální nález lze považovat skutečnost, že bezprostředně po operaci je hladina IL-6 významně vyšší u nemocných operovaných s použitím CPB, zatímco v dalším období dochází k úplnému přesmyku a v první pooperační den je hladina IL-6 signifikantně vyšší u nemocných operovaných bez použití CPB.

Jedním z regulačních prvků, které modulují zánětovou reakci, je tvorba protizánětových cytokinů, např. **IL-10**, které regulačně zasahují do funkcí přirozené i specifické imunity. V naší studii jsme prokázali zcela odlišnou dynamiku sérové hladiny IL-10 u jednotlivých skupin kardiochirurgických pacientů. U nemocných operovaných bez použití CPB dosáhla sérová hladina IL-10 maxima v první pooperační den. U nemocných operovaných s použitím CPB jsme našli signifikantně zvýšenou maximální hladinu IL-10 bezprostředně po operaci. K nárůstu IL-10 docházelo u nemocných s CPB již v průběhu operace a bezprostředně po operaci byly dosaženy sérové koncentrace IL-10 řádově vyšší než u nemocných operovaných bez CPB. Naše výsledky odpovídají nálezům studií (70, 71), ve kterých je popisována významně vyšší tvorba IL-10 bezprostředně po operaci u nemocných operovaných s použitím CPB. Zároveň v nich však byla zjištěna přítomnost vyšších koncentrací IL-10 také u nemocných operovaných bez použití CPB. Přes mnohokrát v přehledech citované údaje, že po kardiochirurgické operaci dochází pravidelně ke zvýšení sérové hladiny IL-10 (15, 72), existují i rozporné nálezy. Např. ve studii Giomarelliho et al. (73) byl zaznamenán nárůst hladin IL-10 u nemocných operovaných s mimotělním oběhem pouze u těch pacientů, kterým byl před operací aplikován methylprednisolon. Rozdíly v hladinách IL-10 mezi kardiochirurgickými nemocnými operovanými s použitím a bez použití CPB lze pouze obtížně interpretovat. Vyšší tvorbou IL-10 musí imunitní systém nemocných operovaných s CPB zřejmě reagovat na kontaktní aktivaci leukocytů, především neutrofilních granulocytů, na umělých površích trubic CPB přístrojů. Přesměrování podstatného objemu krve mimo tělo u nemocných operovaných s použitím CPB může simulovat

i rozsáhlejší hemoragické poškození. V experimentu na zvířatech dochází v reakci na toto poškození ke zvýšení tvorby IL-10 (71).

V naší studii byla ověřena také dynamika hladiny IL-13. Relevantní pro podíl IL-13 na rozvoji zánětové reakce po kardiochirurgické operaci je skutečnost, že výrazným zdrojem IL-13 jsou žírné buňky, lokalizované ve sliznici plic, střeva a pojivové tkáni. Během kardiochirurgické operace jsou mastocyty masivně stimulovány a uvolňují vysoce potentní mediátory, které moduluji průběh zánětové reakce, často s negativním dopadem na nemocného. Lze očekávat, že k výraznější aktivaci mastocytů bude docházet u nemocných operovaných s použitím CPB. V průběhu operace i v sledovaném sedmidenním pooperačním období jsme zaznamenali pouze minimální, statisticky nevýznamné, změny sérové hladiny IL-13. Nenašli jsme ani žádné rozdíly v sérových hladinách IL-13 mezi nemocnými operovanými s použitím a bez použití CPB. Přítomnosti a úloze IL-13 u nemocných podstupujících kardiochirurgickou operaci je dosud věnována minimální pozornost. Nalezli jsme pouze jednu původní práci, ve které autoři rovněž konstatují pouze minimální odpověď v hladině IL-13 po kardiochirurgické operaci (28). Z našich výsledků lze implikovat, že IL-13 pravděpodobně nesehrává významnější úlohu v průběhu kardiochirurgické operace.

Naše výsledky, které dokládají rozdíly v hladinách prozáněťových i protizáněťových cytokinů mezi kardiochirurgickými nemocnými operovanými s použitím a bez použití CPB, nelze jednoznačně interpretovat. S jistými omezeními lze ovšem shrnout, že dynamika protizáněťového cytokinu IL-10 zhruba kopíruje dynamiku tvorby prozáněťových cytokinů (IL-6), nebo jejich produkci spíše předchází. Prokázali jsme, že kvantitativní i kvalitativní změny, ke kterým dochází v různém odstupu od zákroku, jsou odlišné u jednotlivých skupin pacientů. Tento nálezn dokazuje, že rozdílný kardiochirurgický přístup vede k zásadně jinému průběhu zánětové reakce. Naše výsledky zároveň potvrdily skutečnost, že je důležité sledovat dynamiku tvorby cytokinů, nikoliv se zaměřit pouze na jejich izolované stanovení. Toto samo o sobě nepřináší žádnou relevantní informaci. Stanovení hladiny prozáněťových i protizáněťových cytokinů v krvi u kardiochirurgických nemocných umožňuje zhodnotit stupeň aktivace nebo suprese imunitního systému. Může tak přispět ke zhodnocení stavu imunitní kompetence jednotlivých nemocných a být podkladem pro vhodnou klinickou intervenci.

Za jednu z nejvýznamnějších poškozujících složek při kardiochirurgickém výkonu jsou považovány volné kyslíkové radikály (74, 75). V buňkách myokardu, a také v buněčných elementech jiných tělních soustav včetně soustavy imunitní, však existují nebo jsou indukovatelné některé adaptační mechanismy, které jsou schopny ochránit buňky před nežádoucími účinky ischemie a reperfúze. V této souvislosti jsou uváděny jako jedny z nejdůležitějších stresové proteiny Hsp. Některé studie se soustředí na pochopení jejich role v kardioprotekci (76, 77). Největší pozornost je v souvislosti s onemocněním srdce a oběhové soustavy věnována proteinům Hsp60 a Hsp70. **Hsp60**

bývá exprimován po působení různých stresových faktorů včetně ischemie a reperfúze (77). Byla nalezena pozitivní korelace mezi sérovou koncentrací Hsp60 a TNF $\alpha$ . Hladiny cirkulujícího Hsp60 jsou asociovány s časnými stádii kardiovaskulárních onemocnění. Narůstají důkazy o tom, že Hsp60 uvolněný do oběhu je asociován s rozvojem choroby věnčitých tepen (78). Co se týče proteinu **Hsp70**, bylo prokázáno, že extracelulární Hsp70 je považován za určitý signál nebezpečí, který vede k aktivaci imunitního systému. *In vitro* bylo prokázáno, že má významný imunoregulační potenciál. Může být též považován za marker, který odráží stupeň poškození myokardu, kdy je do oběhu uvolňován z nekrotických či poškozených buněk. Zdrojem Hsp70 uvolněného do oběhu pak mohou být jak samotné buňky myokardu, tak leukocyty, zejména poškozené monocyty a granulocyty (70). V buněčných kulturách koronárních endotelových buněk a srdečních myocytů, stejně jako u experimentálních zvířat, bylo potvrzeno, že zvýšené hladiny Hsp70 vedou ke kardioprotekci a k rezistenci k ischemii (79, 80). Prokázali jsme, že kardiologický výkon za použití CPB vedl k větší indukci sérového Hsp70 v porovnání s koncentracemi u pacientů operovaných na bijícím srdci. Podobné výsledky publikovali Dybdahl a kol. (68), kteří nacházeli nejvyšší sérové koncentrace Hsp70 2 hod po operaci u pacientů operovaných s CPB. V našem souboru byly rozdílné koncentrace Hsp70 nalezeny bezprostředně po ukončení operace, kdy u pacientů operovaných s CPB docházelo k významnému nárůstu tohoto proteinu. To odpovídá skutečnosti, že při operaci s použitím CPB dochází k daleko většímu ischemicko-reperfúznímu poškození. V případě proteinu Hsp60, nebyly nalezeny rozdíly v koncentraci mezi nemocnými operovanými s použitím CPB a nemocnými operovanými na bijícím srdci. Zajímavé je pouze zjištění, že u pacientů operovaných na bijícím srdci dochází při posledním odběru, tj. sedmý pooperační den, k významnému poklesu Hsp60 oproti předešlým hodnotám. Z hlediska navození ochrany myokardu a dalších tkání je indukce Hsp považována za pozitivní jev. Některé studie se zabývají aplikací indukce Hsp v klinické praxi a zkoumají různé farmakologické postupy zvyšující expresi Hsp (81, 82).

**Pentraxin 3 (PTX3)** je nově objeveným proteinem akutní fáze, který sdílí částečnou homologii s krátkým, tzv. klasickým pentraxinem, C-reaktivním proteinem (CRP). Zatímco v průběhu reakce akutní fáze je CRP vytvářen v játrech a působí na úrovni celého organismu, PTX3 vzniká přímo v zánětlivém ložisku a jeho působení je lokalizované do postižené tkáně. Společnou vlastností obou pentraxinů je aktivace komplementu klasickou cestou. PTX3 se uplatňuje také jako solubilní receptor pro nebezpečné vzory (83). Oba pentraxiny se podílejí na patogenezi některých zánětlivých onemocnění s autoimunitní složkou. Z tohoto pohledu se největší zájem soustředí na aterosklerózu a její komplikace (40). Hlavními buněčnými elementy, které produkují PTX3, jsou zejména monocyty, dendritické a endotelové buňky. Syntéza PTX3 je v nich indukována po působení prozáněťových cytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) a mikrobiálních komponent (LPS). Synergisticky s účinkem

LPS se na zvýšené produkci PTX3 podílí také IL-10. IFN- $\gamma$ , stejně jako IL-4 mají z hlediska produkce PTX efekt inhibiční (83). Zanedbatelný vliv na produkci PTX3 je popisován i v případě IL-6, hlavního induktoru syntézy hepatálních proteinů (84). Z klinického hlediska je významné sledování hladiny CRP i PTX u pacientů s akutním infarktem myokardu. Maximálních hodnot PTX3 je dosahováno již několik hodin po výskytu prvních příznaků infarktu myokardu, elevace hladiny CRP je pozorován se zpožděním až v intervalu 24-48 hodin od prvních příznaků. Absolutní hodnoty, kterých oba parametry dosahují, jsou rovněž prognostickým parametrem mortality v následném tříměsíčním období (85). V naší studii jsme se zaměřili na sledování dynamiky produkce PTX3 a CRP u pacientů podstupujících kardiologickou revaskularizační operaci. Zaznamenali jsme signifikantní nárůst sérové hladiny PTX3 ve skupině pacientů operovaných s CPB, i ve skupině pacientů operovaných na bítícím srdci. Zvýšené hladiny byly pozorovány již v průběhu operace, maximálních hodnot bylo u obou skupin dosaženo první pooperační den. Na konci sledovaného období tj. sedmý pooperační den, dochází u obou skupin k poklesu sérové koncentrace PTX3 na předoperační úroveň. Bezprostředně po ukončení operace jsme našli signifikantně vyšší hladiny PTX3 u pacientů operovaných s použitím CPB. I přes signifikantní nárůst sérové hladiny PTX3 u obou skupin kardiologických nemocných, nebyla v žádném ze sledovaných odběrových intervalů překročena fyziologická hranice PTX3 v séru. Tato normální hodnota PTX3 v séru, určena v rámci studia jiných autorů (86, 87), byla stanovena na 2 ng/ml. V průběhu operačního výkonu jsme, na rozdíl od PTX3, nezaznamenali zvýšenou hladinu **CRP**. K signifikantnímu zvýšení koncentrace CRP v séru dochází u obou skupin až první pooperační den. V žádném ze sledovaných intervalů nebyl rovněž zjištěn statisticky významný rozdíl mezi skupinou pacientů operovaných s použitím CPB nebo bez použití CPB. Dosažení obdobných hodnot CRP u obou skupin pacientů poukazuje na srovnatelný rozsah reakce akutní fáze u odlišných operačních postupů. Naše výsledky implikují odlišnou dynamiku tvorby PTX3 a CRP. Bude velmi žádoucí ověřit v dalších studiích použitelnost PTX jako velmi časného markeru zánětu u nemocných operovaných na srdci.

Plazmatický protein **LBP** (lipopolysaccharide binding protein), membránový receptor Toll-like receptor-4 (TLR-4, CD284) a koreceptorová molekula CD14 jsou klíčovými molekulami v procesu identifikace bakteriálního endotoxinu (89). LBP, syntetizovaný převážně v hepatocytech a plicích, váže s vysokou afinitou lipid A bakteriálních lipopolysacharidů a katalyzuje vazbu LPS na CD14 receptor. Plazmatická hladina LBP rychle vzrůstá v průběhu zánětové odpovědi (88). Molekula CD14 je membránový protein, vázaný fosfatidylinositolovou (GPI) kotvou, který slouží jako vysokoafinní receptor pro vazbu komplexů LPS-LBP. Je exprimován na řadě buněk, zejména na povrchu monocytů/makrofágů a neutrofilních granulocytů. V tělních tekutinách se vyskytují také solubilní formy **sCD14**, které vznikají proteolytickým odštěpováním z povrchu buněk nebo jsou *de novo* tvořeny

hepatocyty jako proteiny akutní fáze zánětu. Solubilní molekula sCD14 kompetitivně inhibuje vazbu LBP-LPS komplexu na membránově vázanou formou CD14. Zároveň se v komplexu s LBP váže na povrch buněk, které neexprimují molekulu CD14, např. na povrchu endotelových buněk a buněk hladké svaloviny. Po vazbě komplexu dochází k aktivaci těchto buněk s následným uvolněním prozáněťových působků (1). Zvýšené hladiny LBP byly naměřeny v souvislosti s expozicí bakteriálním endotoxinům (90) a bylo publikováno několik prací, jejichž cílem je využití LBP jako diagnostického a prognostického markeru u pacientu se SIRS infekčního a neinfekčního původu (91). Zvýšená sérová hladina sCD14 je dokumentována v klinických stavech se zvýšenou aktivací monocyto/makrofágových buněk. Signifikantně vyšší koncentrace sCD14 jsou popisovány u pacientů s Kawasakiho chorobou (92) a brucelózou (93). Publikovány byly rovněž výsledky prokazující korelaci mezi koncentrací sCD14 a stupněm závažnosti poškození u pacientů s polytraumatem (94). Existuje pouze několik málo studií, které se věnují hodnocení hladiny LBP a sCD14 v průběhu kardiologické operace. Franke a kol. (21) popisují vzrůstající hladinu LBP v průběhu prvního až pátého pooperačního dne po provedené kardiologické operaci. Pooperační nárůst LBP je dokumentován také v práci Lequiera a kol. (95), kteří ale současně popisují přechodné snížení hladiny LBP po ukončení mimotělního oběhu. Také u našich pacientů bylo v porovnání s předoperační úrovní pozorováno statisticky významné zvýšení sérové koncentrace LBP a sCD14 v časném pooperačním období a signifikantně vyšší hladiny obou parametrů byly naměřeny i sedmý den po operaci. V žádném ze sledovaných intervalů nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v koncentraci LBP ani sCD14 mezi skupinou pacientů operovaných s použitím CPB nebo bez použití CPB. Na základě statistického porovnání nebyla zjištěna korelace ani LBP, ani sCD14 s hodnotami proteinů akutní fáze (IL-6, CRP a PTX). Molekuly LBP a sCD14 tak pravděpodobně nepůsobí u kardiologických pacientů jako proteiny akutní fáze.

## 7. ZÁVĚR

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

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

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

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

V případě humorálních parametrů byly rozdíly mezi skupinami pacientů pozorovány mnohem častěji. V naší studii jsme našli významný rozdíl v tvorbě IL-6, IL-10, PTX3 a Hsp70. Již bezprostředně po ukončení operace jsme pozorovali signifikantně vyšší koncentrace těchto parametrů u nemocných operovaných s použitím CPB. Za originální nález naší práce lze považovat skutečnost, že bezprostředně po operaci jsme prokázali významně vyšší hladinu IL-6 u nemocných operovaných s použitím CPB, zatímco v dalším období dochází k úplnému přesmyku a v první pooperační den je hladina IL-6 signifikantně vyšší u nemocných operovaných bez použití CPB.

Naše výsledky, které dokládají rozdíly v hladinách prozáněťových i protizáněťových cytokinů mezi kardiochirurgickými nemocnými operovanými s použitím a bez použití CPB, nelze jednoznačně interpretovat. S jistými omezeními lze ovšem shrnout, že dynamika protizáněťového cytokinu IL-10



zhruba kopíruje dynamiku tvorby prozáněťových cytokinů (IL-6), nebo jejich produkci spíše předchází. Z našich výsledků lze také implikovat, že IL-13 pravděpodobně nesehrává významnější úlohu v průběhu kardiochirurgické operace. Na základě provedených korelací lze rovněž konstatovat, že molekuly LBP a sCD14 nepůsobí u kardiochirurgických pacientů jako proteiny akutní fáze. Naše výsledky zároveň potvrdily skutečnost, že je důležité sledovat dynamiku tvorby cytokinů, nikoliv se zaměřit pouze na jejich izolované stanovení.

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

Detailní znalost kvalitativních a kvantitativních změn parametrů zánětové reakce a jejich podrobná korelace s klinickými preoperačními i pooperačními ukazateli, by mohly vést k identifikování specifických markerů, jejichž sledování by mělo prediktivní sílu určit rozvoj abnormální, deregulované zánětové odpovědi v pooperačním období. V kombinaci s rozšiřující se znalostí geneticky podmíněných odlišností, které určují parametry zánětové reakce (polymorfismus v TLR a pod.), by tyto ukazatele mohly napomoci i výběru optimálního kardiochirurgického postupu s co nejmenším dopadem na zdraví pacienta. V naší studii prodělali všichni pacienti následné zotavení bez pooperačních komplikací. Výše zmíněné korelace tak nebylo možno provést. V řadě sledovaných parametrů je však naše studie pilotní prací a přináší některé originální výsledky, které mohou přispět k detailnějšímu poznání zánětové odpovědi, ať už ve fyziologické či patofyziologické podobě.

## POUŽITÁ LITERATURA

1. Krejsek J., Kopecký J.: Klinická imunologie, Nukleus, 2004, s. 681-701.
2. Šponar J., Vítovec J.: Ischemická choroba srdeční, Grada, 2003.
3. Krejsek J.: Ateroskleróza – důsledek dlouhodobé poškozující zánětové reakce. *Sanquis*, 2007, 49, s.20-22.
4. Ross R.: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.*, 1999, 340(2), s. 115-126.
5. Hansson G.K., Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 352 (16), s-1685-1695.
6. Krejsek J., Kuneš P., Andrýs C., Holická M., Novosad J., Kudlová M., Koláčková M.: přirozená imunita, receptory pro exogenní a endogenní nebezpečné vzory v imunopatogenezi aterosklerózy. *Čas. Lék. Čes.*, 2005, 144(12), s.785-789.
7. Krejsek J.: Zánět – kolik podob? *Sanquis*, 2007, 49, s.6-9.
8. Kapoor M.Ch., Ramachandran T.R.: Inflammatory response to cardiac surgery and strategies to overcome it. *Annals of Cardiac Anaesthesia*, 2004, 7, s. 113-128.
9. Hall R.I., Smith M.S., Rocker G.: The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutical and pharmacological considerations. *Anesth Analg*, 1997, 85, s. 766-782.
10. Osmančík P.: Společná etiopatogeneze akutních koronárních syndromů. *Kardioforum*, 2003, 2, s. 18-21.
11. Masopust J.: Patobiochemie buňky. ČSKB, 2. LF UK, 2003.
12. Vrablík M., Češka R.: Statiny:od lipidologie ke kardiologii. *Klin Farmakol Farm*, 2005, 19: s. 149-151.
13. Dominik J. *Kardiochirurgie*. Grada, 1998.
14. Royston D.: The inflammatory response and extracorporeal circulation. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 1997, 11(3), s. 341-354.
15. Ascione R., Lloyd C.T., Underwood M.J. et al.: Inflammatory response after coronary revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann. Thorac. Surg.*, 200, 69, s 1198-1204.
16. Rumalla V., Calvano S.E., Spotnitz A.J. et al.: The effects of glucocorticoid therapy on inflammatory response to coronary artery bypass graft surgery. *Arch. Surg.*, 2001, 136, s.1039-1044.

17. Khan N.E., de Souza A., Mister R. et al.: A randomized comparison of off-pump and on-pump multivessel coronary-artery bypass surgery. *N. Engl. J. Med.*, 2004, 350, s. 21-28.
18. Diegeler A., Doll N., Rauch T. et al.: Humoral immune response during coronary artery bypass grafting. A comparison of limited approach „off-pump“ technique, and conventional cardiopulmonary bypass. *Circulation*, 2000, 102 (Suppl. III), s. 95-100.
19. Frass O.M., Bühling F., Täger M. et al.: Antioxidant and antiprotease status in peripheral blood and BAL fluid after cardiopulmonary bypass. *Chest*, 2001, 120, s. 1599-1608.
20. Ochoa JJ., Volchez M.J., Mataix J. et al.: Oxidative stress in patients undergoing cardiac surgery: comparative study of revascularization and valve replacement procedures. *J. Surg. Res.* 2003, 111, s- 248-254.
21. Franke A., Lante W., Fackeldey V., et al.: Pro-inflammatory cytokines after different kinds of cardio-thoracic surgical procedures: is what we see what we know? *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2005, 28, s. 569-575.
22. Levy J. H., Tanaka K. A.: Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann. Thorac. Surg.*, 2003, 75, s. 715-720.
23. Heismayr M. J., Spittler A., Lassnigg A. et al.: Alteration in the number of circulating leucocytes, phenotype of monocyte and cytokine production in patient undergoing cardiothoracic surgery. *Clin Exp Immunol*, 1999, 115, s. 315-323.
24. Diegeler A., Tárnok A., Rauch Th. et al.: Changes of leukocyte subsets in coronary artery bypass surgery: Cardiopulmonary bypass versus „off-pump“ techniques. *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1998, 46, s. 327-332.
25. Markewitz A., Lante W., Franke A. et. al.: Alterations of cell-mediated immunity following cardiac operations: clinical implications and open questions. *Shock*, 2001, 16, s. 10-15.
26. Blacher C., Neumann J., Jung L.A. et al.: Off-pump coronary artery bypass grafting does not reduce lymphocyte activation. *Int J Cardiol*, 2005, 101, s. 473-479.
27. Franke A., Lante W., Kurig E. et al.: Hyporesponsiveness of T cell subsets after cardiac surgery: a product of altered cell function or merely a result of absolute cell count changes in peripheral blood? *Eur J Cardiothor Surg*, 2006, 30, s. 64-71.
28. Akbas H., Erdal C., Demiralp E., Alp M.: Effects of coronary artery bypass grafting on cellular immunity with or without cardiopulmonary bypass: changes in lymphocytes subsets. *Cardiovasc Surg*, 2002, 10(6), s. 586-589.
29. Franke A., Lante W., Fackeldey V. et al.: Proinflammatory and antiinflammatory cytokines after cardiac operation: different cellular sources at different times. *Ann. Thorac. Surg.*, 2002, 74, s. 363-371.

30. Asimakopoulos G.: Mechanisms of the systemic inflammatory response. *Perfusion*, 1999, 14, s. 269-277.
31. Wehlin L., Vedin J., Vaage J., Lundahl J.: Activation of complement and leukocyte receptors during on- and off pump coronary artery bypass surgery. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2004, 25, s. 35-42.
32. Reinhart K., Bayer O., Brunkhorst F., Meisner M.: Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit. Care Med.*, 2002, 30 (Suppl), s. 302-312.
33. Scarabelli T., Stephanou A., Rayment et al.: Apoptosis of Endothelial Cells Precedes Myocyte Cell Apoptosis in Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation*, 2001, 104, s. 253-256.
34. Kassirer M., Zeltser D., Prochorov V. et al.: Increased Expression of the CD11b/CD18 Antigen on the Surface of Peripheral White Blood Cells in Patients with Ischemic Heart Disease: Further Evidence for Smoldering Inflammation in Patients with Atherosclerosis. *Am Heart J*, 1999, 138(3): s. 555-559.
35. Mehta K., Shahid U., Malavasi F.: Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *The FASEB Journal*, 1996, 10, s. 1408-1417.
36. Kiechl S., Lorenz E., Reindl M. et al: Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N. Engl. J. Med.*, 2002, 347, s. 185-192.
37. Ferencík M.: Receptory podobné Toll (TLRs), prirodzená imunita a alergický zápal. *Alergie*, 2003, 5(1).
38. Allen E., Bakke A.C., Purtzer M.Z., Deodhar A.: Neutrophil CD64 expression: distinguishing acute inflammatory autoimmune disease from systemic infections. *Ann Rheum Dis*, 2002, 61: s. 522-525.
39. Lin E., Calvano S.E., Lowry S.F.: Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*, 2000, 127(2): s. 117-126.
40. Kuneš P., Krejsek J: Dlouhý pentraxin PTX3 – nový reaktant akutní fáze. *Čas. Lék. Čes.*, 2006, 86, s. 71-77.
41. Pockley G.A.: Heat shock protein, inflammation and cardiovascular disease. *Circulation*, 2002, 105, s. 1012-1017.
42. Jankovičová K., Kudlová M., Koláčková M. et al.: Stresové proteiny Hsp60 a Hsp70 u kardiokirurgických pacientů. *Cor et Vasa*, 2007, 49(10): 356-361.
43. Nouza K.: Zánět. *Medicina*, 2002, 9(5), s.22.
44. Markewitz A., Faist E., Lang S., Hültner L, Weinhold C., Reichart B.: An imbalance in T-helper cell subsets alters immune response after cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1996, 10(1): 61-67.

45. Delongu G., Moretti S., Antonucci A., Marcellini S., Masciangelo R., Famularo G., Signore L.: Apoptosis and surgical trauma. *Arch Surg*, 2000, 135: 1141-1147.
46. Naldini A., Borrelli E., Cesari S., Giomarelli P., Toscano M.: In vitro cytokine production and t-cell proliferation in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Cytokine*, 1995, 7(2): 165-170.
47. Shimaoka M., Hosothubo K., Sugimoto M., Sakaue G.: The influence of surgical stress on t cells? Enhancement of early phase lymphocyte activation. *Anesth Analg* 1998,87: 1431-1435.
48. Bagger J. P., Zindrou D., Taylor K.M.: Leukocyte count: a risk factor for coronary artery bypass graft mortality. *Am J Med*, 2003, 115(8): 660-663.
49. 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.
50. Ernst E., Hammerschmidt D.E., Bagge U.: Leukocytes and the risk of ischemic diseases. *J Am Med Assoc*, 1987, 257: 2318-2324.
51. Iwasaka H., Kitano T., Miyakawa H., Unoshima H., Shinguu Ch., Shigekiyo M., Noguchi T.: Neutrophilia and granulocyte colony-stimulating factor levels after cardiopulmonary bypass. *Canad J of Anesth*. 2001, 48: 81-84.
52. Rinder C.S., Mathew J.P., Rinder H.M., Tracey J.B., Davis E., Smith B.R.: Lymphocyte and monocyte subset changes during cardiopulmonary bypass: effects of aging and gender. *J Lab Clin Med*, 1997, 129(6): 578-9.
53. Kuneš P., Krejsek J.: CD4+ lymfopenie a pooperační imunoprese v kardiokirurgii. *Čas Lék Čes.*, 2000, 139(2): 361-368.
54. Sharma M., Ganguly N.K., Chaturvedi G., Thingnam S. K. S., Majumdar S.: Release of pro-inflammatory mediators during myocardial ischemia/reperfusion in coronary artery bypass graft surgery. *Molec Cell Biochem*, 2003, 247: 23-30.
55. Perttila J., Salo M., Pirttikangas C., Jalonen J., Vainio O.: Effects of cardiopulmonary bypass on lymphocytes and their subset counts with or without use of autotransfusion devices. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 1994, 8(5): 532-535.
56. Lante W., Franke A., Weinhold C., Markewitz A.: Immunoglobulin levels and lymphocyte subsets following cardiac operations: further evidence for a T-helper cell shifting. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2005, 53(1): 16-22.
57. Akbas H., Erdal A.C., Demiralp E., Alp M.: Effects of coronary artery bypass grafting on cellular immunity with or without cardiopulmonary bypass: changes in lymphocyte subsets. *Cardiovasc Surg.*, 2002, 10(6): 586-589.

58. Gasz B., Lenard L., Benko L., Borsiczky B., Szanto Z., Lantos J., Szabados S., Alotti N., Papp L., Roth E.: Expression of CD97 and adhesion molecules on circulating leukocytes in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Eur Surg Res*, 2005, 37(5): 281-289.
59. Diegeler A., Tárnok 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.
60. Asimakopoulos G., Kohn A., Stefanou D.C., Haskard D.O., Landis R.C., Taylor K.M.: Leukocyte integrin expression in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1192-7.
61. Gessler P, Pfenninger J, Pfammatter JP, Carrel T, Dahinden C. Inflammatory response of neutrophil granulocytes and monocytes after cardiopulmonary bypass in pediatric cardiac surgery. *Intensive Care Med* 2002;28:1786-1791.
62. Tanrok A., Bocsi J., Rössler H., Schlykow V., Schneider P., Hamsch J.: Low degree of activation of circulating neutrophils determined by flow cytometry during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Cytometry (Comm Clin Cytometry)* 2001;46:41-49.
63. Sanchez-Margalet V., Cubero J.M., Martin-Romero C., Cubero J., Cruz-Fernandez J.M., Goberna R.: Expression of activation molecules in neutrophils, monocytes and lymphocytes from patients with unstable angina treated with stent implantation. *Clin Chem Labo Med*, 2004, 42(3): 273- 278.
64. Sbrana S., Parri M.S., De Filippis R., Gianetti J., Clerico A.: Monitoring of monocyte functional state after extracorporeal circulation: A flow cytometry study. *Cytometry Part B (Clin Cytometry)* 2004, 58B:17-24.
65. Wittebole X, Coyle SM, Kumer A, Goshima M, Lowry SF, Calvano SE. Expression of tumour necrosis factor receptor and Toll-like receptor 2 and 4 on peripheral blood leucocytes of human volunteers after endotoxin challenge: a comparison of flow cytometric light scatter and immunofluorescence gating. *Clin Exp Immunol* 2005; 141:99-106.
66. 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: 325-332.
67. Stefanou D.C., Asimakopoulos G., Yagnik D.R., Haskard D.O., Anderson J.R., Philippidis P., Landis C., Taylor K.M.: Monocyte Fc gamma receptor expression in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 2004; 77: 951-5.

68. Menasché Ph.: The systemic factor: the comparative roles of cardiopulmonary bypass and off-pump surgery in the genesis of patient injury during and following cardiac surgery. *Ann. Thorac. Surg.*, 2001, 72: 2260-2266.
69. Matata B.M., Sosnowski A.W., Galinanes M.: Off-pump bypass graft operation significantly reduce oxidative stress and inflammation. *Ann. Thorac. Surg.*, 2000, 69: 785-791.
70. Dybdahl B., Wahba A., Haaverstadt R. et al.: On-pump versus off-pump coronary artery bypass grafting: more heat shock protein 70 is released after on-pump surgery. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2004, 25: 985-992.
71. Czerny M., Baumer H., Kilo J. et al.: Inflammatory response and myocardial injury following coronary artery bypass grafting with or without cardiopulmonary bypass. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2000, 17: 737-742.
72. Opal S.M., HUBer Ch.E.: The role of interleukin-10 in critical illness. *Curr. Opin. Infect Dis.*, 2000, 13: 221-226.
73. Giomarelli P., Scolletta S., Borrelli E., Biagioli B.: Myocardial and lung injury after cardiopulmonary bypass: role of interleukin(IL)-10. *Ann. Thorac. Surg.*, 2003, 76: 117-123.
74. Tekeuchi M., Takahashi T., Taga N. et al.: Right ventricle of patients undergoing congenital cardiac surgery differentially expresses haem oxygenase-1 and heat shock proteins 70 genes. *J. Int. Med. Res.*, 2003, 31: 413-417.
75. Ochoa J.J., Vilchez M.J., Mataix J., Ibanez-Quiles S., Palacios M.A., Munoz-Hyos A.: Oxidative stress in patients undergoing cardiac surgery: comparative study of revascularization and valve replacement procedures. *J. Surg. Res.*, 2003, 111: 248-254.
76. Schmitt JP, Schunkert H, Birnbaum DE, Aebert H. Kinetics of heat shock protein synthesis in the human heart after cold cardioplegic arrest. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;22:415-20.
77. Schäfler AE, Kirmanoglou K, Gallmeier U, Pecher P, Hennekum A, Schumacher B. Heat shock protein 60 expression in patients undergoing cardiac operations. *J Cardiovasc Surg* 2003;44:187-90.
78. Kirmanoglou K., Hennekum A., Schäfler A.E.: Expression of mortalin in patients with chronic atrial fibrillation. *Basic Res. Cardiol.*, 2004, 99: 404-408.
79. Latchman D.S.: Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc Res* 2001;51:637-46.
80. Lamb D. .J, El-Sankary W., Ferns G.A.A.: Molecular mimicry in atherosclerosis: a role for heat shock proteins in immunisation. *Atherosclerosis* 2002;167:177-85.
81. Gray C.C., Amrani M., Yacoub M.H.: Heat stress proteins and myocardial protection: experimental model or potential clinical tool? *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:559-73.

82. Benjamin I. J., McMillan D.R.: Stress (heat shock) proteins. Molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1998;83:117-32.
83. Doni A., Mosca M., Bottazzi B., Peri G., Valentino S., Polentarutti N., Garlanda C., Mantovani A.: Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN- $\gamma$ . *J Leuk Biol*, 2006, 79: 797-802.
84. Luchetti M.M, Piccinini G., Mantovani A., Peri G., Matteucci C., Pomponio G., Fratini M., Fraticelli P., Sambo P., Loreto C., Doni A., Introna M., Gabrielli A.: Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol*. 2000, 119(1): 196–202.
85. Latini R., Maggioni A.P., Peri G., Gonzini L., Lucci D., Mocarelli P., Vago L., Pasqualini F., Signorini S., Soldateschi D., Tarli L., Schweiger C., Fresco C., Cecere R., Tognoni G., Mantovani A.: Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;110:2349-54.
86. Peri G., Introna M., Corradi D., Iacuitti G., Signorini S., Avanzini F., Pizzetti F., Maggioni A.P., Moccetti T., Metra M., Cas L.D., Ghezzi P., Sipe J.D., Re G., Olivetti G., Mantovani A., Latini R.: PTX3, a prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation* 2000;102:636-41.
87. He X., Han B., Liu M.: Long pentraxin PTX3 in pulmonary infection and acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 292: 1039-1049.
88. Zweigner J., Schumann R.R., Weber J.R.: The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response. *Microbes Infect* 2006, 8: 946-952.
89. Weiss J. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria. *Biochem Soc Transact* 2003;31(4):785-790.
90. Carroll S.F., Dedrick R., White M.L.: Plasma levels of lipopolysaccharide binding protein (LBP) correlate with outcome in sepsis and other patients. *Shock* 1997, 8:35.
91. Pavcnik-Arnol M., Hojker S., Derganc M.: Lipopolysaccharide-binding protein in critically ill neonates and children with suspected infection: comparison with procalcitonin, interleukin-6, and C-reactive protein. *Intensive Care Med* 2004, 30: 1454-1460.
92. Takeshita S, Nakatani K, Tsujimoto H, Kawamura Y, Kawase H, Sekine I. Increased levels of circulating soluble CD14 in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* 2000;119:376.
93. Ayaslioglu E., Tekeli E., Birengel S.: Significant elevation of serum soluble CD14 levels in patients with brucellosis. *Jpn. J. Infect, Dis.*, 2005, 58: 11-14.



94. Kruger C., Schutt C., Obertacke U., Joka T., Muller F.E., Knoller J., Koller M., Konig W., Schonfeld W.: Serum CD14 levels in polytraumatized and severely burned patients. *Clin Exp Immunol*, 1991, 85: 297.
95. Lequier L.L., Nikaidoh H., Leonard S.R., Bokovoy J.L., White M.L., Scannon P.J., Giroir B.P.: Preoperative and Postoperative Endotoxemia in Children With Congenital Heart Disease. *Chest*, 2000, 117:1706-1712.

## PUBLIKACE UCHAZEČKY

### Původní vědecké práce přímo se vztahující k tématu dizertační práce

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

**KUDLOVÁ M.**, KOLÁČKOVÁ M., KUNEŠ P., LONSKÝ P., MANDĀK J., ANDRÝS C., KREJSEK J.: Expression of an activated form of integrin  $\beta_2$  chain CD18 in cardiac surgical operations. Acta Medica (Hradec Králové) 2007, 50(3): 187-193.

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

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

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

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

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

### Další práce ve vědeckých časopisech

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

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

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

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

### Abstrakta

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **Přednášky**

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

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

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

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

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

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

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

## **PŘÍLOHY**

# Kardiologické operace a jejich vliv na sérovou hladinu protizánětového cytokinu interleukinu-10

Kudlová M., Koláčková M., <sup>1</sup>Kuneš P., Andrys C., Jankovičová K., <sup>1</sup>Mandák J., <sup>1</sup>Lonský V., Krejsek J.

Ústav klinické imunologie a alergologie LF UK, Hradec Králové  
<sup>1</sup>Kardiologická klinika LF UK a FN, Hradec Králové

## ABSTRAKT

**Východisko.** Kardiologická operace vyvolává zánětovou odpověď, která zahrnuje regulační mechanismy omezující potenciálně poškozující složky zánětu. Jedním z důležitých regulačních mechanismů je tvorba protizánětových cytokinů, např. IL-10.

**Metody a výsledky.** Porovnali jsme sérové hladiny cytokinů IL-10, IL-6 a IL-13 u nemocných podstupujících kardiologickou operaci s použitím kardiopulmonálního bypasu (CPB, n=17 osob) nebo operovaných na bijícím srdci (n=17 osob). Podařilo se nám prokázat významně zvýšenou tvorbu protizánětového cytokinu IL-10 již v průběhu operace s vrcholem bezprostředně po operaci u kardiologických nemocných operovaných s použitím CPB. U nemocných operovaných na tepajícím srdci jsou změny sérových hladin IL-10 významně vyšší po operaci s vrcholem v první pooperační den. Bezprostředně po operaci je hladina IL-10 u nemocných s CPB řádově vyšší v porovnání s nemocnými bez CPB. U nemocných operovaných s použitím i bez použití CPB dochází k významnému zvýšení tvorby pluripotentního prozánětového cytokinu IL-6 s vrcholy po operaci s použitím CPB, respektive první pooperační den v případě operace bez CPB. Sérové hladiny cytokinu IL-13, který je zapojen do regulací aktivit subsetu TH2, jsou na hranici detekovatelnosti, nevykazují časovou závislost a neodlišují se mezi nemocnými operovanými s použitím a bez použití CPB.

**Závěry.** Operace s použitím CPB, při kterých dochází k masivní kontaktní aktivaci humorálních i buněčných složek krve a k výrazným ischemicko-reperfučním dějům v tkáních, stimuluje tvorbu IL-10 s protizánětovým působením.

**Klíčová slova:** kardiologická operace, zánět, interleukin-10, interleukin-6, interleukin-13.

## ABSTRACT

*Kudlová M., Koláčková M., Kuneš P., Andrys C., Jankovičová K., Mandák J., Lonský V., Krejsek J.: Cardiac Surgery Operations and Their Influence on Serum Level of Antiinflammatory Cytokine Interleukin-10*

**Background.** Cardiac surgical operation is followed by the development of inflammatory reaction. This reaction is regulated in many ways including the production of antiinflammatory cytokines such as IL-10 to avoid potentially harmful effects of inflammation.

**Methods and Results.** We compared serum levels of cytokines IL-10, IL-6, and IL-13 in the group of patients undergoing cardiac surgical operation using either cardiopulmonary bypass (CPB, n=17) or surged on the beating heart (n=17). We found significant elevation in the serum level of IL-10 during surgery with the peak immediately after finishing surgery in CPB patients and at the first postoperative day in non-CPB patients, respectively. There is statistically significantly higher level of IL-10 in CPB patients in comparison with non-CPB patients at the end of surgery. Serum level of IL-6 is elevated in both groups during surgery reaching maximum immediately after surgery in CPB patients and at the first postoperative day in patients without CPB, respectively. The serum levels of IL-13 are only nonsignificantly changed during operation and in postoperative period in both groups.

**Conclusions.** The intensity of inflammatory response in CPB patients which is enhanced by massive contact activation of blood and extensive ischemia-reperfusion injury is regulated by the production of antiinflammatory IL-10 cytokine.

**Key words:** cardiac surgery, inflammation, interleukin-10, interleukin-6, interleukin-13.

*Ku.*

*Čas. Lék. čes., 2007, 146, pp. 48-55.*

Přes prudký rozvoj invazivní kardiologie zůstává pro mnohé pacienty s onemocněním srdce jediným řešením kardiokirurgická operace. Jakákoliv kardiokirurgická operace je mimořádně náročným výkonem, který s sebou přináší i určitá rizika. Představuje totiž závažné narušení tělní integrity, které se promítne do deregulace homeostázy. Reakcí na kardiokirurgickou operaci je komplexní zánětová odpověď, ve které imunitní systém sehrává nejvýznamnější úlohu. Rozvoj zánětové reakce u kardiokirurgických nemocných má zajistit obranu před infekčním agens endogenního i exogenního původu, podílet se na eliminaci poškozených vlastních struktur a v neposlední řadě se zúčastnit i procesu hojení a reparace tkání. Zánětová reakce provázející kardiokirurgickou operaci nemá u většiny nemocných bezprostřední ani dlouhodobé účinky na zdraví pacientů. Stále však zůstává malá část kardiokirurgických nemocných, u kterých dojde k deregulaci zánětové reakce v takové míře, že subklinická forma SIRS přechází v následnou orgánovou dysfunkci (MODS) a často i ke smrti (MOFS) (1). S cílem zabránit takovým nežádoucím situacím jsou dlouhodobě hledány optimální operační postupy a je optimalizována podpora nemocných v průběhu operace i pooperačním období. V posledních letech je mimořádná pozornost věnována zvláště fyziologii a patofyziologii zánětové reakce (2, 3). Právě v této oblasti jsou očekávána zásadní řešení (4).

Tradiční kardiokirurgický přístup je představován operací na srdci, které bylo vyřazeno z činnosti. Jeho funkce přebírá podpůrné zařízení, které zajišťuje cirkulaci krve v mimotělním oběhu a její okysličení v oxygenátoru. Nyní jsou zaváděny postupy, kdy se kardiokirurgické výkony provádějí na tepajícím srdci, které s minimálními omezeními vykonává své fyziologické funkce (5). Tento přístup nevyžaduje použití kardiopulmonárního bypassu (CPB). Uvedené rozdílné přístupy mají zásadní dopad na rozvoj zánětové odpovědi. Lze určit prozánětové podněty, které oba přístupy nepochybně sdílejí, například podněty spojené s vlastním incisivním výkonem. V jiných se zásadně odlišují. Při použití CPB dochází k masivní aktivaci humorálních i buněčných složek imunitního systému kontaktem s umělými povrchy oxygenátoru a systému tubic, kterým je krev vedena (6). Proudění krve je nejčastěji nepulzatilní. Důsledkem je částečná ischemie orgánů, která se nejvýznamněji projevuje v trávicím traktu, kde jsou negativně ovlivněny slizniční bariéry. U nemocných operovaných s použitím CPB může docházet na přechodnou dobu k prostupu biologicky aktivních látek mikrobiálního původu přes slizniční bariéry střeva. Systémová expozice mikrobiálním substancím, mezi kterými jsou i bakteriální lipopolysacharidy s mimořádnou potencií stimulovat zánětovou reakci, přispívá k aktivaci zánětu. Reperfuze orgánů po odstranění svorky z aorty u nemocných operovaných za použití CPB a v menší míře i po ukončení operace nemocných operovaných na bijícím srdci, vystavuje orgány, zejména srdce a plíce, reperfučnímu poškození. Součástí ischemicko-reperfučních procesů je těžký oxidativní stres, vedoucí k modifikaci vlastních struktur včetně tvorby stresových proteinů (7).

Lze shrnout, že imunitní systém nemocného podstupujícího kardiokirurgickou operaci je vystaven mimořádnému spektru nebezpečných látek antigenního charakteru exogenního i endogenního původu, které stimulují přirozenou imunitu prostřednictvím receptorů pro nebezpečné vzory,

respektive buňky specifické imunity prostřednictvím receptorů pro antigen. Intenzita aktivačních podnětů je tak vysoká, že rozvíjející se zánětová reakce musí být negativně regulována, aby nepřevládaly poškozující složky zánětu (8). Mezi mnohými regulačními prvky, které modulují zánětovou reakci, u osob podstupujících kardiokirurgickou operaci, má své podstatné místo tvorba cytokinů s obecně protizánětovými účinky.

V naší studii jsme se zaměřili na sledování dynamiky cytokinu interleukinu 10 (IL-10), který je považován za klíčový regulační cytokin, interleukinu 13 (IL-13), který sehrává významnou roli v rozvoji aktivity subsetu TH2 T-lymfocytů, a prozánětového cytokinu IL-6 u reprezentativního souboru nemocných operovaných na srdci s použitím nebo bez použití CPB. Prokázali jsme, že u nemocných operovaných s použitím CPB, kteří jsou ve zvýšené míře vystaveni rozvoji poškozující zánětové reakce, dochází k významnému zvýšení tvorby IL-10 bezprostředně po operaci.

## SOUBOR NEMOCNÝCH A POUŽITÉ METODY

Bylo sledováno 34 nemocných (26 mužů a 8 žen), kterým byl poprvé proveden aortokoronární bypass. Studie byla schválena etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Podmínkou zařazení do studie byl informovaný souhlas každého účastníka. Nemocní prodělali buď konvenční myokardiální revaskularizaci s použitím kardiopulmonárního bypassu ( $n=17$ , průměrný věk:  $70,53 \pm 7,05$  let), nebo byli operováni na tepajícím srdci ( $n=17$ , průměrný věk:  $66,41 \pm 10,12$  let). Skupiny nemocných se od sebe významně nelišily věkem, pohlavím ani počtem anastomóz. Operační postupy a postupy vedení kardiopulmonálního bypassu byly obdobné pro všechny pacienty. Pooperační péče pro pacienty byla zajišťována na jednotce intenzivní péče kardiokirurgické kliniky, ze které byli v závislosti na zdravotním stavu překládáni na standardní oddělení.

Hladiny interleukinu-10, interleukinu-6 a interleukinu-13 byly stanoveny ve vzorcích séra, které byly získány z žilní krve. Žilní krev byla odebrána do odběrových zkumavek firmy Saarstedt, SRN. Po koagulaci a centrifugaci bylo sérum rozděleno do alikvotů. Vzorky byly skladovány při  $-40$  °C. Byly zmrazeny a rozmrazeny pouze jednou. Hladina cytokinů byla stanovena pomocí souprav ELISA firmy R&D Systems (USA).

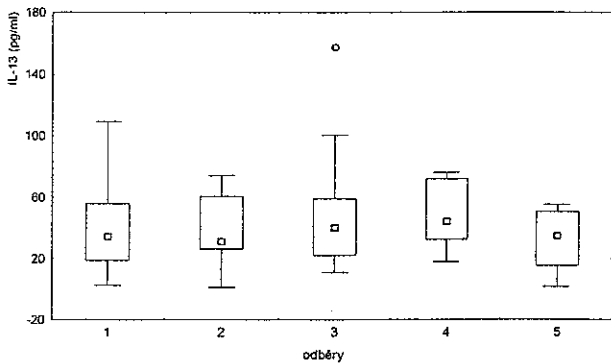
Vzorky žilní krve byly odebrány u nemocných operovaných s použitím mimotělního oběhu při úvodu do anestezie (vzorek 1), po naložení svorky na aortu (vzorek 1a), po sejmutí svorky z aorty (vzorek 1b), po ukončení mimotělního oběhu (vzorek 1c), po ukončení operace (vzorek 2), první pooperační den (vzorek 3), třetí pooperační den (vzorek 4) a sedmý pooperační den (vzorek 5). U nemocných, kteří byli operováni na tepajícím srdci, byl proveden odběr vzorku při úvodu do anestezie (vzorek 1), po ukončení operace (vzorek 2), první pooperační den (vzorek 3), třetí den po operaci (vzorek 4) a sedmý den po operaci (vzorek 5). Stanovení všech cytokinů bylo provedeno ve vzorcích odebraných při úvodu do anestezie, po ukončení operace, první, třetí a sedmý pooperační den. V případě IL-6 a IL-10 byly u nemocných operovaných za použití CPB vyšetřeny i vzorky odebrané při naložení svorky na aortu, sejmutí svorky z aorty, ukončení mimotělního oběhu a ukončení operace.

Výsledky jsou v krabicových grafech vyjádřeny jako medián a kvartily. Rozsah dosažených hodnot bez odlehlých a extrémních hodnot je vyznačen vertikální čarou. Naměřené koncentrace pro

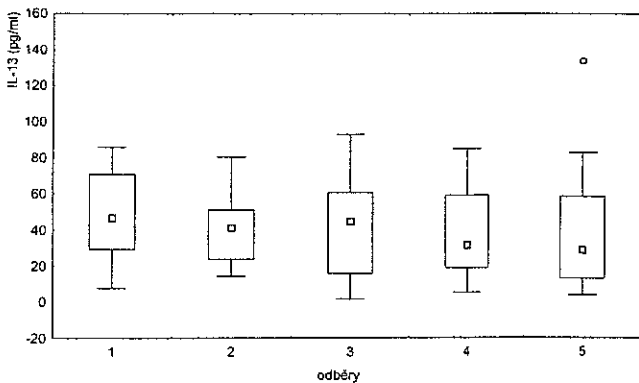
jednotlivé parametry byly vyhodnoceny neparametrickým Friedmanovým testem. Pro mnohonásobná porovnání byl použit Wilcoxonův párový test, přičemž dosažené hodnoty pravděpodobnosti byly upraveny Bonferonniho korekcí. Skupiny pacientů operovaných s použitím CPB a bez použití CPB byly porovnány neparametrickým Mann-Whitney testem s Bonferonniho korekcí. Všechny testy byly prováděny při  $\alpha=0,05$ . Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí statistického softwaru Statistica 5.5 (StatSoft, USA).

### VÝSLEDKY

Výsledky stanovení hladiny IL-13 u nemocných operovaných bez CPB jsou uvedeny v grafu 1. Koncentrace IL-13 se pohybovala v celém sledovaném období mezi 1,2 až 157,4 pg/ml. Nejistili jsme statisticky významné změny v koncentraci IL-13 v porovnání s předoperační hladinou.



**Graf 1.** Změny koncentrace IL-13 v séru pacientů bez CPB  
Friedman ANOVA Chi. Sqr. (N=11, df=4) = 3,798165,  $p<0,43402$

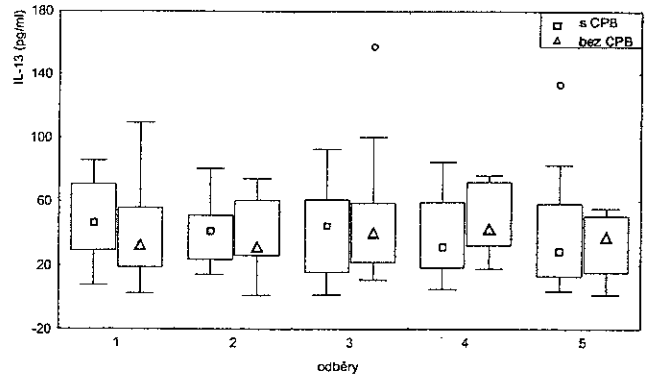


**Graf 2.** Změny koncentrace IL-13 v séru pacientů s CPB  
Friedman ANOVA Chi. Sqr. (N=10, df=4) = 3,075377,  $p<0,54530$

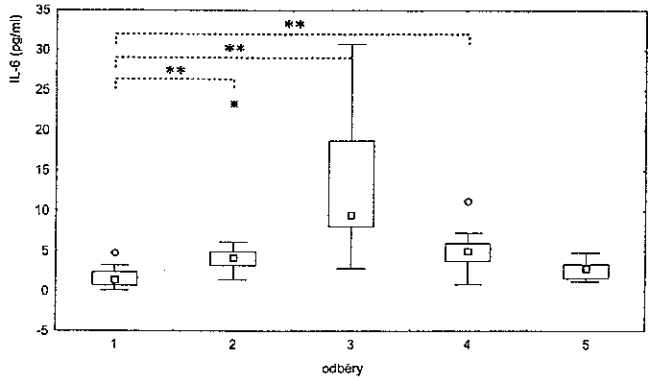
Koncentrace IL-13 v séru nemocných operovaných s použitím CPB jsou znázorněny v grafu 2. V průběhu operace nedocházelo k statisticky signifikantním změnám v porovnání s předoperační hladinou. Hladina IL-13 byla u nemocných operovaných s použitím CPB v rozmezí mezi 1,6 až 133,6 pg/ml. Porovnali jsme hladiny IL-13 v séru nemocných operovaných s použitím CPB a bez použití CPB (graf 3). Nejistili jsme signifikantní rozdíly v koncentraci IL-13

mezi nemocnými operovanými s použitím CPB a bez použití CPB v žádném odběru.

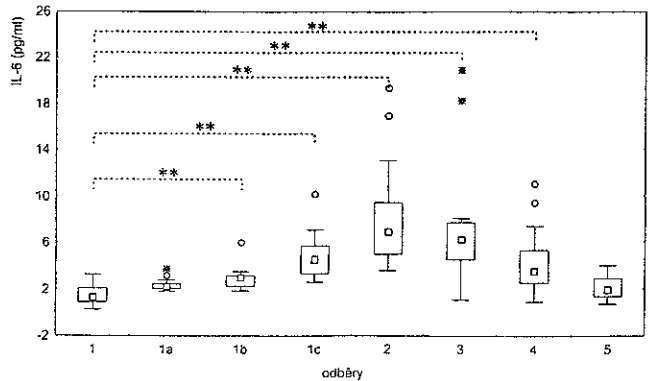
Změny koncentrace IL-6 v séru nemocných operovaných bez použití CPB jsou vyjádřeny v grafu 4. Koncentrace IL-6 se pohybuje od 0,4 do 30,8 pg/ml. Sérová hladina IL-6 má výraznou dynamiku v průběhu operace, ke statisticky významnému zvýšení dochází již bezprostředně po ukončení operace, hladina je ještě zvýšena první pooperační den. Třetí pooperační den dochází ke snížení hladiny IL-6, ale stále je statisticky významně vyšší, než je koncentrace IL-6 před operací.



**Graf 3.** Porovnání sérových koncentrací IL-13 mezi pacienty operovanými s CPB a bez CPB

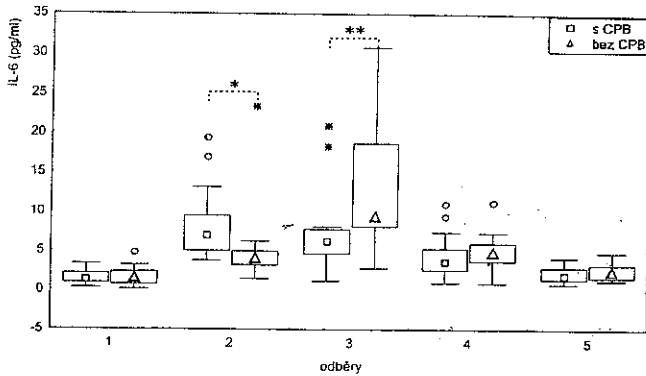


**Graf 4.** Změny koncentrace IL-6 v séru pacientů bez CPB  
Friedman ANOVA Chi. Sqr. (N=17, df=4) = 46,77647,  $p<0,00000$

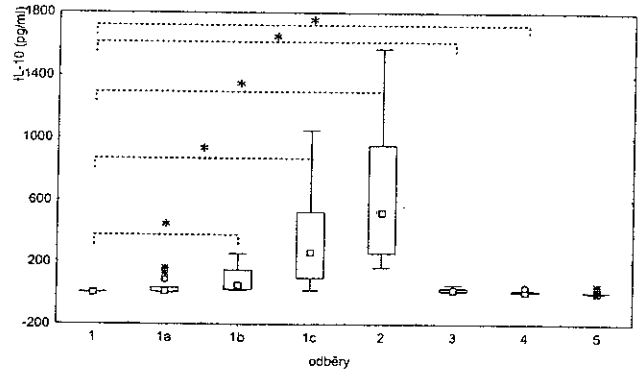


**Graf 5.** Změny koncentrace IL-6 v séru pacientů s CPB  
Friedman ANOVA Chi. Sqr. (N=13, df=7) = 63,61538,  $p<0,00000$

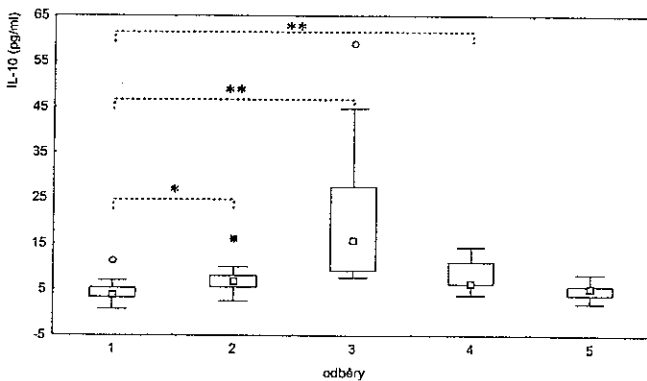




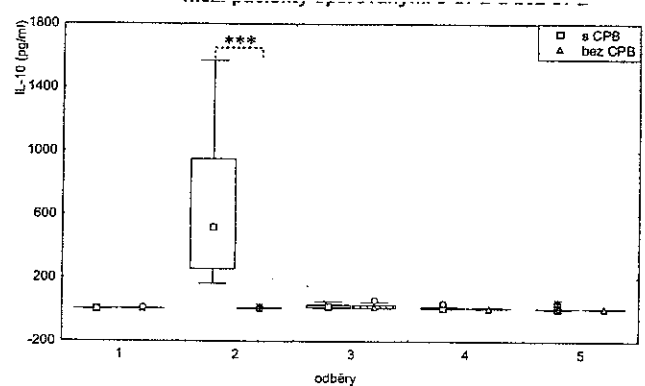
**Graf 6.** Porovnání sérových koncentrací IL-6 mezi pacienty operovanými s CPB a bez CPB



**Graf 8.** Změny koncentrace IL-10 v séru pacientů s CPB  
Friedman ANOVA Chi. Sqr. (N=10, df=7) = 57,66667, p<0,00000



**Graf 7.** Změny koncentrace IL-10 v séru pacientů bez CPB  
Friedman ANOVA Chi. Sqr. (N=15, df=4) = 36, 53512, p<0,00000



**Graf 9.** Porovnání sérových koncentrací IL-10 mezi pacienty operovanými s CPB a bez CPB

Sérová hladina IL-6 v průběhu operace u nemocných operovaných s použitím CPB je vyjádřena v grafu 5. Sérové hladiny IL-6 se pohybují zhruba mezi 0,3–20,9 pg/ml. V případě nemocných operovaných s použitím CPB byly vzorky odebírány také v průběhu operace – při naložení svorky na aortu (vzorek 1a), sejmutí aortální svorky (vzorek 1b) a ukončení mimotělního oběhu (vzorek 1c). Prokázali jsme zvýšení hladiny IL-6 již po odstranění aortální svorky v porovnání s předoperační hladinou. K dalšímu statisticky významnému zvýšení došlo po ukončení mimotělního oběhu a vrcholu bylo dosaženo bezprostředně po ukončení operace. Statisticky významné zvýšení hladiny IL-6 přetrvává ještě první a třetí pooperační den.

Porovnali jsme sérové koncentrace IL-6 u nemocných operovaných s použitím CPB a bez použití CPB. Výsledky jsou vyjádřeny v grafu 6. Prokázali jsme statisticky významné zvýšení hladiny IL-6 po ukončení operace u nemocných operovaných s použitím CPB. Mimořádně zajímavý je náš nálezný, který ukazuje, že v prvním pooperačním dnu je statisticky významně vyšší hladina IL-6 prokazatelná naopak u nemocných operovaných bez použití CPB. V ostatních sledovaných obdobích nejsou statisticky významné rozdíly v sérové hladině IL-6 mezi nemocnými operovanými s použitím a bez použití CPB.

Změny sérové koncentrace IL-10 u nemocných operovaných bez použití CPB jsou uvedeny v grafu 7. Rozsah hodnot se pohybuje od 0,7–58,9 pg/ml. Prokázali jsme statisticky

významné zvýšení hladiny IL-10 v porovnání s předoperační hladinou již po ukončení operace. Vrcholu hladiny IL-10 u těchto nemocných bylo dosaženo první pooperační den. Statisticky významně zvýšená hladina IL-10 přetrvává ještě třetí pooperační den.

Změny v koncentraci IL-10 v séru nemocných operovaných s použitím mimotělního oběhu jsou uvedeny v grafu 8. Sérové hladiny dosahují od 0,5 do 1570,6 pg/ml. Ke statisticky významnému zvýšení hladiny IL-10 dochází již po sejmutí aortální svorky. Sérová koncentrace se dále zvyšuje a je statisticky významně odlišná od předoperační úrovně ve vzorcích odebraných po ukončení mimotělního oběhu a po ukončení operace. Zvýšení hladin v porovnání s předoperační hladinou přetrvává až do prvního a třetího pooperačního dne. Sedmý den po operaci jsme již nezjistili statisticky významné rozdíly v hladině IL-10 v porovnání s předoperační koncentrací. Je třeba zdůraznit, že koncentrace IL-10 u nemocných operovaných s použitím CPB byly v některých intervalech až řádově vyšší v porovnání s nemocnými operovanými bez použití CPB. Porovnání sérových koncentrací IL-10 mezi nemocnými operovanými s použitím a bez použití CPB jsou vyjádřena na grafu 9. Zde je statisticky významně zvýšená hladina IL-10 (p<0,001) nalezena bezprostředně po ukončení operace. V jiných odběrových intervalech jsme nezjistili rozdíl mezi nemocnými operovanými s použitím a bez použití CPB.

## DISKUZE

Kardiologická operace představuje vážný zásah do tělní integrity, který má za následek vznik rozmanitých podnětů, tzv. nebezpečných vzorů. Na jejich přítomnost tělo reaguje zánětovou reakcí, ve které významné postavení zaujímá imunitní soustava. Přítomnost nebezpečných vzorů je mimo jiné důsledkem kombinace operačního traumatu, mechanické manipulace se srdcem, kontaktní aktivace buněčných i humorálních složek krve s umělým povrchem přístrojů, ischemicko-reperfučních dějů a přechodnou endotoxemií. Prospěšné účinky každé zánětové reakce jsou neoddělitelně spojeny s poškozujícími prvky (9). Fyziologická zánětová reakce (SIRS) se u nemocných operovaných na srdci může změnit na poškozující patofyziologické reakce MODS a MOFS. Kvalitativní a kvantitativní parametry i dynamika zánětové reakce musí být proto účinně regulovány. Jedním z regulačních prvků, které modulují zánětovou reakci, je tvorba protizánětových cytokinů, např. IL-10 (10).

IL-10 je multifunkční cytokin s převládajícími protizánětovými účinky, který je zásadním způsobem zapojen do regulací lokální a systémové zánětové reakce. Regulačně zasahuje do funkcí přirozené i specifické imunity. Stanovení hladiny IL-10 v krvi nebo v tělních tekutinách může přispět ke zhodnocení stavu imunitní kompetence jednotlivých nemocných (10). S ohledem na klíčové postavení IL-10 v regulaci zánětové odpovědi nepřekvapí, že je produkován takřka ubikvitárně většinou buněčných typů těla po působení rozmanitých podnětů. Buňky imunitního systému přispívají k celkové produkci IL-10 zásadní měrou. Původně byla významná úloha v produkci IL-10 přisuzována CD4+T-lymfocytům TH2. Nyní je experimentálně doloženo, že IL-10 je spolu s transformujícím růstovým faktorem beta hlavní dvojicí cytokinů produkovaných regulačním subsetem Tr1 T-lymfocytů (11). Dalšími zdroji jsou monocyty, makrofágy, neutrofilní granulocyty, CD8+T-lymfocyty i B-lymfocyty. IL-10 působí prostřednictvím vysokoafinního receptoru, který je ubikvitárně vyjádřen na buňkách imunitního systému i na buňkách většiny dalších tkání. Vazba IL-10 na řetězec R1 a R2 receptorů ústí ve vytvoření funkčního komplexu, kterým je aktivována signální dráha JAK/STAT. IL-10 inhibuje řadu funkčně významných molekul, např. cytoplazmatické tyrozinové kinázy a transkripční faktory včetně NFκB (12). Výsledkem je funkční deaktivace monocyto-makrofágových buněk a neutrofilů v rámci přirozené imunity. V rámci specifické imunity IL-10 tlumí aktivitu subsetu TH1 T-lymfocytů, které regulují potencionálně zatěžující cytotoxickou imunitní odpověď. Naopak, stimuluje B-lymfocyty k růstu, diferenciaci v plazmatické buňky a k tvorbě imunoglobulinů. Lze stručně shrnout, že IL-10 tlumí buňkami zprostředkovanou odpověď přirozené i specifické imunity a stimuluje rozvoj protilátkové odpovědi.

Zcela zásadní úlohu v rozvoji zánětové reakce u nemocných s kardiologickou operací sehrávají buňky monocyto-makrofágové linie. Ty nejefektivněji identifikují signály nebezpečí prostřednictvím dozorových receptorů a reagují na ně mimo jiné tvorbou pluripotentních prozánětových cytokinů. V mnoha experimentech i v klinických studiích je popsáno zvýšení krevní hladiny pluripotentních prozánětových cytokinů, především TNFα, IL-1β, IL-6, ke kterému dochází již v průběhu operace s dosažením maxima obvykle

první den po provedené operaci (13). Důsledky působení pluripotentních prozánětových cytokinů jsou velmi rozmanité. Stimulují kostní dřeň ke zvýšené produkci myeloidních elementů, aktivují endotelové buňky a leukocyty ke změně z antiadhezního do proadhezního fenotypu a indukují v nich tvorbu cytokinů. Stimulují produkci prozánětových působků tvořených z kyseliny arachidonové. Zesílením aktivity oxidázového systému a iNOS zvyšují hladinu reaktivních produktů kyslíkového a dusíkového metabolismu. Jsou odpovědné za uvolnění biologicky aktivních působků (např. elastázy) z neutrofilních granulocytů. Modulují funkci buněk prezentujících antigen, a tak ovlivňují specifickou imunitní odpověď (14).

IL-10 tlumí v monocyto-makrofágových buňkách produkci prozánětových cytokinů TNFα, IL-1β a zesiluje tvorbu solubilních forem TNFαR a přirozeného inhibitoru IL-1-Ra, které neutralizují biologické účinky prozánětových cytokinů. IL-10 tlumí tvorbu kyslíkových radikálů, oxidu dusnatého a prostaglandinů v monocyto-makrofágových buňkách. Snížením exprese molekul HLA II. třídy a kostimulačních molekul CD80 a CD86 negativně regulují prezentaci antigenu T-lymfocytům. Podobný účinek na specifickou imunitu má v důsledku i snížení tvorby IL-12 a IL-18 buňkami monocyto-makrofágové linie. Zásahem do tvorby chemokinů, např. IL-8, MIP-1α, MCP, omezuje IL-10 migrační aktivitu leukocytů. IL-10 brání tvorbě prozánětových cytokinů i v neutrofilních granulocytech. V nich dále tlumí funkci NADPH oxidázy a proces degranulace. Zásahem do tvorby G-CSF a GM-CSF omezuje přežívání granulocytů a jejich diferenciaci.

V rámci specifické imunity je zřejmě nejvýznamnějším omezením produkce INFγ TH1 T-lymfocyty a NK buňkami. Tím je indukován přesmyk k protilátkové imunitě s omezením cytotoxického působení TH1 T-lymfocytů. IL-10 se uplatňuje i v indukci T-lymfocytární anergie indukované antigenem (přehledně viz 11).

V průběhu kardiologické operace je masivně aktivován koagulační a fibrinolytický systém krve, zvláště při použití CPB kontaktem složek krve s umělými povrchy přístrojů. Produkty krevní koagulace a fibrinolýzy aktivují endotelovou výstelku. Vzniklý trombin, ale i faktor FIXa mají schopnost regulovat chemotaxi monocytů a neutrofilů. Samotné endotelové buňky zvyšují expresi adhezních molekul a tvoří prozánětové cytokiny (15). Trombin zvyšuje expresi adhezních molekul P-selektinu na endotelových buňkách. To umožní účinnou adhezenci neutrofilních granulocytů, které po aktivaci uvolňují působky poškozující endotelie. Prostřednictvím trombinu může docházet i k aktivaci a degranulaci žírných buněk se všemi fyziologickými i patofyziologickými důsledky. Tvorba tkáňového faktoru, který je odpovědný za aktivaci vnější cesty krevní koagulace, je v mononukleárních buňkách tlumena účinky IL-10 (14).

V naší studii jsme prokázali zcela odlišnou dynamiku sérové hladiny IL-10 u kardiologických nemocných operovaných s použitím CPB nebo operovaných na tepajícím srdci. Zatímco u nemocných operovaných bez použití CPB dosáhla sérová hladina IL-10 maxima v první pooperační den, u nemocných operovaných s použitím CPB jsme našli signifikantně zvýšenou maximální hladinu IL-10 bezprostředně po operaci. Také jsme našli statisticky signifikantně zvýšenou hladinu IL-10 pouze bezprostředně po

ukončení operace u nemocných s použitím CPB v porovnání s nemocnými bez použití CPB ( $p < 0,001$ ). V ostatních intervalech se hladiny IL-10 mezi skupinami významně nelišily. K nárůstu IL-10 docházelo u nemocných s CPB již v průběhu operace a bezprostředně po operaci byly řádově vyšší než u nemocných operovaných bez CPB. V dalších pooperačních dnech jsme viděli rychlý návrat k výchozím hodnotám.

Naše výsledky se částečně odlišují od jiných autorů. Volk et al. (16) popisují nárůst sérové hladiny IL-10 po jednu hodinu trvajícím CPB s maximem dosaženým 60 minut po odstranění aortální svorky. Následoval prudký pokles k téměř k předoperačním hodnotám čtyři hodiny po odstranění svorky a 24 hodin po ukončení operace. U našich nemocných je dynamika obdobná s určitým zpožděním. Maximální hladiny IL-6 bylo v této studii dosaženo 4 hodiny po odstranění aortální svorky. To zhruba odpovídá našim nálezům. Přes mnohokrát v přehledech citované údaje, že po kardiokirurgické operaci dochází pravidelně ke zvýšení sérové hladiny IL-10 (1, 17), existují i rozporné nálezy. Například Giomarelli et al. (18) nezaznamenali u nemocných operovaných s mimotělním oběhem nárůst hladin IL-10 první a čtvrtý den po operaci. Zvýšení zaznamenali pouze u nemocných, kterým byl před operací aplikován metylprednisolon. Naše výsledky odpovídají nálezům, které publikovali jiní (19), a podobné práci Czerneho et al. (20), kteří popsali významně vyšší tvorbu IL-10 bezprostředně po operaci u nemocných operovaných s použitím CPB. Zároveň zjistili i vysokou přítomnost IL-10 i u nemocných bez použití CPB.

Rozdíly v hladinách IL-10 mezi kardiokirurgickými nemocnými operovanými s a bez použití CPB lze pouze obtížně interpretovat. Dynamika zánětové odpovědi určená stanovením prozánětových cytokinů je velmi obdobná. Rychlejší a vyšší tvorbou IL-10 musí imunitní systém nemocných operovaných s CPB zřejmě reagovat na kontaktní aktivaci leukocytů, především neutrofilních granulocytů umělými povrchy CPB přístrojů. Přesměrování podstatného objemu krve mimo tělo u nemocných CPB může simulovat i rozsáhlejší hemoragické poškození. V experimentu na zvířatech dochází v reakci na toto poškození ke zvýšení tvorby IL-10 (21).

Rozporná je i udávaná dynamika sérové hladiny IL-10 v porovnání s dynamikou tvorby pluripotentních prozánětových cytokinů (např. TNF $\alpha$ , IL-6) a chemokinů (např. IL-8). Podle již citované práce Volka (16) dochází k nárůstům sérové koncentrace IL-6, IL-8 a TNF $\alpha$  na konci operace s vrcholem 6 hodin po operaci. V případě IL-6 dochází k poklesu až normalizaci do 5. dne po operaci. Naopak, hladiny IL-8 a TNF $\alpha$  přetrvávají zvýšené v celém sledovaném období. Giomarelli et al. (18) zaznamenali postupný nárůst hladiny IL-6, IL-8 a TNF $\alpha$  již od 10. minuty po ukončení CPB. My jsme zaznamenali vrchol tvorby IL-6 u nemocných s CPB okamžitě po ukončení operace a u nemocných operovaných bez CPB v první pooperační den. Franke et al. (13) našli vrcholy v hladině pro TNF $\alpha$ , IL-6 a IL-10 shodně v první pooperační den. Lze s jistými omezeními shrnout, že dynamika tvorby IL-10 u nemocných operovaných s CPB zhruba kopíruje dynamiku tvorby prozánětových cytokinů, nebo jejich produkci spíše předchází.

Dlouhodobě a zatím bez jednoznačných závěrů je vedena diskuze, zda provádění kardiokirurgické operace na tepajícím

srdci bez použití CPB snižuje riziko rozvoje SIRS a zlepšuje prognózu nemocných (22). V diskuzi se promítají jak ekonomické aspekty, neboť operace s použitím CPB je nákladnější, tak charakteristiky operátora, protože nároky na zručnost operátora jsou naopak větší u operací na tepajícím srdci. Z pohledu rozvoje zánětové reakce převládá názor, že operace na tepajícím srdci vede k menší systémové zánětové odpovědi (23, 24). Dva z důvodů pro tuto skutečnost jsou zřejmé. První je absence kontaktní aktivace humorálních a buněčných složek krve na umělém povrchu přístrojů zajišťujících CPB. Druhý je nepochybně nižší ischemicko-reperfuční poškození u nemocných operovaných na bijícím srdci. Zatímco důsledky kontaktní aktivace krve jsou dokumentovány například významně nižší sérovou hladinou elastázy, či produktů aktivace komplementu C5a a C3a u nemocných operovaných bez CPB (23), situace v tvorbě cytokinů je v mnohém kontroverzní. Například Franke et al. (23) nenašli významný rozdíl ani v dynamice, ani v kvantitě IL-6, IL-8 a TNF $\alpha$  mezi nemocnými operovanými s použitím nebo bez použití CPB. Jiní našli významně vyšší hladinu chemokinů IL-8 s prozánětovým a chemotaktickým působením u nemocných operovaných s použitím CPB. V naší studii jsme našli významný rozdíl v tvorbě IL-6 mezi nemocnými operovanými s použitím CPB a nemocnými operovanými na tepajícím srdci bezprostředně po operaci a v první pooperační den. Dynamika tvorby IL-6 byla mezi těmito skupinami v naší studii odlišná. U nemocných s CPB bylo dosaženo vrcholu již okamžitě po ukončení operace. U nemocných bez CPB byla nejvyšší koncentrace prokázána první pooperační den a v absolutní hodnotě byla překvapivě vyšší. Naše výsledky jsou částečně v souladu s nálezy dalších autorů (6, 25, 26). Za originální nález lze považovat skutečnost, že bezprostředně po operaci je hladina IL-6 významně vyšší u nemocných operovaných s použitím CPB v porovnání s pacienty operovanými bez použití CPB. V dalším období dochází k úplnému přesmyku a v první pooperační den je hladina IL-6 signifikantně vyšší u nemocných operovaných bez použití CPB. I tento nález implikuje, že rozdílný kardiokirurgický přístup vede k zásadně jinému průběhu zánětové reakce.

Ještě před nedávnou dobou byl IL-10 spolu s IL-4, IL-5 a IL-13 řazen do skupiny cytokinů tvořených imunoregulačním subsetem TH2 T-lymfocytů. TH2 T-lymfocyty regulují fyziologicky tvorbu protilátek, proliferaci a diferenciaci eozinofilních leukocytů (27). Patofyziologicky se, především u nemocných s alergií zprostředkovanou protilátkami IgE, podílejí na syntéze IgE protilátek specifických pro alergeny, iniciaci a rozvoji alergického zánětu (28). Účast IL-13 na vývoji subsetu TH2 T-lymfocytů po antigenní stimulaci je relativně slabá (29). Relevantní pro podíl IL-13 na rozvoji zánětové reakce po kardiokirurgické operaci je zřejmě skutečnost, že výrazným zdrojem IL-13 jsou žírné buňky, lokalizované ve sliznici plic, střeva i v pojivové tkáni. Během kardiokirurgické operace jsou mastocyty masivně stimulovány a uvolňují vysoce potentní mediátory, které modulují průběh zánětové reakce, často s negativními dopady na nemocného. Opět lze očekávat, že k výraznější aktivaci mastocytů bude docházet u nemocných operovaných s použitím CPB. Ve studii jsme ověřili dynamiku hladiny IL-13 u kardiokirurgických nemocných operovaných s použitím nebo bez použití CPB. V průběhu operace i ve sledovaném

sedmidenním pooperačním období jsme zaznamenali minimální, statisticky nevýznamné změny sérové hladiny IL-13. Nenalezli jsme ani žádné rozdíly v sérových hladinách IL-13 mezi nemocnými operovanými s použitím a bez použití CPB. Přítomnosti IL-13 u nemocných podstupujících kardiokirurgickou operaci je dosud věnována minimální pozornost. Nalezli jsme pouze jednu původní práci, ve které autoři rovněž konstatují pouze minimální odpověď v hladině IL-13 po kardiokirurgické operaci (30). Z našich výsledků lze implikovat, že IL-13 pravděpodobně nesehrává významnější úlohu v průběhu kardiokirurgické operace. Dále z nich vyplývá rozdíl ve funkcích IL-10 a IL-13 se zdůrazněním zásadního protizánětlivého účinku IL-10.

Lze shrnout, že se nám podařilo prokázat významně zvýšenou tvorbu protizánětlivého cytokinu IL-10 již v průběhu operace s vrcholem bezprostředně po operaci u kardiokirurgických nemocných operovaných s použitím CPB. U nemocných operovaných na tepajícím srdci jsou změny sérových hladin IL-10 nejvyšší v první pooperační den. U nemocných operovaných s použitím CPB dochází k významnému zvýšení tvorby prozánětlivého cytokinu IL-6 s vrcholem po operaci. U operovaných bez použití CPB je vrcholu dosaženo první pooperační den. Mezi oběma skupinami jsou v sérových hladinách IL-6 významné rozdíly bezprostředně po operaci a v první pooperační den. Sérové hladiny cytokinu IL-13, který je zapojen do regulací aktivit subsetu TH2 nevykazují časovou závislost a neodlišují se mezi nemocnými operovanými s použitím a bez použití CPB.

#### Zkratky

|                |  |
|----------------|--|
| CPB            | – cardiopulmonary bypass                         |
| G-CSF          | – kolonie stimulující faktor pro granulocyty     |
| GM-CSF         | – kolonie stimulující faktor pro makrofágy       |
| IgE            | – imunoglobulin E                                |
| IL             | – interleukin                                    |
| INF $\gamma$   | – interferon gamma                               |
| iNOS           | – inducibilní NO syntáza                         |
| JAK/STAT       | – janus kinasa/signal transducers and activators |
| MCP            | – macrophage chemoattractant protein             |
| MIP-1 $\alpha$ | – macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$     |
| MODS           | – multiple organ dysfunction syndrome            |
| MOFS           | – multiple organ failure syndrome                |
| NF $\kappa$ B  | – transkripční faktor                            |
| SIRS           | – systemic inflammatory response syndrome        |
| TH1            | – imunoregulační subset TH1 T-lymfocytů          |
| TH2            | – imunoregulační subset TH2 T-lymfocytů          |
| Tr             | – imunoregulační subset T-lymfocytů              |

#### LITERATURA

- Rumalla, V., Calvano, S. E., Spotnitz, A. J. et al.: The effects of glucocorticoid therapy on inflammatory responses to coronary artery bypass graft surgery. *Arch. Surg.*, 2001, 136, s. 1039-1044.
- Krejsek, J., Kuneš, P., Andrýs, C. et al.: Přirozená imunita, receptory pro exogenní a endogenní nebezpečné vzory v imunopatogenezi aterosklerózy – I. část: Přirozená imunita, rozlišení signálů nebezpečí. *Čas. Lék. čes.*, 2005, 144, s. 785-789.
- Krejsek, J., Kuneš, P., Andrýs, C. et al.: Přirozená imunita, receptory pro exogenní a endogenní nebezpečné vzory v imunopatogenezi aterosklerózy – II. část: Receptory TLR, význam polymorfismu receptorů pro nebezpečné vzory. *Čas. Lék. čes.*, 2005, 144, s. 790-794.
- Sablitzki, A., Friedrich, I., Mühling, J. et al.: The systemic inflammatory response syndrome following cardiac surgery: different expression of proinflammatory cytokines and procalcitonin in patients with and without multiorgan dysfunctions. *Perfusion*, 2002, 17, s. 103-109.
- Khan, N. E., de Souza, A., Mister, R. et al.: A randomized comparison of off-pump and on-pump multivessel coronary-artery bypass surgery. *N. Engl. J. Med.*, 2004, 350, s. 21-28.
- Diegeler, A., Doll, N., Rauch, T. et al.: Humoral immune response during coronary artery bypass grafting. A comparison of limited approach, „off-pump“ technique, and conventional cardiopulmonary bypass. *Circulation*, 2000, 102 (Suppl. III), s. 95-100.
- Frass, O. M., Bühling, F., Täger, M. et al.: Antioxidant and antiprotease status in peripheral blood and BAL fluid after cardiopulmonary bypass. *Chest*, 2001, 120, s. 1599-1608.
- Wehlin, L., Vedin, J., Vaage, J., Lundahl, J.: Activation of complement and leukocyte receptors during on- and off pump coronary artery bypass surgery. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2004, 25, s. 35-42.
- Ascione, R., Lloyd, C. T., Underwood, M. J. et al.: Inflammatory response after coronary revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann. Thorac. Surg.*, 2000, 69, s. 1198-1204.
- Opal, S. M., Huber, Ch. E.: The role of interleukin-10 in critical illness. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2000, 13, s. 221-226.
- Roncarolo, M. G., Bacchetta, R., Bordignon, C. et al.: Type 1 T regulatory cells. *Immunol. Rev.*, 2001, 182, s. 68-79.
- Wolk, K., Kunz, S., Asadullah, K., Sabat, R.: Cutting Edge: Immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J. Immunol.*, 2002, 168, s. 5397-5402.
- Franke, A., Lante, W., Fackeldey, V. et al.: Proinflammatory and antiinflammatory cytokines after cardiac operation: different cellular sources at different times. *Ann. Thorac. Surg.*, 2002, 74, s. 363-371.
- Asimakopoulou, G.: Mechanisms of the systemic inflammatory response. *Perfusion*, 1999, 14, s. 269-277.
- Reinhart, K., Bayer, O., Brunkhorst, F., Meisner, M.: Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit. Care Med.*, 2002, 30 (Suppl.), s. 302-312.
- Volk, T., Döpfner, U. R., Schmutzler, M.: Stress induced IL-10 does not seem to be essential for early monocyte deactivation following cardiac surgery. *Cytokine*, 2003, 24, s. 237-243.
- Volk, T., Schmutzler, M., Engelhardt, L., Docke, W. D. et al.: Influence of aminosteroid and glucocorticoid treatment on inflammation and immune function during cardiopulmonary bypass. *Crit. Care Med.*, 2001, 29, s. 2137-2142.
- Giomarelli, P., Scolletta, S., Borrelli, E., Biagioli, B.: Myocardial and lung injury after cardiopulmonary bypass: role of interleukin (IL)-10. *Ann. Thorac. Surg.*, 2003, 76, s. 117-123.
- Dybdahl, B., Wahba, A., Haaverstad, R. et al.: On-pump versus off-pump coronary artery bypass grafting: more heat-shock protein 70 is released after on-pump surgery. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2004, 25, s. 985-992.
- Czerny, M., Baumer, H., Kilo, J. et al.: Inflammatory response and myocardial injury following coronary artery bypass grafting with or without cardiopulmonary bypass. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2000, 17, s. 737-742.
- Schneider, Ch. P., Schwacha, M. G., Chandry, I. H.: The role of interleukin-10 in the regulation of the systemic inflammatory response following trauma-hemorrhage. *Biochim. Biophys. Acta – Molecular Basis of Disease*, 2004, 1686, s. 22-23.

22. **Racz, M. J., Hannan, E. L., Isom, W. et al.:** A comparison of short- and long-term outcomes after off-pump and on-pump coronary artery bypass graft surgery with sternotomy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2004, 43, s. 557-564.
23. **Franke, A., Lante, W., Fackeldey, V. et al.:** Pro-inflammatory cytokines after different kinds of cardio-thoracic surgical procedures: is what we see what we know? *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2005, 28, s. 569-575.
24. **Levy, J. H., Tanaka, K. A.:** Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann. Thorac. Surg.*, 2003, 75, s. 715-720.
25. **Menasché, Ph.:** The systemic factor: the comparative roles of cardiopulmonary bypass and off-pump surgery in the genesis of patient injury during and following cardiac surgery. *Ann. Thorac. Surg.*, 2001, 72, s. 2260-2266.
26. **Matata, B. M., Sosnowski, A.W., Galinanes, M.:** Off-pump bypass graft operation significantly reduces oxidative stress and inflammation. *Ann. Thorac. Surg.*, 2000, 69, s. 785-791.
27. **Corry, D. B., Kheradmand, F.:** Biology and therapeutic potential of the interleukin-4/interleukin-13 signaling pathway in asthma. *Am. J. Respir. Med.*, 2002, 1, s. 185-193.
28. **Foster, P. S., Martinez-Moczygemba, M., Huston, D. P., Corry, D. B.:** Interleukins-4, -5, and -13: emerging therapeutic targets in allergic disease. *Pharmacol. Ther.*, 2002, 94, s. 253-264.
29. **McKenzie, G. J., Emson, C. L., Bell, S. E. et al.:** Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. *Immunity*, 1998, 9, s. 423-432.
30. **Szerafin, T., Brunner, M., Horvath, A. et al.:** Soluble ST2 protein in cardiac surgery: a possible negative feedback loop to prevent uncontrolled inflammatory reactions. *Clin. Lab.*, 2005, 51, s. 657-663.

*Autoři děkují paní Bc. Daně Vláškové, staniční sestře JIP KCH a pánům J. Kubíčkovi a M. Voltovi, perfusionistům KCH za pomoc při zajištění studie.*

*Práce byla realizována s podporou MŠMT ČR: MSM 0021620812.*

#### KOMENTÁŘ

## K článku M. Kudlové et al. „Kardiochirurgické operace a jejich vliv na sérovou hladinu protizánětlivého cytokinu interleukinu-10“

Poranění, ať již způsobené náhodnými traumaty, nebo chirurgickými zákroky, vyvolá metabolickou a zánětlivou odpověď, která je v první řadě zaměřena na kontrolu rozsahu poranění a jeho reparaci. Lokální zánět je nezbytný pro hojení rány a pro aktivaci lokálních obranných mechanismů proti pronikajícím mikroorganismům. Tato lokální reakce iniciuje také systémovou reakci, která má spíše imunosupresivní charakter. Systémová imunosuprese je do určité míry fyziologickou reakcí, která má ochránit pacienta proti nekontrolované systémové zánětlivé reakci vyprovokované lokálním poraněním tkáně. Pokud je ovšem poranění rozsáhlejší, zánětlivá reakce perzistuje, začne být neúčinná a může vést v nejhorších případech až k syndromu SIRS – systemic inflammatory response syndrome. Důsledkem těchto závažných stavů může být multiorgánové selhání a smrt. Proto není divu, že se stále hledají parametry, které by dokázaly předvídat rozvoj této závažné komplikace.

Účelem laboratorní diagnostiky v chirurgických oborech je stanovení stupně aktivace nebo suprese imunitního systému, případně stanovení prognosticky relevantních parametrů, které by byly podkladem pro terapeutické zásahy. Pro výzkumné účely lze vyšetřovat v různých časových intervalech různé parametry; pro klinickou praxi jsou však použitelné pouze ty parametry, jejichž stanovení je možné provádět v několikahodinových intervalech, nejsou příliš finančně náročná a jejich význam byl ověřen ve výzkumných studiích. Hledání optimálních parametrů pro určení jejich přínosu je předmětem bádání řady výzkumných týmů na celém světě. Z hlediska cytokinové reakce je lokální zánětlivá reakce charakterizována produkcí prozánětlivých cytokinů, TNF, IL-1, IL-6 a IL-8, zároveň však nastupuje tvorba protizánětlivých až imunosupresivních cytokinů, zejména IL-10, eventuálně IL-4 a IL-13. Zejména do stanovení IL-10 se vkládají naděje jakožto možného ukazatele tíže postoperační nebo posttraumatické imunosuprese. Význam sledování těchto parametrů však ještě není jednoznačně přijímán.

Autoři se ve svém výzkumu pustili na tenký, ale velmi důležitý led sledování cytokinů po kardiochirurgických operacích. Ověřili dynamiku hladiny IL-13 u kardiochirurgických nemocných operovaných s použitím nebo bez použití CPB. V průběhu operace i ve sledovaném sedmidenním pooperačním období zaznamenali minimální statisticky nevýznamné změny séro-

## EXPRESSION OF AN ACTIVATED FORM OF INTEGRIN $\beta_2$ CHAIN CD18 IN CARDIAC SURGICAL OPERATIONS

Manuela Kudlová<sup>1</sup>, Martina Koláčková<sup>1</sup>, Pavel Kuneš<sup>2,1</sup>, Vladimír Lonský<sup>2</sup>, Jiří Mandák<sup>2</sup>, Ctirad Andrys<sup>1</sup>, Jan Krejsek<sup>1</sup>

Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové and University Hospital Hradec Králové, Czech Republic; Department of Clinical Immunology and Allergy<sup>1</sup>, Department of Cardiac Surgery<sup>2</sup>

**Summary: Background:** Myeloid cells are extensively activated in patients undergoing cardiocirculatory operations. It is supposed that this activation is more profound in patients operated with cardiopulmonary bypass (CPB) („on-pump“) in comparison with patients operated without CPB („off-pump“). **Aims:** To evaluate changes in the expression of a novel activation marker expressed on myeloid cells recognized by MEM-148 antibody. **Patients and Methods:** The expression of MEM-148 positive myeloid cells was evaluated by flow cytometry in 40 patients who underwent coronary artery bypass surgery (CABG) randomly assigned to „on-pump“ or „off-pump“ technique. **Results:** The relative and absolute number of MEM-148 positive myeloid cells is significantly diminished during „on-pump“ surgery. A significant increase in their number in postoperative period in both „on-pump“ and „off-pump“ patients was found. There were no significant differences between „on-pump“ and „off-pump“ patients. **Conclusions:** The very trauma of surgery seems to be more relevant in starting on activation of myeloid cells than CPB itself.

**Key words:** Cardiac surgery; Cardiopulmonary bypass; Myeloid cells; Activation MEM-148

Abbreviations: CABG - Coronary Artery Bypass Grafting; CD - Cluster Designation; CPB - Cardiopulmonary Bypass; ICAM-1 - Intercellular Adhesion Molecule-1.

### Introduction

Cardiopulmonary bypass (CPB) in combination with other factors (surgical trauma, anesthesia, medication, hypothermia, ischemia-reperfusion injury) induces inflammatory response in cardiocirculatory patients. This response includes activation of humoral systems (complement, coagulation-fibrinolysis) and cellular components. The crucial role in latter one is devoted to the mutual interplay between activated immune cells in blood vessels and activated endothelial cells. The ultimate goal of this process is extravasation of activated leukocytes into tissues via diapedesis (9). Adhesion of leukocytes to endothelial cells lining which is a multistep process is prerequisite to the diapedesis of leukocytes. The firm adhesion of leukocytes is mediated by the interactions between leukocyte  $\beta_2$  integrins subfamily and their counterparts ICAM-1, 2, 3 belonging into immunoglobulin superfamily. Members of family of  $\beta_2$  integrins are heterodimers defined by a CD18 or  $\beta_2$  subunit that is common to all members of the  $\beta_2$  subfamily, paired with a unique  $\alpha$  chain (CD11 a, b, c,) (16), respectively.

Several avenues of research have converged to reveal the central role of  $\beta_2$  integrins in the inflammatory response. CD18 chain is essential for the function of  $\beta_2$  integrins as is evidenced from rare patients suffering from leukocyte adhesion deficiency I. As a result of mutations in the CD18 chain these patients fail to express normal levels of  $\beta_2$  integrins. As a consequence, neutrophils activation and trafficking is severely impaired.

There are some reports regarding  $\beta_2$  integrins expression in cardiac surgical patients. It is generally assumed that cardiac surgery using CPB („on-pump“) has more profound impact on leukocytes in comparison with surgery on the beating heart („off-pump“) (11). Indeed, Asimakopoulos et al (1) found that  $\beta_2$  integrins CD11b/CD18 expression on neutrophils was significantly increased as early as 15 min after onset of CPB. On the contrary, it was reported by Gesler et al (7) that CD11b/CD18 expression was reduced after weaning from CPB.

Recently, a novel activation marker abundantly expressed on the surface of activated monocytes and neutrophils - a 65- to 70-kDa proteolytic fragment of the common  $\beta$  chain of leukocyte ( $\beta_2$ ) integrins, CD18, as detected by

a monoclonal antibody produced by MEM-148 hybridoma recognizing unique CD18 epitope was described (5).

The aim of this study was to follow the expression of a novel activation form of CD18  $\beta_2$  chain on immune cells of cardiac surgical patients during surgery and an early postoperative period. To the best of our knowledge, no data are available so far concerning the expression of this form of CD18  $\beta_2$  integrin chain recognized by MEM-148 monoclonal antibody in cardiosurgical patients. The expression of this marker was compared between „on-pump“ and „off-pump“ patients to ascertain the impact of CPB on the activation of immune cells.

## Patients

Forty patients (31 male, mean age  $67.9 \pm 9$  years and 9 female, mean age  $66.4 \pm 6.4$  years, collective mean age  $67.6 \pm 8.5$  years) referred to first-time coronary artery bypass grafting (CABG) were enrolled in this study. Patients underwent either conventional myocardial revascularization with cardiopulmonary bypass and cardioplegic arrest of the heart („on-pump“,  $n=20$ , 16 male, 4 females, mean age  $69.4 \pm 7$  years) or beating heart surgery („off-pump“,  $n=20$ , 15 males, 5 females, mean age  $65.9 \pm 9.7$  years). The patients were randomly assigned either to „on-pump“ or to „off-pump“ surgery by a member of the cardiosurgical staff outside the research team who was blinded to all variables pertinent to the study design.

Patients in both groups were comparable in age, preoperative left ventricular ejection fraction (median 0.65 in „on-pump“, 0.65 in „off-pump“ patients, respectively) and the number of performed coronary anastomoses (median 2.0 in „on-pump“, 2.0 in „off-pump“, respectively). All patients had been taking aspirin 100 mg in one daily dose, which was stopped for five days preceding the operation. Patients treated with anti-inflammatory agents, either steroids or NSAID, were excluded from the study, as were patients with serum creatinine  $\geq 130 \mu\text{mol/l}$  or with hepatic disorders. No patients were known to suffer from concomitant malignancies. Patients with active infectious diseases are not admitted to elective CABG in our department. The Ethics Committee of the University Hospital in Hradec Králové approved the study protocol. All participants were informed in detail about the purpose of the study both orally and in writing. They were free to ask any questions. One person refused to participate for reasons he would not specify. All active subjects have given written informed consent.

EUROSCORE is not routinely assessed in our patients.

## Cardiopulmonary bypass

CPB was established using a two-stage venous drainage and ascending aortic return. A roller pump (S3 Stöckert®, Stöckert Instrumente GmbH, München, Germany), a membrane oxygenator (Dideco Avant 903®, Dideco Mirandola,

Italy) in a closed modification with collapsible reservoir, a cardiotomy suction device and a 40  $\mu\text{m}$  arterial line filter (Dideco Micro 40®, Mirandola, Italy) were integrated into the extracorporeal circuit. The system surface was not treated with any hemocompatible substance. The priming solution consisted of:

– 500 ml Ringer's lactate, 500 ml Rheodextran (Rheomacrodex), 5000 IU heparin, 500 000 IU aprotinin, 80 ml natrium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$  8,4 %), 20 ml magnesium sulphate 10 %, 500 mg dexamethasone, manitol 1 g/kg body weight.

The priming volume was calculated to achieve haematocrit levels above 0.22.

Intravenously, heparin was administered at 300 IU/kg body weight to maintain an activated clotting time (ACT) above 480 s during bypass. No patient received either aprotinin or corticosteroid intravenously. Pump flow rates averaged 2.4 l/min/m<sup>2</sup> body surface areas with pressure maintained at 50–60 mmHg. The patients were kept normothermic. Cardioplegic arrest was induced with 800–1000 ml of a St. Thomas cold crystalloid solution, administered antegradely into the aortic root with added doses of 200–300 ml every 30 minutes whenever needed. All patients received an internal artery mammary graft to the left anterior descending coronary artery (LAD). The central aorto-venous anastomoses were performed during the reperfusion phase of CPB with the heart beating. After termination of bypass, heparin anticoagulation was antagonized by protamine sulphate at a 1:1 dosage.

Cross clamping of the aorta in this group took in average 49 minutes; the duration of cardiopulmonary bypass amounted in average to 84 minutes.

## “Off-pump” technique

All operations were performed via a median sternotomy incision. Two to three traction sutures in the postero-lateral pericardium were placed. Regional myocardial stabilization was achieved with commercially available suction stabilizers. No preconditioning was performed. The target coronary vessels were snared with a silicone vascular loop proximal to the anastomotic site. An intracoronary shunt was used during construction of the anastomoses. The left internal mammary artery to LAD was the first anastomosis in all patients. The central aorto-venous anastomoses were established with partial occlusion of the ascending aorta. In OPCAB patients, heparin was given at a dosage of 200 IU/kg to achieve an ACT over 300 s. After completion of the final anastomosis, heparin was antagonized with protamine sulphate at a 1:1 dosage to return the ACT to preoperative levels.

## Anaesthesiological management

All patients were anaesthetised according to the current protocol of our department. Anaesthesia was induced with

thiopental and midazolam. Muscular relaxation was achieved with cisatracurium. Anaesthesia was maintained with isoflurane and intermittent sufentanyl. Continuous propofol was used as a supplement if needed. Volume-controlled ventilation with  $\text{FiO}_2$  of 0.50 was employed. Mean arterial pressure was kept over 50 mmHg with norepinephrine administered whenever required.

### Blood sampling

Venous blood (peripheral venous blood from an antebra- chial vein) was withdrawn in the operating room and during postoperative period in the intensive care unit. Samples were collected into heparinized tubes manufactured by Greiner, Germany.

In "on-pump" patients, blood was withdrawn at following time points:

- 1) introduction to anaesthesia, which in both groups represented the baseline or reference value for all parameters measured thereafter
  - 1a) before cross-clamping of the aorta
  - 1b) after aortic cross-clamp release
  - 1c) after termination of CPB
- 2) after termination of the operation
- 3) the first postoperative day
- 4) the third postoperative day
- 5) the seventh postoperative day.

In "off-pump" patients, blood was withdrawn at:

- 1) introduction to anaesthesia
- 2) after termination of the operation
- 3) the first postoperative day
- 4) the third postoperative day
- 5) the seventh postoperative day.

### Methods

The expression of activated immune cells expressing novel activation marker recognized by MEM-148 monoclonal antibody was determined by phycoerythrin labeled monoclonal antibody purchased by Serotec, UK, Cat.No. MCA2086RPE in combination with anti CD45 panleukocyte marker (Immunotech, France). Direct double immunofluorescence whole blood lysing method was used.

To identify lymphoid and myeloid cells precisely, the combination of CD45 FITC and CD14 PE monoclonal antibodies were purchased from Immunotech, France, respectively.

Relative and absolute number of MEM-148 positive cells, separately for lymphoid and myeloid cells, were determined. Shift in the intensity MEM-148 expression on myeloid cells during surgery and in the postoperative period was expressed as MFI value (mean fluorescence intensity).

Results were measured by FACS Calibur flow cytometer (B.D., USA) using CELLQuest software. Irrelevant  $\text{IgG}_1\text{FITC}/\text{IgG}_1\text{PE}$  monoclonal antibodies serve as negative isotypic control.

### Statistical analysis

We analyzed changes in the relative and absolute numbers of immune cells expressing activated form of CD18 molecule recognized by MEM-148 monoclonal antibody in both group of patients ("on-pump", "off-pump"). Samples taken at the introduction to anaesthesia were considered as reference. Differences between "off- and on-pump" patients were also evaluated.

Data were analyzed using two-way ANOVA for repeated measures with Fisher test for multiple comparisons. To exclude confounding effect of different age and sex in both groups, unpaired t-test and chi-square test were performed. Correlations were assessed using Pearson's correlation coefficient.

A probability (p) value < 0.05 was considered significant.

Statistical analysis was performed with Statistica 5.5 software (Statsoft, USA).

### Results

#### *1. Expression of CD18 $\beta_2$ integrin recognized by MEM-148 on lymphocytes*

The expression of a truncated form of CD18  $\beta_2$  integrin chains recognized by MEM-148 monoclonal antibody on lymphocytes was without any change during cardiac surgical operations either operated with or without CPB. The percentage of MEM-148 positive lymphocytes was in range from 3 % to 6 %. There was an insignificant decrease after declamping aorta in „on-pump“ patients. Slight, insignificant increase in both groups was found after surgery. There were no differences between „on-pump“ and „off-pump“ patients ( $p=0.28$ , data are not shown).

#### *2. Expression of CD18 $\beta_2$ integrin recognized by MEM-148 on myeloid cells*

##### *2.1. Changes in the relative number of MEM-148 positive myeloid cells*

The relative number of MEM-148 positive myeloid cells was significantly decreased in „on-pump“ patients in the whole entire period of surgery from cross-clamping aorta to the end of surgery in comparison with preoperative level ( $p<0.001$ ). In spite of a slight increase on the 1<sup>st</sup> postoperative day this relative number remained significantly diminished ( $p<0.001$ ). This number was normalized on the 3<sup>rd</sup> postoperative day followed by a significant decrease on the 7<sup>th</sup> postoperative day in „on-pump“ patients (Fig. 1).

Changes in the relative number of activated MEM-148 expressing myeloid cells in „off-pump“ patients were resembling the pattern found in „on-pump“ patients. The significant decrease on the 1<sup>st</sup> postoperative day ( $p<0.05$ ) was followed by the return back to the preoperative value on the 3<sup>rd</sup> postoperative day with subsequent decrease on the 7<sup>th</sup> postoperative day ( $p<0.001$ ) (Fig. 2).



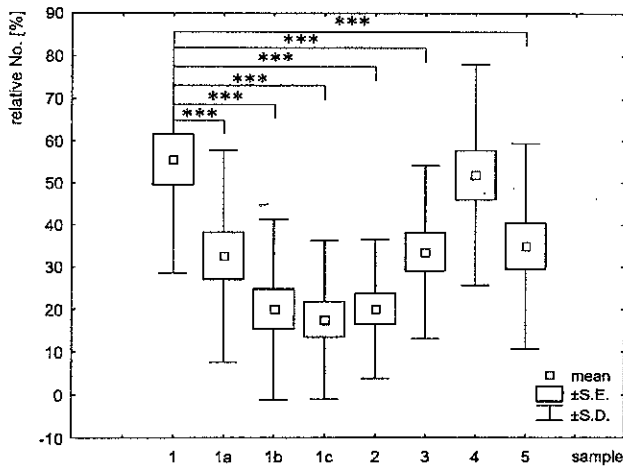


Fig. 1: Changes in the relative number of MEM-148 positive activated myeloid cells in "on-pump" patients.

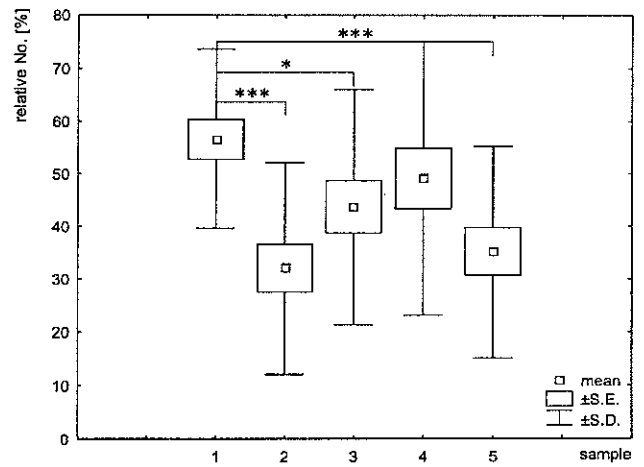


Fig. 2: Changes in the relative number of MEM-148 positive activated myeloid cells in "off-pump" patients.

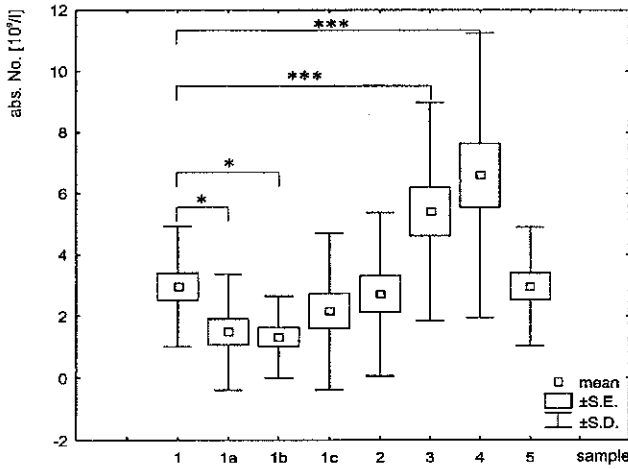


Fig. 3: Changes in the absolute number of MEM-148 positive activated myeloid cells in "on-pump" patients.

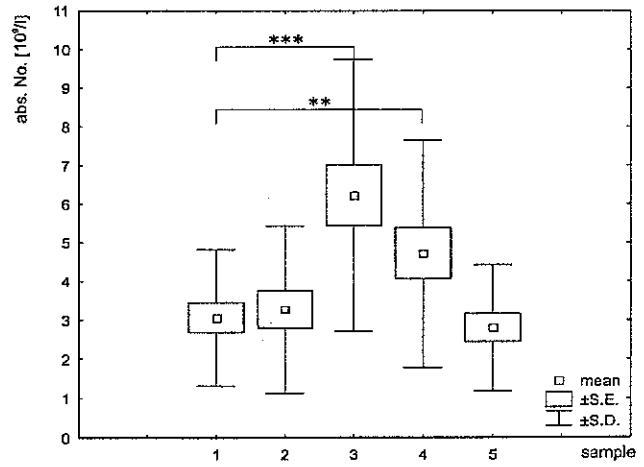


Fig. 4: Changes in the absolute number of MEM-148 positive activated myeloid cells in "off-pump" patients.

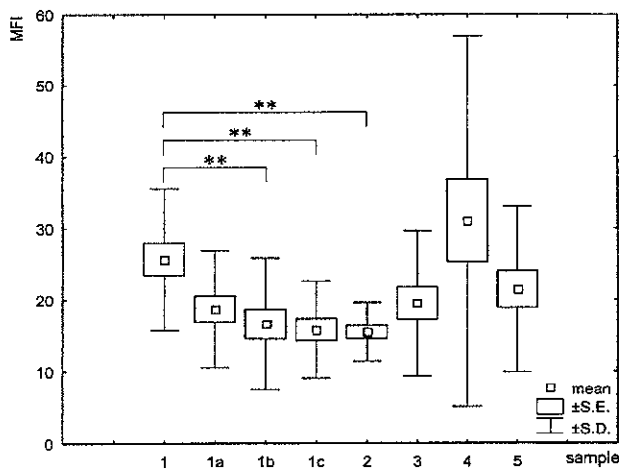


Fig. 5: Changes in the density of expression of MEM-148 activation marker on myeloid cells in "on-pump" patients.

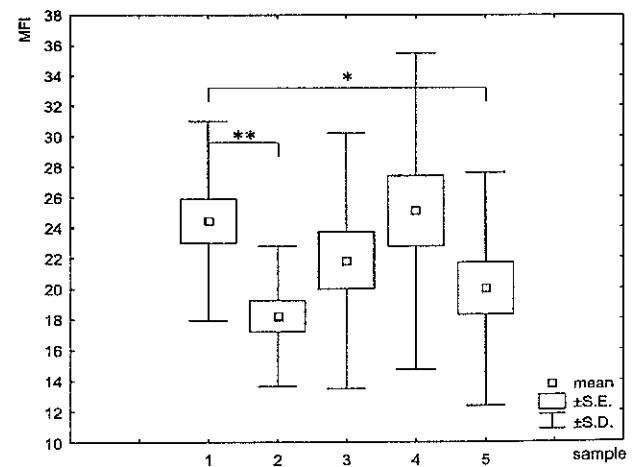


Fig. 6: Changes in the density of expression of MEM-148 activation marker on myeloid cells in "off-pump" patients.

There were no significant differences between „on-pump“ and „off-pump“ patients regarding relative number of MEM-148 positive myeloid cells ( $p=0.44$ , data are not shown).

### 2.2. Changes in the absolute number of MEM-148 positive myeloid cells

Changes in the absolute number of myeloid cells in „on-pump“ patients resembled relative count pattern. The significantly decreased number was found at the cross clamping ( $p<0.05$ ) and declamping aorta ( $p<0.05$ ), respectively.

This transient decrease was followed by the return to the preoperative baseline value at the weaning from CPB and at the finishing of surgery. The absolute count of activated myeloid cell was subsequently highly significantly increased ( $p<0.001$ ) on the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> postoperative days, returned to the baseline value on the 7<sup>th</sup> postoperative day (Fig. 3).

The changes of the absolute number of activated myeloid cells in „off-pump“ patients were very similar compared to „on-pump“ patients. The slight, insignificant increases at the finishing surgery were followed by the statistically highly significant increase on the 1<sup>st</sup> postoperative day ( $p<0.001$ ) and the 3<sup>rd</sup> postoperative day ( $p<0.01$ ), respectively, with subsequent normalization on the 7<sup>th</sup> postoperative day (Fig. 4).

There were no significant difference between „on-pump“ and „off-pump“ patients regarding absolute number of MEM-148 positive activated myeloid cells ( $p=0.86$ , data are not shown).

### 3. Changes in the intensity of expression of activated epitope CD18 recognized by MEM-148 monoclonal antibody

The density of the expression of particular surface molecule is reflecting the physiology of cells. Flow cytometry enables to estimate mean fluorescence intensity (MFI) as a surrogate parameter of surface molecules density.

We followed the density of a truncated form of  $\beta_2$  integrin chain CD18 on myeloid cells of cardiac surgical patients. The density of this marker expressed as MFI was significantly diminished at de-clamping aorta, weaning from CPB and at the end of surgery, respectively ( $p<0.01$ ). This parameter was insignificantly changed in the whole postoperative period compared to baseline preoperative value in „on-pump“ patients (Fig. 5).

There was significantly diminished density of expression of truncated form of CD18 molecule on myeloid cells at the finishing of surgery compared to the preoperative level in „off-pump“ patients ( $p<0.01$ ). This decrease was followed by the normalisation on the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> postoperative days. In accord with a relative number of MEM-148 positive myeloid cells, the density of this marker was significantly diminished on the 7<sup>th</sup> postoperative day ( $p<0.05$ ) (Fig. 6).

There were no significant differences in the density of the truncated CD18 molecule between „on-pump“ and „off-pump“ patients ( $p=0.798$ , data are not shown).

## Discussion

The inflammatory reaction in cardiac surgical patients is the result of a complex interplay between numerous humoral factors and cell substrate of inflammation. Amongst cells involved in this process special role is devoted to innate immunity monocyte-macrophages and granulocytes. Whereas monocyte-macrophage cells are the richest source of pluripotent proinflammatory cytokines upon activation, activated granulocytes are recruited into tissues by stepwise interaction between adhesion molecules on the surface of leukocytes and their corresponding receptors expressed on the luminal surface of inflamed endothelium (16). There is a substantial long lasting effort to identify activated neutrophils in blood of patients with systemic inflammatory response induced by various stimuli either to identify patients at the risk of development of overwhelming inflammatory response potentially ultimating into multiple organ failure syndrome (MOFS) or to implicate the causative agent of such inflammatory response e.g. bacterial infection (2).

Such promising marker is Fc $\gamma$ -receptor I (CD64), a high affinity receptor for IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>3</sub> subclasses of immunoglobulins. Numerous substances of both exogenous and endogenous origin are rapidly upregulating Fc $\gamma$ RI expression on the surface of neutrophils (13). In contrast to Fc $\gamma$ RI, informations regarding the expression of a novel activation marker, CD18 chain recognized by MEM-148 monoclonal antibody; are very sparse and in the case of cardiac surgery are entirely lacking.

Activation of myeloid cells by various physiological and experimental stimuli is accompanied by multiple surface changes associated predominantly with degranulation, it means externalization and thus enhanced surface expression of several membrane proteins stored in cytoplasmic granules, simultaneously with proteolytic shedding, and internalization of distinct sets of molecules. Thus, activated blood myeloid cells typically upregulate surface expression of chemotactic receptors, complement receptor type 3 (CR3; CD11b/CD18), and down-modulate surface density of lipopolysaccharide receptor CD14, adhesion receptors CD44 and CD62L, or antiadhesion sialoglycoprotein CD43 (6).

Recently, it has been reported that CD18  $\beta_2$  chain is proteolytically cleaved on the surface of activated myeloid cells. The resulting free 65 to 70-kDa fragment of CD18 is expressed apparently as a free molecule unassociated with CD11 $\alpha$  chains or other molecules and represents a novel abundant activation marker of myeloid cells (5). This fragment is not likely produced by proteases released from secretory granules of the activated cells or by activated membrane-associated proteases and comes predominantly

from integrin molecules stored intracellularly in resting cells. Transmembrane fragments of CD18 produced by the activation-induced proteolytic cleavage obviously lose their association with CD11 chains and expose the epitope recognized by monoclonal antibody MEM-148, which is the sterically hidden in the intact  $\beta_2$  integrin heterodimer (4).

The expression of activated CD18  $\beta_2$  chain (MEM-148 positive) on lymphocytes in cardiac surgical patients is without any significant changes either during surgery or in the postoperative period regardless "on-pump" or "off-pump" patients. These indicate a low impact of cardiac surgery on this population in an early period. This finding is reflecting the fact, that specific immunity is induced later during inflammatory response.

On contrary, the CD18 expressing (MEM-148 positive) myeloid cells displayed substantial changes both in the relative and absolute counts. The relative and absolute number of MEM-148 positive myeloid cells was significantly diminished during surgery in "on-pump" patients. This drop could be explained by the selective entrapment of activated myeloid cells on the surfaces of CPB circuits. Indeed, such selective decrease, particularly population of CD16/CD14<sup>+</sup> monocytes during "on-pump" surgery, was reported by Wehlin et al. (19).

The return back to the preoperative values of a relative count of MEM-148 positive myeloid cells which was found on the 3<sup>rd</sup> postoperative days in both "on-pump" and "off-pump" patients, was probably caused by the massive release of granulocytes at this period. Unmature, physiologically not fully competent granulocytes (bands) are exported to the periphery at that time. These cells are probably unable to be properly activated and are not expressing activated form of CD18 molecule. Subsequently, the relative number of these cells was again significantly diminished on the 7<sup>th</sup> postoperative day. At that time normal one replaces not fully immunocompetent granulocytes. Due to still persistent proinflammatory conditions in cardiac surgical patients, highly activated myeloid cells are sequestered in the injured tissue lowering the relative number of activated myeloid cells in blood.

The similar explanation could be used to explain significantly diminished density of expression of activated CD18 (MEM-148 positive) molecules on myeloid cells during "on-pump" surgery up to the 1<sup>st</sup> postoperative day. This decrease expressed as a change in MFI value, was found on the 1<sup>st</sup> postoperative day in "off-pump" patients as well. In general, priming and activation of immune cells is followed by a transient down-modulation of membrane molecules density. This phenomenon is supposed to relieve from potentially harmful overactivation of immune cells (6). Our results are in a concordance with the work of Tarnok et al. (17) who found decreased density of common  $\beta_2$  (CD18) chain during surgery up to the 2<sup>nd</sup> postoperative day in "on-pump" patients.

The absolute number of activated (MEM-148 positive) myeloid cells is significantly increased on the 1<sup>st</sup> and the 3<sup>rd</sup>

postoperative days in both "on-pump" and "off-pump" patients. This increase, in spite of diminished MFI and relative count of these cells, is simply caused by substantial neutrophilia, which is typical for this period.

Many studies conducted in the last few years, which investigated various inflammatory markers, have shown reduced inflammation in patients operated on by the "off-pump" technique compared to "on-pump" surgery (3). On the other hand, any definitive proof in favor of "off-pump" surgery in terms of reduced long-term mortality compared to its "on-pump" counterpart is still missing. Moreover, some studies dealing with the inflammatory response elicited in "on-pump" versus "off-pump" CABG patients arrived at the conclusion that most of the differences observed between the two procedures were mostly of quantitative rather than qualitative nature (10, 18, 20). These controversies might be reconciled by taking into account the basic fact that any major surgery, no matter whether cardiac or non-cardiac, elicits disruption of the whole-body integrity due to skin and tissue incisions, bleeding, heart rate or blood pressure instability, and other possible derangements to a smooth perioperative course. All of these inconveniences can be prevented only to a certain degree, even if utmost care is expended. Thus, the very trauma of surgery seems to be more relevant in starting on SIRS rather than cardiopulmonary bypass itself, the latter adding a CPB-specific fraction on top of other unfavorable events (12, 14, 15).

Our results are supporting this idea. We did not find any significant differences between "on-pump" and "off-pump" patients neither in the relative or absolute number of MEM-148 positive myeloid cell nor in its density of expression.

Another opened issue in cardiac surgery is whether depletion of activated circulating leukocytes by arterial line leukocyte filters might alleviate inflammatory response. Rationale, obtained from the results of previous studies was supporting this idea. Very recently these opinions have been rejected by Ilmakunnas et al (8) who have found that passing of leukocytes through arterial filters was enhancing activation of neutrophils expressed as changes in CD11b/CD18  $\beta_2$  integrins expression.

This study was aimed to follow the expression of free 65 to 70-kDa fragment of CD18 in cardiac surgical patients. This fragment is expressed apparently as a free molecule unassociated with CD11 chains and represents a novel abundant activation marker of myeloid cells (5). It is possible to speculate that the proteolytic cleavage and concomitant dissociation of the major CD18 fragment may uncover ligand-binding sites in the  $\alpha$  chain (CD11) thus formed unconventional form of high-affinity conformation of the  $\beta_2$  integrin molecule. On the other hand, the observed cleavage of CD18 may simply be a first step of a degradative process down-regulating the amounts of functional cell surface  $\beta_2$  integrins in the later phases of the adhesion process (5).

Regardless above speculations, this study clearly showed that there are no significant differences in the expression of

activated CD18  $\beta_2$  integrins recognized by MEM-148 antibody between "on-pump" and "off-pump" cardiac surgical patients.

#### Acknowledgment

This work has been supported by a research program of The Czech Ministry of Youth, School and Physical Activities No. MSM 0021620812 and Internal Grant Agency of Ministry of Health, Czech Republic, No. NR/9090-4.

#### References

1. Asimakopoulos G, Kohn A, Stefanou DC, Haskard DO, Landis RC, Taylor KM. Leukocyte integrin expression in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1192-7.
2. Bakke AC, Allen E, Purtzer MZ, Deodhar A. Neutrophil CD64 expression Distinguishing acute inflammatory autoimmune disease from systemic infections. *Clin Applied Immunol Rev* 2001;1:267-275.
3. Biglioli P, Cannata A, Alamanni F et al. Biological effects of off-pump vs. on-pump coronary artery surgery: focus on inflammation, hemostasis and oxidative stress. *Eur J Cardio-Thorac Surg* 2003;24:260-9.
4. Drbal K, Angelisová P, Cerný J et al. Human leukocytes contain a large pool of free forms of CD18. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:295-299.
5. Drbal K, Angelisova P, Hilgert I, Cerny J, Novak P, Horejsi V. A proteolytically truncated form of free CD18, the common chain of leukocyte integrins, as a novel marker of activated myeloid cells. *Blood* 2001;98:1561-1566.
6. Elghetany MT, Davis BH. Impact of preanalytical variables on granulocytic surface antigen expression: a review. *Cytometry Part B (Clin Cytometry)* 2005; 65B:1-5.
7. Gessler P, Pfenninger J, Pfammatter JP, Carrel T, Dahinden C. Inflammatory response of neutrophil granulocytes and monocytes after cardiopulmonary bypass in pediatric cardiac surgery. *Intensive Care Med* 2002;28:1786-1791.
8. Ilmakunnas M, Pesonen EJ, Ahonen J, Rämö J, Siitonen S, Repo H. Activation of neutrophils and monocytes by a leukocyte-depleting filter used throughout cardiopulmonary bypass. *J Thor Cardiovasc Surg*, 2005;129(4):851-859.
9. Larmann J, Theilmeyer G. Inflammatory response to cardiac surgery: cardiopulmonary bypass versus non-cardiopulmonary bypass surgery. *Best Pract Res Clin Anaesth* 2004;18:425-38.
10. Meng ZH, Dyer K, Billiar TR, Tweardy DJ. Essential role for IL-6 in postresuscitation inflammation in hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 2001;280: C343-C351.
11. Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardio-Thoracic Surg* 2002;21: 232-244.
12. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004;22:929-79.
13. Qureshi SS, Lewis SM, Gant VA, Treacher D, Davis BH, Brown KA. Increased distribution and expression of CD64 on blood polymorphonuclear cells from patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Clin Exp Immunol* 2001;125:258-265.
14. Rossi M, Sganga G, Mazzone M et al. Cardiopulmonary bypass in man: role of the intestine in a self-limiting inflammatory response with demonstrable bacterial translocation. *Ann Thorac Surg* 2004;77:612-618.
15. Sablotzki A, Welters I, Lehmann N et al. Plasma levels of immunoinhibitory cytokines interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$  in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardio-Thorac Surg* 1997;11:763-8.
16. Steeber DA, Venturi GM, Tedder TF. A new twist to the leukocyte adhesion cascade: intimate cooperation is key. *TRENDS Immunol* 2005;26(1):9-12.
17. Tarnok A, Bocsi J, Rösster H, Schlykow V, Schneider P, Hamsch J. Low degree of activation of circulating neutrophils determined by flow cytometry during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Cytometry (Comm Clin Cytometry)* 2001;46:41-49.
18. Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A et al. Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:391-8.
19. Wehlin L, Vedin J, Vaage J, Lundahl J. Peripheral blood monocyte activation during coronary artery bypass grafting with or without cardiopulmonary bypass. *Scand Cardiovasc J* 2005;39:78-86.
20. Yang S, Zheng R, Hu S et al. Mechanism of cardiac depression after trauma-hemorrhage: increased cardiomyocyte IL-6 and effect of sex steroids on IL-6 regulation and cardiac function. *Am J Physiol* 2004;287:H2183-H2191.

Submitted April 2007.

Accepted July 2007.

#### Corresponding author:

---

Jan Krejsek, Prof., University Hospital Hradec Králové, Department of Clinical Immunology and Allergy, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic, e-mail: krejsek@fnhk.cz

---

## Clinical Study

# Lipopolysaccharide Binding Protein and sCD14 are Not Produced as Acute Phase Proteins in Cardiac Surgery

Manuela Kudlova,<sup>1</sup> Pavel Kunes,<sup>1,2</sup> Martina Kolackova,<sup>1</sup> Vladimir Lonsky,<sup>2</sup> Jiri Mandak,<sup>2</sup> Ctirad Andrys,<sup>1</sup> Karolina Jankovicova,<sup>1</sup> and Jan Krejsek<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Clinical Immunology and Allergology, Charles University in Prague, School of Medicine and University Hospital in Hradec Králové, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Cardiac Surgery, Charles University in Prague, School of Medicine and University Hospital in Hradec Králové, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Jan Krejsek, krejsek@fnhk.cz

Received 10 July 2007; Accepted 4 September 2007

**Objectives.** The changes in the serum levels of lipopolysaccharide binding protein (LBP) and sCD14 during cardiac surgery were followed in this study. **Design.** Thirty-four patients, 17 in each group, were randomly assigned to coronary artery bypass grafting surgery performed either with ("on-pump") or without ("off-pump") cardiopulmonary bypass. LBP and sCD14 were evaluated by ELISA. **Results.** The serum levels of LBP were gradually increased from the 1st postoperative day and reached their maximum on the 3rd postoperative day in both "on-pump" and "off-pump" patients ( $30.33 \pm 9.96 \mu\text{g/mL}$ ;  $37.99 \pm 16.58 \mu\text{g/mL}$ ), respectively. There were no significant differences between "on-pump" and "off-pump" patients regarding LBP. The significantly increased levels of sCD14 from the 1st up to the 7th postoperative day in both "on-pump" and "off-pump" patients were found with no significant differences between these groups. No correlations between LBP and sCD14 and IL-6, CRP and long pentraxin PTX3 levels were found. **Conclusions.** The levels of LBP and sCD14 are elevated in cardiac surgical patients being similar in both groups. These molecules are not produced as acute phase proteins in these patients.

Copyright © 2007 Manuela Kudlova et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. INTRODUCTION

Numerous events, potentially generating inflammatory response, are induced during cardiac surgical operation on the open heart. Amongst them, the combination of surgical injury, mechanical manipulation with the heart, the contact of blood components with artificial surfaces of the cardiopulmonary bypass circuit, transient endotoxemia, and ischemia-reperfusion injury of the heart and lungs are relevant [1, 2].

The systemic inflammatory response syndrome (SIRS) viewed as basically useful has been conserved during evolution in order to provide support for the host to survive in an unfriendly environment, such as strenuous exercise of the "fight" or "flight" nature, multiple injuries or burns, infections or, more recently, major surgery. Whichever the underlying cause, tight control of every step of the inflammatory reactions must be executed both on local and on systemic level where activities of the neuroimmune, endocrine, and circulatory systems overlap. If this control fails, morbidity and mortality increase dramatically [3].

The presence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) or endotoxin in systemic circulation is sensed as a very strong danger pathogen associated molecular pattern (PAMP) by innate immunity. This identification could be followed by an exaggerated and sometimes overwhelming systemic inflammatory reaction [4]. In cardiac surgical patients, transient endotoxemia is a manifestation of insufficient blood supply to the splanchnic vascular bed after a substantial amount of blood volume has been diverted from the patient's own vasculature into the tubing circuit of the heart-lung machine. Gut wall ischemia results in an increase of villous capillary permeability with ensuing translocation of lipopolysaccharide or even of the patient's own enteral flora into the systemic circulation.

The presence of LPS is identified by numerous phylogenetically highly conserved receptors of innate immunity which are called pattern recognition receptors (PRRs). PRRs are either humoral or membrane molecules which are sometimes shed into the body fluids. The crucial role in the identification of LPS is devoted to the humoral lipopolysaccharide binding protein (LBP) and two membrane receptors

CD14 and toll-like receptor-4 (TLR-4, CD284), respectively. All these molecules are working in concert providing stimulatory signals to innate immunity cells such as monocyte-macrophages and granulocytes [5]. However, the former two molecules display a dual role in an inflammatory reaction. While present in plasma in low concentrations, CD14 being in the soluble form, early during inflammatory response, LBP and sCD14 are serving as a part of an early alarm system aimed at recognizing and binding of LPS and other danger signals, and thus enhancing the activation of the immune system. In the late phase, both sCD14 and LBP could play a role by preventing the lethal side effects of overwhelming inflammatory reaction induces by the presence of "danger."

This study was aimed to follow the serum levels of LBP and sCD14 in cardiac surgical patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG) either with the use of cardiopulmonary bypass (on-pump) or without the use of cardiopulmonary bypass (off-pump). The levels of these markers immediately after surgery and up to seventh postoperative days were compared to preoperative level. Whereas LBP is recognized as a typical acute phase protein principally synthesized by hepatocytes, sCD14 molecules are either produced de novo as acute phase protein or are released into body fluids by shedding from cell surfaces. To ascertain the sources of sCD14, its level was correlated to the level of IL-6 which is the most potent stimulus for liver synthesis of acute phase proteins and to the levels of two pentraxins; C-reactive protein (CRP) and long pentraxin (PTX3), respectively.

## 2. PATIENTS AND METHODS

Forty patients (31 male, mean age  $67.9 \pm 9$  and 9 female, mean age  $66.4 \pm 6.4$ , collective mean age  $67.6 \pm 8.5$  years) referred to first-time coronary artery bypass grafting (CABG) were enrolled in this study. Patients underwent either conventional myocardial revascularization with cardiopulmonary bypass and cardioplegic arrest of the heart (on-pump,  $n = 2$ , 16 male, 4 females, mean age  $69.4 \pm 7$ ) or beating heart surgery (off-pump,  $n = 2$ , 15 males, 5 females, mean age  $65.9 \pm 9.7$ ).

Patients in both groups were comparable in age, preoperative left ventricular ejection fraction (median 0.65 in on-pump, 0.65 in off-pump patients, resp.) and the number of performed coronary anastomoses (median 2.0 in on-pump, 2.0 in off-pump, resp.). All patients had been taking aspirin 100 mg in one daily dose, which was stopped for five days preceding the operation. Patients treated with anti-inflammatory agents, either steroids or NSAID, were excluded from the study, as were patients with serum creatinine  $\geq 130 \mu\text{mol/L}$  or with hepatic disorders. No patients were known to suffer from concomitant malignancies. Patients with active infectious diseases are not admitted to elective CABG in our department. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital in Hradec Králové. All participants were informed in detail about the purpose of the study both orally and in writing. They were free to ask any questions. One person refused to participate for reasons he would not specify. All active subjects have given written informed consent.

Cardiopulmonary bypass, off-pump technique and anesthesiological management have been recently described in detail elsewhere [6].

## 3. BLOOD SAMPLING

Venous blood (central venous blood from arteria pulmonalis, peripheral venous blood from an antebrachial vein) was withdrawn in the operating room and on the first postoperative day in the ICU. Afterwards, only peripheral venous blood was taken due to the removal from the patients' vascular bed of all superfluous indwelling cannulas. Since there were practically no differences in results representative of blood samples originating from the respective sampling sites, for the sake of clarity only values obtained from the peripheral venous blood are indicated as results representative of the entire period of investigation. Samples were collected into tubes manufactured by Greiner, Germany.

In both on-pump and off-pump patients, blood was withdrawn at the following time points:

- (i) introduction to anaesthesia, which in both groups represented the baseline or reference value for all parameters measured thereafter;
- (ii) after termination of the operation;
- (iii) the first postoperative day;
- (iv) the third postoperative day;
- (v) the seventh postoperative day.

### 3.1. Blood sample analysis

Untreated blood samples were allowed to clot at room temperature. Serum samples were obtained after centrifugation (2000 g per 8 minutes), aliquoted and immediately frozen. Samples were thawed only once. Serum level of LBP was determined by ELISA kit, cat.number HK315, HyCult biotechnology b.v., The Netherlands. Serum level of sCD14 was evaluated by sCD14 EASIA kit, cat.number KAS0231, BioSource Europe S.A., Belgium. IL-6 was quantitatively measured by commercially available ELISA kit (BenderMed Systems) according manufacturer's instructions. Results were evaluated by spectrophotometry at 450 nm (Multiscan photometer) using Genesis software. CRP was assessed by immunonephelometry on IMAGE 800 (Beckman). PTX3 was detected using detection set (Alexis Biochemicals, Switzerland) cat.no. ALX-850-299-KI01 for sandwich ELISA application that provided capture monoclonal antibody to PTX3 (700 ng/mL), detection polyclonal antibody to PTX3 (25 ng/mL), and recombinant PTX3 (standard). Plates (96 wells, NunclmaxiSorb 446612) were read at 405 nm by an automatic reader (Multiscan photometer) and evaluated by Genesis software.

### 3.2. Statistics

Serum level changes within a time and differences between both groups of patients were compared by two-way analysis of variance for repeated measures and Fisher's post hoc test. Results are expressed as medians and quartiles. Relationships

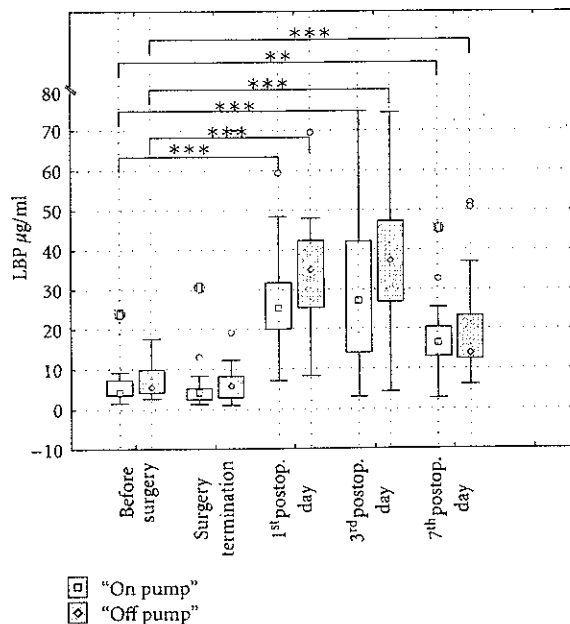


FIGURE 1: Comparison between serum levels of LBP in "on-" and "off-pump" patients  $F(1.32) = 1.96$ ;  $P < .175$ .

between concentrations of different cytokines were assessed using Pearson's correlation. Probability values of  $<.05$  were considered statistically significant. Statistical analyses were performed with Statistica 6 software (StatSoft, USA).

## 4. RESULTS

### 4.1. Changes in the serum level of LBP

The baseline preoperative levels of LBP to which LBP concentrations were statistically compared were nearly identical in both on-pump and off-pump patients ( $6.25 \pm 5.12 \mu\text{g/mL}$ ;  $7.61 \pm 4.79 \mu\text{g/mL}$ , resp.). The same situation was found after finishing surgery indicating that LBP levels are not influenced neither by surgery itself nor by cardiopulmonary bypass. The sharp statistically significant increase of LBP concentrations was found on the 1st postoperative day in both groups of patients. The maximal level of LBP was reached on the 3rd postoperative day in both on-pump and off-pump patients ( $30.33 \pm 9.96 \mu\text{g/mL}$ ;  $37.99 \pm 16.58 \mu\text{g/mL}$ , resp.). The serum levels of LBP declined thereafter being still significantly higher on the 7th postoperative day in both on-pump and off-pump patients ( $18.11 \pm 9.96 \mu\text{g/mL}$ ;  $20.15 \pm 13.79 \mu\text{g/mL}$ , resp.). Surprisingly, the concentrations of LBP were slightly higher in off-pump patients comparing with on-pump patients. However, the statistical significance was not reached comparing on-pump and off-pump patients ( $P < .1715$ ). Results are shown in Figure 1.

To test the hypothesis that LBP is serving as one of acute phase proteins, the correlation between serum levels of LBP and IL-6 which is the principal cytokine regulating acute phase proteins by hepatocytes, and the two members of prototypic pentraxin family acute phase proteins, C-reactive

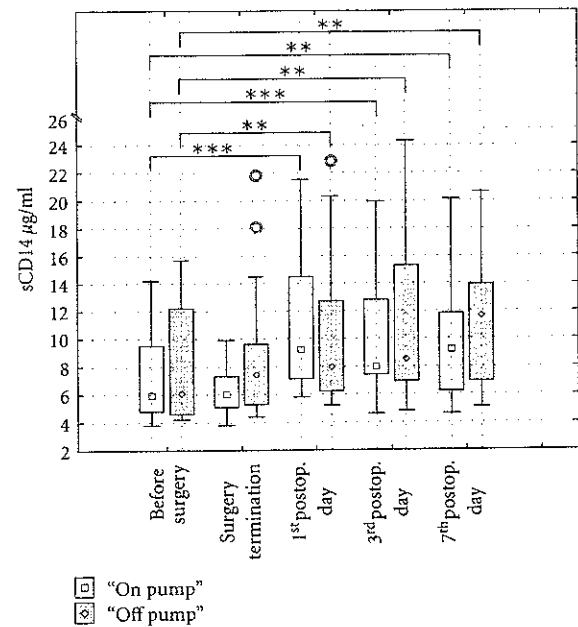


FIGURE 2: Comparison between serum levels of sCD14 in "on-" and "off-pump" patients  $F(1.32) = 0.86$ ;  $P < .417$ .

proteins, and long pentraxin 3, respectively, were tested. No correlations were found thus rejecting our hypothesis (data are not shown).

### 4.2. Changes in the serum level of sCD14

The baseline preoperative levels of sCD14 to which sCD14 concentrations were statistically compared were very similar in both on-pump and off-pump patients ( $7.29 \pm 3.32 \mu\text{g/mL}$ ;  $8.30 \pm 4.26 \mu\text{g/mL}$ , resp.). There was a slight, nonsignificant decrease of sCD14 level in on-pump patients after surgery ( $P = .170$ ), whereas sCD14 concentration was nonsignificantly elevated in off-pump patients at that time. There were different trends in LBP concentration in on-pump and off-pump patients during postoperative period. The maximum of sCD14 concentration in on-pump patients was reached on the 1st postoperative day ( $11.30 \pm 4.93 \mu\text{g/mL}$ ;  $P = .0001$ ) followed by a gradual decrease up to the 7th postoperative day ( $9.41 \pm 4.80 \mu\text{g/mL}$ ;  $P = .009$ ) being still above preoperative baseline level. In contrast, there was a gradual increase of sCD14 serum level from the end of surgery up to the 7th postoperative day when the maximum was reached ( $11.05 \pm 4.57 \mu\text{g/mL}$ ;  $P = .002$ ). In spite of these differences, no significant differences between on-pump and off-pump patients were found ( $P = .417$ ). Results are shown in Figure 2.

To test the hypothesis that sCD14 is serving as one of acute phase proteins, the correlation between serum levels of sCD14 and IL-6 which is the principal cytokine regulating acute phase proteins by hepatocytes, and two members of prototypic pentraxin family acute phase proteins, C-reactive proteins, and long pentraxin 3, respectively, were tested. No

correlations were found thus rejecting our hypothesis (data are not shown).

## 5. DISCUSSION

Numerous danger patterns, both endogenous and exogenous origins, are generated in patients undergoing cardiac surgical operation. Sensing of these danger patterns via innate immunity pattern recognition receptors (PRRs) is followed by the development of inflammatory response. Numerous PRRs are now fully characterized. Amongst them LBP, CD14, MD-2, and TLR-4 are implicated as key factors in innate immunity cells activation by bacterial endotoxin [7].

LBP is a 50-kDa polypeptide mainly synthesized in hepatocytes and is released as a 60-kDa glycoprotein into blood stream after glycosylation. Other sources of LBP synthesis have been identified, such as epithelial cells of mucosa as well as the smooth muscle cells of lung arteries, and heart muscle cells. The amino acid sequence of LBP revealed substantial homology to bactericidal permeability increasing (BPI) protein, another LPS-binding protein originated in innate immunity.

LBP binds to the amphipathic lipid A moieties of LPS with high affinity and has been shown to facilitate the process of LPS monomerization and subsequent presentation to other cellular and humoral binding sites. It catalyzes the transfer of LPS to a binding site of membrane-bound mCD14, which represents one part of cellular-LPS receptor. Adding LBP to a serum-free cell system enhances the LPS-mediated stimulation of CD14-positive cells 100- to 1000-fold. In addition, LBP transfers LPS to soluble sCD14 molecule [8].

We found significantly increased serum levels of LBP in our cardiac surgical patients from the first postoperative day up to the 7th postoperative day in comparison with preoperative level. The maximum, approximately 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , was reached on the 3rd postoperative day with subsequent decline in both off-pump and on-pump patients. It was surprising to recognize that LBP level was even higher in off-pump patients, but no significant differences between on-pump and off-pump patients were found. We have no informations regarding LBP measurement in cardiac surgical patients to compare our results. The only one exception is the work by Fransen et al. [9] who followed LBP concentrations in on-pump patients. Unfortunately, their observation period was only up to 18 hours after declamping aorta. They found significantly increased LBP level at the 8th hour with subsequent increase at the 18th hour after start of reperfusion but maximum was not reached in their observation period.

Several *in vivo* and *in vitro* experiments demonstrated that LBP is a secretory class 1 acute phase protein whose gene is transcriptionally activated by cytokine-inducible nuclear proteins. The transcriptional regulation is induced by IL-1 alone or synergistically by IL-1 and IL-6 leading to a maximum LBP concentration within 24–48 hours after stimulation. This response can be strongly enhanced by TNF- $\alpha$  and dexamethasone [10]. The dynamics of LBP concentrations in our cardiac surgical patients was resembling this kinetics but with prolongation up to the 7th postoperative

day. To test the effect of proinflammatory cytokines on LBP synthesis, the level LBP was correlated with the level of IL-6 which is a principal cytokine regulating acute phase proteins synthesis in the liver. No such correlation was found (data are not shown). The possibility that LBP concentration in blood is influenced by exogenous corticosteroid is also unlikely. There was no significant difference between on-pump and off-pump patients despite the fact that former patient's group is exposed to methylprednisolone which is a standard component in CPB fluid used in our setting.

In humans LBP is constitutively in serum at concentrations of 5–15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . It is in a good concordance with its baseline level in our cardiac surgical patients. Its level is raised 10- to 50-fold during the acute phase reaction [11]. The similar findings were revealed by us in our patients. In contrast to C-reactive protein which level is peaked at the 3rd day in our patients and then rapidly declined, increased level of LBP is sustained up to the 7th postoperative day. It probably reflects the dual role of LBP in an inflammatory reaction. Whereas serving as a potent pattern recognition receptor at low concentrations early during inflammation to amplify the immune response rendering, for example, TNF- $\alpha$  production in macrophages, high concentrations inhibits danger-pattern-induced host cell activation [11]. It can be partly explained by the ability of LBP to transfer LPS to serum lipoproteins thus neutralizing the bioactivity of LPS. LPS has been shown to be physically associated with apoA- or apoB-containing lipoproteins and to transfer LPS into high-(HDL) and low-density lipoproteins (LDL) resulting in the clearance of LPS from the bloodstream. These capabilities were also reported for very-low-density lipoprotein (VLDL) and chylomicrons [12].

Up to now, few studies have been published evaluating the value of LBP as a diagnostic marker in patients with SIRS of noninfectious versus infectious origin and as potential prognostic marker predicting outcome [13]. These results can not be proven in our cardiac surgical patients because no cultivation-confirmed bacterial infections were found in this group. Information regarding LBP level during cardiac surgery are very sparse. It is reported by Vreugdenhil et al. [12] that plasma level of LBP is gradually increased from the 8th to 18th hour after declamping aorta but the maximum was not reached in their observation period. It is resembling our data but in our patients the maximum in LBP production was reached on the 3rd postoperative day. The role of LBP as acute phase proteins is unlikely in our cardiac surgical patients because no correlations with either IL-6, CRP, or PTX3 were found. It is extremely interesting that no significant differences in the serum level of LBP between on-pump and off-pump patients were found in our study. It is generally assumed that splanchnic hypoperfusion during extracorporeal circulation together with steady laminar blood flow that is generated by the heart-lung machine instead of the pulsative blood flow generated by each cardiac contraction, result in gut wall ischemia, subsequent increase of villous capillary permeability and transient endotoxemia. It is supposed that these changes are not so profound in off-pump patients. Lack of differences in LBP concentration between on-pump and off-pump patients could be interpreted in at least two



ways. First, the intensity of the exposition to bacterial danger pattern is similar in both on-pump and off-pump patients. Second, LBP production is stimulated by another still unknown danger pattern which is identical in both on-pump and off-pump patients.

The second aim of our study was to follow the changes of soluble form of CD14 molecule (sCD14) during cardiac surgical operation. CD14 is a glycosylphosphatidyl-inositol-anchored protein constitutively expressed on the surface of various cells, including monocytes, macrophages, neutrophils, B-cells, dendritic cells, as well as several other cell types of nonhematopoietic origin. Aside of this membrane-bound state, CD14 is also found in a circulating soluble form [14]. CD14 molecule is the part of a receptor system of innate immunity cells to identify danger patterns of both exogenous and endogenous origin. This system is represented by the combined actions of the membrane-bound isoform of CD14 with the central transmembrane signaling unit of TLR-4 and the accessory protein MD-2 [15].

Two opposite functions have been described for sCD14. It can either reduce endotoxin-induced activities by competing with mCD14 for LPS binding or mediates the LPS-induced activation of non-CD14-expressing endothelial, epithelial, and smooth muscle cells. In addition, CD14 may function as a receptor for other microbial products, human heat shock proteins Hsp60, and other endogenous ligands such as ceramides, phospholipids, and modified lipoproteins [16].

We found significantly increased serum level of sCD14 from the 1st up to 7th postoperative days compared to the preoperative values in both on-pump and off-pump patients. Surprisingly, there are no significant differences between on-pump and off-pump patients. Evenmore, while reaching the maximum on the 1st postoperative day in on-pump patients, sCD14 level was gradually increasing in off-pump patients up to the 7th postoperative day (end of observation). It is not easy to discuss our findings. The level of sCD14 is not commonly assessed in cardiac surgical patients. It could be possible to extrapolate from patients undergoing major elective abdominal surgery as was reported by Hiki et al. [17]. They found slight decrease 6 hours after incision of skin, reaching the maximum on the 1st postoperative day thereafter decline to approximately baseline preoperative level on the 10th postoperative day. This pattern is resembling our off-pump patients with the exception that maximal concentration in our patients was slightly higher (11.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  versus 9.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Several clinical studies have reported elevated serum levels of sCD14 in various inflammatory conditions such as Kawasaki disease [18]. Furthermore, correlation between sCD14 and severity of the trauma in polytraumatized patients have also been published [19]. Besides its function in LPS signaling, sCD14 might therefore play a role in inflammatory processes by controlling the immune system level of response. It has recently been demonstrated that sCD14 is a regulatory factor capable of modulating cellular and humoral immune responses by interacting directly with T and B cells [20]. Moreover, it has been suggested that sCD14 could be an acute phase protein, because apart from proteases-mediated

shedding, sCD14 is also produced by hepatocytes, which represent the major source of acute phase proteins. Indeed, Bas et al. [14] in their clinical and experimental studies clearly showed that in patients suffering from rheumatoid arthritis, serum level of sCD14 did not correlate with the number of leukocytes, thus excluding an important source from leukocyte membrane-bound CD14, by protease-mediated shedding. In contrast, serum levels of sCD14 in these patients correlated with those of C-reactive protein, a classical acute phase protein, and IL-6, a cytokine known to regulate the synthesis of APP in the liver. We also sought for such correlations in our cardiac surgical patients. No statistically significant correlations between serum level of sCD14 and either IL-6 concentration or CRP and PTX3 levels were found in our study. It could be concluded from our results that sCD14 is not produced as one of acute phase proteins in cardiac surgery. The source of sCD14 in these patients remains enigmatic. Whether sCD14 in cardiac surgery originates mainly from leukocytes by protease-mediated shedding warrants further investigations.

In conclusion, we found significantly increased levels of both sCD14 and LBP in the early postoperative period in cardiac surgical patients. We found no significant differences between on-pump and off-pump patients in the serum levels of these parameters. Finally, both LBP and sCD14 molecules do not seem to act as acute phase proteins in cardiac surgical patients.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by a research program of The Czech Ministry of Youth, School and Physical Activities, no. MSM 0021620812, and Internal Grant Agency of Ministry of Health, Czech Republic, no. NR/9090-4.

#### ABBREVIATIONS

|        |   |
|--------|---|
| IL:    | Interleukin                             |
| LBP:   | Lipopolysaccharide binding protein      |
| LPS:   | Lipopolysaccharide                      |
| PAMP:  | Pathogen associated molecular patterns  |
| PRR:   | Pattern recognition receptors           |
| PTX3:  | Long pentraxin 3                        |
| sCD14: | Soluble form of CD14 molecule           |
| SIRS:  | Systemic inflammatory response syndrome |
| TLR:   | Toll-like receptors                     |

#### REFERENCES

- [1] L. A. Brasil, W. J. Gomes, R. Salomão, and E. Buffolo, "Inflammatory response after myocardial revascularization with or without cardiopulmonary bypass," *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 66, no. 1, pp. 56–59, 1998.
- [2] J. H. Levy and K. A. Tanaka, "Inflammatory response to cardiopulmonary bypass," *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 75, no. 2, pp. S715–S720, 2003.
- [3] M. S. Chew, I. Brandslund, V. Brix-Christensen, et al., "Tissue injury and the inflammatory response to pediatric cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a descriptive study," *Anesthesiology*, vol. 94, no. 5, pp. 745–753, 2001.

- [4] K. M. Ubenauf, M. Krueger, P. Henneke, and R. Berner, "Lipopolysaccharide binding protein is a potential marker for invasive bacterial infections in children," *Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 26, no. 2, pp. 159–162, 2007.
- [5] D. C. Hargreaves and R. Medzhitov, "Innate sensors of microbial infection," *Journal of Clinical Immunology*, vol. 25, no. 6, pp. 503–510, 2005.
- [6] P. Kunes, V. Lonsky, J. Mandak, et al., "The long pentraxin 3 in cardiac surgery: distinct responses in "on-pump" and "off-pump" patients," *Scandinavian Cardiovascular Journal*, vol. 41, no. 3, pp. 171–179, 2007.
- [7] J. Weiss, "Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria," *Biochemical Society Transactions*, vol. 31, no. 4, pp. 785–790, 2003.
- [8] J. Zweigner, R. R. Schumann, and J. R. Weber, "The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response," *Microbes and Infection*, vol. 8, no. 3, pp. 946–952, 2006.
- [9] E. Fransen, J. Maessen, M. Dentener, N. Senden, and W. Buurman, "Impact of blood transfusions on inflammatory mediator release in patients undergoing cardiac surgery," *Chest*, vol. 116, no. 5, pp. 1233–1239, 1999.
- [10] M. A. Dentener, A. C. E. Vreugdenhil, P. H. M. Hoet, et al., "Production of the acute-phase protein lipopolysaccharide-binding protein by respiratory type II epithelial cells: implications for local defense to bacterial endotoxins," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 23, no. 2, pp. 146–153, 2000.
- [11] J. Zweigner, H.-J. Gramm, O. C. Singer, K. Wegscheider, and R. R. Schumann, "High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes," *Blood*, vol. 98, no. 13, pp. 3800–3808, 2001.
- [12] A. C. E. Vreugdenhil, C. H. Rousseau, T. Hartung, J. W. M. Greve, C. van't Veer, and W. A. Buurman, "Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons," *The Journal of Immunology*, vol. 170, no. 3, pp. 1399–1405, 2003.
- [13] M. Pavcnik-Arnol, S. Hojker, and M. Derganc, "Lipopolysaccharide-binding protein in critically ill neonates and children with suspected infection: comparison with procalcitonin, interleukin-6, and C-reactive protein," *Intensive Care Medicine*, vol. 30, no. 7, pp. 1454–1460, 2004.
- [14] S. Bas, B. R. Gauthier, U. Spenato, S. Stingelin, and C. Gabay, "CD14 is an acute-phase protein," *The Journal of Immunology*, vol. 172, no. 7, pp. 4470–4479, 2004.
- [15] R. W. Finberg, F. Re, L. Popova, D. T. Golenbock, and E. A. Kurt-Jones, "Cell activation by Toll-like receptors: role of LBP and CD14," *Journal of Endotoxin Research*, vol. 10, no. 6, pp. 413–418, 2004.
- [16] G. Schmitz and E. Ors6, "CD14 signalling in lipid rafts: new ligands and co-receptors," *Current Opinion in Lipidology*, vol. 13, no. 5, pp. 513–521, 2002.
- [17] N. Hiki, D. Berger, Y. Mimura, et al., "Release of endotoxin-binding proteins during major elective surgery: role of soluble CD14 in phagocytic activation," *World Journal of Surgery*, vol. 24, no. 5, pp. 499–506, 2000.
- [18] S. Takeshita, K. Nakatani, H. Tsujimoto, Y. Kawamura, H. Kawase, and I. Sekine, "Increased levels of circulating soluble CD14 in Kawasaki disease," *Clinical & Experimental Immunology*, vol. 119, no. 2, pp. 376–381, 2000.
- [19] C. Kruger, C. Schutt, U. Obertacke, et al., "Serum CD14 levels in polytraumatized & severely burned patients," *Clinical & Experimental Immunology*, vol. 85, no. 2, pp. 297–301, 1991.
- [20] M. A. Arias, J. E. Rey Nores, N. Vita, et al., "Cutting edge: human B cell function is regulated by interaction with soluble CD14: opposite effects on IgG1 and IgE production," *The Journal of Immunology*, vol. 164, no. 7, pp. 3480–3485, 2000.

ORIGINAL ARTICLE

## The long pentraxin 3 in cardiac surgery: Distinct responses in “on-pump” and “off-pump” patients

PAVEL KUNES<sup>1,2</sup>, VLADIMIR LONSKY<sup>1</sup>, JIRI MANDAK<sup>1</sup>, MARTINA KOLACKOVA<sup>2</sup>, CTIRAD ANDRYS<sup>2</sup>, MANUELA KUDLOVA<sup>2</sup> & JAN KREJSEK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Cardiac Surgery, Charles University in Prague, University Hospital and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Czech Republic and <sup>2</sup>Institute of Clinical Immunology and Allergology, Charles University in Prague, University Hospital and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Czech Republic

### Abstract

**Objective.** Pentraxin 3 (PTX3) is a newly identified acute phase reactant with non-redundant functions in innate immunity. The purpose of this study was to assess the kinetics of release of PTX3 in cardiac surgical patients, operated on either with or without the use of cardiopulmonary bypass (CPB). **Design.** Thirty-four patients, seventeen in each group, were randomly assigned to CABG surgery performed either with (“on-pump”) or without (“off-pump”) CPB. Blood samples were collected both during and after the operation up to the 7<sup>th</sup> day. **Results.** In patients operated on with the use of CPB, PTX3 levels increased throughout the operation. Compared to baseline levels the highest PTX3 value ( $p < 0.000$ ) was attained on the 1<sup>st</sup> postoperative day in both “on-pump” and “off-pump” patients. In contrast to CPB patients, however, PTX3 levels in the latter group declined slowly, remaining elevated as long as the 3<sup>rd</sup> postoperative day ( $p < 0.042$ ). **Conclusions.** Operations performed with the use of CPB are associated with a more pronounced release of PTX3 immediately after operation.

**Key words:** Cardiac surgery, cardiopulmonary bypass, inflammatory response, pentraxin 3

Cardiac surgery performed with the use of cardiopulmonary bypass (CPB) has been recognized as one of the leading causes of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS), a condition of complex pathophysiology that might severely compromise the outcome of surgery or even lead to death. Coronary artery bypass grafting (CABG) which avoids the use of CPB, alternatively called “off-pump” or OPCAB surgery, is now increasingly used by many surgical teams instead of classical CPB in order to reduce as much of SIRS as can be achieved (1). Many studies conducted in the last few years, which investigated various inflammatory markers, have shown reduced inflammation in patients operated on by the “off-pump” technique compared to “on-pump” surgery (2). On the other hand, any definitive proof in favor of “off-pump” surgery in terms of reduced long-term mortality compared to its “on-pump” counterpart is still missing. Moreover, some studies dealing with the inflammatory response elicited in “on-pump”

versus “off-pump” CABG patients arrived at the conclusion that most of the differences observed between the two procedures were mostly of quantitative rather than qualitative nature (3–5). Thus, the very trauma of surgery seems to be more relevant in starting off SIRS rather than cardiopulmonary bypass itself, the latter adding a CPB-specific fraction on top of other unfavorable events (6–8).

In humans, there are two classical or short pentraxins, namely the C-reactive protein (CRP) and the serum amyloid P component (SAP). Both of them are operative as acute phase reactants, with CRP being by far the more prominent one, while the function of the latter is not yet entirely understood. The short pentraxins are produced in the liver under the regulatory control of interleukin (IL)-6. Recently, additional sites of CRP production have been identified in man, namely the kidney and the vascular wall (9). Pentraxin-3 (PTX3), a newly identified prototypic long pentraxin, is structurally

Correspondence: Jan Krejsek, Department of Clinical Immunology and Allergy, Sokolská 581, Medical Faculty and University Hospital, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic. Tel: +420 495 833 454. Fax: +420 495 832 015. E-mail: krejsek@fnhk.cz

(Received 11 January 2007; accepted 5 March 2007)

ISSN 1401-7431 print/ISSN 1651-2006 online © 2007 Taylor & Francis  
DOI: 10.1080/14017430701324262

related to, yet in some aspects completely distinct from the classical short pentraxins. All pentraxins are archaic proteins, the molecular structure of which has been conserved throughout evolution (10).

PTX3 is produced by dendritic cells, macrophages, and endothelial cells in response to inflammatory stimuli. Peri and coworkers showed in 37 patients with acute myocardial infarction (AMI) that plasma PTX3 levels peaked approximately 7 hours after the onset of chest pain. Peak levels of CRP, however, are observed later, about 24 to 48 h after symptom onset. Thus, in the setting of acute myocardial infarction, PTX3 represents an early marker of heart muscle damage irrespective of its extent, whose peak plasma levels can be assessed well before those of CRP (11). The same authors found that PTX3 was the most reliable prognostic marker reflecting 3 month mortality after the index event. The predictive value of PTX3 eclipsed that conveyed by creatine kinase (CK), troponin T (TnT) or N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) levels as well as that of CRP itself (12).

PTX3 displays a predilection for the vascular wall. In humans with small vessel vasculitides, PTX3 is found in deposits formed by dying cells that assemble in perivascular areas of the diseased vessels, or even systemically in the circulation where it is considered to reflect the overall endothelial activation (13). PTX3 synthesis, both mRNA and protein, can be induced by atherogenic lipoproteins in vascular smooth muscle cells (14). In endothelial cells, PTX3 amplifies the synthesis of tissue factor, which itself is induced by TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and/or lipopolysaccharide (LPS), all of these peptides being in turn potent inducers of PTX3 production (15). In advanced atherosclerotic lesions, PTX3 is elaborated by infiltrating macrophages and surviving endothelial cells (16). PTX3 seems to influence atherogenesis all over its course.

The present study was designed in order to assess the kinetics of release and the serum levels attained by PTX3 in a consecutive cohort of patients scheduled for routine myocardial revascularization either with ("on-pump") or without ("off-pump") the use of cardiopulmonary bypass. The second goal of the study was to compare the PTX3 response between the two groups. To determine the extent of the acute phase response, serum levels of CRP and IL-6 were measured at the same time points as those of PTX3. Additionally, serum levels of interleukin (IL)-10 were measured, the most potent anti-inflammatory cytokine whose influence on PTX3 production differs from that exerted by the established members of the cytokine network. According to results published by other investigators,

"on-pump" and "off-pump" patients do not substantially differ either in the magnitude of the acute phase response or in the plasma/serum levels of most inflammatory markers. We hypothesized that PTX3, being both an acute phase reactant and a soluble pattern-recognition receptor elaborated within the myocardium, might reflect the extent of injury inflicted to the heart by the respective surgical methods.

## Methods

### Subjects

Thirty-four patients scheduled for elective CABG in December 2005 were randomized either to "on-pump" (n = 17) or to "off-pump" (n = 17) surgery. There were 14 men and three women in the "on-pump" group while there were 12 men and five women in the "off-pump" group. The patients were randomly assigned either to "on-pump" or to "off-pump" surgery by a member of the cardiac surgery staff outside the research team who was blinded to all variables pertinent to the study design. Patients in both groups were comparable in age ( $70.5 \pm 7.1$  in "on-pump",  $66.4 \pm 10.1$  in "off-pump" patients, respectively), preoperative left ventricular ejection fraction (0.65 in "on-pump", 0.65 in "off-pump" patients, respectively) and the number of coronary anastomoses (median value of 2.0 in "on-pump", 2.0 in "off-pump", respectively). All patients had been taking aspirin 100 mg in one daily dose, which was stopped for 5 days preceding the operation. Patients treated with anti-inflammatory agents, either steroids or NSAID, were excluded from the study, as were patients with serum creatinine  $\geq 130$   $\mu\text{mol/l}$  or with hepatic disorders. No patients were known to suffer from concomitant malignancies. Patients with active infectious diseases are not admitted to elective CABG in our department. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital in Hradec Králové. All participants were informed in detail about the purpose of the study both orally and in writing. They were free to ask any questions. One person refused to participate for reasons he would not specify. All active subjects have given written informed consent.

EUROSCORE is not routinely assessed in our patients.

### Cardiopulmonary bypass

CPB was established using a two-stage venous drainage and ascending aortic return.

A roller pump (S3 Stöckert®, Stöckert Instrumente GmbH, München, Germany), a membrane

oxygenator (Dideco Avant 903<sup>®</sup>, Dideco Mirandola, Italy) in a closed modification with collapsible reservoir, a cardiotomy suction device and a 40 µm arterial line filter (Dideco Micro 40<sup>®</sup>, Mirandola, Italy) were integrated into the extracorporeal circuit. The system surface was not treated with any hemocompatible substance. The priming solution consisted of:

- 500 ml Ringer's lactate,
- 500 ml Rheodextran (Rheomacrodex),
- 5000 IU heparin,
- 500 000 IU aprotinin,
- 80 ml natrium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub> 8.4%),
- 20 ml magnesium sulphate 10%,
- 500 mg methylprednisolone
- manitol 1 g/kg body weight.

The priming volume was calculated to achieve haematocrit levels above 0.22.

Intravenously, heparin was administered at 300 IU/kg body weight to maintain an activated clotting time (ACT) above 480 s during bypass. No patient received either aprotinin or corticosteroid intravenously. Pump flow rates averaged 2.4 l/min/m<sup>2</sup> body surface area with pressure maintained at 50–60 mmHg. The patients were kept normothermic. Cardioplegic arrest was induced with 800–1000 ml of a St. Thomas cold crystalloid solution, administered antegradely into the aortic root with added doses of 200–300 ml every 30 min whenever needed. All patients received an internal artery mammary graft to the left anterior descending coronary artery (LAD). The central aorto-venous anastomoses were performed during the reperfusion phase of CPB with the heart beating. After termination of bypass, heparin anticoagulation was antagonized by protamine sulphate at a 1:1 dosage.

Cross-clamping of the aorta in this group took in average 49 min the duration of cardiopulmonary bypass amounted in average to 84 min.

#### "Off-pump" technique

All operations were performed via a median sternotomy incision. Two to three traction sutures in the postero-lateral pericardium were placed. Regional myocardial stabilization was achieved with commercially available suction stabilizers. No preconditioning was performed. The target coronary vessels were snared with a silicone vascular loop proximal to the anastomotic site. An intracoronary shunt was used during construction of the anastomoses. The left internal mammary artery to LAD was the first anastomosis in all patients. The central aorto-venous anastomoses were established with partial occlusion

of the ascending aorta. In OPCAB patients, heparin was given at a dosage of 200 IU/kg to achieve an ACT over 300 s. After completion of the final anastomosis, heparin was antagonized with protamine sulphate at a 1:1 dosage to return the ACT to preoperative levels.

#### Anesthesiological management

All patients were anaesthetised according to the current protocol of our department. Anaesthesia was induced with thiopental and midazolam. Muscular relaxation was achieved with cisatracurium. Anaesthesia was maintained with isoflurane and intermittent sufentanyl. Continuous propofol was used as a supplement if needed. Volume-controlled ventilation with FiO<sub>2</sub> of 0.50 was employed. Mean arterial pressure was kept over 50 mmHg with norepinephrine administered whenever required.

#### Blood sampling

Both venous blood (central venous blood from arteria pulmonalis, peripheral venous blood from an antebrachial vein) and arterial blood from arteria radialis was withdrawn in the operating room and on the first postoperative day in the ICU. Afterwards, only peripheral venous blood was taken due to the removal from the patients' vascular bed of all superfluous indwelling cannulas. Since there were practically no differences in results representative of blood samples originating from the respective sampling sites, for the sake of clarity only values obtained from the peripheral venous blood are indicated as results representative of the entire period of investigation. Samples were collected into tubes manufactured by Greiner, Germany.

In "on-pump" patients, blood was withdrawn at following time points:

1. introduction to anaesthesia, which in both groups represented the baseline or reference value for all mediators measured thereafter
  - a. before cross-clamping of the aorta
  - b. after aortic cross-clamp release
  - c. after termination of CPB
2. after termination of the operation
3. the first postoperative day
4. the third postoperative day
5. the seventh postoperative day.

In "off-pump" patients, blood was withdrawn at:

1. introduction to anaesthesia
2. after termination of the operation
3. the first postoperative day

4. the third postoperative day
5. the seventh postoperative day.

#### Blood sample analysis

IL-6 and IL-10 were quantitatively detected by commercially available ELISA kits (BenderMed Systems, RD Systems, respectively) and results were evaluated on reader (450 nm, Photometer Multiscan) by Genesis software. CRP was assessed by immunonephelometry on IMAGE 800 (Beckman). PTX3 was detected using detection set (Alexis Biochemicals, Switzerland) cat.no. ALX-850-299-KI01 for sandwich ELISA application that provided capture monoclonal antibody to PTX3 (700 ng/ml), detection polyclonal antibody to PTX3 (25 ng/ml) and recombinant PTX3 (standard). Plates (96 wells, NunclmaxiSorb 446612) were read at 405 nm in automatic reader (Photometer Multiscan) and evaluated by Genesis software. Serum was treated, stored and processed according to the manufacturer's instructions.

#### Statistics

Results obtained by ANOVA are presented as means  $\pm$  standard deviations. Results from the Mann-Whitney U test are expressed as medians. Data calculated by unpaired t-test are expressed as means  $\pm$  standard deviations. Each parameter changes during operation were analyzed by ANOVA for repeated measures followed by Fisher's test for *post hoc* comparisons. Differences between both groups of patients were determined using two-way ANOVA for repeated measures and Fisher's *post*

*hoc* test. Relationships between concentrations of cytokines were assessed using Pearson's correlation. Differences in values of left ventricular ejection fraction between both groups were evaluated by the Mann-Whitney U test. Unpaired t-test and  $\chi^2$  test were performed to exclude confounding effects of differences in age and sex in both groups. Probability values of  $<0.05$  were considered statistically significant. Statistical analysis was performed with Statistica 5.5 software (StatSoft, USA).

## Results

### Pentraxin 3

"On-pump group". In the "on-pump" group (Figure 1), the reference serum level of PTX3 (time point 1, before introduction to anaesthesia) displayed a value of  $0.5 \pm 0.6$  ng/ml. After an insignificant drop before aortic cross-clamping (time point 1a), which might have reflected the lack of correction for hemodilution, there was a steady increase in serum PTX3 levels throughout the operation. Statistically significant peaks were attained after termination of the CPB (time point 1c; PTX3 level of  $1.0 \pm 0.5$  ng/ml;  $p < 0.000$ ) and after termination of the operation (time point 2; PTX3 level of  $0.9 \pm 0.5$  ng/ml;  $p < 0.004$ ). The highest PTX3 value throughout the whole observation period ( $1.5 \pm 0.8$  ng/ml;  $p < 0.000$ ) was achieved on the 1<sup>st</sup> postoperative day (time point 3). Thereafter, PTX3 levels started to decrease, returning to or slightly below the baseline level on the 7<sup>th</sup> postoperative day (time point 5) with a value of  $0.3 \pm 0.2$  ng/ml ( $p < 0.365$ ).

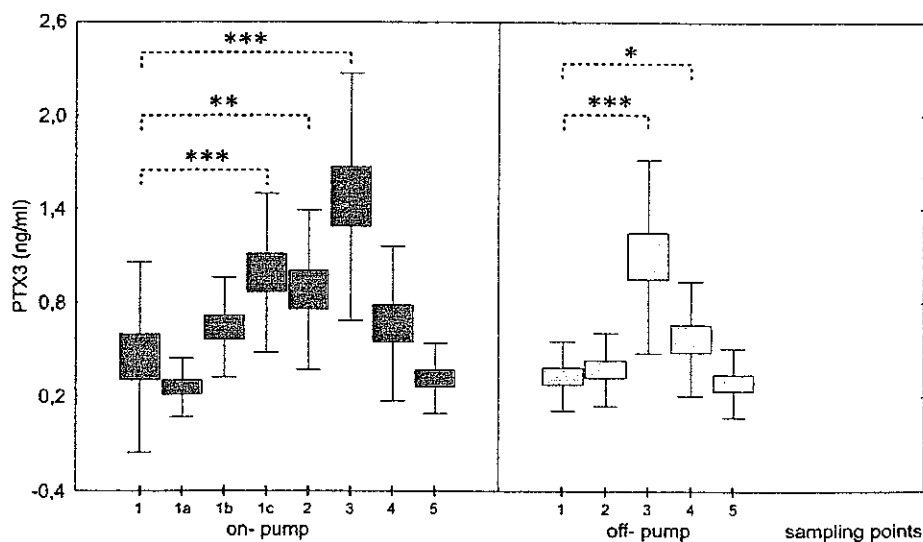


Figure 1. Serum levels of PTX3 in on-pump and off-pump patients on-pump:  $F(7.112) = 14.76$ ;  $p < 0.0000$  off-pump:  $F(4.64) = 16.82$ ;  $p < 0.0000$ .

"Off-pump group". The "off-pump" group began with a baseline PTX3 level of  $0.3 \pm 0.2$  ng/ml at time point 1. A statistically significant increase was reached at time point 3, i.e. on the 1<sup>st</sup> postoperative day, with PTX3 levels attaining  $1.1 \pm 0.6$  ng/ml ( $p < 0.000$ ). By contrast, only an insignificant rise in PTX3 level of  $0.4 \pm 0.2$  ng/ml ( $p < 0.704$ ) was observed after termination of the operation (time point 2). Contrary to CPB patients, PTX3 levels in "off-pump" patients remained elevated at time point 4 (the 3<sup>rd</sup> postoperative day, PTX3  $0.6 \pm 0.4$  ng/ml;  $p < 0.042$ ), returning to baseline values on the 7<sup>th</sup> postoperative day.

When comparing the two groups of cardiac surgical patients in parallel, both of them exhibited significant increases in serum PTX3 levels during and after the operation. However, there were substantial differences between the groups both in the kinetics of PTX3 release and in the overall magnitude of the PTX3 response. In CPB patients, the rise in serum PTX3 occurred earlier than in OPCAB patients. In both groups, absolute peaks in serum PTX3 levels have been achieved jointly on the 1<sup>st</sup> postoperative day, with the difference between the respective values ( $1.5 \pm 0.8$  ng/ml versus  $1.1 \pm 0.6$  ng/ml), however, having not reached a statistical significance. The most striking difference between the two groups was observed after termination of the operation (PTX3 of  $0.9 \pm 0.5$  ng/ml in the CPB group vs.  $0.4 \pm 0.2$  ng/ml in the OPCAB group;  $p = 0.025$ ).

*C-reactive protein*

"On-pump group". In the "on-pump" group (Figure 2), baseline levels of serum CRP ( $4 \pm 3.4$  mg/l) in-

creased on the 1<sup>st</sup> postoperative day ( $86 \pm 27.3$  mg/l), reached an apex of  $145.8 \pm 71.9$  mg/l on the 3<sup>rd</sup> postoperative day, and remained elevated above baseline as long as the 7<sup>th</sup> postoperative day ( $39.1 \pm 23.3$  mg/l). During the course of the operation, CRP levels decreased slightly below the baseline level. However, this finding should be accounted for as an artifact, once again due to the lack of correction for hemodilution.

"Off-pump" group. In the "off-pump" group, an identical kinetics of CRP release was observed as in the "on-pump" counterpart. The absence of any difference between the two groups stands out still further when superimposing the two tracings of CRP release, which converge or even fuse one almost indistinguishable curve.

*Interleukin-6*

"On-pump" group. In the "on-pump" group (Figure 3), baseline serum IL-6 levels of  $1.5 \pm 0.9$  pg/ml increased throughout the operation notwithstanding the omission of correction for hemodilution, with the first statistically significant peak attained at time point 1c (IL-6 of  $4.8 \pm 1.8$  pg/ml;  $p < 0.000$ ) and the everest peak attained after termination of the operation (IL-6 of  $8.4 \pm 4.7$  pg/ml;  $p < 0.000$ ). Thereafter, IL-6 values started to decrease, remaining still on statistically significant levels on the 1<sup>st</sup> and on the 3<sup>rd</sup> postoperative day (IL-6 of  $6.9 \pm 5.2$  pg/ml;  $p < 0.000$ , and IL-6 of  $4.2 \pm 2.8$  pg/ml;  $p < 0.003$ , respectively). By the 7<sup>th</sup> postoperative day, IL-6 levels returned to baseline.

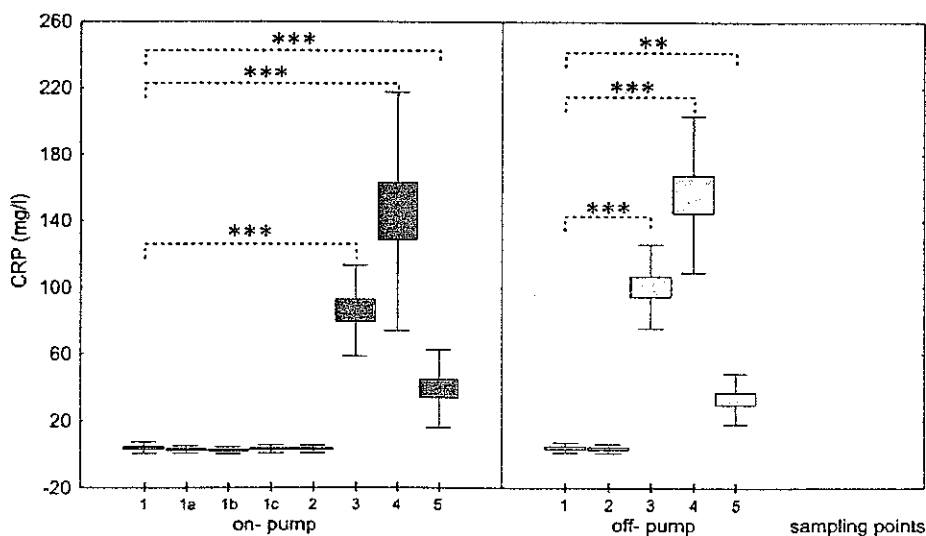


Figure 2. Serum levels of CRP in on-pump and off-pump patients on-pump:  $F(7.112) = 64.96$ ;  $p < 0.000$  off-pump:  $F(4.64) = 134.01$ ;  $p < 0.0000$ .

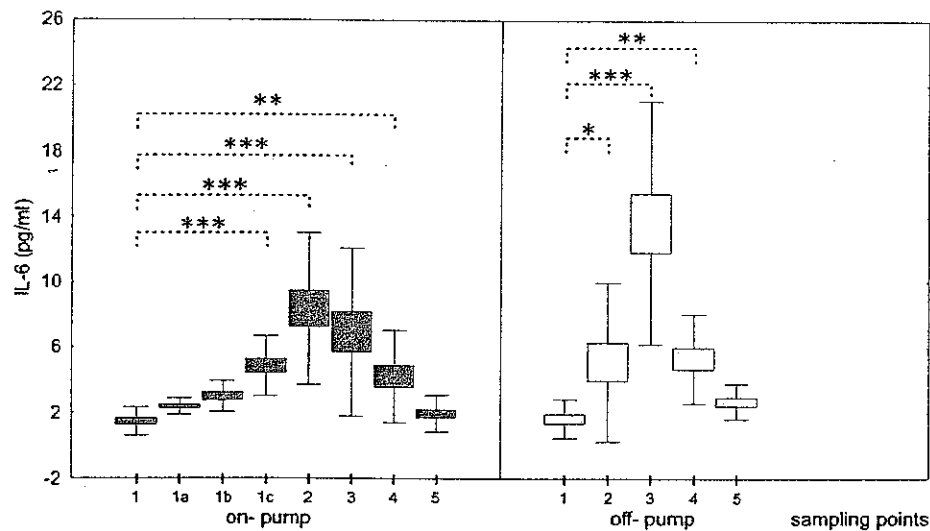


Figure 3. Serum levels of IL-6 in on-pump and off-pump patients on-pump:  $F(7.112) = 15.28$ ;  $p < 0.0000$  off-pump:  $F(4.64) = 24.42$ ;  $p < 0.0000$ .

**“Off-pump” group.** In the “off-pump” group, the most prominent increase in serum IL-6 levels, which started from the baseline value of  $1.6 \pm 1.2$  pg/ml, was attained on the 1<sup>st</sup> postoperative day. It has reached a peak value of  $13.6 \pm 7.5$  pg/ml;  $p < 0.000$ . There were also significant increases after termination of the operation (IL-6 of  $5.1 \pm 4.9$  pg/ml;  $p < 0.012$ ) and on the 3<sup>rd</sup> postoperative day (IL-6 of  $5.3 \pm 2.7$ ;  $p < 0.008$ ). The elevation persisting on the 7<sup>th</sup> postoperative day (IL-6 of  $2.7 \pm 1.1$  pg/ml) did not reach statistical significance ( $p < 0.433$ ).

When superimposing the two curves of IL-6 release, a marked difference between the “on-pump” and the “off-pump” groups can be seen. In CPB patients, the highest value has been achieved after termination of the operation. The OPCAB patients reached their peak level on the 1<sup>st</sup> postoperative day. The highest value of IL-6 reached by OPCAB patients exceeded nearly twofold the peak level of IL-6 achieved by their CPB counterparts, albeit at different time points. IL-6 is known to be produced by the ischemic/reperfused myocardium and to be responsible of much of the reperfusion injury seen in AMI or CPB patients (17,18). Furthermore, circulating IL-6 is known to be increased in patients suffering from heart failure (19) and in patients struck by circulatory shock irrespective of its origin, with the heart being once more a prominent site of its production (20,21). However, our patients from neither group suffered from any clinically overt sequelae of surgical manipulation with the heart muscle. Moreover, as to the highest IL-6 levels attained by our patients, we would have expected the CPB group to override unequivocally the OPCAB cohort, owing to the

global myocardial ischemia produced by cross-clamping of the aorta and followed by reintroduction of oxygenated blood in the former group. A plausible explanation of this seeming discrepancy is afforded by the entry of interleukin-10.

#### Interleukin-10

**“On pump” group.** In the “on-pump” group (Figure 4), baseline serum IL-10 levels of  $2.4 \pm 1.9$  pg/ml also increased throughout the operation, reaching values of  $33.3 \pm 46.0$  pg/ml before aortic cross-clamping ( $p < 0.644$ ; statistically insignificant),  $79.9 \pm 83.3$  pg/ml after aortic cross-clamp release ( $p < 0.247$ ; statistically insignificant). The steady increase of IL-10 levels still continued after termination of cardiopulmonary bypass up to values of  $318.8 \pm 282.6$  pg/ml ( $p < 0.000$ ). The absolute peak of  $619.0 \pm 500.5$  pg/ml ( $p < 0.000$ ) has been attained after termination of the operation. Thereafter, an abrupt decline set in with values of  $21.0 \pm 11.1$  pg/ml ( $p < 0.782$ ; statistically insignificant) on the 1<sup>st</sup> postoperative day,  $10.4 \pm 9.3$  pg/ml ( $p < 0.905$ ; statistically insignificant) on the 3<sup>rd</sup> postoperative day and  $7.4 \pm 10.3$  ( $p < 0.941$ ; statistically insignificant) on the 7<sup>th</sup> postoperative day.

**“Off-pump” group.** In the “off-pump” group, which started with the baseline IL-10 level of  $4.1 \pm 2.7$  pg/ml, the most prominent increase in serum IL-10 levels was attained on the 1<sup>st</sup> postoperative day, having come up to an average value of  $22.0 \pm 15.0$  pg/ml ( $p < 0.000$ ). Despite the high statistical significance of this result, it should be noted that all levels of IL-10 reached by the OPCAB patients were



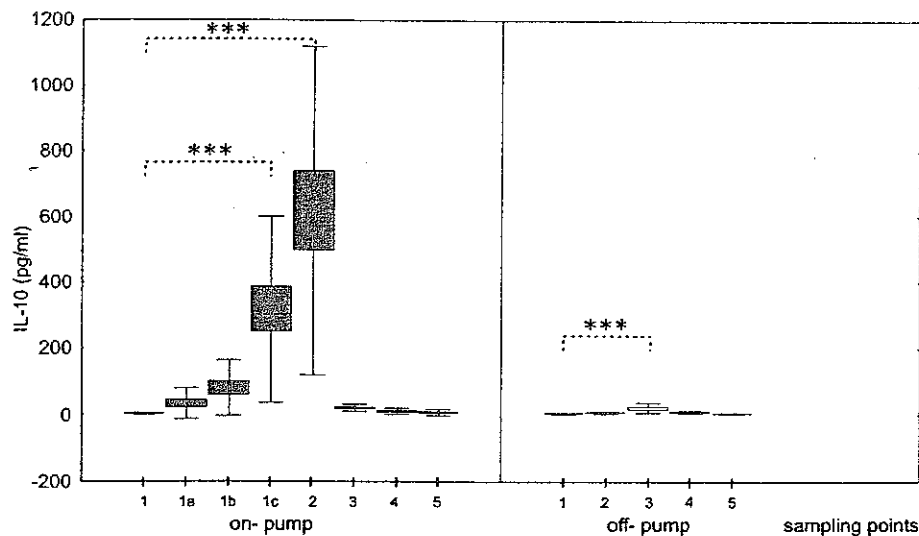


Figure 4. Serum levels of IL-10 in on-pump and off-pump patients on-pump:  $F(7.112) = 22.11$ ;  $p < 0.0000$  off-pump:  $F(4.64) = 17.66$ ;  $p < 0.0000$ .

more than an order of magnitude lower than IL-10 levels in the CPB group. In OPCAB patients, IL-10 developed increases also at time point 2 ( $7.1 \pm 3.1$  pg/ml;  $p < 0.223$ ) and at time point 4 ( $8.6 \pm 3.5$  pg/ml;  $p < 0.071$ ).

Due to the strikingly different peak values of IL-10 achieved in each group, an attempt to superimpose the two kinetics curves upon an identical y axis produced two individual, totally discordant tracings: an almost linear curve typical for the OPCAB patients, whereas that representative of the CPB group exhibited a sharply protruding peak demonstrable after termination of the operation. In keeping with other authors, we assume that the paramount increase of IL-10 in the CPB group represents a feedback regulation mechanism, which in ample advance dampens the attempts of pro-inflammatory mediators TNF- $\alpha$  and/or IL-1 $\beta$  to increase their respective blood concentrations. If not tamed in due time and in due extent, the above mediators, with the assistance of many others headed by IL-6, would be ready starters of full-blown SIRS (22). Most researchers, while indeed finding steady increases of circulating IL-10 levels in cardiac surgical patients, were less consistent in showing corresponding increases of circulating TNF- $\alpha$  and/or IL-1 $\beta$  levels (23).

#### Correlation of IL-6 and IL-10

In thoroughly reviewing all results obtained in this study, an unexpected finding proved a statistically significant correlation between IL-6 and IL-10 levels exhibited both by the CPB and the OPCAB patients

on the 1<sup>st</sup> postoperative day. In the "on-pump" group, there was a tight correlation between the two mediators, documented by  $r = 0.78453$  ( $p = 0.000$ ), while in the "off-pump" group, IL-6 and IL-10 displayed an even tighter correlation mirrored by  $r = 0.86239$  ( $p = 0.000$ ; 95% confidence interval in both groups). Results are not shown as figures due to space limitation. Taking into account the importance of both mediators in setting stage for systemic inflammation, this finding of ours further underlies the key role played by interleukin-10 in transducing smoldering perioperative inflammation into a clinically silent course in the postoperative period.

#### Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study bringing results of the PTX3 response in cardiac surgical patients. We compared separately the PTX3 behavior in CPB and OPCAB patients. We found a significantly higher PTX3 release in patients operated on with the use of cardiopulmonary bypass. Notwithstanding the statistically significant increases of serum PTX3 levels from baseline values observed in both groups, none of the values assessed throughout the observation period exceeded PTX3 levels currently considered as normal (i.e., below 2.0 ng/ml). With high probability, these results mirror the fact that all patients in both groups manifested a straightforward, uneventful clinical course both in the operating room and in the postoperative ward. On the other hand, all CRP levels measured in corresponding time points were practically identical in both groups. These findings may imply an

inherently different propensity to the inflammatory response in the two groups, either employing or avoiding cardiopulmonary bypass. The chief dampening mediator, which under normal conditions does not allow the development of a full-blown systemic inflammation, is undoubtedly IL-10. All CPB patients received aprotinin and dexamethasone in the priming solution which, in their quality of potent antiinflammatory drugs, might confound the results by down-modulating all values measured. Indeed, IL-10 production is increased by the action of corticosteroids. Purposely, we did not leave out these drugs as components of the CPB priming in order to maintain conditions typical for everyday activities in our department, with both aprotinin and dexamethasone being regular adjuncts to the priming solution.

The relatively vast dispersion of most values measured, as can be inferred by the respective standard deviations, is another weak point of our study. It has been undoubtedly caused by the relatively small number of study participants. However, our study pretends to be viewed as one introducing pentraxin 3 into cardiac surgery.

We can merely speculate about the source of the PTX3 protein we detected in the circulation. In our opinion, most of it came from the reperfused heart. For the time being, we cannot offer any recommendations to the clinical applicability of PTX3 in cardiac surgery, notably concerning its prognostic value, as all our patients underwent an uneventful peri- and postoperative course. We must point out that even the highest PTX3 levels measured, have not departed from the normal range which has been set by Mantovani and coworkers below 2.0 ng/ml. Another study with a higher number of participants, including high-risk subjects, which is currently under way in our department, should provide answer to the open questions. It may be that PTX3, owing to its unique kinetics of release, will serve the same prognostic function in cardiac surgery as has been shown by Latini and coworkers (12) in AMI patients and by Muller and coworkers in a general cohort of critically ill patients (24).

The employment of PTX3 as a readily available prognostic marker in cardiac surgery warrants further investigation in high-risk patients.

### Conclusions

We have shown that PTX3, which is considered to be an acute phase protein, is released into circulation during cardiac surgical operations, with patients operated on with the use of CPB displaying significantly higher values than OPCAB patients. On the other hand, serum levels of CRP, which are attained

during both methods of CABG operations, are virtually the same, suggesting an identical extent of the acute phase response in both groups. The kinetics and extent of PTX3 release in CPB patients are marginally paralleled by those of IL-6 and strikingly by those of IL-10. Future applicability of PTX3 is discussed in the article, with special emphasis laid on the activities of PTX3 in innate immunity, which is increasingly recognized to underlie much of the natural history in cardiac surgical patients.

### Acknowledgements

This work has been supported by a research program of The Czech Ministry of Youth, School and Physical Activities No. MSM 0021620812.

### References

- Larmann J, Theilmeyer G. Inflammatory response to cardiac surgery: Cardiopulmonary bypass versus non-cardiopulmonary bypass surgery. *Best Pract Res Clin Anaesth.* 2004;18:425–38.
- Biglioli P, Cannata A, Alamanni F, Naliato M, Porqueddu M, Zanobini M, et al. Biological effects of off-pump vs. on-pump coronary artery surgery: Focus on inflammation, hemostasis and oxidative stress. *Eur J Cardio-Thorac Surg.* 2003;24:260–9.
- Corbi P, Rahmati M, Delwail A, Potreau D, Menu P, Wijdenes J, et al. Circulating soluble gp130, soluble IL-6R, and IL-6 in patients undergoing cardiac surgery, with or without extracorporeal circulation. *Eur J Cardio-Thorac Surg.* 2000;18:98–103.
- Wehlin L, Vedin J, Vaage J, Lundahl J. Activation of complement and leukocyte receptors during on- and off pump coronary artery bypass surgery. *Eur J Cardio-Thorac Surg.* 2004;25:35–42.
- Schmid F-X, Vudattu N, Floerchinger B, Hilker M, Eissner G, Hoenick M, et al. Endothelial apoptosis and circulating endothelial cells after bypass grafting with and without cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardio-Thorac Surg.* 2006;29:496–500.
- Fransen E, Maessen J, Dentener M, Senden N, Geskes G, Buurman W. Systemic inflammation present in patients undergoing CABG without extracorporeal circulation. *Chest.* 1998;113:1290–5.
- Gu YJ, Schoen F, Tigchelaar I, Loef BG, Ebels T, Rankin AJ, et al. Increased neutrophil priming and sensitization before commencing cardiopulmonary bypass in cardiac surgical patients. *Ann Thorac Surg.* 2002;74:1173–9.
- Prondzinsky R, Knöpfer A, Loppnow H, Redling F, Lehmann DW, Stabenow I, et al. Surgical trauma affects the proinflammatory status after cardiac surgery to a higher degree than cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;129:760–6.
- Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today.* 1994;15:74–80.
- Wisniewski H-G, Vilček J. Cytokine-induced gene expression at the crossroads of innate immunity, inflammation and fertility: TSG-6 and PTX3/TSG-14. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15:129–46.
- Peri G, Introna M, Corradi D, Iacuitti G, Signorini S, Avanzini F, et al. PTX3, a prototypal long pentraxin, is an

- early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation*. 2000;102:636-41.
12. Latini R, Maggioni AP, Peri G, Gonzini L, Lucci D, Mocarelli P, et al. on behalf of the Lipid Assessment Trial Italian Network (LATIN) Investigators. Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004;110:2349-54.
  13. Fazzini F, Peri G, Doni A, Dell'Antonio G, Dal Cin E, Bozzolo E, et al. PTX3 in small-vessel vasculitides: An independent indicator of disease activity produced at sites of inflammation. *Arthritis Rheum*. 2001;44:2841-50.
  14. Klouche M, Peri G, Knabbe C, Eckstein HH, Schmid FX, Schmitz G, et al. Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2004;175:221-8.
  15. Napoleone E, Di Santo A, Bastone A, Peri G, Mantovani A, de Gaetano G, et al. Long pentraxin PTX3 upregulates tissue factor expression in human endothelial cells: A novel link between vascular inflammation and clotting activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:782-7.
  16. Rolph MS, Zimmer S, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A, Hansson GK. Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:e10-4.
  17. Sawa Y, Ichikawa H, Kagisaki K, Ohata T, Matsuda H. Interleukin-6 derived from hypoxic myocytes promotes neutrophil-mediated reperfusion injury in myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998;116:511-5.
  18. Yamauchi-Takahara K, Ihara Y, Ogata A, Yoshizaki K, Azuma J, Kishimoto T. Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6. *Circulation*. 1995;91:1520-4.
  19. Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A, Maeda K, Ohnishi M, Fukai D, et al. Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:391-8.
  20. Meng ZH, Dyer K, Billiar TR, Tweardy DJ. Essential role for IL-6 in postresuscitation inflammation in hemorrhagic shock. *Am J Physiol*. 2001;280:C343-51.
  21. Yang S, Zheng R, Hu S, Ma Y, Choudhry MA, Messina JL, et al. Mechanism of cardiac depression after trauma-hemorrhage: Increased cardiomyocyte IL-6 and effect of sex steroids on IL-6 regulation and cardiac function. *Am J Physiol*. 2004;287:H2183-91.
  22. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:929-79.
  23. Sablotzki A, Welters I, Lehmann N, Menges T, Görlach G, Dehne M, et al. Plasma levels of immunoinhibitory cytokines interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$  in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardio-Thorac Surg*. 1997;11:763-8.
  24. Muller B, Peri G, Doni A, Torri V, Landmann R, Bottazzi B, et al. Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2001;29:1404-7.

## ESSENTIAL PTX3 BIOLOGY (NOT ONLY) FOR CARDIOLOGISTS AND CARDIAC SURGEONS

Pavel Kuneš<sup>1</sup>, Vladimír Lonský<sup>1</sup>, Jiří Mandáček<sup>1</sup>, Miroslav Brtko<sup>1</sup>, Martina Koláčková<sup>2</sup>, Ctirad Andryš<sup>2</sup>,  
Manuela Kudlová<sup>2</sup>, Jan Krejsek<sup>2</sup>

Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové and University Hospital Hradec Králové, Czech Republic: Department of Cardiac Surgery<sup>1</sup>, Institute of Clinical Immunology and Allergology<sup>2</sup>

**Summary:** Inflammation has been recognized to form an integral part of the atherosclerotic process. Much consideration has been given lately to the role played in atherogenesis by C-reactive protein (CRP). Although not accepted unequivocally, CRP appears to be not only a marker, but also an active mediator of the atherosclerotic process. Pentraxin 3 (PTX3) is a newly identified acute phase reactant which shares some structural and some functional properties with CRP. On the other hand, pentraxin 3 displays unique biological properties of its own, including a possible role in the pathogenesis of cardiovascular diseases and in processes accompanying the natural evolution of surgical wounds. This review article discusses recent information concerning basic pentraxin 3 biology in inflammation and in innate immunity reactions as viewed by a cardiologist in the context of acute coronary events and by a surgeon in patients struck with multiple wounds who are at the same time menaced by bacterial infections.

**Key words:** *Pentraxin 3; C-reactive protein; Acute phase response; Apoptosis; Macrophages; Dendritic cells; Innate immunity*

### Introduction

Two so-called short pentraxins, C-reactive protein (CRP) and the serum amyloid P component (SAP), are known to operate as acute phase reactants. In humans, CRP is beyond any doubt the more important of the two, while the function of SAP is only partially understood. In mice on the other hand the reverse situation is encountered, with CRP playing negligible, if any, role in the acute phase response. Both pentraxins are produced in the liver, with interleukin (IL)-6 being the key regulatory mediator, at least as far as human CRP is concerned. Additional sites of CRP production have been identified in the last few years, e.g. the kidney and the vascular wall. However, the respective contribution of these alternative sources to the overall CRP elevation during an acute inflammation does not seem to attain much biological significance (5). By contrast, the role of CRP as a marker or even a mediator of low-grade chronic inflammatory processes, such as rheumatoid arthritis or atherosclerosis, has been a subject of much experimental and clinical research. Although not accepted unequivocally by the scientific community, adherents of CRP's active role in these pathological processes markedly predominate.

To make the issue of atherosclerosis as an inflammatory disease more complicated, a recently identified long pentraxin PTX3 has entered the scene. All pentraxins belong among very old proteins. Vertically, throughout evolution,

their composition has been conserved with only insignificant modifications. Horizontally, among diverse species, their presence ranges from the horseshoe crab *Limulus polyphemus* up to man (38). Pentraxin 3 was originally cloned as an interleukin (IL)-1 $\beta$ -inducible gene in endothelial cells (9) or as a tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -inducible gene (alternatively named TSG14) in fibroblasts (25). Pentraxin 3 consists of a C-terminal pentraxin-like domain of 203 amino acids which is common to other pentraxins, coupled to an additional, structurally unique N-terminal portion made up of 178 amino acid residues. Pentraxin 3 protomers assemble into higher order complexes formed by 10–20 monomer units (i.e. dekamers or dodekamers) (7). Unlike CRP, which is manufactured predominantly in the liver, pentraxin 3 is produced directly at sites of tissue damage, with the liver playing only a marginal role in its genesis. Pentraxin 3 production occurs additionally at sites remote from the injured tissue, notably in the vascular endothelium of skeletal muscles and the heart (19). Pentraxin 3 synthesis is induced by proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$ , and by microbial wall constituents such as the lipopolysaccharide (LPS), mycobacterial liparabinomannans and the outer membrane protein A (OmpA) of Gram-negative bacteria (37). All these moieties of microbial origin employ the toll-like receptor (TLR) signaling pathway in order to transmit their respective biological signals into the target cells (8). Interferon (IFN)- $\gamma$ , which in most cases acts synergistically with LPS, inhibits pentraxin 3 production in mono-

cytic cell lines. By contrast, interleukin-10, the most potent anti-inflammatory cytokine as yet recognized, synergizes with LPS in the production of pentraxin 3 (12). IL-6, the major cytokine governing CRP synthesis in the liver, plays a negligible role in pentraxin 3 production, being limited to rare cases of Kaposi's sarcoma or Castleman's disease (22,26).

### **Pentraxin 3: possible implications in coronary artery disease**

The occurrence of pentraxin 3 is predominantly observed in the vascular wall. In patients with small vessel vasculitides, pentraxin 3 is found in deposits formed by dying leukocytes that assemble in perivascular areas of the diseased vessels or even systemically in the circulation, where it is supposed to reflect the overall endothelial activation (14). Pentraxin 3 synthesis, both mRNA and protein, can be induced by atherogenic lipoproteins in vascular smooth muscle cells (23). In human endothelial cells, pentraxin 3 supports the synthesis of tissue factor which has been induced by TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  or lipopolysaccharide, all of them concomitant inducers of pentraxin 3 production (28). In atherosclerotic plaques, pentraxin 3 is produced by infiltrating macrophages and by scattered endothelial cells (34). Peri and colleagues found in their cohort of 37 patients with acute myocardial infarction (AMI) that plasma levels of PTX3 peaked about seven hours after the onset of chest pain. In AMI patients, plasma levels of CRP are known to increase both as a part of the acute phase response and as a reflection of the damaged myocardium. Peak levels of CRP, however, can be assessed only later, about 24 to 48 hours after the initial AMI symptoms. Peak levels of plasma pentraxin 3 attained by AMI patients were shown to occur independently of the extent of myocardial tissue necrosis or of the gravity of incident heart failure assessed by the Killip class at entry. Consequently, in the setting of acute myocardial infarction pentraxin 3 presents the potential advantage of an early marker of heart muscle damage irrespective of its extent, whose peak plasma levels are available well ahead of the elevation of plasma CRP (31). The same research team showed in addition that pentraxin 3 was a marker which supplied the best prognostic information concerning three month mortality after the index event. Among their 724 AMI patients, those whose first day plasma levels of pentraxin 3 exceeded 10.73 ng/ml, exhibited a three-fold higher risk of dying within the next 3 months compared to patients whose pentraxin 3 levels did not reach 5.49 ng/ml at the same point in time. The prognostic information conferred by pentraxin 3 was superior in accuracy to prognostic values mirrored by levels of creatine kinase, troponin T or N-terminal pro-brain natriuretic peptide, not to mention CRP itself (24).

### **Pentraxin 3 and the complement system**

Pentraxin 3 exhibits a high-affinity binding to the globular head of C1q, the first component of the complement cas-

cade. This binding displays the quality of a competitive inhibition. In an environment with excess CRP or SAP, the long pentraxin is displaced from its complex with C1q by the short pentraxin competitors, which bind to C1q with a comparable affinity. The reverse takes place if CRP or SAP is bound to C1q in the presence of excess pentraxin 3. Once bound to C1q, pentraxin 3 either initiates or inhibits activation of the complement cascade via the classical pathway. The respective effect will depend on the actual environmental conditions. Locally formed pentraxin 3 activates complement which is available within inflamed or injured tissues, thereby supporting local defense reactions. Pentraxin 3 present in the circulation, i.e. remote from the site(s) of local inflammation, inhibits activation of complement in that pentraxin 3 molecule inserts between the C1q globular head and the following components of the complement cascade. Due to occupancy by pentraxin 3 of their respective binding sites, these complement components are hindered from direct contact with C1q which in turn is necessary for the activation process to continue. In this position, pentraxin 3 acts counter to an overwhelming activation of the complement cascade during systemic inflammatory processes (29).

Pentraxin 3 is endowed with the quality of an opsonin, which acts in concert with the complement fragment C3b/iC3b on the surface of apoptotic cells. This activity of pentraxin 3 supports removal of apoptotic cells and tissue debris, which in itself is a prerequisite for proper wound healing (36). In its role of an opsonin, pentraxin 3 targets some micro-organisms, above all the conditionally pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. If sufficiently opsonized by pentraxin 3, aspergillid conidia are ingested by the host's alveolar macrophages and subsequently cleared from the lungs (16). Furthermore, Diniz and colleagues showed that recombinant pentraxin 3 binds to zymosan and *Paracoccidioides brasiliensis*, thereby increasing phagocytic ingestion of the pentraxin 3-covered particles by peritoneal macrophages of wild-type mice. This finding is in keeping with the importance of the opsonic role of pentraxin 3 in defense reactions and implies the existence of a pentraxin 3-specific receptor on target cells. This receptor, however, has not yet been identified (11).

### **Pentraxin 3 and KpOmpA**

Apart from the C1q globular head of complement, pentraxin 3 further binds to:

1. the fibroblast growth factor-2 (FGF2), a mediator implicated in angiogenesis,
2. the extracellular matrix protein TSG-6, which supports tissue repair/remodeling,
3. the outer membrane protein A from *Klebsiella pneumoniae* (KpOmpA), a newly recognized mediator of inflammation.

Recognition of KpOmpA by the host is mediated via scavenger receptors LOX-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1) and SREC-I (scavenger receptor expressed by endothelial cell-1). Both receptors are expressed

on macrophages and dendritic cells (DCs). Activation by KpOmpA of the host's innate immunity effector cells, primarily immature DCs, is accomplished via toll-like receptor (TLR)-2. Transmembrane signaling in immature DCs, which is set off by KpOmpA, up-regulates costimulatory molecules CD40, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), intercellular adhesion molecule ICAM-1 (CD54), and MHC class I or class II molecules (CD for cluster of differentiation). KpOmpA also induces production by dendritic cells of IL-12 and TNF- $\alpha$ . Dendritic cell maturation is thus next to complete. Last but not least, KpOmpA targets exogenous antigens to the MHC class I presentation pathway. All the above mentioned activities of KpOmpA culminate in mobilization of potent antibacterial immune reactions. Invading bacteria are eliminated by macrophages in conjunction with the complement system and the pentraxins. Antigen-specific immune responses, initiated by maturing DCs, are executed by cytotoxic CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes. In this respect, dendritic cells present a transition from innate to acquired immunity responses. Exogenous antigens, which have been endocytosed by DCs via KpOmpA-binding elements, gain access to the cytosolic MHC class I presentation pathway. Effector/cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes can thus be generated even in the absence of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte help (21). Cellular signaling exerted by KpOmpA furthermore leads to the production by monocytes/macrophages and by dendritic cells of pentraxin 3. This feature of KpOmpA, which itself is an archetypical pathogen-associated molecular pattern, reflects the seemingly ambiguous or even contradictory nature of the innate immunity reactions, which at the same time combat infection and set the stage for the termination of inflammatory processes, the latter being a prerequisite for repair and regeneration of wounded tissues. Pentraxin 3, along with the complement system, fits in with both of these ambiguous activities. It is an effective mediator of the humoral arm of innate immunity and at the same time it supports elimination of the host's own damaged cells, while meticulously sparing those that have survived cytotoxic attack unleashed by the defense reactions (20).

### **Pentraxin 3 and apoptotic cells**

All pentraxins bind to dying cells, whose number rapidly increases in inflamed or injured tissues, in order for the host to get rid of, by phagocytosis, cellular corpses and intracellular components released by injured or dying cells. Clearance of apoptotic cells and subcellular constituents thereof by macrophages, in conjunction with the pentraxins, starts off paracrine release of anti-inflammatory mediators such TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), which guarantee an immunologically silent cellular death (13). Should this homeostatic mechanism be perturbed, highly immunogenic peptides, which in normal circumstances are integrated within the host's live cells, would inevitably enter the extracellular milieu. Once beyond the protective line of the outer cellular membrane, intracellular components of the host's tissues are identified by his or her DCs as

foreign antigens. If not removed out of reach of this keen surveillance machinery with ample advance, catastrophic auto-immune reactions, provoked by the host's own intracellular antigens, would set in without any restraint (2). In promoting timely elimination of this extremely immunogenic material, the pentraxins prevent grave auto-immune damage that otherwise would be inflicted on the host's tissues (30). This immunologically silent mode of cellular death supported by the pentraxins might question their opposite activities in defense reactions against extracellular bacteria or fungi. The puzzle of how the pentraxins execute inflammatory anti-microbial responses, while at the same time silencing clonal expansion of autoreactive lymphocytes, has been resolved by new data supplied by Rovere and Baruah with colleagues. These data confirm a dual role for pentraxin 3 in reactions of innate immunity (35,4).

### **Cross-presentation of exogenous or endogenous antigens**

Auto-immune reactions present a serious menace anytime the host's cells have been damaged up to the point of setting free their intracellular components. A key event in this process is the cross-presentation by DCs of antigenic neoepitopes, originating from the host's tissues, to cytotoxic CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes (33). This is a common situation in any major surgery, either cardiac or non-cardiac. In the process of cross-presentation, antigens from the extracellular milieu are presented by APCs (antigen-presenting cells) on MHC (major histocompatibility complex) class I molecules in order to stimulate effector CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. At the same time, cross-presentation is an important mechanism by which the immune system monitors the host's tissues for the presence of foreign (e.g. microbial) antigens or his or her own autoantigens, which are identified by the immune system as foreign or non-self. The outcome of cross-presentation is either immune response or immune tolerance. Which of the two will take place depends on whether isolated antigens are acquired by DCs, leading to tolerance, or whether antigens are acquired along with immunostimulatory signals, leading to immune responses. For dendritic cells, the boundary between an endogenous and an exogenous antigen is not entirely clear-cut. MHC class I-restricted presentation of antigens of both sources is a common situation. From among the plethora of candidate antigens, cross-presentation of those of viral or of the host's own cellular origin numbers among the most common. From the surgical point of view, the latter antigens are of extraordinary importance (32). Cross-presentation of the host's own cellular antigens, which results in cross-tolerance or self-tolerance, sets off deletion of auto-reactive cytotoxic CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes (15,6,10). Since DCs have been shown to participate both in antigenic cross-presentation and in cross-tolerance, it is no surprise that the same dendritic cell subset is able to contribute both to immunity and to tolerance. Supplementary factors are thus supposed to make the difference between the outcome, i.e. immunity or

tolerance. A plausible explanation suggests that DCs preferentially induce tolerance to auto-antigens unless exposed to a predominance of inflammatory stimuli, most often those evoked by infection.

### **Pentraxin 3 in antigenic cross-presentation**

Antigenic cross-presentation is manifold augmented in a milieu overflowed with extracellular antigens, including auto-antigens. Such a situation occurs regularly in areas of tissue injury with multiple and/or deep surgical incisions, often menaced by bacterial invasion and soft tissue trauma/contusion, which may be accompanied by multiple or repeated ischemia-reperfusion processes in wound areas. Extensive cell death sets up an important challenge for the host's immune system. (27). Consequently, pentraxin 3 is recruited at the interface between the host's own dying cells and his or her dendritic cells, which make up efficient cellular sentinels incessantly screening the adjacent environment for the presence foreign antigens. Any time such an antigen has been detected, DCs start off an antigen-specific, MHC-restricted immune response, which is aimed at elimination of intracellular microorganisms, tumor cells or neo/autoantigen-stained self cells or fractions thereof (1). Dendritic cells cross-present antigenic epitopes to cytotoxic CD8+ T-lymphocytes in association with MHC class I molecules, irrespective of the antigenic origin - be it foreign microbial antigens or neo/autoantigen-expressing fragments from the host's own cells. Effector CD8+ T-lymphocytes interact with cross-presented antigens only after the latter have been processed into short peptides by antigen-presenting cells and coupled to MHC class I molecules. Thereafter, cytotoxic CD8+ T lymphocytes identify antigen-MHC class I complexes which are designated for elimination (18). Any time antigens of microbial origin and those originating from the host's own cells are presented by DCs to CD8+ T-lymphocytes jointly, a situation commonly encountered in surgical patients, pentraxin 3 cuts up like a useful adaptor of dendritic cell function.

### **Dual role of pentraxin 3 in auto-immune reactions**

In normal homeostatic conditions, the host's cells dying of apoptotic death start off the production of pentraxin 3 by dendritic cells. Apoptotic cells of the host, to which pentraxin 3 is bound, successfully avoid internalization by immature dendritic cells. The same applies to intracellular processing of apoptotic cells' antigenic load and the cross-presentation of antigen-MHC class I molecule complexes to cytotoxic CD8+ T-lymphocytes. Pentraxin 3 additionally limits the production of pro-inflammatory cytokines and costimulatory molecules, both of which are needed for maturation and the antigen-presenting capacity of DCs (3). In parallel, clonal expansion of T-lymphocytes, which are endowed with the potential to set off cytotoxic auto-immune

reactions, is minimized or totally stopped. All the same, it may occur that the host's PTX3-labeled apoptotic cells, due to actual overflow of antigens, notably those of microbial origin, would miss the opportunity to escape ingestion by dendritic cells. If such be the case, pentraxin 3 will enhance the production of proinflammatory cytokines needed to combat infection, while at the same time it will restrict cross-presentation of antigenic neoepitopes to autoreactive CD8+ T-lymphocytes. In so doing, pentraxin 3 will favor defense of the host while at the same time avoiding any undue damage of his or her own tissues whenever microbial infection and extensive cell death coexist. Surgical wounds would be efficiently protected by pentraxin 3 both from infection and from auto-immune damage. On the other hand, pentraxin 3 does not interfere with the presentation to effector cells of soluble antigens, an event required for the elimination of extracellular microbial pathogens. The classical short pentraxin CRP does not substantially contribute to such fine-tuned processes, apparently due to the time lag between the noxious onset and CRP hepatic production, even if the latter is seemingly rapid in execution and undoubtedly robust in volume, with plasma or serum CRP levels reaching several hundred-folds of their basal levels. Nevertheless, if properly regulated, CRP contributes substantially to the generation of an overall anti-inflammatory milieu in which apoptotic cells are cleared by macrophages. CRP-initiated activation of the complement cascade will halt at the level of opsonins C3b/iC3b, thus favoring efficient phagocytosis of opsonin-covered particles. On the other hand, continuation of complement activation up to the generation of the terminal complexes C5b-9(n), which are equipped with mighty cytotoxic and proinflammatory properties, is stopped under these conditions (17).

### **Conclusion**

Pentraxin 3 is a novel acute phase reactant, whose importance in mammalian biology, including human, is only starting to be recognized. In the setting of acute myocardial infarction and other critical care patients, it may provide a prognostic marker undoubtedly superior in prognostic value to C-reactive protein. At the same time, pentraxin 3 plays a non-redundant role in the humoral arm of innate immunity, protecting the host from some invading microorganisms while at the same time fine-tuning the clearance of apoptotic cells, with deletion of auto-reactive T-lymphocyte clones as a result. The importance of pentraxin 3 in human biology may stand out whenever foreign antigens with those of self-origin are presented jointly, as shown in surgical patients.

### **Acknowledgements**

This work has been supported by a research program of The Czech Ministry of Youth, Scholarship and Physical Activities No. MSM 0021620812.

## References

1. Ackerman AL, Cresswell P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* 2004;5:678-84.
2. Aprahamian T, Rifkin I, Bonegio R, Hugel B, Freyssinet J-M, Sato K, et al. Impaired clearance of apoptotic cells promotes synergy between atherosclerosis and autoimmune disease. *J Exp Med* 2004;199:1121-31.
3. Baruah P, Dumitriu IE, Peri G, Russo V, Mantovani A, Manfredi AA, Rovere-Querini P. The tissue pentraxin PTX3 limits C1q-mediated complement activation and phagocytosis of apoptotic cells by dendritic cells. *J Leukocyte Biol* 2006;80:87-95.
4. Baruah P, Propato A, Dumitriu IE, Rovere-Querini P, Russo V, Fontana R, et al. The pattern recognition receptor PTX3 is recruited at the synapse between dying and dendritic cells and edits the cross-presentation of self, viral and tumor antigens. *Blood* 2006;107:151-8.
5. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994; 15: 74-80.
6. Belz GT, Behrens GMN, Smith CM, Miller JFAP, Jones C, Lejon K, et al. The CD8alpha (+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J Exp Med* 2002;196:1099-104.
7. Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, De Gioia L, Matteucci C, Peri G, et al. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3-similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 1997;272:32817-23.
8. Bozza S, Bistoni F, Gaziano R, Pitzurra L, Zelante T, Bonifazi P, et al. Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to IRF3 activation. *Blood First Edition Paper*. DOI 10.1182/blood-2006-03-009266.
9. Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, Peri G, Bottazzi B, Bairoch A, et al. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 1992; 267:22190-7.
10. Davey GM, Kurts C, Miller JFAP, Bouillet P, Strasser A, Brooks AG, Carbone FR, Heath WR. Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *J Exp Med* 2002;196: 947-55.
11. Diniz SN, Nomizo R, Cisalpino PS, Teixeira MM, Brown GD, Mantovani A, et al. PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. *J Leukocyte Biol* 2004;75:649-56.
12. Doni A, Michela M, Bottazzi B, Peri G, Valentino S, Polentarutti N, Garlanda C, Mantovani A. Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma. *J Leukocyte Biol* 2006;79:797-802.
13. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998;101:890-8.
14. Fazzini F, Peri G, Doni A, Dell'Antonio G, Dal Cin E, Bozzolo E, et al. PTX3 in small-vessel vasculitides: an independent indicator of disease activity produced at sites of inflammation. *Arthritis Rheum* 2001;44:2841-50.
15. Ferguson TA, Herndon J, Eizey B, Griffith TS, Schoenberger S, Green DR. Uptake of apoptotic antigen-coupled cells by lymphoid dendritic cells and cross-priming of CD8(+) T cells produce active immune unresponsiveness. *J Immunol* 2002;168:5589-95.
16. Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, Salustri M, De Acetis R, Nota A, et al. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* 2002;420:182-6.
17. Gershov D, Kim SJ, Brot N, Elkon KB. C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an anti-inflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med* 2000;192:1353-64.
18. Heath WR, Belz GT, Behrens GMN, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 2004;199:9-26.
19. Introna M, Vidal Alles V, Castellano M, Picardi G, De Gioia L, Bottazzi B, et al. Cloning of mouse PTX3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood* 1996;87:1862-72.
20. Jeannin P, Bottazzi B, Sironi M, Doni A, Rusnati M, Presta M, et al. Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunology* 2005;22:551-60.
21. Jeannin P, Renno T, Goetsch L, Miconnet I, Aubry JP, Delneste Y, et al. OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway. *Nat Immunol* 2000;1:502-9.
22. Klouche M, Brockmeyer N, Knabbe C, Rose-John S. Human herpesvirus 8-derived viral IL-6 induces PTX3 expression in Kaposi's sarcoma cells. *AIDS* 2002;16:F9-F18.
23. Klouche M, Peri G, Knabbe C, Eckstein HH, Schmid FX, Schmitz G, Mantovani A. Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2004;175:221-8.
24. Latini R, Maggioni AP, Peri G, Gonzini L, Lucci D, Mocarelli P, et al., on behalf of the Lipid Assessment Trial Italian Network (LATIN) Investigators. Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;110:2349-54.
25. Lee GW, Lee TH, Vilček J. TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentraxin family of acute phase proteins. *J Immunol* 1993;150:1804-12.
26. Malaguarnera L, Pilastro MR, Vicari L, Di Marco R, Malaguarnera M, Messina A. PTX3 gene expression in Castleman's disease. *Eur J Haematol* 2000;64:132-4.
27. Morelli AE, Thomson AW. Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. *Immunol. Rev* 2003;196:125-46.
28. Napoleone E, Di Santo A, Bastone A, Peri G, Mantovani A, de Gaetano G, et al. Long pentraxin PTX3 upregulates tissue factor expression in human endothelial cells: a novel link between vascular inflammation and clotting activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:782-7.
29. Nauta AJ, Bottazzi B, Mantovani A, Salvatori G, Kishore U, Schwaible WJ, et al. Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *Eur J Immunol* 2003;33:465-73.
30. Nauta AJ, Daha MR, van Kooten C, Roos A. Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends Immunol* 2003; 24:148-54.
31. Peri G, Introna M, Corradi D, Iacuitti G, Signorini S, Avanzini F, et al. PTX3, a prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation* 2000;102:636-41.
32. Ramirez MC, Sigal LJ. Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. *J Immunol* 2002;169: 6733-42.
33. Rock KL, Shen L. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* 2005;207:166-83.
34. Rolph MS, Zimmer S, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A, Hansson GK. Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:e10-e14.
35. Rovere P, Peri G, Fazzini F, Bottazzi B, Doni A, Bondanza A, et al. The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. *Blood* 2000;96:4300-6.
36. Rovere-Querini P, Dumitriu IE. Corpse disposal after apoptosis. *Apoptosis* 2003;8:469-79.
37. Vouret-Craviari V, Matteucci C, Peri G, Poli G, Introna M, Mantovani A. Expression of a long pentraxin, PTX3, by monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan. *Infect Immun* 1997;65: 1345-50.
38. Wisniewski H-G, Vilček J. Cytokine-induced gene expression at the crossroads of innate immunity, inflammation and fertility: TSG-6 and PTX3/TSG-14. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:129-46.

Submitted November 2006.

Accepted February 2007.

### Corresponding author:

Pavel Kuneš, M.D., University Hospital in Hradec Králové, Department of Cardiac Surgery  
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic, e-mail: kunes.pavel@fnhk.cz



# Stresové proteiny Hsp60 a Hsp70 u kardiologických pacientů\*

Karolína Jankovičová\*, Manuela Kudlová\*, Martina Koláčková\*,  
Pavel Kuneš\*\*\* Ctirad Andrýs\*, Jiří Mandák\*\*, Vladimír Lonský\*\*, Jan Krejsek\*

\*Ústav klinické imunologie a alergologie,

\*\*Kardiologická klinika, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Hradec Králové,  
Hradec Králové, Česká republika

Jankovičová K\*, Kudlová M\*, Koláčková M\*, Kuneš P\*\*\* Andrýs C\*, Mandák J\*\*, Lonský V\*\*, Krejsek J\* (\*Ústav klinické imunologie a alergologie, \*\*Kardiologická klinika, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové, Česká republika). **Stresové proteiny Hsp60 a Hsp70 u kardiologických pacientů.** *Cor Vasa* 2007;49(10):356–361.

**Cíl:** Sledovat sérové koncentrace Hsp60 a Hsp70 v průběhu operace a následných pooperačních dnech u kardiologických pacientů operovaných s použitím kardiopulmonálního bypassu (CPB) a bez jeho použití.

**Metodika:** Bylo sledováno 34 pacientů, kterým byl proveden koronární bypass. Pacienti podstoupili buď konvenční myokardiální revaskularizaci s použitím kardiopulmonálního bypassu nebo byli operováni na bíjícím srdci. Obě dvě skupiny se od sebe významně nelišily věkem, pohlavím, počtem anastomóz a ejection frakcí. Vzorky žilní krve byly odebrány pacientům v pěti časových intervalech: při úvodu do anestezie, po ukončení operace, první, třetí a sedmý pooperační den. Koncentrace Hsp60 a Hsp70 byly stanoveny komerčně dostupnými kity ELISA.

**Výsledky:** Koncentrace Hsp60 se nelišila mezi pacienty operovanými s CPB a bez CPB s výjimkou sedmého dne, kdy byla koncentrace sérového Hsp60 u pacientů operovaných na bíjícím srdci významně nižší v porovnání s ostatními odběry ( $p < 0,0151$ ). Koncentrace Hsp70 se u pacientů operovaných s CPB a bez CPB významně lišila bezprostředně po ukončení operačního výkonu, kdy u pacientů operovaných s CPB docházelo k výraznému nárůstu sérového Hsp70 v porovnání s pacienty operovanými na bíjícím srdci ( $p < 0,0259$ ).

**Závěry:** Studie prokázala zvýšené sérové koncentrace Hsp70 u kardiologických pacientů operovaných s použitím CPB ve srovnání s pacienty operovanými na bíjícím srdci, což naznačuje větší ischemicko-reperfuční poškození při tomto typu operace.

**Klíčová slova:** Kardiologická operace – Hsp60 – Hsp70 – CPB (kardiopulmonální bypass)

Jankovičová K\*, Kudlová M\*, Koláčková M\*, Kuneš P\*\*\* Andrýs C\*, Mandák J\*\*, Lonský V\*\*, Krejsek J\* (\*Institute of Clinical Immunology and Allergy, \*\*Department of Cardiac Surgery, Charles University in Prague, Medical School and University Hospital at Hradec Králové, Hradec Králové, Czech Republic). **Heat shock proteins Hsp60 and Hsp70 in cardiac surgical patients.** *Cor Vasa* 2007;49(10):356–361.

**Background/Aims:** To study the perioperative and postoperative serum levels of heat shock proteins Hsp60 and Hsp70 in cardiac surgical patients operated with or without cardiopulmonary bypass (CPB).

**Methods:** Thirty-four patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG) were operated either with or without the use of CPB. The subgroups did not differ in age, sex, number of anastomoses, and ejection fraction. Samples of venous blood were taken at five intervals: at the induction to anesthesia, upon completion of surgery and on postoperative days 1, 3, and 7. Hsp60 and Hsp70 levels were detected by commercially available ELISA kits.

**Results:** Hsp60 levels did not differ between patients with or without CPB. Hsp60 levels were significantly decreased in patients operated without CPB on postoperative day 7 ( $p < 0.0151$ ). The dynamics of Hsp70 was different between the subgroups with and without CPB. We found significantly increased levels of Hsp70 upon completion of surgery in patients operated with CPB ( $p < 0.0259$ ).

**Conclusion:** The study demonstrated increased Hsp70 levels in cardiac surgical patients undergoing CABG using CPB compared with patients operated on the beating heart. This finding is in accordance with more profound ischemia-reperfusion injury in patients operated with the use of CPB.

**Key words:** Cardiac surgery – Hsp60 – Hsp70 – CPB (cardiopulmonary bypass)

**Adresa:** Mgr. Karolína Jankovičová, PhD., Ústav klinické imunologie a alergologie, UK v Praze, LF a FN Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Česká republika, e-mail: jankovicovak@lfhk.cuni.cz

\*Práce byla provedena s podporou MŠMT ČR, VZ č. MSM 0021620812 a MZd ČR, IGA č. NR/9090-4.

## Použité zkratky

|               |                                     |
|---------------|-------------------------------------|
| CPB           | mimotělní oběh                      |
| HSE           | heat shock element                  |
| HSF           | heat shock transcription factor     |
| Hsp           | stresový protein                    |
| TNF- $\alpha$ | tumor-nekrotizující faktor $\alpha$ |

## ÚVOD

Kardiologické operace představují náročný výkon, který je i přes velké pokroky v této oblasti mnohdy spojen s řadou pooperačních komplikací. Ty mohou souviset s aktivací nespecifických složek imunitního systému a rozvojem syndromu systémové zánětlivé odpovědi (SIRS). SIRS bývá spojen se systémem oxidativním stresem, při němž dochází k tvorbě reaktivních kyslíkových forem (ROS) poškozujících buněčné struktury a tvořících další škodlivé metabolity.<sup>(12,16)</sup> Volné kyslíkové radikály jsou považovány za jednu z nejvýznamnějších poškozujících složek při kardiologickém výkonu.<sup>(20,31)</sup> V buňkách myokardu, a také v buněčných elementech jiných tělních soustav včetně soustavy imunitní, však existují nebo jsou indukovatelné některé adaptační mechanismy, které jsou schopny ochránit buňky před nežádoucími účinky ischemie a reperfuze. V této souvislosti jsou uváděny jako jedny z nejdůležitějších stresových proteinů (Hsp). Některé studie se soustředí na pochopení jejich role v kardioprotekci.<sup>(9,26,27,28)</sup>

Hsp jsou multigenní rodinou proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 10–150 kDa a výskytem ve všech důležitých buněčných organelách.<sup>(1)</sup> Jejich název vyplývá z historických souvislostí, kdy byla v roce 1962 u drosofly popsána reakce na tepelný šok tvorbou zduřelých míst na chromosomech izolovaných z buněk slinných žláz.<sup>(11)</sup> Jednalo se o vazbu transkripčních faktorů na specifická místa genů hsp.<sup>(12)</sup> Hsp jsou indukovány nejen zvýšenou teplotou, ale také řadou dalších stimúlů jako je působení virů, různých chemikálií, těžkých kovů, steroidních hormonů, dále mechanickým stresem, anoxií a vystavením volným radikálům.<sup>(6,11,12)</sup> Hsp patří k evolučně starým proteinům vyskytujícím se u prokaryot, eukaryot včetně rostlin, a napříč různými druhy jsou strukturně velmi konzervativní.<sup>(11)</sup> Některé Hsp jsou exprimovány konstitutivně, jiné jsou přísně inducibilní.<sup>(11)</sup> Stresová regulace exprese Hsp probíhá zejména na úrovni transkripce. Na specifické sekvence v promotorové oblasti genů hsp zvané HSE (heat shock element) se vážou aktivované specifické transkripční faktory HSF (heat shock transcription factor) a spouští transkripci genů hsp.<sup>(1,18)</sup> Funkce proteinů Hsp jsou velice rozmanité a daly by se shrnout pojmem udržení normálních buněčných funkcí, buněčné homeostázy. Nejčastěji bývá uváděna jejich funkce molekulárních „chaperonů“, tedy proteinů, které jsou schopny ovlivňovat terciární a kvartérní strukturu ostatních proteinů.<sup>(1,7)</sup> Dále je uváděna řada funkcí, mezi něž patří například inhibice apoptózy, regulace buněčného cyklu, ochrana cytoskeletu a další.<sup>(1,12)</sup>

Největší pozornost je v souvislosti s onemocněním srdce a oběhové soustavy u Hsp věnována rodinám

Hsp70 a Hsp60. Hsp70, nazývaný též mortalin, vykazuje různé subcelulární lokalizace, avšak dominantně je přítomen v mitochondriích. Zde je zodpovědný za transport proteinů dovnitř organel a jeho činnost závisí na ATP.<sup>(9)</sup> Hsp70 dále odpovídá za sestavování proteinů i multimerních proteinových komplexů jak v cytosolu, tak v mitochondriích a degradaci proteinů.<sup>(25)</sup> Má také rozmanité funkce související s buněčnou proliferací a neoplastickou transformací.<sup>(9)</sup> Jeho inhibice indukuje smrt buněk.<sup>(12)</sup> Současný výzkum se zaměřuje též na jeho protektivní funkce a možné terapeutické využití proti působení poškozujícího buněčného stresu.<sup>(9)</sup>

Hsp60 se nachází hlavně v mitochondriích, ale jsou popsány změny v intracelulární lokalizaci, exprese na buněčném povrchu a jeho uvolňování z mrtvých či umírajících buněk.<sup>(11)</sup> Hsp60 je silně závislý na svém cochaperonu Hsp10, který se k němu váže a ovlivňuje jeho vazebné vlastnosti a ATPázovou aktivitu.<sup>(9,25)</sup> Hsp60 funguje jako hlavní mitochondriální molekulární chaperon a je zodpovědný za transport mitochondriálních proteinů kódovaných jadernou DNA dovnitř mitochondrií.<sup>(1,9,29)</sup> Účastní se sestavování a degradace proteinů a též translokaci organel.<sup>(12)</sup> Extracelulární Hsp60, stejně jako Hsp70, aktivuje přirozenou imunitu CD14-dependentním způsobem.<sup>(4)</sup>

Kardiologické zákroky jsou v současnosti prováděny dvěma odlišnými způsoby. Buď jde o operaci na srdci, které je vyřazeno z činnosti a jeho funkci přebírá podpůrné zařízení (technika využívající CPB-cardiopulmonary bypass, „on-pump“ surgery), a nebo jde o novější přístup – operaci na bijícím srdci („off-pump“ surgery).<sup>(6)</sup> Kardiologické operace bez použití CPB jsou považovány za méně rizikové ve smyslu rozvoje syndromu systémové zánětlivé odpovědi.<sup>(2)</sup>

Cílem této práce je sledovat změny koncentrace Hsp60 a Hsp70 v séru u pacientů během kardiologického zákroku a krátce po něm. V souvislosti s odlišnými technikami vedení operace je našim cílem též sledovat, zda se operace s mimotělním oběhem a operace na bijícím srdci pojí s odlišnou expresí a uvolněním Hsp.

## MATERIÁL A METODY

### Soubor pacientů

Bylo sledováno 34 pacientů (26 mužů a 8 žen), kterým byl poprvé proveden koronární bypass. Studie byla schválena Etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Od každého účastníka studie byl obdržen informovaný souhlas. Pacienti prodělali buď konvenční myokardiální revaskularizaci s použitím CPB (n = 17, průměrný věk 70,53 ± 7,05 let) nebo byli operováni na bijícím srdci (n = 17, průměrný věk 66,41 ± 10,12 let). Obě dvě skupiny se od sebe významně nelišily věkem, pohlavím, počtem anastomóz a ejekčních frakcí. Medián ejekční frakce u nemocných operovaných s CPB byl 0,65. Totožná hodnota ejekční frakce byla i u nemocných operovaných bez použití CPB. V obou skupinách nemocných byl totožný počet provedených anastomóz (medián 2,0). Operační postupy a postupy vedení CPB byly obdobné pro všechny

pacienty. Pooperační péče byla zajišťována na jednotce intenzivní péče kardiologické kliniky, ze které byli pacienti v závislosti na zdravotním stavu překládáni na standardní oddělení. Podrobný popis operace včetně CPB je uveden v naší publikaci Kunesa a spol.<sup>(10)</sup>

#### Odběr vzorků

Vzorky žilní krve byly odebírány pacientům v pěti časových intervalech: při úvodu do anestezie (vzorek 1), po ukončení operace (vzorek 2), první pooperační den (vzorek 3), třetí pooperační den (vzorek 4) a sedmý pooperační den (vzorek 5).

#### Laboratorní zpracování

Žilní krev byla odebírána do odběrových zkumavek firmy Saarstedt (Německo). Po koagulaci a centrifugaci bylo sérum rozděleno do alikvotů a zamrazeno při  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vzorky byly zmrazeny a rozmrazeny pouze jednou. Koncentrace Hsp60 a Hsp70 byly stanoveny komerčně dostupnými kity ELISA (Elisa Stressgen Bioreagents, Německo) a hodnoceny spektrofotometricky při 450 nm.

#### Statistické hodnocení

Změny ve sledovaných parametrech a rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny dvoucestnou analýzou variance pro opakované měření a následným Fisherovým testem pro mnohonásobná porovnání. Dynamika změn je vyjádřena jako průměrné hodnoty dosažené v jednotlivých odběrech. Všechny testy byly prováděny při  $\alpha = 0,05$ . Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí statistického softwaru Statistica 5.5 (StatSoft, USA).

#### VÝSLEDKY

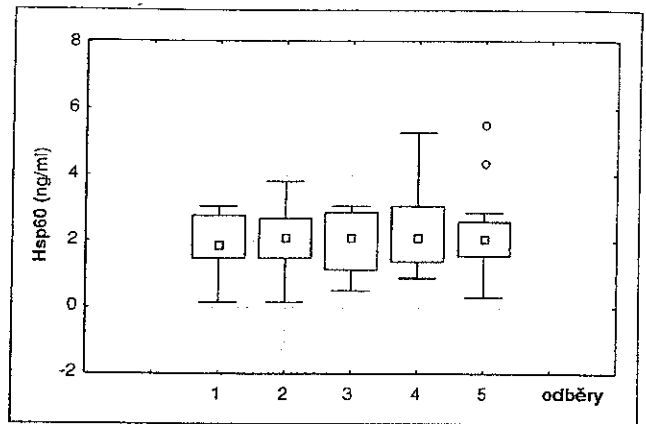
Výsledky stanovení sérové koncentrace Hsp60 u pacientů operovaných s použitím CPB jsou znázorněny na obrázku 1. Koncentrace Hsp60 se pohybovaly v rozmezí 0,15–12,85 ng/ml a nevykazovaly statisticky významné změny v průběhu operace a následných sedmi pooperačních dnů.

U pacientů operovaných na bijícím srdci se sérové koncentrace Hsp60 pohybovaly mezi 0,15–23,25 ng/ml, jak je znázorněno na obrázku 2. Změny v koncentraci byly opět shledány statisticky bezvýznamné s výjimkou posledního odběru – sedmý pooperační den, kdy byla koncentrace sérového Hsp60 významně nižší v porovnání s ostatními odběry ( $p < 0,0151$ ).

Porovnáním dynamiky sérového Hsp60 u obou dvou skupin pacientů jsme neodhalili žádné významné rozdíly mezi skupinou pacientů operovaných s použitím CPB a pacientů operovaných na bijícím srdci ( $p = 0,56$ ), výsledky nejsou uvedeny.

Stanovení koncentrace sérového Hsp70 u pacientů operovaných s použitím CPB přineslo následující výsledky: koncentrace Hsp70 se pohybovaly mezi 0,24–10,64 ng/ml a statisticky významný nárůst byl prokázán bezprostředně po skončení operace ( $p < 0,0001$ ). Průměrné hodnoty sérového Hsp70 u pacientů s CPB v perioperačním a pooperačním období jsou zachyceny na obrázku 3.

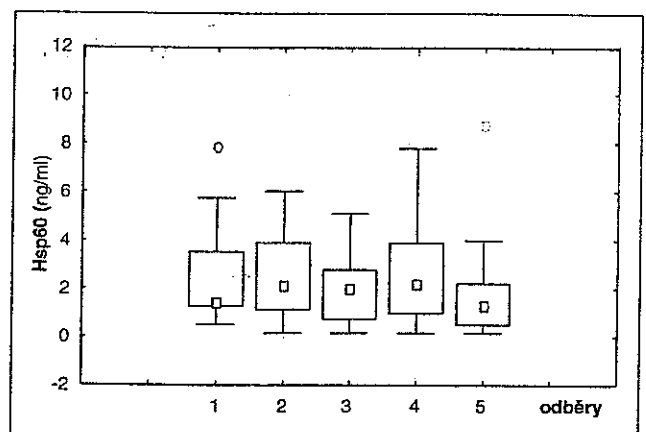
U pacientů operovaných na bijícím srdci se koncentrace sérového Hsp70 pohybovaly mezi 0,23–6,88



Obr. 1 Hsp60 – změny sérových koncentrací u nemocných operovaných s CPB

$F(4,64) = 0,36, p < 0,8385$

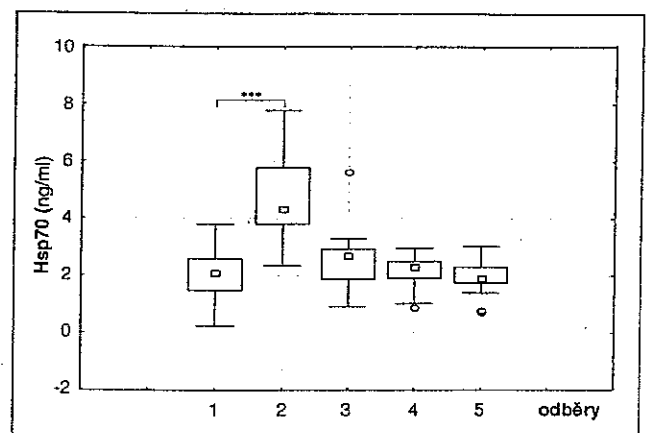
F – hodnota Fisherova testu



Obr. 2 Hsp60 – změny sérových koncentrací u nemocných operovaných bez CPB

$F(4,64) = 3,34, p < 0,0151$

F – hodnota Fisherova testu

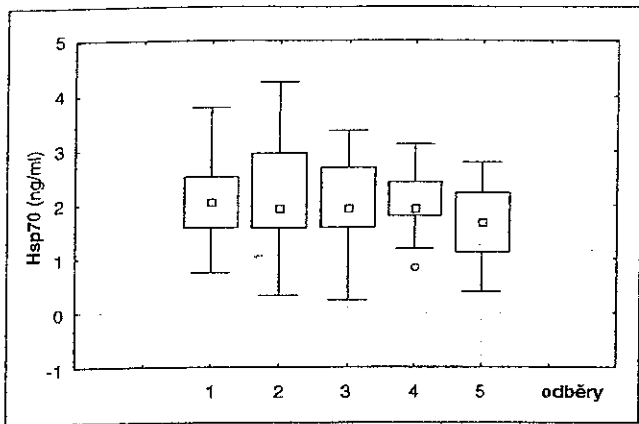


Obr. 3 Hsp70 – změny sérových koncentrací u nemocných operovaných s CPB

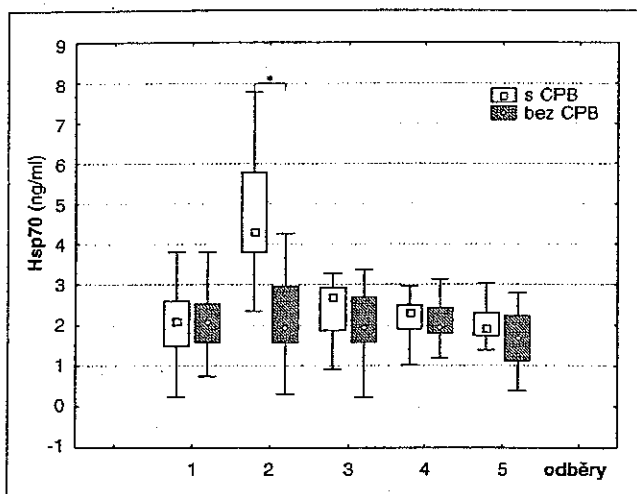
$F(4,64) = 21,12, p < 0,0001$

F – hodnota Fisherova testu

ng/ml, jak je uvedeno na obrázku 4. Mezi koncentracemi Hsp70 při jednotlivých odběrech nebyl nalezen významný rozdíl, tzn. koncentrace Hsp70 se v inkriminovaném čase příliš neměnila.



Obr. 4 Hsp70 – změny sérových koncentrací u nemocných operovaných bez CPB  
 $F(4,64) = 1,77, p < 0,1461$   
 F – hodnota Fisherova testu



Obr. 5 Hsp70 – porovnání sérových koncentrací u nemocných operovaných s CPB a bez CPB  
 $F(1,32) = 5,46, p < 0,0001$   
 F – hodnota Fisherova testu

Při porovnání dynamiky Hsp70 u pacientů operovaných s CPB a bez CPB byly nalezeny významné rozdíly v koncentraci bezprostředně po ukončení operačního výkonu, kdy u pacientů operovaných s CPB docházelo k výraznému nárůstu sérového Hsp70 v porovnání s pacienty operovanými na bijícím srdci ( $p < 0,0259$ , obrázek 5).

## DISKUSE

Předkládaná studie sleduje koncentrace sérových proteinů Hsp60 a Hsp70 u pacientů během kardiologického výkonu a následně po něm. Již řadu let jsou studovány postupy a strategie zlepšující ochranu myokardu a urychlující rychlost fyziologického zotavení po kardiologických výkonech.<sup>(1,15,22)</sup> Experimentálně na zvířecích modelech bylo prokázáno, že krátká ischemie srdce vede k rezistenci k následným ischemickým periodám a obdobné postupy u dalších orgánů, jako jsou ledviny nebo tenké střevo, jsou též schopny navodit ochranu myo-

kardu. Naopak krátká ischemická perioda myokardu může snížit například plicní poškození po následném kardiologickém výkonu.<sup>(15,24)</sup> Nabízí se tedy otázka, jaké ochranné mechanismy jsou při ischemických dějích indukovány a jakým způsobem je ochrana jednoho typu tkáně zprostředkována působením na jinou tkáň. Soudí se, že důležitou, i když ne jedinou, roli v mechanismu ochrany sehrávají proteiny Hsp, které zvyšují ochranu buněk při ischemicko-reperfučních dějích, zlepšují postischemickou funkční obnovu myokardu a mohou také snížit incidenci pooperační fibrilace síní.<sup>(1,30)</sup> Hsp posilují proteosyntézu, stabilizují nově formované proteiny a opravují denaturované proteiny.<sup>(24)</sup> Blahodárné působení je připisováno také enzymům s antioxidačními vlastnostmi jako je superoxid dismutáza a kataláza.<sup>(1,15,24)</sup>

Prokázali jsme, že kardiologický výkon za použití CPB vedl k větší indukci sérového Hsp70 v porovnání s koncentracemi u pacientů operovaných na bijícím srdci. Podobné výsledky publikovali Dybdahl a spol., kteří nacházeli nejvyšší sérové koncentrace Hsp70 2 hod. po operaci u pacientů operovaných s CPB.<sup>(3)</sup> V našem souboru byly rozdílné koncentrace Hsp70 nalezeny bezprostředně po ukončení operace, kdy u pacientů operovaných s CPB docházelo k významnému nárůstu tohoto proteinu. To odpovídá skutečnosti, že při operaci s použitím CPB dochází k daleko většímu ischemicko-reperfučnímu poškození. Z pohledu rozvoje systémové zánětlivé odpovědi je operace s použitím CPB považována za rizikovější.<sup>(5,13)</sup> V buněčných kulturách koronárních endotelových buněk a srdečních myocytů, stejně jako u experimentálních zvířat, bylo potvrzeno, že zvýšené koncentrace Hsp70 vedou ke kardioprotekci a k rezistencí k ischemii.<sup>(11,12,23)</sup> Intracelulární koncentrace Hsp70, avšak ne sérové, negativně koreluje s pooperační fibrilací síní, která je považována za běžnou arytmií po kardiologickém výkonu.<sup>(17)</sup> Ohse a spol. měřili expresi mRNA pro Hsp70 v polymorfonukleárních buňkách za účelem určení stupně perioperativního stresu. Prokázali slabý nárůst mRNA pro Hsp70 na konci operace a výrazný nárůst 6 hodin po operaci, přičemž k vyrovnání koncentrace na předoperační úroveň došlo 48 hodin po operaci.<sup>(21)</sup> Studie Schmitta a spol. ukázala, že nárůst Hsp70 byl po kardiologickém výkonu v průměru dvojnásobný jak v jádře, tak v cytosolu myocytů a endotelálních buněk.<sup>(28)</sup>

Na význam Hsp70 je možno pohlížet z několika úhlů. Bylo prokázáno, že extracelulární Hsp70 je považován za určitý signál nebezpečí, který vede k aktivaci imunitního systému. *In vitro* bylo prokázáno, že má významný imunoregulační potenciál. Může být též považován za ukazatel, který odráží stupeň poškození myokardu, kdy je do oběhu uvolňován z nekrotických či poškozených buněk. Zdrojem Hsp70 uvolněného do oběhu pak mohou být jak samotné buňky myokardu, tak leukocyty, zejména poškozené monocyty a granulocyty.<sup>(3)</sup>

Pokud jde o protein Hsp60, nebyly nalezeny rozdíly v koncentraci mezi nemocnými operovanými s použitím CPB a nemocnými operovanými na bijícím srdci. Zajímavé je pouze zjištění, že u pacientů operovaných na bijícím srdci dochází při posledním odběru, tj. sedmý pooperační den k významnému po-

klesu Hsp60 oproti předešlým hodnotám. Hsp60 bývá exprimován po působení různých stresových faktorů včetně ischemie a reperfuze.<sup>(27)</sup> Byla nalezena pozitivní korelace mezi sérovou koncentrací Hsp60 a TNF- $\alpha$ . Koncentrace cirkulujícího Hsp60 jsou asociovány s časnými stadii kardiovaskulárních onemocnění. Hsp60 působí jako prozánětlivý protein, ale jeho prozánětlivá aktivita není vyjádřena pokud je uložen nitrobuněčně. V koncentraci větší než 100  $\mu\text{g/ml}$  v plazmě je biologicky aktivní a je schopen stimulovat myeloidní buňky k produkci prozánětlivých mediátorů a endotelové buňky k expresi adhezivních molekul, což může přispívat k patogenezi aterosklerózy. Narůstají důkazy o tom, že Hsp60 uvolněný do oběhu je asociován s rozvojem choroby věnčitých tepen.<sup>(9,29)</sup> Studie Schäflera nezjistily zvýšené hodnoty Hsp60 v myokardu pacientů podstupujících kardiokirurgické výkony, zato u pacientů s chronickou fibrilací síní docházelo k 2,5násobnému nárůstu Hsp60 v porovnání s pacienty s normálním sinusovým rytmem.<sup>(26,27)</sup> Při pokusech s buněčnými kulturami, kde byla simulována ischemie, bylo zjištěno, že pouze zvýšená exprese Hsp60 bez zvýšené exprese Hsp10 nemá žádné protektivní účinky.<sup>(12)</sup>

Nelze si nepoložit otázku, zda zvýšení sérové koncentrace Hsp60 a Hsp70 přináší pozitivní, či negativní následky pro operovaného pacienta. Z hlediska navození ochrany myokardu a dalších tkání je indukce Hsp považována za pozitivní jev. Některé studie se zabývají aplikací indukce Hsp v klinické praxi a zkoumají různé farmakologické postupy zvyšující expresi Hsp.<sup>(1,6,12,14,19)</sup>

## ZÁVĚR

Studie prokázala zvýšené koncentrace Hsp70 u kardiokirurgických pacientů operovaných s použitím CPB oproti pacientům operovaných na bĕjícím srdci. K výraznému nárůstu koncentrace sérového Hsp70 dochází bezprostředně po ukončení operace u pacientů operovaných s CPB, což naznačuje větší ischemicko-reperfuční poškození při tomto typu operace. Výzvou k následným studiím je korelovat tyto výsledky s klinickými daty jednotlivých pacientů.

## LITERATURA

1. Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins. Molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1998;83:117-32.
2. Diegeler A, Doll N, Rauch T, et al. Humoral immune response during coronary artery bypass grafting. A comparison of limited approach, „off-pump“ technique, and conventional cardiopulmonary bypass. *Circulation* 2000;102 (Suppl III):95-100.
3. Dybdahl B, Wahba A, Haaverstad R, et al. On-pump versus off-pump coronary artery bypass grafting: more heat-shock protein 70 is released after on-pump surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;25:985-92.
4. Dybdahl B, Wahba A, Lien E, et al. Inflammatory response after open heart surgery. Release of heat-shock protein 70 and signaling through Toll-like receptor-4. *Circulation* 2002;105:685-90.
5. Franke A, Lante W, Fackeldey V, et al. Pro-inflammatory cytokines after different kinds of cardio-thoracic surgical

- procedures: Is what we see what we know? *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;28:569-75.
6. Gray CC, Amrani M, Yacoub MH. Heat stress proteins and myocardial protection: experimental model or potential clinical tool? *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:559-73.
7. Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif* 2000;33:341-65.
8. Khan NE, de Souza A, Mister R, et al. A randomized comparison of off-pump and on-pump multivessel coronary-artery bypass surgery. *New Engl J Med* 2004;350:21-8.
9. Kirmanoglou K, Hennekum A, Schäfler AE. Expression of mortalin in patients with chronic atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2004;99:404-8.
10. Kunes P, Lonsky V, Mandak J, et al. The long pentraxin 3 in cardiac surgery: distinct responses in „on-pump“ and „off-pump“ patients. *Scand Cardiovasc J* 2007;41:171-9.
11. Lamb DJ, El-Sankary W, Ferns GAA. Molecular mimicry in atherosclerosis: a role for heat shock proteins in immunisation. *Atherosclerosis* 2002;167:177-85.
12. Latchman DS. Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc Res* 2001;51:637-46.
13. Levy JH, Tanaka KA. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2003;75:715-20.
14. Li F, Hayes JK, Wong KC. Gene therapy: a novel method for the treatment of myocardial ischemia and reperfusion injury - mini-review. *Acta Anesthesiol Sin* 2000;38:207-15.
15. Li G, Chen S, Lu E, Luo W. Cardiac ischemic preconditioning improves lung preservation in valve replacement operations. *Ann Thorac Surg* 2001;71:631-5.
16. Luyten CR, van Overveld FJ, De Backer LA, et al. Antioxidant defence during cardiopulmonary bypass surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;27:611-6.
17. Mandal K, Torsney E, Poloniecki J, Camm AJ, Xu Q, Jahangiri M. Association of high intracellular, but not serum, heat shock protein 70 with postoperative atrial fibrillation. *Ann Thorac Surg* 2005;79:865-71.
18. McGrath LB, Locke M. Myocardial self-preservation: absence of heat shock factor activation and heat shock proteins 70 mRNA accumulation in the human heart during cardiac surgery. *J Card Surg* 1995;10:400-6.
19. Nanasi PP, Jednakovits A. Multilateral in vivo and in vitro protective effects of the novel heat shock protein inducer, bimoclonol: results of preclinical studies. *Cardiovasc Drug Rev* 2001;19:133-51.
20. Ochoa JJ, Vilchez MJ, Matalx J, Ibanez-Quiles S, Palacios MA, Munoz-Hoyos A. Oxidative stress in patients undergoing cardiac surgery: comparative study of revascularization and valve replacement procedures. *J Surg Res* 2003;111:248-54.
21. Ohse K, Yashiki S, Fujiyoshi T, Sonoda S, Yoshimura N. Expression of heat shock protein 70 mRNA in polymorphonuclear cells responding to surgical stress. *J Anesth* 1999;13:144-9.
22. Perrault LP, Menasche P, Bel A, et al. Ischemic preconditioning in cardiac surgery: a word of caution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:1378-86.
23. Rafiee P, Shi Y, Pritchard KA Jr, et al. Cellular redistribution of inducible Hsp70 protein in the human and rabbit heart in response to the stress of chronic hypoxia. *J Biol Chem* 2003;278:43636-44.
24. Richard V, Kaeffer N, Thuillez C. Delayed protection of the ischemic heart - from pathophysiology to therapeutic applications. *Fundam Clin Pharmacol* 1996;10:409-15.
25. Sammut IA, Harrison JC. Cardiac mitochondrial complex activity is enhanced by heat shock proteins. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:110-5.
26. Schäfler AE, Kirmanoglou K, Balbach J, Pecher P, Hennekum A. The expression of heat shock protein

- 60 in myocardium of patients with chronic atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2002;97:258-61.
27. Schäfler AE, Kirmanoglou K, Gallmeier U, Pecher P, Hannekum A, Schumacher B. Heat shock protein 60 expression in patients undergoing cardiac operations. *J Cardiovasc Surg* 2003;44:187-90.
28. Schmitt JP, Schunkert H, Birnbaum DE, Aebert H. Kinetics of heat shock protein synthesis in the human heart after cold cardioplegic arrest. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;22:415-20.
29. Shamaei-Tousi A, Stephens JW, Bin R, et al. Association between plasma levels of heat shock protein 60 and cardiovascular disease in patients with diabetes mellitus. *Eur Heart J* 2006;27:1565-70.
30. St Rammós K, Koullias GJ, Hassan MO, et al. Low preoperative HSP70 atrial myocardial levels correlate significantly with high incidence of postoperative atrial fibrillation after cardiac surgery. *Cardiovasc Surg* 2002; 10:228-32.
31. Tekeuchi M, Takahashi T, Taga N, et al. Right ventricle of patients undergoing congenital cardiac surgery differentially expresses haem oxygenase-1 and heat shock protein 70 genes. *J Int Med Res* 2003;31: 413-7.

*Došlo do redakce 17. 4. 2007*

*Přijato po úpravách 28. 6. 2007*

**PRESTARUM® NEO**

**PRESTARUM® NEO FORTE**

**PRESTARUM® COMBI**

**PREDUCTAL® MR**

**TENAXUM®**

**Procoralan®**



# Mediators of Inflammation

## • MI/35461.v2 (Clinical Study)

### Details

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>Title</b>                    | Early expression of FcγRI (CD64) on monocytes of cardiac surgical patients and higher density of monocyte antiinflammatory scavenger CD163 receptor in "on-pump" patients |
| <b>Issue</b>                    | regular   |
| <b>Additional Files</b>         | Reply to review reports   |
| <b>Manuscript No.</b>           | 35461.v2 (Clinical Study)   |
| <b>Resubmitted On</b>           | 2007-10-30  |
| <b>Authors</b>                  | Martina Kolackova, <b>Jan Krejsek</b> , Manuela Kudlova, Pavel Kunes, Vladimir Lonsky, Jiri Mandak, Ctirad Andrys, Karolina Jankovicova                                   |
| <b>Editor</b>                   | Freek J. Zijlstra (Assigned on 2007-10-30)  |
| <b>Editorial Recommendation</b> | Publish Unaltered (Made On 2007-10-31)  |
| <b>Editorial Decision</b>       | Accepted (Made On 2007-10-31)   |

# Early expression of Fc<sub>γ</sub>RI (CD64) on monocytes of cardiac surgical patients and higher density of monocyte antiinflammatory scavenger CD163 receptor in “on-pump” patients

(Running head: Expression of CD64, CD163 in cardiac surgical patients)

Martina Kolackova, Manuela Kudlova, Pavel Kunes<sup>1</sup>, Vladimir Lonsky<sup>1</sup>, Jiri Mandak<sup>1</sup>, Ctirad Andrys, Karolina Jankovicova, Jan Krejsek

Charles University in Prague, Medical School in Hradec Kralove  
Department of Clinical Immunology and Allergy  
<sup>1</sup>Department of Cardiosurgery

Corresponding author:

Jan Krejsek, Charles University in Prague, Medical School in Hradec Kralove, Department of Clinical Immunology and Allergy, Sokolska st. 581, 500 05 Hradec Kralove  
phone: +420 495 833 454, fax: +420 495 832 015, e-mail: krejsek@fnhk.cz

## Abstract

### Objective

Activation of innate immunity cells is inseparably linked to cardiac surgical operation. The aim of this study was to assess the kinetics in the expression of receptor for Fc part of IgG, FcRI (CD64), and scavenger receptor CD163 on peripheral blood cells of cardiac surgical patients and to examine the effect of cardiac bypass as a separable influence on the systemic acute inflammatory response.

### Methods

Forty patients, twenty in each group, were randomly assigned to CABG surgery performed either with (“on-pump”) or without (“off-pump”) cardiopulmonary bypass. Standardized quantitative flow cytometry method was used to determine the expression of surface markers.

### Results

The density of CD64 molecule on monocytes reached maximum on the 1<sup>st</sup> postoperative day ( $p < 0.001$ ) whereas the peak for CD64 molecule expression on granulocytes was postponed to the 3<sup>rd</sup> postoperative day ( $p < 0.001$ ). The expression of CD163 scavenger molecule on monocytes reached maximum on the 1<sup>st</sup> postoperative day ( $p < 0.001$ ). The density of CD163 molecule on monocytes on the 1<sup>st</sup> postoperative day is significantly higher in “on-pump” patients in comparison with “off-pump” patients ( $p < 0.001$ ).

### Conclusion

In cardiac surgical patients the expression of activation marker Fc<sub>γ</sub>R1 (CD64) on monocytes is increased earlier in comparison with granulocytes in both “on-pump” and “off-pump” patients. The expression of scavenger molecule CD163 on monocytes is significantly higher in “on-pump” patients.

**Key words:** cardiac surgery, inflammation, CD64, CD163, expression

### Introduction

Numerous events, potentially generating an inflammatory response, are induced during cardiac surgery. Amongst them, the combination of surgical injury, mechanical manipulation with the heart, the contact of blood components with the artificial surfaces of the cardiopulmonary bypass circuit, transient endotoxemia and ischemia reperfusion injury of the heart and lungs are relevant (1).



The inflammatory reaction is the result of a complex interplay between numerous humoral factors and cell substrate of inflammation. Amongst cells involved in this process special role is devoted to innate immunity monocyte-macrophages and granulocytes. Whereas monocyte-macrophage cells are the richest source of pluripotent proinflammatory cytokines upon activation, activated granulocytes are recruited into tissues by stepwise interaction between adhesion molecules on the surface of leukocytes and their corresponding receptors expressed on the luminal surface of inflamed endothelium (2). There is a substantial long lasting effort to identify activated monocytes and neutrophils in blood of patients with systemic inflammatory response induced by various stimuli either to identify patients at the risk of development of overwhelming inflammatory response potentially ultimating into multiple organ failure syndrome (MOFS) or to implicate the causative agent of such inflammatory response e.g. bacterial infection (3).

Activation of myeloid cells by various physiological and experimental stimuli is accompanied by multiple surface changes associated predominantly with degranulation. Thus, activated blood myeloid cells typically upregulate surface expression of chemotactic receptors, complement receptor type 3 (CD11b/CD18), and down-modulate surface density of lipopolysaccharide (LPS) receptor CD14, the low affinity Fc<sub>γ</sub>RIII or CD16 receptor, adhesion receptors CD44 and CD62L (4).

The Fc-receptor I, Fc<sub>γ</sub>RI, (CD64), is a high affinity receptor for IgG1 and IgG3 subclasses of immunoglobulins. Fc<sub>γ</sub>RI is constitutively expressed with high density on monocytes and macrophages, less so on eosinophils, but only to a very low extent on resting neutrophils.

Numerous substances both exogenous and endogenous origin rapidly upregulate Fc<sub>γ</sub>RI expression on the surface of neutrophils (5). Microbial cell wall components such as LPS, endogenous complement split products and cytokines, e.g. IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , are some of the activators. The expression of Fc<sub>γ</sub>RI is determined by immunofluorescence and flow cytometry. The introduction of a new diagnostic kit Leuko64<sup>TM</sup> enables standardized and quantitative approach to the determination of Fc<sub>γ</sub>RI expression on immune cells.

Hemoglobin scavenger receptor CD163 is a group B cysteine-rich scavenger receptor expressed exclusively by cells of monocyte-macrophage lineage. This glycoprotein is characterized as a scavenger receptor for hemoglobin, mediating endocytosis of hemoglobin- haptoglobin complexes. Previous studies have indirectly linked CD163 scavenger receptor to anti-inflammatory phenomena (6). High CD163 expression correlates with the Mo2 anti-inflammatory properties of monocytes and macrophages (7).

The aim of this study was to follow the changes in the expression of granulocyte activation markers Fc<sub>γ</sub>RI and antiinflammatory CD163 scavenger receptor in patients undergoing cardiac surgical operation either with the use of cardiopulmonary bypass (“on-pump”) or operated on the beating heart during “off-pump“ operation and in the postoperative period using quantitative flow cytometric approach.

## **Patients**

Forty patients (31 male, mean age 67.9 $\pm$ 9 and 9 female, mean age 66.4 $\pm$ 6.4, collective mean age 67.6 $\pm$ 8.5 years) referred to first-time coronary artery bypass grafting (CABG) were enrolled in this study. Patients underwent either conventional myocardial revascularization with cardiopulmonary bypass and cardioplegic arrest of the heart (“on-pump”, n=20, 16 male, 4 females, mean age 69.4 $\pm$ 7) or beating heart surgery (“off-pump”, n=20, 15 males, 5 females, mean age 65.9 $\pm$ 9.7).

Patients in both groups were comparable in age, preoperative left ventricular ejection fraction (median 0.65 in “on-pump”, 0.65 in “off-pump” patients, respectively) and the number of performed coronary anastomoses (median 2.0 in “on-pump”, 2.0 in “off-pump”, respectively). The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital in Hradec Králové. All participants were informed in detail about the purpose of the study both orally and in writing. They were free to ask any questions. One person refused to participate for reasons he would not specify. All active subjects have given written informed consent.

Cardiopulmonary bypass, “off-pump” technique and anesthesiological management have been recently described in details elsewhere (8).

### **Blood sampling**

Peripheral venous blood from an antebrachial vein was withdrawn in the operating room and in the intensive care unit. Samples were collected into heparinized tubes VACUTAINER, cat No. 36884 manufactured by Becton Dickinson.

In both “on-pump” and “off-pump” patients, blood was withdrawn at following time points:

- 1: introduction to anaesthesia, which in both groups represented the baseline or reference value for all parameters measured thereafter
- 2: after termination of the operation
- 3: the first postoperative day
- 4: the third postoperative day
- 5: the seventh postoperative day.

Additional samples were taken from “on-pump” patients:

- 1a: before cross-clamping of the aorta
- 1b: after aortic cross-clamp release
- 1c: after termination of CPB

### **Methods**

Leuko64™ kit manufactured by TRILLIUM DIAGNOSTICS, LLC ([www.trilliumdx.com](http://www.trilliumdx.com), Brewer, Maine, USA) was used to determine the expression of CD64 and CD163 on leukocytes of blood samples. Leuko64™ kit is composed of a reagent cocktail of two monoclonal antibodies with specificities to CD64 (clones 22 and 32.2, both FITC conjugated) and monoclonal antibody to CD163 (clone Mac2-148, phycoerythrin conjugated) and a fluorescence beads suspension used for instrument calibration and standardization of leukocyte CD64 and CD163 expression in human blood. The assay was run according to the instruction for use provided by manufacturer. Briefly, 50 µl of blood and the Leuko64 monoclonal cocktail reagent are incubated for 10 minutes, red cell lysis buffer is added and incubated an additional 15 minutes, and 5 µl of bead suspension is added prior to flow cytometric analysis. Results were measured by a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) using CELLQuest software. The listmode data were analyzed using Leuko64™ software (TRILLIUM Diag.). Results are expressed as indexes of positivity for CD64 and CD163 expression on granulocyte and monocyte populations as provided by the Leuko64 software.

### **Statistical analysis**

We compared changes in the intensity of expression of CD64 and CD163 in both group of patients (“on-pump”, “off-pump”) separately. Samples taken at the introduction to anesthesia were considered as reference or baseline expression of CD64 and CD163. Differences between “off- and on-pump” patients were also evaluated.

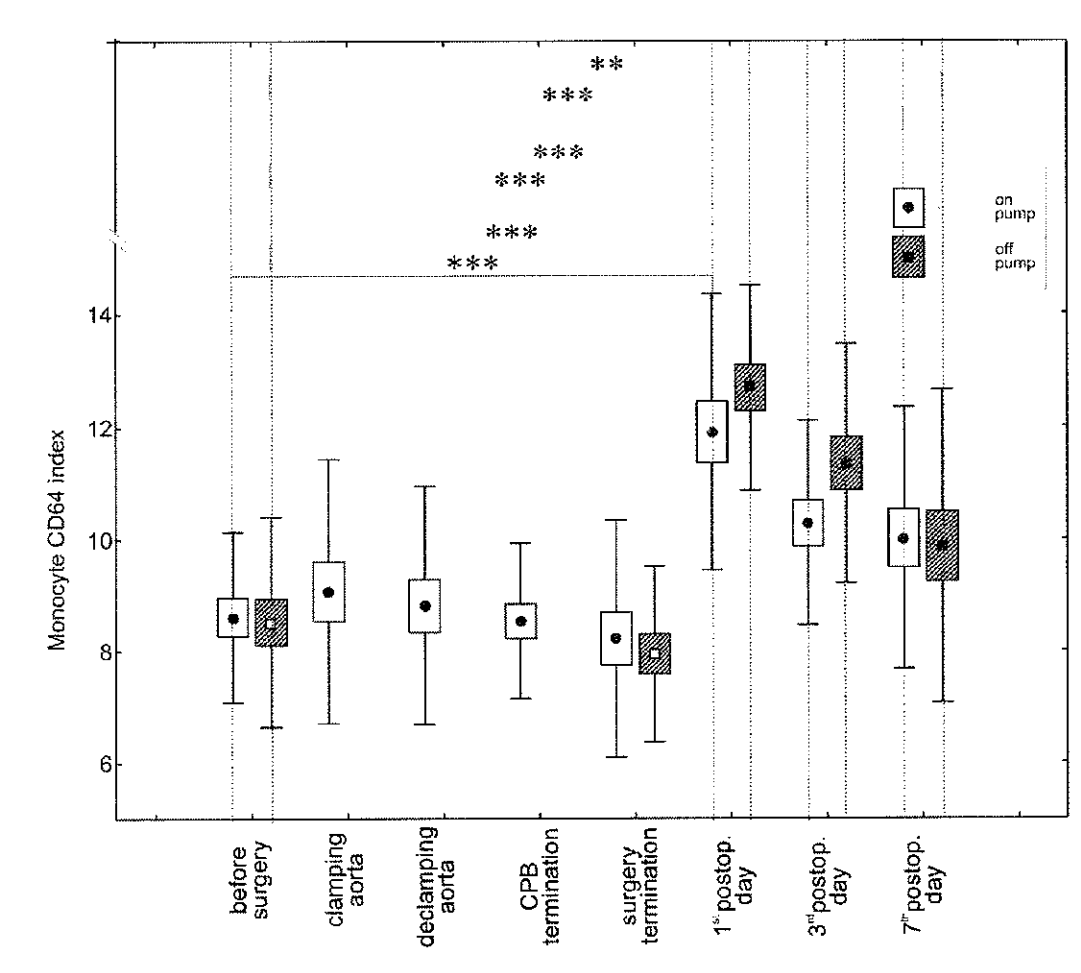
Data were analyzed using two-way ANOVA for repeated measures with Fisher test for multiple comparisons. To exclude confounding effect of different age and sex presentation in the both groups, unpaired t-test and chi-square were performed. A probability (p) value < 0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed with Statistica 5.5 software (Statsoft, USA).

### **Results**

We found substantial dynamics in the expression of both CD64 and CD163 molecules on immune cells in our cardiac surgical patients. These changes are expressed as changes in CD64 and CD163 indexes separately for monocytes and granulocytes. Preoperative levels were taken as reference points. The monocytes CD64 index was significantly increased in both “on-pump” and

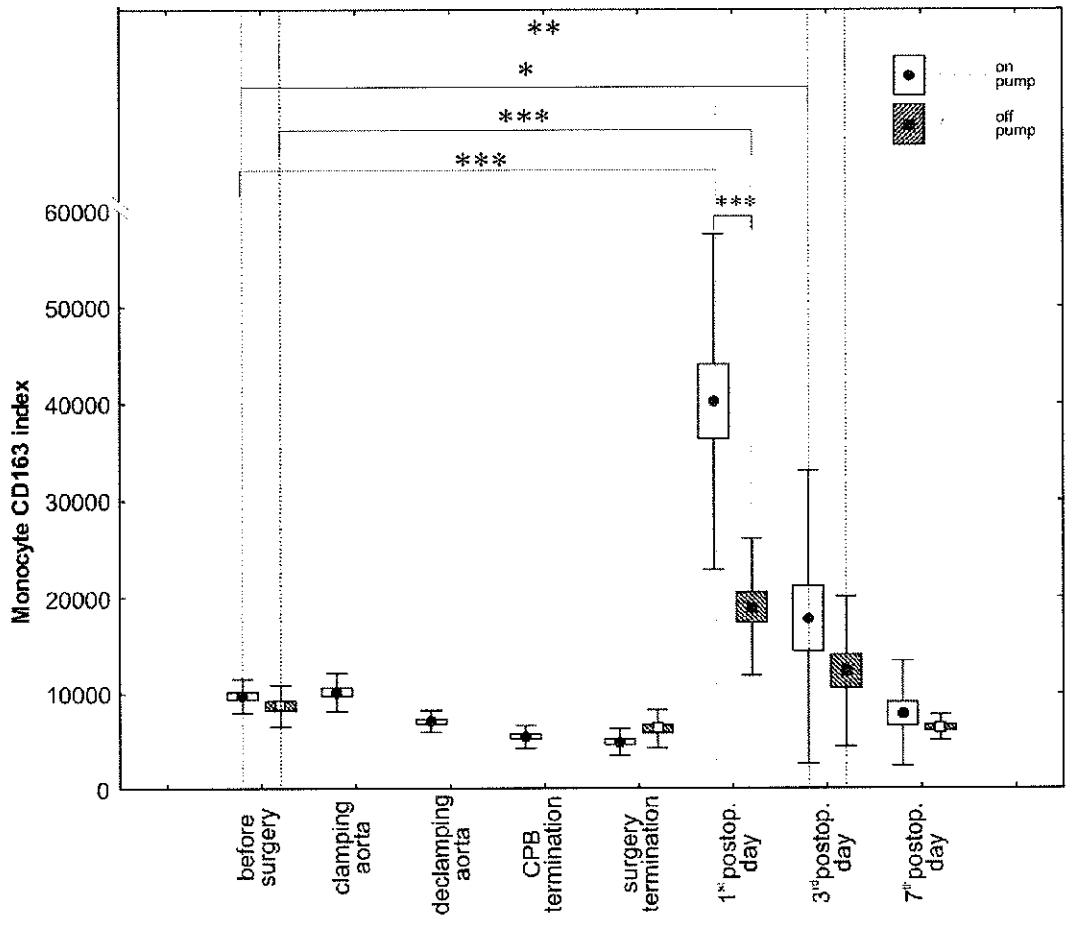
”off-pump“ patients in postoperative period from the first to the seventh day ( $p < 0.01$ ). Comparing monocyte CD64 index between ”on-pump“ and ”off-pump“ patients there were no significant differences ( $p < 0.587$ ) during operation and in the postoperative period (Fig. 1).

Fig. 1: CD64 molecule expression on monocytes in ”on-pump“ and ”off-pump“ patients



The similar patterns were found for monocyte CD163 index in our cardiac surgical patients with following exceptions. Monocyte CD163 index, in contrast to the monocyte CD64 index, showed a significant difference as a function of the pump status. There was statistically significant increase in monocyte CD163 index in "on-pump" patients compared to "off-pump" patients at the first postoperative day ( $p < 0.001$ ) (Fig. 2).

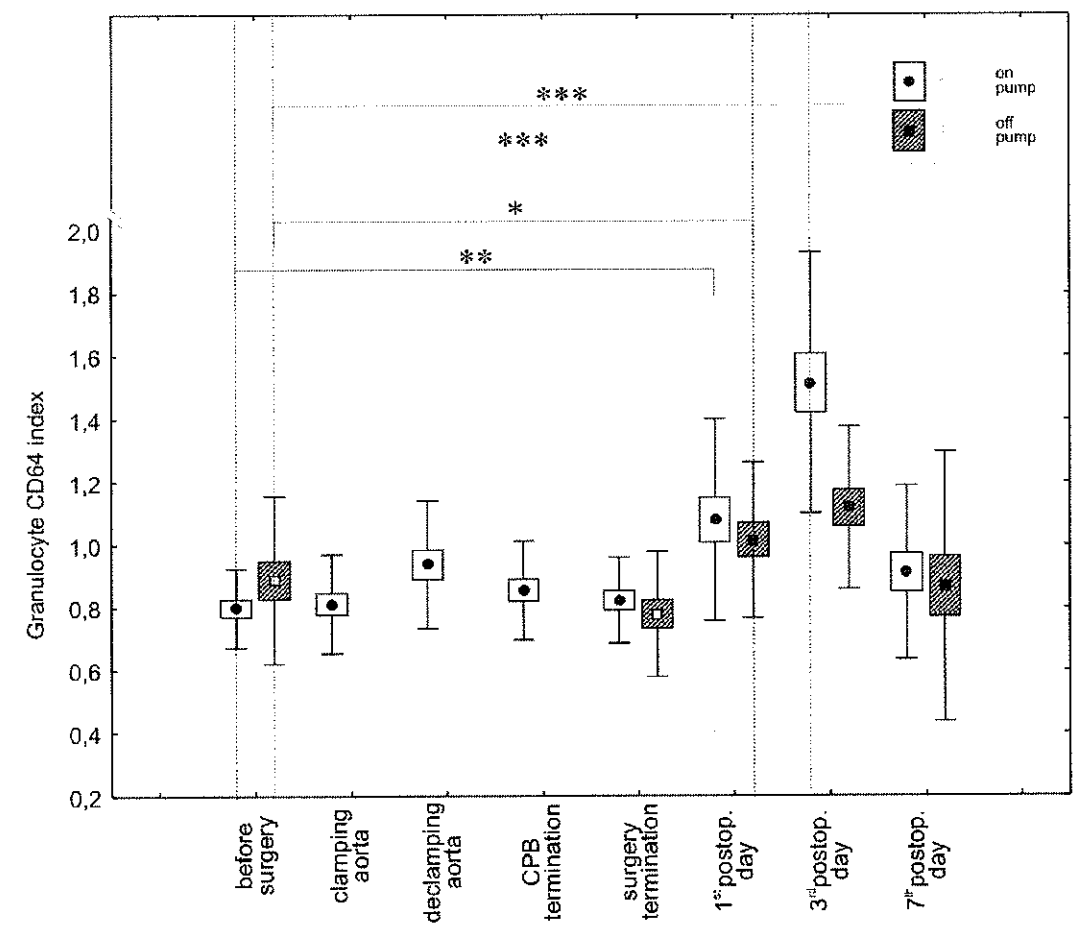
Fig. 2: CD163 molecule expression on monocytes in "on-pump" and "off-pump" patients



The significant increase in monocyte CD163 index in both "on-pump" and "off-pump" patients compared to the baseline expression was found only at the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> postoperative day ( $p < 0.01$ ).

The granulocyte CD64 index was significantly increased both in "on-pump" and "off-pump" patients at the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> postoperative day. A statistically significant differences of granulocyte CD64 indexes between "on-pump" and "off-pump" were not reached ( $p < 0.195$ ) (Fig.3).

Fig. 3: CD64 molecule expression on granulocytes in "on-pump" and "off-pump" patients



The original and pathophysiologically very important observation in our results is that the maximum of CD64 expression on monocytes (1<sup>st</sup> postoperative day) precedes the maximum of CD64 expression on granulocytes (3<sup>rd</sup> postoperative day). The granulocyte CD64 expression returned to baseline or normal levels by the 7<sup>th</sup> postoperative day.

## Discussion

A long term sustained effort is devoted to the better understanding of inflammatory reaction which is inseparably linked to every cardiac surgical operation. Numerous humoral and cell-mediated parameters of immune system have been studied to identify markers describing the development of such inflammatory reaction. The ultimate goal of such studies is to identify those patients who are at substantial risk for development of overwhelming systemic inflammation (SIRS), a condition of complex physiology that might severely compromise the outcome of surgery or even lead to death. Many studies conducted in the last few years have shown reduced inflammation in patients operated on by the "off-pump" technique compared to "on-pump" surgery (9). On the other hand, any definitive proof in favor "off-pump" surgery in terms of reduced long-term mortality compared to its "on-pump" counterpart has not been reported. The very trauma of surgery seems to be more relevant in initiating SIRS rather than cardiopulmonary bypass itself, the latter adding a CPB specific fraction on top of unfavorable events (10).

The objective of this study was to compare the degree of activation of innate immunity cells between "on-pump" and "off-pump" patients. The novel diagnostic Leuko64 kit was used by us to dissect such differences. This kit enables quantitative determination of CD64/CD163 molecule expression on immune cells by flow cytometry.

Fc<sub>v</sub>R1 receptor (CD64) is constitutively expressed on macrophages, monocytes and eosinophils but its expression is negligible on resting neutrophils. Neutrophil CD64 molecule expression is one of many activation-related surface receptors changes manifested during the normal innate immunity response. Microbial cell wall components such as LPS, complement split products and cytokines (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) are some of the activators (3). In contrary to numerous other neutrophilic activation surface antigens, such as CD11b/CD18, CD14, CD16 with large storage intracellular pools, CD64 has limited intracellular storage, but de novo synthesis can be induced in the presence of proinflammatory conditions. In comparison with former neutrophilic activation markers, CD64 expression on neutrophils is thus much less affected by stimuli of degranulation to which these cells are extensively exposed both during cardiac surgical operation and during blood sample processing (5). Thus CD64 molecule appears uniquely suited as a surrogate marker of neutrophil activation or systemic acute inflammatory response as its expression starts from less than 2,000 sites per cell and becomes up-regulated in a graded fashion depending upon intensity of stimulation by cytokines (4).

Clinical usefulness of CD64 determination has been proven in differential diagnosis of sepsis of bacterial origin. Changes in the expression of CD64 on circulating leukocytes in patients undergoing cardiothoracic surgery were also reported (11). Some of these previous works are suffering from the lack of precise quantitation since CD64 positivity was for example expressed as mean fluorescence intensity (11, 12). This means of quantitation is valid on a single platform for day to day comparison, but lacks standardization necessary for a routine clinical laboratory test, whereas the Leuko64 kit approach does allow for inter-laboratory comparisons. Application of a new standardized diagnostic kit in our study overcomes above mentioned limitations. Using calibration fluorescence beads and specialized software, CD64/CD163 density is expressed as index positivity separately for granulocytes and monocytes. As expected, CD64 positivity on monocytes is one log higher in comparison with granulocytes. Significant increase in the both monocytes and granulocytes CD64 expression has been found on the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> postoperative days. No significant differences between "on-pump" and "off-pump" patients have been recognized. Whereas CD64 expression on monocytes is nearly identical for both "on-pump" and "off-pump" patients, there is a tendency for higher granulocyte CD64 index on the 3<sup>rd</sup> postoperative day in "on-pump" patients. This likely reflects the greater sensitivity to cytokine effects of granulocytes compared to monocytes. Our results are in contrast to the work of Stefanou et al (13) who did not report any induction of CD64 expression on monocytes of cardiac surgical patients post CPB. However, only 10 patients were enrolled to their study with some differences in CPB compared to our patients. Furthermore, our attempt using Leuko64 kit ensures better standardisation of method in comparison with previous work, where positivity was expressed as a simple MFI.

The neutrophils CD64 index is designed so that normal inactivated cells yield value of 1.00 and blood samples from individuals with documented sepsis or SIRS typically show values of > 1.50. In our patients, the perioperative and postoperative period was uneventful with the only one

exception, the patient, who will be discussed below. It is our original observation that the maximum of CD64 expression on monocytes of our cardiac surgical patients has already been reached on the 1<sup>st</sup> postoperative day in contrast to granulocytes in which the maximum of CD64 expression has been postponed to the 3<sup>rd</sup> postoperative day. This observation implies that Fc<sub>γ</sub>RI expression on monocytes is upregulated by a different cellular mechanism very early during operation by the exposition of monocytes to various danger patterns which are raised during operation. The upregulation of Fc<sub>γ</sub>RI on granulocytes is a secondary event mediated by their exposition to proinflammatory cytokines and mediators formed by monocytes-macrophages.

The Fc<sub>γ</sub>RI receptor (CD64) on white blood cells integrate responses involving both the innate and acquired immune systems and are very important for effective phagocytosis of bacteria and immune complexes. A new, intrinsic role for this receptor has recently been proposed by Devaraj et al who have described the participation of Fc<sub>γ</sub>RI on internalization of C-reactive protein by endothelial cells, with subsequent release of chemoattractive proinflammatory IL-8, decrease of eNOS and increased ICAM-1 and VCAM-1 adhesion molecules (14). In conclusion, Fc<sub>γ</sub>RI reveals proinflammatory activities in general.

Proinflammatory pathways have to be tightly counterbalanced by numerous anti-inflammatory processes, i.e. production of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 (15), to maintain protective physiological level of inflammatory response in cardiac surgical patients. Another approach to calm down inflammatory reaction is removing of pleiotropic proinflammatory species by the action of so called scavenger receptors which are differentially expressed on cells of both immune and non-immune origin (6). Unique characteristics amongst these scavenger receptors reveals haemoglobin scavenger receptor (CD163). CD163 scavenger receptors represent a highly efficient system to remove potentially toxic and proinflammatory haemoglobin from the circulation and local sites of inflammation (16). Cardiac surgical patient are extensively exposed to large amounts of free heme/hemoproteins due to intravascular haemolysis and tissue damage. There is accumulating evidence that an excess of free heme can cause cell damage and tissue injury. Heme catalyses the formation of reactive oxygen species (ROS), resulting in oxidative stress. Because the low-molecular weight iron chelated heme is lipophilic, it can easily intercalate in the membrane and impair lipid bilayers and organelles, such as mitochondria and nuclei, and destabilize cytoskeleton (17). Several defense mechanisms against free heme-mediated oxidative stress and inflammation exist. They consist of intra- (e.g. heme oxygenase-2 and -3) and extracellular (e.g. hemopexin, albumin) scavengers, anti-oxidative enzymes and heme oxygenase-1 during hemolysis.

Intravascular free hemoglobin is captured by plasma scavenger protein haptoglobin. It is generally accepted that stable haemoglobin-haptoglobin complexes are subsequently delivered to the reticuloendothelial system by CD163 receptor-mediated endocytosis (16). Any free vascular heme is bound to the plasma protein hemopexin or albumin, which transport it to the liver for degradation in reticuloendothelial system. However, when large amounts of free heme proteins or heme (locally) accumulate, like in a blood clot or after vascular deposition, the scavengers get overwhelmed or are unable to reach them. This enables heme to exert its damaging effects. Therefore, the amount of free heme must be tightly controlled to maintain homeostasis and avoid pathological conditions.

The monocyte CD163 index has been found to be between 5,000 and even 40,000 in our study. There was a sharp increase of monocyte CD163 in the postoperative period reaching statistically highly significant maximum ( $p < 0.001$ ) on the 1<sup>st</sup> postoperative day for both “on-pump” and “off-pump” patients followed by decrease to the the baseline preoperative levels. Furthermore, the patients' monocyte CD163 index is significantly higher ( $p < 0.001$ ) in “on-pump” patient group on the 1<sup>st</sup> postoperative day. Reports regarding monocyte CD163 expression in cardiac surgical patients are very sparse. In a study by Goldstein et al (18) significant increase in the monocyte CD163 expression on the 1<sup>st</sup> postoperative day was found. This is in an accord with results of our study. But there were several limitations in previous study. CD163 molecule was expressed as mean fluorescence index (MFI) in comparison with our study in which standardized quantitative approach using calibration fluorescence beads was exploited yielded much more relevant data. The changes in the entire perioperative period and during postoperative period up to the 7<sup>th</sup> postoperative day have been followed by us in comparison with previous study.

The link of CD163 hemoglobin scavenger receptor to anti-inflammatory phenomena in

cardiac surgical patients has been proven by Philippidis et al (19). In their study elevated expression of CD163 on circulating monocytes during the resolution phase of the systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass surgery was reported. Furthermore, binding of hemoglobin-haptoglobin complexes to CD163 expressing monocytes elicited potent interleukin-10 secretion. It was reported by Goldstein (18) that increase in the monocyte CD163 expression was 14 times higher in their "on-pump" patients who were treated by bolus administration of methylprednisolone perioperatively in comparison with untreated patients. Such therapeutical intervention was not performed in any our patients. It seems unlikely that higher monocyte CD163 expression in our "on-pump" patients was elicited by methylprednisolone which is a regular component of CPB fluids used at our department. More pronounced proinflammatory stimuli raised during "on-pump" surgery are more relevant. There will be the unique chance to dissect between the influence of corticosteroids present in CPB fluid and other variables involved in "on-pump" surgery. Currently, CPB protocol used at our department has been changed and methylprednisolone has been omitted. It will enable us to conduct such a study. CD163 is rapidly shed from the surface of monocytes when activated by LPS or phorbol esters. In addition, also cross-linking of Fc $\gamma$ RI triggers shedding of CD163 (20). This phenomena is very likely counterbalanced by the fact that such shedding is followed by upregulation of this hemoglobin scavenger receptor, as was shown for metalloproteinases-mediated CD163 shedding (21). This is probably true for our cardiac surgical patients. Very recently, it was proven by Weaver et al. (22) that CD163 shedding is also induced via stimulation with TLR-4, TLR-2 and TLR-5.

Initially included in this study was a single patient, male, 73 years old who was excluded from our study due to his death on the 2<sup>nd</sup> postoperative day. This patient underwent uncomplicated cardiac surgery using cardiopulmonary bypass. He developed acute diaphragmatic myocardial infarction two hours after finishing surgery. Patient was reoperated and reanastomosis was performed. In spite of this effort, cardiogenic and subsequent hemorrhagic shock were developed ultimating to death next day in the morning. Body temperature was below 36°C so that infection is unlikely.

The expression of both CD64 and CD163 molecules before surgery and up to the end of surgery was comparable with other patients. Granulocyte CD64 index reached 1.72 value which is significant for the development of SIRS (23). However, such values were found in additional four patients without any impact on their postoperative course. Remarkable is the fact, that monocyte CD163 index in this patient was the highest between our patients and was approximately two times higher in comparison with all our patients investigated. It could be concluded from this our anecdotal observation, that the increase in CD163 monocyte positivity could be the marker with predictive value of worse outcome in cardiac surgical patients.

In conclusion, using standardized quantitative methods we revealed substantial dynamics in the expression of the activation marker Fc $\gamma$ RI and scavenger receptor CD163 in both "on-pump" and "off-pump" cardiac surgical patients during operation and in the postoperative period. The maximum in the expression of CD64 on monocytes in postoperative period precedes the maximum in the expression of this molecule on granulocytes by two days.

### **Acknowledgment**

This work has been supported by a research program of The Czech Ministry of Youth, School and Physical Activities No. MSM 0021620812 and Internal Grant Agency of Ministry of Health, Czech Republic, No. NR/9090-4.



## Literature:

1. Ascione R, Lloyd CT, Underwood MJ, Lotto AA, Pitsis AA, Angelini GD: Inflammatory response after coronary revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann thorac Surg* 2000; 69: 1198-2004.
2. Steeber DA, Venturi GM, Tedder TF: A new twist to the leukocyte adhesion cascade: intimate cooperation is key. *TRENDS Immunol* 2005; 26(1): 9-12.
3. Bakke AC, Allen E, Purtzer MZ, Deodhar A: Neutrophil CD64 expression Distinguishing acute inflammatory autoimmune disease from systemic infections. *Clin Applied Immunol Rev* 2001; 1: 267-275.
4. Elghetany MT, Davis BH: Impact of preanalytical variables on granulocytic surface antigen expression: a review. *Cytometry Part B (Clin Cytometry)* 2005; 65B: 1-5.
5. Qureshi SS, Lewis SM, Gant VA, Treacher D, Davis BH, Brown KA: Increased distribution and expression of CD64 on blood polymorphonuclear cells from patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Clin Exp Immunol* 2001; 125: 258-265.
6. Greaves DR, Gordon S: Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res* 2005; 46: 11-20.
7. Xu W, Schlagwein N, Roos A, van den Berg TK, Daha MR, van Kooten C: Human peritoneal macrophages show functional characteristics of M-CSF-driven anti-inflammatory type 2 macrophages. *Eur J Immunol* 2007; 37(6): 1-6.
8. 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; 41:171-9.
9. Paparella D, Yau TM, Young E: Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardio-Thorac Surg* 2002; 21: 232-244.
10. Rossi M, Sganga G, Miazzone M, et al: Cardiopulmonary bypass in man: role of the intestine in a self-limiting inflammatory response with demonstrable bacterial translocation. *Ann Thorac Surg* 2004; 77: 612-618.
11. Hiesmayr MJ, Spittler A, Lassnigg A, Berger R, Laufer G, Kocher A, Artemiou O, Boltz-Nitulescu G, Roth E: Alterations in the number of circulating leucocytes, phenotype of monocyte and cytokine production in patients undergoing cardiothoracic surgery. *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 315-323.
12. Fjaertoft G, Hakansson L, Foucard T, Ewald U, Venge P: CD64 (Fc receptor I) cell surface expression on maturing neutrophils from preterm and term newborn infants. *Acta Paediatrica* 2005; 94: 295-302.
13. Stefanou DC, Asimakopoulos G, Yagnik DR, Haskard DO, Anderson JR, Philippidis P, Landis C, Taylor KM: Monocyte Fc gamma receptor expression in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 2004; 77: 951-5.
14. Devaraj S, Du Clos TW, 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: 1359-1363.
15. Schneider Ch. P., Schwacha M. G., Chaudry I. H.: The role of interleukin-10 in the regulation of the systemic inflammatory response following trauma-hemorrhage. *Biochim. Biophys. Acta Molecular Basis of Disease*, 2004, 1686, s. 22-23.
16. Zuwala-Jagiello J: Haemoglobin scavenger receptor: function in relation to disease. *Acta Biochim Polonica* 2006; 53(2): 257-268.
17. Wagener FADTG, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ, Figdor CG: Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev* 2003; 55(3): 551-571.
18. Goldstein JI, Goldstein KA, Wardwell K, Fahrner SL, Goonan KE, Cheney MD, Yeager MP, Guyre PM: Increase in plasma and surface CD163 levels in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Atherosclerosis* 2003; 170: 325-332.
19. Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO, Landis RC: Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in

- resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res* 2004; 94: 119-126.
20. Sulahian TH, Pioli PA, Wardwell K, Guyre PM: Cross-linking of FcR triggers shedding of the hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 271-277.
  21. Hintz KA, Rassias AJ, Wardwell K, Moss ML, Morganelli PM, Pioli PA, Givan AL, Wallace PK, Yeager MP, Guyre PM: Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 711-717.
  22. Weaver LK, Hintz-Goldstein KA, Pioli PA, Wardwell K, Qureshi N, Vogel SN, Guyre PM: Pivotal advance: activation of cell surface Toll-like receptors causes shedding of the hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 26-35.
  23. Davis BH, Olsen SH, Ahmad E, Bigelow NC: Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 654-661.