

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Nikola Kormundová

Metody detekce snížené imunitní odpovědi u pacientů po kardiochirurgické operaci

**Methods for detection of impaired immune response in
cardiac-surgical patients**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Martina Kolářková, Ph.D.**

Praha 2022

Diplomová práce byla vypracována v Ústavu klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové pod vedením Mgr. Marty Koláčkové, Ph. D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citovaných literárních zdrojů pod vedením mého školitele.

V Praze dne

.....

Nikola Kormundová

Mé poděkování patří vedoucí práce Mgr. Martině Koláčkové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, cenné rady, vstřícnost a všestrannou pomoc týkající se teoretické i praktické části.

Dále bych chtěla poděkovat všem členům laboratoře Ústavu klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice HK, hlavně Mgr. Tereze Švadlákové za veškerou ochotu a pomoc, která se mi naskytla.

Dále děkuji panu prof. RNDr. Janu Krejskovi CSc. jako vedoucímu pracoviště, který nás v práci podpořil a umožnil mi tak vypracování mé diplomové práce.

V poslední řadě bych ráda poděkovala své rodině a blízkým za oporu i finanční pomoc po celou dobu mého studia.

ABSTRAKT

U pacientů po kardiochirurgické operaci dochází ke zvýšení hladiny molekul s prozánětlivým i protizánětlivým účinkem. Tento vzestup je ovlivněn klinickým stavem pacienta, ale také samotným charakterem operace, kdy je použitý konvenční mimotělní oběh. Tato technika vede k poškození krevních elementů přímým kontaktem se vzduchem a částmi mimotělního oběhu, a rovněž k ischemicko-reperfuznímu poškození. Specifika kardiochirurgické operace pak mají vliv na pooperační komplikace jako je multiorgánové selhání nebo septický šok.

Diplomová práce je rozdělena na část teoretickou a praktickou. V teoretické části je popsán princip a vliv kardiopulmonálního bypassu na lidský organismus a komplikace, které jsou s jeho použitím spojovány. Dále je zde popsán IFN- γ , jako potenciální marker septických stavů, který by mohl odrážet klinický pooperační stav pacientů.

V praktické části diplomové práce byla sledována procentuální změna vybraných buněčných populací a produkce IFN- γ v periferní krvi pacientů před a po kardiochirurgické operaci. Dále byla zkoumána odpověď jednotlivých izolovaných populací zdravých dobrovolníků na vybrané stimulatory.

Procento sledovaných buněčných populací i produkce IFN- γ u kardiochirurgických pacientů byly výrazně sníženy v pooperačním období oproti stavu před operací. Tento pokles značí narušení integrity imunitního systému, kdy pacient není schopný plně odpovídat na vnější mikrobiální podněty. U zdravých dobrovolníků došlo k nejvyšší produkci IFN- γ u izolovaných T-lymfocytů, které ale byly schopny produkce IFN- γ až po kombinované stimulaci spojené s aktivací TCR komplexu.

Klíčová slova: stimulace leukocytů, IFN- γ , sepse, izolace buněk, srdeční operace, kardiopulmonální bypass, imunosuprese

ABSTRACT

In patients after cardiac surgery, there is an increase in the level of molecules with both pro-inflammatory and anti-inflammatory effects. This increase is influenced by the patient's clinical condition, but also by the nature of the operation itself, which uses conventional extracorporeal circulation. This technique leads to damage to blood elements by direct contact with air and parts of the extracorporeal circulation, as well as to ischemia-reperfusion injury. The specifics of cardiac surgery then affect possible postoperative complications such as multiorgan failure or septic shock.

The diploma thesis is divided into a theoretical and a practical part. The theoretical part describes the principle and influence of cardiopulmonary bypass on the human body and the complications that are associated with its use. Furthermore, IFN- γ is described herein as a potential marker of septic conditions that could reflect the clinical postoperative condition of patients.

The practical part of the diploma thesis monitored the percentage change of selected cell populations and the production of IFN- γ in the peripheral blood of patients before and after cardiac surgery. Furthermore, the response of individual isolated populations of healthy volunteers to selected stimulators was investigated.

The percentage of monitored cell populations and IFN- γ production in cardiac surgery patients were significantly reduced in the postoperative period compared to the condition before surgery. This decrease indicates a disruption of the integrity of the immune system where the patient is unable to respond fully to microbial stimuli. In healthy volunteers, the highest production of IFN- γ occurred in isolated T-lymphocytes, which were able to produce IFN- γ only after the combined stimulation associated with the activation of the TCR complex.

Key words: leukocyte stimulation, IFN- γ , sepsis, cell isolation, cardiac surgery, cardiopulmonary bypass, immunosuppression

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	9
ÚVOD.....	12
LITERÁLNÍ PŘEHLED.....	13
1 MIMOTĚLNÍ OBĚH.....	14
1.1 Systémové komplikace po CPB.....	16
1.2 Vybrané biomarkery.....	16
1.2.1 C-reaktivní protein (CRP).....	16
1.2.2 Prokalcitonin (PCT).....	17
1.2.3 Tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α).....	17
1.3 Klinické projevy.....	17
1.4 Cytokiny spojené s CPB.....	18
1.5 Akutní poškození ledvin (AKI).....	21
1.6 Plicní komplikace.....	21
1.6.1 Ischemie plic.....	22
1.6.2 Zánětlivá reakce.....	22
1.7 Kognitivní poruchy.....	22
2 INTERFERON GAMMA.....	24
2.1 Charakteristika IFN- γ	24
2.2 Biosyntéza IFN- γ	25
2.3 Antivirové účinky IFN- γ	26
2.4 IFN- γ receptor.....	27
2.5 Signalizace IFN- γ	28
2.5.1 Negativní regulace signalizace IFN- γ	29
PRAKTICKÁ ČÁST.....	31
3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	32
4 MATERIÁL A METODY.....	33

4.1	Použité reagensy.....	33
4.1.1	Izolace buněčných populací	33
4.1.2	Kultivace a stimulace buněčných populací	33
4.1.3	Analýzy	33
4.2	Přístroje	35
4.3	Pomůcky.....	35
4.4	Metody.....	36
4.4.1	Předpokus ke stanovení optimální koncentrace stimulantů LPS a R848.....	36
4.4.2	Stanovení koncentrace IFN- γ metodou ELISA	37
4.4.3	Měření IFN- γ pomocí HEK-Dual IFN- γ reportérových buněk... 38	
4.4.4	Izolace monocytů	38
4.4.5	Izolace T lymfocytů.....	39
4.4.6	Izolace leukocytů	40
4.4.7	Ověření čistoty buněk na průtokovém cytometru	40
4.4.8	Sekreční esej (Miltenyi Biotec)	41
5	CHARAKTERISTIKA SOUBORU PACIENTŮ	42
6	STATISTIKA	43
7	VÝSLEDKY	44
7.1	Produkce IFN- γ u pacientů před a po kardiochirurgické operaci	44
7.1.1	Produkce IFN- γ u pacientů měřené metodou ELISA.....	44
7.1.2	Produkce IFN- γ u pacientů měřené pomocí lidských reportérových buněk HEK293.....	45
7.2	Procentuální zastoupení buněčných populací u pacientů před a po kardiochirurgické operaci	46
7.2.1	Procentuální zastoupení monocytů před a po kardiochirurgické operaci.....	46

7.2.2	Procentuální zastoupení lymfocytů před a po kardiochirurgické operaci.....	47
7.2.3	Procentuální zastoupení CD3 pozitivních T lymfocytů před a po kardiochirurgické operaci.....	48
7.3	Produkce IFN- γ po stimulaci izolovaných buněk zdravých dárců	49
7.3.1	Produkce IFN- γ monocyty po stimulaci LPS a R848	49
7.3.2	Produkce IFN- γ T lymfocyty po stimulaci LPS, R848, IL-2 a anti-CD3	50
7.3.3	Produkce IFN- γ leukocyty po stimulaci LPS, R848, IL-2 a anti-CD3	51
7.4	Sekreční esej.....	52
7.4.1	Produkce IFN- γ monocyty	52
7.4.2	Produkce IFN- γ NK buňkami	53
7.4.3	Produkce IFN- γ Tc lymfocyty.....	53
8	DISKUZE	54
	ZÁVĚR	60
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	62

SEZNAM ZKRATEK

AKI	akutní poškození ledvin
AKT	serine/threonine-specific protein kinase, PKB
ALI	akutní poškození plic
APC	antigen prezentující buňky
AP-1	activator protein 1
ARDS	syndrom akutní respirační tísně
cAMP	cyklický 3',5'-adenosinmonofosfát
CD	cluster Designation (Differentiation)
CPB	kardiopulmonální bypass
CRP	C-reaktivní protein
CTL	cytotoxické T-lymfocyty
DISC	death Inducing Signaling Complex
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
Fc	fragment
FS	forward scatter
GAF	gamma interferon activation factor
GAS	gamma interferon activation site
GC	glukokortikoidy
GM-SCF	granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
HEK	human embryonic kidney
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen – DR isotype
HPV	lidský papilomavirus
IDO	indoleamin 2,3 - dioxygenáza
IFN- α	interferon alpha
IFN- α R	interferon alpha receptor
IFN- γ	interferon gamma
IFN- γ R1/2	interferonu gamma receptor 1/2
IL-	interleukin
IL-1 β	interleukin 1 beta
IL-1Ra	antagonista receptoru IL-1
I/R	ischemicko-reperfuzní

IRF1	interferonový regulační faktor 1
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LPS	lipopolysacharid
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MD2	myeloid Differentiation factor 2
MHC	major histocompatibility complex
MLV	myší leukémie
MODS	syndrom multiorgánové dysfunkce
mRNA	messenger RNA
mCD14	membrane CD14
MyD88	myeloid Differentiation Primary Response 88
NFκB	nukleární faktor kappa B
NK	natural killer
NKT	NK T lymfocyty
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PCT	prokalcitonin
PGE2	prostaglandin E2
pH	vodíkový exponent
PIAS	proteinový inhibitor aktivovaného STAT
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
R848	resiquimod (4-Amino-2-(ethoxymethyl)-alpha)
RNA	ribonukleová kyselina
PRR	pattern recognition receptory
sCD14	soluble CD14
SHPI	5' inositol phosphatase
SH2	Src Homology 2
SIRS	systemová zánětlivá odpověď
SOAP	Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients
SOCS	suppressor of cytokine signaling
SS	side scatter
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription

TCR	T-buněčný receptor
TLR	Toll-like receptors,
TYK 2	tyrosin kinase 2
TGF- β	transformující růstový faktor beta
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alpha
TNFSr	TNF rozpustné receptory
TRAIL	tumor-necrosis factor related apoptosis-inducing ligand
VSV	vezikulární stomatitidy

ÚVOD

Srdeční operace s použitím kardiopulmonálního bypassu umožňuje chirurgům přístup k srdci v nekrvavém a nehybném prostředí. Na druhou stranu je tato technologie spojována se závažnými pooperačními komplikacemi, na jejichž vzniku a progresi se rovněž podílí narušená imunitní odpověď. Výskyt pooperačních komplikací je výsledkem kombinace chirurgického traumatu, aktivace krevních složek v mimotělním oběhu, ischemicko/reperfuzního poranění, použití hypotermie nebo přítomností LPS. U většiny kardiochirurgických pacientů dochází k rozvoji syndromu systémové zánětlivé odpovědi, SIRS. Častými komplikacemi SIRS jsou orgánové dysfunkce, včetně akutního poškození plic, šoku nebo selhání ledvin. Prozánětlivá odpověď imunitního systému je balancována protizánětlivými složkami, které často vedou k přechodným imunopresivním stavům různého trvání a závažnosti. Mezi tyto balancující reakce patří zvýšená produkce kortizolu, zvýšená sekrece protizánětlivých cytokinů, jako je interleukin-10, snížená exprese povrchových receptorů na neutrofilech a monocytech, a v důsledku toho jejich snížená odpověď na mikrobiální podněty. Tato imunoparalýza pak může být jednou z příčin komplikací po srdečních operacích, protože vede například k septickým stavům nebo zhoršenému hojení ran, a je tak důležitým faktorem morbidit a mortality u kardiochirurgických pacientů.

LITERÁLNÍ PŘEHLED

1 MIMOTĚLNÍ OBĚH

Použití technologie kardiopulmonálního bypassu (cardiopulmonary bypass - CPB) umožňuje provádět srdeční chirurgické zákroky v nehybném a nekrvavém chirurgickém poli. Zahrnuje mimotělní okruh, který poskytuje fyziologickou podporu. Krev je obvykle gravitací odváděna ze srdce a plic do rezervoáru pomocí venózní kanylace a hadiček a je vrácena okysličená do kanylového arteriálního systému pomocí pumpy a umělé plíce (oxygenátoru). Během chirurgických operací srdce umožňuje mimotělní oběh lékařům léčit širokou škálu srdečních chorob, zatímco funkce srdce a okysličování organismu je zajišťováno přístroji. První úspěšný kardiopulmonální bypass provedl v roce 1953 chirurg John Heysham Gibbon při operaci komorové přepážky. [1, 2]

Složky okruhu CPB zahrnují žilní kanylu typicky v pravé síni nebo dutých žilách, žilní nádrž, membránový oxygenátor, výměník tepla, srdeční pumpu (čerpadlo), mikrofiltr v arteriální lince a arteriální kanylu. Kanyly lze umístit na pravou stranu srdce, do pravé síně, nebo do horní a dolní duté žíly. [3]

K výměně plynů v těle dochází pomocí oxygenátoru. V minulosti byly používány oxygenátory, které zajišťovaly výměnu plynů volným probubláváním kyslíku krví, nebo kontaktem krevního filmu s atmosférou bohatou na kyslík. Moderní oxygenátory zajišťují výměnu plynů přes membránu. Krev procházející membránovým oxygenátorem je přenášena na velkou plochu s vysokými diferenciálními tlaky plynu napříč tenkou mikroporézní membránovou vrstvou z dutých vláken pro usnadnění okysličování (0,3–0,8 mm póry). [1, 3]

Během CPB je konstantní průtok krve v těle pacienta zajišťován mechanickou pumpou. Pumpa je schopna generovat stálý průtok krve a tlak proti určitému odporu, aniž by docházelo ke stagnaci nebo turbulenci krve. Často bývá pumpa vyrobena z biokompatibilních materiálů a měla by být schopna přizpůsobit se různým velikostem hadiček mimotělního oběhu. Tyto mechanické pumpy mají nízké plnicí objemy, jsou snadno ovladatelné a produkují nízký index hemolýzy (množství plazmatického hemoglobinu na 100 ml čerpané krve). Nejčastěji používanými pumpami jsou válečkové a odstředivé (centrifugální). [1]

Další důležitou částí obvodu je výměník tepla, který umožňuje aktivní chlazení a ohřívání krve vstupující do pacienta. Teplotní rozdíl mezi pacientem a krví je omezen na rozsah 10°C, aby se zabránilo vzduchové embolii. Kromě toho

by krev neměla být zahřívána nad 42°C, aby byla minimalizována denaturace bílkovin a snížené riziko embolie. CPB se provádí buď za systémové hypotermie (obvykle teplota nosohltanu 25–32°C) nebo za normotermních podmínek. Systémové podchlazení snižuje spotřebu kyslíku v myokardu, což zajišťuje ochranu a zvýšenou toleranci k ischemii životně důležitých orgánů. Kvůli některým nežádoucím projevům spojeným s podchlazením (např. zhoršená funkce buněčné membrány myokardu, zvýšená pravděpodobnost pooperačního krvácení) však někteří chirurgové upřednostňují normotermickou operaci, která poskytuje více fyziologické podmínky. [1, 3]

Recyklace odsávané krve z chirurgického pole je zajištěna kardiotoomickým rezervoárem, který zahrnuje síto a hlubkový filtr pro snížení tukové embolie, fibrinu a chirurgické kontaminace. Síťové filtry obsahují tkaný síťovaný materiál, jako je polypropylen, s definovanou velikostí pórů pro určení jeho filtrační schopnosti. Hlubkové filtry obsahují obalové materiály, jako je vlna Dacron nebo polyurethanová pěna, které nemají definitivní velikost pórů a filtrace tedy závisí na tloušťce, těsnosti a povaze obalu. Přítomnost plyných (např. injekční léky, venózní vzduch) a pevných částic (např. zbytky materiálu mimotělního okruhu) opouštějících oxygenátor je spojena s poškozením orgánů a vede k peri- a pooperačním komplikacím typu infarkt myokardu nebo cévní mozková příhoda. [1]

Operace v mimotělním oběhu umožňuje provádět složité výkony přímo na srdci. K tomu účelu slouží technika kardioplegie. Jedná se o plánované, dočasné zastavení srdeční činnosti (diastolická elektromagnetická zástava), kdy je intermitentně nebo kontinuálně podáván kardioplegický roztok. Podává se anterográdním přístupem prostřednictvím kořene aorty, přímým přístupem ke koronárnímu ústí, nebo retrográdním způsobem, pokud se vyskytnou závažné okluze koronární arterie. Nejčastější látka používaná k vyvolání srdeční zástavy je draslík, který způsobuje snížení potenciálu membrány myokardu a následnou diastolickou zástavou. Kardioplegický roztok lze podávat v různém poměru s krví (studená, teplá či vlažná krevní kardioplegie) nebo dokonce čistý draslík (mikroplegie). [1]

1.1 Systémové komplikace po CPB

Operace s kardiopulmonálním bypassem (CPB) je spojena s těžkými poruchami imunity. Zejména dlouhodobý imunosupresivní stav související s kardiopulmonálním bypassem předurčuje pacienty k vyššímu riziku pooperačních komplikací, jako jsou přetrvávající bakteriální infekce. Během operace srdce dochází k indukci systémové zánětlivé reakce spojené s imunitní dysregulací a významnou plicní dysfunkcí. Za pooperační imunodepresi je odpovědná zánětlivá reakce, obvykle připisovaná chirurgickému traumatu, kontaktu krve s umělými povrchy a ischemicko-reperfuznímu poškození. [4, 5]

Patofyziologie systémové zánětlivé odpovědi na CPB je ovlivněna mnoha faktory. Lze ji rozdělit do dvou hlavních fází: „časná“ a „pozdní“. Časná fáze nastává v důsledku krevního kontaktu s neendoteliálními povrchy (kontaktní aktivace) a pozdní fáze je řízena ischemicko-reperfuzním poškozením (I/R poranění), poruchami koagulace a reakcemi na heparin a protamin. [6]

Použití CPB indukuje výrazný syndrom systémové zánětlivé odpovědi (SIRS) vyvolaný expozicí krve umělým povrchům a ischemií s následnou reperfúzí orgánů. [5]

Definice syndromu systémové zánětlivé reakce pochází z roku 1991, kdy byla vytvořena pro souhrn klinických projevů svědčících pro sepsi. Sepse je orgánová dysfunkce vyvolaná dysregulovanou imunitní odpovědí na infekci. Biomarkery jsou biologické molekuly, které slouží jako indikátor fyziologického nebo patologického procesu. K monitorování hladin biomarkerů dochází ve specifickém biologickém médiu, ať už jde o plnou krev, plazmu, sérum nebo buněčnou tekutinu (cytosol). [7, 8]

1.2 Vybrané biomarkery

1.2.1 C-reaktivní protein (CRP)

CRP je primárně syntetizován v játrech jako odpověď na faktory uvolňované makrofágy. Jde o protein akutní fáze, jehož hladina se zvyšuje po infekci a zánětu. Hladina CRP po čase klesá, což může být způsobeno klinickým ústupem zánětu a odpovědí na antimikrobiální léčbu. [8]

1.2.2 Prokalcitonin (PCT)

PCT je prekurzorem hormonu kalcitoninu, secernovaného C buňkami štítné žlázy u člověka. Pacienti se sepsí mají zvýšenou hladinu PCT v plazmě a séru. [8]

1.2.3 Tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α)

Cytokiny jsou mediátorem zánětlivé reakce na infekci. TNF- α patří mezi široce studované prozánětlivé cytokiny v patofyziologii sepse. Přispívá k aktivaci endoteliálních buněk přitahováním neutrofilů. Zvýšená hladina TNF- α spolu za asistence dalších prozánětlivých cytokinů způsobuje zhoršení zánětu. Kromě toho se podílí na poškození orgánů, které vede k zvýšené úmrtnosti na sepsi. [8]

1.3 Klinické projevy

U pacientů se sepsí se objevují:

- tělesná teplota vyšší než 38°C, nebo nižší než 36°C
- srdeční frekvence vyšší než 90 tepů za minutu
- tachypnoe, projevující se dechovou frekvencí vyšší než 20 dechů za minutu
- hyperventilace, kdy je měřen PaCO₂ (parciální tlak oxidu uhličitého v arteriální krvi) nižší než 32 mm Hg
- změna počtu krvinek, která je větší než 12000/ml, počet menší než 4000/ml nebo přítomnost více než 10 % nezralých neutrofilů (tyčky). [9]

Termín SIRS se často používá k definování zánětlivé reakce způsobené kardiochirurgickým výkonem s kardiopulmonálním bypasselem. Srdeční chirurgie ve skutečnosti vyvolává systémovou zánětlivou reakci, která může přispět k pooperační morbiditě a mortalitě. Častou komplikací SIRS je rozvoj orgánové dysfunkce, včetně akutního poškození plic, selhání ledvin, šoku a MODS (syndrom multiorgánové dysfunkce). Získaná víceorgánová dysfunkce je nejlepším ukazatelem mortality u kardiochirurgických pacientů, kteří vyžadují prodlouženou pooperační mechanickou ventilaci. Finálně tedy může být nepříznivě ovlivněno i dlouhodobé přežití u pacientů, u kterých se SIRS vyvinul. [7,10]

Zánět, mimo jiné, představuje reakci těla na poškození tkáně a za normálních okolností je řízenou humorální a buněčnou reakcí, která vede k hojení ran a kontrole infekcí. V některých případech může být tato reakce přehnaná, což nakonec vede k dalšímu poškození tkáně a rozvoji orgánových dysfunkcí.

Operace srdce vyvolává zánětlivou odpověď s významnými klinickými důsledky až u 20 % pacientů. Taková reakce může být aktivována chirurgickým traumatem, hypotermií, ztrátou krve, krevní transfuzí a tak dále. V případě kardiochirurgie další faktory, jako je kontaktní aktivace nebo ischemicko-reperfuzní poškození, přispívají k rozvoji systémové zánětlivé odpovědi. Škodlivé účinky systémové zánětlivé reakce se objevují na jakékoli úrovni organismu. Závažné srdeční příhody, jako je akutní infarkt myokardu, srdeční smrt a srdeční selhání, se vyskytují až u 10 % pacientů po koronární chirurgii. Plicní komplikace, jako je akutní poškození plic, se vyskytují až u 3 % pacientů, renální dysfunkce nastává u 13 % a dokonce až 45 % pacientů trpí dočasnou jaterní dysfunkcí. Dále byly po CPB popsány kognitivní poruchy, jako jsou deficity paměti, poruchy koncentrace nebo zhoršené jemné motorické dovednosti. [10, 11]

Zánět je rychlá, vysoce zesílená, kontrolovaná buněčná a humorální odpověď. Naopak termín „seps“ se klasicky používá k označení klinických projevů těla v reakci na infekci. Podobná reakce ale může nastat také v nepřítomnosti infekce. Ve skutečnosti pacienti, u kterých se předpokládá septický stav, ale průkaz na přítomnost mikrobiálního agens je negativní, mají podobnou morbiditu a mortalitu jako pacienti s pozitivní kultivací. Lze uzavřít, že seps je nespecifická systémová prozánětlivá odpověď na poranění. [10]

1.4 Cytokiny spojené s CPB

Cytokiny jsou širokou skupinou polypeptidů produkovaných mnoha různými typy buněk a jsou nezbytné pro optimální funkci imunitního systému. IL-6, IL-8 a TNF- α jsou hlavními prozánětlivými cytokiny, jejichž sekrece je spojována se srdeční operací. Prozánětlivá cytokinová odpověď je vyvážena fázovanou protizánětlivou cytokinovou odpovědí s rozpustnými (solubilními) cytokinovými receptory, protizánětlivými cytokiny a antagonisty cytokinových receptorů. Primárními protizánětlivými cytokiny jsou IL-10, antagonist receptoru interleukinu-1 (IL-1Ra) a TNF rozpustné receptory 1 a 2 (TNFsr 1 a 2). [10]

TNF- α je tvořen aktivovanými monocyty a makrofágy a má významnou roli při zánětu. Plazmatické hladiny TNF- α se zvyšují s použitím CPB, což ukazuje na jeho roli mediátora zánětlivých reakcí. Kromě toho zvyšuje mikrovaskulární permeabilitu a je odpovědný za nárůst hmotnosti po kardiochirurgické operaci,

zhoršuje respirační index a prodlužuje pobyt v nemocnici. Nadměrná produkce TNF- α vyvolává hypotenzi, koagulopatii a renální dysfunkci. [10]

IL-6 je prozánětlivý cytokin a je jedním z hlavních mediátorů reakce akutní fáze způsobující postižení řady orgánů, zejména dýchacího systému a centrálního nervového systému. Z řad prozánětlivých cytokinů je hlavním ukazatelem systolické dysfunkce levé komory, ischemické poruchy, snížení systémové vaskulární rezistence a kardiovaskulární abnormality. Vysoké hladiny IL-6 jsou také významně spojeny s jaterními a renálními dysfunkcemi. [10]

IL-8 je prozánětlivý cytokin a jeho hladina se zvyšuje při srdečních operacích s CPB. Zvýšené hladiny IL-8 jsou spojené s respirační dysfunkcí. [10]

Cytokiny jako IL-10, prostaglandin E2 (PGE2), transformující růstový faktor- β (TGF- β), hemooxygenáza, katecholaminy a kortizol byly popsány jako hlavní mediátory imunodeprese. Pojem imunodeprese odráží především neschopnost monocytů vylučovat cytokiny a prezentovat antigeny T buňkám. Imunodeprese byla pozorována po traumatu, operaci, mrtvici, krvácení a srdeční operaci s CPB. Zatímco přechodnou imunodepresi lze chápat jako vyvažování nadměrné zánětlivé reakce, perzistentní imunoparalýza se ukázala jako nezávislá příčina infekce, sepse a smrti. Předpokládá se, že protizánětlivý IL-10 spouští autoregulaci nadměrné zánětlivé reakce. IL-10 inhibuje transkripci DNA pro IL-1 β , IL-6 a TNF- α zastavením signální dráhy z tyrosinkinázy p56lyn do Ras. Zvýšený PGE2 potlačuje prezentaci antigenů na povrchu monocytů, čímž zvyšuje cAMP a snižuje produkci IL-1 makrofágy. [12]

Důležitou roli u kardiochirurgických výkonů hrají glukokortikoidy, které inhibují mnoho počátečních dějů zánětlivé reakce. Glukokortikoidy inhibují vazodilataci a zvýšenou vaskulární permeabilitu, ke které dochází po zánětlivém poškození, a dále snižují migraci leukocytů do zanícených míst. Produkce endogenních glukokortikoidů je regulována osou hypotalamus–hypofýza–nadledviny. Glukokortikoidy jsou rychle indukovány v reakci na zánět a další stresory a inhibují zánět tlumením přenosu signálu od PRR receptorů, cytokinových receptorů a Fc ϵ receptorů. Negativně regulují osu hypotalamus–hypofýza–nadledviny tím, že dávají zpětnou vazbu hypotalamu a hypofýze a snižují expresi prozánětlivých cytokinů. [13, 14]

Kortizol, ale také norepinefrin (noradrenalin) a epinefrin (adrenalin) se váží na receptory monocytů a inhibují dráhy prozánětlivých cytokinů. Kortizol potlačuje

produkci prozánětlivých cytokinů IL-1, IL-6 a IL-8 a naopak aktivuje protizánětlivé IL-1Ra a IL-10. Předpokládá se, že zejména kortizol udržuje stav imunoparalýzy, tj. kompletní a dlouhotrvající imunodepresi. Glukokortikoidy (GC) potlačují produkci TNF- α , IFN- γ a IL-2. GC systémově potlačují Th1-buněčnou odpověď a zprostředkovávají posun k Th2 potlačením APC- a Th1- a nadprodukcí Th2-cytokinů. Díky přítomnosti GC dochází k inhibici produkce IL-12 monocyty, což má za následek sníženou schopnost monocytů indukovat IFN- γ a naopak zvýšenou schopnost indukce IL-4 T-lymfocyty. GC dále silně snižují expresi IL-12 receptorů na T a NK buňkách a působí prostřednictvím svých klasických cytoplazmatických/nukleárních receptorů na APC, kde potlačují produkci hlavního induktoru Th1 odpovědí, IL-12. [12, 15, 16]

S pooperační morbiditou jsou spojeny faktory jako je doba trvání CPB, doba klampáže aorty, chirurgická technika a zvýšené hladiny laktátu v séru. Nejčastějšími komplikacemi u pacientů podstupujících srdeční chirurgický zákrok při CPB bývá stav nízkého srdečního výdeje (29,8 %), renální dysfunkce (25,4 %), prodloužená mechanická ventilace (15,7 %) a fibrilace síní (14,6 %). [17]

Cirkulující prozánětlivé mediátory se vážou na receptory vaskulárních a cerebrálních buněk, což vede ke zvýšení permeability hematoencefalické bariéry a edému mozku. U pacientů vyžadujících zástavu oběhu je podstatným mechanismem odpovědným za poškození mozku reperfuční poškození. Poškození tkáně je dále způsobeno produkcí prozánětlivých mediátorů leukocyty, krevními destičkami, endoteliálními buňkami a rezidentními mozkovými buňkami, jako jsou mikroglie, neurony a astrocyty. Cerebrální reperfuční poškození souvisí s poškozením endotelu, což má za následek zhoršenou vazodilataci a autoregulaci nitrolebního tlaku. [18]

Poškození alveolárně-endoteliální bariéry vede k permeabilnímu plicnímu edému a snížení poddajnosti plic. Použití CPB je spojeno s rozvojem plicní vaskulární dysfunkce a rozvojem parenchymálního poškození plic. Ačkoli je plicní vazokonstrikce způsobena některými zánětlivými mediátory, primárním mechanismem odpovědným za zvýšenou plicní vaskulární rezistenci a zvýšenou reaktivitu je plicní reperfuční poškození, viz PLICNÍ KOMPLIKACE. [18]

Zánětlivé mediátory dále zhoršují systolickou funkci srdce. Primárním mechanismem odpovědným za poškození a dysfunkci myokardu je reperfuční poškození myokardu po kardioplegické zástavě. [18]

1.5 Akutní poškození ledvin (AKI)

Akutní poškození ledvin (AKI), stav charakterizovaný přetrvávající oligurií a zvýšenými hladinami sérového kreatininu, je častou komplikací u pacientů podstupujících chirurgický zákrok. AKI komplikuje zotavení po kardiochirurgickém zákroku až u 30 % pacientů, poškozuje a zhoršuje funkci mozku, plic a střev a vystavuje pacienty 5násobně zvýšenému riziku úmrtí během hospitalizace. Jedinečné vlastnosti kardiochirurgie, včetně kardiopulmonálního bypassu (CPB), klampáže aorty, transfuze exogenních krevních produktů, a vysoké dávky exogenních vazopresorů zvyšují riziko AKI ve srovnání s nekardiálními operacemi. Tyto faktory mění perfuzi ledvin, vyvolávají cykly ischemie a reperfuze, zvyšují oxidační poškození a zvyšují renální a systémový tlak. Mechanismy AKI spojené s kardiochirurgickou operací zahrnují perioperační renální ischemii, reperfuční poškození, CPB-indukovanou hemolýzu a pigmentovou nefropatii, oxidační stres a zánět. Příčiny AKI byly klasifikovány jako prerenální, vnitřní a postrenální. Prerenální AKI nastává, když dojde ke změně perfuze ledvin. Ledvina, která má nejvyšší rychlost perfuze tkání vzhledem k hmotnosti orgánu, normálně přijímá 15–20 % celkového srdečního výdeje. Tato vysoká rychlost perfuze činí ledvinu náchylnou k hemodynamickému poškození. Prerenální AKI se nejčastěji vyskytuje u pacientů podstupujících kardiochirurgický výkon, kteří v minulosti podstoupili operaci s kardiopulmonálním bypasselem. [19, 20]

1.6 Plicní komplikace

Změněná pooperační mechanika plic a porucha výměny plynů přispívají k plicním komplikacím po použití mimotělního oběhu. Projevy se pohybují od hypoxémie a atelektázy (nevzdušnosti plicní tkáně) až po akutní poškození plic (ALI), respirační selhání a syndrom akutní respirační tísně (ARDS). Pneumonie, plicní embolie, ventilace delší než 24 hodin a pleurální výpotky vyžadující drenáž jsou plicní komplikace běžné u pacientů, kteří podstoupí kardiochirurgický výkon. V závislosti na typu kardiochirurgického zákroku dochází během použití mimotělního oběhu k několikahodinové relativní ischemii plic. Za normální fyziologie je krev dodávána do plic jak plicním, tak bronchiálním arteriálním systémem, které sdílejí kolaterální oběh. Během operace je ale perfuze poskytována výhradně bronchiálnímu systému, čímž jsou plíce uvedeny do relativního stavu ischemie. Toto prostředí generuje ischemicko-reperfuční

poškození s prozánětlivým/proapoptickým stavem, charakterizovaným sníženou mikrovaskulární permeabilitou, zvýšenou arteriolární rezistencí s plicní hypertenzí a plicním edémem s poruchou výměny plynů. Tyto fyziologické změny vytvářejí celkovou predispozici k rozvoji plicních komplikací. [21, 22]

1.6.1 Ischemie plic

V průběhu CPB jsou plíce vyloučeny ze systémového oběhu, protože krev je odváděna z pravé strany srdce do žilního rezervoáru přes membránový oxygenátor a nakonec se okysličená krev vrací do aorty a systémového oběhu. Předpokládá se, že tato ischemická reperfuze obecně zhoršuje zánětlivou odpověď iniciovanou CPB. CPB s reperfuzí a reoxygenací vede ke vzniku volných kyslíkových radikálů, které přispívají k tomuto procesu poškození plic. Volné kyslíkové radikály zesilují zánět a aktivují neutrofile, makrofágy a endoteliální buňky. Plicní ischemicko-reperfuzní poškození způsobuje zvýšení mikrovaskulární permeability, zvýšenou plicní vaskulární rezistenci, plicní edém, poruchu oxygenace a plicní hypertenzi. [22]

1.6.2 Zánětlivá reakce

Plíce jsou zvláště citlivé na zánětlivé účinky připisované použití CPB a mimotělního oběhu. Zánětlivý proces a ischemie postihuje endoteliální buňky plic. Aktivované leukocyty zvyšují permeabilitu kapilár a způsobují akumulaci tekutiny v intersticiálním prostoru a zvýšení plicního exudátu. Edém způsobuje zhoršení výměny plynů, mechaniky hrudní stěny a plic a vede k obstrukčnímu procesu v dýchacích cestách, který přispívá ke zhoršení bronchospasmu a nevdzdušnosti plicní tkáně. [22]

1.7 Kognitivní poruchy

Neurologické deficity po srdečních operacích jsou u většiny pacientů subklinické, avšak mohou narušovat každodenní život a aktivitu pacienta. Neurofyziologické postižení rozlišujeme dle lokalizace: a) obecnější deficit bez lokálních příznaků týkajících se intelektuálních vlastností/výkonu a paměti pacienta, o kterém se předpokládá, že je výsledkem globální hypoperfuze postihující zejména oblast hippocampu a může vést k neurologickému deficitu až u 50 % pacientů; b) lokálnější symptomy související s tromboembolií, hlavně v oblasti cerebri media se vyskytují s incidencí v rozmezí od 1,9 % do téměř 10 %, v závislosti na provedené srdeční operaci. V jiných studiích byli pacienti operovaní

na pumpě (s CPB) srovnání s operacemi mimo pumpu a ukázalo se, že několik měsíců po chirurgickém zákroku existovaly pouze marginální rozdíly v neurologickém výsledku. Neuroprotektivní techniky jsou stále předmětem zájmu v kardiochirurgii, protože kardiopulmonální bypass může způsobit neurologické poškození buď tromboembolismem, hypoperfuzí oblastí hippocampu nebo zánětlivými procesy. [11]

2 INTERFERON GAMMA

2.1 Charakteristika IFN- γ

IFN- γ náleží do větší skupiny autokrinních a parakrinních proteinů, interferonů, která byla pojmenována na základě své schopnosti interferovat s replikací virů. Vedle antivirotických vlastností se tato skupina vyznačuje schopností inhibovat proliferaci a migraci buněk a podporovat buněčnou smrt, autofagii a senescenci. Ačkoliv samotná skupina interferonů čítá tři podskupiny s více členy, u člověka je IFN- γ jediným zástupcem podskupiny interferonů typu II. [23]

Díky svým pleiotropním účinkům hraje IFN- γ důležitou roli při modulaci každé fáze imunitní a zánětlivé odpovědi. Podobně jako ostatní interferony je IFN- γ produkován v reakci na virovou (intracelulární) infekci. Stimulace exprese může být dosaženo také působením mitogenu či vhodného antigenu anebo účinkem molekulárních struktur typu PAMP. IFN- γ je součástí mechanismů jak vrozené, tak adaptivní imunity jako obrana proti virovým a intracelulárním (myko)bakteriálním i parazitárním infekcím. U lidí s určitými mutacemi v IL-12/IL-23/IFN- γ drahách dochází ke snížení indukce exprese nebo signalizace IFN- γ , jenž vedou např. k nárůstu náchylnosti vůči mykobakteriálním infekcím. [23]

Strukturně se jedná o homodimer s antiparalelní strukturou. Monomer má šest alfa šroubovic a postrádá beta listy. Lidské i myší geny mají velikost 6 kb, kdy každý obsahuje čtyři exony a tři introny. Geny pro lidský IFN- γ jsou lokalizovány na dvanáctém chromozomu. Aktivace lidského genu vede k vytvoření mRNA o velikosti 1,2 kb, která kóduje 166 aminokyselinový polypeptid. Aminoterminální zbytky lidského proteinu tvoří hydrofobní signální sekvenci, jejíž proteolytické odstranění vede ke vzniku pozitivně nabitého polypeptidu s předpokládanou molekulovou hmotností 17 kDa. Na přírodních a rekombinantních formách lidského IFN- γ bylo detekováno alespoň šest různých karboxylových zakončení, která jsou citlivá na posttranslační enzymatickou degradaci. Protože tato část molekuly obsahuje velké množství pozitivně nabitých zbytků, různá zkrácení přispívají k heterogenitě náboje v plně zralé molekule. Dva monomery IFN- γ jsou následně spojeny za vzniku homodimeru s přibližnou molekulovou hmotností 34 kDa. Pouze dimer je nositelem biologické aktivity IFN- γ . Protože zralý lidský IFN- γ

polypeptid postrádá cystein, homodimer je udržován pohromadě zcela nekovalentními silami. Kvartérní struktura molekuly vysvětluje její charakteristickou citlivost na extrémní teploty (k denaturaci proteinu dochází při teplotách 56°C) a pH (aktivita proteinu se ztrácí s pH nižším než 4 a vyšším než 9). Jednotlivé polypeptidové řetězce obsahují dvě N-vázaná glykosylační místa, která jsou glykosylována nezávisle na sobě. Tento odlišný způsob glykosylace vede ke vzniku podjednotek s různou molekulovou hmotností. Amino i karboxylové terminální oblasti hrají klíčovou roli při udržování aktivní konformace proteinu. [24,25]

2.2 Biosyntéza IFN- γ

IFN- γ je produkován jen několika typy buněk; z velké části je produkce omezena na specializované buňky imunitního systému. Primárním zdrojem IFN- γ jsou NK buňky a NKT buňky, které jsou efektorové vrozené imunitní odpovědi. NK a NKT buňky konstitutivně exprimují IFN- γ mRNA, což umožňuje rychlou indukci a sekreci IFN- γ při infekci. [23]

Hlavním fyziologickým stimulem, který indukuje produkci IFN- γ u T lymfocytů jsou antigeny prezentované jak v kontextu MHC II (CD4+ T lymfocyty), tak MHC I (CD8+ T lymfocyty). Efektorové a paměťové CD8+ T lymfocyty, označované jako CTL, jsou důležité při kontrole virové infekce, případně při napadení jinými intracelulárními patogeny. Destrukce cílových infikovaných buněk je zprostředkována cytotoxickými granulemi s obsahem granzymů a perforinu. CTL jsou schopné likvidovat napadené buňky také skrze interakci Fas ligandu s Fas receptorem, kdy dochází k sestavení DISC, jež je součástí signální dráhy pro apoptózu. Nejen aktivace TCR, ale také přítomnost IL-12 a IL-18 vede k produkci IFN- γ . Produkováný IFN- γ působí zpětnovazebně a zvyšuje expresi MHC I. třídy; činí tak infikované buňky pro CTL snadněji rozpoznatelné. [23]

Experimentálně může být exprese IFN- γ indukována přímou stimulací komplexu TCR pomocí protilátek anti-CD3, T-buněčných mitogenů nebo jinými farmakologickými stimuly. Kromě toho může být exprese IFN- γ posílena produkty aktivovaných T lymfocytů a makrofágů, jako je IL-2, peroxid vodíku a leukotrieny. mRNA pro IFN- γ je exprimována nejdříve za 6-8 hodin po stimulaci. K sekreci proteinu dochází ihned po syntéze a v extracelulárním prostředí může být

detekovaný za 8-12 hodin po stimulaci. IL-12 a IL-10 nejvíce ovlivňují produkci interferonu, kdy IL-12 indukuje expresi genu IFN- γ u T lymfocytů a NK buněk, kdežto IL-10 produkci IFN- γ u T lymfocytů inhibuje. [24]

Novější práce prokázaly produkci IFN- γ v monocytech a makrofázích, dendritických buňkách i neutrofilech. Dále se objevují důkazy, že produkce IFN- γ z těchto buněk během zánětu může mít v některých specifických podmínkách fyziologické i patologické účinky. Za normálních okolností jsou však T lymfocyty a NK buňky považovány za hlavní a podstatný zdroj produkce IFN- γ . [26]

2.3 Antivirové účinky IFN- γ

Interferony byly původně pojmenovány dle svých rušivých vlivů na replikaci viru. Antivirový účinek IFN- γ se částečně překrývá s účinkem IFN I. typu. IFN- γ má přímý i nepřímý antivirový efekt. Nepřímo IFN- γ působí skrze indukci indoleamin 2,3-dioxygenázy (IDO) a syntázy oxidu dusnatého (NOS). Výsledná deplece tryptofanu a produkce oxidu dusnatého (NO) v důsledku exprese IDO a NOS má výrazný antivirový efekt. IFN- γ může také inhibovat vstup virů z endozomu do cytoplazmy. Při infekci lidského papilomaviru (HPV) musí být komplexy minoritního kapsidového proteinu (L2)/virový genom disociovány od hlavních kapsidových proteinů (L1) v pozdním endozomu. Následně se disociované komplexy L2/genom přemístí do jádra pro replikaci genomu. IFN- γ může bránit tomuto disociačnímu kroku snížením proteolýzy L1, což vede k retenci komplexu L2/genom v pozdním endozomu. Podobný mechanismus ochrany byl pozorován u infekcí virem myší leukémie (MLV) a vezikulární stomatitidy (VSV). [27]

Interferony hrají roli také při léčbě rakoviny. Mezi hlavní protinádorové účinky interferonu patří potlačení buněčného růstu, podpora buněčné smrti a stárnutí, inhibice buněčné migrace, prevence angiogeneze a imunitní regulace. IFN- γ může regulovat molekuly apoptózy, jako je kaspáza 1 a kaspáza 3, prostřednictvím TRAIL receptorů, čímž přímo zprostředkovává buněčnou smrt v rakovinových buňkách jater. IFN- γ dále indukuje autofagii v jaterních rakovinových buňkách Huh-7 regulací IRF1/beclin/atg5, čímž potlačuje růst buněk a vede k protirakovinovým účinkům. [28]

2.4 IFN- γ receptor

IFN- γ receptor, dále jen IFN- γ R, je vlastně receptorový komplex skládající se z odlišných podjednotek IFN- γ R1 a IFN- γ R2. K interakci obou podjednotek dochází pouze v přítomnosti homodimeru IFN- γ , který se váže nejprve k podjednotce R1, představované dvěma α -řetězci, pak k R2, rovněž zastoupené dvěma řetězci (β -řetězec), přičemž následně dochází i k vytvoření vazby mezi oběma podjednotkami. Celý komplex je za fyziologických podmínek 2:2:2 hexamerem. Starší studie, ve kterých byl použitý „single chain“ konstrukt IFN- γ , uvádí možnost monomerního zastoupení obou podjednotek receptoru při vytvoření komplexu a zachování minimální schopnosti nitrobuňčné signalizace. Zatímco podjednotka IFN- γ R1 je exprimována konstitutivně na všech jaderných buňkách (třebaže úroveň exprese, s výjimkou buněk jako jsou např. monocyty a makrofágy, je nízká), exprese IFN- γ R2 je poměrně přísně regulována. Obě podjednotky jsou kódovány geny na odlišných chromozómech. Zatímco v případě IFN- γ R1 se jedná o chromozóm 6 (přibližně 30 kb), kódující sekvence pro IFN- γ R2 je umístěna na chromozómu 21. [29]

Gen pro IFN- γ R1 se skládá ze 7 exonů a po aktivaci vede k jedinému 2,3 kb transkriptu mRNA. Zralé proteiny jsou pak tvořeny 472 až 451 aminokyselinami. Oba α -řetězce jsou symetricky orientovány kolem jedné transmembránové domény s 23 aminokyselinami. Každý z nich má extracelulární doménu s 228 aminokyselinami, která obsahuje 10 cysteinových zbytků a 5 N-vázaných glykosylačních míst. IFN- γ R1 je syntetizován v endoplazmatickém retikulu a podléhá glykosylaci na cestě do Golgiho aparátu. Na buněčném povrchu jsou exprimovány pouze plně glykosylované R1 podjednotky. Zralé R1 podjednotky exprimované na plazmatické membráně vykazují molekulové hmotnosti, které se pohybují mezi 80 a 95 kDa. Tato heterogenita molekulové hmotnosti je výsledkem buněčně specifických rozdílů v glykosylaci. Po interakci s ligandem na buněčném povrchu je intracelulární doména R1 fosforylována na serinových a threoninových zbytcích. Fosforylovaný komplex receptor-ligand je internalizován, vstupuje do okyseleného endozomálního kompartmentu a disociuje. Volný IFN- γ je transportován do lysozomu, kde je nakonec degradován. V mnoha buňkách, jako jsou např. fibroblasty, se nevázaný receptor

stává součástí intracelulární zásoby zralého receptoru a v případě potřeby je recyklován zpět na buněčný povrch. [24]

IFN- γ R2 je 60 ± 67 kDa glykoprotein kódovaný chromozómem 21. Gen pokrývá přes 33 kb DNA a obsahuje sedm exonů. Receptor je heterodimerní komplex složený z alfa podjednotky vázající ligand (IFN- γ R1) a beta podjednotky přenášející signál (IFN- γ R2). IFN- γ se váže na IFN- γ R1 s relativně vyšší afinitou ve srovnání s IFN- γ R2. IFN- γ R2 přitom zvyšuje afinitu IFN- γ R1 k jeho ligandu. Řetězce IFN- γ R1 a IFN- γ R2 patří do rodiny cytokinových receptorů třídy II, třídy receptorů, které vážou ligand v malém úhlu písmene V, vytvořeném dvěma záhyby podobnými Ig, které tvoří extracelulární doménu. Tato rodina rovněž zahrnuje tkáňový faktor, IL-10 receptor a oba řetězce receptoru IFN- α (IFN- α R). Oba řetězce IFN- γ R postrádají vlastní kinázovou/fosfatázovou aktivitu. Řetězec IFN- γ R2 je konstitutivně exprimován, ale úroveň exprese je závislá na stavu buněčné diferenciaci nebo aktivace. [30, 31, 32]

2.5 Signalizace IFN- γ

Klasická signální transdukce indukovaná IFN- γ a aktivace transkripce probíhá cestou JAK/STAT. Konkrétními členy rodiny Janus tyrozin kináz, které se účastní signální transdukce, jsou tyto členové: JAK1, JAK2 a TYK2. Ze skupiny transkripčních faktorů STAT (signal transducer and activator of transcription) STAT1 a STAT2. Vazba ligandu vede k oligomerizaci receptoru, přičemž dva řetězce IFN- γ R1 jsou vázány k jednomu homodimeru IFN- γ , s následným zapojením dvou řetězců IFN- γ R2 do komplexu. Agregace jeho receptorových složek zprostředkovaná IFN- γ přivede neaktivní JAK asociované s cytoplazmatickými konci řetězců α a β do těsné blízkosti. Jakmile jsou seskupeny, JAK jsou aktivovány následnými auto- a transfosforylacemi. Nejprve dochází autofosforylaci JAK2 a pak k fosforylaci JAK1. Aktivovaná JAK1 pravděpodobně fosforyluje specifický tyrosinový zbytek poblíž C-konce IFN- γ R1. Tento pár fosforylovaných zbytků tyrosinu (jeden na každém řetězci IFN- γ R1) je umístěn v rozpoznávací sekvenci, kde se STAT1 váže prostřednictvím svého SH₂. Po ukotvení molekul STAT1 v cílových sekvencích komplexu IFN- γ R následuje fosforylace STAT1 na tyrosinovém zbytku Y701 pomocí JAK2. Jakmile jsou fosforylovány, dva proteiny STAT1 homodimerizují prostřednictvím vzájemných interakcí SH₂-fosfotyrosinu, čímž se vytvoří proteinový komplex označovaný jako GAF (gamma interferon

activation factor). Homodimer STAT1 se poté přemístí do jádra, kde se váže na krátký úsek DNA, známý jako GAS (gamma interferon activation site). Signalizace prostřednictvím IFN- γ může být regulována v několika bodech dráhy. Jedním z mechanismů je modulace exprese receptoru pro IFN- γ . Řízením hladin IFN- γ R1 buňka mění svou citlivost na IFN- γ a tím i své další reakce. [28]

Předpokládá se, že buňky mají i další mechanismy, které regulují signál IFN- γ . Ty mohou zahrnovat např. defosforylaci IFN- γ R1, která tak zabrání ukotvení STAT1, nebo defosforylaci STAT1, která brání jeho homodimerizaci. [31,33]

Jeden z důležitých transkripčních faktorů aktivovaných IFN- γ R signální drahou je T-bet, hlavní transkripční regulátor nezbytný pro indukci a udržování interferonu gama. [26]

Kromě JAK/STAT může interferon pouštět i jiné signální dráhy, např. PI3K-AKT-NF-KB a ERK-AP-1, které mohou pracovat ve spojení s JAK/STAT k přenosu signálů indukovaných interferonem. Specifické aktivované dráhy jsou závislé nejen na typu buněk, ale také na typu interferonu. [28]

2.5.1 Negativní regulace signalizace IFN- γ

Po transdukci signálu komplex IFN- γ /IFN- γ R1 internalizuje a vstupuje do endozomu, kde komplex disociuje. V mnoha typech buněk se IFN- γ R1 řetězec nakonec recykluje na buněčný povrch v jeho volné defosforylované formě a ligand je degradován. V některých typech buněk může signalizace IFN- γ indukovat degradaci internalizovaného receptoru a tím snížit expresi povrchového IFN- γ R1. Takový mechanismus může umožňovat regulaci IFN- γ indukovaných odpovědí v různých typech buněk. [31]

Mechanismy negativní zpětné vazby zahrnují především tři třídy bílkovin:

- Proteiny rodiny SOCS (potlačující signalizaci cytokinů), jako jsou SOCS1 a SOCS3, se mohou přímo vázat na JAK a inhibovat aktivitu JAK a také usnadnit degradaci komplexu interferonového receptoru.
- Tyrosinkinázy obsahující doménu SH2, jako jsou SHP1 a SHP2, mohou defosforylovat a tím deaktivovat STAT.
- Proteiny rodiny PIAS (proteinový inhibitor aktivovaného STAT) mohou inhibovat vazbu aktivovaných STAT s jejich cílovými sekvencemi DNA nebo

způsobit simulaci STAT, které již vstoupily do jádra, čímž mění transkripci genu a ovlivňují signalizaci indukovanou interferonem. [28]

PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

1) Ověření pozorování, že schopnost odpovědi na mikrobiální podnět je u imunitních buněk v periferní krvi po kardiochirurgické operaci negativně ovlivněna. Měření funkční kapacity buněk u pacientů starších 60 let operovaných pro ischemickou chorobu srdeční a/nebo chlopenní vadu vždy s kardiopulmonárním bypassem se zakládá na kvantifikaci IFN- γ . Mikrobiální podnět je v tomto modelu reprezentován TLR7/8 agonistou – R848, a protože se předpokládá, že významným zdrojem produkovaného IFN- γ jsou T-lymfocyty, aktivace je podpořena anti-CD3 protilátkou

2) Ověření zastoupení monocytární a T-lymfocytární populace mezi leukocyty u těchto pacientů před operací a pooperačně

3) Detekce schopnosti produkovat IFN- γ u vybraných leukocytárních subpopulací zdravých dobrovolníků

4) Vyhodnocení nejvhodnější metody detekce IFN- γ s ohledem na spolehlivost, ekonomiku a pracnost metody

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Použité reagensie

4.1.1 Izolace buněčných populací

- EasySep Human Monocyte Isolation Kit (Stemcell Technologies)
- EasySep Human T-lymfocyte Isolation Kit (Stemcell Technologies)
- Türkův roztok (Merck)
- LymphoPrep (Stemcell)
- 10x PBS:
 - 1,37 M NaCl (Penta)
 - 80 mM Na₂HPO₄·12 H₂O (Penta)
 - 27 mM KCl (Penta)
 - 20 mM KH₂PO₄ (Penta)
 - ddH₂O, pH 7,2-7,4
- EDTA (Sigma-Aldrich), 100 mM v ddH₂O
- FBS low endotoxin (Biosera)
- 1x PBS (10x PBS, 1 mM EDTA, 2% FBS)
- Lyzační roztok:
 - 150 mM NH₄Cl (Penta)
 - 10 mM KHCO₃ (Penta)
 - 0,1 mM Na₂EDTA (Penta)

4.1.2 Kultivace a stimulace buněčných populací

- LPS (Sigma-Aldrich), 1 mg/ml v ddH₂O
- R848 (Invivogen), 2 mM v ddH₂O
- Rekombinantní lidský IL-2 (Biolegend)
- Anti-human CD3, klon OKT3 (Exbio)
- Glutamax 100x (Gibco)
- Primocin (Invivogen)
- RPMI 1640 (Corning)

4.1.3 Analýzy

4.1.3.1 Průtoková cytometrie

- Anti-human CD56 FITC, klon B159 (BD Pharmingen)
- Anti-human CD16 FITC, klon 3G8 (Beckman Coulter)

- Anti-human CD19 ECD, klon J3-119 (Beckman Coulter)
- Anti-human CD8 PC5.5, klon B9.11 (Beckman Coulter)
- Anti-human HLA-DR PC7, klon Immu-357 (Beckman Coulter)
- Anti-human CD64 APC, klon 10.1 (Becton Dickinson)
- Anti-human CD3 PB, klon UCH-T1 (Beckman Coulter)
- Anti-human CD14 APC-A750, klon RMO52 (Beckman Coulter)
- Anti-human CD15 PB, klon 80H5 (Beckman Coulter)
- Anti-human CD45 KO, klon J33 (Beckman Coulter)
- Flow-Check Fluorospheres (Beckman Coulter)
- Flow-Set Fluorospheres (Beckman Coulter)
- OptiLyse (Immunotech)
- VersaComp Antibody Capture Bead Kits (Beckman Coulter) 20% NaN₃ (Penta)
- 20% NaN₃ (Penta)
- BSA (Serva)
- 1x PBS (10x PBS, 2% FBS, 1% BSA, 0,1% NaN₃)
- Injekční voda (Fresenius Kabi)

4.1.3.2 Enzymem řízená imunosorbentní analýza (ELISA)

- Human IFN- γ ELISA kit (R&D Systems), s detekčním limitem 8 pg/ml
- Human IL-6 ELISA kit (R&D Systems), s detekčním limitem 0,7 pg/ml

4.1.3.3 Detekce založená na reportérových buňkách

- „HEK-Blue IL-1 β Cells“ (Invivogen)
- „HEK-Dual IFN- γ Cells“ (Invivogen)
- DMEM (Corning)
- FBS low endotoxin (Biosera)
- Hygromycin B (Invivogen)
- Zeocin (Invivogen)
- Normocin (Invivogen)
- Blastocidin (Invivogen)
- Puromycin (Invivogen)
- PBS (Merck)
- QUANTI-Blue (Invivogen)

- QUANTI-Luc (Invivogen)
- Rekombinantní lidský IL-6 (Sigma-Aldrich)
- Rekombinantní lidský IL-1 β (Sigma-Aldrich)
- Rekombinantní lidský IFN- γ (R&D Systems)
- Rekombinantní lidský TNF- α (R&D Systems)

4.2 Pístroje

- Centrifuga Hermle Z 400 (Labortechnik GmbH)
- Centrifuga Allegra X-22 (Beckman Coulter)
- Chlazená centrifuga MIKRO 22R (Hettich)
- Chlazená centrifuga Universal 320R (Hettich)
- Třepačka Titramax 101 (Heidolph)
- Třepačka (Biosan)
- Promývačka MW-12A (Mindray)
- Spektrofotometr (Synergy HTX)
- Průtokový cytometr Navios EX (Beckman Coulter)
- Software Kaluza (Beckman Coulter)
- Software FlowJo (Becton Dickinson)
- Mikroskop Eclipse Ts2 (Nikon)
- Laminární box MCS-Advantage (Thermo Scientific)

4.3 Pomůcky

- 10 ml K₂EDTA zkumavky (BD Vacutainer)
- 10 ml sodium heparin zkumavky (BD Vacutainer)
- 10 ml zkumavky s aktivátorem srážení (BD Vacutainer)
- 15 ml a 50 ml centrifugační zkumavky (TPP)
- 5 ml polystyrenové zkumavky (12x75 mm) Falcon (Becton Dickinson)
- 1,5 ml a 2 ml zkumavky typu Eppendorf (TPP)
- 1,5 ml zamrazovací zkumavky se šroubovacím víčkem a o-kroužkem (TPP)
- T75 kultivační láhve (TPP)
- 96jamkové destičky (TPP)
- 24jamkové destičky (TPP)
- Nastavitelné automatické pipety Finnpiquette (Thermo Scientific):

- jednobanálové: 0,5-10 μ l, 10-100 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l
- osmikanálové: 5-50 μ l, 50-300 μ l

- Nastavitelná elektronická osmikanálová pipeta E1-ClipTip 10-300 μ l (Thermo Scientific)
- Špičky s filtrem a bez filtru Axygen (Corning)
- Špičky s filtrem a bez filtru ClipTip (Corning)
- Serologické pipety (TPP): 5 ml, 10 ml, 25 ml
- 0,2 μ m Stericup filtry (Merck)
- EasySep Magnet (Stemcell Technologies)
- Bürkerova komůrka (VWR)

4.4 Metody

4.4.1 Předpokus ke stanovení optimální koncentrace stimulantů LPS a R848

1. V předpokusu byla využita periferní krev tří zdravých dobrovolníků. Všechny odběry probíhaly do heparinizovaných zkumavek v ranních hodinách.
2. Periferní krev byla bezprostředně po odběru za sterilních podmínek naředěna médiem RPMI (ošetřeným antibiotikem Primocin, dle návodu výrobce) v poměru 1:1 a kultivována ve 24jamkových destičkách v objemu 500 μ l/jamka jako triplikáty bez stimulátorů nebo se stimulátory o níže uvedené koncentraci.

LPS: 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml

R 848: 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M

Kultivace proběhla v termostatu při 37°C, 5 % CO₂ po dobu 3, 6, 12 a 24 hodin. Po uvedených časech byly jednotlivé destičky centrifugovány 10 minut při 1000 g a pokojové teplotě.

3. Zbytková přítomnost leukocytů a erytrocytů byla odstraněna další centrifugací, při které byl supernatant odebrán do zkumavek typu Eppendorf a ty pak centrifugovány 10 minut při 2000 g a pokojové teplotě.

Po druhé centrifugaci byl supernatant zamražen v zamrazovacích zkumavkách na -80°C až do doby analýzy metodou ELISA.

4.4.2 Stanovení koncentrace IFN- γ metodou ELISA

1. ELISA kit i supernatanty byly před použitím vytemperovány na pokojovou teplotu.
2. Byla připravena pracovní koncentrace promývacího roztoku (20 ml promývacího pufru + 480 ml deionizované vody) a standard, který byl rekonstituován puftrem pro ředění standardu na základě šarže podle návodu výrobce.
3. Sekvenčním naředěním standardu byla připravena sedmibodová kalibrační řada standardu odpovídající rozsahu měření: 15 pg/ml až 1000 pg/ml. Jako pozadí (blank), ke kterému bylo měření vztaženo, sloužil pufr pro ředění standardu.
4. Supernatanty stimulované krve byly naředěny puftrem shodným pro ředění standardu 2x, 10x, 50x a 100x a kontrolní supernatanty byly naředěny 2x.
5. Do každé jamky destičky potažené koutovací protilátkou proti lidskému IFN- γ bylo pipetováno 100 μ l pufru specifického pro tuto esej a poté přidáno 100 μ l z každého bodu kalibrační řady standardu, blank a různě ředěné supernatanty stimulované a nestimulované krve. Vše bylo testováno v duplikátech.
6. Zakrytá destička byla inkubována dvě hodiny na třepačce při pokojové teplotě a poté 4x promyta připraveným promývacím roztokem.
7. V dalším kroku bylo do každé jamky přidáno 200 μ l konjugátu detekční protilátky proti lidskému IFN- γ a enzymu a inkubováno dvě hodiny při pokojové teplotě s následným promytím destičky jako v předchozím bodě.
8. Během druhé inkubace byl připravený roztok TMB substrátu (v ekvivalentním množství byly smíchány obě reagentie obsahující tetrametylbenzidin a peroxid vodíku a uchovány ve tmě) a po promytí bylo pipetováno 200 μ l substrátu do každé jamky a inkubováno ve tmě dle potřeby.

Po inkubační době bylo přidáno 50 μ l stop roztoku (2N kyselina sírová), vše důkladně promícháno a na spektrofotometru pomocí příslušného filtru (450 nm) měřena absorbance.

4.4.3 Měření IFN- γ pomocí HEK-Dual IFN- γ reportérových buněk

1. Pro detekci IFN- γ byly použity reportérové buňky HEK-Dual IFN- γ , které byly kultivovány v médiu DMEM s 10 % FBS a selekčními antibiotiky normocin, blastidicin, puromycin a zeocin dle pokynů výrobce.
2. Kultivované HEK-Dual IFN- γ byly opatrně opláchnuty roztokem PBS, odděleny od kultivační nádoby poklepáním nebo škrabkou a resuspendovány v testovacím médiu DMEM v koncentraci $2,6 \times 10^5$ /ml.
3. Do každé jamky 96jamkové destičky bylo přidáno 5 μ l čerstvého supernatantu ze vzorků stimulovaných a nestimulovaných monocytů, leukocytů a T-lymfocytů. Jako pozitivní kontrola sloužilo 5 μ l rekombinantního lidského IFN- γ . Jeho koncentrace v hodnotách 1, 10, 100 pg/ml byla využita k vytvoření standardní křivky. Jako negativní kontrola bylo použito 5 μ l lidského TNF- α o koncentraci 0,25 μ g/ml.
4. Do každé jamky bylo přidáno 195 μ l HEK-Dual IFN- γ suspenze ($2,6 \times 10^5$ /ml) a inkubováno 24 hodin v 5 % CO₂ při 37°C.
5. Po inkubaci bylo do 96jamkové destičky s průhledným dnem pipetováno 10 μ l supernatantu z této kultivace a 50 μ l roztoku QUANTI-Luc, který byl připraven a uchováván dle návodu výrobce.

V posledním kroku byla měřena luminiscence v předem nastaveném luminometru dle pokynů výrobce.

4.4.4 Izolace monocytů

1. K izolaci bylo odebráno přibližně 30 ml plné krve od zdravých dobrovolníků. Odběr proběhl do zkumavek ošetřených K₂EDTA.
2. Následující postup (s výjimkou centrifugace a mikroskopického stanovení počtu buněk) probíhal ve sterilním prostředí laminárního boxu. Připraven byl roztok PBS obsahující 2 % FBS a 1 mM EDTA, který byl dále používán k naředění krevních vzorků (1:1) a promývání.
3. Naředěné krevní vzorky byly navrstveny na médium k izolaci mononukleárních buněk Lymphoprep (1:1). Všechny reagenty byly před použitím vytemperovány na pokojovou teplotu.
4. Vzorky byly centrifugovány při pokojové teplotě 20 min, 800 g. Poté byl prstenec mononukleárních buněk promyt roztokem PBS (10 min, 400 g, pokojová teplota).

5. Množství vyizolovaných mononukleárních buněk bylo zjištěno mikroskopicky pomocí Türkova roztoku (obvyklé ředění 1:50) a Bürkerovy komůrky.
6. V dalším postupu, kdy byly negativně izolovány monocyty, byl využíván kit EasySep Human Monocyte Isolation kit a EasySep Magnet. Izolace probíhala v polystyrenových zkumavkách. Dle počtu buněk vyseparovaných v předchozím kroku byl k vzorku přidán příslušný objem koktejlu protilátek v poměru 50 μ l koktejlu na 1 ml vzorku. Inkubace proběhla 5 min při pokojové teplotě.
7. Následně byly přidány magnetické kuličky (shodný poměr i inkubace jako u koktejlu protilátek) a roztok PBS do celkového objemu vzorku 2,5 ml. Poté byl vzorek umístěn do prostoru magnetu, kdy po přibližně 3minutové inkubaci byly monocyty přítomné v suspenzi přemístěny do nové 5ml zkumavky jednoduchým přelitím zkumavky umístěné v magnetu. Ostatní buňky zůstaly navázány na magnetické kuličky na stěnách zkumavky. Počet buněk byl ověřen jako v bodě 5.
8. Buňky byly promyty roztokem PBS (10 min, 300 g, pokojová teplota) a naředěny médiem RPMI s 1% roztokem Glutamax, 10% autologním sérem a antibiotikem 1x Primocin tak, aby výsledná koncentrace byla 1×10^6 monocytů na 1 ml. Kultivace probíhala ve 24jamkové destičce (500 μ l/jamka) a stimulované vzorky obsahovaly buď LPS (100 ng/ml) nebo R848 (10 μ M), anebo byly bez stimulátoru (kontrolní vzorek). Vzorky byly kultivovány jako triplikáty.
9. Destička byla inkubována 24 hodin při 37°C, v 5% atmosféře CO₂. Monocyty byly ze vzorku další den odstraněny dvojitou centrifugací: 10 min, 1000 g, poté 10 min, 3000 g, vše při pokojové teplotě.

Supernatanty byly zamrazeny a až do doby analýzy uchovány při -80°C.

4.4.5 Izolace T lymfocytů

1. Postup izolace T lymfocytů z plné krve byl shodný s postupem izolace monocytů. Negativní separace T lymfocytů proběhla pomocí EasySep magnetu, který při použití EasySep Human T lymfocyte kitu, koktejlu protilátek pro negativní selekci, umožňuje získat vysoce čistou populaci T lymfocytů (99 %).

2. Následná kultivace a stimulace buněk (1×10^6 /ml) probíhala stejně jako u monocytů navíc s přidáním kombinace stimulátorů R848 (10 μ M), IL-2 (250 ng/ml) a anti-CD3 (2 μ g/ml).
3. Zpracování supernatantů bylo obdobné jako v předchozím postupu u monocytů.

4.4.6 Izolace leukocytů

1. 5 ml edtované krve bylo inkubováno v 50 ml lyzačního roztoku po dobu 10 min, při pokojové teplotě na rotátoru.
2. Po centrifugaci bez brzdy (10 min, 233 g, pokojová teplota) byl sediment promyt v 50 ml PBS (10 min, 300 g, pokojová teplota) a celý postup opakován s polovičním objemem roztoků.

Izolované leukocyty (1×10^6 /ml) byly kultivovány, stimulovány a supernatanty zpracovány jako v případě monocytů a T-lymfocytů.

4.4.7 Ověření čistoty buněk na průtokovém cytometru

1. Čistota izolovaných monocytů byla ověřována pomocí průtokové cytometrie na základě exprese povrchových znaků CD14, CD4 a HLA-DR. Obdobně byla stanovena čistota izolovaných T-lymfocytů, kdy byly k identifikaci použity tyto znaky CD3, CD8 a CD4. Pro cytometrickou analýzu byly použity protilátky proti těmto znakům: CD16 FITC, CD56 FITC, CD19 ECD, CD8 PC5.5, HLA-DR PC7, CD3 APC, CD4 APC-Alexa 700, CD14 APC-Alexa 750, CD7 PB, CD45 KO. Objem monoklonálních protilátek byl přitom vylitrován pro koncentraci 3×10^5 izolovaných buněk ve 100 μ l roztoku PBS.
2. Po izolaci buněk před vlastní inkubací s protilátkami byla koncentrace buněk v PBS upravena dle výše uvedené optimalizace. 100 μ l izolovaných buněk pak bylo inkubováno s protilátkami po dobu 15 min, při pokojové teplotě, ve tmě. K nastavení základního zobrazení byly použity neznačené buňky ve shodné koncentraci.
3. Zbytkové množství erytrocytů bylo odstraněno 5minutovou inkubací s 200 μ l roztoku OptiLyse při pokojové teplotě, ve tmě.
4. Lýza byla zastavena přidáním 2 ml PBS a nadbytečné množství protilátek odstraněno 5minutovou centrifugací při 300 g a pokojové teplotě.

Akvizice dat proběhla následně pomocí 3laserového průtokového cytometru a akvizičního softwaru Navios. Expres příslušných znaků byla analyzována softwarem Kaluza. Standardizace akvizice a reproducibilita výsledků byla zajištěna rutinním použitím kuliček Flow-Check Fluorospheres a Flow-Set Fluorospheres. Přesvit fluorochromů byl kompenzován post-akvizičně pomocí VersaComp Antibody Capture Beads.

4.4.8 Sekreční esej (Miltenyi Biotec)

Tato esej je obdobou intracelulární detekce produkovaných cytokinů a obchází použití brefeldinu A nebo monensinu.

1. Stimulovaná a kontrolní heparinizovaná krev byla nejprve zbavena erytrocytů v lyzačním pufru po dobu 10 minut.
2. Lyzované erytrocyty byly odstraněny přidáním PBS s následnou centrifugací (5 min, 300 g, 4°C)
3. Sediment byl inkubován s bispecifickou protilátkou (Catch Reagent), která se váže na CD45 na povrchu leukocytů (5 min, 4°C) a zároveň je navázán produkovaný IFN- γ (přidání 3,5 ml teplého média a za trvalého třepání po dobu 45 min ve 37°C).
4. Po centrifugaci (5 min, 300 g, 4°C) byl odstraněn supernatant a sediment byl inkubován s monoklonální protilátkou proti IFN- γ PE (Cytokine Detection Antibody) a dalšími specificky značenými monoklonální protilátkami, které umožnily identifikaci subpopulací leukocytů a odlišení IFN- γ produkujících od neprodukcujících buněk. Inkubace probíhala na ledu po dobu 15 min a nenavázané protilátky byly odmyty přibližně 4 ml studeného PBS (10 min, 300 g, 4°C).

Po odstranění supernatantu a resuspendování sedimentu v malém množství PBS proběhla detekce pomocí průtokového cytometru.

5 CHARAKTERISTIKA SOUBORU PACIENTŮ

Studie byla evidována pod číslem 201611S13P a schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. Každý účastník byl plně informován o účelu studie a svou dobrovolnou účast potvrdil podepsáním informovaného souhlasu, společně se souhlasem s nakládáním s osobními údaji.

Soubor 53 pacientů tvořilo 34 mužů a 19 žen, průměrného věku 70 let (rozsah 60 až 85 let). Pacienti byli operováni pro ischemickou chorobu srdeční a/nebo chlopňové vady, případně bylo důvodem onemocnění aorty. Žádný z pacientů netrpěl v době plánované operace akutním infekčním onemocněním, onkologickým onemocněním nebo poruchou renálních či jaterních funkcí. Do studie byli zařazeni pacienti s logistickým EuroSCORE menším než 5 %. [34]

Všechny operace byly vedeny ze střední sternotomie a byl použitý konvenční mimotělní oběh (kardiopulmonární bypass). Odběry krve byly prováděny před operací, bezprostředně po operaci, 1. a 3. pooperační den. Tři pacienti bezprostředně po operaci zemřeli a nebyli zahrnuti do statistického hodnocení.

Soubor zdravých dobrovolníků (11) tvořily ženy s průměrným věkem 28 let (rozsah 26 až 31 let), které netrpěly akutním ani známým chronickým onemocněním a nebyly v době odběru gravidní. Dobrovolníci opakovaně poskytli vzorky heparinizované nebo EDTA krve s minimálním odstupem 6 týdnů.

6 STATISTIKA

Soubory dat byly statisticky hodnoceny pomocí aplikace Statistica 13 (TIBCO Software Inc, USA). Normalita dat byla ověřena Shapiro-Wilksovým testem a homogenita variancí Levenovým testem. Data byla dle svých charakteristik analyzována parametrickými nebo neparametrickými testy, jak je uvedeno ve výsledkové části u daného experimentu. Rozdíly byly považovány za signifikantní na hladině α menší než 0,05.

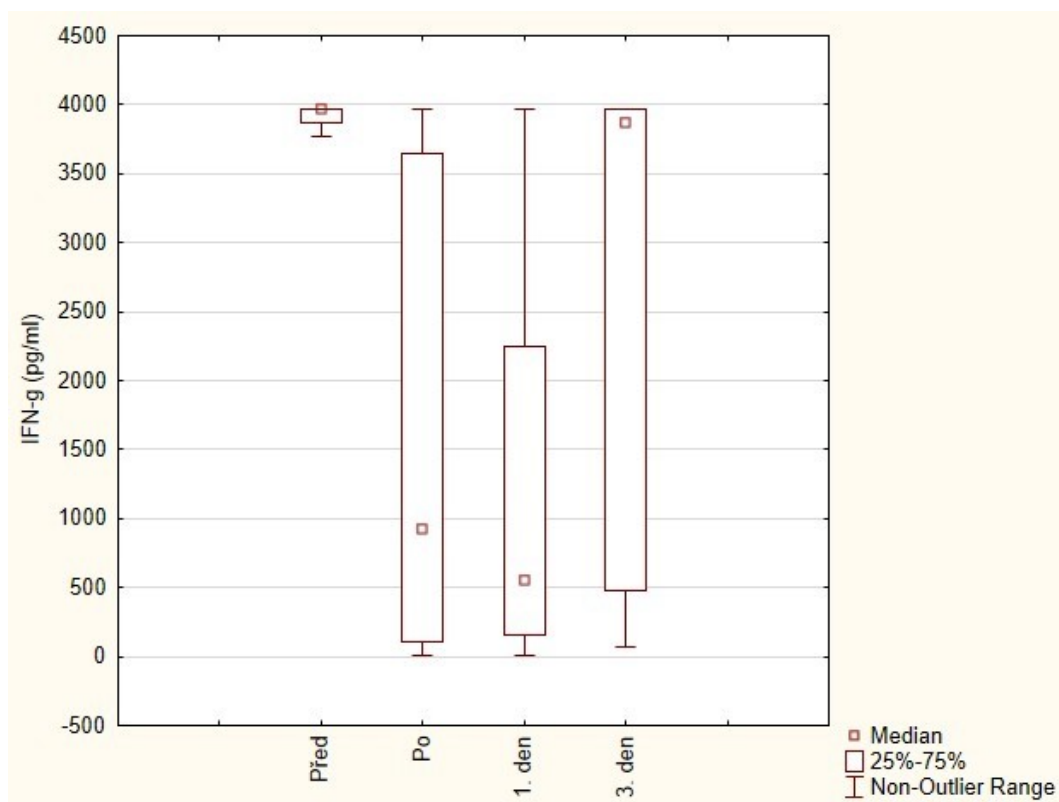
7 VÝSLEDKY

7.1 Produkce IFN- γ u pacientů před a po kardiochirurgické operaci

7.1.1 Produkce IFN- γ u pacientů měřené metodou ELISA

U pacientů (50) po kardiochirurgické operaci s mimotělním oběhem byla pozorována produkce IFN- γ ve vzorku heparinizované krve v období před operací a v následujících pooperačních dnech. Plná krev pacientů byla stimulována pomocí anti-CD3 a R848. První měření bylo u pacientů provedeno v den před operací a následná měření byla provedena ve třech časových úsecích, bezprostředně po operaci, 1. den a 3. den po operaci. Poté byla porovnána koncentrace produkovaného IFN- γ v supernatantu. Po operaci a první pooperační den byla naměřena významně snížená produkce IFN- γ ($p < 0,0001$). Třetí den nejsou hodnoty statisticky odlišné od předoperačních hodnot ($p = 0,076$). Znaménkový test, upraveno Bonferroniho korekcí.

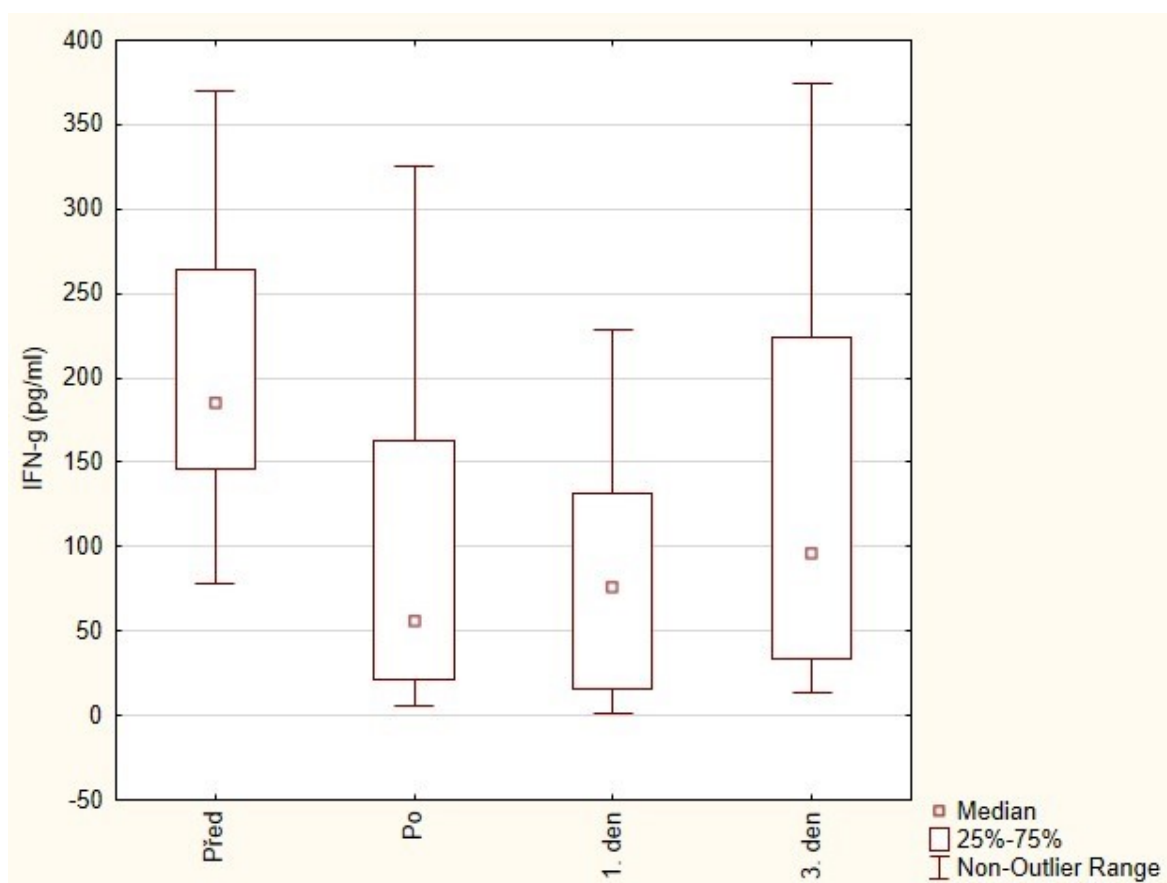
Od této metody bylo později odstoupeno z důvodů snížené reproducibility mezi esejemi různých lotů při opakování měření.



Graf č. 1: Produkce IFN- γ u pacientů před a po kardiochirurgické operaci (měřeno metodou ELISA)

7.1.2 Produkce IFN- γ u pacientů měřené pomocí lidských reportérových buněk HEK293

U pacientů (50) po kardiologické operaci s mimotělním oběhem byla pozorována produkce IFN- γ ve vzorku heparinované krve v období před operací a v následujících pooperačních dnech. Plná krev pacientů byla stimulována pomocí anti-CD3 a R848. První měření bylo u pacientů provedeno v den před operací a následná měření byla provedena ve třech časových úsecích, bezprostředně po operaci, 1. den a 3. den po operaci. Poté byla porovnána koncentrace produkovaného IFN- γ v supernatantu. Významně nižší koncentrace IFN- γ byla měřena po operaci ($p < 0,0001$), první ($p < 0,0001$) i třetí pooperační den ($p = 0,005$) v porovnání s koncentrací měřenou před operací (ANOVA pro opakovaná měření, post hoc Dunnettův test). Koncentrace IFN- γ byla měřena pomocí lidských reportérových buněk HEK293 transfekovaných genem pro Lucia luciferázu.

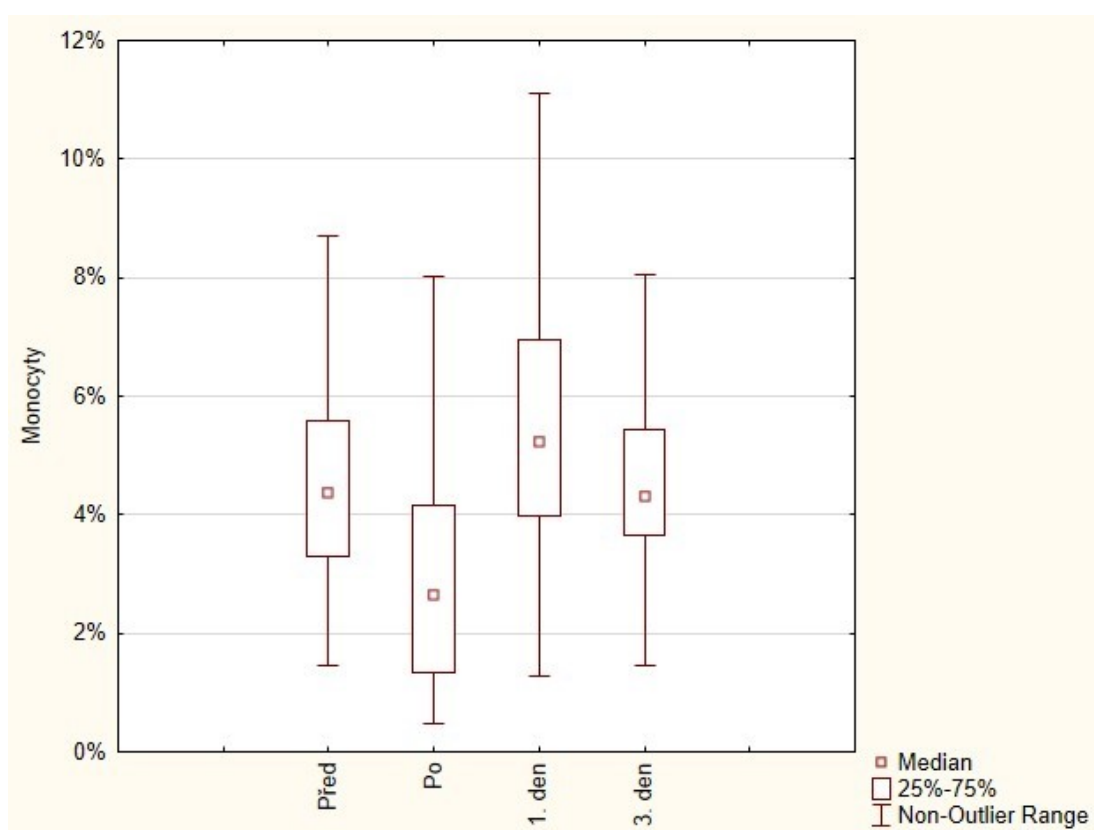


Graf č. 2: Produkce IFN- γ u pacientů před a po kardiologické operaci (měřena pomocí lidských reportérových buněk HEK293)

7.2 Procentuální zastoupení buněčných populací u pacientů před a po kardiochirurgické operaci

7.2.1 Procentuální zastoupení monocytů před a po kardiochirurgické operaci

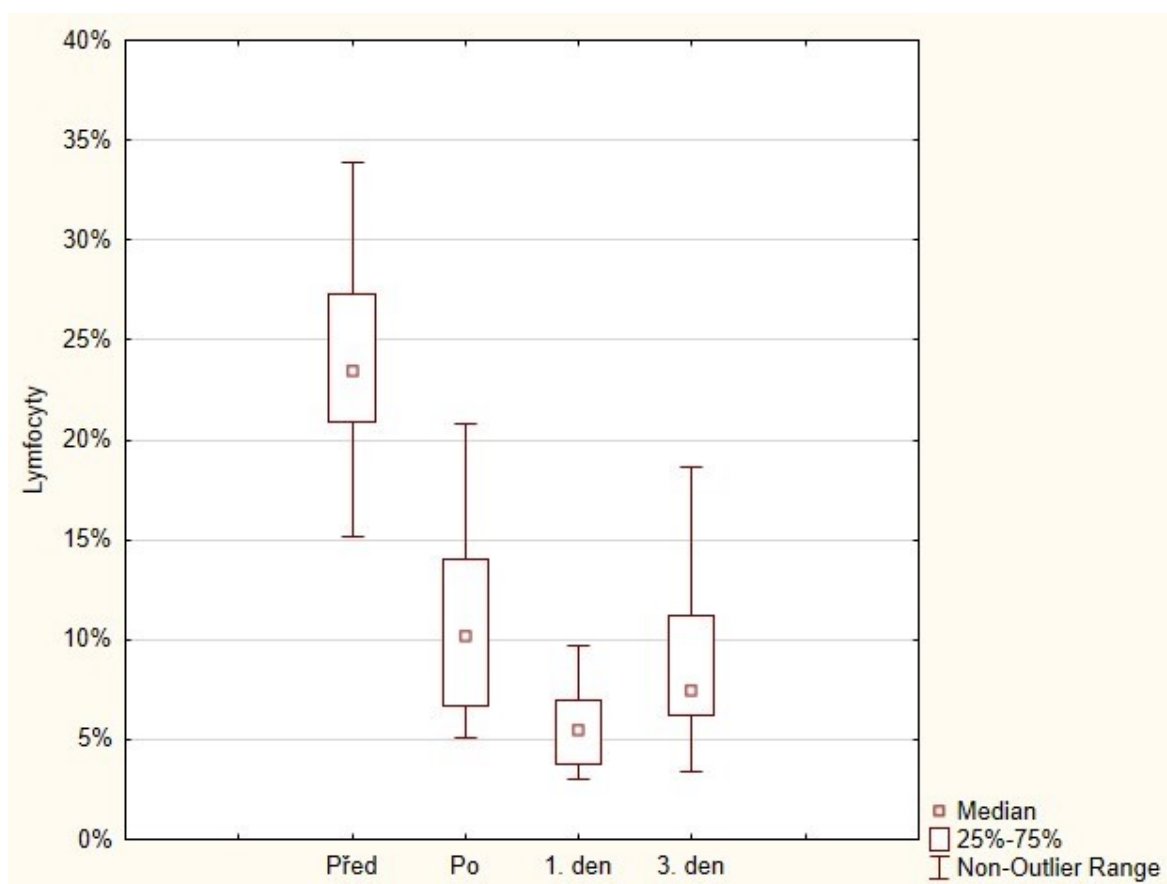
U pacientů (50) po kardiochirurgické operaci s mimotělním oběhem bylo provedeno měření CD14 pozitivních monocytů z celkových leukocytů v období před operací a v následujících pooperačních dnech. První měření bylo u pacientů provedeno v den před operací a následná měření byla provedena ve třech časových úsecích, bezprostředně po operaci, 1. den a 3. den po operaci. Významný procentuální rozdíl monocytů byl naměřen těsně po operaci ($p < 0,0001$) a 1. pooperační den ($p = 0,0001$). 3. pooperační den byly hodnoty již bez významného rozdílu v porovnání s předoperačními (ANOVA pro opakovaná měření, post hoc Dunnettův test).



Graf č. 3: Procentuální zastoupení monocytů před a po kardiochirurgické operaci.

7.2.2 Procentuální zastoupení lymfocytů před a po kardiochirurgické operaci

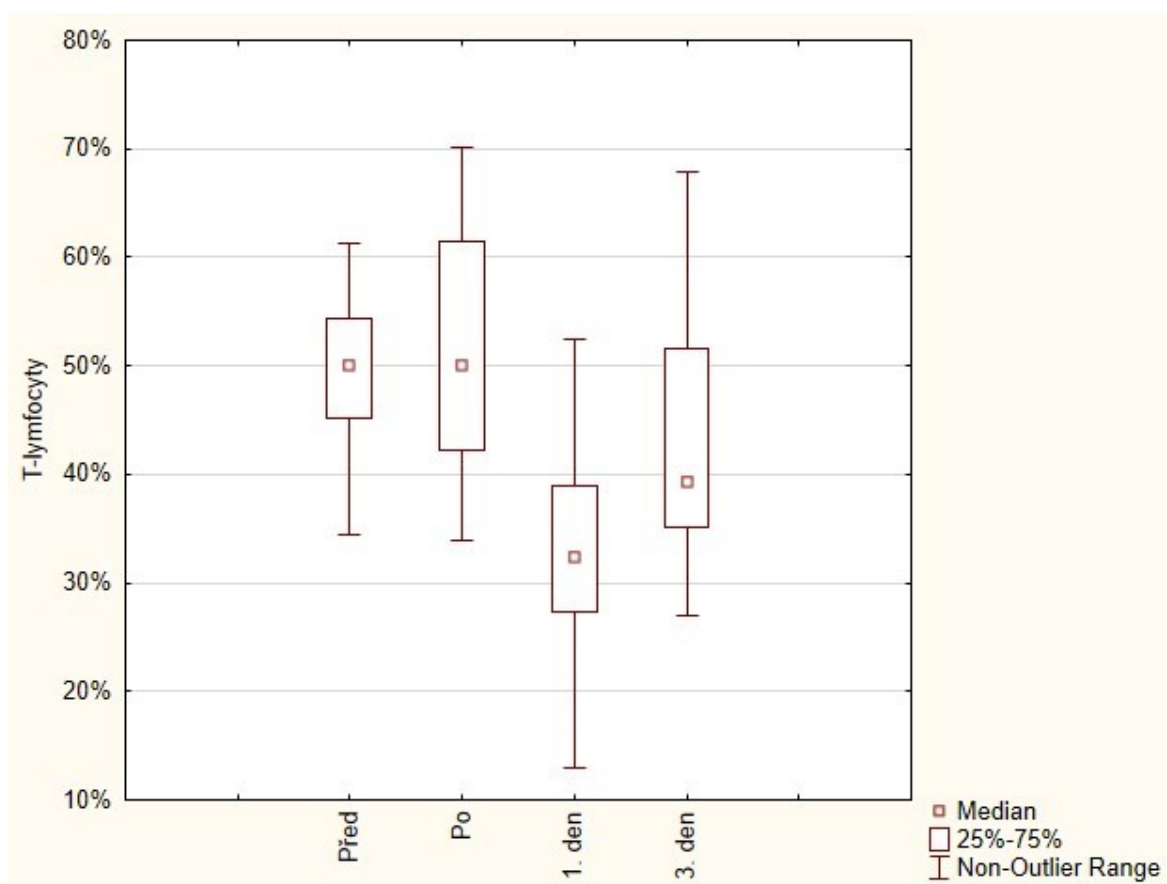
U pacientů (50) po kardiochirurgické operaci s použitím mimotělního oběhu bylo provedeno měření celkového počtu lymfocytů z leukocytů na základě FS/SS charakteristik. Měření bylo provedeno v období před operací a v následujících pooperačních dnech. První měření bylo u pacientů provedeno v den před operací a následná měření byla provedena ve třech časových úsecích, bezprostředně po operaci, 1. den a 3. den po operaci. Významně snížené procento lymfocytů bylo měřeno při všech prováděných měřeních po operaci ($p < 0,0001$) v porovnání s předoperačními hodnotami (ANOVA pro opakovaná měření, post hoc Dunnettův test).



Graf č. 4: Procentuální zastoupení lymfocytů před a po kardiochirurgické operaci.

7.2.3 Procentuální zastoupení CD3 pozitivních T lymfocytů před a po kardiokirurgické operaci

U pacientů (50) po kardiokirurgické operaci s použitím mimotělního oběhu bylo provedeno měření CD3 pozitivních lymfocytů ze všech lymfocytů. Měření bylo provedeno v období před operací a v následujících pooperačních dnech. První měření bylo u pacientů provedeno v den před operací a následná měření byla provedena ve třech časových úsecích, bezprostředně po operaci, 1. den a 3. den po operaci. Těsně po operaci bylo procento CD3+ lymfocytů srovnatelné s hodnotou předoperační. Významně snížené procento bylo naměřeno 1. ($p < 0,0001$) a 3. ($p = 0,005$) pooperační den (ANOVA pro opakovaná měření, post hoc Dunnettův test).

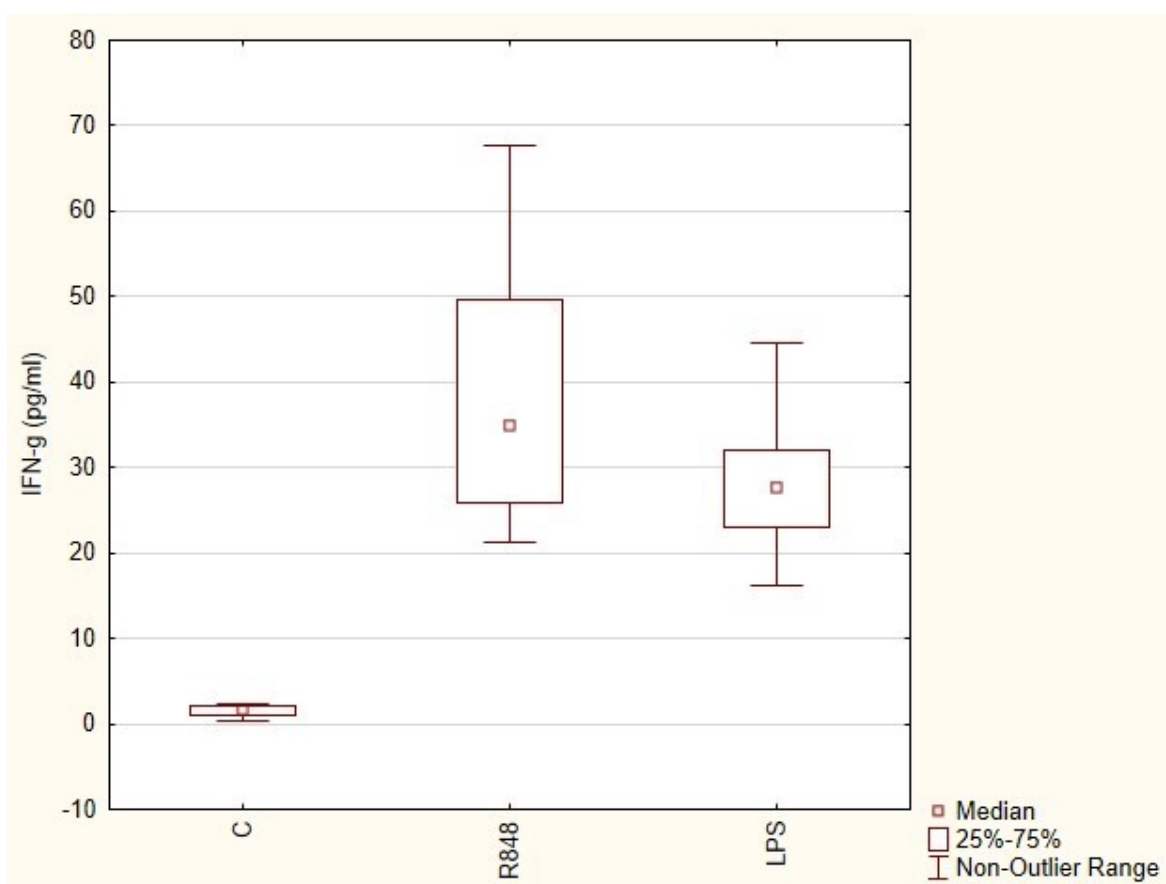


Graf č. 5: Procentuální zastoupení CD3 pozitivních T lymfocytů před a po kardiokirurgické operaci.

7.3 Produkce IFN- γ po stimulaci izolovaných buněk zdravých dárců

7.3.1 Produkce IFN- γ monocyty po stimulaci LPS a R848

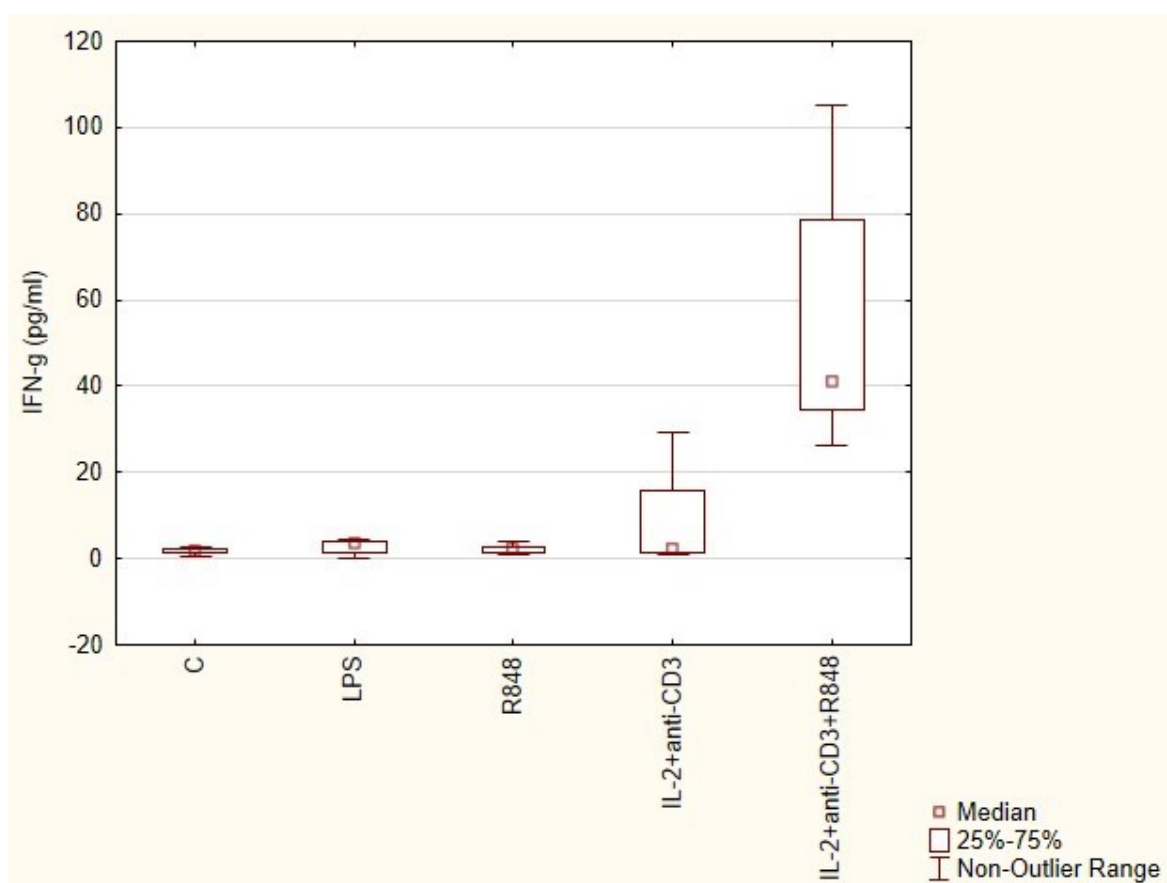
U zdravých jedinců (15) byla provedena stimulace izolovaných monocytů pomocí LPS a R848. Následně byla porovnána produkce IFN- γ v supernatantech. Vyšší koncentrace produkovaného IFN- γ byla zaznamenána při stimulaci monocytů jak pomocí R848, tak LPS (obojí $p=0,0006$, znaménkový test s Bonferroniho korekcí). Koncentrace IFN- γ byla měřena pomocí lidských reportérových buněk HEK293 transfekovaných genem pro Lucia luciferázu.



Graf č. 6: Produkce IFN- γ monocyty po stimulaci LPS a R848.

7.3.2 Produkce IFN- γ T lymfocyty po stimulaci LPS, R848, IL-2 a anti-CD3

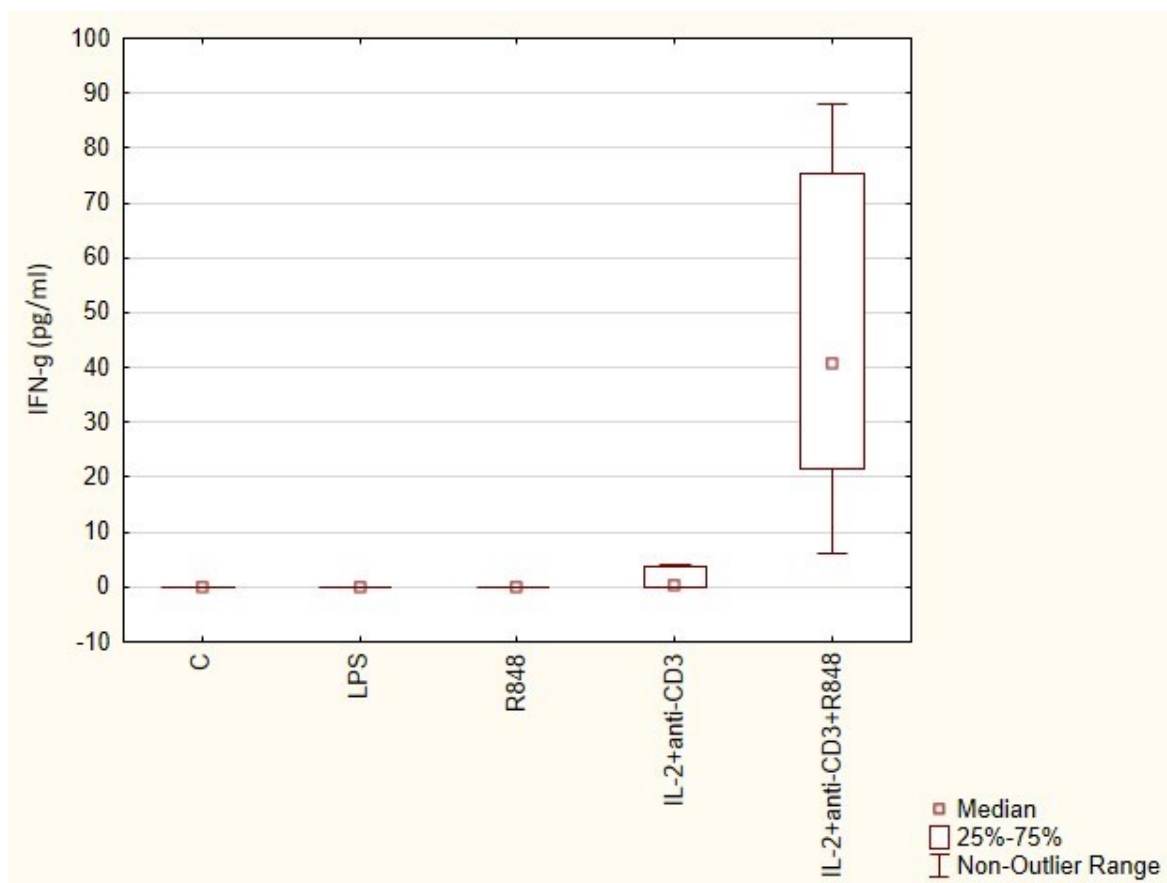
U zdravých jedinců (12) byla provedena stimulace izolovaných T-lymfocytů pomocí LPS, R848, IL-2, anti-CD3 a jejich kombinací. Následně byla porovnána produkce IFN- γ v supernatantech. Nejvyšší naměřená koncentrace IFN- γ byla stejně jako u leukocytů změřena při použití kombinace IL-2, anti-CD3 a R848 ($p=0,005$). Další nesignifikantně zvýšená koncentrace byla zaznamenána při použití stimulantů IL-2 společně s anti-CD3. Samostatné stimulanty LPS a R848 nevykazovaly žádnou produkci IFN- γ vůči kontrole (znaménkový test s Bonferroniho korekcí). Koncentrace IFN- γ byla měřena pomocí lidských reportérových buněk HEK293 transfekovaných genem pro Lucia luciferázu.



Graf č. 7: Produkce IFN- γ T lymfocyty po stimulaci LPS, R848, IL-2 a anti-CD3.

7.3.3 Produkce IFN- γ leukocyty po stimulaci LPS, R848, IL-2 a anti-CD3

U zdravých jedinců (10) byla provedena stimulace izolovaných leukocytů pomocí LPS, R848, IL-2, anti-CD3 a jejich kombinací. Následně byla porovnána produkce IFN- γ v supernatantech. Nejvyšší naměřená koncentrace IFN- γ byla u leukocytů zaznamenána použitím kombinace IL-2, anti-CD3 a R848 ($p=0,016$). Statisticky nevýznamné zvýšení bylo zaznamenáno i při použití kombinace IL-2 a anti-CD3. Použitý byl znaménkový test s Bonferroniho korekcí. Samostatné stimulanty LPS a R848 neindukovaly produkci IFN- γ . Koncentrace IFN- γ byla měřena pomocí lidských reportérových buněk HEK293 transfekovaných genem pro Lucia luciferázu.



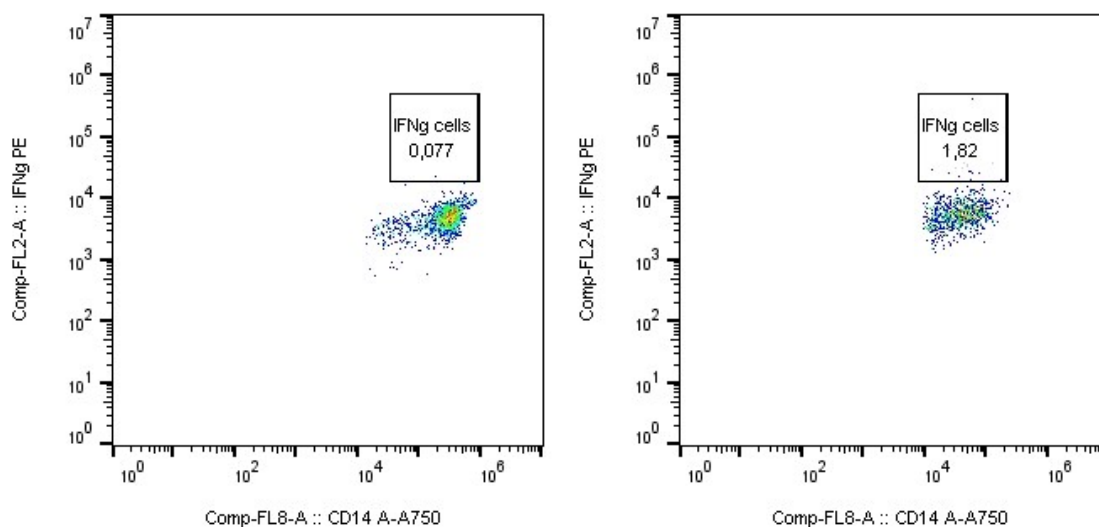
Graf č. 8: Produkce IFN- γ leukocyty po stimulaci LPS, R848, IL-2 a anti-CD3.

7.4 Sekreční esej

Výsledky stimulace heparinizované krve pomocí R848 po dobu 24 hodin u zdravých dobrovolníků (3) ukázaly, že k nejvyšší produkci IFN- γ docházelo u NK buněk. Grafy níže jsou reprezentativním zobrazením IFN- γ produkujících buněk z různých subpopulací leukocytů.

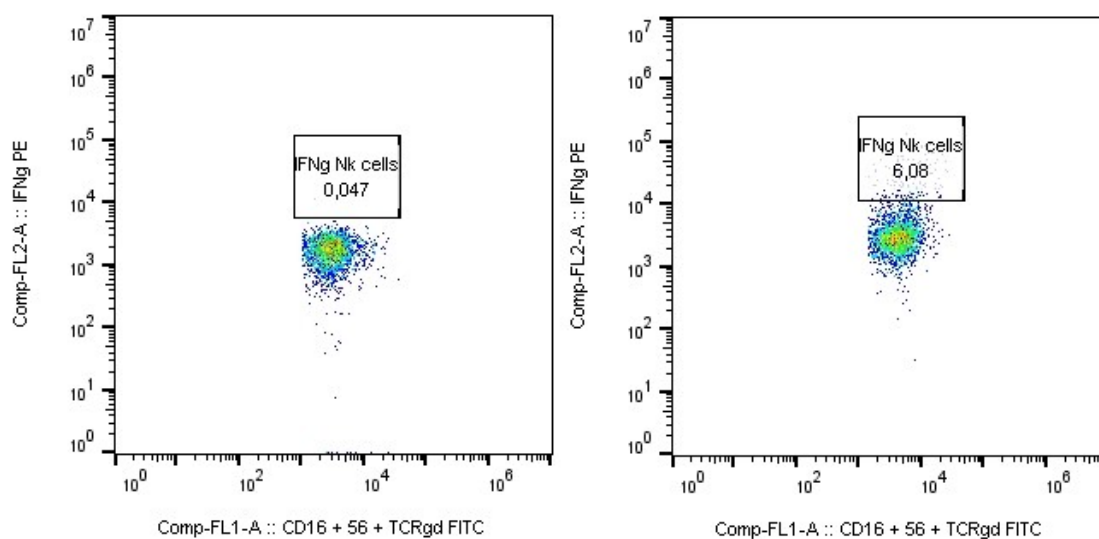
Monocyty byly mezi leukocyty (exprimujícími CD45) identifikovány na základě exprese CD14, lymfocyty pak jako buňky s odlišnými FS/SS charakteristikami. Tc lymfocyty byly mezi lymfocyty odlišeny jako buňky exprimující CD3 a CD8, a Nk buňky na základě exprese CD16 a CD56 s absencí znaku CD3. Umístění gatu odpovídá kontrole bez IFN- γ detekční protilátky (FMO, nezobrazeno). Číslo v gatu udává procento buněk produkujících IFN- γ v dané populaci.

7.4.1 Produkce IFN- γ monocyty



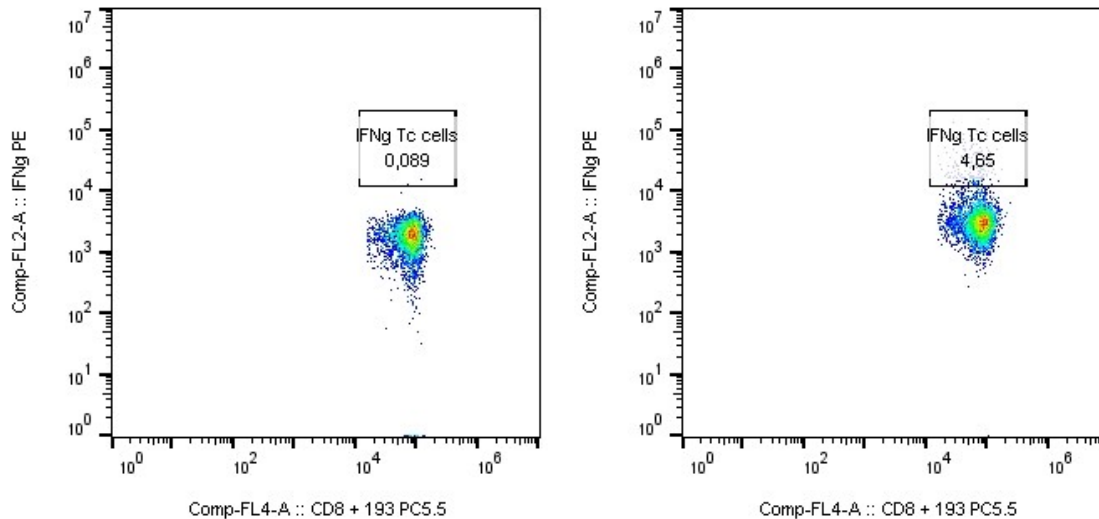
Graf č. 9: Produkce IFN- γ monocyty (vlevo kontrola bez stimulace, vpravo stimulace pomocí R848 po dobu 24 hodin)

7.4.2 Produkce IFN- γ NK buňkami



Graf č. 10: Produkce IFN- γ NK buňkami (vlevo kontrola bez stimulace, vpravo stimulace pomocí R848 po dobu 24 hodin)

7.4.3 Produkce IFN- γ Tc lymfocyty



Graf č. 11: Produkce IFN- γ Tc lymfocyty (vlevo kontrola bez stimulace, vpravo stimulace pomocí R848 po dobu 24 hodin)

8 DISKUZE

Při operaci prováděné s použitím kardiopulmonálního bypassu dochází k narušení funkce imunitního systému. Přímé traumatické poranění chirurgickým zákrokem vyvolává řetězec reakcí prostřednictvím endokrinního, metabolického, kardiiovaskulárního a imunitního systému. Pokud tato stresová reakce není regulována, může vést až k syndromu systémové zánětlivé odpovědi s orgánovou dysfunkcí. [35] Dle studie SOAP (Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients) se v Evropě vyskytne sepse asi u 35 % pacientů v průběhu jejich hospitalizace na jednotce intenzivní péče. I přes určité pokroky v terapii se úmrtnost pacientů s těžkou sepsí pohybuje mezi 20–70 % v závislosti na věku pacienta, přidružených onemocněních a počtu selhávajících orgánů. [36] V roce 2017 bylo celosvětově zaznamenáno přibližně 48,9 milionů případů sepse a bylo hlášeno 11,0 milionů úmrtí souvisejících se sepsí, což představuje 19,7 % všech celosvětových úmrtí. Věkově standardizovaná incidence sepse klesla od roku 1990 do roku 2017 o 37,0 % a mortalita klesla o 52,8 %. [37]

Pooperační imunosuprese, zejména ztráta buňkami zprostředkované imunity, je běžně pozorována po operaci v důsledku zvýšeného uvolňování hormonů potlačujících imunitní odpověď, jako jsou katecholaminy, prostaglandiny a kortizol v závislosti na velikosti chirurgického stresu a poškození tkáně. [38] Snížená syntéza IFN- γ Th1 lymfocyty po srdečních operacích s kardiopulmonálním bypassesem (CPB) je součástí zánětlivé odpovědi na lokální a systémová traumata. [39]

V našem souboru pacientů jsme studovali jednak funkční kapacitu buněčných populací, tak i jejich zastoupení před operací a v pooperačním období. Funkční kapacita byla měřena pomocí produkovaného IFN- γ buňkami plné krve, které byly stimulovány pomocí anti-CD3 a R848, **graf č. 2**. U pacientů bylo pozorováno značné snížení produkovaného IFN- γ , které nastalo hned po operaci ve srovnání s předoperační hodnotou. Od 1. pooperačního dne se produkce IFN- γ lehce zvyšovala, ale snížená produkce, tudíž i narušená funkční kapacita buněk zůstala až do sledovaného 3. pooperačního dne.

U stejného souboru pacientů byly zároveň měřeny i procentuální změny buněčných populací, kde jsme se zaměřili na monocyty, lymfocyty a CD3 pozitivní T-lymfocyty.

Primární role monocytů je účast v odpovědích přirozené imunity a udržování nebo doplňování různých typů makrofágů a dendritických buněk, které napomáhají fagocytóze patogenů. Monocyty tvoří až 8 % bílých krvinek periferní krve a hrají ústřední roli v reakci hostitele na exogenní a endogenní druhy patogenů, jako jsou bakterie a viry. Kromě toho modulují zánětlivé procesy, produkují prozánětlivé i protizánětlivé cytokiny a vyvíjejí se v makrofágy s pro- a protizánětlivým fenotypem. [40] Ve studii zabývající se použitím CPB u kardiologických operací popisují pokles monocytů v jeho počátku, který je následovaný pooperační monocytózou. [41] Snížený pooperační počet monocytů těsně po operaci s použitím CPB popisují ve své studii i Wehlin at al. [42] Procento monocytů, **graf č. 3**, bylo u pacientů velmi sníženo hned po operaci, kdy došlo k významnému poklesu oproti předoperačním hodnotám. 24 hodin po operaci nastala naopak lehká monocytóza a 3. pooperační den byly hodnoty srovnatelné s hodnotami před operací.

Snížené množství po kardiologické operaci s použitím CPB bylo zaznamenáno i u lymfocytů. Ve studii provedené Rinder at al. došlo k poklesu celkového počtu lymfocytů u všech pacientů a největší pokles byl zaznamenán u T-lymfocytů. [43] Další studie popisuje pokles počtu T-lymfocytů 48 hodin po operaci, kdy nejnižší hladiny byly pozorovány v časném pooperačním období. Významné snížení absolutního počtu NK buněk, celkového počtu lymfocytů, celkového počtu T lymfocytů a subpopulací T lymfocytů v časném období CPB může být způsobeno extravazací a/nebo aktivací T buněk během operace a po operaci. [44] Snížené množství lymfocytů, **graf č. 4** a snížené množství T lymfocytů, **graf č. 5** bylo naměřeno i v souboru našich pacientů. U lymfocytů došlo k poklesu hned po operaci a k jeho další prohloubení následovalo ještě 1. pooperační den. 3. pooperační den se počet lymfocytů začal nepatrně zvyšovat, ale v porovnání s předoperačními hodnotami byl stále významně snížený. U T lymfocytů došlo k významnému snížení až 1. pooperační den.

Interferon-gama (IFN- γ) je pleiotropní cytokin s klíčovou rolí ve vrozené a adaptivní imunitě. Ovlivňuje mnoho biologických funkcí primárně souvisejících s obranou hostitele a imunitní regulací, jako je antivirová a antibakteriální obrana, buněčný cyklus, apoptóza a zánět. Stimulace IFN- γ vede k up-regulaci molekul MHC I. i II. třídy a zvyšuje prezentaci antigenu profesionálními antigen prezentujícími buňkami (APC). Aktivace makrofágů pomocí IFN- γ vede k sekreci

cytokinů, up-regulaci procesů zpracování a prezentace antigenu a aktivaci antimikrobiálních a protinádorových mechanismů. Kromě toho je IFN- γ chemoatraktantem leukocytů, podílí se na jejich vyžívání a diferenciaci. Také zvyšuje aktivitu přirozených zabíječských buněk a reguluje funkci B lymfocytů. V časně obraně hostitele je důležitá produkce IFN- γ buňkami přirozených zabíječů (NK) a možná i profesionálními APC, zatímco T lymfocyty se stávají hlavními producenty IFN- γ během adaptivní imunitní odpovědi. IFN- γ je kriticky důležitý při vývoji Th1 odpovědi tím, že reguluje diferenciaci, aktivaci a homeostázu T lymfocytů a inhibuje vývoj Th2 lymfocytů. Kromě NK buněk a T lymfocytů je IFN- γ produkován i jinými subpopulacemi leukocytů, např. monocytů/makrofágy. [45]

Reakce monocytů na patogeny a signály spojené s nebezpečím je klíčovou součástí imunitní odpovědi. Během stresu se monocyty díky své funkční plasticitě vyvíjejí do specializovaných populací. Jsou důležitým zdrojem dendritických buněk, které jsou klíčové pro řízení imunitní odpovědi. Ztráta funkční plasticity monocytů, vedoucí ke snížené schopnosti monocytů stát se dendritickými buňkami, znamená abnormální imunitní odpověď a je spojena s nepříznivými dopady traumatu, zápalu plic a srdečních operací. [46] Velké operační trauma, jako je aorta-koronární bypass, může vést k pooperačním poruchám imunity, čímž je pacient vystaven zvýšenému riziku infekce a sepse. Monocytový/makrofágový systém a receptor CD14 jsou důležité pro včasné rozpoznání a eliminaci přítomných bakterií. Membránový CD14 (mCD14) je považován za hlavní lipopolysacharidový (endotoxinový) receptor na leukocytech. Aktivace monocytů prostřednictvím mCD14 spouští komplexní zánětlivou reakci, která vede k uvolnění cytokinů, produkci reaktivních forem kyslíku a produkci prostaglandinů. Zvýšené plazmatické koncentrace sCD14 spolu se sníženou expresí mCD14 byly hlášeny u pacientů s patologickými stavy, jako je sepsa, infekce nebo multiorgánové selhání, a zvýšené sérové hladiny sCD14 byly spojeny s vyšší mortalitou. [47] U septických a polytraumatizovaných pacientů byla zjištěna snížená kapacita syntézy TNF- α a exprese HLA-DR. U těchto pacientů exprese HLA-DR na monocytech a T lymfocytech korelovala s rozvojem sepse v pozdější fázi klinického průběhu. Cytokiny, jako je interferon- γ (IFN- γ) nebo hematopoetické růstové faktory, jako je faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-

CSF), mohou ve skutečnosti obnovit funkci imunitních buněk jak in vitro, tak in vivo. [48]

Použití kardiopulmonárního bypassu představuje takový podnět, kdy je možné pozorovat, které buněčné populace jsou pro imunitní odpověď při infekci zásadní. Vzhledem k výraznému poklesu monocytů a schopnosti produkce IFN- γ u kardiochirurgických pacientů krátce po operaci bylo otázkou, zda existuje přímá souvislost mezi těmito dvěma jevy. Publikace obvykle neuvádějí monocyty jako hlavní producenty IFN- γ za normálních okolností. Nicméně experimentální schéma a použité stimulatory a metody detekce mají zásadní vliv na analýzu schopnosti produkce tohoto cytokinu. Zde, ale i v jiných pracích byla tato myšlenka studována v izolovaných populacích buněk i plné krvi zdravých dobrovolníků při použití stimulatorů LPS a R848.

Na rozpoznávání bakteriálních a virových produktů se podílí rodina konzervovaných transmembránových receptorů známých jako Toll-like receptory (TLR). Imunitní, ale i endoteliální buňky rozpoznávají LPS, hlavní složku buněčné stěny gramnegativních bakterií, prostřednictvím receptorového komplexu sestávajícího se z TLR4, CD14 a MD2. Adaptorový protein označovaný jako MyD88 iniciuje signální dráhu, která vede k časně aktivaci nukleárního faktoru-KB (NF-KB) a mitogenem aktivovaných proteinových kináz (MAPK). Paralelně je iniciována signální dráha nezávislá na MyD88, která vede k aktivaci NF-KB v pozdní fázi. Výsledkem je produkce různých prozánětlivých mediátorů. [49] Přestože je známo, že stimulace LPS vede k produkci IFN- γ , signální dráha vedoucí k aktivaci příslušných genů není dosud objasněna. Lze se tedy domnívat, že účinek na produkci IFN- γ je sekundární – zprostředkovaný kostimulačními signály a prozánětlivými cytokiny. [50]

R848 (Resiquimod) je stimulator imunitní reakce, který je také známý pro svou výraznou antivirovou aktivitu. R848 je rozpoznáván TLR7 a TLR8, aktivuje imunitní buňky a podporuje Th1 odpověď. Aktivace pomocí R848 iniciuje signální dráhu závislou na adaptorovém proteinu MyD88, kdy dochází k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B a JNK. Následně dochází k indukci produkce Th1 cytokinů, včetně IFN I (interferon typu I), IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α , a inhibici exprese a sekrece Th2 cytokinu IL-4. [51]

Produkcí IFN- γ monocyty po stimulaci LPS u zdravých dobrovolníků se zabýval ve své studii i Kraaij et al., který zjistil, že u izolovaných CD14+ monocytů

po stimulaci LPS dochází k významnému zvýšení produkce IFN- γ . [45] Zvýšená produkce IFN- γ po stimulaci LPS oproti kontrole byla naměřena i v supernatantech našich zdravých dobrovolníků, **graf č. 6**. Monocyty jsou zároveň významným zdrojem IL-12, který je silný induktor produkce IFN- γ a naopak. [52] Produkci IFN- γ po stimulaci R848 u zdravých jedinců se zabýval ve své studii Caron et al., kdy při stimulaci T lymfocytů samostatným R848 byla indukovaná pouze omezená produkce IFN- γ . Produkce IFN- γ byla však několikanásobně vyšší při použití dalších stimulatorů jako jsou anti-CD3 nebo IL-2. [53] I v našich experimentech, kdy jsme stimulovali T lymfocyty pomocí LPS, R848, anti-CD3, IL-2 nebo jejich kombinacemi jsme měli téměř nulovou produkci IFN- γ při použití samostatných stimulatorů. Významná produkce IFN- γ byla naměřena až při použití kombinace R848, anti-CD3 a IL-2, **graf č. 7**. Toto naznačuje, že pro aktivaci T-lymfocytů je potřeba buněčné kooperace, vhodného cytokinového prostředí, případně stimulace TCR komplexu, a že T-lymfocyty nejsou schopny plně odpovídat na podněty receptorů vrozené imunity, PRR, tak jako monocyty. Podobné výsledky jsme zaznamenali i při stimulaci izolovaných leukocytů, kde statisticky významné zvýšení produkce IFN- γ bylo pozorováno pouze při použití kombinace stimulatorů R848, anti-CD3 a IL-2, **graf č. 8**. Tento výsledek byl překvapující, protože zde nebyla detekována signifikantní produkce při použití samotných stimulatorů LPS a R848, přestože izolované monocyty na tyto podněty reagovaly zvýšenou produkcí. Je tedy možné, že prozánětlivý účinek LPS a R848 je v tomto modelu balancován protizánětlivými mechanismy, které jsme dále nesledovali.

Pro další detekci IFN- γ u zdravých dobrovolníků byla použita metoda sekreční eseje, kdy heparinizovaná krev byla stimulována pomocí R848 po dobu 24 hodin. IFN- γ byl produkován různými typy leukocytů, v podstatném množství pak monocyty, **graf č. 9**, NK buňkami, **graf č. 10** a Tc lymfocyty, **graf č. 11**. Nejvyšší procentuální změna byla zaznamenána u NK buněk. K podobným výsledkům dospěli i ve své práci Hou et al., kdy nejvyšší produkce IFN- γ byla detekována NK buňkami. [54]

Významná změna v produkci vzhledem ke kontrole byla v našem experimentu zaznamenána i u Tc lymfocytů, ačkoli byl použitý pouze stimulator R848. Oproti izolovaným T lymfocytům zde mohla hrát roli právě kooperace buněk zastoupených v periferní krvi a vytvoření vhodného cytokinového prostředí. Nejvyšší naměřená produkce IFN- γ zde nemusí odrážet nejvyšší celkovou

produkci, protože NK buňky jsou v krvi zastoupené v menším počtu než Tc lymfocyty.

Z experimentů na zdravých dobrovolnících vyplývá, že monocyty jsou důležitými producenty IFN- γ , ale zásadní roli hrají i při buněčných interakcích, které umožňují dalším buňkám odpovídat na podnět produkcí IFN- γ . Výrazné pooperační snížení počtu monocytů a nízká exprese jejich kostimulačních molekul u kardiochirurgických pacientů tak ovlivní širší spektrum buněk a následnou imunitní odpověď. Přímý vztah mezi sníženou hladinou IFN- γ a konkrétními pooperačními komplikacemi ve stratifikované skupině pacientů, stejně jako dopad kardiochirurgické operace na funkční kapacitu NK buněk by měly být předmětem dalších prací.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá vlivem kardiopulmonálního bypassu na lidský organismus, kdy díky operační zátěži, kontaktu krve s umělými povrchy a ischemicko-reperfuznímu poškození dochází k narušení funkce imunitního systému a indukce systémové zánětlivé odpovědi, SIRS. Těžký průběh SIRS se rozvine až u 35 % pacientů, kteří jsou hospitalizováni na jednotce intenzivní péče.

Cílem této diplomové práce bylo ověření, že po kardiochirurgické operaci dochází k významnému ovlivnění imunitního systému, a to jak ve smyslu změn zastoupených populací imunitních buněk v periferní krvi pacientů, tak v jejich schopnosti odpovídat na mikrobiální podnět. Ta byla hodnocena kvantifikací produkce IFN- γ ve vybraných buněčných subpopulacích a zároveň byla vyhodnocena nejvhodnější metoda detekce IFN- γ .

První část praktické části této diplomové práce se zabývala vlivem kardiochirurgické operaci s použitím CPB, kdy dochází k výraznému snížení produkce IFN- γ imunitními buňkami periferní krve pacientů, které přetrvává minimálně do třetího pooperačního dne a s tím i spojené zhoršené odpovědnosti imunitního systému na mikrobiální stimuly. Zároveň dochází k procentuální změně buněčných populací imunitního systému, které mají na tyto mikrobiální podněty reagovat. Těsně po operaci u pacientů s použitím CPB dochází ke snížení počtu monocytů a lymfocytů. U monocytů došlo k obnovení populace do původního předoperačního stavu třetí den po operaci. U lymfocytů byl od doby operace zaznamenán pouze pozvolný nárůst, který se ale ani třetí pooperační den nedostal na předoperační hodnoty.

Druhá část praktické části byla zaměřená na detekci produkce IFN- γ u zdravých dobrovolníků, kde byla studována funkční kapacita buněk. U izolovaných populací monocytů, T-lymfocytů a leukocytů vykazovaly nejvyšší produkci IFN- γ stimulované T-lymfocyty. Ke stimulaci ale docházelo až při použití kombinace několika stimulátorů (R848, anti-CD3 a IL-2), zatímco jednotlivé stimulátory k produkci nevedly. U metody sekreční eseje při detekci IFN- γ v heparinizované krvi stimulované R848 vykazovaly nejvyšší procentuální rozdíl v produkci IFN- γ NK buňky. Tato metoda zaznamenala i vysoký procentuální rozdíl v produkci IFN- γ u Tc lymfocytů po samostatném stimulu R848, což

naznačuje kooperaci buněk a potřebu vhodného cytokinového prostředí potřebného pro aktivaci této subpopulace.

Jako nejvhodnější metoda pro stanovení IFN- γ z hlediska časového, finančního i způsobem provedení byla vyhodnocena detekce pomocí lidských reportérových buněk HEK transfekovaných receptorem pro IFN- γ . Použití jednoduché koncentrační křivky z rekombinantního IFN- γ pak umožňuje kvantifikaci výsledků. Na rozdíl od metod využívajících protilátky, jako je ELISA nebo sekreční esej, reporterové buňky vážou přítomný protein ve funkční formě dimeru a nejsou zatíženy nespecifitou interakce, nefunkčními nebo odlišně glykosylovanými formami IFN- γ .

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] D. Machin and C. Allsager, "Principles of cardiopulmonary bypass," *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain*, vol. 6, no. 5, pp. 176–181, Oct. 2006.
- [2] F. Kraft, C. Schmidt, H. Van Aken, and A. Zarbock, "Inflammatory response and extracorporeal circulation," *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*, vol. 29, no. 2. Bailliere Tindall Ltd, pp. 113–123, 01-Jun-2015.
- [3] G. Ailawadi and R. K. Zacour, "Cardiopulmonary Bypass/Extracorporeal Membrane Oxygenation/Left Heart Bypass: Indications, Techniques, and Complications," *Surgical Clinics of North America*, vol. 89, no. 4. Surg Clin North Am, pp. 781–796, Aug-2009.
- [4] B. Gaudriot *et al.*, "Immune Dysfunction after Cardiac Surgery with Cardiopulmonary Bypass: Beneficial Effects of Maintaining Mechanical Ventilation," *Shock*, vol. 44, no. 3, pp. 228–233, Sep. 2015.
- [5] M. Hübner *et al.*, "Myeloid-Derived Suppressor Cells Mediate Immunosuppression After Cardiopulmonary Bypass," *Crit. Care Med.*, vol. 47, no. 8, pp. e700–e709, Aug. 2019.
- [6] P. R. B. Evora, D. F. Tenório, and D. M. Braile, "Is the Cardiopulmonary Bypass Systemic Inflammatory Response Overestimated?," *Brazilian J. Cardiovasc. Surg.*, vol. 33, no. 4, pp. I–III, 2018.
- [7] E. Squicciarro *et al.*, "Prevalence and Clinical Impact of Systemic Inflammatory Reaction After Cardiac Surgery," *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.*, vol. 33, no. 6, pp. 1682–1690, Jun. 2019.
- [8] S. Kumar, S. Tripathy, A. Jyoti, and S. G. Singh, "Recent advances in biosensors for diagnosis and detection of sepsis: A comprehensive review," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 124–125, pp. 205–215, Jan. 2019.
- [9] R. C. Bone *et al.*, "Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis," *Chest*, vol. 101, no. 6, pp. 1644–1655, Jun. 1992.
- [10] M. A. Sheikhi, A. Ebadi, A. Shahriary, H. Davoodzadeh, and H. Rahmani*,

- "Cardiac Surgery Anesthesia And Systemic Inflammatory Response," *Int. J. bioassays*, vol. 4, no. 2, p. 3648, Jan. 2015.
- [11] A. Salameh, S. Dhein, I. Dähnert, and N. Klein, "Neuroprotective Strategies during Cardiac Surgery with Cardiopulmonary Bypass," *Int. J. Mol. Sci. 2016, Vol. 17, Page 1945*, vol. 17, no. 11, p. 1945, Nov. 2016.
- [12] G. Justus, C. Walker, L. M. Rosenthal, F. Berger, O. Miera, and K. R. L. Schmitt, "Immunodepression after CPB: Cytokine dynamics and clinics after pediatric cardiac surgery – A prospective trial," *Cytokine*, vol. 122, p. 154018, Oct. 2019.
- [13] A. E. Coutinho and K. E. Chapman, "The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 335, no. 1, p. 2, Mar. 2011.
- [14] D. W. Cain and J. A. Cidlowski, "Immune regulation by glucocorticoids," *Nat. Rev. Immunol. 2017 174*, vol. 17, no. 4, pp. 233–247, Feb. 2017.
- [15] I. J. Elenkov, "Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1024, pp. 138–146, 2004.
- [16] M. H. Blotta, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu, "Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes.," *J. Immunol.*, vol. 158, no. 12, 1997.
- [17] C. Patra, P. Chamaiah Gatti, and A. Panigrahi, "Morbidity After cardiac surgery under cardiopulmonary bypass and associated factors: A retrospective observational study," *Indian Heart J.*, vol. 71, no. 4, pp. 350–355, Jul. 2019.
- [18] O. Giacinto *et al.*, "Inflammatory Response and Endothelial Dysfunction Following Cardiopulmonary Bypass: Pathophysiology and Pharmacological Targets," *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.*, vol. 13, no. 2, pp. 158–173, Jul. 2019.
- [19] J. B. O'Neal, A. D. Shaw, and F. T. Billings, "Acute kidney injury following cardiac surgery: Current understanding and future directions," *Crit. Care*, vol. 20, no. 1, pp. 1–9, Jul. 2016.
- [20] J. T. Park, "Postoperative acute kidney injury," *Korean J. Anesthesiol.*, vol.

70, no. 3, p. 258, 2017.

- [21] T. G. Tanner and M. O. Colvin, "Pulmonary Complications of Cardiac Surgery," *Lung*, vol. 198, no. 6, pp. 889–896, Dec. 2020.
- [22] J. L. Huffmyer and D. S. Groves, "Pulmonary complications of cardiopulmonary bypass," *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, vol. 29, no. 2, pp. 163–175, Jun. 2015.
- [23] J. R. Schoenborn and C. B. Wilson, "Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses," *Advances in Immunology*, vol. 96. Academic Press, pp. 41–101, 01-Jan-2007.
- [24] M. A. Farrar and R. D. Schreiber, "The Molecular Cell Biology of Interferon-gamma and its Receptor," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 1, pp. 571–611, Apr. 1993.
- [25] J. Fenimore and H. A. Young, "Regulation of IFN- γ expression," in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 941, Springer New York LLC, 2016, pp. 1–19.
- [26] J. R. Lees, "Interferon gamma in autoimmunity: A complicated player on a complex stage," *Cytokine*, vol. 74, no. 1, pp. 18–26, Jul. 2015.
- [27] S. Kang, H. M. Brown, and S. Hwang, "Direct antiviral mechanisms of interferon-gamma," *Immune Network*, vol. 18, no. 5. Korean Association of Immunologists, 01-Oct-2018.
- [28] K. Zhang, "Overview of Interferon: Characteristics, signaling and anti-cancer effect," *Arch. Biotechnol. Biomed.*, vol. 1, no. 1, pp. 001–016, Apr. 2017.
- [29] J. L. Mendoza *et al.*, "Structure of the IFN γ receptor complex guides design of biased agonists," *Nature*, vol. 567, no. 7746, p. 56, Mar. 2019.
- [30] G. Tau and P. Rothman, "Biologic functions of the IFN- γ receptors," *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 54, no. 12. Wiley-Blackwell, pp. 1233–1251, 1999.
- [31] K. Schroder, P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume, "Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 75, no. 2, pp. 163–189, Feb. 2004.

- [32] G. Kak, M. Raza, and B. K. Tiwari, "Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases," *Biomol. Concepts*, vol. 9, no. 1, pp. 64–79, Jan. 2018.
- [33] P. Hertzog, S. Forster, and S. Samarajiwa, "Systems biology of interferon responses," *Journal of Interferon and Cytokine Research*, vol. 31, no. 1. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA , pp. 5–11, 01-Jan-2011.
- [34] O. L. L. Zikmund Galková, J. Špinar, "Skórovací systémy před kardiochirurgickou operací," *Kardiol Rev Int Med* 2015, 17(2): 103-104
- [35] J. Sugita and K. Fujiu, "Systemic Inflammatory Stress Response During Cardiac Surgery," *Int. Heart J.*, vol. 59, no. 3, pp. 457–459, May 2018.
- [36] J. Maláska et al., "Léčba těžké sepse na pracovištích intenzivní péče v České republice - pilotní výsledky projektu EPOSS." *Vnitr Lek*, vol. 59, pp. 962-70, 2013.
- [37] K. E. Rudd *et al.*, "Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study," *Lancet (London, England)*, vol. 395, no. 10219, pp. 200–211, Jan. 2020.
- [38] G. Lachmann, C. Von Haefen, J. Kurth, F. Yuerek, and C. Spies, "Innate immunity recovers earlier than acquired immunity during severe postoperative immunosuppression," *Int. J. Med. Sci.*, vol. 15, no. 1, p. 1, Jan. 2018.
- [39] A. Franke, W. Lante, A. Markewitz, and C. Weinhold, "In Vitro Restoration of Post-Operatively Decreased IFN-Gamma Levels After Cardiac Surgery and Its Effect on Pro- and Anti-Inflammatory Mediators," *J. Surg. Res.*, vol. 136, no. 2, pp. 266–272, Dec. 2006.
- [40] F. Shahid, G. Y. H. Lip, and E. Shantsila, "Role of monocytes in heart failure and atrial fibrillation," *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 7, no. 3, Feb. 2018.
- [41] G. Fingerle-Rowson *et al.*, "Down-regulation of surface monocyte lipopolysaccharide-receptor CD14 in patients on cardiopulmonary bypass undergoing aorta-coronary bypass operation," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 115, no. 5, pp. 1172–1178, 1998.

- [42] L. Wehlin, J. Vedin, J. Vaage, and J. Lundahl, "Peripheral blood monocyte activation during coronary artery bypass grafting with or without cardiopulmonary bypass," *Scand. Cardiovasc. J.*, vol. 39, no. 1–2, pp. 78–86, 2005.
- [43] C. S. Rinder, J. P. Mathew, H. M. Rinder, J. B. Tracey, E. Davis, and B. R. Smith, "Lymphocyte and monocyte subset changes during cardiopulmonary bypass: effects of aging and gender," *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 129, no. 6, pp. 592–602, 1997.
- [44] A. Bayer, Ö. F. Doğan, F. Ersoy, and Ü. Ersoy, "The effect of open heart surgery on circulating lymphocytes and lymphocyte subsets in pediatric patients," *Turkish J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 17, no. 1, 2009.
- [45] M. D. Kraaij *et al.*, "Human monocytes produce interferon-gamma upon stimulation with LPS," *Cytokine*, vol. 67, no. 1, pp. 7–12, May 2014.
- [46] M. Zawadka, J. Wahome, H. Oszkiel, W. Y. Szeto, B. Cobb, and K. Laudanski, "Long-term alterations in monocyte function after elective cardiac surgery," *Anaesthesia*, vol. 72, no. 7, pp. 879–888, Jul. 2017.
- [47] G. Fingerle-Rowson *et al.*, "Down-regulation of surface monocyte lipopolysaccharide-receptor CD14 in patients on cardiopulmonary bypass undergoing aorta-coronary bypass operation," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 115, no. 5, pp. 1172–1178, 1998.
- [48] J. Börgermann *et al.*, "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) restores decreased monocyte HLA-DR expression after cardiopulmonary bypass," *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 55, no. 1, pp. 24–31, Feb. 2007.
- [49] S. M. Dauphinee and A. Karsan, "Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells," *Lab. Investig. 2006 861*, vol. 86, no. 1, pp. 9–22, Nov. 2005.
- [50] T. K. Varma, C. Y. Lin, T. E. Toliver-Kinsky, and E. R. Sherwood, "Endotoxin-Induced Gamma Interferon Production: Contributing Cell Types and Key Regulatory Factors," *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 9, no. 3, p. 530, 2002.
- [51] Y. Zhou *et al.*, "R848 Is Involved in the Antibacterial Immune Response of

Golden Pompano (*Trachinotus ovatus*) Through TLR7/8-MyD88-NF- κ B-Signaling Pathway," *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 1, Jan. 2021.

- [52] J. Hodge-Dufour *et al.*, "Inhibition of interferon γ induced interleukin 12 production: A potential mechanism for the anti-inflammatory activities of tumor necrosis factor," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, no. 23, pp. 13806–13811, Nov. 1998.
- [53] G. Caron *et al.*, "Direct Stimulation of Human T Cells via TLR5 and TLR7/8: Flagellin and R-848 Up-Regulate Proliferation and IFN- γ Production by Memory CD4+ T Cells," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 3, pp. 1551–1557, Aug. 2005.
- [54] H. Hou *et al.*, "Establishment of the reference intervals of lymphocyte function in healthy adults based on IFN- γ secretion assay upon phorbol-12-myristate-13-acetate/ionomycin stimulation," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. FEB, p. 172, Feb. 2018.