

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Imunitní odpověď u kriticky nemocných pacientů

The immune response in critically ill patients

Vypracovala: Jana Melichová

Vedoucí práce: MUDr. Miroslav Průcha Ph.D.

Studijní obor: Imunologie

Studijní program: Biologie

Ústav: Katedra buněčné biologie

Praha 2010

ABSTRAKT

Kardiochirurgická operace vyvolává nespecifickou aktivaci systémové zánětlivé odpovědi podobně jako sepse u kriticky nemocných. Významnou roli zde proto hraje diferenciální diagnostika infekční a neinfekční etiologie systémové zánětlivé odpovědi. Cílem práce bylo srovnání vybraných biomarkerů u pacientů po kardiochirurgickém zákroku a u pacientů se sepsí. Vyšetřeno bylo 24 pacientů, kteří splňovali kritéria diagnózy sepse a 8 pacientů po kardiochirurgické operaci. Prokázali jsme vyšší senzitivitu a specifickou PCT ve srovnání s CRP při diagnostice sepse. sTREM-1, exprese TREM-1 na monocytech, TREM-1 na granulocytech a počet FoxP3+ T regulačních lymfocytů neumožňují spolehlivou diferenciální diagnostiku infekční a neinfekční etiologie u vyšetřovaných skupin pacientů. Stanovení lymfocytů u pacientů se sepsí je užitečným parametrem při této diagnostice. Kardiochirurgická operace je významným podnětem vyvolání systémové zánětlivé odpovědi neinfekční etiologie.

Klíčová slova: sepse, kardiochirurgická operace, biomarker, diagnóza

ABSTRACT

Cardiosurgery is a potent activator of the immune response similar to sepsis in critically ill patients. Therefore the differential diagnostics of infectious and non-infectious etiology plays an important role. The aim of the study was to compare the biomarkers in the diagnostics of patients after cardiosurgery and in septic patients. 24 patients fulfilling criteria of sepsis and 8 patients after cardio surgery were involved in the study. We demonstrated higher specificity and sensitivity of PCT in comparison with CRP at diagnostics of sepsis. sTREM-1, expression of TREM-1 on monocytes, TREM-1 on granulocytes and the number of FoxP3+T regulatory lymphocytes do not provide a reliable differential diagnostics of infectious and non-infectious etiology of examined group of the patients. The number of lymphocytes in patients with sepsis is a useful parameter at this diagnostics. Cardiosurgery represent a significant impulse for the evocation of the systemic inflammatory response of non-infectious etiology.

Key words: sepsis, cardio surgery, biomarker, diagnostics

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením MUDr. Miroslava Průchy Ph.D. a použila jsem pouze prameny uvedené v seznamu literatury.

V Praze dne 31.8.2010

.....
podpis

Na předložené práci jsem pracovala v Nemocnici Na Homolce na OKBHI úseku imunologie pod vedením MUDr. Miroslava Průchy Ph.D.

Děkuji vedoucímu práce MUDr. Miroslavu Průchovi Ph.D. za odborné vedení a poskytnutí cenných rad při řešení zadaného úkolu a také děkuji MUDr. Miroslavu Dostálovi DrSc. za pomoc při zpracování statistiky.

Dále děkuji kolegyním z úseku imunologie za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	8
1. ÚVOD.....	10
2. TEORETICKÁ ČÁST	
2.1. DEFINICE SEPSE.....	10
2.2. ETIOLOGIE SEPSE.....	11
2.3. PATOFYZIOLOGIE SEPSE.....	11
2.3.1. RECEPTORY IMUNITNÍHO SYSTÉMU.....	11
2.3.1.1. TOLL-LIKE RECEPTORY.....	12
2.3.1.2. NOD-LIKE RECEPTORY.....	13
2.3.1.3. LEKTINOVÉ RECEPTORY.....	14
2.3.1.4. RLR RECEPTORY.....	14
2.3.2. LOKÁLNÍ ODPOVĚĎ NA INFEKCI.....	15
2.3.3. SYSTÉMOVÁ ODPOVĚĎ NA INFEKCI.....	16
2.3.4. DIAGNOSTIKA SEPSE.....	18
2.3.5. BIOMARKERY SEPSE.....	19
2.3.5.1. PCT.....	19
2.3.5.2. CRP.....	20
2.3.5.3. TREM-1	22
2.3.5.4. sTREM-1.....	24
2.3.5.5. T REGULAČNÍ LYMFOCYTY.....	24
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	
3.1. CÍL PRÁCE.....	26
3.2. SOUBOR PACIENTŮ A METODY.....	26
3.2.1. SOUBOR PACIENTŮ.....	26
3.2.2. METODY STANOVENÍ.....	26
3.2.2.1. STANOVENÍ PCT.....	26
3.2.2.2. STANOVENÍ CRP.....	27
3.2.2.3. STANOVENÍ Treg.....	27
3.2.2.5. STANOVENÍ sTREM-1.....	27
3.2.2.4. STANOVENÍ EXPRESE TREM-1 NA MONOCYTECH A GRANULOCYTECH.....	28

3.2.2.6. STANOVENÍ FAGOCYTÁRNÍ AKTIVITY GRANULOCYTŮ.....	28
3.2.2.7. STANOVENÍ LEUKOCYTŮ A LYMFOCYTŮ.....	28
3.2.3. STATISTICKÁ ANALÝZA DAT.....	28
3.3. VÝSLEDKY.....	29
3.3.1. SROVNÁNÍ PACIENTŮ PO KARDIOCHIRURGICKÉM ZÁKROKU A KRITICKY NEMOCNÝCH PACIENTŮ.....	29
3.4. DISKUZE.....	31
3.5. ZÁVĚR.....	32
SEZNAM LITERATURY.....	33
PŘÍLOHY.....	42

SEZNAM ZKRATEK

APC	Antigen-Presenting Cell (Antigen prezentující buňka)
ATP	Adenosintrifosfát
BAL	Broncho alveolární laváž
BCR	B-cell receptor (Receptor B lymfocytů pro antigen)
CARS	Compensatory Anti-inflammatori Response Syndrom
CD	Cluster of Differentiation (Označení povrchových markerů buněk)
CLR	C-type Lectin Receptors (C-lektinový receptor)
CRD	Carbohydrate Recognition Domains (Doména rozpoznávající karbohydráty)
CRP	C-reactive protein (C-reaktivní protein)
CTLA4	Cytotoxic-T-lymphocyte antigen (CD152) (Cytotoxický T lymfocytární antigen)
DAMP	Danger-Associated Molecular Pattern (Molekula asociovaná s nebezpečím)
DAP12	DNAX Activation Protein of 12 kDa (DNAX aktivační protein)
DIC	Disseminated Intravascular Coagulation (Diseminovaná intravaskulární koagulopatie)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleová kyselina)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina etylendiaminotetraoctová)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Enzymová imunoanalýza)
G- (G+)	Gram negativní bakterie (Gram pozitivní bakterie)
GITR	Glucocorticoid Induced TNF Related protein (Glukokortikoidem indukovaný TNF receptor)
GM-CSF	Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor (Faktor stimulující kolonie monocytů a granulocytů)
HDL	High Density Lipoprotein (Vysokodenzitní lipoprotein)
HLA	Human Leukocyte Antigen (Hlavní lidský antigen)
HMGB1	Highmobility Group Box 1
HSP	Heat-Shock Protein (Protein teplotního šoku)
ICAM	Intracellular Adhesive Molecule (Mezibuněčná adhezivní molekula)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LBP	Lypopolysacharide Binding Protein (Lipopolysacharid vázající protein)

LDL	Low Density Lipoprotein (Nízkodenzitní lipoprotein)
LPS	Lipopolysacharid
MBL	Mannose binding lectin (Manózu vázající lektin)
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome (Syndrom multiorgánové dysfunkce)
MOF	Multiple Organ Failure (Syndrom multiorgánového selhání)
MPO	Myeloperoxidáza
MyD88	Myeloid differentiation primary-response protein 88
NLR	Nod-like receptor
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
PAF	Platelet Activating Factor (Faktor aktivující trombocyty)
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern (Molekula asociovaná s patogeny)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerázová řetězová reakce)
PG-E2	Prostaglandin E2
PRR	Pattern-Recognition Receptor
RIP2	Receptor-Interacting Protein 2
RLR	Retinoic-acid-inducible gene I-like receptor
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleová kyselina)
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome (Syndrom systémové zánětlivé reakce organismu)
Tc	cytotoxic T cell (Cytotoxický T lymfocyt)
TCR	T-cell receptor (Receptor T lymfocytů pro antigen)
TGFβ	Transforming Growth Factor β (Transformující růstový faktor)
Th	hellper T cell (Pomocný T lymfocyt)
TIR	Toll interleukin-1 receptor
TLR	Toll-like receptor
TLT	Trem-like transcript
TNF	Tumor Necrosis Factor (Faktor nekrotizující nádory)
Treg	T regulační lymfocyt
TREM	Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells
VCAM	Vascular cell adhesion molecule (Cévní adhezivní molekula)

1. ÚVOD

Sepse je velkým medicínským, ale i ekonomickým problémem na celém světě. I přes pokroky v medicíně se mortalita pohybuje mezi 30 až 50%. Incidence v posledních letech stoupá. V Evropě je každým rokem evidováno 135 000 a v USA 215 000 případů těžké sepse. Náklady na léčbu jsou každoročně 7,6 miliard euro v Evropě a v USA to je 17,4 miliard euro. Sepsa je nejčastější příčinou smrti na nekoronárních jednotkách intenzivní péče.¹

Sepsa je stav provázený řadou imunologických poruch na úrovni buněčné i humorální imunity. Selhání regulačních mechanismů vede k nekontrolovatelné zánětlivé odpovědi, která může vést až k multiorgánovému selhání a fatální prognóze nemocného. Dysfunkce imunitní odpovědi se může u kriticky nemocných rozvinout až do obrazu imunoparalýzy, která je popisovaná jako generalizovaná neschopnost vyvolat efektivní imunitní odpověď.²

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. DEFINICE A ROZDĚLENÍ SEPSY

Sepsa je klinický syndrom, který je důsledkem systémové zánětlivé reakce hostitele na infekci. V širším kontextu syndromu sepse rozlišujeme: syndrom systémové zánětlivé reakce (Systemic Inflammatory Response Syndrome - SIRS), sepsi, těžkou sepsi, syndrom multiorgánové dysfunkce (Multiple Organ Dysfunction Syndrome - MODS) a syndrom multiorgánového selhání (Multiple Organ Failure - MOF).

SIRS je zánětlivá reakce bez prokazatelné přítomnosti infekce. Původem zánětlivé reakce mohou být vlivy fyzikální - mechanické, tepelné, radiační; chemické - toxiny anorganického nebo organického původu; vnitřní - tkáňové nekrózy, trombózy nebo ischemie. Diagnóza SIRS je určena na základě přítomnosti nejméně dvou z následujících příznaků: teplota nad 38°C nebo pod 36°C, srdeční frekvence nad 90 tepů/min, tachypnoe s frekvencí nad 20/min nebo PaCO₂ pod 4,3 kPa, leukocytóza nad 12x10⁹/L nebo pod 4x10⁹/L nebo nad 10% nezralých neutrofilů.

Sepsa je podmnožinou SIRS s přítomností infekčního agens. Musí splňovat nejméně dva příznaky SIRS, ale také musí být prokázána invaze patogena.

Těžká sepsa je sepsa provázená orgánovou dysfunkcí, acidosou, oligurií, poruchami koagulace, poruchami vědomí. Těžká sepsa může progradovat do septického šoku, který je

definován jako sepse s hypotenzí pod 90 mmHg nebo pokles tlaku o více než 40 mmHg a to i přes adekvátní objemovou náhradu tekutin.

Syndrom multiorgánové dysfunkce je charakterizován poruchou funkcí orgánů. Orgánovou dysfunkcí může být postižen kterýkoli orgán, nebo orgánový systém. Nejčastěji to je selhání ledvin, jater, plic nebo porucha krevní hemostázy - diseminovaná intravaskulární koagulopatie.

Syndrom multiorgánového selhání je diagnostikován na základě selhání alespoň dvou orgánů. MOF je nejzávažnější klinický stav, u kterého mortalita dosahuje až 64% .^{3,4}

2.2. ETIOLOGIE SEPSE

Sepse může být způsobena velice heterogenní skupinou mikroorganismů – bakteriálními, virovými, parazitárními, mykotickými. Rozvoj sepse je podmíněn dostatečně velkou infekční dávkou nebo dysfunkcí imunitního systému. Před dvaceti lety byly nejčastějšími původci sepse gram-negativní (G-) bakterie, postupně se tento trend změnil. Studie Martina et al. uvádí, že v roce 2000 bylo 52,1% zapříčiněno G+ bakteriemi, 37,6% G- bakteriemi a zbývajících 10,3% sepsí bylo zapříčiněno mykotickými, anaerobními a polymikrobiálními infekcemi.⁵ Z G+ bakterií je nejčastějším původcem *Staphylococcus aureus*, dále pneumokoky a enterokoky. Z G- bakterií to je *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Serratia*. Z mykotických původců je nejčastější *Candida albicans* a z parazitů *Plasmodium malariae*, *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi cruzi*.³

2.3. PATOFYZIOLOGIE SEPSE

2.3.1. RECEPTORY IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Sepse je systémovou reakcí organismu na infekci, při které dochází k dysregulaci vrozené i adaptivní imunity.⁶

Vrozený imunitní systém detekuje infekční agens řadou receptorů - Pattern-Recognition Receptors (PRRs). Mezi PRRs patří: Toll-like receptory (TLRs), Nod-like receptory (NLRs), C-lektinové receptory (CLRs), Retinoic-acid-inducible gene I-like receptory (RLRs).⁷ PRRs rozpoznávají konzervované motivy, které jsou exprimovány mikroorganismy, ale ne vyššími

eukaryoty. Tyto motivy jsou označovány jako Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) mezi které patří: peptidoglykan, lipoproteiny, flagelin, bakteriální DNA a celá řada dalších. PRRs také rozpoznávají endogenní mediátory uvolněné z poškozených buněk při traumatu, ischemii nebo nekroze. Tyto endogenní signály nebezpečí jsou označovány jako alarminy - Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs). Mezi DAMPs patří tkáňové faktory, jejichž produkce je asociována se zánětem a intracelulární molekuly uvolněné z odumřelých buněk. Mezi tyto molekuly patří: prozánětlivé a protizánětlivé cytokiny – interleukin-1 α (IL-1 α), IL-18, interferon- γ (IFN γ), chemokiny, eicosanoidy, heat-shock proteiny (HSPs), komponenty extracelulární matrix (hyaluronan, fibronectin), různé molekuly vázané na povrchu buněk včetně lipidů nekrotických buněk (kardiolipin), oxidované lipidy a endogenní imunostimulátory: surfactant protein, krystaly kyseliny močové, ATP, cytochrom C, high mobility group box 1 (HMGB1) protein.⁸

PRRs jsou exprimovány především na imunokompetentních buňkách, ale také na neimunitních buňkách – buňkách hladkého svalu, epitelálních buňkách a na místech potenciálního vstupu patogenu - kůži, gastrointestinálním traktu, respiračním a urogenitálním traktu.

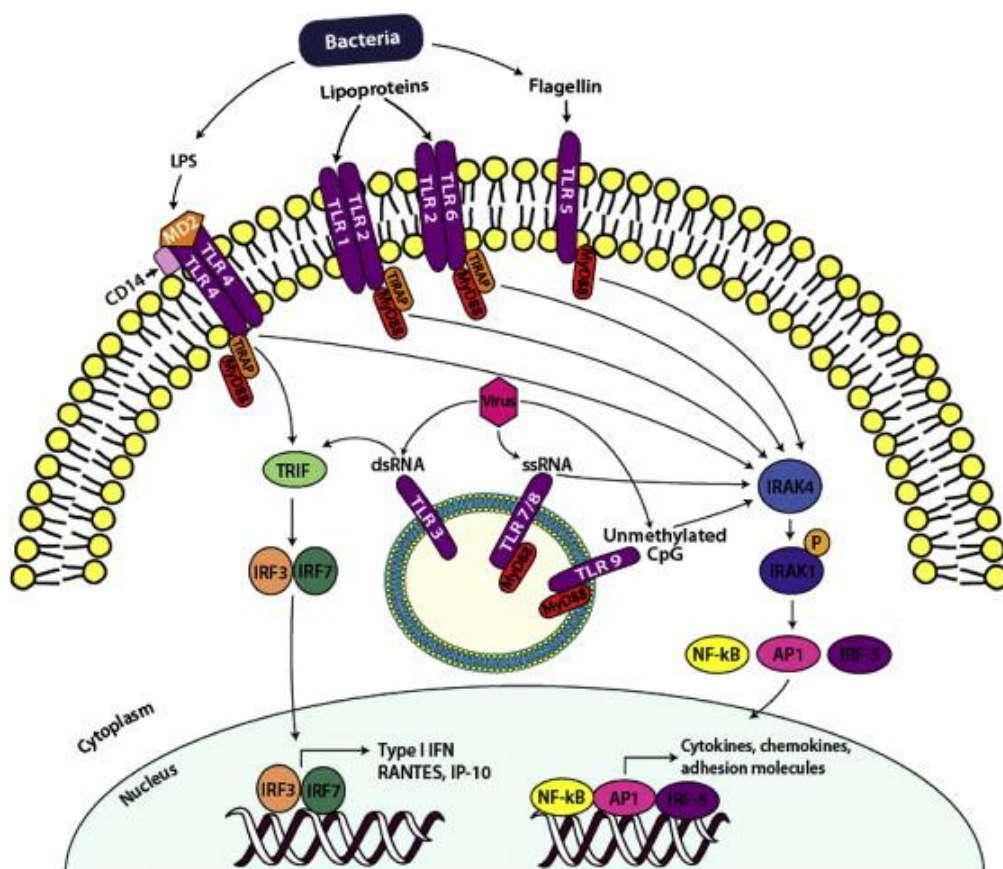
Interakce PAMPs a DAMPs indukuje opsonizaci, endocytózu, aktivaci komplementu a koagulační kaskády, aktivuje signální dráhy zúčastněné v indukci zánětu a apoptózy (produkci IL-1 β , IL-18, kaspázy).^{9,10}

2.3.1.1. TOLL-LIKE RECEPTORY

TLR jsou nejvíce prozkoumanou rodinou PRRs. Poprvé byly detekovány v *Drosophila melanogaster*. U lidí známe 10 členů TLR rodiny. TLR jsou exprimovány řadou imunokompetentních buněk: monocyty, makrofágy, dendritickými buňkami, B lymfocyty, T lymfocyty. Některé z nich jsou exprimovány na buněčném povrchu, kde rozpoznávají lipopolysacharid (LPS), peptidoglykany, flagelin, některé jsou exprimovány intracelulárně, kde rozpoznávají bakteriální a virovou DNA a RNA. Všechny TLR se skládají z: transmembránového proteinu obsahujícího leucinové repetice, extracelulární domény a cytoplasmatické části obsahující Toll interleukin-1 receptor (TIR) signalizační doménu.

Aktivace TLR vede k produkci prozánětlivých cytokinů - TNF- α , IL-6, IL-12 a IFN γ , což vede k modulaci vrozené i adaptivní imunity.^{11,12,13}

Obr. č. 1 Na obrázku jsou znázorněny ligandy jednotlivých TLR a jejich signální dráhy, které vedou k aktivaci transkripčních faktorů a produkci prozánětlivých cytokinů.



Redfern RL, McDermott AM. Toll-like receptors in ocular surface disease. *Experimental Eye Research* 2010; 90: 679-687

2.3.1.2. NOD-LIKE RECEPTORY

NLR rodina je skupinou cytoplazmatických PRR obsahující u lidí 23 členů. Hlavní úlohou NLRs je rozpoznání mikrobiálních PAMPs, které pronikly do cytoplazmy, nebo DAMPs uvolněných z poškozených buněk a zahájení imunologické odpovědi. NLR se skládají ze tří částí: C-terminální domény obsahující leucinové repetice, která rozpoznává mikrobiální struktury; centrální nukleotid-vázající oligomerizační domény a N-terminální efektorové domény, která spouští produkci prozánětlivých cytokinů nebo cysteinových proteáz, které aktivují buněčnou apoptózu.^{14, 15}

Příkladem je skupina NOD receptorů. NOD proteiny jsou cytoplazmatické receptory, které mimo jiné rozpoznávají bakteriální peptidoglykan. Aktivace NOD vede k fosforylaci

receptor-interacting proteinu 2 (RIP 2) a transkripčního faktoru NF- κ B a následně k produkci prozánětlivých cytokinů. NOD1 rozpoznávají G- bakterie a vyskytují se ve všech buňkách. NOD2 rozpoznávají G- i G+ bakterie a vyskytují se v makrofázích, monocytech a dendritických buňkách.¹⁶

2.3.1.3. LEKTINOVÉ RECEPTORY

Lektiny C typu obsahují doménu CRDs (carbohydrate recognition domains), která váže sacharidové struktury. K jejich vazbě je nutná přítomnost Ca²⁺. Ionty vápníku se přímo zapojují do obou vazeb ligandu a udržují strukturální integritu CRD nutnou pro lektinovou aktivitu. Po biochemické stránce C-lektiny obsahují dva antiparalelní β -řetězce a dva α -helixy.^{17, 18}

Příkladem lektinového receptoru je mannose binding lectin (MBL), který se váže svou COOH doménou na sacharidy přítomné na povrchu patogenního organismu jako jsou viry, bakterie nebo houby. Aktivuje komplementový systém (lektinovou cestou, která je obdobná klasické cestě, MBL má podobnou funkci jako C1), nebo působí přímo jako opsonin. Je složen ze tří domén: první doména je bohatá na cystein, která stabilizuje α -helix, druhá doména je podobná kolagenu a třetí doména obsahuje vazebnou oblast COOH.¹⁹

Vrozená genetické predispozice provázená nedostatkem MBL je spojována se zvýšeným rizikem bakteriální sepse.²⁰

2.3.1.4. RLR RECEPTORY

RLR jsou exprimovány v cytoplasmě imunitních i neimunitních buněk. RLR rodina má tři členy, které rozpoznávají virovou RNA. Při rozpoznání virové RNA aktivují signální cestu, která spouští aktivaci NF- κ B a produkci antivirového IFN.^{21, 22}

2.3.2. LOKÁLNÍ ODPOVĚĎ NA INFEKCI

Interakce PAMPs (infekce) nebo DAMPs (trauma) a PRR vede k aktivaci nespecifických složek imunity. Cílem této odpovědi je lokalizovat a regulovat přítomný zánět a poté poškozené tkáně reparovat.²³

Klíčovou úlohu v zánětlivých mechanismech hraje endotel, leukocyty, trombocyty, komplement a plazmatický koagulační systém.²⁴

Aktivací PRRs na leukocytech, především mononukleárních fagocytech, dochází k produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů, které aktivují endotelie a zprostředkovávají chemotaxi neutrofilů. Cytokiny se dostávají do celého krevního oběhu a v játrech stimulují produkci proteinů akutní fáze. Endotel exprimuje řadu adhezivních molekul, např. ICAM-1, což umožní uchycení leukocytů a jejich přestupu do tkání, monocyty využívají adhezivní molekulu VCAM-1. Aktivované endoteliální buňky uvolňují vazodilatační oxid dusnatý nebo endothelin 1 způsobující vazokonstrikci.^{25, 26, 27}

Proteiny akutní fáze, mezi které patří C-reaktivní protein (CRP), sérový amyloid P, lipopolysacharide binding protein (LBP), komplementové složky C3 a C4, se účastní opsonizace a aktivace komplementu klasickou cestou.^{28, 29, 30}

Důležitou roli ve zprostředkování imunitní odpovědi hraje komplement. Komplement je soustava 40 proteinů, které mezi sebou kooperují. Komplement se aktivuje dvěma cestami: klasickou a alternativní. Klasická cesta je zahájena vazbou komplexu antigen-protilátka na C1 složku komplementu. Kaskádovitým štěpením jednotlivých složek komplementu vznikají meziproducty, které se účastní opsonizace a chemotaxe. Terminálním produktem celé reakce je komplex proteinů označovaný jako *membrane attack complex*, který perforuje membránu některých mikroorganismů a tím je zabíjí. Alternativní cesta komplementu je zahájena vazbou C3b složky komplementu na bakteriální povrch za účasti dalších faktorů a dále pokračuje jako klasická cesta.³¹

Při déletrvajícím zánětu se aktivují specifické složky imunity. Antigen prezentující buňky s navázanými mikrobiálními antigeny migrují do mizních uzlin, kde stimulují aktivaci a terminální diferenciaci T a B lymfocytů. B lymfocyty se diferencují na plasmatické buňky a produkují protilátky. Důležitou složkou buněčné imunity představuje T lymfocytární systém. V rámci tohoto systému rozeznáváme cytotoxické T lymfocyty (Tc CD8+), které rozpoznávají abnormální buňky a ničí je cytotoxickými produkty. Pomocné T lymfocyty (Th CD4+) lze rozdělit podle produkce cytokinů na Th1 a Th2. Z naivních T lymfocytů (Th-0) se

podle efektivity lokální obranné reakce vyvíjí buď subpopulace Th-1 produkující prozánětlivé cytokiny, anebo Th-2 lymfocyty produkující protizánětlivé cytokiny. Ve skutečnosti se v místě zánětu diferencují oba dva typy, ale podle převažujícího typu okolních buněk jeden typ převažuje. Th1 se vyvíjí za přítomnosti makrofágů nebo NK buněk, které produkují IL-12. IL-12 je diferenciačním faktorem pro Th1 lymfocyty. Th2 se vyvíjí za přítomnosti bazofilů a žírných buněk, které produkují IL-4, který je diferenciačním faktorem pro Th2 lymfocyty. Th1 migrují cévami do místa zánětu, kde produkují cytokiny (IL-2, INF γ), které stimulují makrofágy a zvyšují jejich fagocytární a cytotoxickou aktivitu. Základní funkcí Th2 lymfocytů je kooperace s B lymfocyty a to prostřednictvím sekrece cytokinů (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) a mezibuněčným kontaktem zprostředkovaným CD40L na Th2 a CD40 na B lymfocytech.

Kontrola zánětlivé odpovědi na lokální úrovni je zajištěna několika způsoby. Produkci protizánětlivých cytokinů (IL-10), receptorových antagonistů prozánětlivých cytokinů (IL-1Ra), případně regulačních molekul typu HSP a PG-E2 (prostaglandin E2), které buď prozánětlivé cytokiny neutralizují, nebo inhibují jejich produkci. Důležitou součástí regulačních mechanismů je také apoptóza aktivovaných lymfocytů a polymorfonukleárů.^{32, 33, 34, 35, 36}

2.3.3. SYSTÉMOVÁ ODPOVĚĎ NA INFEKCI

K systémové zánětlivé odpovědi dochází při masivním průniku mikroorganismů do krevního řečiště, nebo při masivním uvolnění antigenních látek neinfekčního charakteru a to po rozsáhlých traumatech, operacích nebo popáleninách. Systémová aktivace imunitního systému může být vyvolána endotoxiny nebo superantigeny.³⁷

Příkladem endotoxinu je LPS, který je hlavní komponentou G- bakterií. Jednou z důležitých molekul, které se účastní přenosu signálu, je molekula CD14. CD14 se vyskytuje ve dvou formách solubilní (sCD14) a membránová (mCD14). mCD14 je povrchovým receptorem myeloidních buněk. K membráně je připevněna glycosylphosphatidylinositolovou kotvou bez intracelulárního signalizačního motivu. K přenosu signálu tedy vyžaduje další receptor, kterým je TLR4. sCD14 váže LPS v komplexu s LBP a přenáší ho na TLR4. Vazbou na TLR dochází k aktivaci NF- κ B a produkci prozánětlivých cytokinů.³⁸ Vysoká koncentrace LBP

snižuje buněčnou aktivaci transportem LPS do HDL nebo LDL a tím dochází ke snížení produkce prozánětlivých cytokinů.³⁹

Superantigeny jsou proteiny, které mají dvě vazebná místa, jedním interagují s epitopem přítomným na všech HLA II a druhým se strukturami sdílenými mnoha různými molekulami TCR nebo BCR. Superantigen pak může propojit HLA II na povrchu antigen prezentujících buněk s TCR nebo BCR přítomných na velkém množství lymfocytů. Superantigenem může být např. toxin *Staphylococcus aureus* nebo *Streptococcus pyogenes*.⁴⁰

U systémové zánětlivé odpovědi dochází k dysregulaci prozánětlivých a protizánětlivých mechanismů, hyperaktivaci komplementového systému, masivnímu uvolnění cytokinů a aktivaci neuroendokrinního systému a dalších mediátorů, které vedou k masivní vazodilataci, hypertenzi až oběhovému selhání.^{41, 42, 43} Systémovou odpověď ovlivňují mimo jiné genetické predispozice - genetické polymorfismy.⁴⁴

Akutní systémová zánětlivá odpověď je provázena rozvojem diseminované intravaskulární koagulopatie (DIC). U DIC dochází k deregulaci koagulačních a antikoagulačních mechanismů hemostázy. Velké množství prozánětlivých cytokinů aktivuje endoteliální buňky, které mimo jiné uvolňují velké množství tkáňového faktoru. Tkáňový faktor je klíčový pro aktivaci koagulační kaskády zevní cestou, tedy přes aktivaci F VII. Dochází k nadměrné aktivaci hemostatického systému a vzniku mikrotrombů, které vedou k poškození orgánů. Následkem této přehnané koagulace je vyčerpání koagulačních faktorů a masivní krvácení.^{45, 46}

Kromě změn v cytokinových profilech je akutní fáze infekce doprovázena masivní produkcí stresových hormonů jako je kortisol, katecholaminy, vasopresin, insulin a glukagon. Tyto hormony podporují dodávku kyslíku do tkání a produkci proteinů akutní fáze.

Hyperzánětlivý stav je vystřídán protizánětlivou fází nazývanou CARS (Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrom) a může se rozvinout až do obrazu imunoparalýzy. Dochází k produkci protizánětlivých cytokinů, solubilního receptoru pro TNF α a IL-1Ra. Aktivuje se apoptóza cirkulujících B a T lymfocytů, neutrofilů, monocytů. Snižuje se exprese HLA znaků II. třídy na antigen prezentující buňkách, v klinické praxi se sleduje především snížení HLA-DR na monocytech.^{47, 48, 49}

Tabulka č. 1 Hlavní účinky prozánětlivých cytokinů

Cytokin	Účinek cytokinu
TNF α	Indukuje lokální zánět a aktivuje endotelie
INF γ	Aktivuje makrofágy
IL-1 β	Kostimuluje lymfocyty, indukuje produkci TNF a IL-8, pyrogen
IL-6	Stimuluje lymfocyty, stimuluje sekreci Ig, indukuje syntézu proteinů akutní fáze
IL-8	Chemotaxe a aktivace granulocytů
IL-12	Stimuluje vývoj Th1 a NK
IL-18	Indukuje produkci INF γ

Tabulka č. 2 Hlavní účinky protizánětlivých cytokinů

Cytokin	Účinek cytokinu
IL-1Ra	Antagonistické účinky jako IL-1
IL-4	Stimuluje B lymfocyty, stimuluje vývoj Th2, indukuje izotypový přesmyk na IgE a IgG4, inhibuje Th1 a makrofágy
IL-10	Inhibuje Th1 a makrofágy, indukuje diferenciaci plazmocytů
TGF β	Inhibuje imunitní reakce, indukuje izotypový přesmyk na IgA

2.3.4. DIAGNOSTIKA SEPSE

Sepse je syndrom, který je definován přítomností dvou a více kritérií SIRS s prokázanou infekcí. Základem pro diagnózu je klinický obraz typický pro SIRS. Tato kritéria jsou ale často nedostatečná, proto se využívají další parametry: biochemické, imunologické, hematologické a mikrobiologické.

Z biochemických parametrů to jsou především proteiny akutní fáze jako je CRP a sérový amyloid P. K hematologickým parametrům patří diferenciální krevní obraz, laboratorní známky DIC (trombocytopenie, snížení antitrombinu III atd). Nejdůležitější je přímý mikrobiologický průkaz infekčního agens v biologickém materiálu a stanovení citlivosti na antibiotika. V poslední době se zde významným způsobem uplatňuje diagnostika pomocí PCR

(polymerázová řetězová reakce). K imunologickým parametrům patří prokalcitonin (PCT), koncentrace imunoglobulinů, C3 a C4 složky komplementu, exprese HLA-DR na monocitech, stanovení cytokinů - IL-6, IL-8, TNF α .^{50, 51, 52}

2.3.5. BIOMARKERY SEPSE

2.3.5.1. PCT

Prokalcitonin je bílkovina složená z 116 aminokyselin o molekulové hmotnosti 13 kDa. Syntetizuje se jako pro-prokalcitonin složený ze 141 aminokyselin. Po odštěpení signálního peptidu (25 aminokyselin) vzniká prokalcitonin. Fyziologicky je produkován C buňkami štítné žlázy jako prekurzor hormonu kalcitoninu. Při generalizovaných bakteriálních infekcích PCT produkují i další buňky, především monocyty, makrofágy a neuroendokrinní buňky. Přesný fyziologický význam prokalcitoninu není zcela objasněn. Jedna z hypotéz je, že se účastní regulace kalciumfosfátového metabolismu při sepsi. Fyziologické a patologické hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 3.

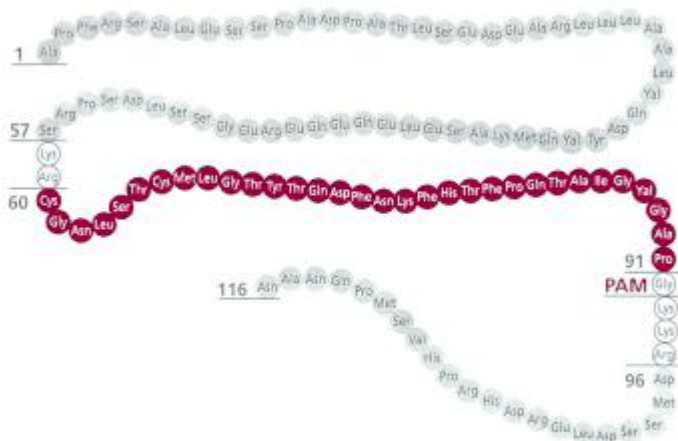
Biologický poločas PCT je 24 hodin. Jeho hladina v séru se zvyšuje po šesti hodinách od poškození tkání a dosahuje maxima za 12- 48 hodin. Po úspěšné antibiotické léčbě se jeho koncentrace rychle snižuje. Ostatní reaktanty akutní fáze jako je CRP, sérový amyloid A, alfa-1 antitrypsin, fibrinogen atd. se zvyšují do 24 hodin a dosahují maxima za 72-94 hodin, jsou sice citlivé, ale nespecifické z hlediska diagnostiky bakteriální infekce. Např. CRP se zvyšuje nejen při bakteriálních, ale i při virových infekcích, po operacích, při infarktu myokardu, autoimunitních onemocněních a dalších stavech.^{53, 54, 55, 56, 57}

Tabulka č. 3 Fyziologické a patologické hodnoty PCT

Diagnóza	PCT (ng/ml)
normální hodnoty	< 0,5
chronické zánětlivé procesy	< 0.5-1
virová nebo lokalizovaná bakteriální infekce	< 0.5-2
bakteriální infekce komplikovaná systémovou reakcí	2-10
SIRS (mnohočetná poranění, popáleniny)	5-20
těžké bakteriální infekce, sepse, MODS	10-1000

Obr. č. 2 Struktura prokalcitoninu

1-57 N-ProCT, 60-91 Calcitonin, 96-116 Katalcalcin



Maruna P, Gurlich R. Zánětový prokalcitonin - prohormon s potenciální analgetickou aktivitou. *Bolest* 2003; 6: 80-85

2.3.5.2. CRP

Syntéza CRP probíhá v hepatocytech a je indukována cytokiny (především IL-6 a IL-1), které jsou produkovány makrofágy při zánětlivé reakci. Během akutní fáze imunitní odpovědi může syntéza CRP v játrech tvořit až 20 % celkové proteosyntetické kapacity hepatocytů. Normální syntetická rychlost je 1 - 10 mg/den, během akutního zánětu se zvyšuje na více než 1 g/den (20-50 mg/L). Fyziologické a patologické hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 4. Exprese CRP je regulována na transkripční úrovni. Gen kódující CRP se nachází na 1. chromozomu v oblasti 1q21-q23. Regulační úlohu mají i posttranskripční mechanismy, při zánětu se zkracuje doba přítomnosti CRP v endoplazmatickém retikulu z 18 hodin na 70 minut. Zajímavé je, že CRP není proteinem akutní fáze u myši. Nicméně transgenní myši se zvýšeným králičím CRP jsou chráněny před endotoxickým šokem.

CRP patří do rodiny pentraxinů. Pentraxiny se vyskytují od bezobratlých až po obratlovce, jeho cyklická pentamerová struktura odolává teplu a proteázám. Jde o homopentamer, který se v elektroforéze nalézá v beta2-frazi. Molekulová hmotnost CRP je asi 120 kDa.

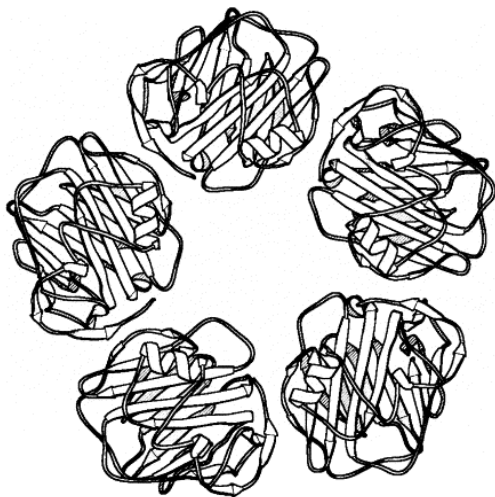
CRP váže v přítomnosti vápenatých iontů řadu endogenních i exogenních ligandů. Z endogenních to jsou součásti poškozených a apoptotických buněk: chromatin, histony, fibronectin, laminin, dále modifikované fosfolipidy a oxidované lipoproteiny. Z exogenních

ligandů to jsou glykany, fosfolipidy a další součásti mikroorganismů. CRP se váže na receptory fagocytů (vysoko- i nízkoafinitní); samotný CRP přítomný na membráně fagocytujících buněk pak váže své ligandy a umožní tak jejich fagocytózu. Aktivuje komplement přes C1q složku (tedy klasickou cestou). V místě zánětu je štěpen proteázami neutrofilů, vzniklé fragmenty aktivují makrofágy a inhibují neutrofilů. Komplexy CRP-ligand jsou z cirkulace vycitány makrofágy, způsobuje tedy jejich opsonizaci. ^{58, 59, 60, 61}

Tabulka č. 4 Fyziologické a patologické hodnoty CRP

Diagnóza	CRP (mg/l)
normální hodnoty	< 5
Virové infekce	6-40
bakteriální infekce	40-300

Obr. č. 3 Struktura CRP



Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Molecular Immunology* 2001; 38: 189-197

2.3.5.3. TREM-1

Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells (TREM) je v evoluci vysoce konzervovaný, vyskytuje se nejen u myši a lidí, ale i u drůbeží, prasat a skotu. S výjimkou trem-like transcript-1 (TLT-1), exprese všech členů TREM rodiny byla detekována na všech makrofágových buňkách. Exprese TREM rodiny není omezena na myeloidní buňky, jaterní a endoteliální buňky také konstitutivně exprimují TREM. Zatímco lymfatické uzliny, peritoneální a alveolární makrofágy exprimují TREM-1, střevní makrofágy ho neexprimují ani po stimulaci TNF.^{62, 63}

Exprese TREM-1 na neutrofilních granulocytech, monocytech, makrofázích je amplifikátorem bakteriálního zánětu a jedním z důležitých mediátorů septického šoku. TREM-2 je exprimovaný na nezralých dendritických buňkách, kde stimuluje produkci oxidu dusnatého a reguluje vývoj a funkci dendritických buněk. Také je přítomen na mikroglíích a osteoklastech. Nedostatečná exprese TREM-2 je spojena s onemocněním Nasu-Hakola, kdy dochází k demenci a tvorbě cyst v kostech. TREM-1 je důležitý článek mezi přirozenou a získanou imunitou. Navázání ligandu na TREM-1 spouští diferenciaci primárních monocytů do nezralých dendritických buněk, stimuluje produkci TNF a granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF). TREM-1 také zvyšuje expresi molekul prezentujících antigen jako je CD86 a HLA II. Dendritické buňky vzniklé díky TREM-1 více prezentují antigen na naivních T lymfocytech a stimuluje produkci IFN γ produkovaného Th1 lymfocyty.^{64, 65}

Ačkoli ještě nebyl identifikován žádný specifický ligand, nepřímé důkazy ukazují na PRR, proteiny, nebo jiné bakteriální produkty. TREM-1 tak možná spolupracuje s TLR v rámci odpovědi na bakteriální infekci. TREM-1 po stimulaci LPS aktivuje neutrofilů a monocytů a indukuje sekreci zánětlivých cytokinů, adhezivních molekul, myeloperoxidázy a monocytární chemottractant protein (MCP-1).

TREM-1 a TREM-2 geny jsou přítomné na lidském chromosomu 6p21 a myším chromosomu 17C3. Navíc jsou zde homologické geny TREM1 jako trem-like transcript-1 (TLT) a TLT-2, který jako TREM1 a TREM2 kóduje jednoduchou variabilní imunoglobulinovou doménu. U myši je přítomný i TREM-3, který se u lidí vyskytuje jako pseudogen.

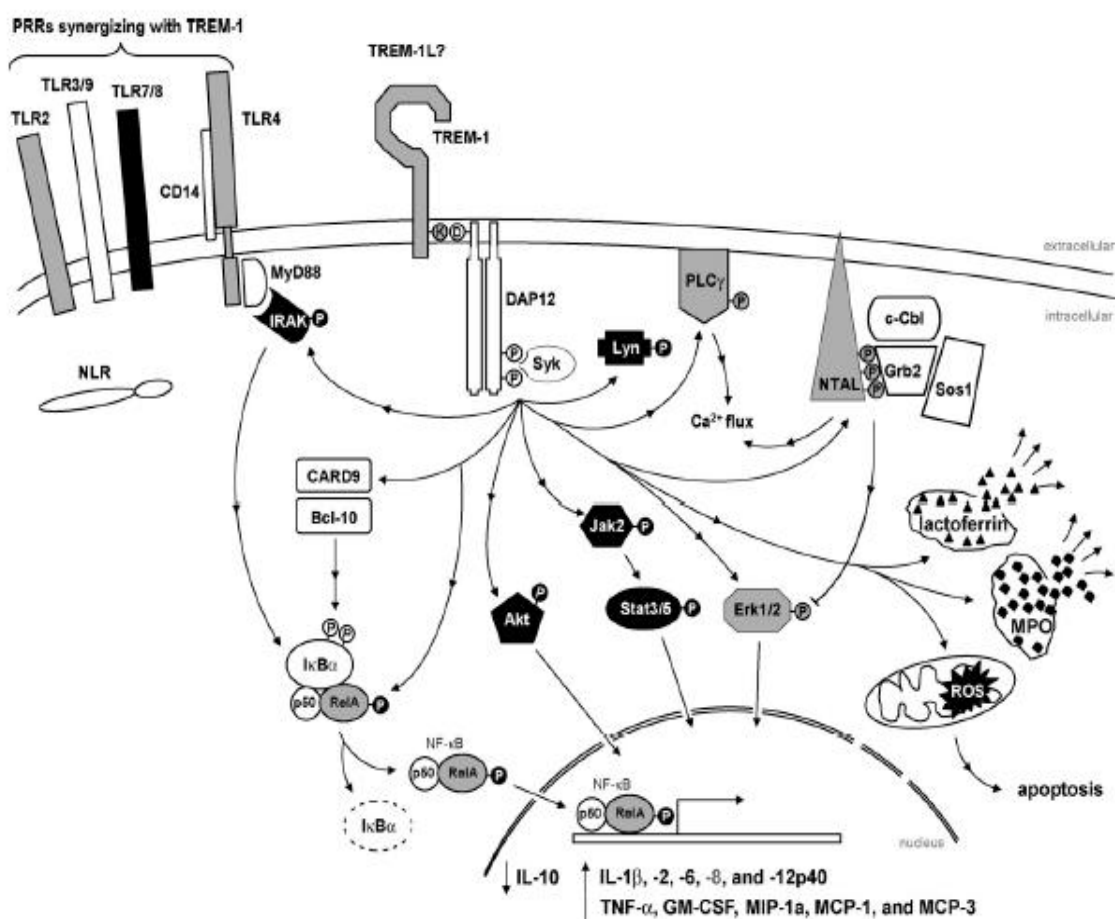
TREM-1 je upregulovaný u pacientů s mikrobiální sepsí a u myši, u kterých byla sepse indukována LPS.^{66, 67}

Lidský TREM-1 se skládá z extracelulární části s imunoglobulinovou doménou 194 AMK zbytků, transmembránové domény 29 AMK a cytoplazmatické části bez signalizačního

motivu. Transmembránová část obsahuje jednoduchý lysinový zbytek, který je zodpovědný za asociaci TREM s DAP12. Homodimer DAP12 obsahuje ITAM v cytoplasmatické doméně a asociuje s TREM-1 přes utváření můstku s asparaginovým zbytkem v transmembránové části DAP12.⁷⁰ Prokřížení TREM-1 v primárních lidských monocyttech směřuje k tyrozinové fosforylaci proteinů včetně DAP12, fosfolipázy C γ a ERK 1/2. Provázení TREM-1 často indukuje produkci prozánětlivých cytokinů jako je IL-8, myeloperoxidáza (MPO) v neutrofilech a v monocyttech IL-8, MCP-1, TNF α ..^{68, 69}

Obr. č. 4 TREM-1/DAP12 signalizace na myeloidních buňkách

Signalizační proteiny, které se účastní signalizace TREM-1 v monocyttech jsou bílé, v neutrofilech černě a které jsou společné pro monocyty i neutrofile jsou šedě



Tessarz AS, Cerwenka A. The TREM-1/DAP12 pathway. *Immunology Letters* 2008; 116: 111–116

2.3.5.4. sTREM-1

Solubilní formy TREM rodiny mají tři členy: TREM-1, TREM-2 a TLT-1. sTREM byl detekován v tělních tekutinách u pacientů a myši s infekcemi a koncentrace často korelovala se závažností infekce. Některé studie naznačují, že sTREM pochází z alternativního splicingu mRNA a jiné studie uvádí, že jde o odštěpení extracelulární domény z buněčného povrchu.⁷⁰

2.3.5.5. T REGULAČNÍ LYMFOCYTY

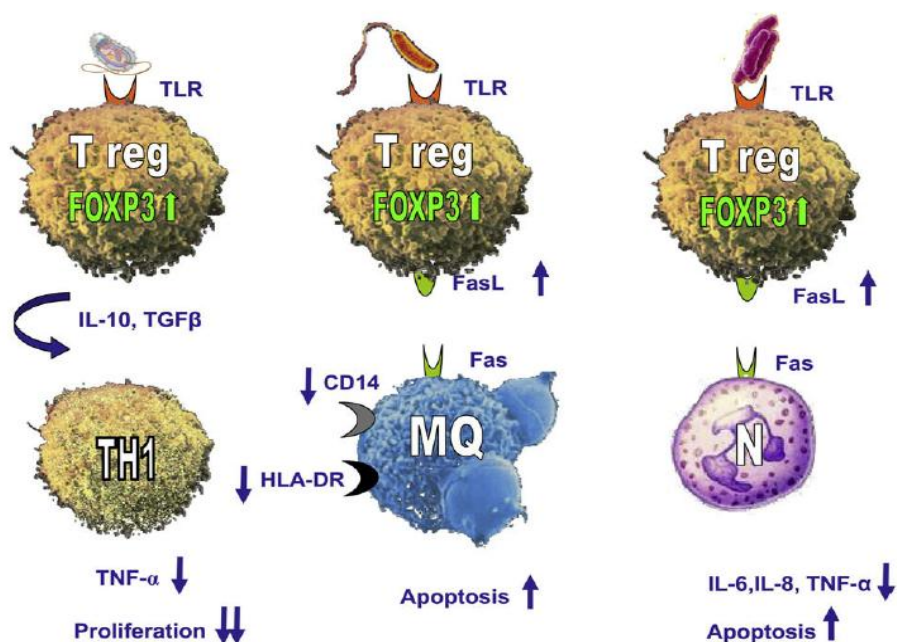
V roce 1995 Sakaguchi et al. poprvé popsal na experimentálním modelu CD4⁺ CD25⁺ T lymfocyty a jejich úlohu v prevenci autoimunitních chorob. U lidí představují CD4⁺ T regulační lymfocyty (Treg) 5-10% v periferním oběhu, ale v lymfatických tkáních a kostní dřeni jsou poměrně vzácné. Obvykle jsou 2 typy Treg v periferní krvi. První vznikají v thymu a jsou charakterizovány expresí CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺. Označujeme je jako *přirozené*. Druhou skupinou jsou Treg vznikající aktivací a diferenciací ze zralých CD4⁺ CD25⁻ v periférii, jsou *adaptivní* neboli *indukované*.^{71,72}

CD4⁺CD25⁺ hrají důležitou úlohu v udržování imunologické tolerance k vlastním i cizím antigenům a potlačují autoagresivní odpověď T lymfocytů. Treg v místě zánětu modulují imunitní odpověď třemi mechanismy: 1) přímým cytotoxickým zabíjením, 2) inhibují cytokiny produkované cytotoxickými buňkami (IL-2, TNF) 3) přímou sekrecí imunomodulačních cytokinů TGF β a IL-10.⁷³

Treg nejlépe rozpoznáme podle přítomnosti transkripčního faktoru FoxP3. Mutace v genu pro FoxP3 vedou k lymfoproliferativním onemocněním. Treg mají konstitutivně vysokou povrchovou expresi IL-2Ra řetězce (CD25), dalším povrchovým markerem je CTLA-4 (CD152) a glukokortikoidem indukovaný TNF receptor (GITR).⁷⁴

Monneret et al. jako první poukázal na to, že Treg jsou v krvi během sepse zvýšeny. Tyto Treg jsou CD45RO⁺ a CD69⁻ což naznačuje, že nebyly během sepse aktivovány, ale že jde zřejmě o přirozené Treg. Zvýšená hladina Treg u septických pacientů je spojena se špatnou prognózou. Tamms et al. uvedl, že monocyty inkubované s Treg mají menší schopnost antigenní prezentace a menší produkci prozánětlivých cytokinů na odpověď LPS. Treg inhibují monocyty pomocí FasL.⁷⁵

Obr. č. 5 Interakce mezi Treg a efektorovými buňkami sepse



Kessel A, Bamberger E, Masalha M, Toubi E. The role of T regulatory cells in human sepsis. *Journal of Autoimmunity* 2009; 32; 211–215

TLR jsou také exprimované na Treg, které potlačují buněčnou imunitní odpověď a snižují tak hyperaktivitu TLR u sepse a autoimunitních chorob. Supresivní funkce Treg může být zesílena, nebo naopak potlačena v závislosti na stimulaci TLR. Jakákoli přímá aktivace TLR na Treg blokuje funkci Treg a vede k amplifikaci zánětlivé odpovědi a tím se maximalizuje bojová funkce proti patogenu a minimalizuje se poškození organismu. MyD88^{-/-} Treg mají nižší supresorovou funkci než wild typ Treg (přirozené). Funkci Treg stimuluje aktivace TLR2, 4, 5, které rozpoznávají bakterie, naopak funkci Treg inhibují intracelulární TLR7, 8, 9, které rozpoznávají nukleové kyseliny. FoxP3 je transkripční faktor, který je důležitý pro diferenciaci a aktivaci Treg.⁷⁶

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. CÍL PRÁCE

Cílem práce je srovnání parametrů PCT, CRP, Treg, exprese TREM-1 na monocytech, exprese TREM-1 na granulocytech, sTREM-1, fagocytární aktivity granulocytů, leukocytů a lymfocytů u pacientů po kardiochirurgickém zákroku a u pacientů se sepsí. Po kardiochirurgických operacích dochází k nespecifické aktivaci imunitních mechanismů, a proto je u těchto pacientů důležitá diferenciální diagnostika infekční a neinfekční etiologie systémové zánětlivé odpovědi.

3.2. SOUBOR PACIENTŮ A METODY

3.2.1. SOUBOR PACIENTŮ

Bylo vyšetřeno 24 pacientů, kteří splňovali kritéria konsenzuální konference pro diagnózu sepse. Jako kontrolní skupina bylo vyšetřeno 8 pacientů po kardiochirurgické operaci. U žádného z pacientů po kardiochirurgickém zákroku nebyly zjištěny klinické, laboratorní ani mikrobiologické známky infekce. U obou skupin byly vyšetřeny následující parametry: PCT, CRP, Treg, sTREM-1, exprese TREM-1 na monocytech, exprese TREM-1 na granulocytech, fagocytární aktivita granulocytů, leukocyty a lymfocyty. Odběry byly provedeny u septických pacientů do 24 hodin splnění kritérií sepse, u kontrolní skupiny kardiochirurgických pacientů byly odběry provedeny 1. 3. a 5. den po kardiochirurgickém zákroku.

3.2.2. METODY STANOVENÍ

3.2.2.1. STANOVENÍ PCT

K tomuto vyšetření byla krev odebrána do vakutainerové zkumavky s přísadou citrátu sodného, která byla zpracována do čtyř hodin po odběru. Ke stanovení prokalcitoninu byl použit imunoanalyzátor Kryptor Compact (B.R.A.H.M.S). Principem kvantitativního stanovení prokalcitoninu je imunofluorescenční analýza na principu TRACE (přenos

neradioaktivní energie z donoru na akceptor). Vzorek je vybuzen dusíkovým laserem při 337 nm, donor emituje fluorescenční signál s dlouhou životností v řádu milisekund při 620 nm, zatímco akceptor generuje krátkodobý signál. Jsou-li obě složky vázány v imunokomplexu, dojde k zesílení signálu akceptoru při 650 nm a k prodloužení doby jeho trvání, takže může být měřen v mikro-sekundách. Tento dlouhodobý signál je úměrný koncentraci měřeného PCT.

3.2.2.2. STANOVENÍ CRP

Odebraná krev byla zpracována do čtyř hodin po odběru. Hladina C-reaktivního proteinu byla stanovena na automatickém biochemickém analyzátoru LX20 nebo CX7 (Beckman Coulter). Analyzátor pracuje na principu imunoturbidimetrie. C-reaktivní protein reaguje se specifickou protilátkou za vzniku imunokomplexů. Intenzita zákalu se hodnotí měřením absorbance při 340 nm. Polyethylenglykol přítomný v reagenzii urychluje a zvyšuje tvorbu imunokomplexů.

3.2.2.3. STANOVENÍ Treg

Pro stanovení byla použita plná krev s heparinem jako protisrážlivým činidlem a zpracována do čtyř hodin po odběru. Ke stanovení Treg byla použita komerční souprava HU FOXP3 Staining Kit PE (BD Pharmingen) Test je založen na povrchovém značení CD4⁺ a CD25⁺ buněk fluorescenčně značenou monoklonální protilátkou a následném intracelulárním značení FoxP3. Ke stanovení CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ buněk byl použitý průtokový cytometr FACSCalibur (Becton Dickinson). Cytometr analyzuje buňky unášené proudem nosné kapaliny přes fixní argonový paprsek, měří rozptyl světla buňkou a emisi fluorescence. Data jsou přenesena do počítače a vyhodnocena.

3.2.2.4. STANOVENÍ sTREM-1

K tomuto vyšetření byla krev odebrána do vakutainerové zkumavky s přísadou citrátu sodného. Ke stanovení sTREM-1 byla použita komerční souprava ELISA (IQ Products bright fluorescence). Test je založen na principu sandwichové ELISA testu. Monoklonální protilátka imobilizovaná v mikrotitrační destičce se váže na sTREM-1. Po inkubaci vzorku se přidá sekundární biotinylovaná protilátka a poté streptavidin-HRP. Po přidání substrátu tetrametylbenzidiantu pro enzym HRP může být sTREM-1 kvantifikován. Ke kvantifikaci byl použitý MRX ELISA Plate Reader.

3.2.2.5. STANOVENÍ EXPRESE TREM-1 NA MONOCYTECH A GRANULOCYTECH

Pro stanovení byla použita plná krev s heparinem jako protisrážlivým činidlem a zpracována do čtyř hodin po odběru. Ke stanovení exprese TREM-1 na monocytech a granulocytech byla použita komerční souprava TREM-1 PE (R&D Systems). Test je založen na povrchovém značení buněk fluorescenčně značenou monoklonální protilátkou. Stanovení bylo provedeno na průtokovém cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson).

3.2.2.6. STANOVENÍ FAGOCYTÁRNÍ AKTIVITY GRANULOCYTŮ

Pro stanovení byla použita plná krev s heparinem jako protisrážlivým činidlem a zpracována do čtyř hodin po odběru. Ke stanovení fagocytární aktivity granulocytů byla použita komerční souprava FagoFlow™ (EXBIO Diagnostics). Test je založen měření respiračního vzplanutí granulocytů po jejich stimulaci inaktivovanými bakteriemi *E. coli*. Po ingesci bakterií je ve fagocytech aktivována NADP-oxidáza, která spustí oxidační vzplanutí. Vznikající reaktivní meziprodukty uvnitř fagocytů oxidují dihydrorhodamin 123 na fluorescenční produkt rhodamin 123, který je detekován průtokovým cytometrem FACSCalibur (Becton Dickinson).

3.2.2.7. STANOVENÍ LEUKOCYTŮ A LYMFOCYTŮ

K vyšetření byla použita plná krev s kyselinou etylendiaminotetraoctovou (EDTA) jako protisrážlivým činidlem. Stanovení leukocytů a lymfocytů bylo provedeno na analyzátoru ADVIA 2120 (BAYER). Metoda je založena na barvení peroxidázou, měření intenzity rozptýleného světla, velikosti buněk a měření rozptýlení laserového paprsku-denzita a lobularita jádra a porovnání obou měření.

3.2.3. STATISTICKÁ ANALÝZA DAT

K popisné statistice a analýze dat byl použit statistický program STATA 9.1. Normalita distribuce hodnot byla testována SK testem (Skewness and kurtosis test), pro testování rozdílů mezi skupinami byl použit Kruskalův-Wallisův neparametrický test (Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test), vzájemné závislosti byly testovány Spearmanovou pořadovou korelací (Spearman's rank correlation) a logistickou regresí.

3.3. VÝSLEDKY

3.3.1. SROVNÁNÍ PACIENTŮ PO KARDIOCHIRURGICKÉM ZÁKROKU A PACIENTŮ SE SEPSÍ

Zjistili jsme statisticky významný rozdíl prokalcitoninu mezi oběma skupinami $p = 0,01$. Zvýšené hodnoty PCT jsme zjistili u obou skupin. V kontrolní skupině pacientů po kardiokirurgickém zákroku (medián 0,9 ng/ml, 25. percentil 0,7 ng/ml, 75. percentil 2,73 ng/ml), ve skupině pacientů se sepsí byla koncentrace PCT vyšší (medián 3,83 ng/ml, 25. percentil 1 ng/ml, 75. percentil 12,3 ng/ml) Graf č. 1.

Nezjistili jsme statisticky významný rozdíl CRP mezi kontrolní skupinou a pacienty se sepsí ($p = 0,84$) Graf č. 2.

Nezjistili jsme statisticky významný rozdíl FoxP3+ T regulačních lymfocytů mezi kontrolní skupinou a pacientů se sepsí ($p = 0,07$) Graf č. 3.

Nezjistili jsme statisticky významný rozdíl exprese sTREM mezi kontrolní skupinou a pacienty se sepsí ($p = 0,86$) Graf č. 4.

Zjistili jsme statisticky významný rozdíl exprese TREM-1 na monocytech mezi oběma skupinami $p = 0,002$. Zvýšené hodnoty exprese TREM-1 jsme zjistili u obou skupin. V kontrolní skupině pacientů po kardiokirurgickém zákroku (medián 50 MFI, 25. percentil 27 MFI, 75. percentil 75 MFI), ve skupině pacientů se sepsí byla exprese TREM-1 na monocytech nižší (medián 22 MFI, 25. percentil 13 MFI, 75. percentil 37 MFI) Graf č. 5.

Zjistili jsme statisticky významný rozdíl exprese TREM-1 na granulocytech mezi oběma skupinami $p = 0,0001$. Zvýšené hodnoty exprese TREM-1 jsme zjistili u obou skupin. V kontrolní skupině pacientů po kardiokirurgickém zákroku (medián 224 MFI, 25. percentil 159 MFI, 75. percentil 297 MFI), ve skupině pacientů se sepsí byla exprese TREM-1 na granulocytech nižší (medián 107 MFI, 25. percentil 76 MFI, 75. percentil 182 MFI) Graf č. 6.

Nezjistili jsme statisticky významný rozdíl fagocytární aktivity granulocytů mezi kontrolní skupinou a pacienty se sepsí ($p = 0,07$) Graf č. 7 .

Zjistili jsme statisticky významný rozdíl leukocytů mezi oběma skupinami $p = 0,04$. Zvýšené hodnoty leukocytů jsme zjistili u obou skupin. V kontrolní skupině pacientů po kardiokirurgickém zákroku (medián $9,3 \times 10^9/L$, 25. percentil $7,4 \times 10^9/L$, 75. percentil

12,2x10⁹/L), ve skupině pacientů se sepsí byly leukocyty vyšší (medián 11,9x10⁹/L, 25. percentil 9,2x10⁹/L, 75. percentil 15,9x10⁹/L) Graf č. 8.

Zjistili jsme statisticky významný rozdíl lymfocytů mezi oběma skupinami $p = 0,0001$. Snížené hodnoty lymfocytů jsme zjistili u pacientů se sepsí. Hodnoty kontrolní skupiny byly ve fyziologických mezích. V kontrolní skupině pacientů po kardiochirurgickém zákroku (medián 19%, 25. percentil 17%, 75. percentil 21%), ve skupině pacientů se sepsí byly lymfocyty nižší (medián 10%, 25. percentil 5%, 75. percentil 15%) Graf č. 9.

U skupiny pacientů po kardiochirurgické operaci jsme zjistili korelaci mezi:

sTREM a fagocytární aktivitou granulocytů; Spearman rho 0,597; $p = 0,04$

sTREM a CRP; Spearman rho 0,539; $p = 0,03$

Expresí TREM-1 na monocytech a lymfocyty; Spearman rho 0,609; $p = 0,006$

Expresí TREM-1 na granulocytech a leukocyty; Spearman rho 0,491; $p = 0,03$

Fagocytární aktivitou granulocytů a leukocyty; Spearman rho -0,629; $p = 0,01$

U skupiny pacientů se sepsí jsme zjistili korelace mezi:

PCT a sTREM ; Spearman rho 0,384; $p = 0,002$

PCT a CRP; Spearman rho 0,513; $p < 0,00001$

FoxP3+ T reg a expresí TREM-1 na monocytech; Spearman rho -0,324; $p = 0,008$

FoxP3+ T reg a expresí TREM-1 na granulocytech; Spearman rho -0,267; $p = 0,03$

Expresí TREM-1 na monocytech a expresí TREM-1 na granulocytech; Spearman rho 0,553; $p < 0,00001$

Expresí TREM-1 na granulocytech a CRP; Spearman rho -0,252; $p = 0,04$

Fagocytární aktivitou granulocytů a leukocyty; Spearman rho -0,396; $p = 0,004$

Fagocytární aktivitou granulocytů a lymfocyty; Spearman rho 0,474; $p = 0,0006$

Leukocyty a lymfocyty; Spearman rho -0,474; $p = 0,0001$

3.4. DISKUZE

Cílem mé práce bylo srovnání vybraných parametrů - PCT, CRP, Treg, sTREM-1, exprese TREM-1 na monocytech, exprese TREM-1 na granulocytech, fagocytární aktivity granulocytů, leukocytů a lymfocytů a jejich význam v diferenciální diagnostice systémové zánětlivé odpovědi infekční a neinfekční etiologie. V naší práci jsme prokázali, že PCT je více senzitivní a specifický parametr systémového infekčního zánětu ve srovnání s CRP. Ačkoli hodnoty PCT byly zvýšeny v obou skupinách proti fyziologickým hodnotám (0,5 ng/ml), jednoznačně vyšší koncentrace PCT byly ve skupině pacientů se sepsí. Naproti tomu koncentrace CRP byly bez statisticky významného rozdílu u obou skupin. Z těchto výsledků jednoznačně vyplývá, jak důležité je hodnocení významu biomarkerů ve vztahu k různým cílovým skupinám pacientů. Naše výsledky se shodují s jinými uveřejněnými studiemi.^{77,78,79}

Neprokázali jsme statisticky významný rozdíl v počtu FoxP3+ T regulačních lymfocytů u obou skupin. Francouzští autoři zjistili zvýšené výsledky FoxP3+ T regulačních lymfocytů u pacientů v septickém šoku.⁸⁰ Rozdíl v obou studiích můžeme komentovat jako důsledek kvalitativně jiného klinického stavu, který představuje septický šok.

Neprokázali jsme statisticky významný rozdíl sTREM u pacientů se sepsí a kontrolní skupinou, ačkoli v určitých situacích je sTREM považován za specifický indikátor infekční etiologie, např. u pacientů s pneumonií v BAL.⁸¹ Toto zjištění ukazuje, že chirurgický zákrok je také významným spouštěcím mechanismem pro expresi sTREM. V dalších studiích bude vhodné se zaměřit na významnost tohoto biomarkeru v různých analytech při ne-/přítomnosti infekce.

Expresí TREM-1 na monocytech i exprese TREM-1 na granulocytech byla významně vyšší u kontrolní skupiny než u pacientů se sepsí. Tyto výsledky nejsou překvapující a jsou v souladu s našimi prvotními zkušenostmi. Prokazují schopnost kardiochirurgické operace indukovat expresi TREM-1 na obou populacích bez přítomnosti infekce.

Fagocytární aktivita granulocytů je funkční test, u kterého jsme neprokázali statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a pacienty se sepsí.

Počet leukocytů byl statisticky významně vyšší u pacientů se sepsí. Počet lymfocytů byl statisticky významně nižší u pacientů se sepsí. Zejména lymfopenie se ukázala jako významný parametr infekční etiologie podobně jako ve studii slovenských autorů.⁸²

V obou skupinách jsme zjistili relativně velké množství korelací mezi jednotlivými parametry. Zajímavým nálezem je prokázaná korelace mezi FoxP3+ T regulačními lymfocyty

a expresí TREM-1 na monocytech a granulocytech. Tento nálezu ukazuje na možnou souvislost regulačních mechanismů zprostředkovaných T regulačními lymfocyty a aktivačními signály, které postihují celkovou populaci leukocytů. S nálezem koresponduje korelace exprese TREM-1 na monocytech a exprese TREM-1 na granulocytech.

V souladu s klinickým pozorováním je korelace mezi fagocytární aktivitou granulocytů a leukocytů nebo lymfocytů. Se zhoršením klinického stavu, které je provázeno zvýšeným počtem leukocytů a snížením počtu lymfocytů, dochází ke snížení funkční schopnosti granulocytů pohlcovat infekční agens.

Z praktického hlediska bych chtěla upozornit na negativní korelaci leukocytů a lymfocytů, což jen podtrhuje významnost naprosto jednoduchých a finančně jednoduchých testů při monitorování kriticky nemocných pacientů.

Podobné, nicméně ne zcela identické spektrum korelací vyšetřených biomarkerů ve skupině kardiologických pacientů naznačuje, že závažné operační trauma, jakým je například kardiologická operace, vede: 1) k nespecifické aktivaci imunitního systému; 2) mechanismy, které se v tomto případě uplatňují, nejsou identické s mechanismy systémové zánětlivé odpovědi infekční etiologie.

3.5. ZÁVĚR

Rozlišení infekční a neinfekční etiologie systémové zánětlivé odpovědi je diagnosticky složité. Sepsis i kardiologická operace vedou k aktivaci systému vrozené a adaptivní imunity, přičemž tato aktivace má podobné projevy v produkci biomarkerů, které používáme v diagnostice. Prokázali jsme vyšší senzitivitu a specifitu PCT ve srovnání s CRP v diagnostice infekční systémové zánětlivé odpovědi. Parametry sTREM-1, TREM-1 na monocytech, TREM-1 na granulocytech a FoxP3+ T regulačních lymfocytů neumožňují diferenciální diagnostiku infekční a neinfekční etiologie u vyšetřovaných skupin pacientů. Stanovení leukocytů a lymfocytů u pacientů se sepsí je užitečným parametrem vzhledem k závažnosti klinického stavu. Kardiologická operace je významným podnětem k zánětlivé odpovědi neinfekční etiologie.

SEZNAM LITERATURY

1. **Andersen TH, Jensen TH, Andersen LW.** Adjunctive therapy of severe sepsis and septic shock in adults. *Current Anaesthesia & Critical Care* 2009; 20: 254–258 .
2. **Poehlmann H, Schefold J C, Zuckermann-Becker H, Volk H D, Meisel CH.** Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care* 2009; 13: 1-12.
3. **Melichová J.** NK buňky jako základní kámen přirozené imunity. *Bakalářská práce* 2009; 9-10.
4. **Jastrow KM, Gonzalez EA, McGuire MF, Suliburk JW, Kozar RA, Iyengar S, Motschall DA, McKinley BA, Moore FA, Mercer DW.** Early Cytokine Production Risk Stratifies Trauma Patients for Multiple Organ Failure. *J Am Coll Surg* 2009; 209: 320-331.
5. **Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M.** The Epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348: 1546-54.
6. **Shelley O, Murphy T, Lederer JA, Paterson H, Mannick JA.** Interaction Between the Innate and Adaptive Immune Systems is Required to Survive Sepsis and Control Inflammation After Injury. *Shock* 2003; 20: 123-129.
7. **Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ.** Building an immune system from nine domains. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1437–1444.
8. **van der Poll T, Ospal SM.** Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 32-43.
9. **Xiang M, Fan J.** Pattern Recognition Receptor–Dependent Mechanisms of Acute Lung Injury. *Mol Med* 2010; 16: 69-82.

10. **Castellheim A, Brekke OL, Espevik T, Harboe M, Mollnes TE.** Innate Immune Responses to Danger Signals in Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis. *Scand J Immunol* 2009; 69: 479-491.
11. **Trinchieri G, Sher A.** Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 179-190.
12. **Becker CE, O'Neill LA.** Inflammasomes in inflammatory disorders: the role of TLRs and their interactions with NLRs. *Semi Immunopathol* 2007; 29: 239-248.
13. **Basu S, Fenton MJ.** Toll-like receptors: function and roles in lung disease. *Am J Physiol Lung Celr Mol Physiol* 2004; 286: 887-892.
14. **Franchi L, Park J, Shaw MH, Marina-Garcia N, Chen G, Kim Y, Núñez G.** Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiol* 2008; 10: 1-8.
15. **Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, Flavell RA, Girardin SE, Godzik A, Harton JA, Hoffman HM, Hugot J, Inohara N, MacKenzie A, Maltais LJ, Nunez G, Ogura Y, Otten LA, Philpott D, Reed JC, Reith W, Schreiber S, Steimle V, Ward PA.** The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* 2008; 28: 285–287.
16. **Kanneganti TD, Lamkanfi M, Núñez G.** Intracellular NOD-like Receptors in Host Defense and Disease. *Immunity* 2007; 27: 549-559.
17. **Cambi A, Gijzen K, de Vries, JM, Torensma R, Joosten B, Adema GJ, Netea MG, Kullberg BJ, Romani L, Figdor C G.** The C-type lectin DCSIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Europ J Immunol* 2003; 33: 532-538.
18. **Cambi A, Figdor CG.** Levels of coplexity in pathogen recognition by C-type lectins. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 345-351.

19. **Gadjeva M, Takahashi K, Thiel S.** Mannan-binding lectin a soluble pattern recognition molecule. *Mol Immun* 2004; 41: 113–121.
20. **Dzwonek AB, Neth OW, Thiebaut R, Gulczynska E, Chilton M, Hellwig T, Bajaj-Elliott M, Hawdon J, Klein NJ.** The role of mannose-binding lectin in susceptibility to infection in preterm neonates. *Pediatr Res* 2008; 63: 680–685.
21. **Kawai T, Akira S.** The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 2009; 21: 317-337.
22. **Yoneyama M, Fujita T.** RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol Rev* 2009; 227: 54-65.
23. **Medzhitov R, Janeway Ch.** Innate immunity. *N Eng J Med* 2000; 343: 338-344.
24. **Schedvins P, Hjelmstrom P.** Chemokines a hope of specific anti-inflammatory treatment. *Läkartidningen* 2002; 99: 1056-1059.
25. **Hopkins AM, Baird AW, Nusrat A.** ICAM-1: targeted docking for exogenous as well as endogenous ligands. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56: 763-778.
26. **Laudes IJ, Guo RF, Riedemann NC, Speyer C, Craig R, Sarma JV, Ward PA.** Disturbed homeostasis of lung intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 during sepsis. *Am J Pathol* 2004;164:1435-1445.
27. **Tamagawa E, Bai N, Morimoto K, Gray C, Mui T, Yatera K, Zhang X, Xing L, Li Y, Laher I, Sin DD, Man SF, van Eeden SF.** Particulate matter exposure induces persistent lung inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Physiol* 2008; 295: 79-85.
28. **Van Amersfoort ES, Van Barkel TJ, Kuiper J.** Receptors, mediators, and mechanism involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 379-414.

29. **Groeneveld AB, Bossink AW, van Mierlo GJ, Hack CE.** Circulating inflammatory mediators in patients with fever: predicting bloodstream infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 1189-1195.
30. **Villar J, Pérez-Méndez L, Espinosa E, Flores C, Blanco J, Muriel A, Basaldúa S, Muros S, Blanch L, Artigas A, Kacmarek RM.** Serum lipopolysaccharide binding protein levels predict severity of lung injury and mortality in patients with severe Sepsis. *PLoS One* 2009; 4: 6818.
31. **Alexander JJ, Anderson AJ, Barnum SR, Stevens B, Tenner AJ.** The complement cascade: Yin–Yang in neuroinflammation – neuro-protection and –degeneration. *J Neurochem* 2008; 107: 1169–1187.
32. **Larson DF, Horak K.** Macrophage migration inhibitory factor: controller of systemic inflammation. *Crit Care* 2006; 10: 138.
33. **Ding XZ, Fernandez-Prada CM, Bhattacharjee AK, Hoover DL.** Overexpression of hsp-70 inhibits bacterial lipopolysaccharide-induced production of cytokines in human monocyte-derived macrophages. *Cytokine* 2001; 16: 210–219.
34. **Reada S, Malmströma V, Powrie F.** Cytotoxic T Lymphocyte–Associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of Cd25⁺Cd4⁺ Regulatory Cells That Control Intestinal Inflammation. *J Exp Med* 2000; 192: 295-302.
35. **Tilley SL, Coffman TM, Koller BH.** Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* 2001; 108: 15-23.
36. **Kamperschroer C, Roberts DM, Zhang Y, Weng N, Seain SL.** SAP enables T cells to help B cells by a mechanism distinct from Th cell programming or CD40 ligand regulation. *J Immunol* 2008; 181: 3994-4003.

37. **Muller-Werdan U, Buerke M, Ebelt H, Heinroth KM, Herklotz A, Loppnow H, Ruß M, Schlegel F, Schlitt A, Schmidt HB, Söffker G, Werdan K.** Septic cardiomyopathy – A not yet discovered cardiomyopathy? *Exp Clin Cardiol* 2006; 11: 226-23.
38. **Jeyaseelan S, Chu HW, Young SK, Freeman MW, Worthen GS.** Distinct Roles of Pattern Recognition Receptors CD14 and Toll-Like Receptor 4 in Acute Lung Injury. *Infect Immun* 2005; 73: 1754-1763.
39. **Adib-Conquy M, Cavaillon JM.** Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS Letters* 2007; 581: 3723–3733.
40. **Hayashida K, Chen Y, Bartlett AH, Park PW.** Syndecan-1 is an in vivo suppressor of gram-positive toxic shock. *J Biolog Chem* 2008; 283: 19895-19903.
41. **Parker RS, Clermont G.** Systems engineering medicine: engineering the inflammation response to infectious and traumatic challenges. *J Royal Soc Inter* 2010; 7: 989-1013.
42. **Akrouf N, Sharshar T, Annane D.** Mechanisms of Brain Signaling During Sepsis. *Curr Neuropharm* 2009; 7: 296-301.
43. **Alper Y, Kilic I, Tez M.** Sepsis and multiple organ failure represent a chaotic adaptation to severe stress which must be controlled at nanoscale. *Crit Care* 2009; 13: 424.
44. **Kumpf O, Schumann RR.** Genetic influence on bloodstream infections and sepsis. *Internat J Antimicrob Agents* 2008; 32: 44-50.
45. **Carré J E, Singer M.** Cellular energetic metabolism in sepsis: The need for a systems approach. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1777: 763–771.
46. **Aird WC.** The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 2003; 101: 3765-3777.

47. **Sriskandan S, Ferguson M, Elliot V, Faulkner L, Cohen J.** Human intravenous immunoglobulin for experimental streptococcal toxic shock: bacterial clearance and modulation of inflammation. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 117–124.
48. **Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG.** Circulating Cytokine/Inhibitor Profiles Reshape the Understanding of the SIRS/CARS Continuum in Sepsis and Predict Mortality. *J Immunol* 2006, 177: 1967-1974.
49. **Ward NS, Casserly B, Ayala A.** The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med* 2008; 29: 617-625
50. **Reinhart K.** Diagnosis of sepsis: novel and conventional parameters. *Minerva Anesthesiol* 2001; 67: 675-82.
51. **Punyadeera CH, Schneider EM, Schaffer D, Hsu H, Joos T, Kriebel F, Weiss M, Verhaeh WFJ.** A biomarker panel to discriminate between systemic inflammatory response syndrome and sepsis and sepsis severity. *J Emerg Trauma Shock* 2010; 3: 26-35.
52. **Raghavan M, Marik P E.** Management of sepsis during the early “golden hours”. *J Emerg Med* 2006; 7: 185-199.
53. **Summah H, Qu J.** Biomarkers: a definite plus in pneumonia. *Mediators Inflamm* 2009; 2009: 675753.
54. **Shehabi Y, Seppelt I.** Pro/Con debate: Is procalcitonin useful for guiding antibiotic decision making in critically ill patients? *Crit Care* 2008; 12: 211.
55. **Seperme S,Chenevier-Gobeaux C, Doumenc B, Ray P.** Usefulness of B Natriuretic Peptides and Procalcitonin in Emergency Medicine. *Biomark Insights* 2008; 3: 203–217.

56. **Meisner M.** Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin. *Clin Chim Acta* 2002; 323: 17-29.
57. **Martinot M, Hansmann Y, De Martino S, Lesens O, Coumaros G, Pencreach E, Bertrand M, Christmann D.** Procalcitonin in pyelonephritis and acute community-acquired pneumonia in adults. *Presse Med* 2001; 30: 1091-6.
58. **Hakobyan S, Harris CL, van den Berg CW, Fernandez-Alonso MC, Goicoechea de Jorge E, Rodriguez de Cordoba S, Rivas G, Mangione P, Pepys MB, Morgan BP.** Complement Factor H Binds to Denatured Rather than to Native Pentameric C-reactive Protein. *J Biol Chem* 2008; 283: 30451-30460.
59. **Bíró A, Rovó Z, Papp D, Cervenak L, Varga L, Füst G, Thielens NM, Arlaud GJ, Prohászka Z.** Studies on the interactions between C-reactive protein and complement proteins. *Immunology* 2007; 121: 40-50.
60. **Taylor KE, van den Berg CW.** Structural and functional comparison of native pentameric, denatured monomeric and biotinylated C-reactive protein. *Immunology* 2007; 120: 404-411.
61. **Xia D, Samols D.** Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 2575–2580.
62. **Sharif O, Knapp S.** From expression to signaling: Roles of TREM-1 and TREM-2 in innate immunity and bacterial infection. *Immunobiology* 2008; 213: 701–713.
63. **Ford JW, McVicar DW.** TREM and TREM-like Receptors in Inflammation and Disease. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 38-46.
64. **Colonna, M.** TREMs in the immune system and beyond. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 445–453.

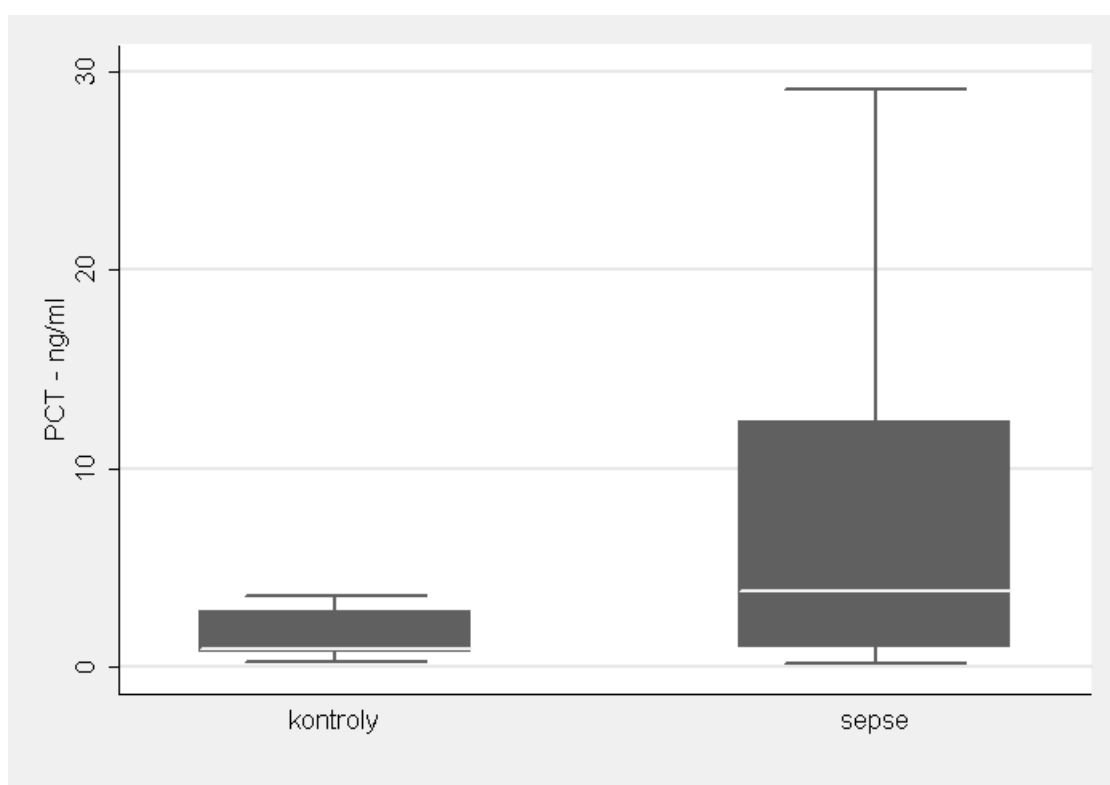
65. **Cella M, Buonsanti C, Strader C, Kondo T, Salmaggi A, Colonna M.** Impaired differentiation of osteoclasts in TREM-2-deficient individuals. *J Exp Med* 2003; 198: 645–651.
66. **Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M.** TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 2001; 410: 1103–1107.
67. **Kelker MS, Foss TR, Peti W, Teyton L, Kelly JW, Wüthrich K, Wilson IA.** Crystal Structure of Human Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1 (TREM-1) at 1.47 Å. *J Mol Biol* 2004; 342: 1237–1248.
68. **Dower K, Ellis DK, Saraf K, Jelinsky SA, Lin LL.** Innate Immune Responses to TREM-1 Activation: Overlap, Divergence, and Positive and Negative Cross-Talk with Bacterial Lipopolysaccharide. *J Immunol* 2008; 180: 3520–3534.
69. **Tessarz AS, Cerwenka A.** The TREM-1/DAP12 pathway. *Immunol Letters* 2008; 116: 111–116.
70. **Mahdy AM, Lowes DA, Galley HF, Bruce JE, Webster NR.** Production of Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells by Lipopolysaccharide-Stimulated Human Neutrophils Involves De Novo Protein Synthesis. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 492–495.
71. **Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M.** Immunologic self-tolerance by activated T cells expressing IL-2 receptor α chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151–64.
72. **Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB.** Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol* 2007; 8: 359–68.
73. **Zheng Y, Rudensky AY.** Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 2007; 8: 457–462.

74. **Huang LF, Yao YM, Dong N, Yu Y, He LX, Sheng ZY.** Association between regulatory T cell activity and sepsis and outcome of severely burned patients: a prospective, observational study. *Crit Care* 2010; 14.
75. **Kessel A, Bamberger E, Masalha M, Toubi E.** The role of T regulatory cells in human sepsis. *J Autoimm* 2009; 32: 211–215.
76. **Dai J, Liu B, Li Z.** Regulatory T cells and Toll-like receptors: What is the missing link? *Internat Immunopharm* 2009; 9: 528-533.
77. **Průcha M, Herold I, Zazula R, Dubská L, Kavka B, Dostál M.** Comparison of procalcitonin, interleukin-6 and C-reactive protein in the differential diagnosis of patients with sepsis syndrome in intensive care units. *Vnitřní lékařství* 2003; 49: 541-547.
78. **Spapen HD, Hachimi-Idrissi S, Corne L, Huyghens LP.** Diagnostic markers of sepsis in the emergency department. *Acta Clin Belg* 2006; 61: 138-42.
79. **Castelli GP, Pognani C, Cita M, Stuani A, Sgarbi L, Paladini R.** Procalcitonin, C-reactive protein, white blood cells and SOFA score in ICU: diagnosis and monitoring of sepsis. *Minerva Anesthesiol* 2006; 72: 69-80.
80. **Hein F, Massin F, Cravoisy-Popovic A, Barraud D, Levy B, Bollaert PE, Gibot S.** The relationship between CD4⁺CD25⁺CD127⁻ regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states. *Crit Care* 2010; 14: 132.
81. **JW, Lim CM, Koh Y, Oh YM, Shim TS, Lee SD, Kim WS, Kim DS, Kim WD, Hong SB.** Diagnostic utility of the soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bilateral lung infiltrates. *Crit Care* 2008; 12: R6.
82. **Zahorec R.** Ratio of neutrophil to lymphocyte counts--rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratislavské lékařské listy* 2001; 102: 5-14.

PŘÍLOHY

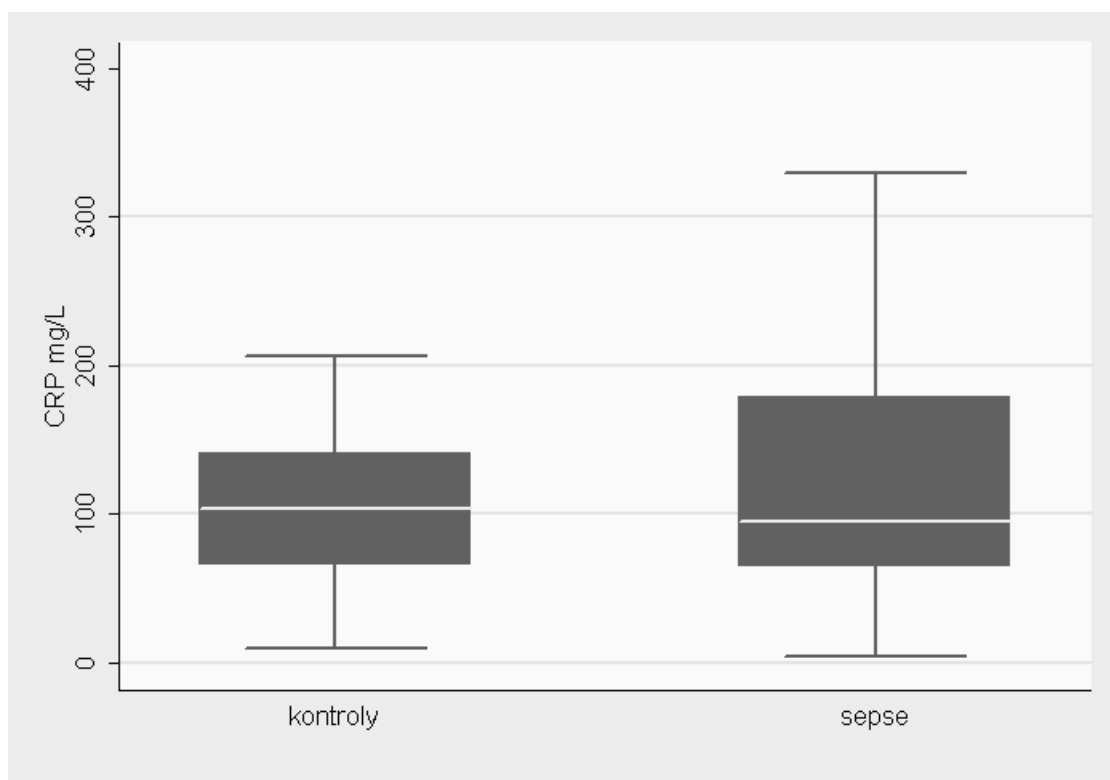
GRAFICKÉ ZNÁZORNĚNÍ VÝLEDKŮ PACIENTŮ PO KARDIOCHIRURGICKÉ OPERACI A PACIENTŮ SE SEPSÍ

Graf č. 1



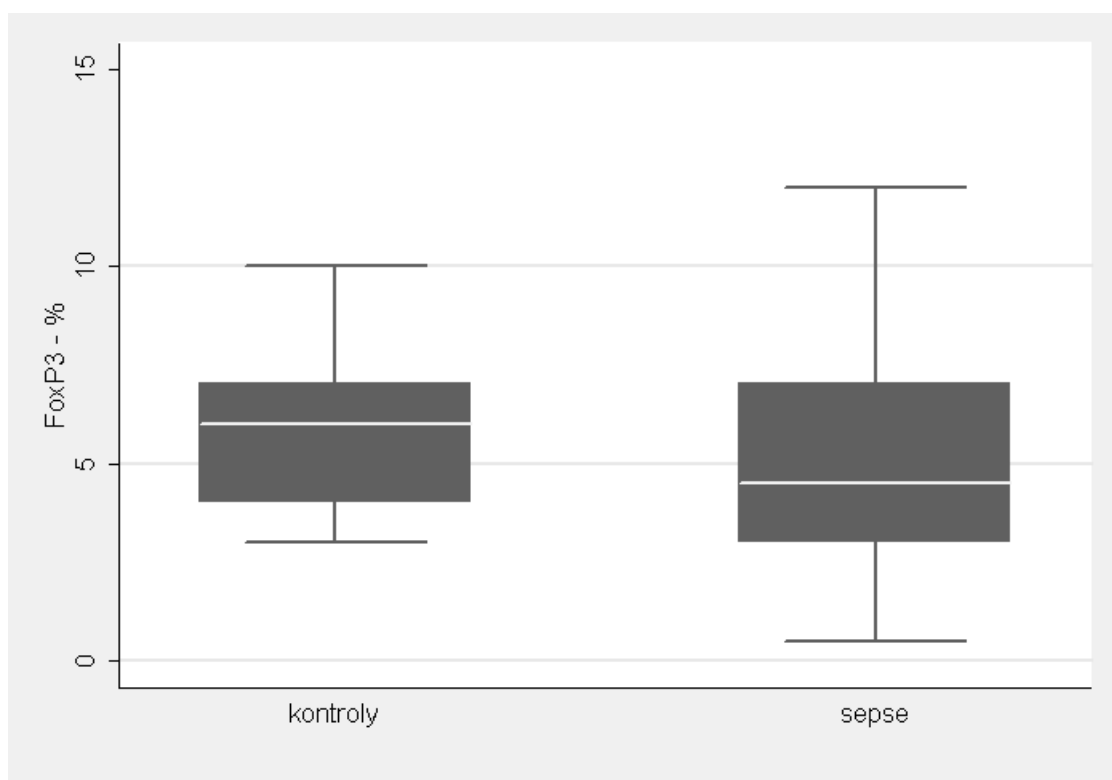
Srovnání prokalcitoninu mezi kontrolní skupinou a pacienty se sepsí; $p = 0,01$

Graf č. 2



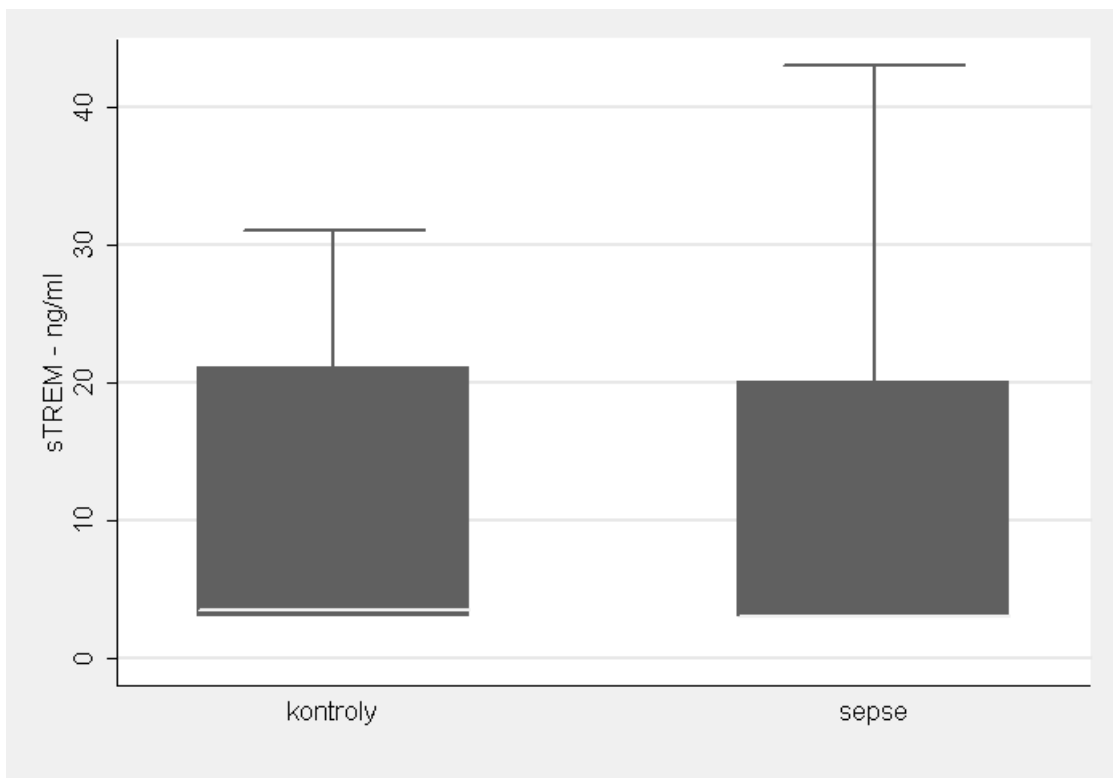
Srovnání CRP mezi kontrolní skupinou a pacienty se sepsí; $p = 0,84$

Graf č. 3



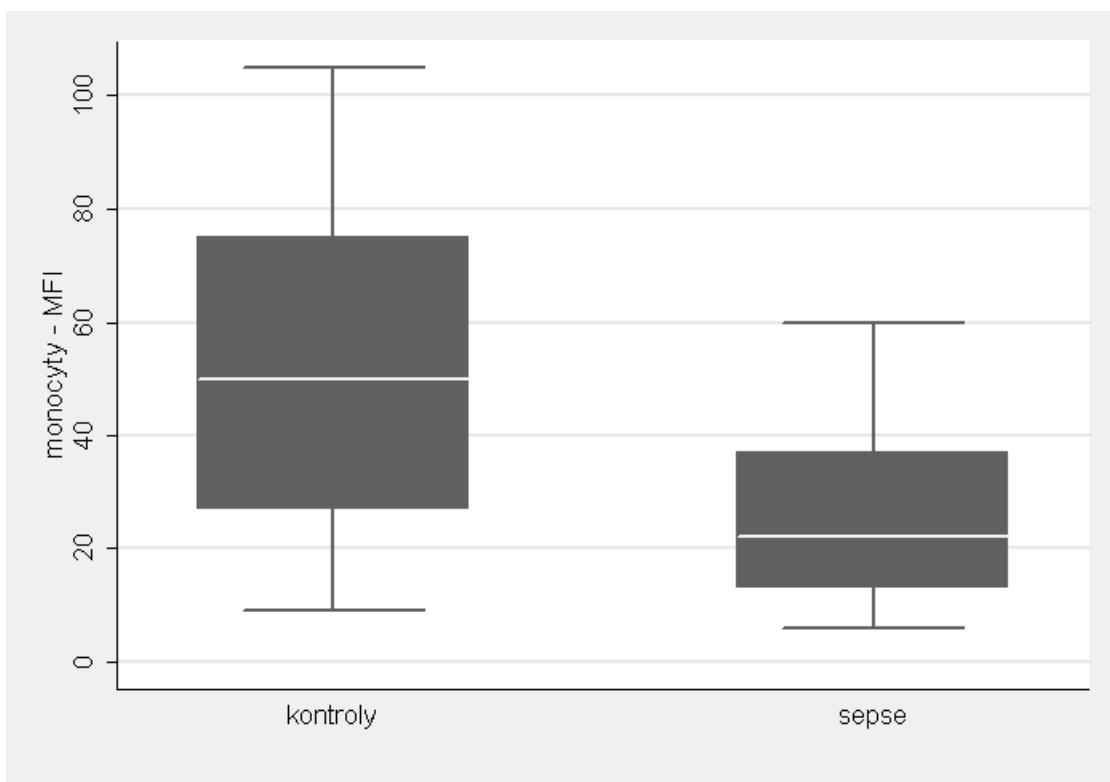
Srovnání FoxP3+ T regulačních lymfocytů mezi kontrolní skupinou a pacienty se sepsí; $p = 0,07$

Graf č. 4



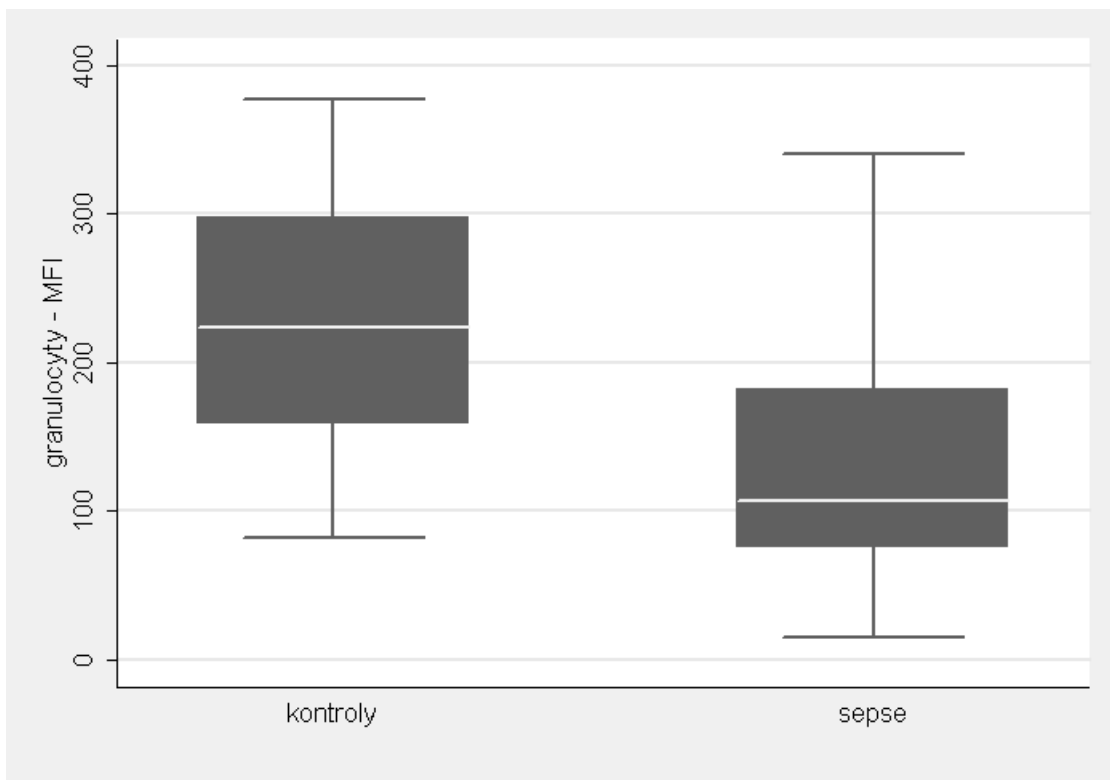
Srovnání sTREM-1 mezi kontrolní skupinou a pacienty se sepsí; $p = 0,86$

Graf č. 5



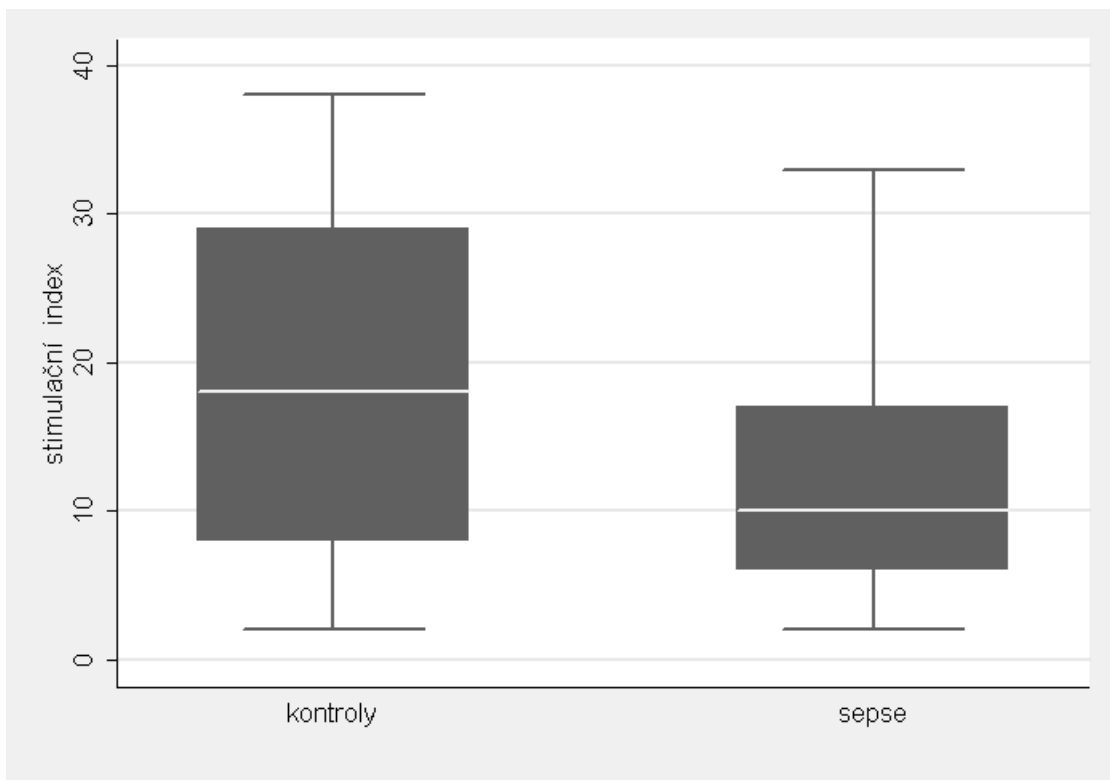
Srovnání exprese TREM-1 na monocytech mezi kontrolní skupinou a pacienty se sepsí; $p = 0,0021$

Graf č. 6



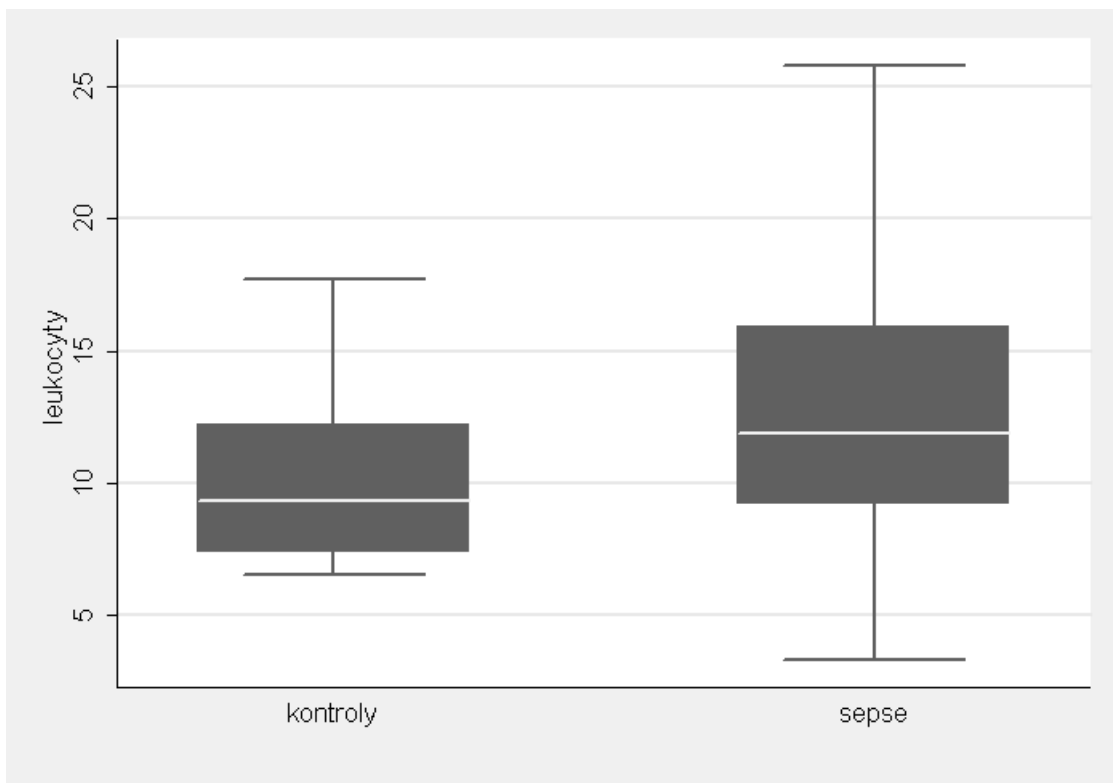
Srovnání exprese TREM-1 na granulocytech mezi kontrolní skupinou a pacienty se sepsí; $p = 0,0001$

Graf č. 7



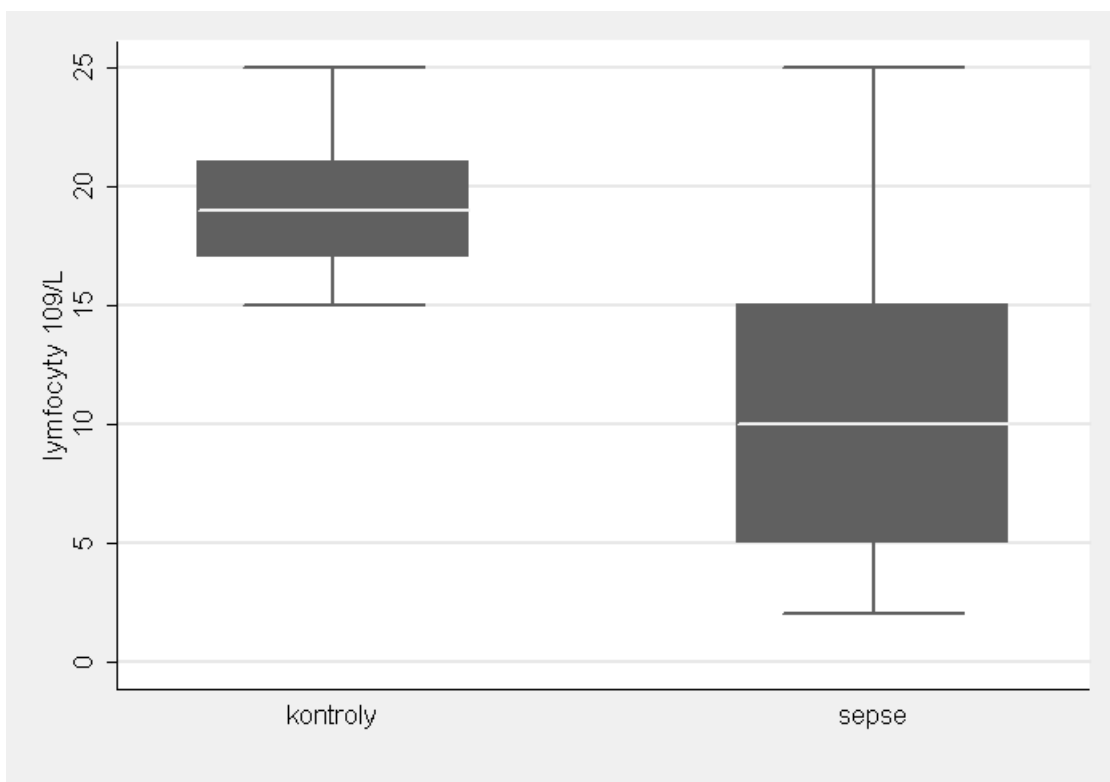
Srovnání fagocytární aktivity granulocytů mezi kontrolní skupinou a pacienty se sepsí; $p = 0,07$

Graf č. 8



Srovnání leukocytů mezi kontrolní skupinou a pacienty se sepsí; $p = 0,04$

Graf č. 9



Srovnání lymfocytů mezi kontrolní skupinou a pacienty se sepsí; $p = 0,0001$